

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

Sulfoonamiidi resistentsus prügila metaanilagunduskattes

Bakalaureusetöö

12 EAP

Aap Muromägi

Juhendajad: professor Jaak Truu

teadur Kertu Tiirik

TARTU 2025

Sulfoonamiidi resistentsus prügila metaanilagunduskattes

Antibiootikumiresistentsus prügilates on oluline osa resistentsuse üldisest levikust, kuna prügilad toimivad antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) reservuaaridena, olles sobilik keskkond ARG-ide kogunemiseks, paljunemiseks ja levimiseks. Käesolevas töös uuritakse sulfoonamiidi resistentsusgeenide (*sul1*, *sul2* ja *sul3*) arvukust ja osakaalu prügilakatte erinevates sügavustes ja looduslikus foonis ning tulemusi võrreldakse omavahel. Samuti töötati välja sobiv praimeripaar *sul3* geeni kvantifitseerimiseks.

Märksõnad: sulfoonamiid, prügilakate, resistoom, antibiootikumiresistentsus

T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

T490 Biotehnoloogia

Sulfonamide resistance in landfill biocover material

Antibiotic resistance in landfills is a significant contributor to the overall spread of resistance. Landfills function as reservoirs for antibiotic resistance genes (ARGs), providing a suitable environment for their accumulation, proliferation and dissemination. This study examines the abundance and proportions of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) at different depths of landfill cover material, comparing these findings to those from natural soils. Furthermore, a suitable primer pair and protocol for the quantification of *sul3* gene was developed.

Keywords: sulfonamide, landfill cover, resistome, antibiotic resistance

T270 Environmental technology, pollution control

T490 Biotechnology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Antibiootikumiresistentsus ja resistentsusgeenid	6
1.2. Antibiootikumidele resistentsed mikroobid keskkonnas	8
1.3. Antibiootikumiresistentsus prügilates	9
1.4. Sulfoonamiidid ja resistentsus nende suhtes	9
1.5. Meetodid antibiootikumidele resistentsete mikroobide tuvastamiseks	11
1.5.1. Kultiveerimisel põhinevad meetodid.....	11
1.5.2. Molekulaarsed meetodid.....	11
2. METOODIKA	13
2.1. Töö eesmärgid	13
2.2. Katseala kirjeldus ja proovide võtmine	13
2.3. DNA eraldamine proovidest	14
2.4. Geenide kvantifitseerimine.....	14
2.5. <i>sul3</i> geenispetsiifiliste praimerite toimivuse määramine ja reaktsioonitingimuste optimeerimine.....	16
2.6. <i>sul3</i> geeni standardi valmistamine.....	17
2.7. Andmete statistiline analüüs.....	18
3. TULEMUSED	19
3.1. <i>sul3</i> geeni kvantifitseerimise meetodika väljatöötamine.....	19
3.2. <i>sul</i> geenide arvukus ja osakaalud prügila kattes	20
3.2.1. Dispersioonanalüüsi tulemused	23
3.2.2. Studenti t-test tulemused	23
4. ARUTELU	24
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUS	30
KASUTATUD VEEBISAIDID	36
LISAD	37
LIHTLITSENTS.....	39

KASUTATUD LÜHENDID

AR – antibiootikumiresistentsus

ARG – antibiootikumiresistentsusgeen

ARM – antibiootikumiresistentne mikroob

DHPPP – 7,8-dihüdro-6-hüdroksümetüülpteriin-pürofosfaat

DHPS – dihidropteoraadi süntaas

GMP – gaasimõõtmispunkt

HGT – horistonaalne geeniülekanne (*horizontal gene transfer*)

HT-qPCR – kõrge läbilaskvusega polümeraasi ahelreaktsioon (*high-throughput polymerase chain reaction*)

KA – kuivaine

LOQ – määramispiir (*limit of quantification*)

MIC – minimaalne inhibitsiooni kontsentratsioon (*minimal inhibitory concentration*)

PABA – *p*-aminobensoehape

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

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

RPJ – reoveepuhastusjaam

SISSEJUHATUS

Antibiootikumiresistentsus on maailmas kasvav probleem. Selle tõttu tuleb mikroobsete infektsioonide ravis üha sagedamini kasutada teise või kolmanda valiku antibiootikume, või ei ole osa levinud bakteriaalsetest infektsioonidest enam üldse ravitavad (CDC, 2024). Probleem tuleneb eelkõige antibiootikumide liigsest ning valest kasutamisest, mis soodustab antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) levikut (Uddin *et al.*, 2021).

Prügilatesse ladestatakse valdavalt olmejäätmeid, mille hulgas leidub märkimisväärsel hulgal ravimeid, hügieenitooteid ja raskemetalle. Need ühendid avaldavad mikroobidele tugevat selektiivset survet ja põhjustavad stressitingimusi, mis omakorda soodustavad horisontaalse geeniülekanne (HGT) toimumist. Selle tulemusel võivad prügilad toimida antibiootikumiresistentsusgeenide reservuaaridena, toetades resistentsuse püsimist ja levikut keskkonnas (Zhang *et al.*, 2022). ARG-de keskkonda sattumise peamiseks mehhanismiks peetakse nõrgvee lekkeid prügilatest (Huang *et al.*, 2022).

Sulfoonamiidid on sünteetilised antibiootikumid, mis kuuluvad ühtede esimeste kaubanduslikult toodetud antibiootikumide hulka. Need toimivad bakterites foolhappe biosünteesi raja võtmeensüümi – dihidropteoraadi süntaasi (DHPS) – inhibiitoritena, takistades bakterite kasvu ja paljunemist (Madigan *et al.*, 2022). Kuigi sulfoonamiide looduses teadaolevalt ei esine, on resistentsus nende suhtes olnud levinud juba enne nende antibiootikumidena kasutuselevõttu, mis viitab sulfoonamiidi resistentsusgeenide (nt *sul1*, *sul2* ja *sul3*) iidsele päritolule (Bisaccia *et al.*, 2025). Nimetatud geenid kodeerivad madala afiinsusega DHPS-i variante, mis säilitavad ensümaatilise aktiivsuse ka antibiootikumi juuresolekul (Perreten ja Boerlin, 2003).

Selle uurimistöös eesmärgiks oli kvantifitseerida *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide arvukused suletud prügila metaanilagunduskatte materjalis ning seda ümbritsevas looduslikus pinnases. Sealjuures kontrolliti kirjanduses saadud *sul3* kvantifitseerimiseks vajalike geenispetsiifiliste praimerite toimivust ning töötati välja protokoll *sul3* arvukuse määramiseks keskkonnaproovidest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumiresistentsus ja resistentsusgeenid

Antibiootikumid on mikroorganismide (bakterid, seened, ainuraksed) kasvu pidurdavad või neid surmavad kemoterapeutilised ained, mida kasutatakse laialdaselt inimeste, loomade ja taimede infektsioonide raviks. Need võivad olla looduslikku päritolu või keemiliselt sünteesitud ning jaotatakse toimemehhanismi ja keemilise struktuuri alusel eri klassidesse (Kümmerer, 2009).

Antibiootikumiresistentsus (AR) on mikroobide võime ellu jääda ja paljuneda antibiootikume sisaldavas keskkonnas. AR on vana nähtus ning oli looduses laialt levinud ammu enne inimesepoolset antibiootikumide tootmist (D'Costa *et al.*, 2011). AR levik aga on tänapäeval maailmas kasvav probleem. Antibiootikumide suhtes resistentsete patogeene vastu võib olla raske või harvemini võimatu võidelda. Resistentsuse tõttu võidakse kasutada teise või kolmanda liini ravi, mis võivad olla inimese tervisele kahjulikumad (CDC, 2024). AR-i levikut soodustab antibiootikumide liigne ja vale kasutamine (Uddin *et al.*, 2021). 2022. aastal avaldatud analüüsis toodi välja hinnang, et 2019. aastal oli inimese puhul otseselt AR-ga seotud surmasid 1,27 miljonit (Murray *et al.*, 2022).

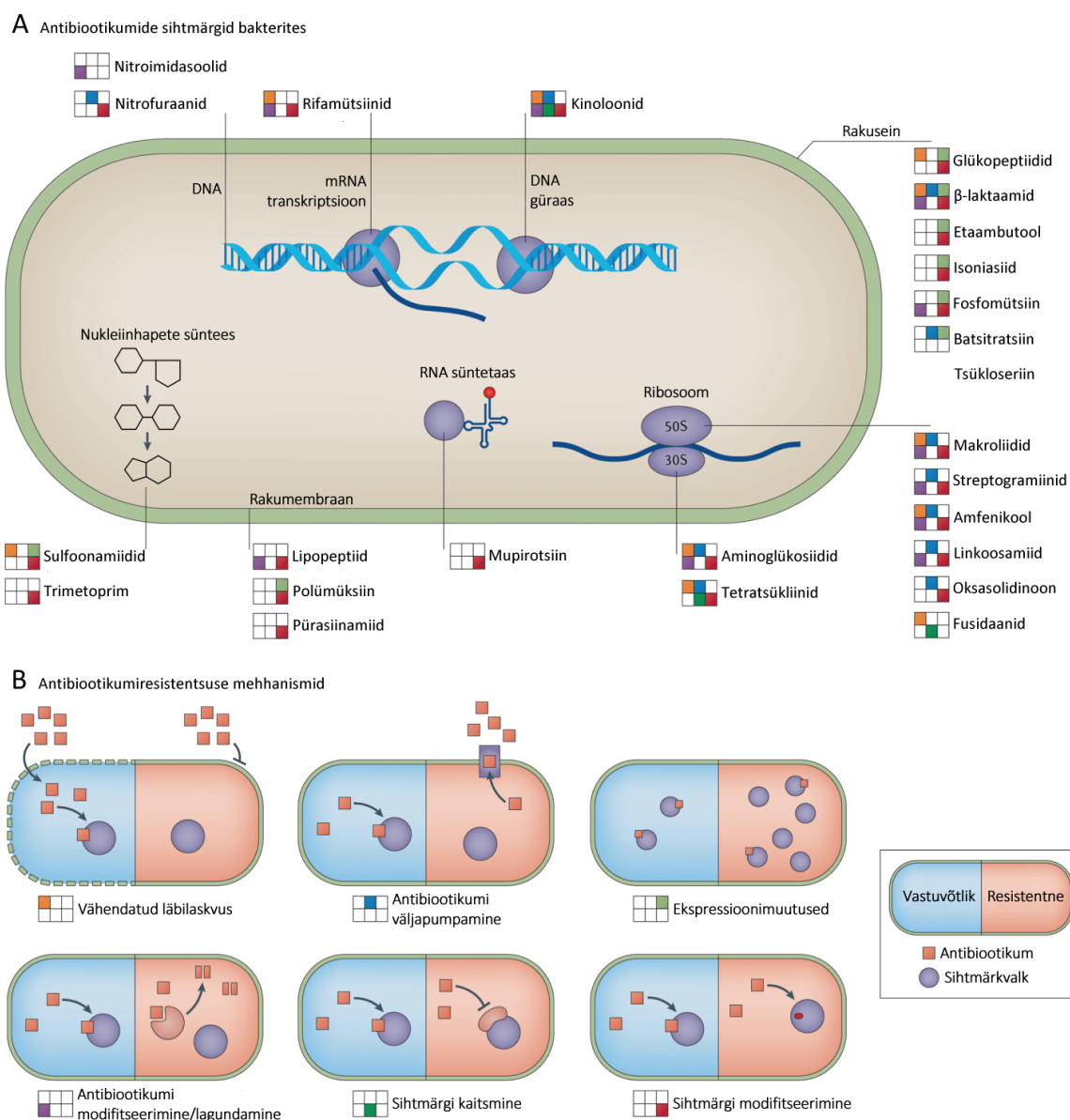
Antibiootikumiresistentsusel on mitmeid mehhanisme, mida saab jagada nelja peamisesse rühma: (1) antibiootikumi sisenemise takistamine rakku, (2) antibiootikumi sihtmärgi muutmine, (3) antibiootikumi inaktiveerimine ning (4) aktiivne väljapumpamine rakust (Reygaert, 2018). Erinevaid antibiootikumide sihtmärke ning AR mehhanisme on kujutatud joonisel 1.

Gramnegatiivsete bakteritel on olemas välismembraan, mis on võrreldes rakumembraaniga madala läbilaskvusega, kaitstes bakterit toksiliste ainete sissetungi eest. Ained, sealhulgas antibiootikumid, läbivad välismembraani poriinide abil, mis võivad oma spetsiifika tõttu takistada nende rakku pääsemist. Siiski, välismembraani olemasolu ei välista antibiootikumide rakku pääsemist täielikult, kuid AR-i saab tagada kombineeritult teiste mehhanismidega (Cox ja Wright 2013).

Bakteritel on olemas valgulised pumbad, mis olenevalt tüübist transpordivad rakust välja erinevaid toksilisi ühendeid, sealhulgas antibiootikume. Pumbad võivad olla ühe aine suhtes spetsiifilised või ka transportida paljusid erinevaid. Võime antibiootikume transportida ja tagada tugev resistentsus tuleneb üldiselt muutustest pumba kanali struktuuris (Reygaert, 2018).

Antibiootikumi inaktiveerimise korral lisatakse antibiootikumile ensüümide abil keemilisi funktsionaalrühmi või antibiootikum hävitatakse, mille lõpptulemusena antibiootiline aine kaotab oma funktsiooni (Uddin *et al.*, 2021).

Muutused antibiootikumi sihtmärkides tulenevad mutatsioonidest. Selle tulemusena väheneb sihtmärkvalgu afiinsus antibiootikumi suhtes ning antibiootikum enam valgule nii hästi ei seonu või ei seonu peaaegu üldse (Uddin *et al.*, 2021). Selle mehhanismiga toimivad *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide tagatud sulfoonamiidi resistentsus, mis on täpsemalt kirjeldatud alapeatükis 1.4.



Joonis 1. Erinevate antibiootikumiklasside sihtmärgid ning resistentsusmehhanismid. **A** osas on välja toodud erinevaid antibiootikumide klassid ning nende sihtmärgid bakterirakus. Antibiootikumiklasside ees olevad värvilised ruudud tähistavad neile omaseid antibiootikumiresistentsuse mehhanisme, mis on näidatud osas **B**. Lisaks mehhanismidele on **B** osas kujutatud sinisel poolel antibiootikumitundlikku bakterirakku, punasel poolel antibiootikumiresistentset bakterirakku. Joonis on modifitseeritud Boolchandani *et al.* (2019) tööst.

Antibiootikumiresistentsuse geneetiliseks aluseks on antibiootikumiresistentsusgeenid (ARG), mis kodeerivad valke, mis takistavad antibiootikumi toimimist. Sarnaselt AR-ile on ARG-de esinemine looduses tavaline ning iidne nähtus, mida kinnitavad näiteks igikeltsast leitud ARG-d (Bisaccia *et al.*, 2025; D'Costa *et al.*, 2011). ARG-d võivad tekkida mutatsioonide kaudu (Martínez *et al.*, 2014). Samuti levivad ARG-d ühest rakust teise HGT kaudu, mis võib toimuda erinevate liikide vahel ning omakorda sattuda inimese patogeenidesse (Forsberg *et al.*, 2012). HGT erinevateks mehhanismideks on näiteks transformatsioon, konjugatsioon, transduktsioon ja transpositsioon (Lutsar *et al.*, 2017).

Resistoom (ingl *resistome*) hõlmab kogu mikroobikoosluses või üksikgenoomis leiduvat antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG-de) varamut koos potentsiaalsete eellasjärjestuste ja nendega seotud mobiilsete elementidega (Wright, 2007).

Loomupärane (ingl *intrinsic*) resistentsus on liigispetsiifiline ja paikneb bakterite põhigenoomis (nt *Pseudomonas aeruginosa* vähese läbilaskvusega välismembraan), moodustades iga liigi „tuumresistoomi“. Omandatud resistentsus lisandub mutatsioonide või horisontaalse geeniülekanne kaudu ning kujundab resistoomi dünaamilise, mobiilsete elementidega osa, millesse kuuluvad plasmiididel, transposoonidel ja integronidel paiknevad ARG-d (nt *sul* geenid).

1.2. Antibiootikumidele resistentsed mikroobid keskkonnas

Antibiootikumiresistentsus on keskkonnas looduslik nähtus, mis eksisteeris juba enne inimtegevusega seotud antibiootikumide tootmist (Larsson ja Flach, 2021). Kuigi antibiootikumid olid olemas enne inimesepoolset masstootmist (D'Costa *et al.*, 2011), avaldus nende toime tõenäoliselt vaid looduslike antibiootikumi tootjate vahetus läheduses ning suuremad mikroobikooslused tervikuna antibiootikumidega olulises koguses eriti kokku ei puutunud. Pärast antibiootikumide masstootmise algust 2. maailmasõja ajal aga satub neid erinevatel viisidel rohkelt keskkonda, mis omakorda soodustab AR-i ja ARG-de levikut (Gaynes, 2017; Larsson ja Flach, 2021).

Tänapäeval kujutab keskkonna resistoom endast nii looduslikes (nt pinnas, mage- ja merevesi) kui ka inimtekkelistes keskkondades (nt reoveepuhastusjaamad, prügilad, sönnikuhoidlad) esinevate antibiootikumiresistentsusgeenide, nende kandjate (mikroobid) ja mobiilsete geneetiliste elementide (mobiloom) koondit, mis toimib esmaste reservuaaridena kliinilisse keskkonda jõudvatele resistentsusgeenidele (Larsson ja Flach, 2021).

Olulisteks ARG-de allikateks on nii inimesest kui ka loomadest pärinevad fekaalsed jäätmed (Larsson ja Flach, 2021; Yin *et al.*, 2023). Tasub märkida, et eriti suur mõju on just loomakasvatusel, kuna 73% antibiootikumidest maailmaturul kasutatakse just loomade ravimiseks (Van Boeckel *et al.*, 2019). Loomakasvatuses tekkivat sõnnikut kasutatakse tihti põldudel ja rohumaadel väetisena, mille kaudu pääsevad sõnnikus olevad ARG-d pinnasesse, sealt edasi veekogudesse ja põhjavette või isegi põllul kasvatatavale toodangule. Reovett, mille hulgas võib olla fekaalseid jäätmeid, ravimitööstuse jääke, aga ka prügilala nõrgvett, suunatakse reoveepuhastusjaamadesse (RPJ). RPJ-d on ARG-de kogunemispaiaks ning reservuaariks. Reovee puhastamine ei suuda ARG-sid täielikult eemaldada, mille tulemusena jõuavad ARG-d koos puhastatud veega suurematesse veekogudesse. Sel puhul võivad ARG-d puutuda kokku inimesega ning inimese mikrobiomiga, näiteks joogivee kaudu (Yin *et al.*, 2023).

1.3. Antibiootikumiresistentsus prügilates

Prügilad on olulised antibiootikumiresistentsete mikroobide (ARM) ja ARG-de reservuaarid. Prügilasse toodavast materjalist moodustab üle poole olmeprügi, milles on olulisel hulgal ravimeid, hügieenitooteid, orgaanilisi ühendeid ja raskemetalle. Antibiootikumid satuvad prügilatesse eelkõige tootmisjääkide ning kasutamata jäänud või aegunud ravimite kaudu. Need reoained avaldavad mikroobidele selektiivset survet ja soodustavad HGT toimumist, mis soodustab ARG-de levikut (Zhang *et al.*, 2022). Prügilates olev orgaaniline materjal varustab mikroobe kasvuks vajaliku süsiniku ja energiaga (Gao *et al.*, 2021).

Prügilala põhja koguneb nõrgvesi, mis võib lekkida vettpidava kihi puudumisel põhjavette. Nõrgvee prügilast lekkimine on üks peamisi viise, kuidas ARG-d ja ARM-d prügilast ümbritsevasse keskkonda jõuavad. Nõrgvett võidakse koguda ning seda puhastada, tänu millele väheneb mitte ainult ARG-de, aga ka raskemetallide hulk. Seega prügilala nõrgvee puhastamine on üheks oluliseks viisiks vähendamaks AR-i levikut antropogeenset keskkonnast loodusesse (Huang *et al.*, 2022).

1.4. Sulfoonamiidid ja resistentsus nende suhtes

Sulfoonamiidid moodustavad keemiliste ühendite rühma, mis sisaldavad ühise tunnusega sulfoonamiidset funktsionaalrühma ($-SO_2NH_2$). Olenevalt sulfoonamiidide kui ravimite funktsioonist oleneb ka nende kasutusala, mis jaotatakse antibiootilisteks sulfoonamiidideks ja mitteantibiootilisteks sulfoonamiidideks. Antibiootilisi sulfoonamiide kasutatakse bakteriaalsete infektsioonide raviks. Mitteantibiootilisi sulfoonamiide kasutatakse mitmete muude haiguste korral, näiteks diureetikuna, diabeedi ja põletikuvastaseks raviks (Ovung ja

Bhattacharyya, 2021). Esimese antibiootilise sulfoonamiidina võeti kasutusele 1933. aastal Prontosil (Blake, 1940; Lutsar *et al.*, 2017). Sulfoonamiide tunti juba varem, millest esimene, sulfaniilamiid, sünteesiti 1906. aastal, kuid enne Prontosili ei tuntud sulfoonamiidide antibakteriaalseid omadusi (Ovung ja Bhattacharyya, 2021).

Imetajatel sulfoonamiidide manustamisel suurt osa ei metaboliseerita, seetõttu pääsevad need uriini ja väljaheidete kaudu oma algsel kujul keskkonda (Ovung ja Bhattacharyya, 2021). Sulfoonamiide kasutatakse laialdaselt nii inimeste ravimisel kui ka veterinaarmeditsiinis, mille tõttu peamisteks sulfoonamiidide allikaks on haiglad ja loomafarmid (Managaki *et al.*, 2007).

Antibakteriaalsed sulfoonamiidid on sünteetilised bakteriostaatilised antibiootikumid. Sulfoonamiidid mimikeerivad ning asendavad vitamiin B₉ ehk foolhappe sünteesi rajas para-aminobensoehapet (PABA), mille tulemusena ei suuda bakterid toota foolhapet (Madigan *et al.*, 2022). Täpsemalt, sulfoonamiidide sihtmärgiks on ensüüm dihidropteraadi süntaas (DHPS). DHPS katalüüsib reaktsiooni PABA-st 7,8-dihüdro-6-hüdroksümetüülpteriiin-pürofosfaadi (DHPPP) saamiseks. Kui ensüümi aktiivtsentrisse seondub PABA asemel antibiootikum, inhibeerib see ensüümi tööd ning DHPPP-d enam ei sünteesita (Sköld, 2000). Foolhappe puuduse tagajärjel häirub bakteri kasv. Peremeesrakud foolhapet ise ei tooda, vaid transpordivad seda rakku valmiskujul. Tänu sellele sulfoonamiidid imetajarakkudele samasugust mõju nagu bakteritele ei avalda (Madigan *et al.*, 2022). Seevastu, nagu iga ravimiga, esineb sulfoonamiididel kõrvalmõjusid ja ka allergiaid ning on täheldatud, et sulfoonamiidid on olenevalt ravimist imetajatele mingil määral toksilised (Ovung ja Bhattacharyya, 2021).

Sulfoonamiidide resistentsus on bakteritel üsna tavaline ning levib üldiselt plasmiidide ja integronikassettide abil. Resistentsuse mehhanismideks võib olla PABA või DHPS ületootmine, sulfoonamiidide suhtes madala afiinsusega DHPS tootmine või ka valmiskujul foolhappe rakku transportimine (Lutsar *et al.*, 2017). *sul1* geen on väga levinud klass 1 integronides, mis on tavalised eelkõige gramnegatiivsetes bakterites plasmidi või kromosoomi koosseisus (Poey *et al.*, 2019). Käesolevas töös uuritavad geenid, *sul1*, *sul2* ja *sul3*, kodeerivad kõik alternatiivseid DHPS ensüüme, millel on sulfoonamiidide suhtes väiksem afiinsus (Perreten ja Boerlin, 2003). Arvatakse, et *sul* geenid pärinevad algselt DHPS-i kodeerivast *folP* geenist, kuid nende plasmiididele sattumise mehhanism ei ole teada (Venkatesan *et al.*, 2023). Samuti on täheldatud, et lisaks bakteritele võivad *sul* geenid esineda ka arhedes (Tiirik *et al.*, 2021). Kuigi sulfoonamiide teadaolevalt looduses ei esine, on näiteks leitud *sul2* geeni Antarktikas 1200-1400 aasta vanuses jääs, mis kinnitab, et resistentsus nende vastu oli olemas ammu enne sünteetiliste sulfoonamiidide kasutuselevõttu (Bisaccia *et al.*, 2025).

1.5. Meetodid antibiootikumidele resistentsete mikroobide tuvastamiseks

1.5.1. Kultiveerimisel põhinevad meetodid

Üheks traditsiooniliseks ja laialt levinud viisiks antibiootikumiresistentsuse määramiseks on minimaalse inhibitsiooni kontsentratsiooni (MIC) hindamine. MIC tähistab kõige madalamat antibiootikumi kontsentratsiooni, mille juures testitava mikroobi kasvu ei ole enam näha. MIC-i määramiseks lisatakse uuritavale bakterikultuuri pindkõlvile erinevaid antibiootikumidega immutatud diske, mille järel bakterikultuuri inkubeeritakse. Seejärel vaadatakse, kui kaugemale diskist ulatuvad kasvuvabad tsoonid. Mida suurem on diski ümbritsev kasvuvaba tsoon, seda tundlikum on uuritav mikroob antibiootikumi suhtes (Madigan *et al.*, 2022)

Mikrofluidika on teadusharu, mis käsitleb vedelikke ning nende liikumist mikrokogustes. Meetodi põhiliseks eeliseks on väikesed mõõtmed, madal materjalikulu ning suur läbilaskevõime. Mikrofluidilistes lahendusteks kasutatakse kiipe, kus on olemas vedelike juhtimiseks ning manipuleerimiseks mõeldud kanalid. Tilgapõhises mikrofluidikas moodustatakse mikromõõtmes tilkasid, millest igaüks kujutab endast isoleeritud mikrokeskkonda. Veepõhiseid tilkasid eraldab õli, mis veega ei lahustu ning hoiab tilkasid üksteisest eraldatuna (Mazutis *et al.*, 2013). Mikrofluidika lahendused on oluline osa *lab-on-a-chip* seadmetes, mis jäljendavad tavalisi laboratoorseid protsesse mikromõõdukus (Ardila *et al.*, 2023).

Mikrofluidikal põhinevad lahendused võimaldavad viia antibiootikumi-tundlikkuse testid ja haruldaste resistentsete alampopulatsioonide sõeluuringu mikromahtudesse, lühendades analüüsi-aega ja tõstes läbilaskevõimet. Näiteks töötasid Nguyen *et al.* (2023) välja mikrokihistatud kiibi, mis genereerib standardse kaheastmelise kontsentratsioonigradiendi ($1 \times - 128 \times$) ja mõõdab *Escherichia coli* kliiniliste isolaatide MIC-väärtused vähem kui viie tunniga. Tilgapõhist mikrofluidikat kasutades on võimalik osmootse tilga kokkutõmbumise abil tuvastada üliväikese sagedusega ($<10^{-6}$) esinevaid heteroresistentsed alampopulatsioone juba 24 tunniga, ennustades multiresistentsuse võimalikku väljakujunemist (Agnihotri *et al.*, 2025).

1.5.2. Molekulaarsed meetodid

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) on meetod DNA fragmentide eksponentsiaalseks kordistamiseks. PCR võimaldab kiiresti toota miljoneid või miljardeid DNA fragmentide koopiaid. Kusjuures PCR-i tööks on vaja ainult väikest kogust algset DNA-d. Amplifitseerimiseks kasutatakse märklaudjärjestusega külgnevate aladega komplementaarseid praimeripaare ning termostabiilset DNA polümeraasi, enamasti *Thermus aquaticus*'elt

eraldatud *Taq* polümeraasi (Wages, 2005). PCR-i produktide visualiseerimiseks kasutatakse geelelektroforeesi või kapillaar- ja mikrofluidilist elektroforeesi.

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) on klassikalise PCR-i edasiarendus, mis võimaldab jälgida amplifikatsiooni kulgu tsükkel-tsükli haaval reaalsajas. Reaktsioonisegusse lisatakse fluorestsentsignaali tootvaid reportereid, nt kaheaheelalise DNA-ga mittespetsiifiliselt interkaleeruvat fluorestsentsvärvainet (käesolevas töös SYBR Green I); värvaine ergastub valguse toimel ja kiirgab fluorestsentsi. Signaali intensiivsus suureneb proportsionaalselt tekkiva kaheaheelalise PCR-produkti hulgaga, mistõttu on võimalik sihtjärjestust kvantifitseerida juba amplifikatsiooni käigus (Kubista *et al.*, 2006).

Suure läbilaskevõimega kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (HT-qPCR) laiendab tavapärase qPCR-i võimalusi, võimaldades ühel seadmel korraga kvantifitseerida sadu kuni tuhandeid erinevaid sihtjärjestusi paralleelselt sadades proovides. Selline mikrokiibi- või nanoliiterskaalal põhinev formaat on eriti sobiv laiaulatuslikeks resistoomi seireuringuteks, kus tuleb analüüsida palju gene ja proove samaaegselt (Smith ja Osborn, 2020; Srathongneam *et al.*, 2024).

Keskkonna resistoomi uuringutes kasutatakse järjest rohkem metagenoomi (kogu mikroobikoosluse DNA) järjestamist, sest see võimaldab analüüsida kogu uuritavas proovis leiduvat mikroobide DNA-d ilma eelneva amplifikatsiooni või praimerivaliku eelistuseta (Davis *et al.*, 2025). Võrreldes sihtmärgipõhise qPCR-ga on metagenoomi järjestamisel võimalik tuvastada korraga tuhandeid erinevaid ARG-e, samuti seostada ARG-e mikroobide liigiinfo ning mobiilsete geneetiliste elementidega, mis vahendavad geenide horisontaalset ülekannet (Yin *et al.*, 2023). Metagenoomil põhinev analüüs sobib qPCR-i kõrvale laiaulatuslikuks resistoomi seireks, pakkudes nii kvalitatiivset (uued või madala homoloogiaga geenid) kui ka kvantitatiivset (ARG/MGE suhtarvud, koosinemise võrgustikud) teavet, mis on hädavajalik “Üks Tervis”-põhiste riskihinnangute koostamiseks.

2. METOODIKA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida sulfoonamiidi resistentsuse levikut suletud prügila metaanilagunduskattes. Täpsemalt seati töö eesmärgiks:

- Kvantifitseerida sulfoonamiidi resistentsusgeenide (*sul1*, *sul2* ja *sul3*) arvukus ja osakaal prügila kattekihi eri sügavuskihtides ning seda ümbritsevas looduslikus pinnases, kasutades kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni.
- Leida ja optimeerida sobivad geenispetsiifilised praimerid *sul3* geeni arvukuse määramiseks, hinnates nende praimerite spetsiifilisust, amplifikatsioonitõhusust ning reaktsioonitingimusi.

2.2. Katseala kirjeldus ja proovide võtmine

Käesolevas töös kasutatud pinnaseproovid pärinevad endise prügila kattekihist. Prügila on tänaseks suletud ja seal asub puhkeala. Prügila sulgemisel kaevati prügila lahti ning selle põhja ehitati vettpidav kiht. Lahtikaevatud prügi sorteeriti ning taaskasutatavad materjalid eemaldati. Ülejäänud jäätmed taas-ladestati ning kaeti metaanioksidatsioonikattega. Metaanioksidatsioonikate koosneb prügila jäätmetest saadud kuni 40 mm osakestega peenfraktsioonist, reoveesette kompostist ja kohalikust pinnasest, mis on kokku segatud suhtes 3:1:1. Kattekihi paksus on 1,5-1,8 m. Prügila sulgemisprotsess lõpetati 2013. aastal ning nüüdseks on sinna rajatud vaba aja veetmiseks mõeldud ala.

Prügilasse on paigutatud kolme kohta gaasi mõõtmiseks mõeldud torustikud, mis läbivad prügila kattekihti, gaasijaotuskihti ning ulatuvad prügilademesse. Pinnaseproovide võtmiseks kaevati kattekiht ja gaasijaotuskiht gaasikogumistorustike juurest lahti. Proovid võeti eri sügavustelt (0-225 cm) vastavalt horisontaalselt paiknevatele gaasikogumistorudele, milleks kasutati pinnaseproovide võtmiseks mõeldud steriliseeritud roostevabast terasest 10 cm läbimõõduga rõngaid. Igast kihist võeti 5 osaproovi, mis segati plastikkotis ning need suleti õhukindlalt. Seejärel hoiti proove kuni laborisse jõudmiseni koos külmakadega külmakastides. DNA eraldamiseks mõeldud materjali säilitati laboris -20 °C juures. Igast gaasimõõtmispunkti (tähistatuna K1, K2, K3) võeti 2017. aastal 9. augustil 11 proovi, kolme peale kokku 33 proovi, mille hulgas oli 30 pinnaseproovi ning 3 risosfääri proovi. 2023. aastal 25. augustil võeti igast gaasijaotuspunkti kõrvalt üks koondproov 0-10 cm sügavuselt, samuti võeti 5 koondproovi suletud prügilat ümbritsevatelt aladelt (mets, rohumaa) 0-10 cm sügavuselt.

Tartu reoveepuhastist võeti 3 proovi: reovee jääkmuda, biogaasi kääriti jääkmuda ja reovee jääkmuda kompost.

Kuivaine (KA) osakaalud kõikidest võetud proovidest määras Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituudi bio- ja keskkonnakeemia laboris Kaja Orupõld (PhD). KA osakaalude leidmiseks kuumutati proove 105°C juures.

2.3. DNA eraldamine proovidest

Kõikidest endisest prügilast, prügilat ümbritsevatelt aladelt ning Tartu reoveepuhastist kogutud proovidest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy PowerSoil Pro Kit-i (Qiagen, USA). Antud töö raames eraldati DNA vaid reoveepuhastist kogutud proovidest. Ülejäänud proovidest oli DNA eraldatud varem, millest käesoleva töö autor osa ei võtnud. DNA eraldamine viidi läbi vastavalt tootja protokollile. Eraldamiseks võeti igast proovist kahest kordusest 0,25 g materjali, vedela proovi korral võeti 1,5 mL algmaterjali. Proovid homogeniseeriti TissueLyzerII (Qiagen) homogenisaatoril. DNA eraldamise järel määrati saadud lahuste DNA kontsentratsioon Qubit 4 fluoromeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile.

2.4. Geenide kvantifitseerimine

ARG-de amplifitseerimiseks kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR). Antud töös kvantifitseeriti eraldatud DNA proovidest *sul1*, *sul2*, *sul3* ning bakterite ja arhede 16S rRNA geenid. Siiski, gaasijaotuskihi proove ei kvantifitseeritud, kuna selle struktuur ning proovide kogumise meetod oli ülejäänud prügilamaterjalist erinev. Kasutatud praimerite järjestused, kontsentratsioonid ja reaktsioonitingimused on esitatud tabelis 1. Iga DNA proovi kohta valmistati kolmes korduses qPCR-i segu. Iga segu koostisesse lisati 3,6 µL steriliseeritud destilleeritud vett, 0,2 µL 5' praimeri lahust, 0,2 µL 3' praimeri lahust, 5 µL Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific) ning 1 µL DNA proovi. Segu lõppmahuks oli 10 µL. Negatiivseks kontrolliks valmistati samasugune qPCR-i reaktsioonisegu, millesse aga DNA-d ei lisatud. QPCR viidi läbi RotorGene Q (Qiagen, USA) masinas ning tulemuste visualiseerimiseks ja analüüsiks kasutati RotorGene Series Software version 2.3.5 (Qiagen) tarkvara.

Pärast qPCR-i kontrolliti sulamiskõverate kuju ja asukohta ning amplifikatsioonikõverate Ct väärtust ja ühtsust proovide korduste vahel. Hälbivad kordused jäeti edasisest analüüsist välja. QPCR-i amplifikatsiooniefektiivsused määrati LinRegPCR version 2021.2 programmiga (Ruijter *et al.*, 2009). Seejärel leiti amplifitseeritava 16S rRNA või *sul* geeni kontsentratsioon

Tabel 1. Töös kasutatud praimeripaarid ja qPCR programmid.

Märklau- geen	Praimer	Primeri järjestus (5' -3')	Viide	Primeri kontsentrat- sioon (µM)	Amplikoni pikkus (aluspaari)	Määramispiir (koopiat reaktsioonis)	Amplifikatsiooni programm
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Liu <i>et al.</i> , 2007	0,6	530	100	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 tsükliit: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s
	Bact1028R	CGACARCCATGCASCACCT ¹	Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008				
Arhede 16S rRNA	A519F	CAGCCGCGCGGTAA	Øvreås <i>et al.</i> , 1997	0,6	395	25	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 tsükliit: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s
	A915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Stahl ja Amann, 1991				
<i>sul1</i>	sul1-F1	CTGAACGATATCCAAGGATTYCC ¹	Heuer <i>et al.</i> , 2008	0,8	239	50	50°C 2 min, 95°C 10 min; 45 tsükliit: 95°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s
	sul1-R1	AAAAATCCCATCCCCGGRTC ¹					
<i>sul2</i>	sul2-F	CTCAATGATATTCGGGGTTYCC ¹	Heuer ja Smalla, 2007	0,6	245	50	50°C 2 min, 95°C 10 min; 45 tsükliit: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s
	sul2-R	AAAAACCCCATGCCGGRTC ¹					
<i>sul3</i>	sul3-F3	CAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGC	Arabi <i>et al.</i> , 2015 Kozak, <i>et al.</i> , 2009	0,4	331	6	50°C 2 min, 95°C 10 min; 45 tsükliit: 95°C 15 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s
	sul3-R4	GCTGCACCAATTCGCTGAACG					

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

(A) ning sellele vastava standardi erinevate punktide kontsentratsioonide (B) vaheline kordusaste vastavalt valemile (1) (Ruijter *et al.*, 2009).

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

kus:

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

Saadud kordusaste korrutati erinevate standardlahjenduste kontsentratsioonidega, millest võeti aritmeetiline keskmine ning saadi otsitav geenikoopiate arv. Geenikoopiate arvukused on välja toodud ühe grammi kuivaine kohta (geenikoopiat/g*KA). *sul* geenide osakaalude leidmiseks mikroobikooslusest liideti kokku bakterite ning arhede 16S rRNA geeni arvukused ning saadud summast leiti *sul* geenide osakaalude protsent.

2.5. *sul3* geenispetsiifiliste praimerite toimivuse määramine ja reaktsioonitingimuste optimeerimine

sul3 geeni puhul otsiti olemasolevast kirjandusest *sul3*-le sobivaid praimerite järjestusi, mille toimivust kontrolliti qPCR-i ja automatiseeritud geelelektroforeesi abil. Variantideks olid mitmed olemasolevast kirjandusest leitud praimeripaarid, mis on välja toodud lisas 1. Kõik *sul3* praimeritega tehtavad testid viidi läbi prügila katte K1 punkti 125 cm sügavuse kihi („K7“) ja Tartu reoveepuhastist kogutud proovidega.

Esmalt testiti praimeripaari võimekust viia läbi DNA amplifikatsiooni. Selleks valmistati qPCR-i segu, kuhu lisati 0,4 μ M algkontsentratsiooniga 5' ja 3' primereid. QPCR-i amplifikatsiooniprogrammis kasutati praimerite seondumise temperatuurina teoreetilisest praimerihelalt lahtisulamise temperatuurist 5 kraadi madalamat temperatuuri.

Praimer peab amplifitseerima vaid märklaudgeeni, mistõttu kontrolliti praimeripaari spetsiifilisust märklaudgeeni suhtes. Selleks valmistati kaks qPCR segu, millest ühes oli ainult 5' praimer ja teises 3' praimer. Kui qPCR segus on vaid üks praimer ning tekib amplifikatsiooniprodukt, siis praimer seondub DNA-le kahes või enam kohas ning saadakse soovimatu produkt.

Optimaalseks praimerite kontsentratsiooni määramiseks valmistati kolm qPCR-i segu, kuhu oli lisatud vastavalt 0,4, 0,6 ja 0,8 μM algkontsentratsiooniga praimerite lahuseid. Viidi läbi qPCR, mille järel valiti sobiv praimerite kontsentratsioon kõige madalama Ct väärtuse järgi. Sarnaste Ct väärtuste korral eelistati madalamat praimerite kontsentratsiooni.

Praimerite seondumistemperatuuri optimeerimine viidi läbi qPCR-i abil. Selleks võeti eelnevates testides kasutatud teoreetilisest seondumistemperatuurist ühe kraadi võrra kõrgem temperatuur ning viidi läbi qPCR. Ct väärtuse ja amplifikatsiooniefektiivsuse paranemise korral korrati protseduuri ühe kraadi võrra kõrgema temperatuuriga niikaua, kuni Ct väärtus hakkas tõusma ja amplifikatsiooniefektiivsus vähenema. Juhul kui teoreetilisest seondumistemperatuurist kõrgem temperatuur andis suurema Ct väärtuse ja madalama amplifikatsiooniefektiivsuse, siis viidi sama protseduuri läbi järjest väiksema praimeriseondumistemperatuuriga. Lisaks analüüsiti sulamiskõverate kuju ning asukohta, mille puhul jälgiti, et ei oleks tekkinud nähtavalt mitme erineva suurusega produkti. Kokkuvõtvalt valiti optimaalseks praimerite seondumistemperatuur, mille korral tuli qPCR-iga kõige väiksem Ct väärtus ja kõrgem amplifikatsiooniefektiivsus, kuid samal ajal ka puudusid erineva suurusega produktid.

Viimaseks testiks viidi läbi automatiseeritud geelelektroforees TapeStation 4200-ga (Agilent Technologies, USA). TapeStation võimaldab paremini hinnata kõrvaliste amplifikatsiooniproduktide olemasolu võrreldes tavalise geelelektroforeesiga. Geelelektroforeesi ettevalmistuseks viidi läbi standardne PCR. Selleks valmistati PCR-i segu lõppmahuga 20 μL , millesse hulgas oli 10 μL Phusion Plus PCR Master Mix (Thermo Scientific) reagenti, 0,5 μL F ja 0,5 μL R praimerit, 8 μL steriliseeritud destilleeritud vett ning 1 μL DNA proovi. Seejärel viidi läbi PCR, mille amplifikatsiooniprogramm oli 98°C 30 s, seejärel 30 tsüklit: 98°C 10 s, 62°C 20 s, 72°C 20 s ning lõpetuseks 72°C 8 min. Saadud PCR produkti säilitati analüüsini -20°C juures.

2.6. *sul3* geeni standardi valmistamine

QPCR analüüsil vajaminevate *sul3* geeni standardkõverate tegemiseks kasutati märklaudjärjestust sisaldavat pEX-A128 plasmiidset vektorit (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Saksamaa). Standardi algkontsentratsioon oli $1,22 \times 10^9$ plasmidi/ μL , mis leiti vastavalt valemile (2). Sellest valmistati steriliseeritud destilleeritud veega lahjendades standardlahus kontsentratsiooniga 10^8 plasmidi/ μL vastavalt valemile (3).

$$N = \frac{c}{M} \times N_a \quad (2)$$

kus:

- N – plasmidi kontsentratsioon (plasmidi/l)
- c – DNA kontsentratsioon (g/l)
- M – plasmidi molekulmass koos märklaudjärjestusega (Da)
- N_a – Avogadro arv ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (3)$$

kus:

- C_1 – plasmidi kontsentratsioon lahjenduses
- V_1 – lahjenduse maht
- C_2 – plasmidi kontsentratsioon alglahuses
- V_2 – alglahuse maht

Seejärel lahjendusrea saamiseks valmistati kümnekordsed lahjendused $10^7 - 10^2$ plasmidi/ μL ning sellest edasi kahekordsed lahjendused $50 - 6$ plasmidi/ μL . Saadud standardlahjendustest tehti qPCR-i segud ning need kvantifitseeriti samadel tingimustel nagu keskkonnaproovide *sul3* geeni. Bakterite ja arhede 16S rRNA, *sul1* ning *sul2* standardid olid valmis tehtud varasemate tööde raames ja käesoleva töö autor nende tegemisel ei osalenud.

2.7. Andmete statistiline analüüs

Resistentsusgeenide arvukuste ja osakaalude jaotust kontrolliti Lillieforsi testiga. Kuna andmed olid normaaljaotusest oluliselt erinevad ($P < 0,05$), kasutati geenide arvukuste puhul logaritmttransformatsiooni ning osakaalude puhul ruutjuurtransformatsiooni.

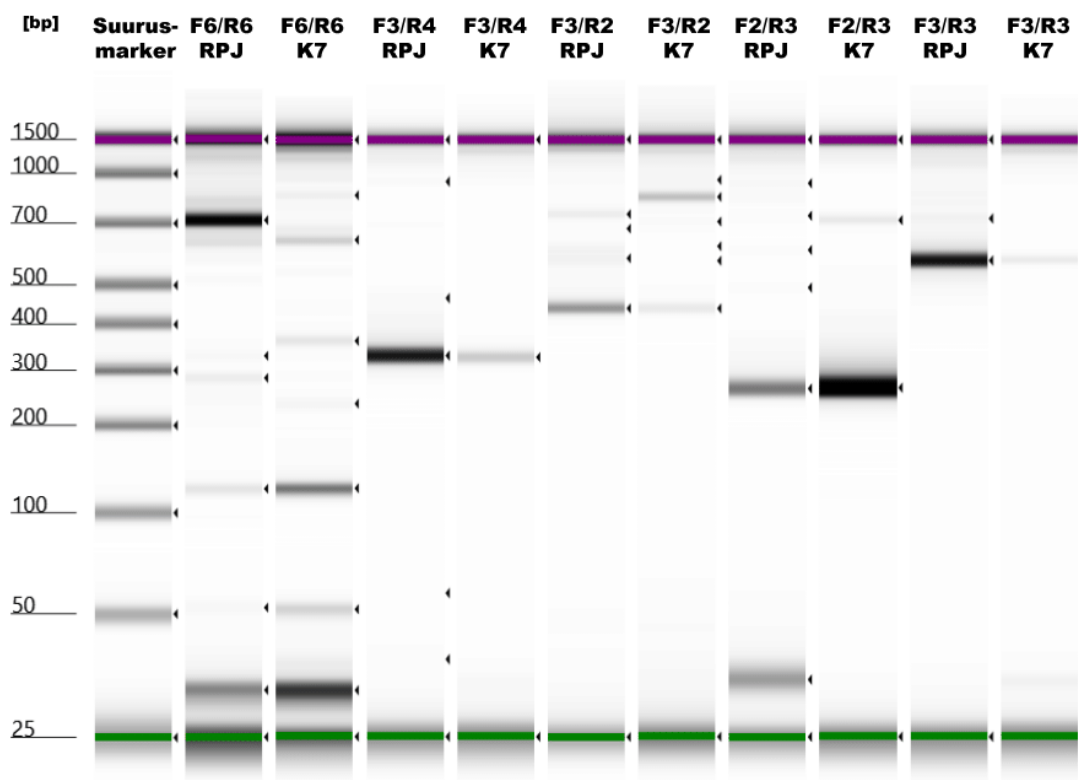
Prügila kolme gaasimõõtmispunkti geenide arvukusi ning osakaalusid võrreldi ühefaktorilise dispersioonianalüüsi abil. 2017. ja 2023. aasta proovide võrdlemiseks ning seejärel 2023. aasta ja loodusliku pinnase proovide võrdlemiseks kasutati Studenti t-testi.

3. TULEMUSED

3.1. *sul3* geeni kvantifitseerimise meetodika väljatöötamine

Käesolevas töös kontrolliti mitmete kirjandusest leitud *sul3* praimerite tööd ning otsiti välja parim praimeritepaar *sul3* geeni kvantifitseerimiseks. Selleks testiti qPCR-i abil praimerivariantide võimekust viia läbi amplifikatsiooni, kontrolliti amplifikatsiooni spetsiifilisust, optimeeriti praimerite kontsentratsiooni ja seandumistemperatuuri ning lõpuks kontrolliti kõrvalproduktide teket optimeeritud tingimustel TapeStation seadmel.

Esmalt välja valitud praimeripaar F6/R6 läbis kõik qPCR-iga läbi tehtud testid ning optimeerimise edukalt. Siiski näitas TapeStation seadmel läbi viidud analüüs, et antud praimeripaar amplifitseerib *sul3* geeni ebaspetsiifiliselt, kuna tekkisid erineva pikkusega DNA fragmendid (joonis 2). Samuti kombineeriti omavahel 5' primereid (F2, F3, F4) kokku 3' praimeritega (R2, R3, R4). Nende praimerite kombinatsioonid on esitatud lisas 2, kus on ka välja toodud praimeripaaride ebasobivuse põhjused. Sobivaimateks osutusid praimeripaarid F3/R4 (tabel 2) ning F3/R3 (tabel 3). Siiski, TapeStationi tulemuste visuaalsel vaatlusel oli näha, et F3/R3 praimeritega tekkis vähesel määral soovimatut amplifikatsiooniprodukti, eriti kui märklaudgeeni oli vähem (joonis 2). F3/R4 praimeripaari korral tekkis kõrvalisi amplifikatsiooniprodukte minimaalselt, tänu millele võeti see praimeripaar kasutusele edasises *sul3* kvantifitseerimise etapis.



Joonis 2. Erinevate praimerikombinatsioonide abil saadud PCR produktide analüüsi tulemused TapeStation seadmel.

Tabel 2. *sul3* geeni spetsiifiliste praimerite (sul3-F3/sul3-R4) kontsentratsiooni optimeerimise tulemused. Ct – tsüklilävend, E – amplifikatsiooniefektiivsus, Melt – sulamiskõvera positsioon; N=3.

Praimeri kontsentratsioon	Tartu RPJ			„K7“		
	Ct	E	Melt (°C)	Ct	E	Melt (°C)
0,4	20,97 ± 0,23	1,946 ± 0,005	79,3	25,42 ± 0,17	1,932 ± 0,036	78,5
0,6	20,86 ± 0,12	1,924 ± 0,086	79,3	25,24 ± 0,08	2,005 ± 0,072	78,5; 82,4
0,8	20,75 ± 0,08	2,005 ± 0,171	79,3	25,16 ± 0,19	1,880 ± 0,142	76,0; 78,3; 82,5

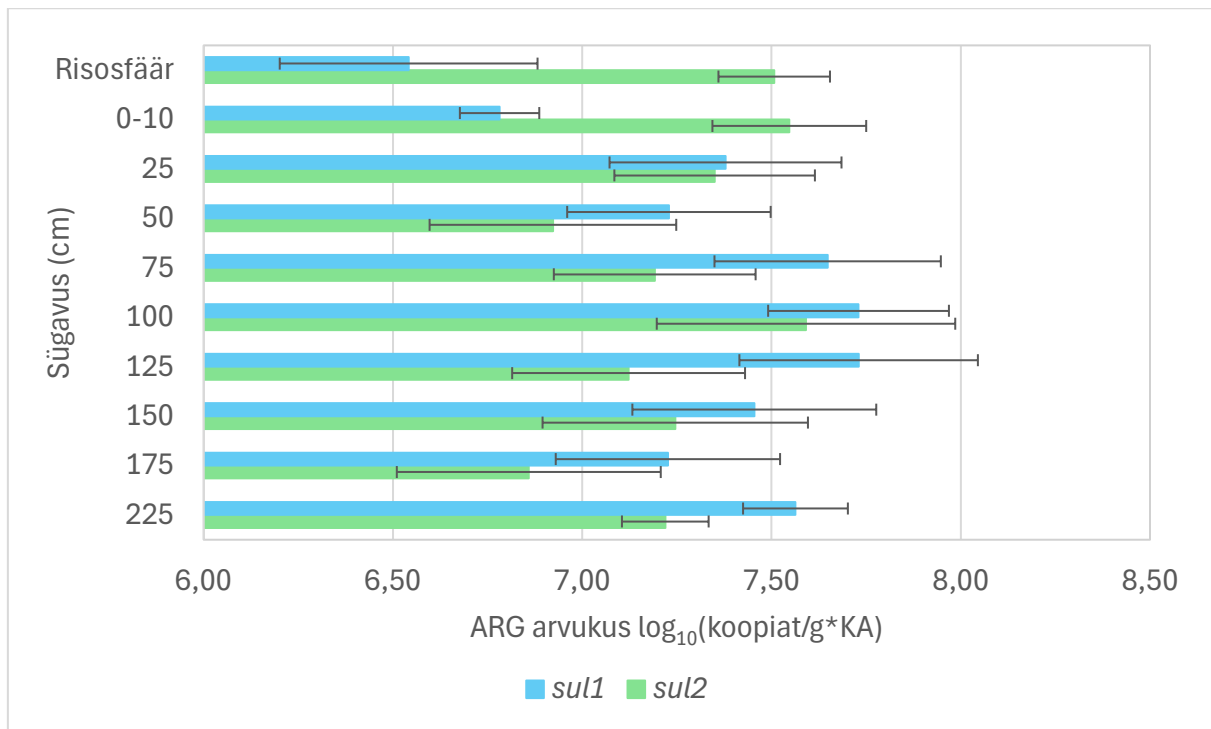
Tabel 3. *sul3* geeni spetsiifiliste praimerite (sul3-F3/sul3-R4) seondumistemperatuuri optimeerimise tulemused. Ct – tsüklilävend, E – amplifikatsiooniefektiivsus, Melt – sulamiskõvera positsioon; N=3.

Praimeri seondumistemperatuur (°C)	Tartu RPJ			„K7“		
	Ct	E	Melt (°C)	Ct	E	Melt (°C)
60	21,27 ± 0	2,020 ± 0,046	79,2	25,59 ± 0,14	2,272 ± 0,121	76; 78,3; 82,6
61	21,39 ± 0,12	2,123 ± 0,002	79,2	25,32 ± 0,06	1,956 ± 0,161	75,9; 78,3; 82,5
62	20,97 ± 0,23	1,946 ± 0,005	79,3	25,42 ± 0,17	1,932 ± 0,036	78,5
63	21,25 ± 0,02	2,093 ± 0,036	79,3; 82,9	25,78 ± 0,11	1,953 ± 0,092	78,4; 82,8

3.2. *sul* geenide arvukus ja osakaalud prügilas kattes

Käesolevas töös kvantifitseeriti kogutud proovidest sulfoonamiidide resistentsusgeenide *sul1*, *sul2* ja *sul3* arvukus ning osakaal mikroobikoosluses. Proovid võeti suletud prügilas kattekihiga 11-lt eri sügavuselt kolmest kohast. Samuti võeti 5 proovi prügilas ümber asuvatelt aladelt ning 3 võrdlusproovi Tartu reoveepuhastist. *sul1*, *sul2* ja *sul3* arvukus ning osakaalude väärtused on esitatud töö lisa 3.

sul1, *sul2* ja *sul3* arvukused olid 2017. aasta gaasimõõtmispunktide (GMP) proovides vahemikus vastavalt $7,85 \times 10^5$ – $2,29 \times 10^8$ koopiat/g*KA, $1,88 \times 10^6$ – $1,76 \times 10^8$ koopiat/g*KA ning $5,05 \times 10^3$ – $4,55 \times 10^6$ koopiat/g*KA. *sul1* ja *sul2* geenide arvukused on sügavusprofiilina näidatud joonisel 3. *sul3* puhul jäi sõltuvalt GMP-st geeni arvukus alla määramispiiri viies, kolmes ja kaheksas proovis ja enamasti oli see nii kattekihi ülemistes kihtides.



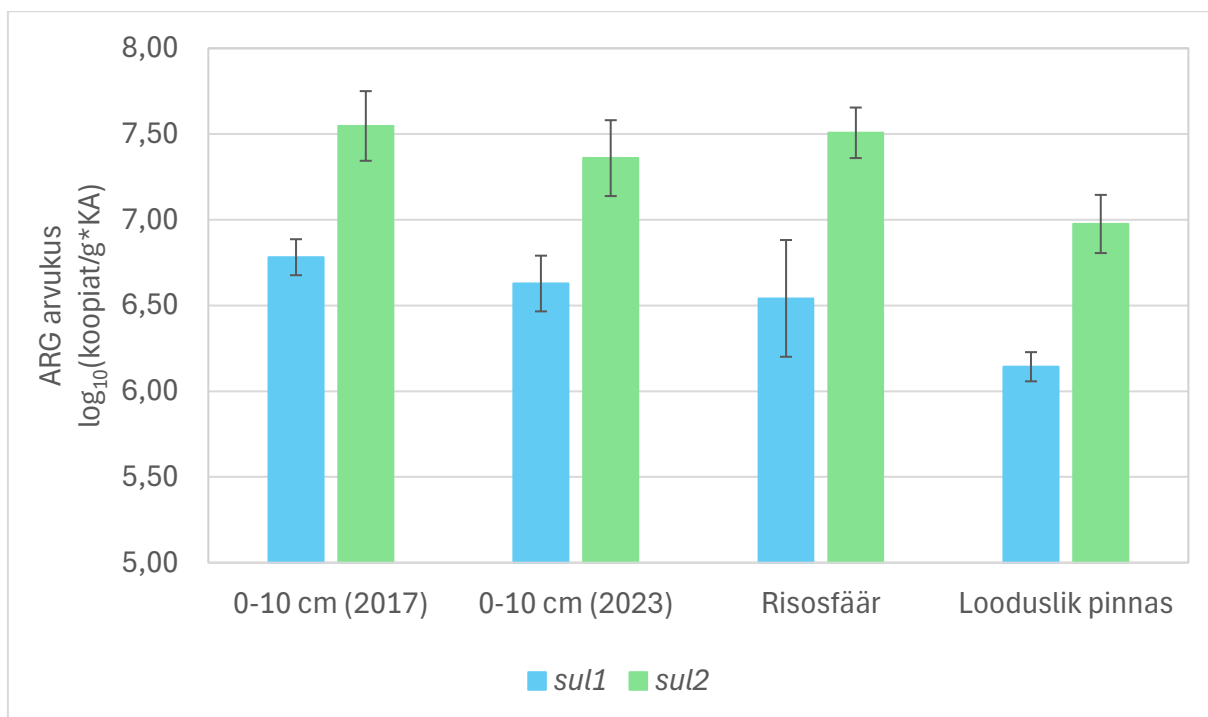
Joonis 3. *sul1* ja *sul2* geenide sügavusprofiil. Kihid on märgitud sügavusena sentimeetrites. Arvukused on esitatud logaritmtuureeritud kujul koos standardveaga.

Tartu RPJ proovides olid *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide arvukused vastavalt $2,01 \times 10^9 - 6,63 \times 10^{10}$ koopiat/g*KA, $7,08 \times 10^8 - 3,67 \times 10^9$ koopiat/g*KA ning $1,31 \times 10^6 - 8,64 \times 10^8$ koopiat/g*KA.

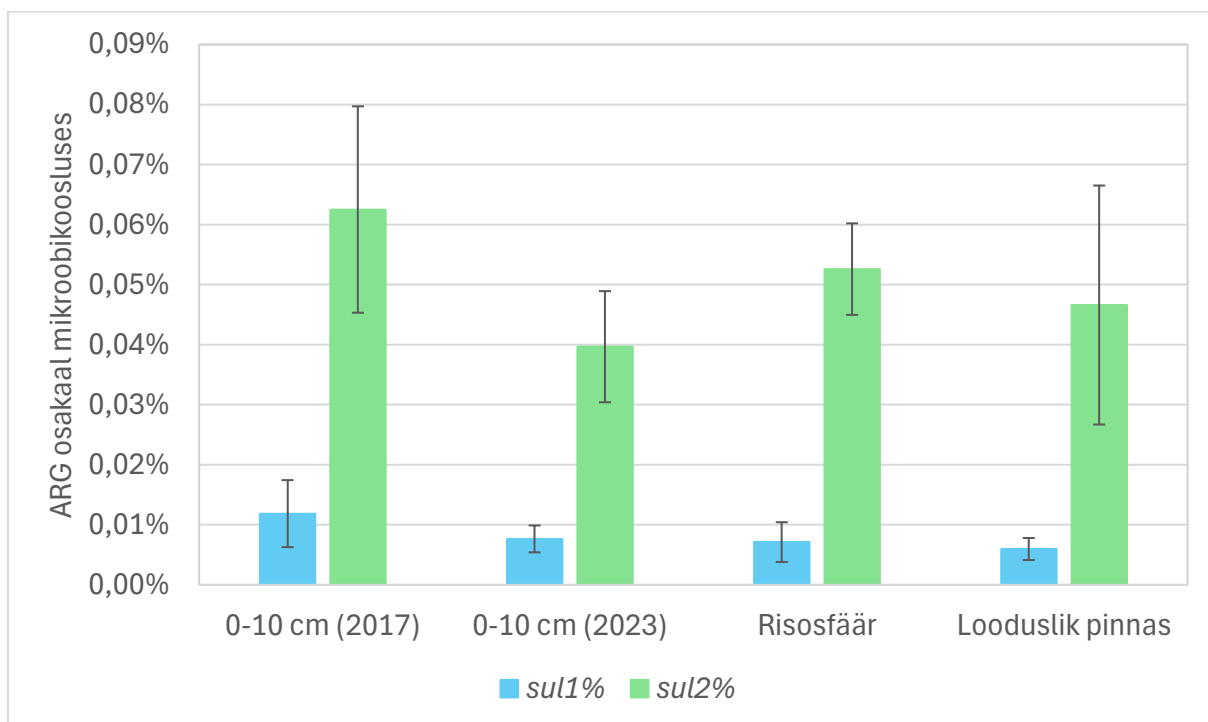
2017. aastal kogutud prügilakatte 0-10 cm kihi proovides olid *sul1* ja *sul2* arvukused vastavalt $3,73 \times 10^6 - 7,80 \times 10^6$ koopiat/g*KA ja $1,78 \times 10^7 - 8,63 \times 10^7$ koopiat/g*KA. 2023. aasta sama kihi proovides olid arvukused vastavalt $2,70 \times 10^6 - 8,93 \times 10^6$ koopiat/g*KA ning $8,27 \times 10^6 - 3,89 \times 10^7$ koopiat/g*KA. 2017. aasta risosfääri proovides olid nende geenide arvukused vastavalt $7,85 \times 10^5 - 1,12 \times 10^7$ koopiat/g*KA ja $1,73 \times 10^7 - 5,56 \times 10^7$ koopiat/g*KA. Loodusliku pinnase proovides olid *sul1* arvukused vahemikus $8,51 \times 10^5 - 2,78 \times 10^6$ koopiat/g*KA ja *sul2* arvukused vahemikus $4,69 \times 10^6 - 4,15 \times 10^7$ koopiat/g*KA. *sul3* arvukus oli kõigis 0-10 cm, risosfääri ja loodusliku pinnase proovides alla määramispiiri. Samade proovide *sul1* ja *sul2* arvukused on välja toodud joonisel 4.

Arvukustele lisaks leiti *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide osakaalud kogu mikroobikooslusest. Kolme GMP peale kokku olid geenide osakaalud vastavalt 0,002-0,839%, 0,025-0,463% ning *sul3* puhul geeni arvukuse määramispiiri ületavates kihtides 0,0002-0,0336%. 2017. aastal kogutud 0-10 cm kihis olid *sul1* osakaalud 0,006-0,023% ja *sul2* osakaalud 0,029-0,084%. 2023. aastal samas kihis olid *sul1* osakaalud 0,004-0,011% ja *sul2* osakaalud 0,021-0,051%. 2017. aastal kogutud risosfääri proovides olid *sul1* osakaalud 0,002-0,013%, *sul2* osakaalud 0,041-0,067%. Viimaseks, loodusliku pinnase proovides olid *sul1* osakaalud 0,003-0,013% ning *sul2*

osakaalud 0,016-0,125%. *sul1* ja *sul2* geenide osakaalude keskvaartused kogu mikroobikooslusest on visuaalselt välja toodud joonisel 5. Lisaks, Tartu RPJ proovides olid *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide osakaalud vastavalt 0,705-4,693%, 0,167--0,260% ja 0,00009-0,17%.



Joonis 4. *sul1* ja *sul2* geenide arvukused prügila 0-10 cm kihis, risosfääris ja looduslikus pinnases koos standardveaga. Esitatud andmetel on läbi viidud logaritmtformatsioon.



Joonis 5. *sul1* ja *sul2* osakaalud kogu mikroobikooslusest 0-10 cm kihis, risosfääris ning looduslikus pinnases koos standardveaga.

3.2.1. Dispersioonanalüüsi tulemused

Dispersioonanalüüsi abil võrreldi *sul1* ja *sul2* geenide arvukusi ning osakaalusid gaasimõõtmispunktide vahel. *sul1* puhul ei erinenud arvukused erinevate mõõtmispunktide vahel. Osakaalude puhul seevastu oli oluline erinevus olemas ($P < 0,05$). Siiski, Tukey test näitas, et paariviisilisel võrdlusel olid mõõtmispunktidel *sul1* geeni osakaalud küllaltki sarnased. *sul2* puhul leiti oluline erinevus geeni arvukustes ($P < 0,05$), kuid mitte osakaalude puhul. Tukey test näitas *sul2* arvukuse olulist erinevust K2 ja K3 gaasimõõtmispunktide vahel ($P < 0,05$).

3.2.2. Studenti t-test tulemused

Studenti t-testi abil võrreldi omavahel 2017. aastal kogutud 0-10 cm ja 2023. aastal kogutud 0-10 cm kihi proove. Aastate vahel *sul1* ja *sul2* arvukustes olulist erinevust ei esinenud. Samuti ei olnud statistiliselt olulist erinevust *sul1* ja *sul2* osakaaludes aastate vahel. Seejärel võrreldi koos mõlema aasta 0-10 cm kihi proove loodusliku pinnase proovidega. Analüüs näitas, et *sul1* arvukus oli keskmiselt 3,75 korda suurem prügilakattes kui looduslikus pinnases (t-test, $P < 0,01$). Erinevus puudus *sul2* arvukuse ning *sul1* ja *sul2* osakaalude puhul.

Lisaks võrreldi 2017. aasta 0-10 cm kihi pinnase andmeid prügila kattekihi risosfääri proovide näitajatega, kuid olulist erinevust ei esinenud. Pinnalähedastes kihtides ning olenevalt GMP-st jäi mitmetes sügavamates kihtides *sul3* arvukus alla määramispiiri (< 794 koopiat/g*KA), mistõttu nimetatud statistilisi teste selle geeni puhul läbi ei viidud.

4. ARUTELU

Ülevaade kirjandusest leitud *sul1* ja *sul2* geenide arvukuste ning osakaalude kohta eri tüüpi muldades, prügilas materjalis ja reoveepuhasti jääkmudas on esitatud tabelis 4. Siinkohal tasub märkida, et *sul3* geeni arvukust on keskkonna proovides väga vähe uuritud ning kvantitatiivsete andmete hulk on puudulik.

Austria metsapinnases oli *sul1* arvukus vahemikus $1,68 \times 10^3 - 1,90 \times 10^4$ koopiat/g, samas kui põllumuldade vastavad väärtused olid $1,31 \times 10^4 - 1,84 \times 10^5$ koopiat/g (Radu *et al.*, 2021). Käesoleva töö looduslikus pinnases jäi *sul1* arvukus vahemikku $8,51 \times 10^5 - 2,78 \times 10^6$ koopiat/g*KA, mis ületab Austria metsa mulla taset ja kattub osaliselt põllumuldade väärtustega. Samuti sarnaneb see osaliselt Hiinas põllumullast leitud väärtustega, mis ulatuvad kuni $5,5 \times 10^8$ koopiani grammi kohta (Zhou *et al.*, 2017).

sul2 geeni puhul leiti käesolevas töös looduslikus pinnases arvukused vahemikus $4,69 \times 10^6 - 4,15 \times 10^7$ koopiat/g*KA, samas kui Hiina põllumuldades on vastavad väärtused olnud keskmiselt $5,0 \times 10^5$ koopiat/g, ulatudes maksimaalselt $2,6 \times 10^8$ koopiani (Zhou *et al.*, 2017). Käesoleva töö tulemused ületavad seega mitmete piirkondade keskmisi väärtuseid, kuid jäävad siiski varem kirjeldatud vahemike piiridesse.

sul1 geeni osakaaludeks on Eestis rohumaa mullas leitud 0,010-0,021% (Nõlvak *et al.*, 2016), Itaalias metsamullas 0,0025% (Chessa *et al.*, 2016), Austria põllumaa- ja metsamullas vastavalt 0,002-0,02% ja 0,0002-0,001% (Radu *et al.*, 2021) ning Hiina põllumullas ja prügilates vastavalt 0,0004-1,1% (Zhou *et al.*, 2017) ja 1,12-15,2% (Chen *et al.*, 2021). Käesoleva töö loodusliku pinnase *sul1* osakaaludeks saadi 0,003-0,013% ning prügilakattes 0,002-0,839%, millest Austria metsamullas on osakaalud väiksemad, kuid teised mulla *sul1* osakaalud on sarnased. Seevastu, Hiina prügilate *sul1* osakaalud on käesoleva töö prügilakatte andmetest oluliselt suuremad, kuid kattuvad Eesti prügilate materjalis *sul1* osakaaludega.

sul2 geeni osakaaludeks on leitud Itaalia metsamullas 0,00005% (Chessa *et al.*, 2016), Hiina põllumullas 0,000005-0,38% (Zhou *et al.*, 2017) ning Hiina prügilates 3,04-48,9% (Chen *et al.*, 2021). Käesolevas töös saadi looduslikus foonis ning prügilakattes *sul2* osakaaludeks vastavalt 0,016-0,125% ja 0,025-0,463%, millest Itaalia andmed on väiksemad ja Hiina prügilate andmed on vastupidiselt palju suuremad. Kuigi Zhou *et al.* (2017) töös *sul2* osakaalud varieeruvad suurel määral, kattuvad käesoleva töö andmed nendega osaliselt.

Reoveepuhasti proovides olid *sul1* ja *sul2* geenide osakaalud (vastavalt 0,705–4,693% ja 0,167–0,260%) sarnases suurusjärgus või mõnevõrra kõrgemad võrreldes Saksamaal

jääkmudast leitud väärtustega (Wolters *et al.*, 2022). Samas olid vastavad geenide absoluutarvud Saksamaa uuringus oluliselt suuremad, mis viitab kohaliku proovitüübi või reoveepuhastustehnoloogia erinevustele.

Siinkohal võib järeldada, et uuritud prügila kattekihis on arvukalt *sul1* geeni kandvaid mikroobe, kuna selle arvukus on oluliselt suurem loodulikus pinnases olevast *sul1* geeni arvukusest. Sulfoonamiidid on sünteetilised antibiootikumid ja looduslikult neid teadaolevalt ei esine, mis viitab seosele saadud tulemuste ja inimtegevuse põhjustatud *sul1* geeni arvukuse suurenemise vahel. Arvestades, et prügila katematerjal sisaldas ühe komponendina reoveemuda komposti, võib see olla üheks ARG-de allikaks kattekihi materjalis. Lisaks sellele on kattekihi materjalis prügilast välja kaevatud materjali, mis samuti on võimalik ARG-de allikas. Prügila kattekihi *sul1* geeni arvukuse erinevus on võrreldes loodusliku pinnasega alla ühe suurusjärgu, mis osutab väga nõrgale arvukuse suurenemisele võrreldes loodusliku mullaga. Kuigi *sul1* geen sisaldub WHO suure ohutasemega ARG-de nimekirjas, soovitatakse *sul1* geeni klassifitseerida madala ohutasemega ARG-ks (Zhang *et al.* 2021). Sellest tulenevalt võiks käsitleda *sul1* geeni veidi suuremat arvukust prügila kattekihis kui ohutut taset. *sul2* arvukustes erinevust aga käesolevas töös prügila katte ning loodusliku fooni vahel ei esinenud.

sul3 geeni arvukus oli suuremas osas pinnaproovidest, sh looduslik pinnas, alla määramispiiri, kuid seda geeni tuvastati sügavamates prügilakatte kihtides. See võib viidata sellele, et algselt kattekihi materjalis olnud *sul3* geeni kandvad mikroobid on paremini kohastunud eluks kattekihi sügavamatesse kihtides. Kaks keskkonnaparameetrit, hapniku kontsentratsioon ja temperatuur, võivad olla *sul3* geeni kandvatele mikroobidele olulised. Prügilakatte sügavamaid kihte iseloomustab väga madal hapniku kontsentratsioon (<0,1%) ja stabiilne temperatuur vahemikus 10-15°C aasta läbi (Kriipsalu *et al.*, 2023). Arvestades, et *sul3* levikut on keskkonnaproovides seni vähe uuritud, vajab selle geeni esinemismuster, sh seos erinevate mikroobiliikidega ja seos keskkonna näitajatega ning arvukus tulevikus kindlasti täiendavat tähelepanu.

Tabel 4. *sul1* ja *sul2* geenide arvukused ning osakaalud erinevates looduslikes ja haritavates muldades, prügilates ja reoveepuhasti jääkmudas. Esitatud on geomeetriline keskmine arvukuste ja aritmeetiline keskmine osakaalude puhul koos miinimum ja maksimum väärtustega sulgudes.

Materjali tüüp	<i>sul1</i> (koopiat/g)	<i>sul2</i> (koopiat/g)	<i>sul1</i> (%)	<i>sul2</i> (%)	Viide
Muld (rohuma, Eesti)			0,014 (0,010 – 0,021)		Nõlvak <i>et al.</i> , 2016
Muld (mets, Itaalia)			0,0025	0,00005	Chessa <i>et al.</i> , 2016
Muld (põllumaa, Austria, n=12)	$4,87 \times 10^4$ ($1,31 \times 10^4$ – $1,84 \times 10^5$)		0,006 (0,002 – 0,02)		Radu <i>et al.</i> , 2021
Muld (mets, Austria, n=7)	$7,76 \times 10^3$ ($1,68 \times 10^3$ – $1,90 \times 10^4$)		0,0005 (0,0002 – 0,001)		Radu <i>et al.</i> , 2021
Muld (põllumaa, Hiina, n=126)	$2,7 \times 10^6$ ($2,2 \times 10^4$ – $5,5 \times 10^8$)	$5,0 \times 10^5$ ($1,6 \times 10^3$ – $2,6 \times 10^8$)	0,065 (0,0004 – 1,1)	0,024 (0,000005 – 0,38)	Zhou <i>et al.</i> , 2017
Prügilad (Hiina, n=13)			(1,12-15,2)	(3,04 – 48,9)	Chen <i>et al.</i> , 2021
Prügilad (Eesti, n=4)	$5,70 \times 10^7$ ($2,10 \times 10^7$ – $2,36 \times 10^8$)	$2,76 \times 10^7$ ($1,20 \times 10^7$ – $5,82 \times 10^7$)	0,409 (0,187 – 1,08)	0,169 (0,107 – 0,447)	Levit, 2024
Jääkmuda (Saksamaa, n=48)	$8,96 \times 10^{12}$ ($1,34 \times 10^{12}$ – $3,51 \times 10^{13}$)	$5,17 \times 10^{12}$ ($4,31 \times 10^{11}$ – $9,22 \times 10^{13}$)	0,447 (0,11 – 1,78)	0,257 (0,04 – 3,16)	Wolters <i>et al.</i> , 2022

KOKKUVÕTE

Antibiootikumiresistentsus on mikroobide poolt põhjustatud haiguste ravimisel suur ning pidevalt kasvav probleem. Sulfoonamiidid on rohkelt kasutatavad antibiootikumid, mis on sünteetilised ning teadaolevalt neid looduslikult ei esine. Resistentsus sulfoonamiidide vastu on laialt levinud. Seda põhjustavad ARG-d on leitavad mitmetes keskkondades, sealhulgas prügilates. Prügilad toimivad ARG-de kogunemispaiaga ning reservuaaridena, seda sinna ladestatavate jäätmete tõttu.

Käesolevas töös kvantifitseeriti qPCR-i abil *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide arvukus suletud prügila kattekihi ja prügilat ümbritsevas looduslikus pinnase mikroobikoosluses. Seejärel võrreldi omavahel prügilakattes asuvat kolme GMP sügavusprofiile ning 2017. ja 2023. aasta prügilakatte pinnakihi andmeid. Prügilakatte ülemise kihi andmeid võrreldi prügilat ümbritseva loodusliku pinnase *sul1*, *sul2* ja *sul3* geenide arvukuse ning osakaaludega koosluses.

Lisaks töötati välja *sul3* geeni kvantifitseerimiseks sobilik praimeripaar. Selleks kontrolliti kirjandusest saadud praimerite võimet amplifitseerida spetsiifiliselt *sul3* geeni ning optimeeriti PCR reaktsioonitingimusi.

Töö tulemused näitavad, et prügilakattes on veidi kõrgem *sul1* arvukus kui ümbritsevas loodusliku pinnases. Seevastu *sul2* puhul prügilakatte ja loodusliku pinnase vahel erinevust ei olnud. *sul3* arvukus aga oli paljudes kihtides, eriti prügilakatte ülemistes kihtides ja kõikides loodusliku pinnase proovides alla määramispiiri, mistõttu ei saanud statistilisi analüüse selle geeni puhul läbi viia. *sul3* arvukus oli mõõdetav prügilakatte sügavamates kihtides, mis võib olla seotud sellega, et *sul3* geeni kandvad mikroobid on looduslikus pinnases vähem püsivad kui *sul1* ja *sul2* kandvad mikroobid. Tulevikus võiks uurida *sul* geenide arvukust prügilakatte materjalis ning looduslikus pinnases suurema valimi põhjal.

Töö tulemused kinnitavad, et suletud prügila kattekihi materjal ei kujuta endast keskkonnariski kui allikas sulfoonamiidi resistentsust põhjustava geenide levimiseks keskkonda. Edasised uuringud prügilate kattekihi materjalide keskkonnaohutuse puhul võiksid keskenduda resistentsusgeenide mitmekesisuse tuvastamisele kasutades kogu mikroobikoosluse DNA järjestamist. Samuti oleks oluline uurida *sul3* geeni levikut ja arvukust erinevates keskkondades.

Sulfonamide resistance in landfill biocover material

Aap Muromägi

SUMMARY

Antibiotic resistance (AR) is an escalating global threat. As a result of this resistance, bacterial diseases that were once easily treatable may become more challenging or even impossible to cure. While AR is a natural phenomenon that existed before the advent of antibiotics, its spread has significantly increased due to the misuse and overuse of these medications in both medical practice and agricultural settings.

Landfills serve as reservoirs for antibiotic resistance genes (ARGs). They collect a variety of selective agents, including antibiotics, pharmaceutical residues, hygiene products, and heavy metals. These substances place stress on microbes and create selective pressure, which increases the rates of horizontal gene transfer and promotes the spread of ARGs. Additionally, ARGs can be transported from landfills through leachate to the surrounding environment.

Sulfonamides are synthetic antibiotics that have been widely used since the 1930s. Although these antibiotics do not occur naturally, resistance to them is common. This resistance is primarily due to antibiotic resistance genes, particularly *sul1*, *sul2*, and *sul3*, which have been found in various environments, including landfills. Landfills may serve as environmental reservoirs for these antibiotic resistance genes because of the diverse waste materials deposited there, such as pharmaceuticals and organic matter.

This study quantified the abundance and proportion of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in the biocover layer of a closed landfill and in the adjacent natural soil. Quantification was performed using quantitative PCR, with samples taken from different depths (0–225 cm) and surface layers sampled in 2017 and 2023. Surface layer data were compared between the landfill biocover and surrounding natural soils.

A specific primer pair for *sul3* quantification was also developed. Candidate primers from the literature were screened for specificity and efficiency, and the optimal primer pair was selected and validated for use in qPCR assays.

The results indicated that the abundance of the *sul1* gene in the landfill biocover was, on average, 3.75 times higher than that in natural soils. In contrast, no significant difference in the abundance of the *sul2* gene was observed between these two environments. The levels of the *sul3* gene were mostly below the detection limit in surface and natural soil samples, although they were detectable in some deeper layers of the landfill. This pattern may reflect differences

in the ecology of microbes that possess the *sul3* gene compared to those that carry the *sul1* and *sul2* genes. These findings suggest that the closed landfill biocover does not pose a potential risk of disseminating sulfonamide resistance genes into the environment. Future research should focus on assessing the diversity of antibiotic resistance genes in biocover material using metagenomic approaches and on characterizing the distribution of the *sul3* gene across various environmental settings.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agnihotri, S. N., Fatsis-Kavalopoulos, N., Windhager, J., Tenje, M., Andersson, D. I. (2025). Droplet microfluidics-based detection of very rare antibiotic-resistant subpopulation in clinical isolates of *Escherichia coli* from bloodstream infections. *MedRxiv*, 2025.03.05.25323409.
- Arabi, H., Pakzad, I., Nasrollahi, A., Hosainzadegan, H., Jalilian, F. A., Taherikalani, M., Samadi, N., Sefidan, A. M. (2015). Sulfonamide Resistance Genes (*sul*) M in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) and Non-ESBL Producing *Escherichia coli* Isolated From Iranian Hospitals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(7), e19961.
- Ardila, C. M., Zuluaga-Gómez, M., Vivares-Builes, A. M. (2023). Applications of Lab on a Chip in Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus*: A Systematic Review. *Medicina*, 59(10), 1719.
- Bisaccia, M., Berini, F., Marinelli, F., Binda, E. (2025). Emerging Trends in Antimicrobial Resistance in Polar Aquatic Ecosystems. *Antibiotics* 2025, Vol. 14, Page 394, 14(4), 394.
- Blake, F. G. (1940). Chemotherapy with the Sulfonamide Derivatives: General Principles. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 16(4), 197.
- Boolchandani, M., D'Souza, A. W., Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics* 2019 20:6, 20(6), 356–370.
- Chen, Z., Yao, L., Sun, F., Zhu, Y., Li, N., Shen, D., Wang, M. (2021). Antibiotic resistance genes are enriched with prolonged age of refuse in small and medium-sized landfill systems. *Environmental Research*, 197, 111194.
- Chessa, L., Jechalke, S., Ding, G. C., Pusino, A., Mangia, N. P., Smalla, K. (2016). The presence of tetracycline in cow manure changes the impact of repeated manure application on soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 52(8), 1121–1134.
- Cox, G., Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 287–292.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., ... Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461.

- Davis, B. C., Vikesland, P. J., Pruden, A. (2025). Evaluating Quantitative Metagenomics for Environmental Monitoring of Antibiotic Resistance and Establishing Detection Limits. *Environmental Science and Technology*, 59, 6192–6202.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLOS Biology*, 6(11), e280.
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107–1111.
- Gao, M., Li, S., Zou, H., Wen, F., Cai, A., Zhu, R., Tian, W., Shi, D., Chai, H., Gu, L. (2021). Aged landfill leachate enhances anaerobic digestion of waste activated sludge. *Journal of Environmental Management*, 293.
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use - Volume 23, Number 5—May 2017 - Emerging Infectious Diseases journal CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M. (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1892–1900.
- Heuer, H., Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9(3), 657–666.
- Huang, F. Y., Zhou, S. Y. D., Zhao, Y., Zhou, X. Y., Li, H., Zhang, X., Su, J. Q. (2022). Dissemination of antibiotic resistance genes from landfill leachate to groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 440, 129763.
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Jardine, C. (2008). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559.

- Kriipsalu, M., Somani, M., Pehme, K., Tamm, O., Truu, J., Truu, M., Orupold, K. (2023). Performance of biocover in controlling methane emissions from landfill: A decade of full-scale investigation. *Process Safety and Environmental Protection*, 172, 486–495.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., ... Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434.
- Larsson, D. G. J., Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269.
- Levit, D. (2024). *Prügilademest toodetud prügilakatete võrdlemine antibiootikumiresistentsusgeenide leviku seisukohast*. Bakalaureusetöö. Tartu ülikool, bioloogia ja elustiku kaitse õppekava.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), e120.
- Lutsar, I., Mändar, R., Mikelsaar, M., ... Parm, Ü. (2017). *Meditiiniline mikrobioloogia. Üldmikrobioloogia*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. (2022). *Brock biology of microorganism*. Harlow: Pearson education.
- Managaki, S., Murata, A., Takada, H., Bui, C. T., Chiem, N. H. (2007). Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Environmental Science and Technology*, 41(23), 8004–8010.
- Martínez, J. L., Coque, T. M., Baquero, F. (2014). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 13(2), 116–123.
- Mazutis, L., Gilbert, J., Ung, W. L., Weitz, D. A., Griffiths, A. D., Heyman, J. A. (2013). Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 8(5), 870–891.
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., ... Naghavi, M. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 12–88.

- Nguyen, A. v., Yaghoobi, M., Azizi, M., Davaritouchae, M., Simpson, K. W., Abbaspourrad, A. (2023). Ladder-shaped microfluidic system for rapid antibiotic susceptibility testing. *Communications Engineering*, 2(1), 15.
- Nõlvak, H., Truu, M., Kanger, K., Tampere, M., Espenberg, M., Loit, E., Raave, H., Truu, J. (2016). Inorganic and organic fertilizers impact the abundance and proportion of antibiotic resistance and integron-integrase genes in agricultural grassland soil. *Science of The Total Environment*, 562, 678–689.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L., Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3367.
- Ovung, A., Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, 2021 13:2, 13(2), 259–272.
- Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., Pruden, A. (2006). Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40(12), 2427–2435.
- Perreten, V., Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1169–1172.
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., Laviña, M. (2019). On sulfonamide resistance, *sul* genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103611.
- Radu, E., Woegerbauer, M., Rab, G., Oismüller, M., Strauss, P., Hufnagl, P., Gottsberger, R. A., Krampe, J., Weyermair, K., Kreuzinger, N. (2021). Resilience of agricultural soils to antibiotic resistance genes introduced by agricultural management practices. *Science of The Total Environment*, 756, 143699.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 45.

- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160.
- Smith, C. J., Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20.
- Srathongneam, T., Sresung, M., Paisantham, P., Ruksakul, P., Singer, A. C., Sukchawalit, R., Satayavivad, J., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K. (2024). High throughput qPCR unveils shared antibiotic resistance genes in tropical wastewater and river water. *Science of The Total Environment*, 908, 167867.
- Stahl, D.A., Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic Acid Tech. Bact. Syst.*, 205–248.
- Zhang, A. N., Gaston, J. M., Dai, C. L., ... Zhang, T. (2021). An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–11.
- Zhang, R., Yang, S., An, Y., Wang, Y., Lei, Y., Song, L. (2022). Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *Science of The Total Environment*, 806, 150647.
- Zhou, Y., Niu, L., Zhu, S., Lu, H., Liu, W. (2017). Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China. *Science of The Total Environment*, 599–600, 1977–1983.
- Tiirik, K., Nõlvak, H., Truu, M., Peeb, A., Kõiv-Vainik, M., Truu, J. (2021). The Effect of the Effluent from a Small-Scale Conventional Wastewater Treatment Plant Treating Municipal Wastewater on the Composition and Abundance of the Microbial Community, Antibiotic Resistome, and Pathogens in the Sediment and Water of a Receiving Stream. *Water* 2021, Vol. 13, Page 865, 13(6), 865.
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., ... Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766.
- Wages, J. M. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 243–250.
- Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. *Science*, 365(6459).

- Wang, N., Yang, X., Jiao, S., Zhang, J., Ye, B., Gao, S. (2014). Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS ONE*, 9(11), e112626.
- Venkatesan, M., Fruci, M., Verellen, L. A., Skarina, T., Mesa, N., Flick, R., Pham, C., Mahadevan, R., Stogios, P. J., Savchenko, A. (2023). Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nature Communications*, 14(1), 4031.
- Wolters, B., Hauschild, K., Blau, K., Mulder, I., Heyde, B. J., Sørensen, S. J., Siemens, J., Jechalke, S., Smalla, K., Nesme, J. (2022). Biosolids for safe land application: does wastewater treatment plant size matters when considering antibiotics, pollutants, microbiome, mobile genetic elements and associated resistance genes? *Environmental Microbiology*, 24(3), 1573–1589.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 2007 5:3, 5(3), 175–186.
- Yin, X., Li, L., Chen, X., Liu, Y. Y., Lam, T. T. Y., Topp, E., Zhang, T. (2023). Global environmental resistome: Distinction and connectivity across diverse habitats benchmarked by metagenomic analyses. *Water Research*, 235, 119875.

KASUTATUD VEEBISAIDID

Centers for Disease Control and Prevention. About Antimicrobial Resistance. (2024).

Kasutatud 03.11.2024, <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/about/index.html>

LISAD

Lisa 1. Testitud *sul3* geeni spetsiifilised praimerid.

Praimer	Praimeri järjestus (5'-3')	Praimeri sulamistem- temp (°C)	Juukse- nõela sulamistem- temp (°C)	Homodimeer ΔG (kcal/mol)	Viide
sul3-F2	TCCGTT CAGCGAATTGGTGCAG	67,2	50,1	-7,05 (4 bp)	Pei <i>et al.</i> , 2006
sul3-R2	TTCGTT CACGCCTTACACCAGC	66,9	39,2	-4,95 (3 bp)	Pei <i>et al.</i> , 2006
sul3-F3	CAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGC	67,6	43,8	-18,01 (10 bp)	Arabi <i>et al.</i> , 2015
sul3-R3	GATTTCCGTGACACTGCAATCATT	64,1	28,3	-7,05 (4 bp)	Arabi <i>et al.</i> , 2015
sul3-F4	CAACGGAAGTGGGCGTTGTGGA	68,9	54,1	-8,85 (5 bp)	Kozak, <i>et al.</i> , 2009
sul3-R4	GCTGCACCAATTCGCTGAACG	66,4	40,6	-7,05 (4 bp)	Kozak, <i>et al.</i> , 2009
sul3-F6	GGTTGAAGATGGAGCAGATG	60,4	-	-3,14 (2 bp)	Wang <i>et al.</i> , 2014
sul3-R6	GCCTTAATGACAGGTTTGAGTC	61,2	36,9	-4,85 (4 bp)	Wang <i>et al.</i> , 2014

Lisa 2. Võimalikud praimerite paaride kombinatsioonid, mida katsetati *sul3* geeni fragmendi amplifitseerimiseks. Praimerite omaduste leidmiseks kasutati OligoAnalyzer programmi (Integrated DNA Technologies).

Praimerite kombinatsioon	Fragmendi pikkus (aluspaari)	Praimerite sulamistem- temp (°C)	Heterodimeer ΔG (kcal/mol)	Märkused
F4/R4	244	68,9/66,4	-6,9 (4 bp)	Ainult F4 praimerit kasutades tekkis amplifikatsiooniprodukt, mistõttu on see praimer ebaspetsiifiline.
F4/R2	348	68,9/66,9	-11,16 (5 bp)	
F4/R3	478	68,9/64,1	-11,54 (6 bp)	
F2/R3	257	67,2/64,1	-8,65 (5 bp)	TapeStationil tekkis lisaprodukt.
F3/R4	331	67,6/66,4	-7,32 (5 bp)	
F3/R2	435	67,6/66,9	-10,71 (6 bp)	TapeStationil tekkis mitu lisaproducti.
F3/R3	565	67,6/64,1	-5,37 (4 bp)	TapeStationil tekkis lisaprodukt, mõju oli suurem, kui märklaudgeeni oli vähem.

Lisa 3. Endise prügila katte, loodusliku fooni ja Tartu RPJ proovid koos *sul* geenide arvukuste ja osakaaludega. <LOQ – geeni arvukus proovis on alla määramispiiri (794 koopiat/g*KA).

GMP	Sügavus (cm)	<i>sul1</i> (koopiat/g*KA)	<i>sul2</i> (koopiat/g*KA)	<i>sul3</i> (koopiat/g*KA)	<i>sul1</i> %	<i>sul2</i> %	<i>sul3</i> %
K1 (2017)	Risosfäär	7,85E+05	1,73E+07	<LOQ	0,002	0,050	<LOQ
	0-10	7,80E+06	2,85E+07	<LOQ	0,023	0,084	<LOQ
	25	2,79E+07	7,34E+07	<LOQ	0,058	0,153	<LOQ
	50	5,03E+07	2,03E+07	<LOQ	0,450	0,182	<LOQ
	75	8,67E+07	2,61E+07	<LOQ	0,541	0,163	<LOQ
	100	5,78E+07	4,41E+07	7,13E+04	0,606	0,463	0,00075
	125	2,47E+07	8,56E+06	2,49E+05	0,210	0,073	0,00213
	150	1,10E+08	3,96E+07	1,72E+06	0,664	0,239	0,01037
	175	3,53E+07	6,55E+06	3,39E+05	0,182	0,034	0,00175
	225	2,12E+07	9,86E+06	4,61E+05	0,640	0,298	0,01393
K2 (2017)	Risosfäär	1,12E+07	5,56E+07	<LOQ	0,013	0,067	<LOQ
	0-10	7,60E+06	8,63E+07	<LOQ	0,007	0,075	<LOQ
	25	7,45E+07	9,72E+06	<LOQ	0,239	0,031	<LOQ
	50	1,64E+07	1,88E+06	2,43E+06	0,215	0,025	0,03180
	75	9,06E+07	4,57E+06	4,85E+05	0,718	0,036	0,00384
	100	2,00E+07	7,64E+06	4,55E+06	0,148	0,056	0,03361
	125	2,75E+07	5,14E+06	1,57E+06	0,181	0,034	0,01031
	150	2,46E+07	3,50E+06	2,46E+05	0,182	0,026	0,00181
	175	4,31E+06	1,89E+06	5,05E+03	0,212	0,093	0,00025
	225	3,62E+07	1,99E+07	4,90E+04	0,839	0,459	0,00113
K3 (2017)	Risosfäär	4,78E+06	3,45E+07	<LOQ	0,006	0,041	<LOQ
	0-10	3,73E+06	1,78E+07	<LOQ	0,006	0,029	<LOQ
	25	6,57E+06	1,57E+07	<LOQ	0,019	0,046	<LOQ
	50	5,90E+06	1,53E+07	<LOQ	0,018	0,046	<LOQ
	75	1,12E+07	3,14E+07	<LOQ	0,047	0,132	<LOQ
	100	1,34E+08	1,76E+08	2,12E+06	0,209	0,275	0,00331
	125	2,29E+08	5,30E+07	2,86E+06	0,496	0,115	0,00618
	150	8,53E+06	3,94E+07	<LOQ	0,037	0,169	<LOQ
	175	3,14E+07	3,04E+07	<LOQ	0,106	0,102	<LOQ
	225	6,39E+07	2,33E+07	<LOQ	0,437	0,159	<LOQ
K1 (2023)	0-10 cm	3,18E+06	8,27E+06	<LOQ	0,008	0,021	<LOQ
K2 (2023)	0-10 cm	8,93E+06	3,73E+07	<LOQ	0,011	0,047	<LOQ
K3 (2023)	0-10 cm	2,70E+06	3,89E+07	<LOQ	0,004	0,051	<LOQ
Looduslik pinnas (2023)	0-10 cm	8,51E+05	6,89E+06	<LOQ	0,005	0,037	<LOQ
	0-10 cm	2,78E+06	4,69E+06	<LOQ	0,013	0,022	<LOQ
	0-10 cm	1,49E+06	1,00E+07	<LOQ	0,005	0,033	<LOQ
	0-10 cm	1,28E+06	4,15E+07	<LOQ	0,004	0,125	<LOQ
	0-10 cm	1,15E+06	5,62E+06	<LOQ	0,003	0,016	<LOQ
Tartu RPJ (2024)		6,63E+10	3,67E+09	1,31E+06	4,693	0,260	0,00009
		5,46E+09	8,51E+08	8,64E+08	1,073	0,167	0,17003
		2,01E+09	7,08E+08	3,10E+07	0,705	0,249	0,01089

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aap Muromägi,

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

Aap Muromägi

26.05.2025