

TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUM

HANNA MARTA NELLIS

12.A KLASS

# **TSIPROFLOKSATSIINI LÜHIAJALINE MÕJU BAKTERITE ÜLDARVULE REOVEEPUHASTUSE MUDELSÜSTEEMIS**

JUHENDAJA LAURI MÄLLO

## **SISSEJUHATUS**

Uurimistöö teemavalikul sai otsustavaks teema aktuaalsus. Üha rohkem räägitakse antibiootikumide mõjust looduskeskkonnale ja suurenevast antibiootikumiresistentsusest, millest on saanud oluline globaalne probleem. Alates esimese antibiootikumi avastamisest on neil ravimitel olnud tähtis roll loomade ja inimeste ravimisel erinevatest bakteriaalsetest haigustest. Antibiootilised ühendid satuvad põllumajanduse ja inimeste kaudu reovette. Loomakasvatuses kasutatavad suured antibiootikumikogused viivad uute resistentsete bakterite tekkeni ning need võivad levida edasi ka inimestele. Mitmed mainekad organisatsioonid (Maailma Terviseorganisatsioon, ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon ja Maailma Loomaterviseorganisatsioon) on välja töötanud tegevuskava mikroobide antibiootikumiresistentsuse vähendamiseks. (Aasmäe, 2016)

Teisalt on keskkonnasäästliku reoveekäitlemise üks aluseid bioloogiline puhastus, milles mängivad olulist rolli bakterid, kelle elutegevuse tulemusena väheneb heitvee keskkonnaohtlikkus. Kuna reovette satub üha enam antibiootilisi ühendeid, siis on tõenäoline, et need mõjutavad reoveepuhastites elavate bakterite elutegevust. Kõrvutades kaht eelnevat fakti – suurenenud antibiootiliste ühendite hulka reovees ning reoveepuhasti tööd –, soovis autor uurimistöö käigus analüüsida, kuidas mõjutab reovette sattunud antibiootikum vee puhastamist.

Töö eesmärk oli luua mudelsüsteem, mille abil saaks hinnata konkreetse antibiootikumi (tsiprofloksatsiini) mõju kindla bakteritüve üldarvule sünteetilises reovees selle puhastamise käigus. Juhul kui mõju üldarvule on selgelt olemas, siis hinnata ka reoveepuhasti töö efektiivsuse muutust selle mõju taustal.

Töö peamine raskuskoht oli välja selgitada kõik segavad faktorid (näiteks temperatuur, hapniku juurdevool, jääkainete kuhjumine, bakterikooslus), mis võivad antud mudelsüsteemi ja töö tulemusi mõjutada. Tsiprofloksatsiin valiti, sest see on teadaolevalt üks antibiootikum, mille

suhtes on reovees palju tundlikke baktereid ehk siis resistentsus on pigem vähestel bakteritüvedel (Asi, 2020).

Uurimistöös üks peamisi allikaid oli Euroopa Ühenduse direktiiv 1982. aastast, kust saadi sünteetilise reovee retsept. Lisaks kasutati Kristo Kärmase (2012) esitlust reoveest ning selle puhastamisest, teost „Meditiiniline mikrobioloogia I osa“ ja artiklit „Ravimijääd looduskeskkonnas“.

Töö ettevalmistamisel püstitati hüpotees, mille järgi tsiprofloksatsiini sattumine reoveepuhastisse vähendab kasutatava bakteritüve üldarvukust reoveepuhastis lühiajaliselt ning kõrgema antibiootikumikontsentratsiooni korral on mõju arvukusele suurem. Seeläbi väheneb puhasti töö efektiivsus. Siinses töös mõeldakse termini lühiajaline all üht nädalat ehk uurimistöös tarbeks tehtud katse pikkust.

Töö autor tänab oma juhendajat Lauri Mällot nõuannete ja abi eest katsevahendite soetamisel ning Marta Putrinšit nõuannete ja võimaluse eest kasutada Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi laborit ja katsevahendeid bakterite külvamisel ja inkubeerimisel.

# SISUKORD

SISSEJUHATUS .....	1
1. REOVESI JA SELLE PUHASTAMINE.....	4
2. BIOPUHASTID JA MIKROOBNE BIOPUHASTUS.....	5
3. ANTIBIOOTIKUMID .....	6
3.1. Tsiprofloksatsiin.....	8
4. KATSEKESKKONNA ETTEVALMISTAMINE JA EKSPERIMENT .....	10
4.1. Katsekeskkonna loomine ja proovikatsed.....	10
4.1.1. LB söötme hindamine, külvide lahjendused ja sobiv bakterikultuur.....	10
4.1.2. Sobiva antibiootikumi valimine.....	12
4.1.3. Mudelsüsteemi kokkupanek .....	13
4.2. Põhikatse läbiviimine.....	16
5. TSIPROFLOKSATSIINI MÕJU BAKTERITE ARVUKUSELE.....	19
KOKKUVÕTE .....	24
ABSTRACT .....	25
KASUTATUD MATERJALID.....	27
LISAD .....	30
Lisa 1. Veeanalüüside tulemused.....	30

# 1. REOVESI JA SELLE PUHASTAMINE

Reovesi on olmes või tootmises rikutud vesi, mille füüsikalised või keemilised omadused on võrreldes esialgsega muutunud. Reovesi jaguneb olemereoveeks, tootmisreoveeks ja sademeveeks. (Masing, 1992, lk 217)

Reoveepuhastus jaguneb nelja etappi. Esimene reovee puhastamise etapp on mehaaniline puhastamine. Mehaaniline puhastus on suuremate lahustumatute osakeste eemaldamine. Selleks kasutatakse erinevaid võresid, sõelasid, setiteid ja liivapüüniseid. Teine reovee puhastamise etapp on bioloogiline puhastus. Bioloogiline puhastus tähendab, et orgaanilisi aineid lagundavad mikroobid. See toimub nii aeroobses, anaeroobses kui ka anoksilises ehk hapnikuvabas keskkonnas (hapnik võib esineda keemilistest ühendites). (Kärmas, 2012)

Kolmas reovee puhastamise etapp on keemiline puhastus. Keemilise puhastuse käigus sadestatakse lahustunud ained välja kemikaalide abil. Levinum on fosforiühendite sidumine raua- ja alumiiniumisoolade abil. (Kärmas, 2012) Järeldpuhastus on viimane reovee puhastamise etapp. Selles etapis kasutatakse enamasti biotiike ja liivafiltreid. Biotiikide ülesanne on vähendada jääkreostust ja vähendada seejuures näiteks veetaimestiku abil fosfori ja lämmastiku sisaldust reovees. „Järeldpuhastusega põhipuhasti tõhusus on parem kui puhastitel, mis toimivad ilma järeldpuhastuseta.“ (Loigu, 2011)

Asulates juhitakse olmereovesi ja tootmisreovesi veepuhastusjaamadesse, kus see puhastatakse. Peale reovee puhastamist on reoveest saanud heitvesi, mis juhitakse suublasse. Tavaliselt on suublaks looduslik veekogu. (Ader, Tartes, 2014)

Reostusnäitajate piirväärtused sõltuvad reovee liigist, reoveekogumisala reostuskoormusest ja suubla seisundist. (Reovee..., 2012) Välja on antud heitvee reostusnäitajate piirväärtused, kus saab vaadata reoveekogumisala reostuskoormusest ja reostusnäitajast lähtuvalt reoveele kehtestatud piirväärtusi (Heitvee..., 2012).

Puhastamata reovesi on oht keskkonnale. Esiteks sisaldab reovesi keemilisi puhastusaineid, mis looduslike protsesside tagajärjel piisavalt kiiresti ei lagune ning selletõttu on puhastamata reovesi oht ka põhjavee puhtusele. Teine oht on pinnaveekogude kinnikasvamine, mida põhjustavad taimedele olulised toitained, peamiselt fosfor. (Maastik, 2009) Üha suurenev probleem on ka ravimijääkide sattumine reovette ning seeläbi looduskeskkonda. Aastal 2011 tehtud uuringu tulemusena leidis nii Tallinna kui ka Taru reoveesetetes ravimijääke, nende hulgas ka tsiprofloksatsiini (Haiba jt, 2016).

## 2. BIOPUHASTID JA MIKROOBNE BIOPUHASTUS

Uurimistöös kasutati reovee puhastamiseks biopuhasti vähendatud mudelsüsteemi. Biopuhastis puhastavad vett bioloogilised protsessid ehk enamasti on tegemist bakteritega (Bollverk 2009). Biopuhastis püütakse luua olukord, kus baktereid kandvat pinda on võimalikult palju ning bakteriaalne ainevahetus on kiirem ja intensiivsem kui looduses. See tagab saasteaine kiirema lagundamise. (Bollverk, 2009; Mida...; Millal...)

Biopuhastite eelis on nende keskkonnasäästlikkus. Need ei kasuta keemilisi aineid ja ei tekita müra. Biopuhastid töötavad kõikide ilmastikutingimustega ja puhastatud vett võib kasutada tehnilise veena. (Biopuhasti..., 2017)

Reoveepuhastuse tehnikad jaotatakse bioloogiliste protsesside järgi ehk vastavalt sellele, kuidas reovett mikroobidega puhastatakse. Üldiselt jaotatakse tehnikad aeroobseteks ja anaeroobseteks vastavalt sellele, kas süsteemis on oluline hapniku juurdevool või mitte (Kärmas, 2012).

Anaeroobseks töötuseks nimetatakse orgaanilise aine lagunemist lahustunud hapniku puudumisel. Anaeroobses keskkonnas laguneb orgaaniline aine järgnevalt: orgaaniline aine +  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2 + \text{biomass}$ . (Kärmas, 2012)

Aeroobne töötus on reoainete lagundamine hapnikurikkas keskkonnas. Aeroobses keskkonnas laguneb orgaaniline aine järgnevalt: orgaaniline aine +  $\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{biomass}$ . (Kärmas, 2012)

Biopuhastis lagundamisprotsesse läbiviivatele mikroobidele on ohtlikud otseselt toksilised ained ning kemikaalid, mis pärsivad bakterite elutegevust. Viimaste hulka kuuluvad näiteks naftaproduktid, paljud pesuvahendid ja kindlasti ka ravimijääd, nende hulgas antibiootikumid.

### 3. ANTIBIOOTIKUMID

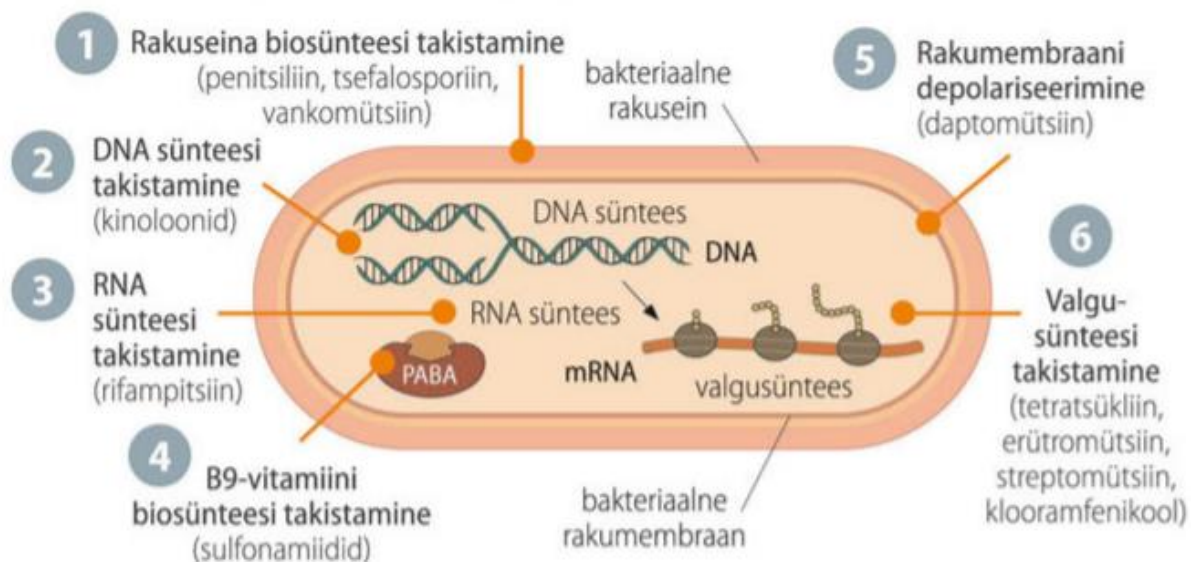
Esimene antibiootikum (penitsilliin) avastati aastal 1928. Peaaegu kõik tänapäeval kasutatavad antibiootikumid on avastatud 1970ndatel. Hilisemal ajal on antibiootikume avastatud väga vähe. Selle põhjuseks on antibiootikumi väljatöötamise keerukus (patsiendi manustatud antibiootikum peab organismis jõudma õigesse kohta ega tohi olla mürgine). Lisaks võtab uue antibiootikumi väljatöötamine palju aega ning on sageli kulukas. (Few...)

Antibiootikumid on mikroobe hävitavad või nende elutegevust pärssivad ained (Masing, 1992, lk 18). Kuna reovees on bakterid, siis võib järeldada, et antibiootikumid mõjuvad ka nende elutegevust pärssivalt või neid hävitavalt.

Antibiootikume kasutatakse laialdaselt, et ravida bakteriaalseid haiguseid nii inimestel kui ka loomadel. Erinevatel antibiootikumidel on erinevad toimetehhanismid (vt joonis 1). „Mikroobidevastase toime järgi jaotatakse antibiootikumid rühmadesse:

- a) põhiliselt grampositiivsele mikrofloorale toimivad,
- b) põhiliselt gramnegatiivsele mikrofloorale toimivad,
- c) nii grampositiivsele kui gramnegatiivsele mikrofloorale toimivad,
- d) põhiliselt seentele toimivad jt antibiootikumid.“

Mida laiema toimespektriga on antibiootikum, seda rohkem kahjustab see organismi normaalset tööd, sest seda rohkem mõjub see ka meie kehas olevatele headele bakteritele. (Allikmets)



Joonis 1. Antibiootikumide toimemehhanismid (Allas, Tenson, 2017)

Antibiootikumide kasutamisel on alati võimalus, et mikroobid muutuvad konkreetse ühendi suhtes resistentseks ehk vastupanuvõimeliseks (Allikmets). Seda soodustab antibiootikumi korduv, ebaõige ja põhjendamatu kasutamine. Resistentsete bakterid võivad kanduda loomadelt inimestele ja vastupidi. (Niitra, 2017). Seepärast on viimasel ajal räägitud üha enam põllumajanduses kasutatavate antibiootikumide profülaktilise kasutamise ja kasutatavate koguste vähendamise kohta. Eestis on viimastel aastatel loomakasvatuse antibiootikumide kasutamine kasvanud. Seetõttu on suurenenud võimalus nende sattumiseks reovette ning seeläbi oht antibiootikumiresistentsuse kasvule. Selle vältimiseks on Euroopa Liit kehtestanud erinevad piirangud. Näiteks ei tohi antibiootikumiravi ajal ja teatud aeg pärast seda loomalt pärit piima, liha ja mune inimeste toiduks kasutada. Kuigi Eestis on antibiootikumide kasutamine loomakasvatuse laialt levinud, on Eesti põllumajandusloomadelt ja lihast võetud mikroobitüvede antibiootikumiresistentsus võrreldes Euroopa Liidu keskmisega väiksem. (Niitra, 2017)

„Reoveesete on reovee puhastuse lõppsaadus, mis sisaldab paljusid reoveest eemaldatud reoaineid.“ (Endjärv jt, 2006) Reoveesetest valmistatakse kompostväetist, mida on lubatud kasutada põllumajanduses, kui see on muudetud ohutuks. Et selgitada välja, kas tehtud kompostväetis on ohutu, tehakse palju analüüse, milles kontrollitakse erinevaid näitajaid. Näiteks analüüsitakse raskmetallide setet ning parasiitusside munade ja kolilaadsete bakterite sisaldust kompostis. Ilmselt jõuavad kasutatavad antibiootikumid muuhulgas reovette ja sellest tekkivasse settesse, kuid antibiootikumijääkide sisaldust reovees ei kontrollita. Kuigi maal, kus on reoveesete kompost, pole lubatud kasvatada aasta jooksul muid toidutaimi kui teravilja, ei muutu antibiootikumijääkide sisaldus kompostis olematuks. (Haiba jt, 2012)

Euroopa Ravimiamet (edaspidi EMEA/CVMP) soovib ravimisisalduse piirnormiks vees 10 ng/l, kuid Euroopa Liidu teaduskomitee toksikoloogia, ökotoksikoloogia ja keskkonna küsimustes ning Euroopa Liidu juhtiv teaduskomitee soovib piirnormiks 0,4 ng/l. Eestis tehti teadusuuring, mille käigus hinnati ravimijääkide sisaldust kompostis, milles selgus, et nii Tartu kui ka Tallinna reovees ületas fluorokinoloonide (rühm antibiootikume) sisaldus EMEA/CVMP soovitatavat piirnormi mitu korda. (Haiba jt, 2012; Lillenberg, 2011)

Reoveepuhastusjaamad ei suuda eemaldada reoveesettest kõiki ravimijääke, mistõttu satuvad ravimijäägid looduskeskkonda. Sellel on väga suur mõju mikroorganismidele, taimedele, loomadele ja toiduahela kaudu isegi inimestele. Antibiootikumid mõjutavad mikroorganismide elutegevust ja aktiivsust, samuti taimede ning loomade kasvu ja arengut. (Haiba jt, 2016)

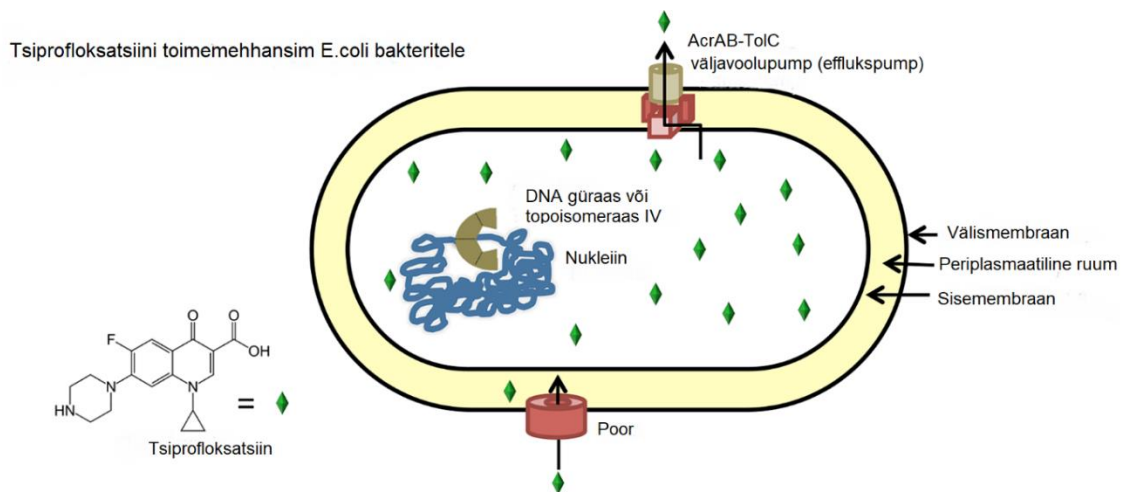
### **3.1. Tsiprofloksatsiin**

Tsiprofloksatsiin kuulub kinoloonide (siin ja edaspidi kinoloonid) hulka. Kinoloonid on sünteetilised antibiootikumid, mis on nalidiksiinhappe ja oksoliinhappe derivaadid.

Tsiprofloksatsiini sisaldavaid ravimeid kasutatakse nii laste kui ka täiskasvanute erinevate bakteriaalsete infektsioonide raviks. Levinumad neist on hingamisteede, kõrva või ninakõrvalkoobaste kauakestvad või korduvad infektsioonid ning kuseteede infektsioonid. Tsiprofloksatsiini sisaldavatel ravimitel pole täpset kogust ega perioodi, millal ravimit võtma peab. Ravi sõltub infektsiooni tüübist ja raskusest. (Ciprofloxacin...)

Kinoloonid on bakteritsiidse toimega preparaadid, mis seostuvad mikroobi DNA güraasiga ja vähendavad selle kiirust, hoides ära DNA keerdumise ja replikatsiooni (vt joonis 2). Samas ei pärsi kinoloonid loomsete rakkude elutegevust. Tsiprofloksatsiin on uuem ja laia toimespektriga antibiootikum, mis on efektiivne nii grampositiivsetele kui ka gramnegatiivsete mikroorganismide suhtes. (Mikelsaar jt, 2006: 127)





Joonis 2. Tsiprofloksatsiini toimemehhanism *E. coli* bakteritele (Conley jt, 2018)

Kinoloonide resistentsus võib tekkida mitmel viisil. Neist levinumad on resistentsus DNA güraasi mutatsioonide tõttu ning raku välismembraani läbilaskvuse vähenemise või väljavoolupumpade üleekspressiooni korral. (Mikelsaar jt, 2006, lk 127)

Tsiprofloksatsiini resistentsus võib bakteritel tuleneda sellest, et rakk on võimeline spetsiifiliste väljavoolupumpade kaudu antibiootikumi rakust välja pumpama (vt joonis 1). On teada, et juhul kui antibiootikumi on keskkonnas olemas või selle hulk tõuseb, siis tekib selliseid väljavoolupumpasid juurde ja antibiootikumi mõju mikroobidele on selle tõttu piiratud.

## 4. KATSEKESKKONNA ETTEVALMISTAMINE JA EKSPERIMENT

### 4.1. Katsekeskkonna loomine ja proovikatsed

Selleks, et uurida tsiprofloksatsiini mõju bakterite üldarvule sünteetilise reoveepuhastuse mudelsüsteemis, oli vaja

- a) leida reovees vastupidavad ja n-õ toimivad bakterid, kelle arvukust saab jälgida LB (Luria–Bertani) söötmel kasvatades;
- b) leida antibiootikum, millel oleks kasutatavale bakterile mõju ehk siis bakter ei tohi olla resistentne;
- c) tagada mudelsüsteemis püsiv temperatuur;
- d) tagada mudelsüsteemis hapniku (õhu) pidev pealevool;
- e) tagada jääkainetena tekkiva süsihappegaasi eraldumine süsteemist;
- f) tagada katse jooksul aurunud vee koguse kompenseerimine;
- g) luua bakterikülvide jaoks vajalike proovide võtmise võimalus.

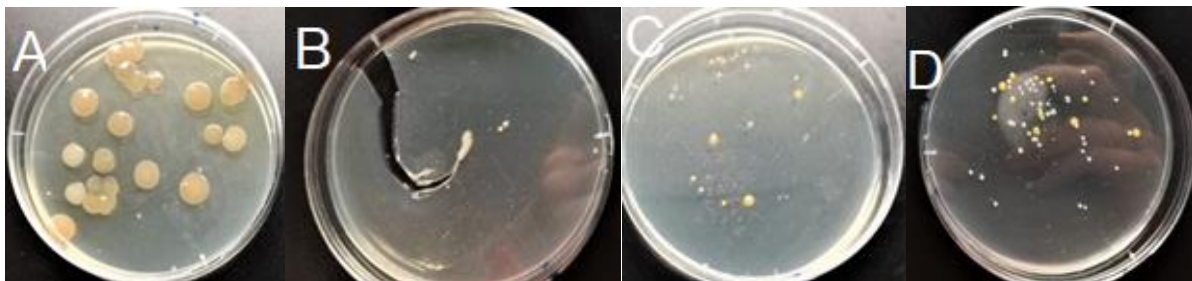
#### 4.1.1. LB söötme hindamine, külvide lahjendused ja sobiv bakterikultuur

Esimene proovikatse oli bakterite suhtelise arvukuse hindamine veekülvist. Katse tehti selleks, et vaadelda, kas ja kui paljud vees elavad bakterid lähevad LB söötmel kasvama. Siinses töös kasutati LB söödet, kuna see on mikrobioloogias laialt kasutatav universaalsööde ning see on kergesti kättesaadav. Katses hinnati, millise lahjendusega tuleb teha külvid põhikatsetes, et kolooniaid oleks võimalik loendada. Väljakülvid tehti LB söötmetele (200 µl) akvaariumiveest eeldusel, et seal on baktereid, mida on ka tavalises reovees. Pärast väljakülvide tegemist inkubeeriti külve 14 päeva toatemperatuuril ning hinnati erinevate kolooniate tekkimise kiirust. Selline meetodika, kus bakterite suhtelist arvukust hinnatakse CFU<sup>1</sup> abil, annab võimaluse bakterite suhtelise arvukuse võrdlemiseks, kuid ei võimalda hinnata bakterite üldarvukust vees.

---

<sup>1</sup> CFU (*Colony forming unit*) ehk kolooniaid moodustav ühik. Üks koloonia on üks ühik.

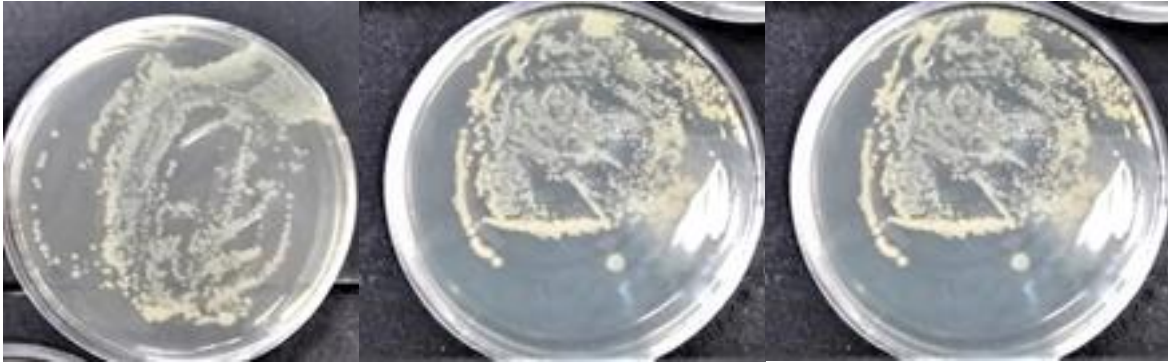
Tulemuste põhjal otsustati, et LB sööde sobib vees elavate bakterite kasvuks ning esialgu otsustati, et külvid peavad olema lahjendusega 1 : 1000, sest sellises lahjenduses oli kolooniate arv kõige paremini loendatav (vt joonis 3). Põhikatses mindi üle 5 µl suurustele kogustele ning külvid tehti täpsuse huvides kõigi lahjenduste kohta (lahjendust pole ja 10<sup>1</sup>–10<sup>6</sup>). Joonisel 3 on näha, et söötmel B ei moodustanud bakterid kolooniaid. Põhjus võis olla selles, et valmistatud lahjenduses ei leidunud piisavalt baktereid.



Joonis 3. Bakterite suhtelise arvukuse hindamine. Lahjendust pole (A), lahjendus 1 : 10 (B), lahjendus 1 : 100 (C) ja lahjendus 1 : 1000 (D) (autori foto).

Katses kasutatavaks bakterikultuuriks otsustati võtta akvaariumi veepuhastussüsteemides kasutatav bakterikultuur, milleks oli JBL FilterStart. See on preparaat, mida kasutatakse akvaristikas biofiltrite starteri ehk käivitajana. Preparaat tagab uue akvaariumi puhastussüsteemi kiirema käivitumise.

Järgmisena tehti valitud bakterikultuurist väljakülv LB söötmele, et hinnata söötme sobivust. Väljakülve inkubeeriti toatemperatuuril neli ööpäeva, mille jooksul kontrolliti tasse iga 24 tunni järel. Jälgides kolooniate kasvu otsustati, et toatemperatuuril inkubeerimiseks piisab neljast ööpäevast, kuna pikema inkubatsiooniaja jooksul hakkasid kolooniad omavahel kokku kasvama ning nende loendamine oli raskendatud. Katses tehti kolm paralleelset väljakülvi, mis kõik läksid ka kasvama (vt joonis 4). Katse tulemustest järeldati, et väljavalitud baktereid saab uurimistöös kasutada. Hiljem, kui kasutada sai termokappe, kus külve hoiti 36 °C juures, piisas 24 tunni pikkusest inkubatsiooniajast.



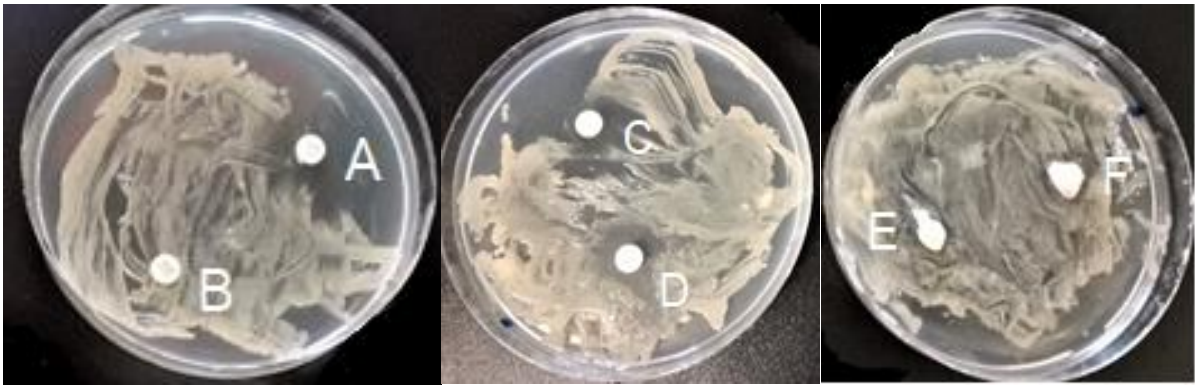
Joonis 4. Bakterite väljakülvid – kolm paralleeli, millega hinnati, kas kasutatav bakter kasvab LB söötmele (autori foto). Igale söötmele külvati 200 µl bakterikultuuri.

#### 4.1.2. Sobiva antibiootikumi valimine

Valitud bakteri antibiootikumiresistentsuse hindamiseks tehti valitud bakterikultuurist puhaskülvid LB söötmele. Külvidele lisati antibiootikumid. Katses kontrolliti viie antibiootikumi efektiivsust – amoksitsilliini, tsiprofloksatsiini, gentamütsiini, streptomütsiini ja karbenitsilliini. Neist neljal viimasel kasutati antibiootikumiga immutatud paberdiske. Amoksitsilliin oli tabletikujul, see purustati ja segati destilleeritud veega. Antibiootikumide valimisel sai otsustavaks nende kättesaadavus ja laialdane kasutamine. Väljakülve inkubeeriti kolm päeva toatemperatuuril.

Antibiootikumi efektiivsust näitab söötmele olevale külvile asetatud diski või lahuse ümber tekkiv ala, kus bakterid ei saa paljuneda. Mida suurema diameetriga ring ümber antibiootikumi tekib, seda rohkem pärsib see bakterite paljunemist. Töös ei hinnatud otseselt antibiootikumi efektiivsust, oluline oli leida antibiootikum, mille suhtes ei oleks kasutatav bakter resistentne.

Tulemused (vt joonis 5) näitasid, et ei saa kasutada amoksitsilliini ning karbenitsilliini, sest nimetatud antibiootikumid ei olnud piisavalt efektiivsed. Tsiprofloksatsiinil, streptomütsiinil ja gentamütsiinil oli mõju bakteri kasvule olemas. Marta Putrinši soovitusel võeti viimastest kasutusele tsiprofloksatsiin, sest kõnealune antibiootikum on laia toimespektriga ning selle suhtes on vähem resistentseid bakteritüvesid ka reovees (Asi, 2020).



Joonis 5. Antibiootikumide efektiivsuse hindamine. Tsiprofloksatsiin (A), karbenitsilliin (B) streptomütsiin (C), gentamütsiin (D) ja amoksiitsilliin (E,F) (autori foto).

#### 4.1.3. Mudelsüsteemi kokkupanek

Selleks, et katsed oleks võimalik lihtsate vahenditega koolitingimustes teostada, püüti valida vahendid, mis on kättesaadavad ja ei ole kuigi kulukad. Katseseade koosnes liivavannist, kompressoritest, kummist korkidest, voolikutest, sulguritest ning kolbidest (vt foto 1).

Katses oli väga oluline hoida terve katse vältel temperatuuri ühtlaselt 30 °C juures. Selleks kasutati kahte liivaga täidetud firma J.P Selecta liivavanni, mille võimsus on 2300 W. Liivavannide sisse mahtus kokku kaksteist kolbi, igasse kolbi pandi 275 ml vett.

Kolbidesse ei tohtinud sattuda baktereid õhust. Selleks pandi igale kolvile peale kahe auguga kork, et juhtida kolbidesse hapnik ja neist välja ainevahetuse käigus tekkivad gaasid. Õhk juhiti kolbidesse kummist voolikutega kompressorite abil, mis olid firmadelt Marina (Marina Durchlüfterpumpe 100) ja Resun (Air pump AC-2000 ja AC-500). Voolikute vahele pandi sulgurid, et tagada ühtlane õhu juurdevool kõigis kolbides. Liigsed gaasid eraldusid vesiluku kaudu. Kummist korgi ja kolvi ühenduskohad tihendati plastiliiniga, et korgi ja kolvi vahelt ei satuks kolbidesse ümbritsevast keskkonnast mikroobe. Kord päevas lisati kolbidesse destilleeritud vett, et hoida vedeliku tase ühtlasena. Süsteemi puuduseks on kompressorite väga kesine filtersüsteem, mis ikkagi viis katsekeskkonda ka õhus olevaid mikroobe, kuid koolitingimustes paremat lahendust ei leitud. Põhikatses eeldati varasematele kogemustele toetudes, et õhus olevad bakterid kasvavad LB söötmel välja pigem aeglasemalt kui kasutatava bakterikultuuri bakterid, mis vähendab pisut vea suurust kolooniate loendamisel.

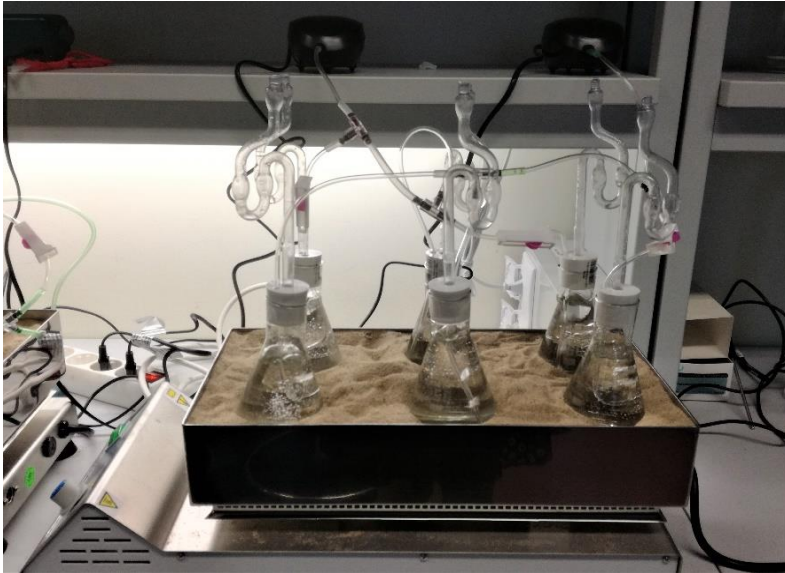


Foto 1. Katseseade (autori foto)

#### 4.1.4. Sünteetilise reovee valmistamine

Siinses töös kasutatakse sünteetilist reovett, et katsetingimused oleks igas katses võrreldavad. Võimalus oli kasutada ka tavalist reovett või akvaariumivett, kuid siis oleks olnud kõigi katsete algtingimused erinevad. Sünteetilises reovees on palju aineid, mida leidub ka tavalises reovees. Proovikatses tehti kaks erinevat reovett, esimene destilleeritud vee ja teine akvaariumivee baasil. Akvaariumivett kasutati võrdlusena, et näha, kas looduslikus vees oleks tulemused erinevad. Akvaariumivesi saadi Jaan Poska Gümnaasiumis olevatest akvaariumidest.

Siinses töös kasutatud sünteetilise reovee retsepti alus oli Euroopa Ühenduse direktiiv 1982. aastast. Reovees tehti mõningaid muudatusi, sest alguses reovees leidis aineid, mida oli raske hankida või analüüsida.

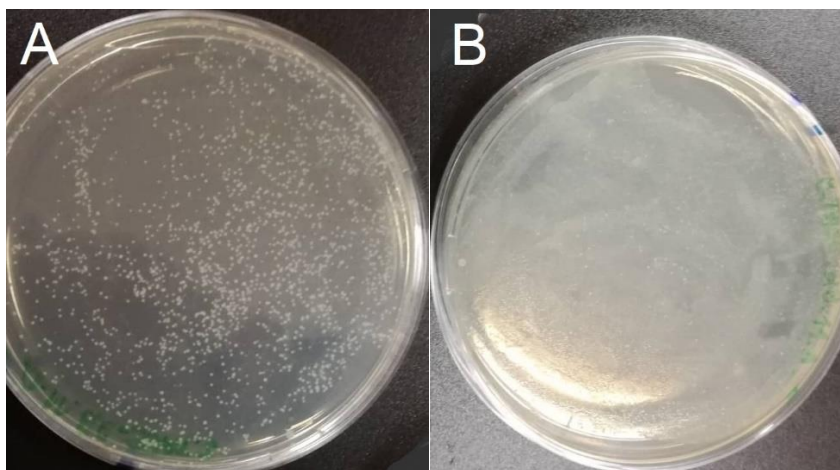
1 liitrile veele lisati:

- 1) 0,18 g tärklist;
- 2) 1,0 g puljongit, millest oli 19% rasv, 16,9% süsivesikud, 5% rasvad ja 55,9% NaCl;
- 3) 1,0 g karbamiidi ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ );
- 4) 0,50 g magneesiumkloriidi ( $\text{MgCl}_2$ );
- 5) 0,50 g ammooniumkloriidi ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ );
- 6) 0,50 g kaltsiumkloriidi ( $\text{CaCl}_2$ ).

Reovee valmistamise järel jagati kumbagi reovett kolme kolbi. Kolbidesse lisati 400 µl kasutatavat bakterikultuuri. Reovesi koos bakteritega pandi katseseadmesse.

Et selgitada, milline on kõige optimaalsem katse kestvus, tehti nelja ja seitsme päeva pärast igast kolvist väljakülv LB söötmele. Esimeses väljakülvis ei tehtud reoveest lahjendusi. Kuna proovikatses, kus külvati kasutatavat bakterit LB söötmele, selgus, et kasutatav bakter moodustab kolooniaid kiiresti, siis otsustati inkubeerida külve 12 tundi 30 °C juures, mis on bakteritele soodne temperatuur. Tassid pandi seejärel külmkappi, et vältida kolooniate ülekasvu. Pärast seitset päeva tehti neli (kaks akvaariumiveest ja kaks destilleeritud veest) külvi lahjendusega 1 : 1000le ja kontrolliks ka kaks külvi lahjenduseeta (mõlemas üks).

Külvidega sooviti hinnata bakterite kasvukiirust. Selleks hoiti lahjenduseeta külve ööpäev toatemperatuuril ja lahjendusega tase 72 tundi 30 °C juures. Selgus, et kasutatav bakter moodustas kolooniaid kiiresti ning ilma lahjenduseeta destilleeritud vee tassidel oli 16 tunni pärast 2000 kolooniat (vt joonis 6). Akvaariumiveest tehtud külvidele tekkis bakteritest tihe kiht, mida ei saanud loendada. Ka lahjendusega 1 : 1000le oli kasvukiirus kiire, kuid 16 tunni pärast moodustunud kolooniate arv oli selgelt väiksem.



Joonis 6. Ilma lahjenduseeta LB söötmed. A (destilleeritud vesi), B (akvaariumivesi) (autori foto)

Katse eel ja järel tehti reoveest veetestid. Hinnati reovee  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , pH, soolsuse ja elektrijuhtivuse muutust (vt tabel 1). Need ühendid valiti, sest lämmastiku- ja fosforiühendid näitavad bakteriaalse ainevahetuse kiirust ning fosforit kasutatavate bakterite elutegevuse intensiivsust. Veeteste tehti JBL veetestidega. Need on tiitrimisel põhinevad värvusreaktsiooni testid, mis näitavad uuritavate ainete ligikaudset hulka vees.

Tabelis on näha, et  $\text{NO}_2^-$  hulk on destilleeritud vees vähenenud, aga akvaariumivees suurenenud. Põhjus võib olla selles, et akvaariumivees on juba varem bakterid, kelle

ainevahetuse tulemusena suureneb  $\text{NO}_2^-$  hulk reovees.  $\text{NO}_3^-$  ja  $\text{PO}_4^{3-}$  sisaldus ja elektrijuhtivus on mõlemas katses vähenenud. Mõlemas katses reovee pH suurenes. Soolsus eriti ei muutunud. Saadud tulemustes hinnati, milliseid veeteste on mõistlike teha põhikatsetes.

Tabel 1. Veeanalüüsid proovikatses. A – akvaariumivee põhjal tehtud reovesi enne puhastamist, B – destilleeritud vee põhjal tehtud reovesi enne puhastamist, C – akvaariumivee põhjal tehtud reovesi pärast puhastamist ja D – destilleeritud vee põhjal tehtud reovesi pärast puhastamist

	A	B	C	D
$\text{NO}_2^-$ (mg/l)	0,05	0,05	0,4	0,03
$\text{NO}_3^-$ (mg/l)	15	1,0	8,3	0,4
$\text{PO}_4^{3-}$ (mg/l)	1,8	0,02	< 0,02	< 0,02
pH	7,66	6,66	7,8	7,6
Soolsus (mg/l)	2666	2370	2759	2314
Elektrijuhtivus ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	4083	4078	3527	3536

Kuna proovikatses oli sooluse ja elektrijuhtivuse muutus minimaalne, siis otsustati neid põhikatsetes mitte analüüsida. Et katse tulemused oleksid selgemad, otsustati sünteetiline reovesi teha destilleeritud vee baasil. Lisaks otsustati, et peale külvamist piisab külvide inkubeerimiseks 24 tunnist, sest bakterite kasvukiirus oli suhteliselt kiire.

## 4.2. Põhikatse läbiviimine

Põhikatse osa, mis hõlmas reoveepuhastust, viidi läbi Tartu Jaan Poska gümnaasiumis ja külvid ning veeanalüüsid tehti Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis. Kokku kestis üks katse ühe nädala. Ühes katses võib eristada kahte faasi – esimene reovee puhastamine ja teine reoveest külvide ja veeanalüüside tegemine.

Kokku tehti neli eksperimenti, kus igas eksperimendis oli kasutusel 12 „reoveekolbi“ (ühes liivavannis olnud kuus samasuguse sisuga kolbi, millest hiljem tehti igaühel kaks väljakülvi LB söötmele). Igas katses kasutati erinevat antibiootikumi kogust. Antibiootikumi kontsentratsioon, mis inhibeerib bakterite kasvu, saadi Marta Putrinšini soovitatud andmebaasist (Antimicrobial...). Viimasest leiti, milline kogus tsiprofloksatsiini mõjub kõige enamatele bakteriliikidele ja tüvedele.



Katsetes kasutatavad tsiprofloksatsiini kogused olid järgmised: esimeses katses antibiootikumi ei olnud, teises katses 0,1 mg/l, kolmandas katses 0,3 mg/l ja neljandas katses 0,6 mg/l kohta.

Kõigepealt valmistati sünteetiline reovesi. Põhikatses asendati proovikatses kasutuses olnud puljongikuubik peptooniga. Selline muudatus otsustati teha, sest algses reovee retseptis oli peptoon, kuid proovikatsete ajal ei olnud see kättesaadav. Lisaks sisaldab peptoon kõiki efektiivseks bakterikasvuks vajalikke toitaineid. Puljongis oli ka liiga palju soolasid ning see võis hoopis bakterite elutegevust pärssida.

Kasutatud sünteetilise reovee retseptis lisati 1 liitrile destilleeritud veele:

- 1) 0,18 g tärklist;
- 2) 1,0 g peptooni;
- 3) 1,0 g karbamiidi ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ );
- 4) 0,50 g magneesiumkloriidi ( $\text{MgCl}_2$ );
- 5) 0,50 g ammooniumkloriidi ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ );
- 6) 0,50 g kaltsiumkloriidi ( $\text{CaCl}_2$ ). (Nõukogu..., 1982).

Valmistatud sünteetiline reovesi valati koonilistesse kolbidesse (275 ml) ja lisati 400  $\mu\text{l}$  kasutatavat bakterilahust. Seejärel lasti reoveel 24 tundi laagerduda, et bakterid saaks kohaneda ning siis lisati vastav kogus antibiootikumi. Seejärel lasti reoveel seista katseseadmes kuus ööpäeva.

Katse teises faasis viidi reovesi Tartu Ülikooli tehnikainstituuti, kus tehti LB söötmele väljakülvid. Selleks valmistati lahjendused, mida oli kokku seitse. Külvamisel pipeteeriti automaatpipetiga LB söötmele ringi kujuliselt erinevate kontsentratsioonidega lahjendused.

Lahjenduste tegemine:

- 1) 0 lahjendus (L0) – ringmeetodil külvati 5  $\mu\text{l}$  reovett automaatpipetiga söötmele;
- 2)  $10^{-1}$  lahjendus (L1) – pandi 10  $\mu\text{l}$  reovett ning 90  $\mu\text{l}$  steriilset füsioloogilist lahust (NaCl 0,8-protsendiline lahus) mikroliiterplaadile, segati ning külvati ringmeetodil 5  $\mu\text{l}$  automaatpipetiga söötmele;
- 3)  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  lahjendused (L2–L6) – võeti eelmisest lahjendusest 10  $\mu\text{l}$  lahust, lisati 90  $\mu\text{l}$  steriilset füsioloogilist lahust, segati ning külvati 5  $\mu\text{l}$  ring automaatpipetiga söötmele.

LB-söötmeid hoiti 24 tundi termokapis 35 °C juures. Temperatuuri tõsteti, sest proovikatsetes oli võimalik kasutada koolis olevaid tingimusi, laboris oli aga võimalik kasutada termokappi. Antud temperatuur on optimaalne enamikele bakteritele. Pärast 24-tunnist inkubeerimist loeti kokku kasvama läinud bakterite kolooniad lahjendustest 3–6 ning mõõdeti nende diameetrid lahjendustest 0–4. Bakterite kolooniate lugemisest jäeti välja väiksemad lahjendused, sest neis olid bakterite kolooniad kasvanud väga lähestikku ning loendamisel oleks tulnud ette rohkem vigu. Diameetrite mõõtmiseks valiti lahjendused, kus bakterite kolooniad olid kõige suurema diameetriga. Saadud mõõtmistulemused kanti tabelisse.

Kohe peale külvamist tehti veeanalüüsid. Et eemaldada reoveest kõik jäägid ja bakterid, tsentrifuugiti reovesi tsentrifuugis, mille tsentrifugaaljõud oli 2844 N. Seejärel mõõdeti pH ja ning tehti  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  ning  $\text{PO}_4^{3-}$  veetestid.

## 5. TSIPROFLOKSATSIINI MÕJU BAKTERITE ARVUKUSELE

Katsete eesmärk oli hinnata, kuidas tsiprofloksatsiini sattumine reoveepuhastisse vähendab kasutatava bakteritüve üldarvukust reoveepuhastis ning kui suur on mõju juhul, kui antibiootikumi kontsentratsiooni tõsta. Töö ettevalmistamisel eeldati, et antibiootikum vähendab kasutatava bakteritüve arvukust ja seeläbi väheneb ka reovee puhastamise efektiivsus.

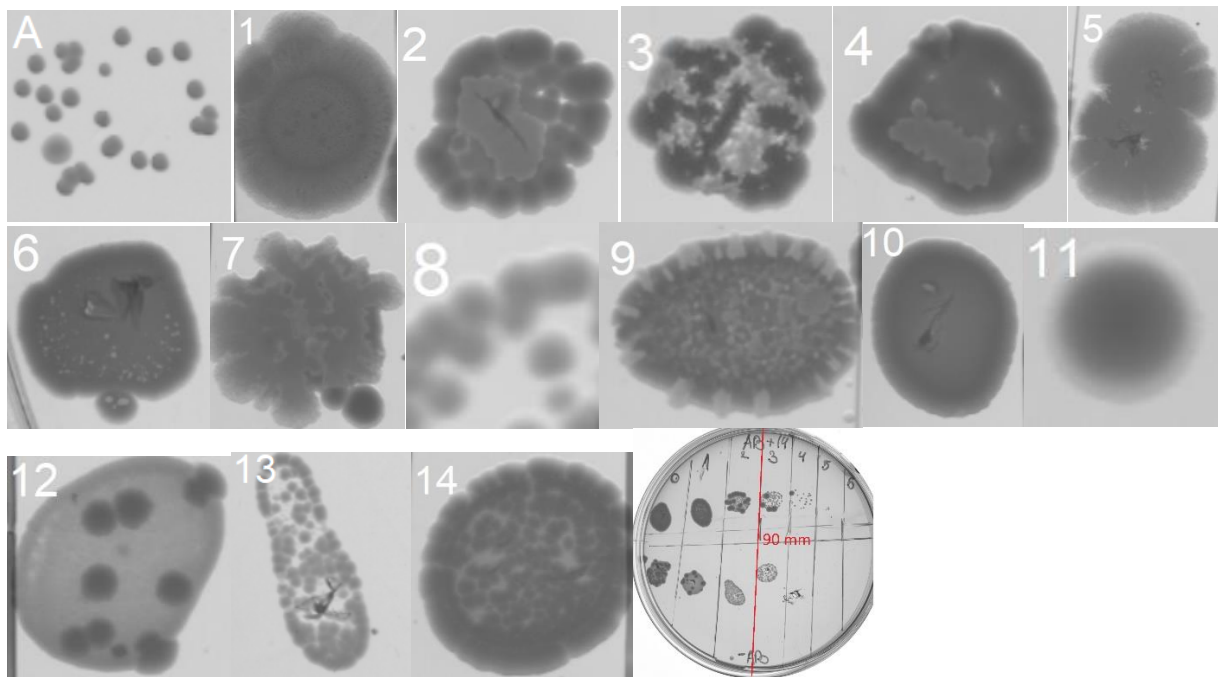
Töö mahtu arvestades keskenduti tulemuste osas esmalt katseseadme kokkupanekule ning kasutatava bakteritüve üldarvu muutustele erinevate antibiootikumi kontsentratsioonide juures.

Kokku tehti neli põhikatset, mis joonistel ja tekstis on tähistatud järgnevalt: AB0 – antibiootikumi reovees ei olnud, AB1 – 0,1 mg/l, AB3 – 0,3 mg/l kogus, AB6 – 0,6 mg/l.

Juba esimeste põhikatsetega oli näha, et katsesüsteemis ei suudeta tagada piisavat steriilsust ja arvestama peab suurema hulga n-ö võõraste bakteritega. Lisaks katses kasutatud bakterikultuurile (edaspidi bakter A) läks kasvama 14 võõrast bakterit (vt joonis 7). Seetõttu püüti andmete analüüsil tulemustele läheneda kahel viisil.

Esmalt otsustati bakterid nummerdada (vt joonis 7) visuaalse vaatluse teel. See viis on väga subjektiivne, kuid siinse töö jaoks paremat lahendust ei olnud. Kuna täpset bakterite määramist ei tehtud, ei saa kindlalt väita, et kõik eraldi vaadeldavad bakterid on erinevad. Sellisel viisil püüti siiski saada ülevaadet sellest, kui mitmekesine on bakterikooslus antud väljakülvides.

Kuigi esmalt oli plaanis analüüsida vaid katses kasutatava bakteri arvukuse muutusi, siis peab tõdema, et võõrad bakterid võisid seda arvukust tugevalt mõjutada, ning hinnangus võib olla ebatäpsusi, mis tulenevad sellest, et loendati ka võõraste bakterite kolooniaid.

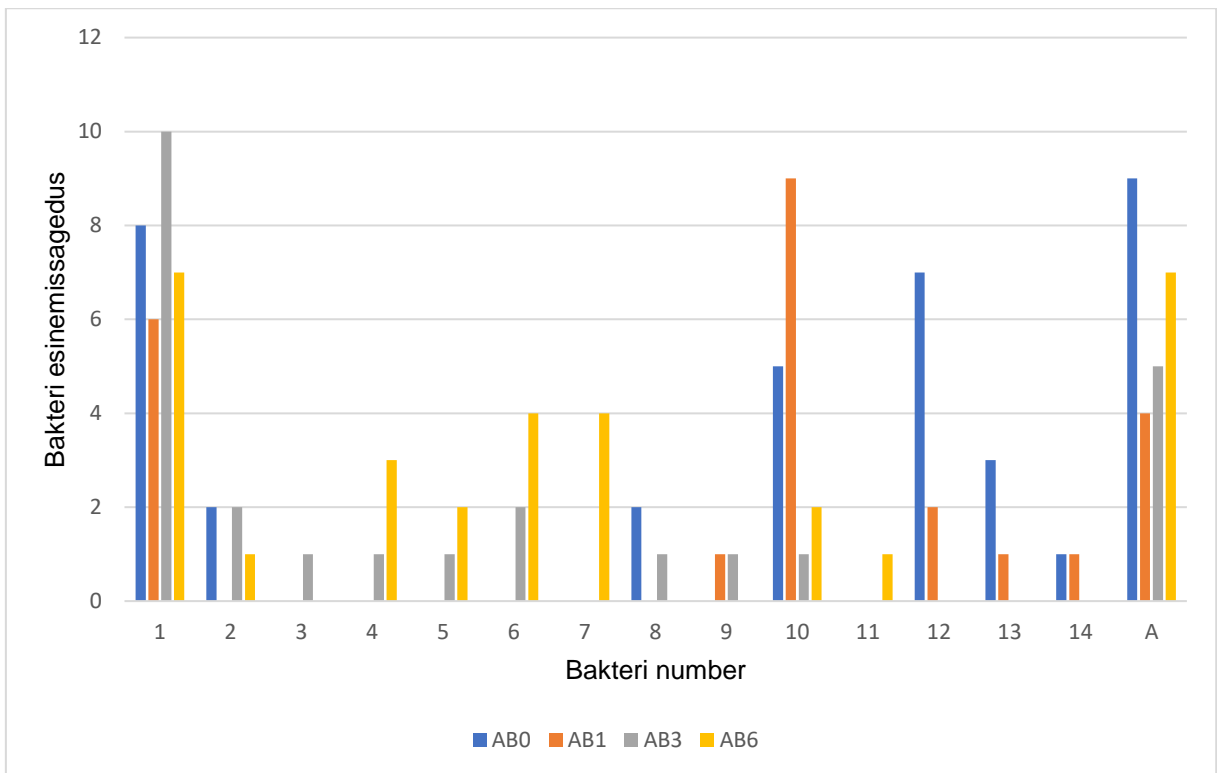


Joonis 7. LB söötmel väljakasvanud erinevad bakterid (autori skaneering)

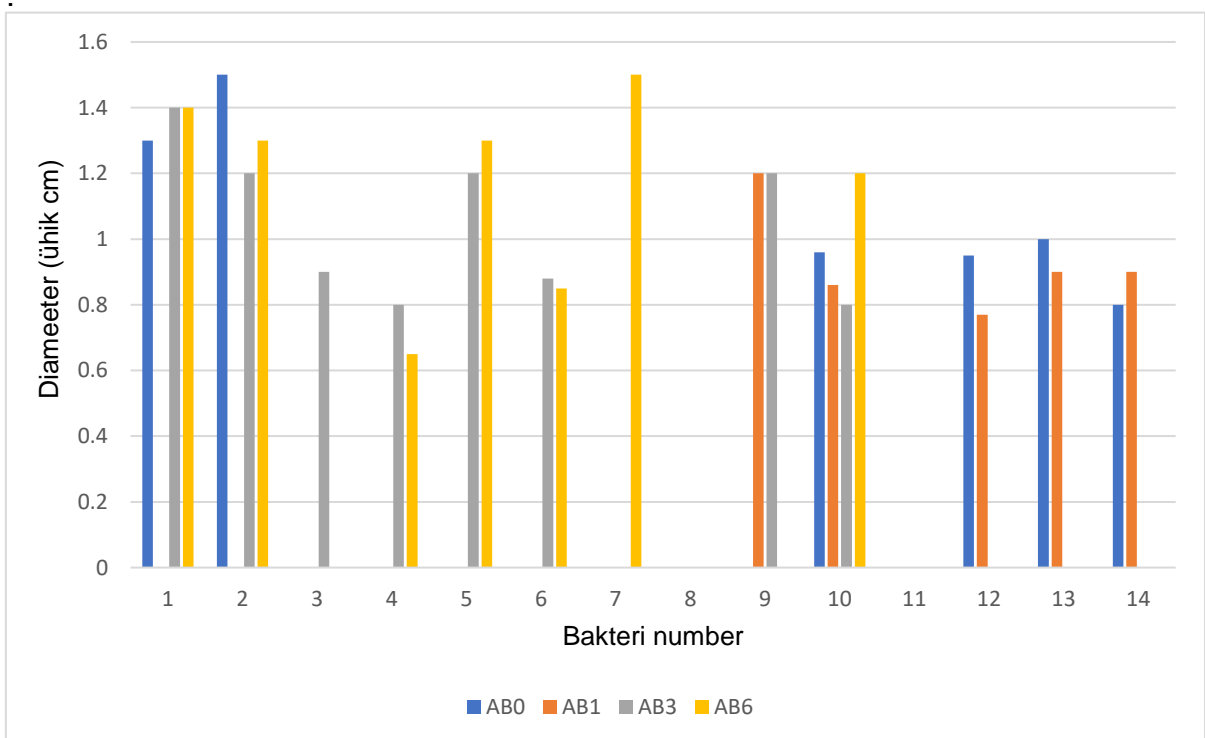
Bakterite loendamiseks kasutati järgmist meetodikat: erinevate bakterite esinemissageduse määramiseks loendati esialgu kõik bakterite kolooniad lahjendustest 3–6, kuid hiljem otsustati arvukuse hinnang kõrvale jätta ning võrrelda erinevaid katseid vaid bakterite esinemise/mitteesinemise järgi. Sellise lähenemise põhjustas see, et erinevate bakterikolooniate suurused olid väga erinevad ning loendamisel ei saanud olla kindel, et paljud kolooniad ei olnud omavahel ikkagi osaliselt kattunud. Maksimaalne võimalik ühe bakteri esinemissagedus oli 12 korda (6 kolbi, kust igast ühest tehti 2 paralleeli).

Bakterikolooniate kasvu intensiivsuse hindamiseks mõõdeti kolooniate diameetrid joonlauaga lahjendustest 0–4. Vaadeldi, millises lahjenduses on antud bakterikoloonia diameeter kõige suurem ning arutati keskmine diameeter. Sellist mõõtmist tehti, et vaadata, kas bakterikolooniad kasvavad antibiootikumideta lahjendustes suuremaks kui antibiootikumidega lahjenduses.

Saadud tulemused on esitatud joonistel 8 ja 9. Jooniselt 9 on jäetud välja bakterid number 8 ja 11 ning kasutatud bakter, kuna nende kolooniate läbimõõdud olid alla 0,1 millimeetri ja hinnangu andmine oli seetõttu veelgi ebatäpsem.



Joonis 8. Bakterite esinemissagedus väljakülvides (maksimaalne sagedus oli 12 ehk bakter esines kõigis väljakülvides). Tähistused on järgnevad: AB0 – antibiootikumi reovees ei olnud, AB1 – 0,1 mg/l, AB3 – 0,3 mg/l kogus, AB6 – 0,6 mg/l.



Joonis 9. Bakterikolooniate keskmised diameetrid. Tähistused on järgnevad: AB0 – antibiootikumi reovees ei olnud, AB1 – 0,1 mg/l, AB3 – 0,3 mg/l kogus, AB6 – 0,6 mg/l.

Joonisel 8 on näha, et katses kasutatava bakteri esinemissagedus oli kõige kõrgem katses AB0, mis on loogiline, arvestades, et antud bakter sai valitud selliselt, et tsiprofloksatsiinil oleks kindlasti mõju. Ka kokku esines AB0 katses kõige rohkem erinevaid baktereid. Lisaks on joonisel 9 näha, et bakterikolooniate diameetrid on üldjuhul suuremad katses AB0 kui katsetes, kus kasutati antibiootikumi. Kuid oli ka bakterikolooniaid, mille keskmine diameeter oli kõige suurem katses AB6. Selle põhjuseks võib olla, et need bakterid olid antibiootikumi suhtes resistentsed. Seega ilma antibiootikumita katses oli bakteritel kõige parem kasvada ja võib eeldada, et biopuhasti toimis kõige paremini.

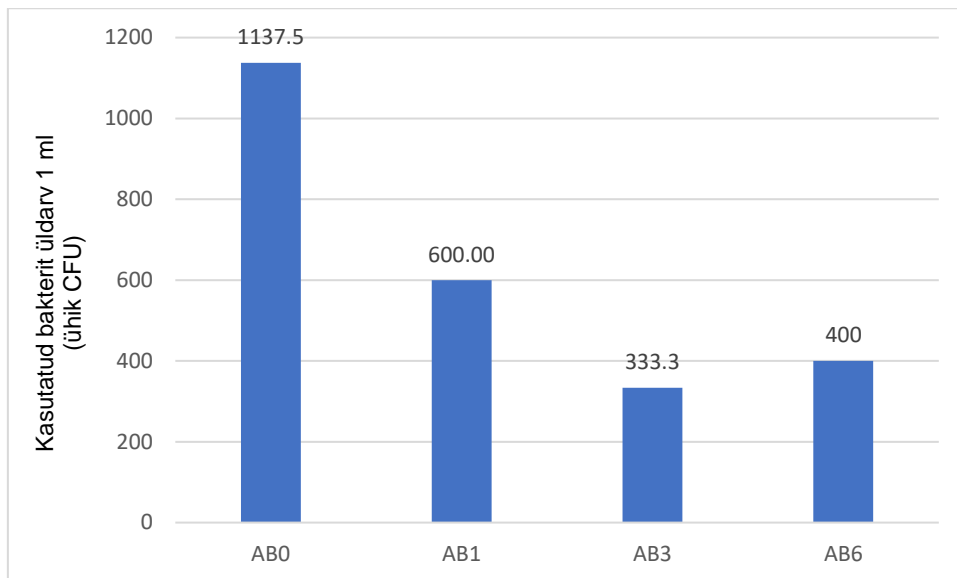
Joonisel 8 on näha, et katses kasutatavat bakterit esines kõige arvukamalt katses AB0. Katses AB6 esines küll kasutatavat bakterit erinevatel lahjendustel, kuid bakterikolooniad oli vähe (AB0-s oli lahjenduses üldiselt üle viie bakterikoloonia, aga lahjenduses AB6 oli üldiselt 1–5 bakterikolooniat), millest võis tulla ka analüüsiviga.

Bakterite mitmekesisus on kõige suurem katsetes AB3 ja AB6. Põhjuseks võib olla, et kasutatav bakter oli antud antibiootikumi suhtes tundlik ehk kasutatav bakter ei pakkunud teistele bakteritele tugevat konkurentsi ja viimased said eelise.

Kuna katsed sooritati kahel erineval ajal (katsed AB0 ja AB1 tehti koos ja katsed AB3 ja AB6 tehti koos), siis võib tulemustest eeldada, et katseseadmesse sattusid samal ajal sooritatud katsetele sarnased bakterid keskkonnast. Katsetel AB0 ja AB1 esinesid bakterid numbriga 3–7 ja katsetel AB3 ja AB6 esinesid bakterid numbritena 9 ja 11–14 (vt joonist 7 ja joonist 8). See omakorda tekitab katse tulemustes veavõimaluse, kuna erinevad bakterid on antibiootikumide suhtes erineva tundlikkusega ja mõjutavad seeläbi ka teiste bakterite arvukust.

Seega tuleb sellise katse puhul edaspidi kindlasti arvestada keskkonnast süsteemi sattuvate bakteritega ja pigem hinnata kogu bakterikoosluse reageerimist antibiootikumile, mitte vaid ühe konkreetse bakteritüve arvukust.

Kuna töö eesmärk oli vaadelda kindla bakteritüve arvukuse muutust erinevatel tsiprofloksatsiini kontsentratsioonidel, siis hinnati kasutatava bakteri üldarvukus kõigis neljas katses (joonis 10).



Joonis 10. Katses kasutatud bakterite üldarv (CFU / 1 ml kohta). Hinnatud lahjenduses 1 : 10<sup>6</sup>. Tulemused saadud arvutuste kaudu.

Jooniselt 10 on näha, et kasutatava bakteri arvukus reovees oli kõige kõrgem, kui antibiootikumi vees ei olnud ja antibiootikumidega katsetes nende bakterite arvukus vähenes. Arvukust hinnati lahjenduses 1 : 10<sup>6</sup> sest seal oli kõige paremini näha kasutatavat bakterit (teiste kasvama läinud bakterite arvukus oli väiksem) ja kasutatavat bakterit oli võimalik kõige paremini loendada (nõrgemate lahjenduste puhul oli kasutatava bakteri arvukus kohati väga kõrge ja loendamisel võis kergemini sisse tulla vigu). Joonise 10 tulemuste põhjal võib teha järelduse, et tsiprofloksatsiini kontsentratsiooni suurenedes väheneb kasutatava bakteri arvukus. Kui eeldada, et puhasti efektiivsus sõltub konkreetse bakteri elutegevusest, võib väita, et puhasti töötas kõige paremini katses, kus antibiootikumi ei olnud.

Töö käigus tehti ka veeanalüüsid, aga kuna nende põhjal ei leitud kindlaid seoseid tsiprofloksatsiini kontsentratsiooni tõusmise ja biopuhasti töö vahel, siis neid töö põhiosas ei kasutatud. Veeanalüüside tulemused paigutati lisadesse (vt lisa 1).

## KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli luua katsekeskkond, kus saab uurida tsiprofloksatsiini mõju bakterite üldarvule sünteetilise reovee mudelsüsteemis. Suures osas töö õnnestus ja antibiootikumi mõju kasutatava bakteri üldarvukusele oli olemas. Katse puuduseks oli teiste bakterite hulgaline sattumine reovette, mis muutis katse tulemused raskemini interpreteeritavaks. Seega tuleks järgnevates samalaadsetes katsetes hinnata pigem bakterite üldarvu, mitte ühe kindla bakteri arvukust. Kuna uurimistöös kasutati õhu juhtimiseks kompressorit, sattus ilmselt just seetõttu katsesüsteemi kõige rohkem baktereid ning paremate katsetulemuste saamiseks peaks katsesüsteemi veel rohkem isoleerima.

Töö alguses püstitati hüpotees, et tsiprofloksatsiini sattumine reoveepuhastisse vähendab lühiajaliselt kasutatava bakteritüve üldarvukust reoveepuhastis ning kõrgema antibiootikumi kontsentratsiooni korral on mõju arvukusele suurem ja seeläbi väheneb puhasti töö efektiivsus. Uurimistöo hüpotees pidas paika, kui vaadata katses kasutatud bakteri üldarvukust, kuid ei pidanud paika, kui vaatluse alla oleks võetud kogu bakterikooslus.

Uurimistöo hüpotees sai osaliselt kinnitatud. Antibiootikumi kontsentratsiooni suurenemisel, suurenes teiste bakterite mitmekesisus ning üldarvukus võrreldes kasutatava bakteri arvukusega. Seega antibiootikumi lisades võivad reovees saada konkurentsieelise bakterid, kes ei pruugi puhastada reovett. Samas, kui antibiootikumi kontsentratsioon suureneb, suureneb ka bakterikolooniate hulk teiste bakterite arvelt, kuid nende töö efektiivsus ei ole teada ning nad ei pruugi reovett puhastada.

Järelikult pärssib reoveepuhastitesse sattunud antibiootikum kindlate bakterite elutegevust ja kui need bakterid on puhastussüsteemis olulised, siis selle tulemusena võib väheneda reoveepuhasti töö efektiivsus ning puhastamata vesi võib sattuda looduskeskkonda.

Et kinnitada saadud tulemusi, peaks katset veel mitu korda tegema. Kuna siinses töös kasutati antibiootikumi, mis on kasutatavale bakterile efektiivne, siis võiks katses kasutada ka teisi antibiootikume.



## ABSTRACT

This research paper has been written on the topic “The Short Term Effect of Ciprofloxacin on The Count of Bacteria in The Model System of Waste Water” by Hanna Marta Nellis. The aim of the research paper was to find out how the antibiotic ciprofloxacin influences the count of bacteria in synthetic waste water and how the count of bacteria changes with the rise of the concentration of ciprofloxacin.

The parts involving cleaning the waste water were done in Tartu Jaan Poska Gymnasium and the sowing and water analyses were done in the Institute of Technology of the University of Tartu. A model system was built, consisting of two sand baths, 12 pistons, compressors, water locks, hoses, fasteners and rubber stoppers. Then the synthetic waste water was prepared and poured into the pistons. The bacterium was added (400 µl) and after 24 hours the antibiotic was added. The pistons were in the experiment device for a week.

During the research, in total four experiments were done. In the first experiment the antibiotic wasn't used. The amount of antibiotic was 0.1 mg/l in the second, 0.3 mg/l in the third and 0.6 mg/l in the fourth experiment.

All the experiments were done in the Institute of Technology of the University of Tartu. The sowing was done on the LB agar plates, which were held in the thermal incubator at 35 °C for 24 hours, after which the colonies of the growing bacteria were counted and their diameters measured. After that, the water analyses were done. To remove all bacteria and residue from the waste water, it was centrifuged. Lastly, the waste water pH was measured and  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  tests were done.

The results of the experiment showed that with the rise of the concentration of the antibiotic, the multiplicity of the bacteria decreased significantly. If the count of bacteria in the experiment without the antibiotic was 1138 CFU/ml, then in the experiment with the concentration of 0.6mg/l the count of bacteria was 400 CFU/ ml. It also became evident that with the rise of concentration of the antibiotic the used bacterium cannot be sufficiently competitive and other bacteria come forward. As a result of the research paper it can be claimed that the occurrence of ciprofloxacin in the waste water cleaner reduces the effectiveness of the cleaner, if presumed that the effectiveness of the cleaner depends on the vital function of that specific bacterium.

To confirm the obtained result, this experiment should be repeated more times. Because in this experiment an antibiotic effective on the used bacterium was used, then an ineffective antibiotic

on the battery should be used. To obtain better results, the experiment system should be further isolated.

## KASUTATUD MATERJALID

Aasmäe, Piret 2016. Euroopas hakatakse piirama antibiootikumide kasutamist loomakasvatustes. Kättesaadav:

<https://www.pollumajandus.ee/uudised/2016/11/21/euroopas-hakatakse-piirama-antibiootikumidekasutamistloomakasvatustes?fbclid=IwAR2CBuiowWzXqMy8ZbgJtt1Zs8ux2wPjf90t9Ike-MESfQduYFru82ag7uo>. (05.02.2020).

Ader, Arne, Urmas Tartes 2014. Veeteemaline õpimapp. Kättesaadav: <https://www.keskkonnaamet.ee/veemapp/raamat#leht/44>. (10.11.2018).

Allas, Ülar, Tanel Tenson 2017. Antimikroobsed ained 21. sajandi hakul. Kättesaadav: <http://www.horisont.ee/arhiiv-2017/Horisont-2-2017.pdf>. (09.04.2019).

Allikmets, Lembit. Antibiootikumid. Kättesaadav: [https://www.kliinik.ee/haiguste\\_abc/antibiootikumid/id-110](https://www.kliinik.ee/haiguste_abc/antibiootikumid/id-110). (23.10.2018).

Antimicrobia...= Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Kättesaadav: <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=175&Specium=-1>. (10.04.2019).

Asi, Kaja 2020. Tartu reoveepuhasti väljavoolu mikroobide antibiootikumitundlikkus. Tartu Jaan Poska gümnaasium, uurimistö, juhendajad: Lauri Mällo (JPG) ja Signe Viggor (Tartu Ülikool).

Biopuhasti... = Biopuhasti kui looduse säästja 2017. Kättesaadav: <http://maaleht.delfi.ee/news/keskkond/uudised/biopuhasti-kui-looduse-saastja?id=78694712>. (22.10.2018).

Bollverk, Anu 2009. Biopuhasti annab puhtama jõevee. Kättesaadav: <https://jarvateataja.postimees.ee/81156/biopuhasti-annab-puhtama-joevee>. (22.10.2018).

Ciprofloxacin...= Ciprofloxacin Olainfarm, 250 mg õhukese polümeerikattega tabletid. Kättesaadav: [https://www.ravimiregister.ee/Data/PIL/PIL\\_1501018.pdf](https://www.ravimiregister.ee/Data/PIL/PIL_1501018.pdf). (04.09.2019).

Conley jt = Conley , Zachary C., Truston J. Bodine, Andrew Chou, Lynn Zechiedrich 2018. Wicked: The untold story of ciprofloxacin. Kättesaadav: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006805>. (09.04.2019).

Endjärv jt = Endjärv, Erki, Peeter Ennet, Karin Kroon, Kristo Kärmas, Peeter Marksoo, Maaja Narusk, Raili Niine, Karin Pachel, Nele Sinikas 2006. Asulareovee puhastamise direktiivi nõuete täitmine Eestis. Kättesaadav: [http://www.keskkonnainfo.ee/publications/109\\_PDF.pdf](http://www.keskkonnainfo.ee/publications/109_PDF.pdf). (21.10.2018).

Few...= Few antibiotics under development. Kättesaadav: <https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/how-did-we-end-up-here/few-antibiotics-under-development/?fbclid=IwAR1WQ2oKr6CPsKvGMgOjJJ9uYbdJVd4Pi4WlciRj4ucoCr1sCNIEzFzpoKI>. (07.02.2019).

Haiba jt = Haiba, Egge, Merike Lillenberg, Lembit Nei 2012. Ravimijäägid looduskeskkonnas. Kättesaadav: [http://www.eestiloodus.ee/artikkel4679\\_4623.html](http://www.eestiloodus.ee/artikkel4679_4623.html). (02.10.2018).

Haiba jt = Haiba, Egge, Merike Lillenberg, Lembit Nei 2016. Ravimijääkidest keskkonnas. Kättesaadav: [https://www.kliinikum.ee/keskkonnaosakond/pildid/konverentsid/2016/Egge\\_Haiba.pdf](https://www.kliinikum.ee/keskkonnaosakond/pildid/konverentsid/2016/Egge_Haiba.pdf) (09.12.2018).

Heitvee = Heitvee reostusnäitajate piirväärtused ja reovee puhastusastmed. Kättesaadav: [https://www.riigiteataja.ee/aktiis/1041/2201/2001/VV\\_99m\\_lisa1.pdf#](https://www.riigiteataja.ee/aktiis/1041/2201/2001/VV_99m_lisa1.pdf#). (09.04.2019).

Kärmas, Kristo 2012. Reovee puhastamise tehnoloogilised võimalused. Kättesaadav: [http://www.tut.ee/public/e/ehitusteaduskond/Instituudid/Keskkonnatehnika\\_instituut/rvp\\_operaatid\\_reoveepuhastuse\\_tehnoloogiad\\_120828\\_3.pdf](http://www.tut.ee/public/e/ehitusteaduskond/Instituudid/Keskkonnatehnika_instituut/rvp_operaatid_reoveepuhastuse_tehnoloogiad_120828_3.pdf). (21.10.2018).

Lillenberg, Merike 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. Tartu: Ecoprint.

Loigu, Enn 2011. Reovee väikepuhastite tehnoloogiliste ja tehniliste lahenduste soovitude ja juhendmaterjalide koostamine kohalike omavalitsuste tarbeks. Kättesaadav: [http://tut.ee/public/e/ehitusteaduskond/Instituudid/Keskkonnatehnika\\_instituut/Teadustoo/Vaikepuhastite\\_lopparuanne\\_19\\_04\\_20122.pdf](http://tut.ee/public/e/ehitusteaduskond/Instituudid/Keskkonnatehnika_instituut/Teadustoo/Vaikepuhastite_lopparuanne_19_04_20122.pdf). (19.11.2018).

Masing, Viktor 1992. Ökoloogialeksikon. Tallinn: Eesti Entsüklopeediakirjastus.

Maastik, Aleksander 2009. Reovee puhastamine haljastusalal. Miks ja kuidas? Kättesaadav: [https://www.envir.ee/sites/default/files/reovee\\_puhastamine\\_hajaasustusosalal.\\_miks\\_ja\\_kuidas.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/reovee_puhastamine_hajaasustusosalal._miks_ja_kuidas.pdf). (08.04.2019).

Mida...= Mida peaksite teadma meie biopuhastitest. Kättesaadav: <https://www.kanall.ee/biopuhastid/mida-peaksite-teadma-meie-biopuhastitest>. (09.04.2019).

Millal... = Millal kasutada mahutit, millal septikut või biopuhastit? Kättesaadav: <https://www.puhastid.ee/millal-kasutada-mahutit-millal-septikut-voi-biopuhastit-2/>. (09.04.2019).

Mikelsaar jt = Mikelsaar, Marika, Tõnis Karki, Irja Lutsar ja Reet Mändar 2006. MEDITSIINILINE MIKROBIOLOOGIA I OSA. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

Niitra, Sirje 2017. Antibiootikumide kasutamine loomakasvatuses luubi all. Kättesaadav: <https://maaelu.postimees.ee/4093649/antibiootikumide-kasutamine-loomakasvatuses-luubi-all>. (09.04.2019).

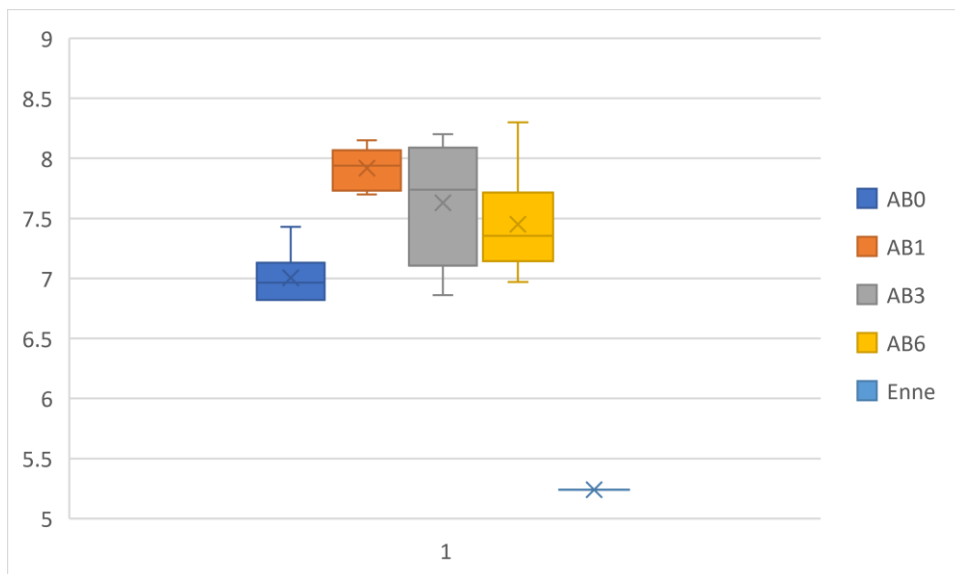
Nõukogu...= Nõukogu direktiiv, 31. märts 1982, millega muudetakse direktiivi 73/405/EMÜ anioonsete pindaktiivsete ainete biolagunduvuse katsemeetodeid käsitlevate liikmesriikide õigusaktide ühtlustamise kohta. Kättesaadav: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A31982L0243>. (15.11.2018).

Reovee... = Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed 2012. Kättesaadav: <https://www.riigiteataja.ee/akt/113062013013?leiaKehtiv>. (09.04.2019).

# LISAD

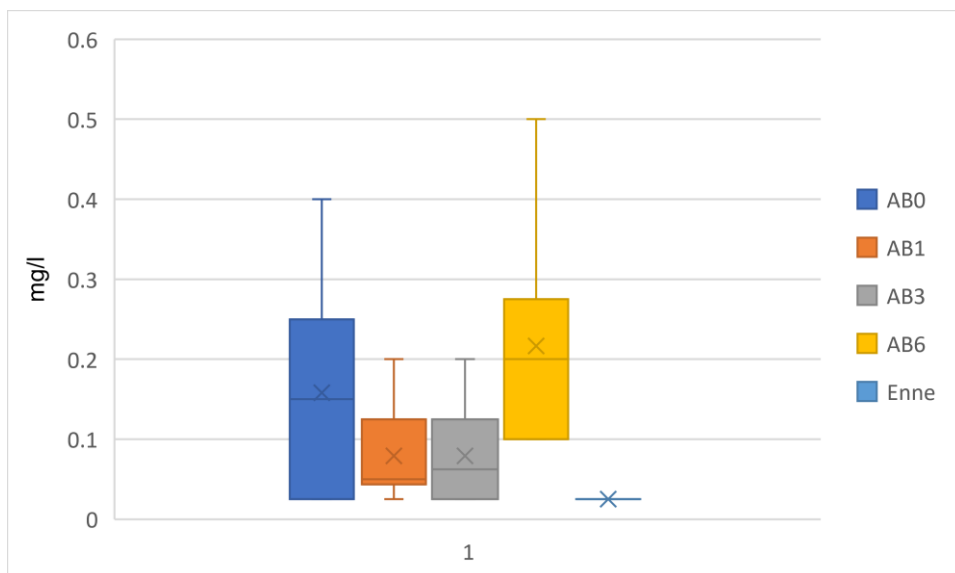
## Lisa 1. Veeanalüüside tulemused

Igas katses tehti veeanalüüsid. Saadud tulemused kanti joonistele (vt joonis 11–14).

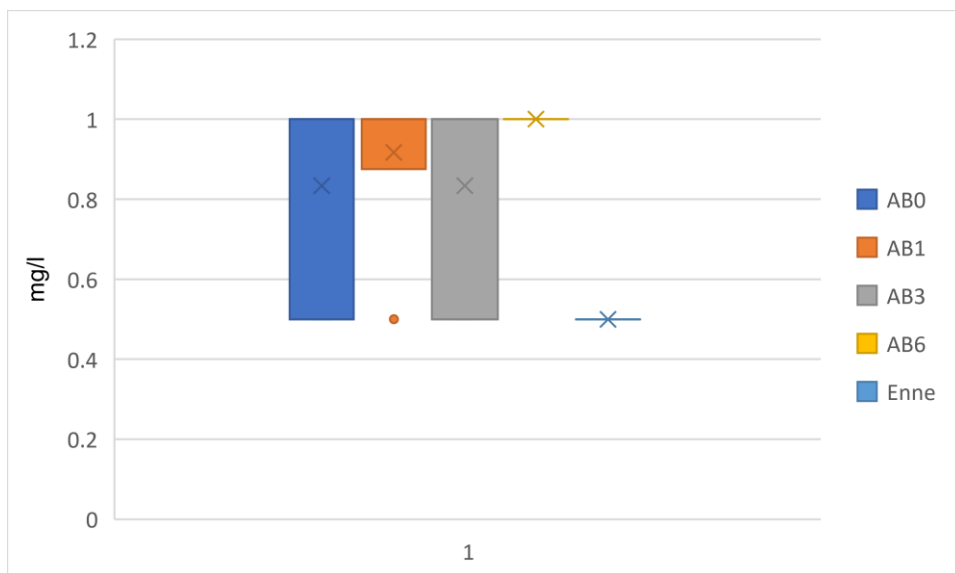


Joonis 11. Reovee pH

Joonisel näitab joon kõikide katsete tulemusi, paksemas osas on 50% saadud tulemustest ja rist tähistab keskmist tulemust.

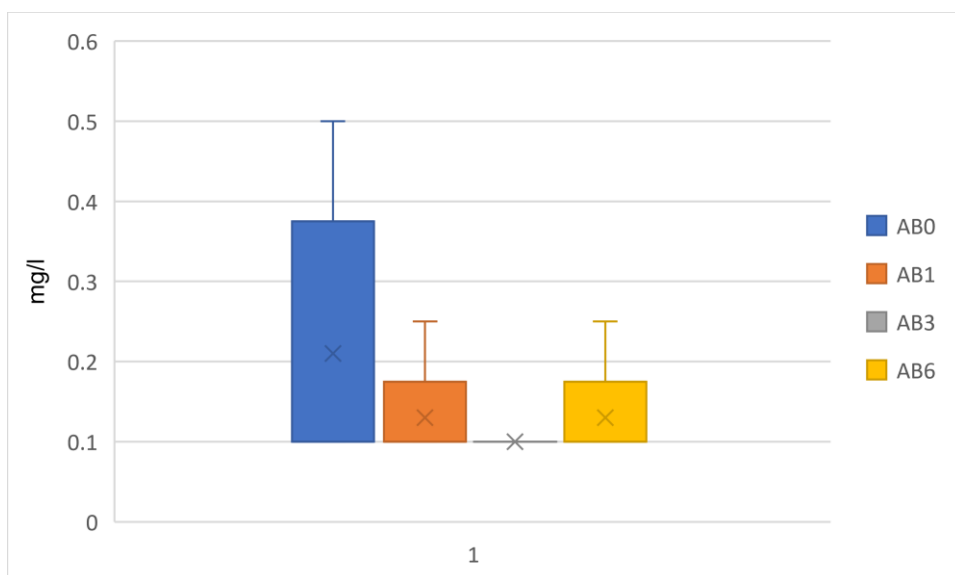


Joonis 12. Reovee NO<sub>2</sub><sup>-</sup>



Joonis 13. Reovee  $\text{NO}_3^-$

Täpp tähistab teistest tulemustest väga erinevat tulemust, mis mõjutab oluliselt keskmist.



Joonis 14. Reovee  $\text{PO}_4^{3-}$ . Enne katseid oli  $\text{PO}_4^{3-}$  1,2 mg/l

Kõikides katsetes on veeanalüüside tulemused üsna sarnased (vt joonis 11–14). Erineb ainult katse AB0 reovee pH, mis on teistest oluliselt madalam. Sarnastest veeanalüüside tulemustest võib järeldada, et bakterite elutegevus on kõigis katsetes sarnane. Katses AB0 määrab tulemuse suuremas mahus vee puhastamiseks mõeldud bakter. Veeanalüüsidele järelduste tegemiseks peaks katseid kordama.