

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
GEOGRAAFIA OSAKOND

Mario Mutli

**ANAEROOBSE KÄITLEMISE MÕJU VEISELÄGA
ANTIBIOOTIKUMIRESISTENTSETE BAKTERITE JA
PATOGEENIDE SISALDUSELE**

BAKALAUREUSETÖÖ

Juhendaja:
Kertu Tiirik (MSc)

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja: _____

Osakonna juhataja: _____

Tartu 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Antibiootikumid.....	5
1.1.1. Antibiootikumide kasutamine	5
1.1.2. Antibiootikumiresistentsuse tekke ja leviku mehhanismid	6
1.2. Läga ja selle kasutamine	6
1.3. Anaeroobne käärivamine	7
1.3.1. Hüdroolüüs	7
1.3.2. Atsidogenees.....	8
1.3.3. Atsetogenees	8
1.3.4. Metanogenees	8
1.4. Digestaat ja selle kasutamine	9
1.5. Ohud läga ja digestaadi kasutamisel.....	10
1.5.1. Antibiootikumiresistentsusgeenid	10
1.5.2. Patogeenid	11
1.6. Antibiootikumiresistentsuse ja patogeenide uurimise meetodid	11
1.6.1. PCR ja kvantitatiivne PCR	11
1.6.2. Sekvencerimine	12
1.6.3. Metagenoomika	13
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	15
2.1. Orgaanilise väetise proovide võtmine.....	15
2.2. Mikroobikoosluse DNA eraldamine	15
2.3. Kvantitatiivne PCR	15
2.4. qPCR andmete kvaliteedi analüüs ja grupeerumine	17
2.5. Märklaudegenide koopiaarvude leidmine.....	17
3. TULEMUSED	18
3.1. Läga ja digestaadi proovide keemilised parameetrid.....	18
3.2. qPCR-i tulemuste kvaliteedikontroll	18
3.3. ARG-ide ja patogeenide tuvastamine ja kvantifitseerimine	20
4. ARUTELU	23
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	27
TÄNUAVALDUSED.....	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30
LISA 1	35
LIHTLITSENTS.....	36

LÜHENDID

ARG – antibiootikumiresistentsusgeen

blaCTX-M – β -laktaamiresistentsust kodeeriv geen

blaTEM1 – β -laktaamiresistentsust kodeeriv geen

bp – aluspaar(i) (*Base Pair*)

HGT – horisontaalne geeniülekanne (*Horizontal Gene Transfer*)

KA – kuivaine

NGS – suure läbilaskevõimega sekveneerimistehnoloogiad (*Next-Generation Sequencing*)

OA – organiline aine

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

qnrS – fluorokinolooni resistentsust kodeeriv geen

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative PCR*)

sul1 – sulfoonamiidiresistentsust kodeeriv geen

tetA – tetratsükliiniresistentsust kodeeriv geen

tetB – tetratsükliiniresistentsust kodeeriv geen

SISSEJUHATUS

Antibiootikumid on ravimigrupp, mida kasutatakse inimeste ja loomade bakteriaalsete haiguste kontrolli all hoidmiseks. Lisaks tarvitatakse antibiootikume suurtes kogustes loomade produktsiooni suurendamiseks. Loomorganism ei kasuta ära kogu ravimit ja antibiootikumide jäägid eritatakse väljaheidetega, mida kasutatakse põldude väetamiseks. Kui keskkonda satub liiga palju ravimijääke, mille doosid jäävad bakteritele letaalsest mõjust allapoole, võib välja kujuneda antibiootikumiresistentsus. Resistentsus võib kujuneda ka organismis, kui ravimit manustatakse ebaotstarbekalt (Kummerer *et al.*, 2000).

Antibiootikumiresistentsusgeenid paiknevad enamasti mobiilsetel elementidel ja võivad üle kanduda keskkonnas olevatele bakteritele tänu horisontaalsele geeniülekandele. Keskkonnast võivad bakterid taimedes akumulereuda, sattuda kokkupuutesse inimestega ja põhjustada tõsiseid terviseprobleeme, kuna nende bakteriaalsete haiguste ravimine on raskendatud. Antibiootikumiresistentsuse kiire teke on suureks mureks, kuna see võib saada ohtlikuks inimeste ja loomade tervisele (Alanis, 2005).

Antibiootikumiresistentsusest vabanemiseks on tänapäeval olemas mitmeid meetodeid. Üheks mooduseks, on kasutada läga anaeroobset töötlust, mille saadusteks on digestaat ja metaan, mida saab kasutada biogaasina. Protsessi käigus hävivad antibiootikumiresistentsusgeenid ja patogeenid.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni abil antibiootikumiresistentsusgeenide *tetA*, *tetB*, *sul1*, *qnrS* *blaTEM1* ja *blaCTX-M* ning patogeenide *Enterococcus faecalis*-e ja *Escherichia coli* sisaldust lägas ja selle digestaadis ning seeläbi hinnata anaeroobse kääritamise efektiivsust.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumid

Antibiootikumid on elusorganismide (bakterite, seente) poolt produtseeritud või tööstuslikult sünteesitud ained, mis surmavad mikroorganisme või pärsivad tugevalt nende kasvu ning terapeutilistes annustes ei kahjusta peremeesorganismi. Esimesi antibiootikume hakati tootma juba 1940. aastate alguses. Tänapäeval kasutatakse antibiootikume, mida on keemiliselt modifitseeritud, et nende toimet efektiivsemaks muuta (Ding & He, 2010). Antibiootikumid on tõenäoliselt kõige edukam ravimite kategooria, mida kasutatakse inimeste ja loomade ravis (Martinez & Baquero, 2014).

1.1.1. Antibiootikumide kasutamine

Antibiootikume on kasutatud inimeste ja loomade bakteriaalsete haiguste kontrolli all hoidmiseks ja ravimiseks peaaegu sada aastat (Mather *et al.*, 2011). Peale selle kasutatakse antibiootikume laialdaselt ka looma- ja taimekasvatustes, et ennetada haiguseid, kiirendada loomade kasvu ja tõsta nende produktsiooni (Martinez, 2009). Antibiootikumid on hädavajalikud inimeste ja loomade bakterinfektsioonide ravis, mistõttu on väga oluline säilitada nende efektiivsus. Ravimite tarvitamine kasvab pidevalt kogu maailmas ja antibiootikumid on ravimigrupp, mis mõjutab elusorganisme kõige rohkem (Allen *et al.*, 2010).

Veterinaarmeditsiinis ning loomade kasvu suurendamiseks kasutatakse maailmas kümneid tuhandeid tonne antibiootikume aastas. Üle poole maailmas tarvitavatest antibiootikumidest leiab kasutust loomakasvatustes. Peamised veterinaarmeditsiinis kasutatavad antibiootikumirühmad on aminoglükosiidid, β -laktaam antibiootikumid, tsefalosporiinid, fenikoolid, fluorokinoloonid, makroliidid, linkosamiidid, tetratsükliinid, sulfoonamiidid ja trimetoprim (Kemper, 2008).

Aastal 2006 keelati Euroopa liidus antibiootikumide kasutamine põllumajanduses loomade kasvu edendamiseks. Ameerika Ühendriikides aga sellist keeldu ei ole ning umbes pooled antibiootikumid kasutatakse USAs just selleks (Pappas, 2011). Laiaulatuslik antibiootikumide kasutamine veterinaarmeditsiinis, põllumajanduses ja loomakasvatustes põhjustab

antibiootikumide reostuskoormuse tõusu sõnnikus, mida kasutatakse väetisena (Baquero *et al.* 2008).

1.1.2. Antibiootikumiresistentsuse tekke ja leviku mehhanismid

Antibiootikumiresistentsus on mikroorganismide võime mitte alluda antibiootikumide toimele. Antibiootikumiresistentsus võib kujuneda nii keskkonnas, kus leidub palju ravimijääke, mille doosid jäävad bakteritele surmavast doosist allapoole või siis inim- ja loomorganismis, keda pole ravitud piisavalt efektiivselt. Viimasel juhul siis, kui ravimit manustatakse liiga pikaajaliselt, liiga lühiajaliselt või tarbitakse valesti. Sellisel juhul ei hävita antibiootikum patogeenipopulatsiooni täielikult ning kasutatava antibiootikumi vastu võib patogeenidel kujuneda välja resistentsus (Baquero, 2008).

Antibiootikumiresistentsusgeen (ARG) on bakteriaalne geen, mis põhjustab resistentsust ühe või mitme antibiootikumi vastu. ARG-id saavad levida keskkonnas kas vertikaalse või horisontaalse geeniülekanne teel. Esimesel juhul pärivad järglased geenid oma vanematelt. Kuna ARG-id paiknevad enamasti plasmiididel või teistel mobiilsetel geneetilistel elementidel saab toimuda horisontaalne geeniülekanne (HGT – *Horizontal gene transfer*), mille käigus võivad geenid üle kanduda nii sama põlvkonna esindajate kui ka teiste bakteritüvede ja -liikide vahel (Palmer *et al.*, 2010). ARG-id, mis vastutavad antibiootikumiresistentsuse eest ühes bakteriliigis, võivad kanduda üle teistele liikidele läbi erinevate mehhanismide (Naik *et al.*, 1994). ARG-ide horisontaalne geenitriiv toimub läbi kolme mehhanismi: transformatsiooni, transduktsiooni ja konjugatsiooni. Transformatsiooni käigus siseneb keskkonnas olev vaba geneetiline info bakterirakku läbi rakumembraani, transduktsiooni käigus kandub geneetiline info ühelt bakterirakult teisele viiruste vahendusel ja konjugatsiooni käigus kandub geneetiline info ühelt bakterirakult teisele läbi otsese kontakti (Stearns & Hoekstra, 2005).

1.2. Läga ja selle kasutamine

Lüpsilehm produtseerib aastas keskmiselt 19,3 tonni väljaheiteid (Burton & Turner 2003). Karjamaal vabalt elav lehm ei tekita läga, kuna tema väljaheited jäävad põllule. Lüpsmise ajaks aetakse lehmad lauta, kus nad väljutavad oma ainevahetusproduktid põrandal asuvasse renni. Läga ehk vedelsõnnik on lehmasõnniku, uriini ja vee segu ning selle kogumiseks on

lautades spetsiaalsed rennid, kust vedelsõnnik mahutitesse liigub. Kogutud läga säilitatakse kuni edasise kasutamiseni (Banks *et al.*, 2011).

Tänapäeval kasutatakse läga põhiliselt kahel otstarbel. Üks võimalus on vedelsõnnikut kasutada väetisena, kuna selles sisaldub orgaanilist ja anorgaanilist lämmastikku ja fosforit ning kaaliumi. Väiksemal määral leidub ka naatriumi, magneesiumi, kaltsiumi, mangaani ja väävli. Väetamiseks kasutatakse spetsiaalseid põllutöomasinaid, mis suruvad läga pinnasesse (Mattila, 2006).

Teine võimalus läga kasutamiseks on sellest toota biokütust või elektrit. Kääritites, kuhu on kogutud läga, silo, tahke sõnnik, hein, orgaanilised jäätmed või mõni muu bioreaktsiooni parandav produkt, toimub anaeroobse kääritamise protsess (Alvarez & Lidén, 2008). Selle lõppsaaduseks on biogaas, mis lisaks metaanile sisaldab ka süsinikdioksiidi (CO₂), vähesel määral lämmastikku (N₂), divesiniksulfiidi (H₂S) ja teisi gaase (Normak *et al.*, 2009). Eestis toodab lägast biogaasi Estonia OÜ Oisu biogaasijaam.

1.3. Anaeroobne kääritamine

Anaeroobse käärimise käigus lagundatakse kompleksühendid metaaniks ja süsihappegaasiks. Protsessi saab tinglikult jaotada neljaks etapiks: hüdroolüüs, atsidogenees, atsetogenees ja metanogenees (Joonis 1).

Läga anaeroobset töötlust kasutatakse ühelt poolt selleks, et saada biogaasi, teisalt aitab aga kääritamine tõsta läga kasutamise efektiivsust orgaanilise väetisena. Cote *et al.* (2006) uurisid patogeenide *Escherichia coli* ja *Salmonella spp.* sisaldust lägas ja selle digestaadis pärast psührofiilset anaeroobset kääritamist. Patogeeni *E. coli* ei leidunud viieteistkümnes digestaadi proovis kahekümnest. Ülejäänud viie puhul oli kääritusjärgis patogeene 99,67–99,99% vähem kui lägas.

1.3.1. Hüdroolüüs

Hüdroolüüs on anaeroobse lagunemise esimene etapp, milles osalevad peamiselt bakterid klassidest *Clostridia* ja *Bacilli* (Truu, 2014). Hüdroolüüsi käigus lagundatakse kompleksühendid (polüsahhariidid, valgud, nukleiinhapped, lipiidid) lihtsamateks mono- ja oligomeerideks (monosahhariidid, aminohapped, puriinid, pürimidiinid, glütserool,

rasvhapped) (Truu, 2014). Hüdrolüüs on anaeroobse lagundamise üks tähtsamaid protsesse, määrates anaeroobse käärimise kiiruse ja efektiivsuse (Insam *et al.*, 2010).

1.3.2. Atsidogenees

Atsidogeneesi protsessis lisanduvad hüdrolüüsis toimivatele bakteritele ka hõimkondadesse *Bacteroidetes* ja *Actinobacteria* kuuluvad bakterid (Truu, 2014). Atsidogeneesi käigus muudetakse hüdrolüüsis saadud ained käärivate bakterite poolt metanogeneesi substraatideks. Monosahhariidid, aminohapped ja rasvhapped lagundatakse atsetaadiks, süsinikdioksiidiks ja vesinikuks (70%) või lühikese ahelaga rasvhapeteks (süsiniku aatomite arv 1-6) ja alkoholiks (30%) (Al Seadi *et al.*, 2008).

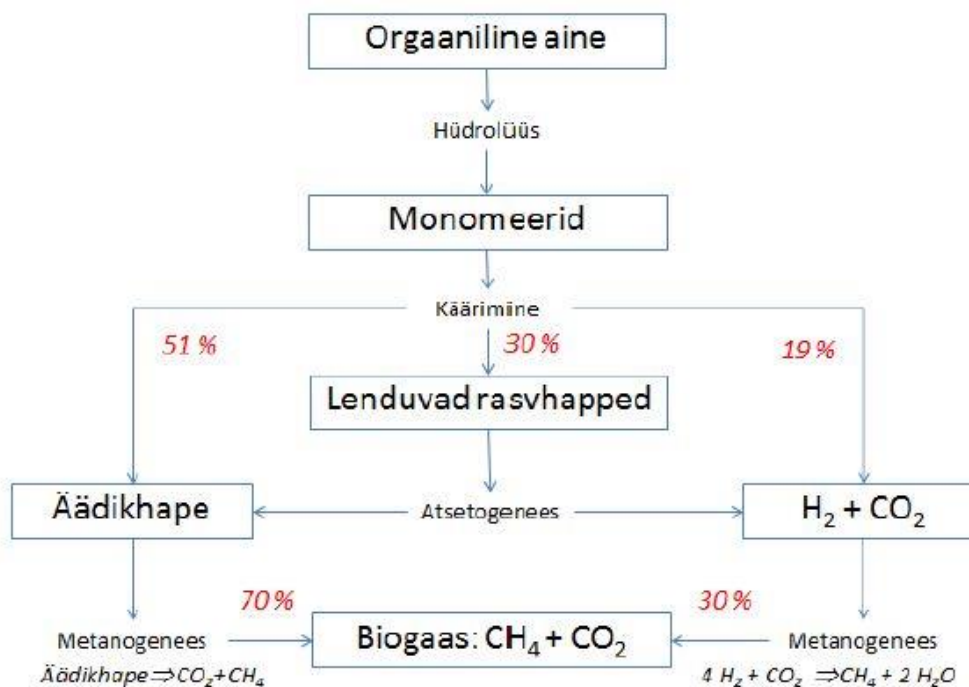
1.3.3. Atsetogenees

Atsetogenees on käärimise kolmas faas, kus bakterid perekondadest *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* ja *Acetobacterium* lagundavad atsidogeneesi protsessi käigus saadud lühikese ahelaga rasvhapped ja alkoholi atsetaadiks, vesinikuks ja süsinikdioksiidiks, et metanogeneesi läbi viivad arhed saaks neid edasi lagundada (Truu, 2014). Vesinikku võib pidada atsetogeneesi „jääkproduktiks“, mis inhibeerib atsetogeneesi käigus osalevate bakterite metabolismi. Atsetogenees ja metanogenees toimuvad paralleelselt (Al Seadi *et al.*, 2008).

1.3.4. Metanogenees

Metaani teke on viimane ja tingimuste muutumise suhtes kõige tundlikum etapp orgaanilise aine anaeroobse lagunemise protsessis (Insam *et al.*, 2010). Metanogeneesi käigus muudetakse atsetaat, vesinik ja süsinikdioksiid metaaniks. Lagunemise viivad lõpuni seltsidesse *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* ja *Methanococcales* kuuluvad anaeroobsed arhed. 70% tekkinud metaanist pärineb äädikhappes (sugukonna *Methanosaetaceae* liigid) ja ülejäänud 30% vesinikust ja süsinikdioksiidist (seltside *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* liigid) (Truu, 2014). Sugukonna *Methanosarcinaceae* liigid suudavad metaani toota nii äädikhappes kui ka vesinikust ja süsinikust (Truu, 2014). Metanogenees on anaeroobse lagundamise juures kõige aeglasem biokeemiline protsess. Protsessi toimumise kiirust mõjutavad mitmed asjaolud: tooraine koostis, tooraine lisamine, pH (pH=6,5-8,5, optimaalselt 7,0-8,0) ja temperatuur (toimub

psührofiilses (20°C), mesofiilses (35-42°C) ja termofiilses (45-60°C) keskkonnas) (Karakashev *et al.*, 2005). Metaani produktsioon võib lõppeda, kui toimub hapniku liigne juurdevool, temperatuuri muutus või käärituskambri ülekoormamine (Al Seadi *et al.*, 2008).



Joonis 1. Orgaanilise aine anaeroobse lagunemise skeem anaeroobse käitluse korral (protsendid näitavad kuidas metaaniteke faaside vahel jaguneb) (Truu, 2014).

1.4. Digestaat ja selle kasutamine

Digestaat ehk kääritusjääk on orgaanilise aine anaeroobsel lagunemisel tekkiv saadus, mis koosneb mikroobsest biomassist, pooleldi lagunenu orgaanilisest ainest ja anorgaanilistest ühenditest. Kääritusjäaki võib edasi kasutada alles siis, kui on veendunud, et see on ohutu nii inimeste kui loomade tervisele (Banks *et al.*, 2011).

Digestaati saab edukalt kasutada põllumaa väetamisel (Albuquerque *et al.*, 2012). Kääritusjäak on taimedele pinnasest kergemini omastatav kui sõnnik, kuna sisaldab rohkem mineraalsel kujul toitaineid. Digestaat on homogeenne, toitainerikas ja seda saab edukalt kasutada alternatiivina tööstuslikele väetistele (Weiland, 2010). Orgaanilise väetise eelistamine tööstuslikule aitab ka vähendada keskkonna saastet, vähendades väetiste tootmisel tekkivaid kasvuhoonegaase (Rodrigues-Navas, 2013).

Beneragama *et al.* (2013) uurisid mitmele antibiootikumile (nt kanamütsiin, oksütetratsükliin) resistentsete bakterite kooslusi lägas ja digestaadis pärast termo- ja mesofiilset anaeroobset kääritamist. Selgus, et 22 päevane termofiilne kääritusprotsess hävitas kõik bakterid ja mesofiilne 90% bakterikooslusest.

1.5. Ohud läga ja digestaadi kasutamisel.

Organism kasutab antibiootikumidest vaid väga väikest osa ja ülejäänud eritatakse väljaheidetega (Kemper, 2008). Peamiseks ohuks kääritusjäägi või läga kasutamisel tööstuslike väetiste asemel on antibiootikumijääkide, antibiootikumresistentsete bakterite ja patogeenide sattumine mullakeskkonda (Heuer *et al.*, 2011). Antibiootikumide kõrge kontsentratsioon mullas võib hävitada mullas olevad mikroorganismid, kuid kui antibiootikumide kontsentratsioon keskkonnas jääb alla surmava toime, võib see põhjustada ravimiresistentsuse väljakujunemist patogeensetes, kommensaalsetes ja ka teistes keskkonnas leiduvates bakterikolooniates (Altmets, 2011). Kuna taimedel puudub väljutusmehhanism, akumulerevad kahjulikud ühendid (k.a antibiootikumide jäägid) mullast taimedesse, kust nad võivad sattuda edasi inimese toidulauale (Lillenberg, 2011). Antibiootikumiresistentsed bakterid võivad olla inimesele ohtlikud, kuna nendest haigustekitajatest on väga keeruline vabaneda, sest nad ei pruugi alluda ravile tuntud antibiootikumidega (Kemper, 2008).

1.5.1. Antibiootikumiresistentsusgeenid

Tänapäeval kasutatakse antibiootikume väga laialdaselt, et surmata haigustekitajaid või pärssida nende levikut. Põllumajanduses on tihtipeale tarvitusel samad antibiootikumid, mida kasutatakse inimpatogeenide (patogeenne *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Salmonella spp.*) ravimiseks, nagu näiteks amoksitsilliin ja erütromütsiin (Allen *et al.*, 2010). Antibiootikume antakse kariloomadele suurtes kogustes, kuid organism kasutab ravimist vaid väga väikest osa ja ülejäänud eritatakse väljaheidetega (Kemper, 2008). Mikroobid, kes saavad ARG-id teistelt bakteritelt, võivad jääda ellu ning levitada omakorda ARG-e ümbritsevasse keskkonda. (Baquero *et al.* 2008).

Chee-Sanford *et al.* (2001) uurisid ARG-ide *tetW*, *tetO*, *tetQ*, *tetM*, *tetS*, *tetT*, *tetB* ja *otrA* levikut keskkonnas. Proovid võeti sealäga laguunist ja põhjaveest, nii alla kui ka ülesvoolu. qPCRi kasutades, leiti et laguunis leidis kõiki ARG-e. Ülesvoolu paiknevatest kaevudest ei leidunud resistentsusgeene, kui allavoolu olid geenid tuvastatavad kuni 250m kauguseni.

1.5.2. Patogeenid

Patogeenid on mikroorganismid (viirused, bakterid, seened, algloomad), mis põhjustavad peremeesorganismis haigusi. Haiguse raskus oleneb patogeeni tõvestusvõimest, organismi pääsenud mikroobide hulgast, paljunemise kiirusest ning organismi vastupanuvõimest (Murray *et al.*, 2009). Lägas ja digestaadis võib leida erinevaid patogeene nagu *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Enterococcus spp.*, rotaviirus, *Campylobacter spp.* (Martens & Böhm, 2009).

Iwasaki *et al.* (2011) uurisid *Coli-Aerogenes* gruppi kuuluvate bakterite ja *Enterococcus spp.* sisaldust nelja Jaapani biogaasijaama vedelsõnnikus ja selle digestaadis, nii mesofiilse kui ka termofiilse kääritamise tingimustes. Leiti, et mesofiilse kääritamisprotsessi tulemusel oli digestaadis 10^2 - 10^3 patogeeni milliliitri kohta algse 10^5 - 10^6 asemel, termofiilse kääritamise protsessi käigus hävisid aga kõik uuritud patogeenid.

1.6. Antibiootikumiresistentsuse ja patogeenide uurimise meetodid

Viimastel aastakümnetel on antibiootikumiresistentsuse esinemine pidevalt tõusud, tänu antibiootikumide laialdasele kasutamisele loomakasvatuses ja inimeste ravis (Sørum & Sunde, 2001). Antibiootikumiresistentsete mikroobide tuvastamiseks kasutatakse tavaliselt antibiootikumi-tundlikkuse teste. Kuna nende testidega ei saa määrata täpselt resistentsust põhjustavat geeni, kasutatakse ARG-ide eristamiseks tihti molekulaarseid meetodeid (van Hoek *et al.*, 2005). Molekulaarsetest meetoditest kasutatakse kõige rohkem polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), kvantitatiivset PCR-i (qPCR) ja DNA sekveneerimist (Zhang *et al.*, 2009).

1.6.1. PCR ja kvantitatiivne PCR

Polümeraasi ahelreaktsioon on biokeemiline meetod molekulaarbioloogias, mis võimaldab ühest DNA fragmendist luua tuhandeid koopiaid. PCR-ga saab keskkonnaproovidest amplifitseerida ja detekteerida ka madala DNA või RNA kontsentratsiooniga sihtmärke (Wilson *et al.*, 1999). PCR-ga saab teha 3-4 tunniga miljoneid kordusi kindlast geenilõigust, tervest geenist või geeniklastritest (Malink *et al.*, 2008). PCR-i amplifikatsiooni tulemus sõltub nii proovi ja praimerite kvaliteedist, kui ka nukleiinhappe eraldamise ja puhastamise kvaliteedist (Malink *et al.*, 2008). PCR-i efektiivsust takistavad humiinhappe, orgaanilised

ained ja saviosakesed, mis on nukleiinhappesse jäänud tänu ebakvaliteetsele DNA eraldamisele (Kirk *et al.*, 2004).

Kvantitatiivne PCR (qPCR) on meetod, mis võimaldab lisaks geenide tuvastamisele ka nende arvukust määrata (Zhang *et al.*, 2009). Reaktsiooni toimumise jooksul on võimalik jälgida PCR produkti moodustumist ja amplifikatsioonikõverate alusel saab hinnata algset märklaudgeeni kogust proovis (Ginzinger, 2002). qPCR-i eelisteks on kiirus, tundlikkus, täpsus, katse korratavus ja automatiseeritus (Valasek & Repa, 2005).

Protsessis kasutatakse fluorestseeruvaid markereid, mille avaldumise intensiivsus on otseselt seotud saadud PCR-i produkti kogusega. Enimkasutatavaks fluorestseeruvaks ühendiks on *SYBR Green I* (Zhang *et al.*, 2009). Selle meetodi puuduseks on fluorokroomi mittespetsiifiline seondumine, mille tulemusena mõjutavad signaali kõik reaktsionis esinevad DNA molekulid. Vigade vältimiseks analüüsitakse *SYBR Green I* kasutamisel amplifitseeritud produktide sulamiskõveraid. Kui esineb kaks või rohkem piiki, siis see viitab mittespetsiifilise amplifikatsiooni esinemisele (Valasek & Repa, 2005).

Lisaks ARG-ide tuvastamisele ja kvantifitseerimisele kasutatakse PCR produkte ka antibiootikumiresistentsete mikroobide määramiseks DNA sekveneerimisel (primaarjärjestuse määramisel) (Zhang *et al.*, 2009).

McKinney *et al.* (2010) kasutasid qPCR meetodit, et uurida lisaks *tet* geenidele veel *sul1* ja *sul2* geenide sisaldust mahetootmisega lautade, tavaliste lautade, sigalate ja kanalate lägas. Leiti, et kanalate lägas on ARG-de sisaldus kõige väiksem ja kõige suurem sigalate lägas, kus resistentsusgeeni *sul1* osakaal 16S rRNA-st jäi vahemikku 0,01–0,1%. Mahetootmisega lautade lägas oli *sul1* geeni osakaal 16 rRNA-st 0,006% ja tavalise lauda lägas oli 0,02%.

1.6.2. Sekveneerimine

Tänu sekveneerimistehnoloogia kiirele arengule viimase kümnendi jooksul ja kulude vähenemisele (ühe aluspaari maksumus – *cost per base*) on järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS – *next generation sequencing*, suure läbilaskevõimega sekveneerimistehnoloogiad) viinud kiirele metagenoomse uuringu kasvule nii kvantitatiivselt kui ka kvalitatiivselt. Hiljutised uuendused sekveneerimistehnoloogiates aitavad uurida palju paremini mikroobikooslusi, genereerides miljoneid nukleotiidide järjestusi oluliselt

madalamate kuludega. NGS platvormide kasutusala on lai, alates ühe geeni sekveneerimisest kuni kogu genoomi järjestamiseni (Metzker, 2010). Pürosekveneerimisega saab produtseerida ~500 miljonit 400-500 bp (aluspaari) pikkuseid lugemeid ühe töötükli jooksul. *Illumina* platvormiga saab produtseerida palju rohkem järjestusi odavama hinnaga, kuid selle puuduseks on lühikesed (2x300 bp) lugemid (Gills, 2011). Limitatsioonid võivad tekkida tohutu andmemahu analüüsil, vajades suurt arvutusressurssi (Mincheol, 2013).

Durso *et al.* (2011) kasutasid pürosekveneerimist, et uurida 6-8 kuuste mullikate lägas olevaid mikroobe. Kõikidest ARG-idest moodustasid tetratsükliiniresistentsusgeenid vaid 5,06%.

1.6.3. Metagenoomika

Metagenoomika on hea meetod eraldamiseks ja avastamiseks uusi antibiootikumresistentseid gene. Metagenoomika on meetod, millega saab eraldada ARG-e mittekultiveeritavatest mikroobidest (Forsberg, 2012). Metagenoomika võimaldab uurida kogu keskkonnast pärinevat DNA-d ning on seetõttu mikrobiökoloogia üks põhilisi uurimismeetodeid. Keskkonna DNA-d analüüsides saab paremini mõista uuritavas ökosüsteemis olevate mikroobide ökoloogilist rolli, metabolismi ja evolutsiooni (Kim, 2013).

Mikroobikoosluse profiili määramiseks kasutatakse taksonoomilisi markereid nagu 16S rRNA (amplikonipõhine metagenoomika) või juhuslikke DNA piirkondi (*shotgun* põhine metagenoomika). *Shotgun*-sekveneerimise käigus toimub kogu genoomi fragmenteerimine juhuslikeks kindla pikkusega lõikudeks ja seejärel nende nukleotiidsed või aminohappelise järjestuse kindlaksmääramine. Amplikonipõhine metagenoomika uurib gene või genoomipiirkondi sihtmärk-meetoditel (aktiivsus- ja järjestusepõhised meetodid) (Zarraonaindia *et al.* 2012).

Shotgun põhise metagenoomika saab jaotada kaheks tehniliselt erinevaks võimaluseks. Esimene kasutab klonimisel põhinevat lähenemist, mis kasutab vektoreid nagu fosmiidid, kosmiidid, bakteriaalsed kunstlikud kromosoomid (BAC – *bacterial artificial chromosomes*), mis sobivad pikkade järjestustega (10 000-100 000 bp) raamatukogude klonimiseks või plasmiidseid vektoreid lühikeste sisenditega (kuni 5000 bp) raamatukogude jaoks. Teiseks võimaluseks on NGS tehnoloogiad, mis tuginevad DNA fragmentatsioonile ja eraldamisele mitmesuguste ligatsiooni meetoditega (Gilbert & Dupont, 2011). NGS tehnoloogiate jätkuva arengu tulemuseks on oluliselt odavam ja kiirem DNA raamatukogude sekveneerimine.

Praegu saame *shotgun* metagenoomika abil rekonstrueerida täispikki bakterite ja arhede genome ilma eelnevate teadmisteta organismide või nende genoomi järjestuste kohta. Selleks kasutatakse võimsaid algoritme, mis liidavad lühikesed ja kattuvad DNA fragmendid pikemateks järjestusteks (Thomas *et al.* 2012).

Wichmann *et al.* (2014) kasutasid Ameerika farmi veiste lägas leiduvate antibiootikumresistentsusgeenide uurimiseks metagenoomikat. Leiti palju ARG-e, sealhulgas ka tetratsükliinile resistentseid geene, mis moodustasid 5% kõigist resistentsetest geenidest.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Orgaanilise väetise proovide võtmine

Töös kasutatud orgaanilise väetise proovid on kogutud emeriitprofessor Rein Viiralti põldkatselt 26.04.13 (03.05.13), 11.06.13 ja 30.07.13 võttes ~250 g raskuse proovi nii veise vedelsõnnikust kui selle digestaadist. Digestaadi põhisubstraadiks on lüpsikarja vedelsõnnik, kuhu on lisatud ka tahket sõnnikut, heina ja silo ning see on kääritatud temperatuurivahemikus 37-38°C. Nii veiselägapst kui ka selle digestaadist määrati EMÜ Taimebiokeemia laboratooriumis KA% (KA – kuivaine), OA% (OA – orgaaniline aine), pH, NH₄-N, NO₃-N, N%, P%, K%, Ca% ja Mg%. DNA analüüsiks säilitati ~30 g väetist -18°C juures. Antud töö autor ise proovivõtus ei osalenud.

2.2. Mikroobikoosluse DNA eraldamine

Mikroobikoosluse DNA eraldati kolmest veiseläga ning kolmest digestaadi proovist kasutades *PowerSoil® DNA Isolation Kit*'i (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA). DNA eraldati vastavalt tootjapoolsele juhendile, kuid rakkude lüüsimiseks kasutati homogenisaatorit *Precellys® 24* (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Prantsusmaa) (5000 rpm, 20 sek).

DNA eraldamise protsessi edukust kontrolliti *Infinite M200* (Tecan Group Ltd, Männedorf, Šveits) spektrofotomeetrit kasutades.

2.3. Kvantitatiivne PCR

qPCR-i reaktsioonid viidi läbi firma QIAGEN Group masinat *Rotor Gene® Q* kasutades. qPCR segu lõppmahus 10 µl sisaldas vastavaid praimeritepaare (Tabel 1) lõppkontsentratsiooniga 0,0004 mM (v.a *blaTEM1* ja *blaCTX* 0,0006 mM) ja 5 µl *Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Läga ja digestaadi proovide qPCR segu sisaldas 1 µl vastava proovi DNA-d. Kõiki proove amplifitseeriti neljas korduses. qPCR programmid on toodud tabelis 2. Iga qPCR reaktsiooni korral kasutati võimaliku DNA saastuse avastamiseks negatiivset kontrolli, mis koosnes kõikidest qPCR segu komponentidest välja arvatud märklaud DNA.

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

Praimer	Märklaud-geen	Järjestus (5'-3')	Produkti pikkus (bp)	Praimerite seondumistemperatuur	Viide
F0 R0	16S rRNA	GAACGCGARGAACCTTACC ACAACACGAGCTGACGAC	111	54°C	Gloor <i>et al.</i> , 2010
tetA-F2 tetA-R2	<i>tetA</i>	TCAATTTCTGACGGGCTG GAAGCGAGCGGGTTGAGAG	96	60°C	Börjesson <i>et al.</i> , 2009
tetB-F1 tetB-R1	<i>tetB</i>	AGTGCGCTTTGGATGCTG TGAGGTGGTATCGGCAATGA	101	60°C	Börjesson <i>et al.</i> , 2009
sul1-F1 sul1-R1	<i>sul1</i>	CTGAACGATATCCAAGGATTYCC ^A AAAAATCCCATCCCCGGRTC ^A	239	58°C	Heuer <i>et al.</i> , 2008
qnrS-F qnrS-R	<i>qnrS</i>	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTG AAACACCTCGACTTAAGTCT	169	52°C	Guillard <i>et al.</i> , 2011
blaTEM1-F blaTEM1-R	<i>blaTEM1</i>	CATTTYCGTGTCGCCCTTAT ^A GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT	167	57°C	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009 ^B
UP CTX-M LP CTX-M	<i>blaCTX-M</i>	ACCAAYGATATYGCGGTGAT ^A ACATCGCGYCGGCMRTCT ^A	101	56°C	Colomer-Lluch <i>et al.</i> , 2011 ^B
Allan Fw Allan Rev	<i>E. coli Allan</i>	GCGAAGATCTATTGCCGAAA ATGAACCGAACCCATCCATA	83	58°C	Chetta <i>et al.</i> , 2012
Efs130F Efs490R	<i>E. faecalis</i> 16S rRNA	AACCTACCCATCAGAGGG GACGTTCACTACTAACG	360	54°C	Venieri <i>et al.</i> , 2012

^A – nukleotiidide tähistused: **R** – A või G; **Y** – C või T; **M** – A või C.

^B – modifitseeritud antud allika alusel.

Tabel 2. 16S rRNA ja funktsionaalsete geenifragmentide amplifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutatud qPCR programm.

qPCR programm	Sulamiskõverate analüüs
1 tsüklil: 50°C 2 min 1 tsüklil: 95°C 10 min 45 tsükli: 95°C 15 sek, X°C 30 sek, 72°C 30 sek	70 – 95°C Samm: 0,35°C

X – vastav praimerite seondumistemperatuur (Tabel 1).

2.4. qPCR andmete kvaliteedi analüüs ja grupeerumine

Kõiki läga ja digestaadi proovide qPCR tulemusi analüüsiti võttes arvesse RotorGene® Q (versioon 2.0.2) programmi poolt väljendatud sulamiskõverate asukohti ja kuju, paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtlust ja geenifragmentide paljundamise efektiivsust. Parema tulemuse saamiseks kasutati LinRegPCR (versioon 2014.0) programmi.

Läga ja digestaadi proove analüüsiti kahe erineva amplikonina kuna nende amplifikatsiooniefektiivsused olid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad.

2.5. Märklaudgeenide koopiaarvude leidmine

Proovides sisalduvate 16S rRNA geenifragmentide ja ARG-ide koopiaarvude määramiseks kasutati Rujiter *et al.* (2009) poolt välja pakutud valemit (1) proovi (A) ja iga 10 kordse standardi lahjenduse (B) hinnangulise erinevuse (FD) leidmiseks.

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

Kus:

N_0 – keskmine amplikonide A ja B algkontsentratsioon (fluorestsentsühikutes)

E – amplifikatsiooniefektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – fluorestsentsi läviväärtuseni jõudmiseks vajalik tsüklite arv

Geenikoopiate hinnangulise arvukuse leidmiseks korrutati iga saadud FD väärtus vastava standardi lahjenduse geenikoopiate arvuga. Lõplik geenikoopiate kontsentratsioon igas proovis leiti kasutades kolme erineva standardilahjenduse alusel leitud hinnanguliste arvukuste keskmist väärtust. Kõikide uuritud geenide koopiaarvud väljendati iga proovi puhul 1 grammi kuivaine kohta.

Resistentsusgeenide proportsioon igas proovis leiti ARG-ide normaliseerimisega bakteriaalse 16S rRNA geeni suhtes. Proportsioonide arvutamiseks kasutati eelpool toodud valemit (1), kus iga proovi FD väärtuse leidmiseks kasutati funktsionaalse (amplikon A) ja 16S rRNA geeni (amplikon B) vastavaid väärtuseid.

3. TULEMUSED

3.1. Läge ja digestaadi proovide keemilised parameetrid

Läge ja digestaadi proovide keemilised parameetrid on toodud tabelis 3. Läge pH oli 0,78-1,06 ühikut madalam kui digestaadil. Ammooniumlämmastiku kogus suurenes 30,0-242,7 mg/kg kohta. Nitraatlämmastikku ei leitud esimeses ja kolmandas vedelsõnniku proovis ja kolmandas digestaadi proovis. Esimeses digestaadi proovis oli nitraatlämmastikku 1,67 mg/kg ja teises proovis 0,78 mg/kg, mis teeb 0,20 mg/kg kohta vähem kui teises läge proovis. Lämmastiku, kaaliumi, kaltsiumi ja magneesiumi suhtarvud oli vedelsõnnikus vastavalt 0,006-0,06%, 0,076-0,101%, 0,018-0,047%, 0,005-0,63% väiksemad kui digestaadis. Fosfori sisaldus oli esimeses vedelsõnniku proovis 0,011% suurem kui digestaadis, kuid teises ja kolmandas proovis oli vedelsõnnikus fosforit vastavalt 0,024% ja 0,019% rohkem kui digestaadis. Orgaanilise aine osakaal oli vedelsõnnikus 4,86-6,47% suurem kui digestaadis.

Tabel 3. Vedelsõnniku ja digestaadi proovide keemilised parameetrid

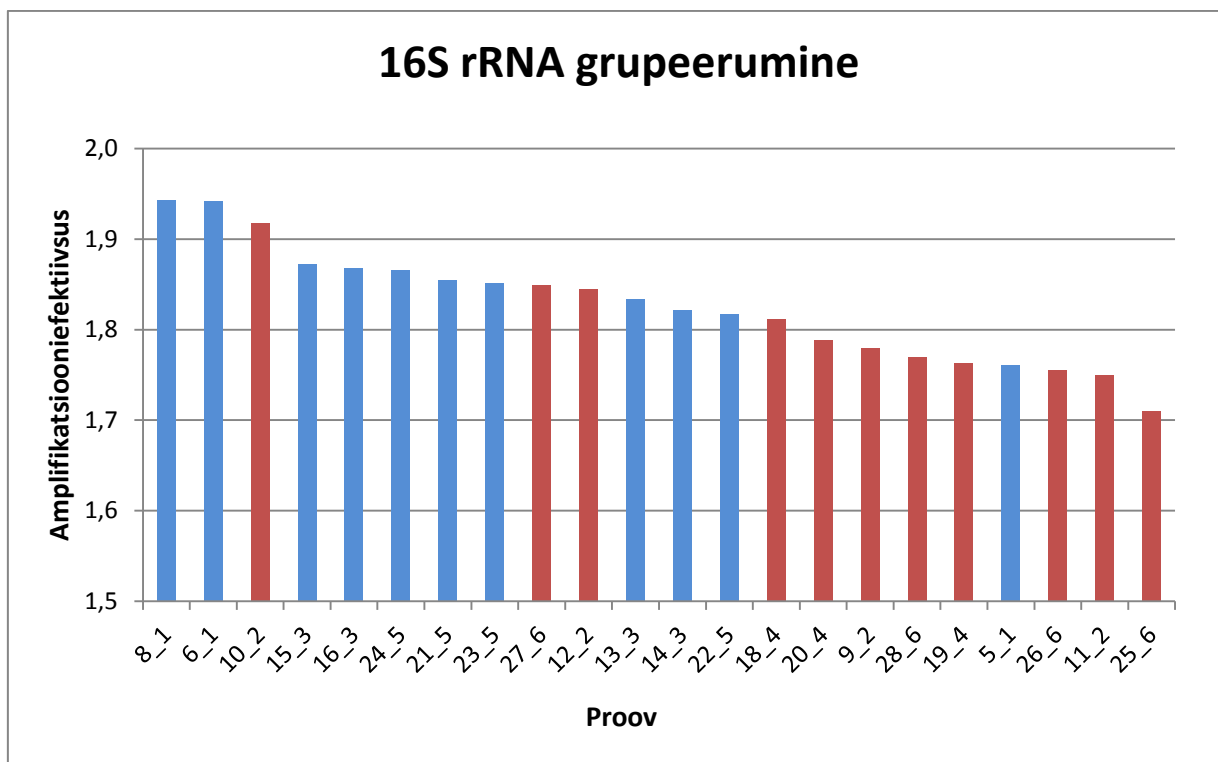
Proov	pH	KA%	NH ⁴ -N mg/kg	NO ³ -N mg/kg	N%	P%	K%	Ca%	Mg%	OA%
Läge 1	7,14	8,36	2239,6	0	0,393	0,079	0,236	0,107	0,057	72,36
Digestaat 1	7,92	6,86	2482,3	1,67	0,399	0,068	0,337	0,125	0,062	67,85
Läge 2	6,77	8,01	2558,5	0,98	0,401	0,053	0,289	0,080	0,085	67,38
Digestaat 2	7,72	8,67	2588,5	0,78	0,451	0,077	0,375	0,127	0,092	62,50
Läge 3	7,29	8,07	2270,0	0	0,385	0,072	0,256	0,085	0,073	65,96
Digestaat 3	8,35	8,80	2460,0	0	0,445	0,091	0,332	0,127	0,100	59,49

Kõik tulemused (v.a. OA) on vedelsõnniku kohta.

3.2. qPCR-i tulemuste kvaliteedikontroll

Kvaliteedikontrolliks kasutati LinRegPCR programmi, mille abil arvutati märklaudgeenide amplifikatsiooniefektiivsused. Amplifikatsiooniefektiivsus 2 vastab efektiivsusele 100% ehk siis ühe qPCR tsükli jooksul kordistub DNA ideaalis kaks korda. Standardite

amplifikatsiooniefektiivsused jäid vahemikku 1,7-1,95 (Tabel 4). Kuna läga ja digestaadi proovide amplifikatsiooniefektiivsused olid üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad ($p < 0,05$), analüüsiti kõiki proove kahe eraldi amplikonina (Joonis 2).



Joonis 2. 16S rRNA grupeerumine amplifikatsiooniefektiivsuste järgi. Sinised tulbad tähistavad läga ja punased digestaadi proove.

Märklaudgeenide keskmised amplifikatsiooniefektiivsused ning nende standardhälbed on toodud tabelis 4. Geenide 16S rRNA, *tetA*, *tetB*, *sulI*, *qnrS*, *blaTEM1*, *blaCTX-M* ja *E. faecalis*-e spetsiifilise 16S rRNA keskmised amplifikatsiooniefektiivsused läga-proovides olid vastavalt 1,86, 1,79, 2,05, 1,77, 1,82, 1,87, 1,64 ja 1,66. Keskmised amplifikatsiooniefektiivsused digestaadi proovides olid vastavalt 1,80, 1,82, 1,93, 1,71, 1,80, 2,02, 1,63 ja 1,52. Tabelist on puudu *E. coli* spetsiifilise geeni amplifikatsiooniefektiivsused, kuna need ei olnud piisavalt hea kvaliteediga.

Tabel 4. Standardite ja märklaudgeenide keskmised amplifikatsiooniefektiivsused ning nende standardhälbed.

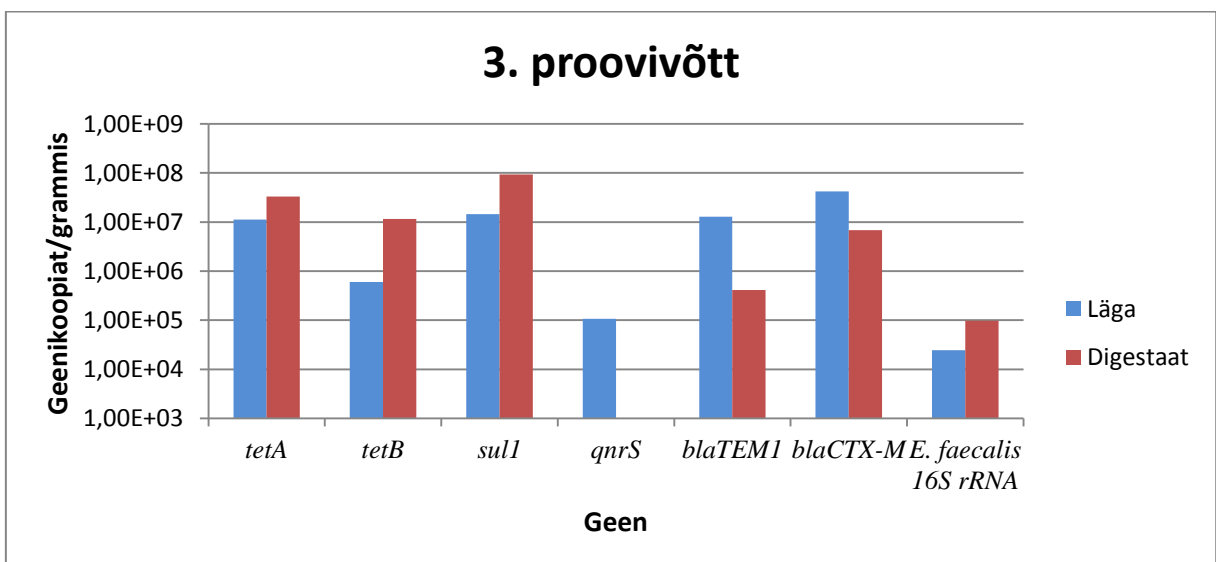
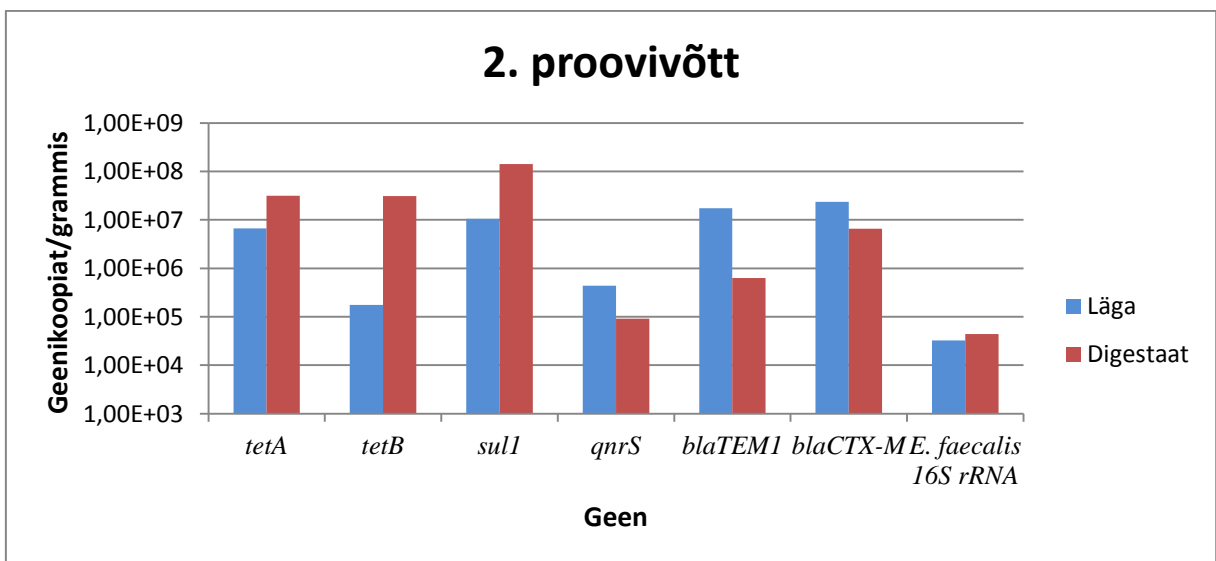
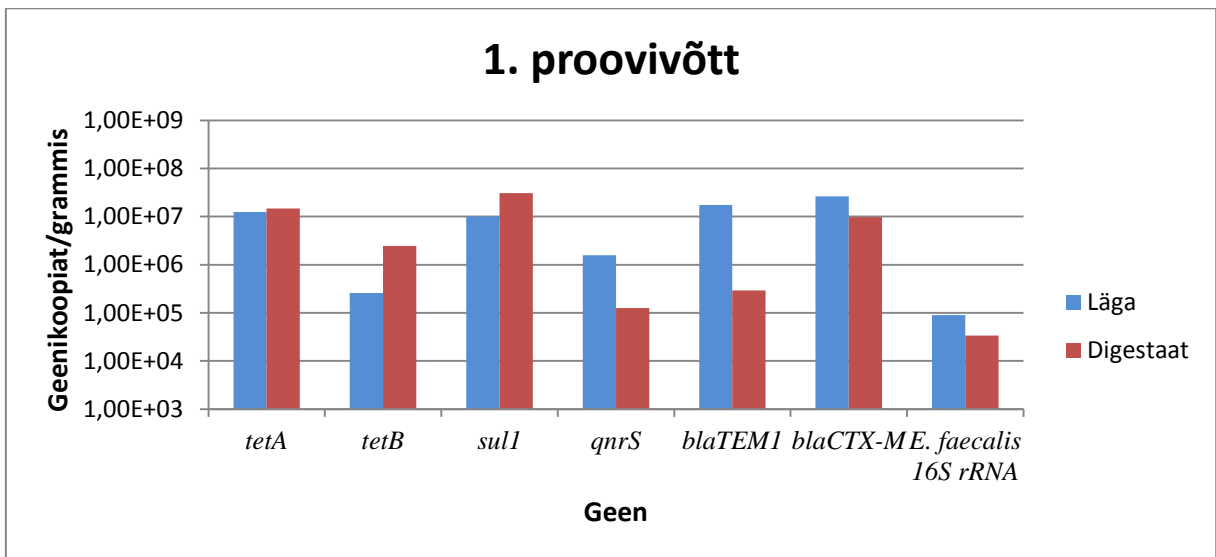
qPCR efektiivsus	Märklaudgeen							
	16S rRNA **	<i>tetA</i> *	<i>tetB</i> *	<i>sulI</i> **	<i>qnrS</i> *	<i>blaTEM1</i> **	<i>blaCTX-M</i> *	<i>E. faecalis</i> 16S rRNA *
Standard	1,86	1,93	1,95	1,84	1,88	1,92	1,75	1,73
Standardhälve	±0,03	±0,03	±0,04	±0,03	±0,12	±0,12	±0,05	±0,06
Läga	1,86	1,79	2,05	1,77	1,82	1,87	1,64	1,66
Standardhälve	±0,05	±0,13	±0,19	±0,07	±0,10	±0,14	±0,06	±0,22
Digestaat	1,80	1,82	1,93	1,71	1,80	2,02	1,63	1,52
Standardhälve	±0,05	±0,11	±0,28	±0,06	±0,05	±0,14	±0,19	±0,24

Statistiliselt oluline (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) erinevus läga ja digestaadi proovide amplifikatsiooniefektiivsuste vahel.

3.3. ARG-ide ja patogeeni tuvastamine ja kvantifitseerimine

Peaaegu kõikidest läga ja digestaadi proovidest tuvastati uuritud märklaudgeene. Ainsaks erandiks oli *qnrS* geen, mida ei leitud kolmandast digestaadi proovist. *E. coli* spetsiifilise geeni amplifikatsiooniefektiivsused olid arvutuste tegemiseks ebakvaliteetsed. *E. coli*-t leidis esimeses ja teises läga proovis, kuid seda ei tuvastatud kolmandast läga proovist ega ühestki digestaadi proovist.

Uurimuse käigus kvantifitseeritud läga ja selle digestaadi geenikoopiate arvukused on toodud lisa 1. 16S rRNA geenikoopiate arvukus jäi vahemikku $4,5 \times 10^{11}$ - $1,4 \times 10^{12}$ geenikoopiat ühe grammi kuivaine kohta. Antibiootikumiresistentsusgeenide *tetA*, *tetB*, *sulI*, *qnrS*, *blaTEM1*, *blaCTX-M* ja patogeeni *E. faecalis-e* spetsiifilise 16S rRNA arvukused vedelsõnniku proovides olid vastavalt $6,7 \times 10^6$ - $1,2 \times 10^7$, $1,8 \times 10^5$ - $6,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^7$ - $1,4 \times 10^7$, $1,1 \times 10^5$ - $1,6 \times 10^6$, $1,3 \times 10^7$ - $1,7 \times 10^7$, $2,4 \times 10^7$ - $4,2 \times 10^7$ ja $2,5 \times 10^4$ - $8,9 \times 10^4$ geenikoopiat ühe grammi kuivaine kohta. Digestaadi proovides vastavalt $1,5 \times 10^7$ - $3,3 \times 10^7$, $2,5 \times 10^6$ - $3,1 \times 10^7$, $3,1 \times 10^7$ - $1,4 \times 10^8$, 0 - $1,2 \times 10^5$, $2,9 \times 10^5$ - $6,3 \times 10^5$, $6,5 \times 10^6$ - $9,7 \times 10^6$ ja $3,4 \times 10^4$ - $9,8 \times 10^4$ geenikoopiat ühe grammi kuivaine kohta (Joonis 3).



Joonis 3. Märklaudgeenide arvukus läga ja digestaadi proovides ühe grammi kuivaine kohta. Märklaudgeenide arvukused on Y-teljel esitatud logaritmilises skaalas.

Geenikoopiate arvukusele lisaks määrati ka ARG-ide osakaal bakteriaalse 16S rRNA geeni arvukuse suhtes (Tabel 5). Geenide *tetA*, *tetB*, *sulI*, *qnrS*, *blaTEM1*, *blaCTX-M* ja *E. faecalis*-e spetsiifilise 16S rRNA osakaalud bakteriaalsest 16S rRNA-st jäid vahemikku vastavalt 0,0008-0,0038%, 0,0004-0,0044%, 0,0098-0,0595%, 0,0000-0,0039%, 0,0001-0,0202%, 0,0035-0,0427%, 0,0001-0,0006%.

Geenide *qnrS*, *blaTEM1* ja *blaCTX-M* osakaalud olid kõigis läga proovides suuremad kui digestaadi proovides. Seevastu geenide *tetB* ja *sulI* osakaalud kõigis läga proovides madalamad kui digestaadi proovides. *TetA* geeni osakaal oli esimeses läga proovis suurem, kuid järgmistes väiksem kui vastavates digestaadi proovides. *E. faecalis*-e spetsiifilise 16S rRNA osakaal oli esimeses läga proovis suurem kui digestaadi proovis, kuid kõigis järgmistes proovides oli geeni osakaal ühtlaselt 0,0001%.

Tabel 5. ARG-ide ja patogeenspetsiifiliste geenide osakaal 16S rRNA geenikoopiate arvust.

Proov	<i>tetA</i> %	<i>tetB</i> %	<i>sulI</i> %	<i>qnrS</i> %	<i>blaTEM1</i> %	<i>blaCTX-M</i> %	<i>E. faecalis</i> 16S rRNA %
Läga 1	0,0034	*	0,0127	0,0039	0,0202	0,0427	0,0006
Digestaat 1	0,0017	0,0004	0,0164	0,0010	0,0001	0,0067	0,0001
Läga 2	0,0008	*	0,0098	0,0030	0,0146	0,0281	0,0001
Digestaat 2	0,0021	0,0044	0,0595	0,0021	0,0002	0,0035	0,0001
Läga 3	0,0020	0,0002	0,0112	0,0020	0,0091	0,0422	0,0001
Digestaat 3	0,0038	0,0022	0,0523	*	0,0002	0,0049	0,0001

*– arvukuse % on nullilähedane.

4. ARUTELU

Anaeroobse kääritamise protsessi lõppedes oli digestaadi pH suurem kui vedelsõnniku oma, mis võib tuleneda sellest, et protsessi käigus lagundatakse äädikhapet ja lenduvaid rasvhappeid. Enamasti oli mineraalainete osakaal kääritusjärgis suurem kui lägas, erandiks olid fosfor ja NO^{3-} , kus ühel juhul oli lägas sisaldus suurem kui digestaadis. Mineraalainete suurema sisalduse tõttu on kääritusjääk taimedele lägast lihtsamini omastatav, on toitainete rikas ja seega alternatiiviks tööstuslikele väetistele. Kapuinen *et al.*, (2008) leidsid, et anaeroobse kääritamise protsessi tulemusel muutus läga paremini lahustuvaks ja homogeensemaks, paranes C/N suhe ja suurenes lahustuvate toitainete (NH_3 , P) sisaldus.

Enamiku ARG-ide ja 16S rRNA geeni amplifikatsiooniefektiivsused läga proovides jäid vahemikku 1,7-2,0 (tabel 4), mida võib üsna heaks tulemuseks pidada (Invitrogen). Geenide *blaCTX-M* ja *E. faecalis* 16S rRNA efektiivsused olid vastavalt ~1,64 ja ~1,65. Digestaadi proovides olid enamike geenide paljundamise efektiivsused vahemikus 1,7-2,0. Madalaimad jällegi geenide *blaCTX-M* ja *E. faecalis* 16S rRNA efektiivsused, mis olid vastavalt ~1,63 ja ~1,52. Madala efektiivsuse korral võib olla tegemist praimeritepaari ebaefektiivse toimimisega. Amplifikatsiooni efektiivsust mõjutavad lisaks veel amplikonide pikkus ja järjestus, inhibiitorite esinemine proovis, võimalik sekundaarstruktuur, primer-dimerite ja ebaspetsiifiliste produktide teke (Ruijter *et al.*, 2009).

Mikroobiökoloogias kasutatakse tänapäeval laialdaselt qPCR-i, et määrata geenikoopiate arvukust keskkonnaproovides. Usaldusväärsete tulemuste saamisel mängib suurt rolli märklaudgeeni amplifikatsiooniefektiivsus, selle võrreldavus standardkõvera lahjendusega ja andmete kvaliteet (Smith & Osborn, 2009). Üldiselt oli amplifikatsioon antud töös hea kvaliteediga, ainult *E. coli* spetsiifilise geeni amplifikatsiooniefektiivsused ei vastanud kvaliteedinõuetele.

Läbi kõigi kolme proovivõtu püsisid geenide *tetA*, *tetB* ja *sulI* arvukused enam-vähem samal tasemel erinevates läga proovides ja erinevates digestaadi proovides. Sealjuures oli eelpool nimetatud gene vedelsõnnikus alati vähem kui kääritusjärgis. Põhjuseks võib olla horisontaalne geeniülekanne ja anaeroobse kääritamise madal temperatuur, mis ei taga *tetA* ja *tetB* geeni sisaldavate bakterite hävinemist, mille tõttu saavad nad hakata paljunema. Sulfoonamiidid on esimesed sünteetilised antibiootikumid, mis on arendatud laialdaseks kliiniliseks kasutamiseks. *SulI* geeni esines lägas vähem kui digestaadis, mille põhjuseks võib

olla lisaks madalale temperatuurile ka horisontaalne geeniülekanne, mille käigus resistentsusgeeni omavate bakterite osakaal suureneb. Põhjuseks võib olla ka *sulI*-e sisaldus tahkes sõnnikus, mida lisatakse vedelsõnnikule enne anaeroobset kääritamist. Geenide *qnrS*, *blaTEM1* ja *blaCTX-M* arvukus oli kõigis läga proovides üsna sarnane. Anaeroobse kääritamise protsessis vähenes nende ARG-ide sisaldus kääritusjärgis märgatavalt. *E. faecalis*-e spetsiifilise 16S rRNA geeni arvukus vähenes kääritamise jooksul, kuid teises ja kolmandas proovivõtus arvukus suurenes. Põhjuseks võib olla lenduvate rasvhapete suur sisaldus, mis mõjutab protsessi efektiivsust (Kearney *et al.*, 1993). *E. coli*-t leidis kahes läga proovis kolmest ja mitte üheski digestaadi proovis. Järelikult saab anaeroobset kääritamist kasutada patogeenidest vabanemiseks. Sahlström (2003) uuris millised anaeroobse kääritamise tegurid mõjutavad patogeenide elimineerimist. Kõige rohkem mõjutab protsessi temperatuur, kuid oma panuse annavad ka aeg, pH ja lenduvate rasvhapete kontsentratsioon. Parim tulemus saavutatakse termofiilsetel temperatuuridel. Näiteks *Salmonella spp.* populatsiooni 90% vähendamiseks termofiilsetes tingimustes kulus 0,7 tundi ja mesofiilsetes tingimustes kulus selleks 2,4 päeva (Bendixen, 1999).

ARG-ide ja bakteriaalse 16S rRNA geenikoopiate omavahelisi suhteid kasutati, et hinnata erinevaid ARG-e omavate bakterite osakaalu (Tabel 5) koosluses. Arvatakse, et geenikoopiate suhete kasutamine aitab ületada DNA eraldamisest ja paljundamisest tulenevaid vigu absoluutsete geenikoopiaarvude määramisel (López-Gutiérrez *et al.*, 2004). Proovide lõikes jäid geenide *qnrS*, *blaTEM1*, *blaCTX-M* ja *E. faecalis*-e spetsiifilise 16S rRNA geenikoopiate osakaalud 16S rRNA geenikoopiate arvust vahemikku vastavalt 0-0,0010%, 0,0001-0,0202%, 0,0035-0,0427% ja 0,0001-0,0006%. *TetA*, *tetB* ja *sulI* geenikoopiate osakaal oli 16S rRNA geenikoopiate arvust vahemikus 0,0008-0,0038% 0-0,044% ja 0,0098-0,0595%. Cheng *et al.* (2013) uurisid kümme tetratsükliiniresistentsust põhjustava geeni, sealhulgas ka gene *tetA* ja *tetB*, ning ka sulfoonamiidiresistentsust põhjustavate geenide *sulI* ja *sul2* sisaldust Hiina farmide lägas. Leiti, et ARG-ide *tetA*, *tetB* ja *sulI* osakaal 16S rRNA geenikoopiate arvust oli vastavalt $0,00033 \pm 0,000203\%$, $0,00031 \pm 0,000338\%$, $0,0199 \pm 0,0297\%$. Geenide *tetA* ja *tetB* osakaalud olid väiksemad kui antud töös, mis võib olla tingitud erinevast DNA eraldamise meetodikast ja ka qPCRi tingimuste erinevustest. Geeni *sulI* osakaal oli sarnane.

Kuna ARG-id levivad mitmete erinevate bakteriliikide vahel, siis on oluline iseloomustada kõiki keskkonnas olevate bakterite resistentsusgene. Enamik bakterite resistentsuse uurimiseks kasutatavad meetodid põhinevad aga bakterite kultiveerimisel ja sellele järgneval

seleksioonil. Keskkonnabakteritest on aga ainult 1% bakteritest kultiveeritavad. Tulemuste võrdlemise erinevate keskkondade vahel teeb aga omakorda keeruliseks see, et resistentsuse määramiseks ei kasutata ühtseid standardseid meetodeid. Kõikidel meetoditel on omad piirangud, kuid kultuurist sõltuvate ja sõltumatute meetodite kombineerimisel saaks kõige ülevaatlikuma pildi erinevate mikroobikoosluste resistentsustest. See aitaks mõista keskkonna resistentsusgeenide mõju inimeste patogeenidele.

KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida kvantitatiivse PCR-i abil ARG-ide *tetA*, *tetB*, *sulI*, *qnrS* *blaTEM1* ja *blaCTX-M* ning patogeenide *Enterococcus faecalis*-e ja *Escherichia coli* sisaldust lāgas ja selle digestaadis ja seelābi hinnata anaeroobse kääritamise efektiivsust.

Uurimistöö aluseks olid kolm 2013. aastal võetud lāga (26.04, 11.06, 30.07) ja kolm digestaadi (03.05, 11.06, 30.07) proovi. Proovidest eraldati bakterikoosluse DNA, millest määrati qPCR-i kasutades 16S rRNA ja ARG-ide geenikoopiate arvukused. Erinevate proovide geenikoopiate arvukused väljendati ühe grammi kuivaine kohta ja leiti ka ARG-ide suhe 16S rRNA geenikoopiate arvust.

Töö tulemustest selgus, et:

- Lāgas ja digestaadis leidus enamikke uuritud patogeene ja ARG-e.
- Anaeroobse kääritamise protsess eemaldas täielikult patogeeni *E. coli* ning vähendas märgatavalt ARG-ide *qnrS*, *blaTEM1* ja *blaCTX-M* arvukust.
- Anaeroobse kääritamise käigus suurenesid patogeeni *E. faecalis* ning ARG-ide *tetA*, *tetB* ja *sulI* arvukused.

Antibiootikumireistentsusgeenide ja patogeenide uuringud on olulised ja praktilised, hindamaks anaeroobse kääritamise efektiivsust nende vähendamisel ja hävitamisel lāgas, mis omakorda aitab peatada antibiootikumiresistentsuse teket ja levikut bakterites.

Effects of anaerobic digestion on antibiotic resistance genes and pathogens in a dairy cattle slurry

Mario Mutli

SUMMARY

Antibiotics are one of the most important drugs in human and animal therapy. It's not only used to treat diseases, but also to promote the growth and increase production of the animals. Animal organism uses only a small part of the antibiotics and drug residues remain in the slurry. Slurry is used on the fields as a fertilizer and this way antibiotics, drug residues and antibiotic resistant genes can end up in natural environment, which may cause antibiotic resistance in bacteria.

Modern methods in molecular biology, such as quantitative PCR allow us detect antibiotic resistance genes in the environment quickly and accurately. It is helpful to know about antibiotic resistance genes, because that helps us to study the impact of drug residues to environment and we can also assess the risk to humankind.

The aim of current Bachelor's thesis was to determinate the abundance of antibiotic resistance genes *tetA*, *tetB*, *sulI*, *qnrS* *blaTEM1* and *blaCTX-M* and pathogens *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in a dairy cattle slurry and digestate. Three samples of slurry and digestate were under investigation. Laboratory experiments in form of qPCR method were carried out, to quantify pathogens and antibiotic resistance genes in three samples of slurry and digestate.

The result of current study showed:

- Most of the studied pathogens and antibiotic resistance genes were found in cattle slurry and digestate.
- Anaerobic digestion process successfully removed pathogen *E. coli* and significantly reduced the amount of *qnrS*, *blaTEM1* ja *blaCTX-M* genes.
- As a result of anaerobic digestion the abundance of pathogen *E. faecalis* and resistance genes *tetA*, *tetB* and *sulI* genes increased.

Studies of antibiotic resistance genes and pathogens are important and practical to assess the efficiency of anaerobic digestion in reducing pathogens and anaerobic resistance genes. It also helps to stop the rise and spread of resistance in environmental bacteria.

TÄNUAVALDUSED

Autor avaldab tänu kõigile, kes on kaasa aidanud käesoleva bakalaureusetöö valmimisele. Eriti suured tänusõnad oma juhendajale Kertu Tiirikule, kelle nõuannetel antud töö valmis. Autor tänab ka Kärt Kangerit nõuannete ja abi eest laboris. Tänuavaldused kõigile, kes on olnud abiks töö valmimisel.

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

KASUTATUD KIRJANDUS

Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R. (2008). Biogas handbook. Esbjerg, Denmark: University of Southern Denmark.

Alanis A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36: 697–705.

Albuquerque, J. A., Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M.P. (2012). Assessment of the fertilizer potential of digestate from farm and agroindustrial residues. *Biomass Bioenergy*, 40: 181–189.

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews Microbiology*, 8: 251–259.

Altmets, A. (2011). Ravimijääkide võimalik keskkonnamõju ja selle hindamine. *Eesti Arst* 90(7): 311–320.

Alvarez, R., Lidén, G. (2008). Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renew. Energy*, 33: 726–734.

Banks, C. J., Salter, A.M., Heaven, S., Riley, K. (2011). Energetic and environmental benefits of co-digestion of food waste and cattle slurry: A preliminary assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 56: 71–79.

Baquero, F., Martinez, J-L., Canton, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 260–265.

Bendixen H. J. (1999). Hygienic safety –results of scientific investigations in Denmark Sanitation requirements in Danish BGPs. In: Böhm R, Wellinger A (Eds.), *Hygienic and Environmental Aspects of Anaerobic Digestion*, Stuttgart pp. 27–47.

Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S. A., Yamashiro, T., Ihara, I., Umetsu, K. (2013). The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of daily manure and waste milk. *Animal Science Journal*, 84: 426–433.

Burton, C. H., Turner, C. (2003). *Manure management: treatment strategies for sustainable agriculture*. Bedford, UK: Silsoe Research Institute.

Börjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P-Å., Olsen, B., Matussek, A., Lindgren, P-E. (2009). Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, β -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *International Journal Environmental Health Research*, 19(3): 219–230.

Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 1494–1502.

- Cheng, W., Chen, H., Su, C., Yan, S. (2013). Abundance and persistence of antibiotic resistant genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China. *Environmental International*, 61: 1–7.
- Chetta, M., Bafunno, V., Grillo, R., Mele, A., Lo Perfido, P., Notarnicola, M., Cellini, F., Cifarelli, R. A. (2012). SYBR green real time-polymerase chain reaction as a rapid and alternative assay for the efficient identification of all existing *Escherichia coli* biotypes approved directly in wastewater samples. *Biotechnology Progress*, 28(4): 1106–1113.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE*, 6(3):e17549.
- Cote, C., Masse, D. I., Quessy, S. (2006). Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurry. *Bioresource Technology*, 97: 686–691.
- Ding, C., He, J. (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 925–941.
- Durso, L. M., Harhay, G. P., Bono, J.L., Smith, T. P. L. (2011). Virulence-associated and antibiotic resistance genes of microbial populations in cattle feces analysed using a metagenomic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 84: 278–282.
- Forsberg K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337: 1107–1011.
- Gilbert, J. A., Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3: 347–371.
- Gilles, A., Megléc, E., Pech, N., Ferreira, S., Malausa, T., Martin, J. F. (2011). Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12: 245.
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hermatology* 30: 503–512.
- 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.
- Guillard, T., Moret, H., Brasme, L., Carlier, A., Vernet-Garnier, V., Cambau, E., de Champs, C. (2011). Rapid detection of *qnr* and *qepA* plasmid-mediated quinolone resistance genes using real time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70: 253–259.
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spitteller, 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: 1892–1900.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 236–243.
- Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (2010). *Microbes at Work From Wastes to Resources*. p. 16-23. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Iwasaki, M., Yamashiro, T., Beneragama, N., Nishida, T., Kida, K., Ihara, I., Takahashi, J., Umetsu, K. (2011). The effect of temperature on survival of pathogenic bacteria in biogas plant. *Animal Science Journal*, 82: 702–712.
- Kapuinen, P., Perälä, P., Regina, K., (2008). Digestion effect on fertilizing quality of cattle slurry with grass. In: Hopponen, A. (Ed.), *Proceedings of Finnish Club of Agricultural Science 23: 7*. Ministry of Agriculture and Forestry, Finland, pp. 7.
- Karakashev, D., Bastone, D., Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 331–338.
- Kearney, T. E., Larkin, M. J., Frost, J. P., Levett, P. N. (1993). Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 215–219.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8: 1-13.
- Kim, M., Lee, K-H., Yoon, S-W., Kim, B-S., Chun, J., Yi, H. (2013). Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era, *Genomics Information* 11(3): 102-113.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee H. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* , 58: 169–188.
- Kummerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000). Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40: 701–710.
- Lillenberg, M. (2011). Residues of some pharmaceuticals in sewage sludge in Estonia, their stability in the environment and accumulation into food plants via fertilizing. PhD Thesis in Environmental Protection. Eesti Maaülikool.
- López-Gutiérrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catrou, G., Philippot, L. (2004). Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *J. Microbiology Methods*, 57: 399–407.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environmental International*, 34: 265–276.
- Martens, W., Böhm, R. (2009). Overview of the ability of different treatment methods for liquid and soil manure inactivate pathogens. *Bioresource Technology*, 100: 5374–5378.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157: 2893–2902.
- Martinez, J.L., Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Science*, 119(2):68-77.

- Mather, A. E., Matthews, L., Mellor, D. J., Reeve, R., Denwood, M. J., Boerlin, P., Reid-Smith, R. J., Brown, D. J., Coia, J. E., Browning, L. M., Haydon, D. T., Reid, S. W. J. (2011). An ecological approach to assessing the epidemiology of antimicrobial resistance in animal and human populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1733):1630–1639.
- Mattila, P. (2006). Ammonia emissions from pig and cattle slurry in the field and utilization of slurry nitrogen in crop production. Doctoral dissertation. Agrifood Research Reports 187, Jokioinen, p 136.
- McKinney, C. W., Loftin, K. A., Meyer, M. T., Davis, J. G., Pruden, A. (2010). Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. *Environmental Science Technology*, 44(16): 6102–6109.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies: the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11: 31–46.
- Mincheol, K., Ki-Hyun, L., Seok-Whan, Y., Bong-Soo, K., Jongsik, C., Hana, Y. (2013). Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. *Genomics Information*, 11(3): 102–113.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2009). *Medical Microbiology*: 6th edition. Mosby Elsevier, p 73–79.
- Naik, G. A., Bhat, L. N., Chpoad, B. A., Lynch, J. M. (1994). Transfer of broad-host-range antibiotic resistance plasmids in soil microcosms. *Current Microbiology*, 28(4): 209–215.
- Normak, A., Vollmer, E., Orupõld, K., Kaasik, A., Kask, Ü. (2009). Biogaasi tootmine ja kasutamine. OÜ Tartumaa Trükikoda, Tartu, p 18–27.
- Palmer, K. L., Kos, V. N., Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 632–639.
- Pappas, G. (2011). An animal farm called extended-spectrum β -lactamas: antimicrobial resistance as a zoonosis. *Clinical Microbiology and Infections*, 17(6):797–798.
- Rodriguez-Navas, C., Björklund, E., Hannling-Sorensen, B., Hansen, M. (2013). Biogas final digestive byproduct applied to croplands as fertilizer contains high level of steroid hormones. *Environmental Pollution*, 180: 386–371.
- 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.
- Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 87: 161–166.
- Smith, C. J., Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecology*, 67: 6–20.
- Sørum, H., Sunde, M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32: 227–241.

Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K-H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*, 155: 2306–2319.

Stearns, S. C., & Hoekstra, R. F. (2005). *Evolution: An introduction* (2nd ed.). Oxford, NY: Oxford University Press, pp 38–40.

Zarraonaindia, I., Smith, D. P., Gilbert, J. A. (2013). Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world. *Biological Philosophy*, 28(3): 261–282.

Zhang, X-X., Zhang, T., Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 397–414.

Thomas, T., Gilbert, J. A., Meyer, F. (2012). Metagenomics—a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 9: 1–3.

Truu, J. (2014). Bioloogilised protsessid ökotehnoloogias. Loengu õppematerjalid.

Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151–159.

van Hoek, A. H. A. M., Scholtens, I. M. J., Cloeckaert, A., Aarts, H. J. M. (2005). Detection of antibiotic resistance genes in different *Salmonella* serovars by oligonucleotide microarray analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 62: 13–23.

Venieri, D., Chatzisyneon, E., Sofianos, S. S., Politi, E., Xekoukoulotakis, N. P., Katsaounis, A., Mantzavinos, D. (2012). Removal of faecal indicator pathogens from waters and wastewaters by photoelectrocatalytic oxidation on TiO₂/Ti films under simulated solar radiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(9): 3782–3790.

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4): 849–860.

Wichmann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S., Handelsman, J. (2014). Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *American Society for Microbiology*, 5(2):e01017.

Wilson, V. L., Tatford, B. C., Yin, X., Rajki, S. C., Walsh, M. M., LaRock, P. (1999). Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 39: 59–78.

LISA 1

ARG-ide ja patogeenide arvukus ühes grammis kuivaines

Proov	Proovivõtu kuupäev	16S rRNA	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>sulI</i>	<i>qnrS</i>	<i>blaTEM1</i>	<i>blaCTX-M</i>	<i>E. faecalis</i> 16S rRNA	<i>E. coli</i>
Läga 1	26.04.13	4,5x10 ¹¹	1,24x10 ⁷	2,59x10 ⁵	9,98x10 ⁶	1,57x10 ⁶	1,74x10 ⁷	2,62x10 ⁷	8,94x10 ⁴	+
Digestaat 1	03.05.13	1,1x10 ¹²	1,46x10 ⁷	2,45x10 ⁶	3,06x10 ⁷	1,25x10 ⁵	2,93x10 ⁵	9,71x10 ⁶	3,38x10 ⁴	-
Läga 2	11.06.13	6,2x10 ¹¹	6,68x10 ⁶	1,76x10 ⁵	1,05x10 ⁷	4,38x10 ⁵	1,73x10 ⁷	2,37x10 ⁷	3,25x10 ⁴	+
Digestaat 2	11.06.13	1,4x10 ¹²	3,15x10 ⁷	3,11x10 ⁷	1,42x10 ⁸	9,15x10 ⁴	6,32x10 ⁵	6,52x10 ⁶	4,38x10 ⁴	-
Läga 3	30.07.13	7,4x10 ¹¹	1,12x10 ⁷	6,04x10 ⁵	1,44x10 ⁷	1,08x10 ⁵	1,28x10 ⁷	4,22x10 ⁷	2,46x10 ⁴	-
Digestaat 3	30.07.13	1x10 ¹²	3,3x10 ⁷	1,16x10 ⁷	9,32x10 ⁷	0	4,15x10 ⁵	6,82x10 ⁶	9,82x10 ⁴	-

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mario Mutli

(sünnikuupäev: 29.10.1991)

Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

„Anaeroobse käitlemise mõju veiseläga antibiootikumiresistentsete bakterite ja patogeenide sisaldusele“,

mille juhendaja on Kertu Tiirik

- 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 lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2014