TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOINFORMAATIKA ÕPPETOOL

Antibiootikumiresistentsuse ja mikroobikoosluse uurimine Eesti mahe- ja intensiivpõllumajanduse muldades

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kaur Reidma

Juhendajad: PhD Reidar Anderson

MSc Liina Kuus

TARTU 2025

INFOLEHT

Antibiootikumiresistentsuse ja mikroobikoosluse uurimine Eesti mahe- ja intensiivpõllumajanduse muldades

Antibiootikumid on inimkonna üks olulisemaid leiutisi ja peamine vahend bakteriaalsete nakkustekitajate vastu võitlemiseks. Aina enam levinud antibiootikumiresistentsus on suurenev probleem, suures osas põhjustatud antibiootikumide vastutustundetust kasutamisest põllumajandussektoris, kust resistentsusgeenid saavad levida erinevaid teid pidi inimese patogeenidele. Käesolevas töös uuritakse antibiootikumiresistentsust ja selle seost mikroobse mitmekesisuse ja mobiilsete geneetiliste elementide arvukusega Eesti muldades, võrreldes omavahel maheda ja intensiivse viljelusviisiga muldasid.

Märksõnad: antibiootikumid, resistentsus, mulla mikrobioom, metagenoomika, mahepõllumajandus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Antibiotic resistance and microbial community structure in Estonian organic and conventional farming systems

Antibiotics are one of the most important discoveries of mankind and a critical tool in fighting against bacterial infections. The spreading of antimicrobial resistance is a growing concern, one of its biggest drivers being the inconsiderate use of antibiotics in the livestock sector, where resistance genes can spread by different avenues to human pathogens. This work aims to study antibiotic resistance and its connections to microbial diversity and the abundance of mobile genetic elements in Estonian soils by comparing samples taken from the soils of organic and conventional farming systems.

Keywords: antibiotics, resistance, soil microbiome, metagenomics, organic farming

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 4
SISSEJUHATUS 5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 6
1.1. Antibiootikumiresistentsuse levik ja selle olulisus 6
1.1.1. Antimikroobne resistentsus ja antibiootikumid 6
1.1.2. Antibiootikumiresistentsuse leviku mõju inimtervisele 6
1.1.3. Antibiootikumide klassid ja kriitiliselt olulised antibiootikumid 7
1.1.4. AMR ja selle levik põllumajanduses 8
1.1.5. Muld kui AMR geenide reservuaar 9
1.2. Antibiootikumiresistenstsuse ja selle leviku mehhanismid 10
1.2.1. AMR omandamine 10
1.2.2. Horisontaalne geeniülekanne 12
1.2.3. Mobiilsed geneetilised elemendid 13
1.2.4. Ülevaade resistentsusmehhanismidest 15
1.2.5. Resistentsuse seos mulla mikrobioomi mitmekesisusega 16
1.3. Metagenoomika analüüsimeetodina 16
2. UURIMUSLIK OSA 17
2.1. Töö eesmärgid 17
2.2. Materjalid ja metoodika 17
2.2.1. Proovide kogumine 17
2.2.2. Proovide analüüsimine 17
2.2.3. Andmete analüüs 18
2.3. Tulemused 19
2.4. Arutelu 26
KOKKUVÕTE 28
Summary 29
TÄNUSÕNAD 30
KASUTATUD KIRJANDUS 30
LISAD 38
LIHTLITSENTS 41

KASUTATUD LÜHENDID

ARG – antibiootikumide resistentsusgeen (*antibiotic reistance gene*)

AMR – antimikroobne resistentsus (*antimicrobial resistance*)

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organisation*)

FAO – ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

MIC – minimaalne inhibeeriv konsentratsioon (minimal inhibiting concentration)

MGE – mobiilne geneetiline element (*mobile genetic element*)

LPS - lipopolüsahhariid

SISSEJUHATUS

Antimikroobne resistentsus (AMR) tähendab mikroorganismide, muuhulgas bakterite, võimet saavutada resistentsust ainete vastu, mis olid enne efektiivsed nende vastu võitlemisel (Ahmed et al., 2024). AMR on looduslik ja levinud fenomen ning paljusid AMR geene on leitud iidsetest bakteritest arheoloogilistest uuringutest, kuid praegune inimtegevusest tulenev kiirenev AMR levik vähendab inimühiskonna võimet nakkustekitajate vastu võidelda (Iskandar et al., 2022). Antimikroobsete ainete valesti või liias kasutamine nii meditsiini-, loomakasvatus- ja põllumajandussektoris tekitab mikroorganismidele keskkonna, kus on tugev evolutsiooniline surve omastada resistentsust pakkuvaid mutatsioone ja geene (Ahmed et al., 2024). Antibiootikume kasutatakse suurtes kogustes loomakasvatuse sektoris, millele järgneb nende kogunemine keskkonda, kus antibiootikumid soodustavad resistentsete mikroorganismide teket ning läbi kontamineeritud toidu, loomade või veega jõuavad AMR geene kandvad mikroorganismid tagasi inimesteni, kus läbi horisontaalse geeniülekande saavad need resistentsusgeenid kanduda üle inimeste patogeenidele (Kumar et al., 2020).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumiresistentsuse levik ja selle olulisus

1.1.1. Antimikroobne resistentsus ja antibiootikumid

Antibiootikumid, mis toimivad spetsiifiliselt bakterite vastu, on kõige laialdasemalt kasutatav antimikroobsete ainete rühm (Salam et al., 2023). Antibiootikumide kasutuselevõttu võib pidada 20. sajandi olulisemaks läbimurdeks meditsiinis, mis lisaks nakkuste ravimisele on muutnud võimalikuks paljud modernsed kirurgilised protseduurid, kuid nende väärkasutamine on viinud AMR aina kiireneva levikuni ning mõned nakkushaigused on juba muutunud praktiliselt ravimatuks (Hutchings et al., 2019). Ühed kõige raskemini ravitavamad infektsioonid on põhjustatud enterobakterite poolt, kes on saavutanud resistentsuse karbapaneemidele, mis on tihti viimane valik krooniliste gramnegatiivsete haiguste vastu, nende seas kliinilistes tingimustes kõige levinum on *Klebsiella pneumoniae* (Lasko & Nicolau, 2020; Mancuso et al., 2021). AMR levik on globaalne probleem, mis haarab enda alla tervishoiu, põllumajanduse, karjakasvatuse ja toidutööstuse sektori. Kuna see areneb ja levib kõikide nende sektorite vahel, tuleb seda vaadelda n.ö "*One Health*" printsiibi läbi, mis on defineeritud Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) poolt kui multidistsiplinaarne lähenemine tervisele, mis tunnustab seoseid inimeste, taimede ja loomade ning nende jagatud elukeskkonna vahel (CDC, 2024; Christaki et al., 2020). AMR aina suurenev levik 21. sajandil ähvardab nii ülemaailmset tervist kui ka toidukindlust (Salam et al., 2023).

1.1.2. Antibiootikumiresistentsuse leviku mõju inimtervisele

Antibiootikumresistentsete patogeenide poolt põhjustatud nakkused on raskemini ravitavad, kergemini naasvad, toovad kaasa pikemaid haigestumisi ning on seega palju suuremaks koormaks inimeste tervisele ja tervishoiusüsteemile (Christaki et al., 2020). AMR-ga seotud surmade arv ületas aastal 2019 1,2 miljoni piiri ning ennustuste kohaselt võib see aastaks 2050 tõusta 10 miljonini aastas, mis ületaks suurel määral vähi poolt põhjustatud surmade arvu ning WHO hinnangul on AMR esimese kolme suurima ülemaailmse terviseohu seas (Salam et al., 2023). Eriti problemaatilised on multiresistentsed bakterid, kes omavad resistentsust mitme antibiootikumi vastu ning kelle vastu puudub toimiv antibiootikum (Velazquez-Meza et al., 2022). Nende seas on näiteks multiresistentne tuberkuloosi põhjustav *Mycobacterium*

tuberculosis, mis 2018. aasta seisuga hoomas 3,5% uutest juhtumitest ja 18% varem ravitud juhtumitest, kusjuures ainult 55% multiresistentse tuberkuloosi juhtudest said edukalt ravitud ning ekstensiivselt resistentse tuberkuloosi (XDR-TB) juhtudest ainult 34% (WHO, 2018). Samuti kuuluvad sinna niinimetatud ESKAPE patogeenid (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* ja *Enterobacter* spp.), kes moodustavad suure osa resistentsete bakterite poolt põhjustatud infektsioonidest kliinilises meditsiinis (Miller & Arias, 2024).

Pärast 1980. aastaid on uute antibiootikumide väljatöötamine aeglustunud ning praegusel ajal on vähe uusi antibiootikumide klasse väljatöötamisel ning enamus neist on suunatud samadele sihtmärkidele, kui traditsionaalsed antibiootikumid, mis tähendab, et veelgi olulisem on praegu olemasolevate antibiootikumide tõhususe säilimise nimel tegutseda (Iskandar et al., 2022; Salam et al., 2023). Antibiootikumide tõhususe kaotamisel on palju laiemad tagajärjed, kui vaid haiguste ravimises, kuna paljud invasiivsed kliinilised protseduurid, näiteks kirurgia ja vähiravi vajavad antibiootikume profülaktikaks (üldiseks kaitseks, haiguste ennetamiseks), seega mõjutaks antibiootikumide tõhususe kaotamine pea kogu tervishoiusüsteemi (Smith & Coast, 2013). Suurenev resistentsuse levik ja vähenev uute antibiootikumide väljatöötamine on viinud meid n.ö antibiootikumidejärgsesse aega, kus tavalised nakkused ja pisivigastused võivad taas saada eluohtlikuks (Ahmed et al., 2024). Vajalik on uute antibiootikumide arendus, kuid kui antibiootikumide liigset ja ebavajalikku kasutust ei vähendata, muutuvad niipea ka uued antibiootikumid ebaefektiivseks (Velazquez-Meza et al., 2022).

1.1.3. Antibiootikumide klassid ja kriitiliselt olulised antibiootikumid

Enamus kliinilises kasutuses olevaid antibiootikume on toodetud looduslikel viisidel, seente ja bakterite kaudu, kusjuures suur osa kõikidest bakterite toodetavatest antibiootikumidest on pärit aktinomütseetidelt (Hutchings et al., 2019). Osad antinomütseetidest pärinevad antibiootikumid on näiteks glükopeptiidid (toimivad inhibeerides rakuseina sünteesi), rifamütsiin (toimib inhibeerides valgusünteesi) ja karbapaneemid (toimivad inhibeerides rakuseina sünteesi) ning antibiootikumid nagu näiteks diaminopürimidiinid (toimivad inhibeerides folaadi sünteesi) ja nitrofuraanid (toimivad inhibeerides DNA sünteesi) kuuluvad sünteetiliselt toodetud antibiootikumide alla (Hutchings et al., 2019).

WHO kliiniliselt oluliste antibiootikumide klassifikatsiooni järgi kuuluvad karbapaneemid ja glükopeptiidid ainult inimestes kasutamiseks autoriseeritud antibiootikumide alla ja on seega kliiniliselt olulised antibiootikumid (*WHO's List of Medically Important Antimicrobials*, 2024).

WHO nimekiri toob samuti välja, et selles kategoorias olevad antibiootikumid on eraldi teistest, kuna neid ei kasutata loomadel, kuid sellele vaatamata on nende puhul AMR tekke risk ning neid peaks pidama kõige kriitilisemateks antibiootikumideks (*WHO's List of Medically Important Antimicrobials*, 2024).

1.1.4. AMR ja selle levik põllumajanduses

AMR levik toimib kaheastmelise protsessina – esmalt AMR omastamine kas mutatsioonide või mobiilsete geneetiliste elementide kaudu. Teine osa on resistentsete tüvede levik, mis toimub mitme vektori, näiteks inimeste, vee, putukate, lindude ja põllumajandustegevuse kaudu (Collignon et al., 2018). Loomakasvatuses manustatakse pidevalt loomadele madalas koguses antibiootikumidega, et ennetada haiguste levikut karjades, kes tihti elavad kitsastes ja mittesanitaarsetes tingimustes, kuid selline rutiinne antibiootikumide kasutamine viib suurte koguste antibiootikumide akumulatsioonini keskkonnas ning soodustab resistentsuse teket bakterites, kes sellega kontakti satuvad, näiteks on fluorokinoloonide kasutamine karjakasvatuses aidanud kaasa tsiprofoksatsiini resistentsuse tekkele *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ja *E.coli* tüvedel (Kumar et al., 2020). On ka näidatud, et osad mullabakterid on võimelised kasvama, kasutades antibiootikume ainsa süsinikuallikana (Dantas et al., 2008).

Lisaks haiguste ennetamisele kasutatakse sellist madalas koguses antibiootikumide manustamist ka loomade kasvu soodustamiseks, kuigi selline kasutusviis on paljudes riikides juba keelustatud (*Antimicrobial Resistance | Food and Agriculture Organization of the United Nations*, s.a.). Antimikroobsed ained võivad jääda alles loomsetesse toodetesse ning jõuavad loomsete jäätmete kaudu muldadesse ja vetesse, FAO (ÜRO Toidu ja Põllumajandusorganisatsioon) andmetel 75-90% karjakasvatuses kasutatud antimikroobsetest ainetest väljutatakse metaboliseerimata ehk muundamata kujul keskkonda (*Antimicrobial Resistance | Food and Agriculture Organization of the United Nations*, s.a.). Kui loomade sõnnikut kantakse põldudele, saavad sinna jäänud antibiootikumid avaldada selektiivset survet mulla mikroorganismidele, mis aitab kaasa antibiootikumiresistentsuse tekkele (Han et al., 2022). On näidatud, et mahepõllumajanduse meetmed toovad endaga kaasa kõrgemaid ARG tasemeid (M. Wang et al., 2024).

Muld on antimikroobsete resistentsusgeenide reservuaar ja sealt võib resistentsus levida inimestele otsese kontaktiga, toiduahela või veekeskkonna kaudu (Zhu et al., 2019). Taimed võivad omastada keskkonnast resistentseid baktereid taimsesse mikrobioomi, mille kaudu saab

resistentsus levida inimestele ja nende patogeenidele (Chen et al., 2019). Mullast saavad resistentsusgeenid ja resistentsed bakterid liikuda koos veevooluga veekogudesse ja sealt edasi ka veeauru aerosoolide kujul edasi levida (Zhu et al., 2017).

Resistentsuse teket ja levikut bakterites antibiootikumide väärkasutuse tulemusena loomakasvatuses on näidatud mitmel juhul. Fluorokinoloonide ja karbapaneemide vastast resistentsust on näidatud *Salmonella* spp. tüvedel nende kasutuse otsese tulemusena loomakasvatuses (Cui et al., 2019; Mollenkopf et al., 2017). Aastal 2015 tuvastati Hiinas esimene mobiilne resistentsusgeen kolistiini vastu, mis on määrava tähtsusega antibiootikum kõrgelt resistentsete gramnegatiivsete bakterite vastu ning sellele järgneval aastal keelustati Hiinas kolistiini kasutamine loomade söödalisandina (Walsh & Wu, 2016). Eelmise sajandi lõpus Euroopas tihedalt kasutusel olnud avopartsiin põhjustas vankomütsiiniresistentse *Enterococcus* spp. tihedat levikut ja esinemist inimestes, kuid peale selle keelustamist loomakasvatuses nähti selle langust (Bager et al., 1997; Klare et al., 1999; Marshall & Levy, 2011).

1.1.5. Muld kui AMR geenide reservuaar

Ühest grammis mullas võib leida 10^6-10^9 bakterirakku 10^3-10^6 erinevast liigist, olenevalt proovivõtukohast (Nesme & Simonet, 2015). Looduses eritavad mikroorganismid mulda antibiootikume, nii teiste, konkureerivate organismide vastu võitlemiseks, kuid ka väikestes kogustes omavaheliseks kommunikeerimiseks (Linares et al., 2006; Newman et al., 2003). Nagu ka antibiootikumid, on resistentsusgeenid looduslikult laialt levinud, mullas elutseb palju erinevaid antibiootikume tootvaid mikroobe ja seega on seal levinud ka nendele vastavad resistentsusgeenid, mida kokku nimetatakse mulla resistoomiks (Zhu et al., 2019). See looduslik resistoom on mitmekesine nii resistentsuse mehhanismide kui ka arvukuse poolest ning sellist mitmekülgse resistoomi esinemist on leitud ka inimmõjust puudutamata aladelt, näiteks on 30000 aasta vanusest igikeltsast leitud resistentsusgeene β-laktaamide, glükopeptiidide ja tetratsükliinide vastu ning ARG-sid on leitud ka Antarktika muldadest (D'Costa et al., 2011; Zhu et al., 2019; Van Goethem et al., 2018).

Mulla resistoom sisaldab umbes 30% kõikidest teadaolevatest ARG-dest ning umbes 80% meditsiinis kasutatavatest antibiootikumidest pärineb mullabakteritest *(Bacillaceae, Pseudomonas* spp.*, Actinobacteria)* (Han et al., 2022, Davies & Davies, 2010). Mulla resistoomi mõjutavad mikroobikommuuni struktuur, sinna sattuvate antibiootikumide tüüp ja

konsentratsioon, raskemetallid, mulla pH, mulla niiskus, mullas sisalduvad toitained, mis kõik võivad esitada selektiivset survet mulla resistoomile, seega esinevad erinevates mullatüüpides erinevad domineerivad ARG-d (Han et al., 2022). Mulla pH on üks kõige olulisemaid ARG-de rikkust mõjutavaid faktoreid ning ARG-de rikkus on suurim neutraalse pH juures (Hu et al., 2018; Xie et al., 2018). Kõrge mulla niiskus soodustab ARG-de levikut mobiilsete geneetiliste elementide kaudu (Wang et al., 2016). Toitainetest mõjub näiteks kaalium positiivselt sulfonamiidide ARG-de rikkusele ning fosfor mõjub negatiivselt eflukspumpade ja tetratsükliinide ARG-de rikkusele (Song et al., 2021; Zhang et al., 2019).

1.2.Antibiootikumiresistenstsuse ja selle leviku mehhanismid

1.2.1. AMR omandamine

Konkreetse patogeeni vastu efektiivse antibiootikumi kasutuselevõtul on patogeen sellele tundlik, kuid pideva kasutuse ja kokkupuutega areneb välja resistentsus (Salam et al., 2023). Bakterid on võimelised kiiresti muteeeruma ja adapteeruma, mis lubab neil välja kujundada palju erinevaid resistentsusmehhanisme(Ahmed et al., 2024). Kasulike resistentsust tekitavate *de novo* mutatsioonide teke annab nendele bakteritele elukeskkonnas eelise, mis antakse edasi kas järgmisele generatsioonile, või teistele bakteritele horisontaalse geeniülekande teel (konjugatsioon, transformatsioon või transduktsioon) (Kumar et al., 2020). Resistentsuse omastamisega võib kaasneda negatiivne toime kohastumusele keskkonnas, kus antibiootikume pole, kuid positiivne toime keskkonnas, kus antibiootikume leidub. Seega keskkonnas, kus antibiootikume pole, on resistentsed bakterid halvemini kohastunud ja ei suuda konkureerida mitteresistentsete bakteritega ning lõpuks kaovad, mida on ka eksperimentaalselt nähtud kliinilistes olukordades, kui teatud antibiootikumide kasutamine on lõpetatud (Durão et al., 2018). Nii kõrge kui ka madal antibiootikumide kontsentratsioon võib soodustada resistentsuse teket; *E.coli* ja *Salmonella enterica* peal on näidatud, et osade antibiootikumide kontsentratsioonid, mis on sadu kordi väiksemad kui MIC (minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon), on ikkagi piisavalt suured, et põhjustada resistentsete bakterite selektsiooni (Durão et al., 2018).

Resistentsete bakterite teke oleneb nende füsioloogiast, geneetikast ja bakterite ning antibiootikumide omavahelistest interaktsioonidest, näiteks võib antibiootikum ise mõjutada mutatsioonide teket ja ka üldisem antibiootikumidest tulenev stress võib tõsta mutatsioonide,

rekombinatsiooni ja horisontaalse geeniülekande taset (Andersson & Hughes, 2014; Cirz et al., 2005; Durão et al., 2018).

Antimikroobset resistentsust esineb kolme liiki – loomulik (*intrinsic*), omandatud ja adaptiivne resistentsus (Christaki et al., 2020). Loomulik resistentsus on muutumatu, bakterile olemuslik omadus, universaalne kogu liigi piires ja ei olene eelnevast antibiootikumiga kokkupuutest (Reygaert, 2018). See tuleneb geenidest, mis ei liigu ja ei ole seega mujalt omastatud (Lee, 2019). Loomulik resistentsus võib olla alati ekspresseeritud või indutseeritud, kui resistentsusgeene ekspresseeritakse alles antibiootikumiga kokkupuutel (Reygaert, 2018). Selle alla kuulub näiteks gramnegatiivstete bakterite resistentsus glükopeptiididele, kuna nende välismembraan on nendele läbimatu (Christaki et al., 2020). Looduslikult on samuti levinud mittespetsiifilised efflukspumbad, mis pumpavad antibiootikume rakust välja (Reygaert, 2018). Enamasti leidub loomulikku resistentsust bakterites, kes ise antibiootikume toodavad, olles resistentsed iseenda toodetud antibiootikumile ning nendega sümbioosis elavates bakterites (Lee, 2019; Peterson & Kaur, 2018).

Omandatud resistentsuse puhul saab bakter resistentsuse kas mutatsiooni teel või väliskeskkonnast horisontaalse geeniülekande teel (Christaki et al., 2020). Kõige levinum resistentsusgeenide leviku viis on plasmiidide konjugatsiooni kaudu ning bakteriofaagide teel transduktsioon on pigem haruldane (Iskandar et al., 2022; Reygaert, 2018). Mutatsioonid võivad bakterites tekkida keskkonna stressorite ja mutageenide tõttu(toitainete puudus UV kiirgus, kemikaalid), kuid ka sisemiste faktorite tõttu, näiteks vead DNA replikatsioonil ning integronide ja IS (*insertion sequence*) tegevusel (Iskandar et al., 2022; Reygaert, 2018). Peamised geenid, kus resistentsust põhjustavad mutatsioonid toimuvad, on geenid, mis kodeerivad antibiootikumide sihtmärke, antibiootikumide transportereid ja regulaatoreid, mis kontrollivad antibiootikumide transportereid (Reygaert, 2018).

Adaptiivne resistentsus on indutseeritud konkreetse signaali või keskkonnastiimuli poolt (stress, pH, toitainete kättesaadavus, madalas konsentratsioonis antibiootikumid) ning on ajutine, ebastabiilne, ei kandu edasi järgmisele põlvkonnale ning pöördub tagasi algseisundisse kui indutseeriv faktor eemaldada (Lee, 2019). Adaptiivne resistentsus toimib läbi muudatuste geeniekspressioonis(efflukspumpade ekspressiooni suurendamine, poriinide ekspressiooni vähendamine (Fernández & Hancock, 2012)) ja epigneetiliste modifikatsioonide, näiteks DNA metüleerimise kaudu (Rizi et al., 2018). Selle alla kuulub näiteks biofilmi moodustamine, kus ekstratsellulaarne maatriks takistab antibiootikumi jõudmist sihtmärgini ja persisterrakkude

teke, kui osad populatsiooni bakterid aeglustavad oma metabolismi, et vähendada antibiootikumide mõju (Lee, 2019).

1.2.2. Horisontaalne geeniülekanne

Antibiootikumiresistentsuse horisontaalne levik bakteripopulatsioonide vahel toimub kolme peamise mehhanismi kaudu: transformatsioon vaba DNA-ga, plasmiidide konjugatsioon ja transduktsioon bakteriofaagide kaudu (Peterson & Kaur, 2018).
Transformatsioon on protsess, milles bakterid suudavad keskkonnast üles korjata vaba rakuvälist DNA-d ,mis pärineb doonorbakteritelt, kes on kas selle sekreteerinud või ise surnud ja selle käigus on nende DNA keskkonda vabanenud (Tao et al., 2022; von Wintersdorff et al., 2016). Selleks, et transformatsioon saaks toimuda, peab bakter olema kompetentne ja üles korjatud DNA peab stabiliseeruma, kas kromosoomi integreerumise kaudu või plasmiidse DNA puhul retsriklulariseerimise kaudu (von Wintersdorff et al., 2016). Kompententsust bakterites mõjutavad peamiselt toitainete kättesaadavus ja keskkonnastressorid, näiteks antibiootikumid (Peterson & Kaur, 2018). Osad bakterid on looduslikult kompetentsed, näiteks *Bacillus subtilis* ja *Acetinobacter baylyi* (Blokesch, 2016) ning võimelised otse väliskeskkonnast geneetilist materjali omandama (Reygaert, 2018).

Konjugatsioon on plasmiidide edastamise viis bakterite vahel, mis nõuab rakkude omavahelist kontakti, näitaks piilide või adhesiinide kaudu (Peterson & Kaur, 2018). Konjugatsioon leiab tihti aset tingimustes, kus baktereid on tihedalt, näiteks inimeste või loomade soolestikus, biokiles ja haiglates (Peterson & Kaur, 2018). Plasmiidid on levinud MGE (mobiine geneetiline element) ja AMR geenide kandjad ning on näidatud, et kui resistentsusgeenid jäävad püsima plasmiididele, võivad nad nende kaudu kiiresti levida erinevate tüvede ja liikide vahel (Partridge et al., 2018; von Wintersdorff et al., 2016). Lisaks horisontaalsele ülekandele konjugatsiooni teel kanduvad plasmiidid ka vertikaalselt edasi tütarrakkudele ning eksisteerivad ka toksiin-antitoksiin mehhanismid, mis tapavad tütarrakud, kes ei omanda rakujagunemisel plasmiidi (Partridge et al., 2018). Konjugatsiooni mehhanismi geenid võivad asuda nii plasmiidis endas kui ka kromosoomis ning isegi muidu mittekonjugeeruvat plasmiidi saab edastada, kui samas rakus eksisteerivad konjugatsiooni geenidega plasmiid (Partridge et al., 2018; von Wintersdorff et al., 2016). Plasmiidid kannavad tihti rohkem kui ühte resistentsusgeeni, ja selline klasterdumine võib tuleneda keskkonnasurvest (Peterson & Kaur, 2018). Ühe plasmiidi sees mitme resistentsusgeeni esinemine tekib mobiilsete geneetiliste

elementide (transposoonid, integronid, IS elemendid) tegevuse tulemusena (Christaki et al., 2020).

Transduktsiooni puhul liiguvad geenid doonorbakterilt retsipendile lüsogeensete bakteriofaagide kaudu (Tao et al., 2022). Need üleviidavad geenid võivad olla kromosomaalsed ja ka mobiilsed, näiteks plasmiidid ja transposoonid (von Wintersdorff et al., 2016). Bakteriofaagid saavad eksisteerida samas keskkonnas ARG-dega ja neid kandvate bakteritega ning katsed hiirte peal on näidanud, et transduktsioon soodustab soolestiku mikrobiootas geneetilist mitmekesisust ja resistentsuse teket(Tao et al., 2022).

Arvatakse, et transduktsioon on peamine mehhanism *Staphlococcus aureus*-e resistentsuse levikus, kuid üldiselt on transduktsioonil suhteliselt väike osa horisontaalses geeniülekandes, moodustades sellest umbes 1000 korda väiksema osa, kui konjugatsioon (Haaber et al., 2017; Volkova et al., 2014).

1.2.3. Mobiilsed geneetilised elemendid

Mobiilsed geneetilised elemendid(MGE) on elemendid, mis soodustavad DNA rakusisest liikumist, näiteks kromosoomi ja plasmiidide vahel (Partridge et al., 2018; Siguier et al., 2014). Nende hulka kuuluvad näiteks transposoonid, integronid ja IS-id (*insertion sequence*) (Partridge et al., 2018). MGE-d mängivad kriitilist rolli AMR geenide levikus, pakkudes võimalust horisontaalseks geeniülekandeks bakteripopulatisoonide vahel ning on näidatud, et MGE ja ARG tasemed keskkonnas on tugevalt korrelatsioonis (Fu et al., 2024). Lisaks saavad MGE-d liikuda edukalt erinevate liikide vahel, olenemata nende omavahelisest geneetilisest lähedusest (Domingues, Harms, et al., 2012).

Integronid on geneetilised elemendid mis sisaldavad homoloogia põhist rekombinatsioonisüsteemi, mis suudavad ekspresseerida ja omavahel vahetada spetsiifilisi DNA elemente, n.ö geenikassette (Domingues et al., 2012). Integrone ei loeta otseselt mobiilseks elementideks, kuna nad ei ole võimelised iseseisvalt liikuma, kuid nende kantud geenikassetid on selleks võimelised ning neid loetakse mobiilseteks elementideks (Domingues et al., 2012). Kuigi integronid ei ole iseseisvalt võimalised liikuma, on neil võimalik näiteks transposoonide kaudu sattuda plasmiididel või faagidesse, olles nii võimelised levima horisontaalse geeniülekande kaudu (Peterson & Kaur, 2018). Integronid koosnevad kolmest osast: *IntI* geen, mis kodeeerib rekombinatsiooniks vajalikku valku integraasi, integronile omane rekombinatsioonisait *attI* ja integronile omane promooter *Pc* (Gillings, 2014).

Geenikassetid on vabas olekus rõngasmolekulid, mis sisaldavad *attC* rekombinatsioonijärjestust ning geenikasseti integroni lisamisel toimub homoloogne rekombinatsioon integroni *attI* ja geenikasseti *attC* elemendi vahel, see protsess on pöörduv ning selle pöördprotsessi kaudu saab geenikassetti integronist eemaldada (Gillings, 2014). Näiteks on klass 1 integronid laialt levinud kliinilistes olukordades ja tihti seotud antibiootikumide resistentsusgeenide kandmise ja levimisega (Peterson & Kaur, 2018).

Transposoonid on üldlevinud elemendid kõikides teadaolevates genoomides, konkreetsemalt tüüp 2 ehk DNA põhised transposoonid (Aziz et al., 2010). Autonoomsed DNA transposoonid koosnevad vähemalt ühest avatud lugemisraamist, mis kodeeerib transpositsiooni reaktsiooni läbiviivat transposaasi ensüümi ning kahte kõrgelt konserveerunud järjestust transposooni otstes, mis käituvad transposaasi seostumiskohtadena (Schmitz & Querques, 2023). Enamus DNA transposoone liigub selle genoomist väljalõikamise ja teise kohta integreerumise kaudu, kuid vähesed neist saavad ka ennast kopeerida, jäädes selleläbi originaalsesse asukohta alles (Schmitz & Querques, 2023). Lisaks transposaasi geenile saavad transposoonid sisaldada ka teisi kaasaliikuvaid geene, näiteks resistentsusgeene (Partridge et al., 2018). Osad transposoonid, niinimetatud konjugatiivsed transposoonid, saavad ka liikuda horisontaalselt konjugatsiooni kaudu ja integreeruda kromosoomi (Arnold et al., 2022).

IS-id on üldiselt väikesed MGE-d, mis kannavad ühte kuni kahte transposaasi geeni (Partridge et al., 2018). Kõige levinum IS-ide liikumise tagajärg on geenide inaktivatsioon, kui IS sisestub geeni keskele ning on näidatud, et see saab põhjustada resistentsuse teket, näiteks inaktiveerides poriinid, mis muidu omastaksid keskkonnast antibiootikume, selliseid juhte on näidatud muuhulgas *Psuedomonas* aeruginosa-s, *Acinetobacter baumannii*-s ja *Klebsiella pneumoniae-s* (Vandecraen et al., 2017). IS-id ise ei sisalda muid kaasaliikuvaid geene, kuid nad saavad moodustada n.ö komposiittransposooni, kus kaks sama või sarnast IS-i piiravad ühte regiooni ning need kaks IS-i liiguvad ühe osana, kandes kaasas seda genoomset regiooni (Partridge et al., 2018). Erinevus IS ja transposoonide vahel on küllaltki hägune, eksisteerib juhtumeid kus IS-e on kirjeldatud transposoonide andmebaasides ja transposoone on kirjeldatud IS andmebaasides ning enamustel eukarüootsetel transposoonidel on sugulus prokarüootsete IS-idega (Partridge et al., 2018; Siguier et al., 2014).

1.2.4. Ülevaade resistentsusmehhanismidest

Resistentsuse mehhanismid langevad laialt nelja rühma: aine omastamise piiramine, aine rakusisese sihtmärgi modifitseerimine, aine inaktiveerimine ja aine aktiivne väljapumpamine (Reygaert, 2018).

Antibiootikumi omastamise piiramine toimib peamiselt läbi rakumembraani või rakuseina (Reygaert, 2018). Näiteks pakub gramnegatiivsete bakterite LPS (lipopolüsahhariid) kihi struktuur neile kaitset osade antibiootikumide klasside eest ning teistes bakterites saab tihedam rakusein takistada antibiootikumide sisenemist rakku (Reygaert, 2018). Resistentsus võib tekkida ka välismembraani aineid läbilaskvate poriinide modifitseerimisest või muudatustest nende ekspressioonis (Salam et al., 2023).

Antibiootikumi inaktiveerimine võib toimuda antibiootikumi modifitseerimise või lagundamise kaudu (Salam et al., 2023). Antibiootikumi lagundamise teel toimivad näiteks β-laktamaasid, mis lagundavad β-laktaame (Christaki et al., 2020). β-laktaamide alla kuuluvad muuhulgas penitsilliinid ja karbapaneemid (Reygaert, 2018).

Antibiootikumide aktiivne rakust väljapumpamine toimub membraanseoseliste eflukspumpade aktiivse transpordi kaudu (Salam et al., 2023). Eflukspumbad on enamasti mittespetsiifilised ja põhjustavad resistentsust mitme antibiootikumi vastu korraga (n.ö *multidrug* resistentsus) (Salam et al., 2023). Mittespetsiifilised eflukspumbad on enamasti kodeeritud kromosoomi poolt ja on konserveerunud, kuid vähesed neist põhjustavad resistentsust kliiniliselt oluliste antibiootikumide vastu (Christaki et al., 2020).

Antibiootikumi rakusisest sihtmärki saab modifitseerida, kaitsta ja asendada (Christaki et al., 2020). Modifikatsioon võib toimuda läbi mutatsioonide sihtmärki kodeerivas geenis, mis muudab seda nii, et antibiootikum ei saa sinna enam seostuda, või posttranslatsioonilise modifikatsioonidega, nendest üks efektiivsemaid resistentsuse tekkel on metülatsioon (Salam et al., 2023). Sihtmärgi asendamisel täidab sama funktsiooni teistsugune valk, mida antibiootikum ei mõjuta, näiteks toimib nii β-laktaamide resistentsus *Streptococcus pneumoniae* seas, kes on olnud omastanud resistentsusgeeni, mis võimaldab tal toota rekombinantset valku, mis võimaldab rakukesta sünteesi ka antibiootikumi juuresolekul (Christaki et al., 2020). Sihtmärgi kaitsmine on levinud näiteks tetratsükliinide vastu, kus resistentsusgeeni toodetud valkude seostumine ribosoomile soodustab sealt tetratsükliini molekulide eemaldamist (Peterson & Kaur, 2018).

1.2.5. Resistentsuse seos mulla mikrobioomi mitmekesisusega

Mitu uuringut on leidnud, et mulla mikroobne mitmekesisus on negatiivses korrelatsioonis resistentsusgeenide rikkusega mullas (Q.-L. Chen, An, et al., 2019; B. Li et al., 2020; Van Goethem et al., 2018). Selle põhjuseks võib olla, et palju AMR geene sisaldavad mikrobiootas on tundlikumad liigid vähem konkureerivad ning seega liigiline mitmekesisus on väiksem (Van Goethem et al., 2018), kuid on ka pakutud, et kõrge mitmekesisuse tase toimib bioloogilise barjäärina mis takistab invasiivsete antibiootikumiresistentsete liikide levikut (Q.-L. Chen, An, et al., 2019).

1.3.Metagenoomika analüüsimeetodina

Metagenoomika võimaldab genoomsete andmete analüüsimist keskkonnaproovidest ilma, et seal elavaid organisme oleks vaja eelnevalt üles kasvatada (de Abreu et al., 2021). Mullast pärinevate proovide analüüsimiseks on selline lähenemine väga sobiv, kuna hinnanguliselt vähem kui 1% mullas elavatest organismid on laboris kultiveeritavad (Amann et al., 1995). Järjestuste assambleerimine ja selleläbi saavutatud pikemad kontiigide pikkused aitavad kaasa liikide määramisele ja resistentsusega seotud elementide tuvastamisele ja annoteerimisele (de Abreu et al., 2021). Metagenoomilised analüüsid võivad olla järjestuse- või funktsioonipõhised - järjestusepõhises metagenoomikas saadakse järjestused proovidest *shotgun* sekveneerimise meetodil ning analüüsitakse bioinformaatiliste tööriistadega, kuid funktsionaalses metagenoomikas, mida kasutatakse tihti resistentsusgeenide uurimiseks, kloonitakse keskkonnast võetud DNA ekspressioonivektorisse (enamasti *E.coli*) ning selekteeritakse funktsionaalsete tunnuste põhjal (de Abreu et al., 2021).

2. UURIMUSLIK OSA

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks oli mulla mikrobioota ja resistoomi uurimine mahe- ja intensiivpõllumajanduses kasutades järjestuspõhiseid metagenoomika meetodeid. Sooviti leida, kas on olulist erinevust antibiootikumiresistentsusgeenide esinemissageduses ja mikrobioota mitmekesisuses maheda ja intensiivse viljelusviisiga põldude vahel. Osa sellest oli uurida mobiilsete geneetiliste elementide arvukust muldades ja kuidas need tulemused erinevad mahedate ja intensiivsete viljelusviisiga muldade vahel.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Proovide kogumine

Proovid koguti Maaeuluministeeriumi Rakendusuuringute programmi rahastatud projekti "Mikroobsete taimekultuuripõhiste spetsiifilise funktsiooniga biostimulaatorite väljatöötamine väetistetoodete (sh mineraal-väetiste, orgaaniliste ja/või orgaanilis-mineraalsete) tootmiseks" raames.

Analüüsimiseks võeti 79 proovi 46-st erinevast mullast üle Eesti, millest 20 olid maheda viljelusviisiga, 21 intensiivse viljelusviisiga, 4 olid loodusliku rohumaa mulda ja 1 teadmata viljelusviisiga muld. Põllukultuuridest kasvatati 11 mullal nisu, 12 mullal lutserni, 10 mullal rapsi ja 13 mullal porgandit. Kokkuvõttev info võetud proovide ning muldade asukoha ja viljelusviisi kohta on välja toodud Lisas 1.

2.2.2. Proovide analüüsimine

Kogutud proovidest DNA eraldamiseks kasutati NucleoSpin Soil DNA Mini Kit-i (Machery Nagel, Saksamaa). DNA konsentratsioon mõõdeti Thermo Fischeri QUBIT 4 fluoromeetriga. DNA eraldamine ja konsentratsiooni mõõtmine viidi läbi BioCC OÜ-s. Proovid sekveneeriti Element Bioscience AVITI masinaga keemilise afiinsuse meetodil Helsingi Ülikoolis. Sekveneerimise tulemusena saadi igast proovist kaks paarislugemit, mida uuriti edasi bioinformaatika meetoditega.

2.2.3. Andmete analüüs

Programme kasutati ja analüüse teostati TÜ bioinformaatika õppetooli Linuxi serveris. Sekveneerimise andmed puhastati fastp (S. Chen, 2023) programmiga. Sekveneerimise adapterite tuvastamiseks ja eemaldamiseks kasutati parameetrit --detect_adapter_for_pe. Libiseva akna nukleotiidide minimaalse kvaliteediskoori väärtuseks pandi 30 ja kasutati libiseva akna filtreerimise parameetreid --cut_tail ja --cut_front. Samast mullast võetud proovide puhastatud DNA sekveneerimise andmed liideti omavahel kokku kasutades Linuxi cat funktsiooni, vastavalt parempoolsed lugemid, vasakpoolsed lugemid ja paardumata lugemid üksteisega, nii saadi 46 andmete gruppi. Edasised analüüsid tehti nende gruppidega.

Proovide assambleerimine viidi läbi MEGAHIT (Li et al., 2015) programmiga. Assambleerimisel kasutati k-meeride suurusi 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127 ja leebemat filtreerimist parameetriga –min-count 1. Need parameetrid on samad, mis on kasutusel MEGAHIT programmi sisseehitatud meta-large eelseadistuses, mis on mõeldud suurte ja keerukate metagenoomide assambleerimiseks.

Resistentsusgeenide leidmiseks kontiigidest kasutati Abricate (Seemann T, *Abricate*) programmi. Iga proovi peal teostati analüüs NCBI (Feldgarden et al., 2019), ResFinder (Zankari et al., 2012), ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014), CARD (Jia et al., 2017) ja MEGARes (Doster et al., 2020) andmebaasidega, ning saadud tulemused liideti omavahel. Geenide tuvastamise lävendideks seati identsusel 80% ja katvusel 50%. Iga resistentsugeeni koguseks proovis määrati nii mitu, kui leidis andmebaas, kes leidis seda geeni kõige rohkem. Uurimaks, kas antud tulemustes on statistiliselt oluline vahe resistentsusgeenide esinemise sageduses mahedates ja mittemahedates muldades, tehti resistentsusgeenide sageduste kohta Fischeri test, statistiliselt oluliseks loeti tulemus, kui p-väärtus oli alla 0,05.

Integronide järjestuste leidmiseks kontiigidest kasutati IntegronFinder programmi (Eddy, 2011; Haft et al., 2018; Hyatt et al., 2010; Nawrocki & Eddy, 2013; Néron et al., 2022). Arvesse võeti vasted, mille e-väärtus oli väiksem, kui $1*10^{-5}$.

Liigilise mitmekesisuse analüüsimiseks kasutati Kraken2 (Wood et al., 2019) ja Bracken (Lu et al., 2017) programme. Alfa ja beeta mitmekesisuste väärtuste leidmiseks kasutati KrakenTools'i Pythoni skripte (Lu et al., 2022). Alfa mitmekesisuse arvutamisel kasutati Shannoni indeksit. Beeta mitmekesisuse määramisel kasutati Bray-Curtise erisusindeksit. Kraken analüüsiks kasutati paarislugemeid, mis olid enne kokku liidetud SeqFu (Telatin et al., 2021) programmi interleave funktsiooniga. Beeta ja alfa mitmekesisuste erinevuse statistilist

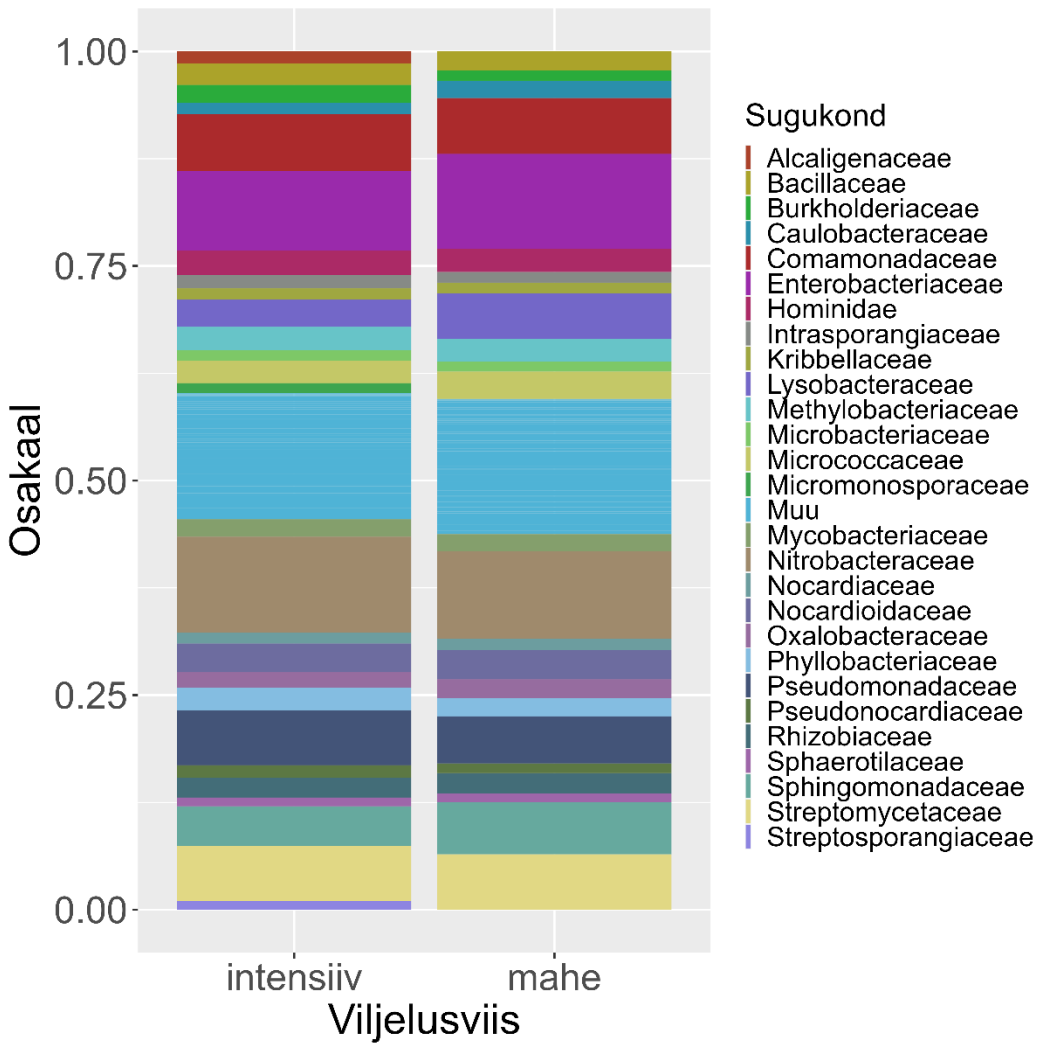
olulisust kontrolliti Wilcoxoni testiga, statistiliselt oluliseks loeti tulemus, kui p-väärtus oli alla 0,05.

Programmide käivitamiseks ja andmetega manipuleerimiseks kasutati autori kirjutatud Bash ja Python skripte, mis on lisatud autori GitHubi lehele (Reidma, K. 2025). Statistiliste analüüside ja jooniste loomiseks kasutati programmi R versiooniga 4.2.2.

2.3.Tulemused

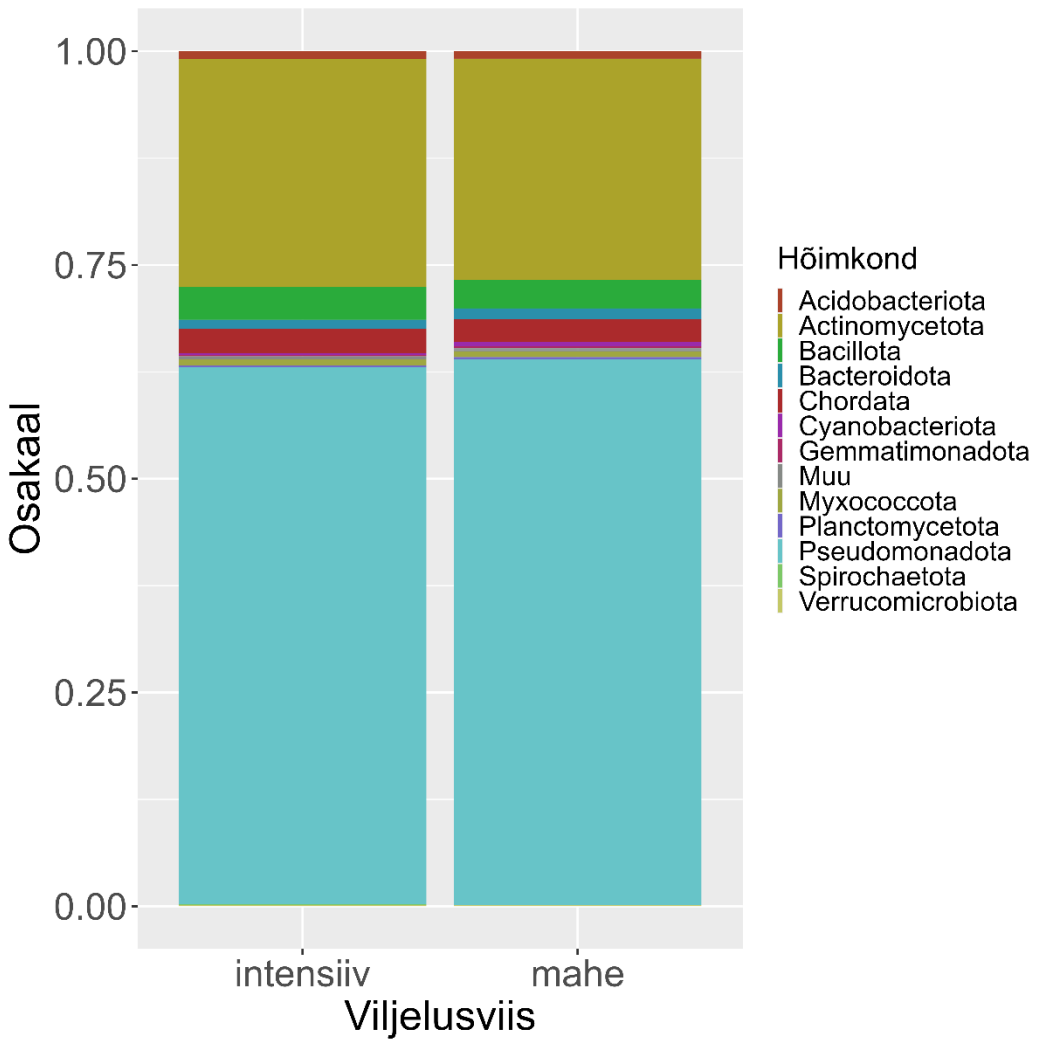
Statistiliste tulemuste analüüsides analüüsiti proovide gruppe kahe rühmana – mahe viljelusviisiga muldade proovid ja intensiivse viljelusviisiga muldade proovid. Maheda viljelusviisiga grupis oli 24 mulla proovi ja intensiivse viljelusviisiga grupis oli 22 mulla proovi.

Krakeni liigilises analüüsis jäi läbivalt umbes 95% kõikidest lugemitest klassifitseerimata ning umbes 5% said klassifitseeritud. Brackeni programmi tulemuste põhjal visualiseeriti liigiline mitmekesisus sugukonna ja hõimkonna tasemel, mida kujutavad Joonis 1 ja 2. Brackeni tulemuste põhjal suhteliste mitmekesisuse analüüsil jäeti sugukonna tasemel välja sugukonnad, mille osakaal oli väiksem, kui 1% ja hõimkonna tasemel jäeti välja hõimkonnad, mille osakaal oli väiksem, kui 0,1%.



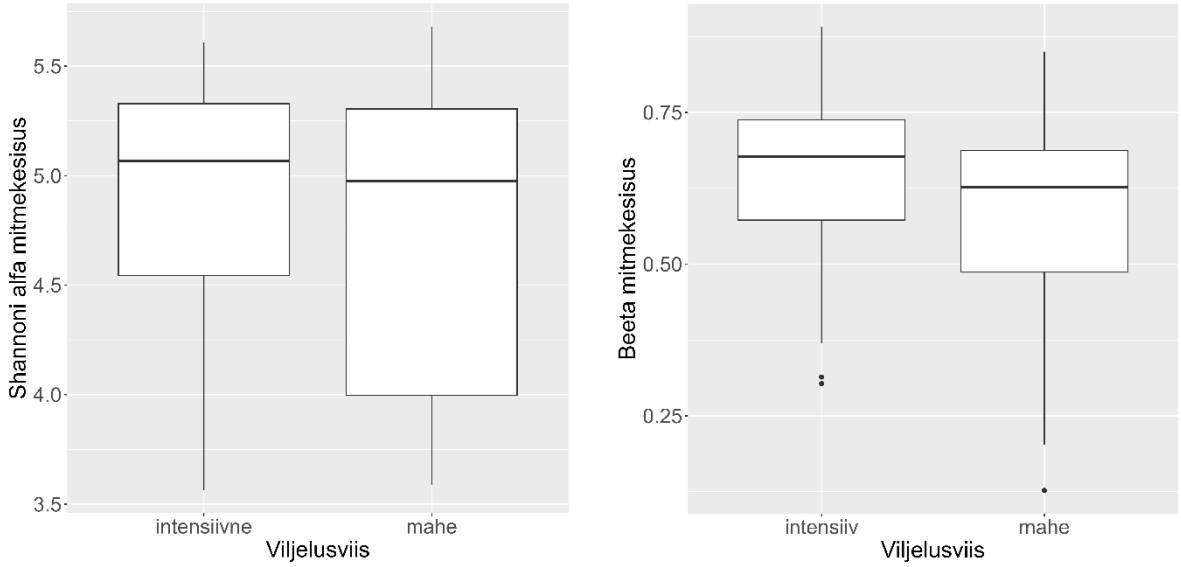
Joonis 1. Liigiline mitmekesisus esinemissageduse järgi sugukonna tasemel maheda ja intensiivse viljelusviisiga muldades. “Muu” alla on liigitatud sugukonnad, mille osakaal on väiksem, kui 1%.

Sugukonna tasemel olid tulemused üldiselt väga sarnased, kuigi intensiivse viljelusviisiga proovides esinesid osad hõimkonnad osakaalus, mis ületasid lävendi, kuid maheda viljelusviisiga proovides ei ületanud, näiteks *Streptosporangiaceae* ja *Alcaligenaceae*. Domineerivad sugukonnad olid *Nitrobacteriaceae* ja *Enterobacteriaceae.*



Joonis 2. Liigiline mitmekesisus esinemissageduse järgi hõimkonna tasemel maheda ja intensiivse viljelusviisiga muldades. "Muu" alla on liigitatud sugukonnad, mille osakaal on väiksem, kui 0,1%.

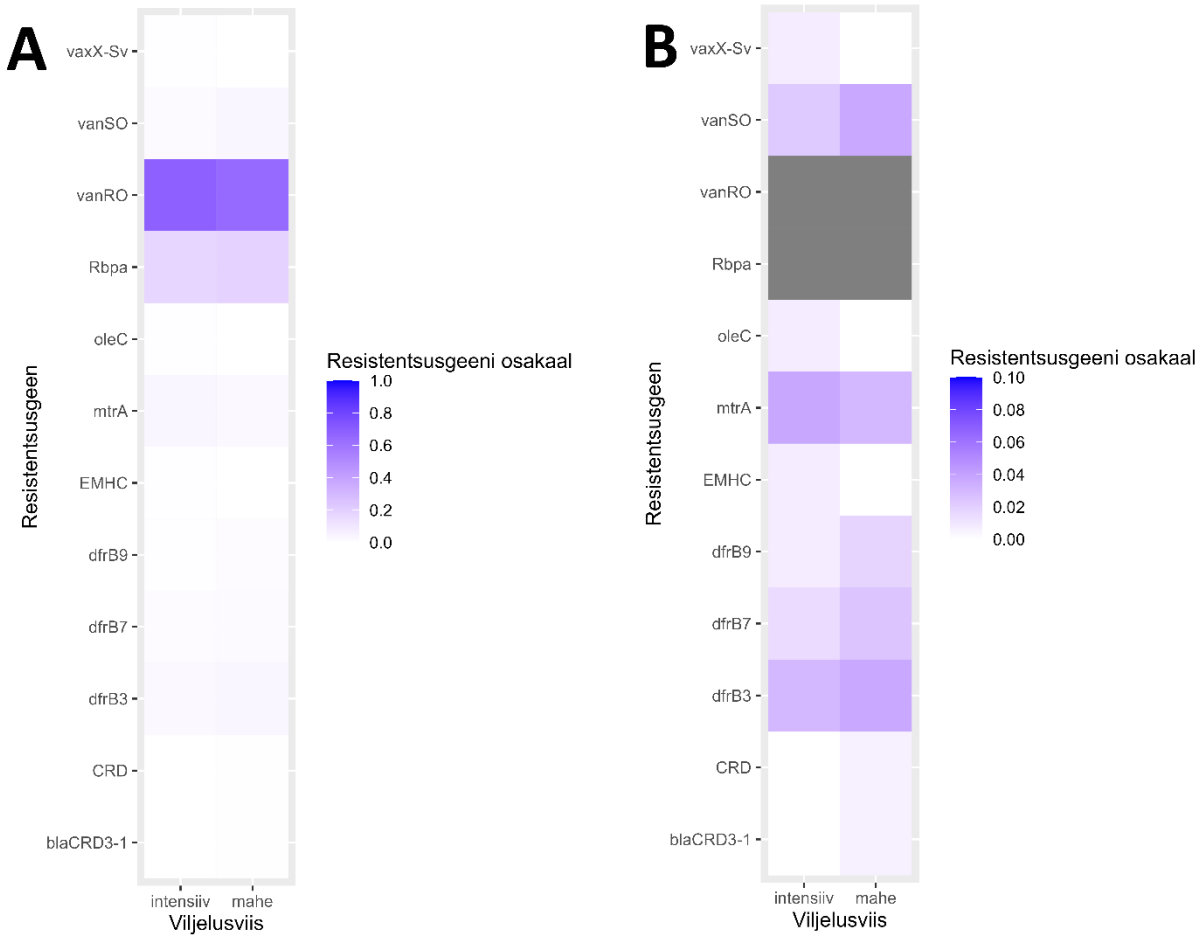
Hõimkonna tasemel ei ole mahedate ja intensiivsete viljelusviisidega proovidega vahel suuri märgatavaid erinevusi. Domineerivad hõimkonnad olid *Pseudomonadota* ja *Actinomycetota*. Lisaks määrati eraldi maheda ja intensiivse viljelusviisiga proovidel alfa ja beeta mitmekesisuse väärtused, mis on välja toodud Joonisel 3. Alfa mitmekesisus näitab varieeruvust ühe proovi siseselt ning beeta mitmekesisus näitab varieeruvust mitme proovi vahel võrrelduna. Beeta mitmekesisuse väärtus kahe proovi võrdluses jääb 0 ja 1 vahele, kus 0 näitab, et liikide koosseis ja esinemissageduses on identsed ning 1 näitab, et proovides ei ole ühtegi sama liiki ning erinevus on seega täielik.



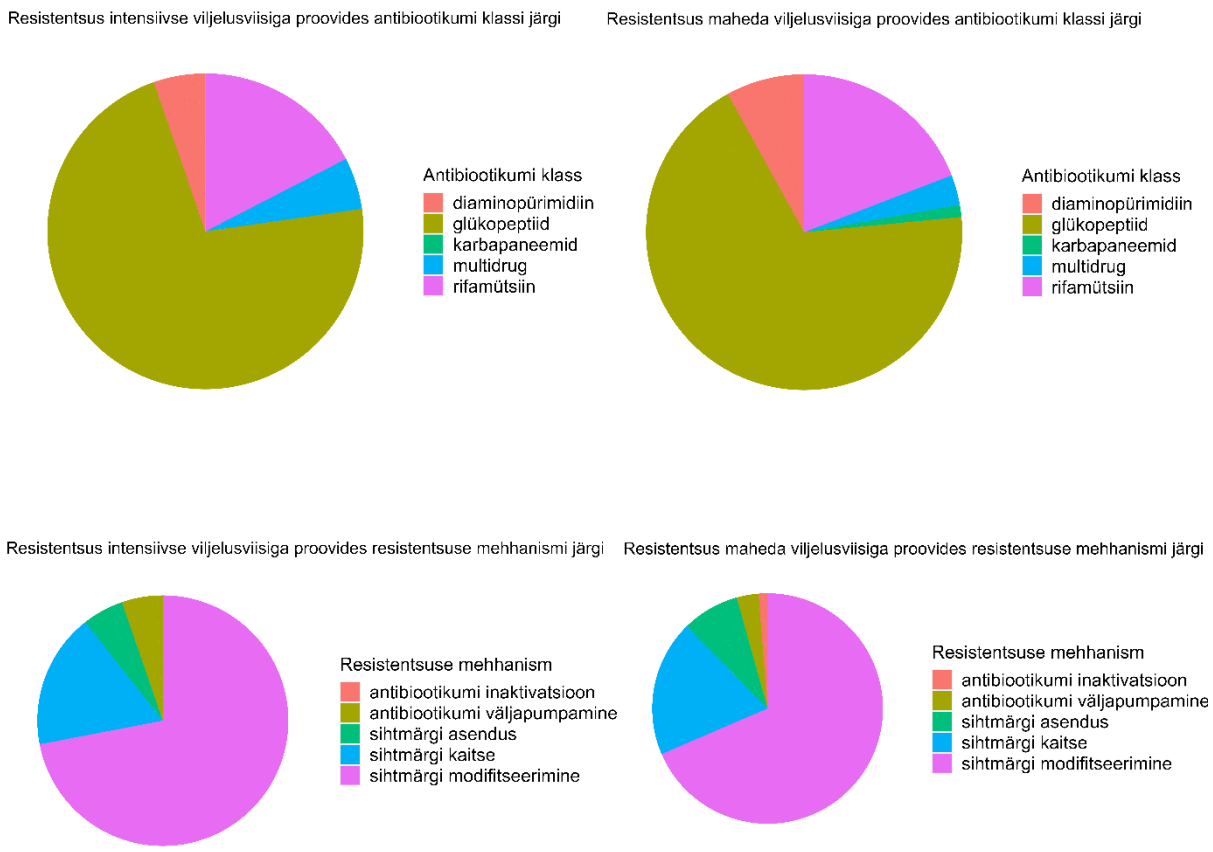
Joonis 3. Beeta ja alfa mitmekesisused intensiivse ja maheda viljelusviisiga proovides. Alfa mitmekesisused on arvutatud Shannoni indeksi järgi iga proovi kohta eraldi ning summeeritud. Beeta mitmekesisused on arvutatud mõlema grupi raames võrreldes kõiki proove omavahel ning summeerides tulemused.

Alfa mitmekesisuste väärtuste erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($p>0,05$). Mahedatel proovidel on alfa mitmekesisuse väärtused suurema varieeruvusega. Beeta mitmekesisuste põhjal saab öelda, et intensiivsetes proovides on proovidevaheline liigiline mitmekesisus suurem. Võrreldes mahe- ja intensiivpõllumajanduse mullparoovide tulemusi leiti oluline erinevus beeta mitmekesisuses ($p<0,001$).

Abricate tulemused grupeeriti vastavalt viljelusviisile ja geenide kogused summeeriti. Resistentsusgeenide esinemissagedused kujutatud Joonisel 4, samuti kujutati visuaalselt resistentusgeenide jagunemist vastavalt antibiootikumi klassile, mille vastu resistentsusgeen toimib ning resistentsuse mehhanismile (Joonised 5 ja 6).



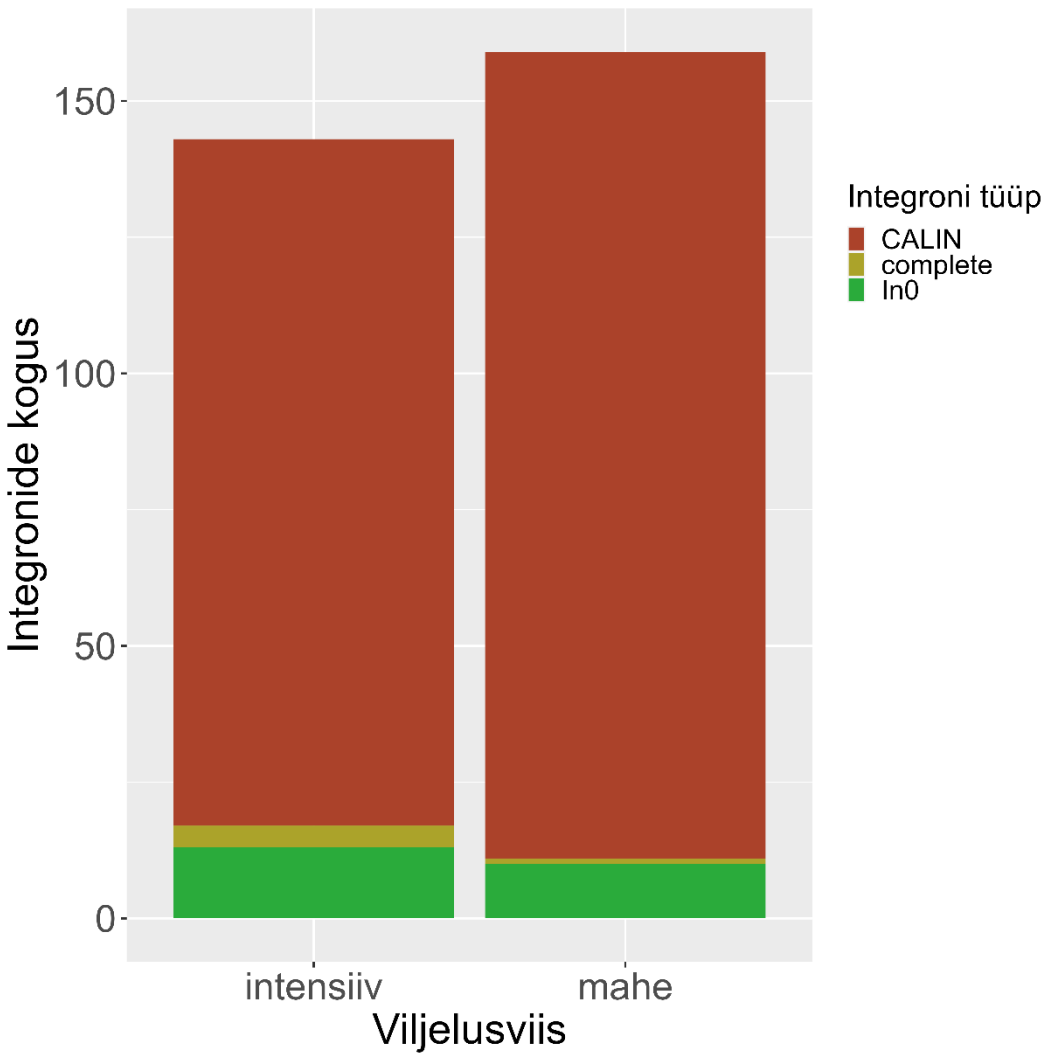
Joonis 4. Heatmap abricate tulemustest. Osakaal on arvutatud resistentsusgeeni esinemissagedusena konkreetse viljelusviisiga grupis. Tumedam värvus tähistab suuremat osakaalu. Kuna vanRO ja Rbpa geene tuvastati palju rohkem, kui kõiki teisi, on tehtud kaks heatmapi, et paremini visualiseerida teiste geenide osakaalu. Joonisel A on maksimaalseks esinemissageduseks seatud 1, Joonisel B 0.1. Hall värvus Joonisel B tähistab, et tulemus on vahemikust väljas.



Joonis 5. Resistentsusgeenide osakaalude jagunemine antibiootikumi klassi ja resistentsusmehhanismi järgi.

Resistentsusgeenide osakaalud on üldiselt natukene suuremad mahepõllumajanduse muldades, kuid see erinevus ei ole statistiliselt oluline ($p>0.05$). Resistentsuse mehhanismidest on domineeriv sihtmärgi modifitseerimine ja antibiootikumi klassidest, mille vastu resistentsus toimib, on domineerivad glükopeptiidid, mis mõlemad vastavad vankomütsiini geenile vanRO, mida tuvastati kõige rohkem. Maheda viljelusviisidega muldades on ka rohkem levinud resistentsus karbapaneemide vastu ja antibiootikumi inaktivatsiooni mehhanism.

IntegronFinderi tulemused sorteeriti vastavalt proovi viljelusviisile ja leitud integroni tüübile ning on visualiseeritud Joonisel 6.



Joonis 6. Leitud integronide jagunemine esinemissageduse järgi erinevate viljelusviisiga proovides integroni tüübi järgi. CALIN tähistab, et leitud integroni kassetis ei ole integraasi geeni, In0 tähistab elemente, millest leiti ainult integraasi geen ja complete tähistab tervikut integroni kassetti.

Kokku leiti mahedatest muldadest 149 integroni elementi ja mittemahedatest muldadest 143. Lisaks arvutati, mitu integroni leiti keskmiselt ühe kontiigi kohta. Maheda viljelusviisiga proovides saadi selle keskmiseks väärtuseks ümardatult 1,15 ja intensiivse viljelusviisiga proovides 1,13. Kuigi integrone leiti rohkem maheda viljelusviisiga proovides ja keskmiselt leiti iga kontiigi kohta rohkem integrone, ei olnud see tulemus statistiliselt oluline ($p>0,05$).

2.4.Arutelu

Antud töö raames olid erinevused maheda ja intensiivse viljelusviisiga gruppide vahel sarnased ja erinevusi oli vähe. Statistiliselt oluline oli beeta mitmekesisuse suurem väärtus intensiivse viljelusviisiga proovides. Käesolevas töös leiti mahepõllumajanduslikes muldades mikroobikooslustes suurem varieeruvus alfa mitmekesisuse väärtustes, mis tähendab, et mahepõllumajanduslik keskkond võib pakkuda rohkem nišše, kuid see varieerub prooviti. Intensiivne kasutus loob ühtlasema keskkonna, kus mitmekesisus on stabiilsem. See võib tähendada, et kuigi mahepõllumajanduslikes muldades on ühe proovi sisene varieeruvus suurem, on üldine nišš mahedatel põldudel väiksem, kuna seal olevad tingimused soodustavad kindlate omadustega mikroorganismide domineerimist. Eelnevad uuringud on leidnud, et suurem resistentsusgeenide arvukus ja mitmekesisus on korrelatsioonis väiksema mikroobse mitmekesisusega, kuid antud töö tulemused resistentsusgeenide osas ei ole piisava statistilise olulisusega, et seda kinnitada. Sugukonna tasemel oli *Enterobacteriacea* rohkem levinud maheda viljelusviisiga proovides(ligikaudu 11% maheda ja 9% intensiivse viljelusviisiga muldades), mis tuleneb tõenäoliselt mahedate muldade sõnnikuga väetamisest, kuna *Enterobacteriaceae* on peamiselt soolestikubakter. 2019. aastal Leedus läbi viidud maheda ja intensiivse viljelusviisiga nisupõldude võrdluses saadi sarnaseid tulemusi (Armalytė et al., 2019). Selles uuringus leiti muldade mikroobikommuuni struktuuris erinevusi vaid väikeste taksonite seas, kusjuures taksonites, kus oli erinevus, leiti rohkem liike intensiivse viljelusviisiga põldudel, samuti oli alfa mitmekesisuse väärtus kõrgem intensiivse viljelusviisiga põldude mullas. Samuti uuriti ka AMR geenide esinemist ning kliiniliselt olulisi AMR geene leiti väheses koguses ja väikese mitmekesisusega. Varasemad uuringud (Q. Chen et al., 2016; L. Zhu et al., 2022; Xiao et al., 2023; Xie, Shen, et al., 2018) on leidnud, et pikaajaline sõnniku kasutamine mahepõllumajanduses mulla väetamisel suurendab resistentsusgeenide osakaalu ja mitmekesisust. Käesolevas uuringus leiti mahedates muldades suuremas koguses karbapaneemide vastast resistentsust, mis on meditsiinis üks kriitiliselt olulisemaid antibiootikume. Kuigi karbapaneemid on autoriseeritud kasutamiseks vaid inimestes, võib olla võimalik, et suurem karbapaneemide resistentsusgeenide osakaal tuleneb reovee sattumisest keskkonda (Hrenovic et al., 2019).

Kuigi andmeid oli küllaltki palju, leiti resistentsusgeene, oodatust palju vähem. See võib tuleneda asjaolust, et proove oli võetud mitmest erinevast kohast, ning igast kohast oli võetud 1-3 proovi. Kontiigide assambleerimisel saab grupeerida ainult samast kohast võetud proove,

seega tulid kontiigid väga lühikesed (N50 pikkused jäid vahemikku 300-600). Peale vankomütsiini ja rifamütsiini leiti teisi resistentsusgeene väga väikestes kogustes (1-10). Vankomütsiini resistentsusgeenid on tõenäoliselt suures osas mulla loodusliku resistoomi osa. Loomulikku vankomütsiiniresistentsust omavad näiteks *Lactobacillus* spp, *E.coli* ja *Pseudomonas* spp. bakterid. Kuid ka loomulikud resistentsusgeenid võivad bakterite vahel levida. On näidatud, et inimtegevuse tagajärjel keskkonnas tekkiv selektiivne surve saab põhjustada resistentusgeenide liikumist kromosoomist plasmiididele, tehes seeläbi võimalikuks nende horisontaalse leviku erinevate bakteripopulatsioonide vahel (Peterson & Kaur, 2018).

Rohkemate ja statistiliselt olulisemate resistentsusgeenide leidmiseks võib olla parem metoodika võtta proove vähematest kohtades, kuid võtta igast kohast rohkem proove. Resistentsusgeenide tuvastamisel saab kasutada ka funktsionaalse metagenoomika meetmeid, kus uuritakse otseselt proovidest eraldatud DNA potentsiaalselt fenotüüpilisi efekte mudelorganismides, kuid selle töö raames seda ei kasutatud. Üks potentsiaalne suund, mida edasi võiks uurida, oleks resistentsusgeenide arvukuse ja mitmekesisuse võrdlemine mahepõllumajanduse muldade vahel, kus kasutatakse sõnnikut väetamisel ja kus mitte. Kuna mullakeskkonda sattuvad antibiootikumid pärinevad enamasti loomakasvatusest, saaks võrrelda muldadest võetud proovide tulemusi antibiootikumide kasutusega loomade peal Eesti taludes ning kuidas see võib seostuda muldadest leitud resistentsusgeenidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö raames uuriti antibiootikumresistentsusgeenide levikut ja mikroobset mitmekesisust 46-s Eesti maheda ja intensiivse viljelusviisiga mullas. Eesmärgiks oli uurida resistentsusgeenide sagedust, mobiilsete geneetiliste elementide esinemist ja mikroobset mitmekesisust ja nende kaudu võrrelda kahte mullatüüpi. Muldadest võetud proove sekveneeriti ja saadud järjestusi analüüsiti bioinformaatika ja metagenoomika meetoditega. Leiti, et mahedates muldades oli üldiselt väiksem mikroobne mitmekesisus ja suurem resistentsusgeenide ja mobiilsete geneetiliste elementide arvukus, mis lähevad küll kokku varasemate tulemustega, kuid kuna iga proovi kohta leiti oodatust vähem resistentsusgeene ja mobiilseid geneetilisi elemente, ei ole tulemused statistiliselt piisavalt olulised. Siiski on antibiootikumiresistentsus ja selle levik väga aktuaalne probleem, mille edasine uurimine on oluline, eriti seoses antibiootikumide liigse kasutusega loomakasvatuse sektoris.

Antibiotic resistance and microbial community structure in Estonian organic and conventional farming systems

Kaur Reidma

Summary

Antibiotics are one of the most important medicines of the last century, helping not only in combating against bacterial infections but also making possible many surgical and invasive procedures. The spread of antibiotic resistance is a growing concern for medicine worldwide. In recent decades the growing overuse and misuse of antibiotics has led to the rapid spread of antibiotic resistance genes, leading to many infections becoming harder to treat, if not effectively incurable. One of the biggest drivers of antimicrobial resistance is the inconsiderate use of antibiotics in the livestock sector. A big part in the spreading of antibiotic resistance is the existence of mobile genetic elements (MGEs), that facilitate horizontal gene transfer between bacteria by promoting genetic mobility. In this work we studied the abundance of antibiotic resistance genes and MGEs and also measured microbial community diversity in 46 Estonian soils from organic and conventional farming systems, with the aim to compare differences in these two systems. We took soil samples for shotgun sequencing and analyzed them using metagenomic approaches and bioinformatic methods. The samples from each site were assembled and the results of all bioinformatics analyses were grouped by the type of farming system. Microbial diversity, measured using the Kraken2 software was similar in both samples, however slightly higher in the conventional farming systems. Resistance genes were searched using the Abricate software and integrons were searched using the IntegronFinder software. We found a total of 12 different antibiotic genes, spanning 5 different classes of drug resistance and 5 different mechanisms of resistance. The abundance of antibiotic genes was slightly higher in the organic soils, however the difference was not statistically significant (p-value 0.9172). We also found more MGEs (integrons) in the organic soils, however that difference was also not statistically significant (p-value 0.4884). These results are likely to be because of the overall unexpectedly low number of resistance genes and MGEs found in both groups owing probably to the small amount on samples taken from each site, which resulted in lower contig length on assembly (N50 was in the 300-600 range for all samples). Future studies are needed to further analyze the spread of antibiotic resistance genes in Estonian soils and the potential dangers they can present for the healthcare system.

TÄNUSÕNAD

Soovin avaldada tänu oma juhendajatele Liina Kuus ja Reidar Anderson. Samuti soovin avaldada tänu BioCC OÜ-le, kelle projekti põhjal käesolev töö valmis.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, *2*, 100081. https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(7), 465–478. https://doi.org/10.1038/nrmicro3270

Antimicrobial Resistance | Food and Agriculture Organization of the United Nations. (s.a.). Salvestatud 16. aprill 2025, https://www.fao.org/antimicrobial-resistance

Armalytė, J., Skerniškytė, J., Bakienė, E., Krasauskas, R., Šiugždinienė, R., Kareivienė, V., Kerzienė, S., Klimienė, I., Sužiedėlienė, E., & Ružauskas, M. (2019). Microbial Diversity and Antimicrobial Resistance Profile in Microbiota From Soils of Conventional and Organic Farming Systems. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00892

Arnold, B. J., Huang, I.-T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(4), 206–218. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4

Aziz, R. K., Breitbart, M., & Edwards, R. A. (2010). Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Research*, *38*(13), 4207–4217. https://doi.org/10.1093/nar/gkq140

Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., & Aarestrup, F. M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant Enterococcus faecium on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, *31*(1–2), 95–112. https://doi.org/10.1016/s0167-5877(96)01119-1

CDC. (2024, november 21). *About One Health*. One Health. https://www.cdc.gov/one-health/about/index.html

Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., & Zhu, Y.-G. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*, *92–93*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026

Chen, Q.-L., An, X.-L., Zheng, B.-X., Gillings, M., Peñuelas, J., Cui, L., Su, J.-Q., & Zhu, Y.-G. (2019). Loss of soil microbial diversity exacerbates spread of antibiotic resistance. *Soil Ecology Letters*, *1*(1), 3–13. https://doi.org/10.1007/s42832-019-0011-0

Chen, Q.-L., Cui, H.-L., Su, J.-Q., Penuelas, J., & Zhu, Y.-G. (2019). Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. *Trends in Plant Science*, *24*(6), 530–541. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.010

Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*, *2*(2), e107. https://doi.org/10.1002/imt2.107

Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, *88*(1), 26–40. https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3

Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., Crécy-Lagard, V. de, Craig, W. A., & Romesberg, F. E. (2005). Inhibition of Mutation and Combating the Evolution of Antibiotic Resistance. *PLOS Biology*, *3*(6), e176. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176

Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., & Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: A univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health*, *2*(9), e398–e405. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4

Cui, M., Zhang, P., Li, J., Sun, C., Song, L., Zhang, C., Zhao, Q., & Wu, C. (2019). Prevalence and Characterization of Fluoroquinolone Resistant Salmonella Isolated From an Integrated Broiler Chicken Supply Chain. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1865. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01865

Dantas, G., Sommer, M. O. A., Oluwasegun, R. D., & Church, G. M. (2008). Bacteria subsisting on antibiotics. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5872), 100–103. https://doi.org/10.1126/science.1155157

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417–433. https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457–461. https://doi.org/10.1038/nature10388

Domingues, S., da Silva ,Gabriela J., & and Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, *2*(5), 211–223. https://doi.org/10.4161/mge.22967

Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., Johnsen, P. J., Silva, G. J. da, & Nielsen, K. M. (2012). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLOS Pathogens*, *8*(8), e1002837. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002837

Doster, E., Lakin, S. M., Dean, C. J., Wolfe, C., Young, J. G., Boucher, C., Belk, K. E., Noyes, N. R., & Morley, P. S. (2020). MEGARes 2.0: A database for classification of antimicrobial

drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D561–D569. https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010

Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, *26*(8), 677–691. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005

Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology*, *7*(10), e1002195. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P. F., Tadesse, D. A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J. P., & Klimke, W. (2019). Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(11), e00483-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19

Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661–681. https://doi.org/10.1128/cmr.00043-12

Fu, Y., Hu, F., Wang, F., Xu, M., Jia, Z., Amelung, W., Mei, Z., Han, X., Virta, M., Jiang, X., & Tiedje, J. M. (2024). Distinct Assembly Patterns of Soil Antibiotic Resistome Revealed by Land-Use Changes over 30 Years. *Environmental Science & Technology*, *58*(23), 10216–10226. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c10423

Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(2), 257–277. https://doi.org/10.1128/mmbr.00056-13

Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J.-M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(1), 212–220. https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13

Haaber, J., Penadés, J. R., & Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus. *Trends in Microbiology*, *25*(11), 893–905. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.011

Haft, D. H., DiCuccio, M., Badretdin, A., Brover, V., Chetvernin, V., O'Neill, K., Li, W., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zheng, C., Thibaud-Nissen, F., Geer, L. Y., … Pruitt, K. D. (2018). RefSeq: An update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D851–D860. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1068

Han, B., Ma, L., Yu, Q., Yang, J., Su, W., Hilal, M. G., Li, X., Zhang, S., & Li, H. (2022). The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657

Hrenovic, J., Ivankovic ,Tomislav, Durn ,Goran, Dekic ,Svjetlana, Kazazic ,Snjezana, & and Kisic, I. (2019). Presence of carbapenem-resistant bacteria in soils affected by illegal waste dumps. International Journal of Environmental Health Research, 29(2), 154–163. https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1522423

Hu, H.-W., Wang, J.-T., Singh, B. K., Liu, Y.-R., Chen, Y.-L., Zhang, Y.-J., & He, J.-Z. (2018). Diversity of herbaceous plants and bacterial communities regulates soil resistome across forest biomes. *Environmental Microbiology*, *20*(9), 3186–3200. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14248

Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*, 119. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119

Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic Discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics*, *11*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182

Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L. E., Frye, J. G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E. L., Pawlowski, A. C., … McArthur, A. G. (2017). CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D566–D573. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004

Klare, I., Badstübner, D., Konstabel, C., Böhme, G., Claus, H., & Witte, W. (1999). Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *5*(1), 45–52. https://doi.org/10.1089/mdr.1999.5.45

Kumar, S. B., Arnipalli, S. R., & Ziouzenkova, O. (2020). Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, *9*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/antibiotics9100688

Lasko, M. J., & Nicolau, D. P. (2020). Carbapenem-Resistant Enterobacterales: Considerations for Treatment in the Era of New Antimicrobials and Evolving Enzymology. *Current Infectious Disease Reports*, *22*(3), 6. https://doi.org/10.1007/s11908-020-0716-3

Lee, J.-H. (2019). Perspectives towards antibiotic resistance: From molecules to population. *Journal of Microbiology*, *57*(3), 181–184. https://doi.org/10.1007/s12275-019-0718-8

Li, B., Chen, Z., Zhang, F., Liu, Y., & Yan, T. (2020). Abundance, diversity and mobility potential of antibiotic resistance genes in pristine Tibetan Plateau soil as revealed by soil metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(10), fiaa172. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa172

Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(10), 1674–1676. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033

Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(51), 19484–19489. https://doi.org/10.1073/pnas.0608949103

Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2017). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, *3*, e104. https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104

Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., Salzberg, S. L., & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, *17*(12), 2815–2839. https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y

Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*, *10*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310

Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(4), 718–733. https://doi.org/10.1128/cmr.00002-11

Miller, W. R., & Arias, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: Antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, *22*(10), 598–616. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w

Mollenkopf, D. F., Stull, J. W., Mathys, D. A., Bowman, A. S., Feicht, S. M., Grooters, S. V., Daniels, J. B., & Wittum, T. E. (2017). Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Recovered from the Environment of a Swine Farrow-to-Finish Operation in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(2), e01298-16. https://doi.org/10.1128/AAC.01298-16

Nawrocki, E. P., & Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *29*(22), 2933–2935. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509

Néron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in Klebsiella. *Microorganisms*, *10*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/microorganisms10040700

Nesme, J., & Simonet, P. (2015). The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, *17*(4), 913–930. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, *66*(7), 1022–1037. https://doi.org/10.1021/np030096l

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4), e00088-17. https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17

Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928

Reidma, K. (2025) *MetagenoomiSkriptid* Github: https://github.com/KReidma/MetagenoomiSkriptid

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, *4*(3), 482–501. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482

Rizi, K. S., Ghazvini, K., & Noghondar, M. kouhi. (2018). Adaptive Antibiotic Resistance: Overview and Perspectives. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*, *6*(3), 1–3. https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000363

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, *11*(13), Article 13. https://doi.org/10.3390/healthcare11131946

Seemann T, *Abricate*, Github https://github.com/tseemann/abricate

Schmitz, M., & Querques, I. (2023). DNA on the move: Mechanisms, functions and applications of transposable elements. *FEBS Open Bio*, *14*(1), 13–22. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13743

Siguier, P., Gourbeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: Their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 865–891. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067

Smith, R., & Coast, J. (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*, *346*, f1493. https://doi.org/10.1136/bmj.f1493

Song, M., Song, D., Jiang, L., Zhang, D., Sun, Y., Chen, G., Xu, H., Mei, W., Li, Y., Luo, C., & Zhang, G. (2021). Large-scale biogeographical patterns of antibiotic resistome in the forest soils across China. *Journal of Hazardous Materials*, *403*, 123990. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123990

WHO's List of Medically Important Antimicrobials: a risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO .Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB). Loetud: **https://www.who.int/docs/default-source/documents/tuberculosis/multidrug-resistant-tuberculosis-mdr-tb.pdf** (10.04.2025).

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(11), 2640–2644. https://doi.org/10.1093/jac/dks261

Zhang, Y.-J., Hu, H.-W., Yan, H., Wang, J.-T., Lam, S. K., Chen, Q.-L., Chen, D., & He, J.-Z. (2019). Salinity as a predominant factor modulating the distribution patterns of antibiotic resistance genes in ocean and river beach soils. *Science of The Total Environment*, *668*, 193–203. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.454

Zhu, L., Lian, Y., Lin, D., Huang, D., Yao, Y., Ju, F., & Wang, M. (2022). Insights into microbial contamination in multi-type manure-amended soils: The profile of human bacterial pathogens, virulence factor genes and antibiotic resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, *437*, 129356. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129356

Zhu, Y.-G., Gillings, M., Simonet, P., Stekel, D., Banwart, S., & Penuelas, J. (2017). Microbial mass movements. *Science*, *357*(6356), 1099–1100. https://doi.org/10.1126/science.aao3007

Zhu, Y.-G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., Capon, A., & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. *Environment International*, *131*, 105059. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059

Tao, S., Chen, H., Li, N., Wang, T., & Liang, W. (2022). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale*, *2022*, 3348695. https://doi.org/10.1155/2022/3348695

Telatin, A., Fariselli, P., & Birolo, G. (2021). SeqFu: A Suite of Utilities for the Robust and Reproducible Manipulation of Sequence Files. *Bioengineering*, *8*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/bioengineering8050059

Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, *6*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5

Vandecraen, J., Chandler ,Michael, Aertsen ,Abram, & and Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(6), 709–730. https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661

Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary World*, 743–749. https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.743-749

Volkova, V. V., Lu, Z., Besser, T., & Gröhn, Y. T. (2014). Modeling the Infection Dynamics of Bacteriophages in Enteric Escherichia coli: Estimating the Contribution of Transduction to Antimicrobial Gene Spread. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(14), 4350–4362. https://doi.org/10.1128/AEM.00446-14

von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173

Walsh, T. R., & Wu, Y. (2016). China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(10), 1102–1103. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30329-2

Wang, M., Zhao, J., Liu, Y., Huang, S., Zhao, C., Jiang, Z., Gu, Y., Xiao, J., Wu, Y., Ying, R., Zhang, J., & Tian, W. (2024). Deciphering soil resistance and virulence gene risks in conventional and organic farming systems. *Journal of Hazardous Materials*, *468*, 133788. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133788

Wang, R., Zhang, J., Sui, Q., Wan, H., Tong, J., Chen, M., Wei, Y., & Wei, D. (2016). Effect of red mud addition on tetracycline and copper resistance genes and microbial community during the full scale swine manure composting. *Bioresource Technology*, *216*, 1049–1057. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.012

Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, *20*(1), 257. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0

Xiao, R., Huang, D., Du, L., Song, B., Yin, L., Chen, Y., Gao, L., Li, R., Huang, H., & Zeng, G. (2023). Antibiotic resistance in soil-plant systems: A review of the source, dissemination, influence factors, and potential exposure risks. *Science of The Total Environment*, *869*, 161855. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161855

Xie, W.-Y., Shen, Q., & Zhao, F. J. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review. *European Journal of Soil Science*, *69*(1), 181–195. https://doi.org/10.1111/ejss.12494

Xie, W.-Y., Yuan, S.-T., Xu, M.-G., Yang, X.-P., Shen, Q.-R., Zhang, W.-W., Su, J.-Q., & Zhao, F.-J. (2018). Long-term effects of manure and chemical fertilizers on soil antibiotic resistome. *Soil Biology and Biochemistry*, *122*, 111–119. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.009

LISAD

Lisa 1. Tabel proovide andmetega. Iga proovi kohta on välja toodud selle isoleerimise koht, viljelusviis ja seal kasvatatav põllukultuur. Proovi ID näitab ühe sekveneerimise protsessil analüüsitud proovi.

Proovi ID	Kultuur	Proovivõtukoht	Viljelusviis
A001	Nisu	Võrumaa	mahe
A002			
A003		Võrumaa	intensiiv
A004			
A005		Tartumaa	intensiiv
A006			
A007		Tartumaa	mahe
A008			
A009		Harjumaa	intensiiv
A010			
A011		Raplamaa	intensiiv
A012			
A013		Raplamaa	mahe
A014			
A015		Raplamaa	mahe
A016			
A017		Viljandimaa	intensiiv
A018			
A019		Jõgevamaa	intensiiv
A020			
A021		Jõgevamaa	mahe
A022			
A023	Lutsern	Ida-Virumaa	mahe
A024		Lääne-Virumaa	looduslik rohumaa
A025		Harjumaa	looduslik rohumaa
A026		Raplamaa	looduslik rohumaa
A027		Raplamaa	intensiiv

A028		Jõgevamaa	intensiiv
A029		Jõgevamaa	intensiiv
A030		Järvamaa	intensiiv
A031		Valgamaa	mahe
A032		Jõgevamaa	mahe
A078		Ida-Virumaa	mahe
A079		Lääne-Virumaa	looduslik rohumaa
A033	Raps	Harjumaa	intensiiv
A034			
A035		Harjumaa	intensiiv
A036			
A037		Raplamaa	mahe
A038			
A039		Viljandimaa	intensiiv
A040			
A041		Jõgevamaa	intensiiv
A042			
A069		Võrumaa	mahe
A070			
A071		Võrumaa	mahe
A072			
A073		Võrumaa	mahe
A074			
A075		Võrumaa	mahe
A076			
A068		Võrumaa	intensiiv
A077			
A043	Porgand	Harjumaa	intensiiv
A044		Jõgevamaa	intensiiv
A045		Võrumaa	intensiiv
A049			
A047			
A048		Võrumaa	intensiiv

A051			
A050		Võrumaa	mahe
A053			
A052		Valgamaa	mahe
A054			
A046		Võrumaa	mahe
A055			
A056		Tartumaa	mahe
A057			
A058		Tartumaa	intensiiv
A059			
A060		Jõgevamaa	intensiiv
A061			
A062		Tartumaa	intensiiv
A063			
A064		Viljandimaa	mahe
A065			
A066		Jõgevamaa	mahe
A067			

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaur Reidma

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose "Antibiootikumiresistentsuse ja mikroobikoosluse uurimine Eesti mahe- ja intensiivpõllumajanduse muldades", mille juhendaja(d) on Reidar Anderson ja Liina Kuus reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commonsi 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.

Kaur Reidma
25.05.2025