



# **TALLINNA LAHTE SUUBUVA SADEMEVEE MIKROBIOLOOGILINE KVALITEET**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Grete Jõgisoo

Juhendaja: Kai Künnis-Beres, Meresüsteemide Instituut, PhD (mikrobioloog)

Õppekava: LAAB17/17 - Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Grete Jõgisoo

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Kai Künnis-Beres

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Vello Tõugu

[allkiri ja kuupäev]



# **Microbiological Quality of Rainwater Flowing into the Gulf of Tallinn**

Bachelor thesis

Student: Grete Jõgisoo

Supervisor: Kai Künnis-Beres, Department of Marine System, PhD (microbiologist)

Study program: LAAB17/17 – Applied Chemistry, Food and Genetic Engineering

Tallinn 2022

## Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract .....	7
Lühendite loetelu .....	8
Sissejuhatus.....	9
1. Uuritavate objektide teoreetiline ülevaade.....	10
1.1 Bakterid inimese mikrobiotas .....	10
1.1.1 Seedetrakti mikrobiota .....	10
1.1.2 Naha mikrobiota.....	10
1.2 Fekaalsed indikaatorbakterid.....	11
1.2.1 Fekaalsete indikaatorbakterite kriteeriumid.....	11
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.2.3 Soole enterokokid .....	13
1.3 Mikrobioloogiliste vee kvaliteedinäitajate piirväärtused.....	14
2. Töö eesmärk.....	16
3. Materjal ja meetodika.....	17
3.1 Uurimispiirkond ja proovivõtt .....	17
3.2 Bakterite kultiveerimine.....	18
3.2.1 Membraanfiltreerimise meetodi iseloomustus .....	18
3.2.2 Bakterite kultiveerimiseks kasutatud selektiivsõötmed .....	19
3.2.3 Töövahendid.....	21
3.2.4 Membraanfiltreerimise protseduur .....	21
3.3 Selektiivsõotmel saadud tulemuste kontrollimine sekveneerimise meetodil .....	22
3.3.1 16S ribosomaalse RNA sekveneerimise iseloomustus .....	22
3.3.2 Sekveneerimise korraldamine.....	23
4. Tulemused .....	25
5. Lahendused .....	30
5.1 Sademevee puhastamine.....	30
5.2 Looduslähedased sademeveesüsteemid.....	30
5.3 Sademevett puhastavad looduslähedased sademeveelahendused .....	31
6. Arutelu.....	33
Kokkuvõte.....	34
Tänuavaldused .....	35
Kasutatud kirjanduse loetelu .....	36

Lisad.....	40
LISA 1. Proovivõtu kohad. ....	40

## Annotatsioon

Tallinna lahe ökosüsteemi ja vee kvaliteeti määravateks teguriteks on eutrofeerumine ja prahistumine. Kõige rohkem toitaineid satub merre elukondliku reoveega, mida ei ole enne merre juhtimist piisavalt puhastatud, ning sademe- ja uhtevetega. Tallinna lahe puhul on kõige olulisem toitainete lisaja Pirita jõgi (Erm et al., 2014; Jaanus et al., 2011; Paalme, 2011).

Toitainete sissekande ja sellest tingitud eutrofeerumise üheks väljundiks on suviti randa kanduvad vetikad, mis massilise esinemise korral rannal ja rannalähedases vees lagunema ning haisema hakkavad. Erinevates uuringutes on välja toodud, et vetikate vohamise ja haisva lagunemise põhiteguriks on küll Soome ja Tallinna lahe eutrofeerumine, mille suurimaks põhjuseks on suure tõenäosusega Pirita jõe veega merre kantavad toitained, kuid ebameeldiva haisu teket soodustavad ka vähekontrollitud Tallinna lahte juhitud sademeveed. (Künnis-Beres, 2016, 2017; Künnis-Beres et al., 2022)

Käsitleva lõputöö eesmärgiks on välja selgitada Tallinna lahte Pirita tee äärsel rannalõigul Vana Sadamast Pirita purjekeskuseni suubuvate sademevee kollektorite vee mikrobioloogiline koostis, et kindlaks määrata sademeveega merre lisanduv tegelik mikrobioloogiline reostuskoormus. Sel eesmärgil analüüsiti sademevees fekaalse reostuse indikaatorbakterite *Escherichia coli* (*E. coli*) ja soole enterokokkide esinemist ja arvukusi. Kuna sademevee puhul viitab fekaalsete bakterite rohke esinemine kokkupuutele või segunemisele elukondliku reoveega, mis alati sisaldab lisaks mikroobidele ka rohkesti toitaineid, siis võib sellist vett pidada terviseohu tekitajaks ja eutrofeerumise soodustajaks.

Tallinna lahte juhtisid järjepidevalt fekaalsete bakteritega (*E. coli*, soole enterokokid) reostunud vett neljast suurema vooluhulgaga sademevee kollektoritest kaks – niinimetatud Saare tee toru ja Russalkast Pirita pool paikneva surfimaja kõrval avanev sademevee kollektor. Fekaalsete bakterite erilise rohkusega paistis silma just surfimaja kõrval paikneva kollektori vesi. Kõrge fekaalbakterite järjepidev kontsentratsioon nimetatud väljalaskude vees, näitab, et merre ei suunata üksnes sademevett, vaid torustikku peab olema juhitud ka fekaalvett (olmevett).

Lõputöös läbiviidud uuringud kinnitavad varasemaid teadlaste seisukohti, et vähemalt osa sademevee sissevooludest tuleks likvideerida (reoveepuhastusjaama suunata). Esiteks, võib nii kõrge *E. coli* ja soole enterokokkide sisaldusega vesi olla nakkusohtlik (võib sisaldada ka patogeenseid mikroorganisme). Teiseks, soodustavad fekaalsed bakterid vetikate lagunemist eriti haisval moel. Terviseriski suurendab seegi, et kõige reostunumaks osutunud sademevee väljalask asub inimeste poolt külastatavimas kohas Russalka vahetus läheduses surfimaja kõrval, kus toimub aastaringne puhketegevus. Antud lõputöö käigus läbiviidud uuringud täidavad olulise lünga ning viitavad edasiste täiendavate uuringute, aga ka ilmnunud reostuse likvideerimise vajadusele. Selline teadmine on väga oluline Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete kavandamisel.

## Abstract

Eutrophication and littering are determinants of the ecosystem and water quality of the Gulf of Tallinn. Most nutrients end up in the sea with domestic wastewater, which has not been sufficiently cleaned before being discharged into the sea, rainwater and run-off water. In the case of Tallinn bay, the most important nutrient source is the Pirita River (Erm et al., 2014; Jaanus et al., 2011; Paalme, 2011).

One of the outcomes of nutrient intake and the resulting eutrophication is algae transfer to the beach in summer, which, in case of mass occurrences on the beach and in the water near the coast, begin to decompose and stink. Various studies have pointed out that the main factor for the proliferation and smelly decomposition of algae is the eutrophication of the Gulf of Finland and the Gulf of Tallinn, which is most likely caused by nutrients carried into the sea by water from the Pirita River, but also by poorly controlled discharge of rainwater into the Gulf of Tallinn contribute to the development of unpleasant smell. (Künnis-Beres, 2016, 2017; Künnis-Beres et al., 2022)

The aim of this thesis is to find out the microbiological composition of the water in the rainwater collectors flowing into the gulf of Tallinn (from the Vana Sadama to the Pirita sailing Center, on the beach section of Pirita Road) in order to determine the pollution load added to the sea by rainwater. For this purpose, the presence and abundance of fecal pollution indicator bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and intestinal enterococci in rainwater were analyzed. As in the case of rainwater, the presence of fecal bacteria indicates contact or mixing with domestic wastewater, which always contains not only microbes but also a high content of nutrients, such water can be considered a health hazard and a facilitator of eutrophication.

Water polluted with fecal bacteria (*E. coli*, intestinal enterococci) was consistently driven into Tallinn Bay by two of the four rainwater collectors with the highest flow rate – the so-called Saare tee pipe and the rainwater collector opening next to the surf house on the Pirita side of Russalka. The water from the collector next to the surf house was particularly rich in faecal bacteria. The consistent concentration of faecal bacteria in the water of these discharges indicates that not only rainwater is being discharged into the sea, but also faecal water (municipal water) is being discharged through the pipeline.

The investigation carried out in this thesis confirm previous scientists' views that at least part of the rainwater inflow should be eliminated (directed to a wastewater treatment plant). First of all, water with such high content of *E. coli* and intestinal enterococcus can be infectious (may also contain other pathogenic microorganisms). Secondly, faecal bacteria promote the breakdown of algae in a particularly smelly way. The health risk is also increased by the fact that the most polluted rainwater discharge is located in the most visited place in the immediate vicinity of Russalka, next to the surf house, where year-round recreation activities take place.

The investigation carried out in the course of this thesis fill an important gap and indicate the need for further additional studies, as well as the elimination of the occurred pollution. Such knowledge is very important in the planning of measures to improve the condition of Tallinn Bay

## Lühendite loetelu

DNA - desoksüribonukliinhape

EHEC - enterohemorraagilised *E. coli*

EIEC - enteroinvasiivsed *E. coli*

ETEC - enterotoksigeenne *E. coli*

Eutrofeerumine ehk eutrofikatsioon – veekogude rikastumine toitainetega (enamasti fosfori- ja lämmastikuühenditega), terminiga iseloomustatakse tavaliselt ökosüsteemi esmatootjate suurenenud produktsiooni, millele järgneb lagunemisprotsess, mis toob sageli kaasa hapnikupuuduse ja veekvaliteedi halvenemise.

ISO – Rahvusvaheline Standardimisorganisatsioon (*International Organization for Standardization*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PMÜ – pesa moodustav ühik

RNA - ribonukleiinhape

SUDS – looduslähedased sademeveesüsteemid (*Sustainable Urban Drainage System*)

TFTAK – Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskus

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)



## Sissejuhatus

Tallinna lahe ökosüsteemi ja vee kvaliteeti määravateks teguriteks on eutrofeerumine ja prahistumine. Mõlemad nimetatud tegurid on otseselt või kaudselt seotud inimtegevusega ja seda nii merel kui maismaal. Kõige rohkem toitaineid satub merre elukondliku reoveega, mida ei ole enne merre juhtimist piisavalt puhastatud, ning sademe- ja uhtevetega. Suhteliselt palju toitaineid satub esmalt vooluveekogudesse ja seejärel merre põllumajanduslikelt maadelt ja karjakasvatusest. Tallinna lahe puhul on kõige olulisem toitainete lisaja Pirita jõgi (Erm et al., 2014; Jaanus et al., 2011; Paalme, 2011). Koos toitainetega kannavad vooluveed merre ka mitmesugust prahti, millest kõige ebasoovitavam on mitmesugune plast.

Toitainete sissekande ja sellest tingitud eutrofeerumise üheks väljundiks on suviti randa kanduvad vetikad, mis massilise esinemise korral rannal ja rannalähedases vees lagunema ning haisema hakkavad. Selline ebameeldiv nähtus on Pirita tee äärsel mereala probleem, mille leevendamiseks on püütud leida võimalusi juba aastaid (Künnis-Beres et al., 2022). Uuringutes on välja toodud, et vetikate vohamise ja haisva lagunemise põhiteguriks on küll Soome ja Tallinna lahe eutrofeerumine, mille suurimaks põhjuseks on suure tõenäosusega Pirita jõe veega merre kantavad toitained, kuid ebameeldiva haisu teket soodustavad ka vähekontrollitud Tallinna lahte juhitud sademeveed. (Künnis-Beres, 2016, 2017; Künnis-Beres et al., 2022)

Käsitleva lõputöö *eesmärgiks* on välja selgitada Tallinna lahte Pirita tee äärsel rannalõigul Vana Sadamast Pirita purjekeskuseni suubuvate sademevee kollektorite vee mikrobioloogiline koostis, et kindlaks määrata sademeveega merre lisanduv tegelik mikrobioloogiline reostuskoormus.

Sel eesmärgil analüüsiti sademevees fekaalse reostuse indikaatorbakterite *Escherichia coli* (*E. coli*) ja soole enterokokkide esinemist ja arvukusi. Kuna sademevee puhul viitab fekaalsete bakterite rohke esinemine kokkupuutele või segunemisele elukondliku reoveega, mis alati sisaldab lisaks mikroobidele ka rohkesti toitaineid, siis võib sellist vett pidada terviseohu tekitajaks ja eutrofeerumise soodustajaks.

Töös püstitatud *hüpotees*: Tallinna lahte suubuv sademevesi võib teatud juhtudel kanda merre fekaalset reostust ning fekaalse päritoluga mikroorganisme, mille olemasolu sademevees tavapäraselt ei eeldata.

Püstitatud hüpoteesi ajendiks on varasemates uuringutes välja toodud oletus, et üheks suvel Pirita tee ääres leviva ebameeldiva haisu põhjuseks võib olla ka sademeveekollektoritega merre kantavad fekaalsed bakterid, kelle orgaanika lagunemise rajad ja tekkivad vahe- ja lõpp-produktid erinevad merebakterite omast (Künnis-Beres, 2017; Künnis-Beres et al., 2018). Kuigi proovide kogumise periood jäi lühikeseks (september-detsember 2021) täidavad lõputöö käigus läbiviidud uuringud puuduva teadmislünga ning viitavad edasiste uuringute, aga ka ilmnenu reostuse likvideerimise vajadusele. Selline teadmine on väga oluline Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete kavandamiseks.

# 1. Uuritavate objektide teoreetiline ülevaade

Uuritavaks objektiks oli Tallinna lahte suunatav sademevesi. Veeseaduse kohaselt on sademevesi sademetena langenud ning ehitiste, sealhulgas kraavide kaudu kogutav ja ärajuhitav vesi (Veeseadus, 2018). Käesoleva töö raames selgitatakse Tallinna lahte suunatava sademevee mikrobioloogilist kvaliteeti, eelkõige inimkaaslejate bakterite nagu seda on kolibakterid ja enterokokid, sademevees tuvastamise kaudu.

## 1.1 Bakterid inimese mikrobiotas

Bakterid on kõigi elusolendite, kaasa arvatud inimeste, loomulikud kaaslejad. Baktereid leidub kõige enam seedetraktis, kus nad on jaotunud üle kogu inimese seedetrakti, kuid suurim mikroobide kontsentratsioon ja metaboolne aktiivsus on siiski jämesooles.

### 1.1.1 Seedetrakti mikrobiota

Soole ülaosas (magu, kaksteistsõrmiksool, tühisool) on mikrobiota hõre, bakterite kontsentratsioon on  $10^5$  PMÜ/ml. Alates niudesoolest hakkab bakterite kontsentratsioon kasvama, jõudes käärsooles  $10^{10}$ - $10^{11}$  PMÜ/g soolesisu kohta. Inimese seedetrakti mikrobiotas on hinnanguliselt vähemalt 500-1000 erinevat mikroobiliiki, milles domineerivad arvuliselt üldjuhul 10-20 perekonda. (Cabral, 2010; Saarela et al., 2002; Wilson, 2004)

Nende ligikaudu 100 miljardi bakteri seas võib leiduda teatud juhtudel ka patogeenseid mikroobe, nagu perekondade *Salmonella* või *Shigella* esindajad. Lisaks bakteritele võib väljaheidete sisaldada ka patogeenseid viiruseid ja parasiite. (Cabral, 2010)

Inimese seedetrakti mikroflooras domineerivad obligatoorsed anaeroobid, mida on ligikaudu tuhat korda rohkem kui fakultatiivseid anaeroobe. Peamised anaeroobsed perekonnad on bakteroidid, *Eubacterium* esindajad ja bifidobakterid. Need organismid moodustavad ca 90% kultiveeritavatest inimese fekaalbakteritest. Kõige arvukamad fakultatiivsed anaeroobid on enterokokid ja enterobakterid. Peamised *Enterobacteriaceae* perekonnad on *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* ja *Enterobacter*. (Cabral, 2010; Wilson, 2004)

### 1.1.2 Naha mikrobiota

Inimese nahk on kodus miljonitele bakteritele, seentele ja viirustele – need moodustavad naha mikrobiota. Sarnaselt inimeste soolestiku mikroorganismidele on ka naha mikroorganismidel oluline roll nii kaitses sissetungivate patogeenide eest, immuunsüsteemi arendamisel kui ka looduslike saaduste lagunemisel (Belkaid & Segre, 2014; Grice, 2015; Scharschmidt & Fischbach, 2013). Naha mikrofloora koostis varieerub olenevalt kehapiirkonnast ja mikrokeskkonna iseloomust. Naha mitmekesine keskkond põhjustab lokaalselt tihedaid või hõredaid populatsioone,

kus tavaliselt domineerivad gram-positiivsed organismid (näiteks stafülokokid, mikrokokid, difteroidid). *Staphylococcus epidermis* on naha peamine asutaja ja teatud piirkonnas moodustab see bakter enam kui 90 protsenti elavast aeroobsest floorast. *Staphylococcus aureus* esineb nii normaalsel nahal kui ka limaskestadel (enamasti nina piirkonnas), kuid see on inimese peamine bakteriaalne patogeen, mis võib põhjustada erinevaid infektsioone. *S. aureus* ei põhjusta tavaliselt tervel nahal nakkust, kuid nende sisenemisel vereringesse või sisekudedesse, võivad need bakterid põhjustada mitmesuguseid potentsiaalselt tõsiseid infektsioone, nagu endokardiid, osteomüeliit, septiline artriit, kopsuinfektsioonid, gastroenteriit jne. Sõltuvalt tüvedest ja nakatumiskohast võivad need bakterid põhjustada invasiivseid infektsioone ja/või toksiinide poolt vahendatud haigusi. (Byrd et al., 2018; Davis, 1996)

## 1.2 Fekaalsed indikaatorbakterid

Fekaalsed indikaatorbakterid on bakteritüübid, mida kasutatakse vee mikrobioloogilise kvaliteedi hindamiseks - fekaalse reostuse tuvastamiseks ja taseme hindamiseks. Üldjuhul sellised bakterid ei ole inimestele ohtlikud ega põhjusta haigusi, kuid neid kasutatakse terviseriski olemasolu hindamisel. (Devane et al., 2020)

Bakterite kasutamist vee kvaliteedi näitajana pakuti välja juba 1880. aastatel, kui erinevad teadlased hakkasid bakterioloogilisi söötmeid kasutama selleks, et hinnata mikroobide esinemist vees ja toidus. Kuigi erinevaid alternatiivseid indikaatorbaktereid on pakutud, on siiski alates 1920. aastatest kasutatud just erinevaid kolibakterite vorme (*Escherichia*, enterobakter ja teised) kvaliteedihindamise standardsete mikroobinäitajana. (Hussain, 2019)

Lisaks kolibakteritele on üle maailma vee kvaliteedi testimisel laialdast kasutust leidnud veel ka soole enterokokk, mida leidub nii loomade kui ka inimeste soolestikus. (Byappanahalli et al., 2012)

### 1.2.1 Fekaalsete indikaatorbakterite kriteeriumid

Maaailma Terviseorganisatsioon on välja töötanud fekaalse reostatuse indikaatorbakteri kriteeriumid. Selline bakter peaks omama järgmisi tunnuseid:

- 1) esinema suurel hulgal inimeste ja loomade väljaheites;
- 2) nende esinemine väljaheites peab ületama võimaliku patogeense bakteri arvukuse;
- 3) nende võime ellu jääda vees, reovees ja puhastusprotsessides peab olema patogeensete bakteritega sarnane;
- 4) nad peavad reageerima raviprotsessidele sarnaselt patogeensetele bakteritele;
- 5) nende paljunemine väliskeskkonnas, sh vees, peab olema ebatõenäoline;
- 6) neid peab saama tuvastada suhteliselt lihtsa ja odava meetodiga;
- 7) nad ise ei tohi olla ohtlikud/patogeensed. (WHO, 2008)

Täielikult loetletud kriteeriumitele vastavat indikaatorbakterit ei ole olemas, kuid üsna ligilähedaste omadustega bakteriteks on tänapäeval laialdast kasutust leidnud fekaalsed kolibakterid ja enterokokid. (Horan, 2003; WHO, 2008)

### **1.2.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* ehk kolibakter on perekonna *Enterobacteriaceae* esindaja (tüüpliik), keda võib pidada kõige põhjalikumalt uuritud mikroorganismiks (Vila et al., 2016). *E. coli* on gramm-negatiivne fakultatiivne anaeroob, oksüdaasnegatiivne, katalaaspositiivne ja spore mittemoodustav pulgakujuline bakter, mida leidub harilikult soojavereliste organismide soolestiku alumises osas, olles seal üks tuntumaid esindajaid kontsentratsiooniga  $10^7$ – $10^8$  mikroobirakku/g (Lutsar et al., 2007). Enamik *E. coli* tüvesid on kahjutud, kuid mõned võivad põhjustada inimestel tõsiseid haigusi. Kahjutud tüved on aga osa normaalsest ja tervest soolestiku mikrofloorast, need soodustavad seedimist ja kaitsevad inimesi teiste kahjulike mikroobid eest (Reid et al., 2001; Vogt & Dippold, 2005), samas toodavad ka ühendit, mis aitab rakkudel rauda omastada ja sünteesivad ise K-vitamiini (Bentley & Meganathan, 1982). Optimaalne temperatuur *E. coli* paljunemiseks on 37 °C. (Odonkor, 2013)

*E. coli* on fekaalse saastumise spetsiifilisem näitaja kui teised fekaalsed kolibakterid. Üldiselt *E. coli* ei suuda väliskeskkonnas kaua vastu pidada, seega selle bakteri esinemine keskkonnaproovides, toidus või vees viitab just hiljutisele fekaalsele saastumisele (WHO, 2008). Ainuüksi *E. coli* või teise fekaalindikaatori olemasolu toidus või vees ei näita otseselt, et proovis on patogeenseid mikroorganisme, kuid see viitab ohule, et leiduda võib ka patogeenseid väljaheitega levivaid mikroorganisme ja viiruseid, nagu *salmonella* spp. või A-hepatiidi viirus. (Odonkor, 2013)

Heaks indikaatoriks kolibakterite tuvastamiseks keskkonnaveses on  $\beta$ -D-galaktosidaasi aktiivsuse määramine temperatuuril 37 °C.  $\beta$ -galaktosidaas lõhustab laktoosi glükoosis ja galaktoosis, mida saab tuvastada värviliste või fluorestseeruvate markerite abil – värvuse/fluorestsentsi ilmumine kajastab ensüümi toimet. (Cabral, 2010)

#### ***E. coli* ohtlikud tüved**

Soolehaigustest eraldatud *E. coli* tüved on epidemioloogiliste tõendite, fenotüüpiliste tunnuste, haiguse kliiniliste tunnuste ja spetsiifiliste virulentsustegurite põhjal rühmitatud vähemalt kuude erinevasse põhirühma. Neist eriti olulised on enterotoksigeensed (ETEC, O148), enterohemorraagilised (EHEC, O157) ja enteroinvasiivsed (EIEC, O124) serotüübid, mis saavad edasi kanduda ka saastunud veega. (Cabral, 2010)

**Enterotoksigeenne *E. coli* (ETEC)** serotüübid võivad põhjustada infantiilset gastroenteriiti, mis on peamiseks kõhulahtisuse põhjustajateks just arengumaades, kus puudub piisav puhas vesi ja esineb halb kanalisatsioon. Arengumaades on need tüved kõige sagedamini eraldatud bakteriaalsed enteropatogeenid just alla 5-aastastel lastel, põhjustades igal aastal mitusada miljonit kõhulahtisust ja mitukümmend tuhat surmajuhtumit. ETEC-i põhjustatud haigus järgneb saastunud toidu või vee allaneelamisele ja seda iseloomustab mitu päeva kestev vesine kõhulahtisus, mis sageli põhjustab

väikelastel dehüdratsiooni ja alatoitumist. ETEC on ka kõige levinum „rändurite kõhulahtisuse“ põhjustaja, mis mõjutab eelkõige tööstusriikidest pärit inimesi, kes reisivad arengupiirkondadesse. (Cabral, 2010)

**Enterohemorraagilised *E. coli* (EHEC)** serotüüp O157:H7 on Shiga toksiini tootev bakter (STEC) (Cabral, 2010). STEC-puhangute peamisteks allikateks on toored või alaküpsed lihatooted (mäletsejaliste liha: veised, lambad jne), toorpiim ja köögiviljade fekaalsaaste. STEC-i on isoleeritud ka veekogudest, teatatud on vee kaudu levimisest nii saastunud joogiveest kui ka puhkevetes suplemisel. STEC-i põhjustatud haiguste sümptomiteks on kõhukrambid ja kõhulahtisus, mis võib mõnel juhul areneda veriseks kõhulahtisuseks. Samuti võib tekkida palavik ja oksendamine. Inkubatsiooniperiood võib kesta 3 kuni 8 päeva. Enamikul juhtudel taandub haigus ise, kuid võib põhjustada eluohtlikku haigust, sealhulgas hemolüütilis-ureemilist sündroomi (HUS), eriti väikelastel ja eakatel. HUS-i iseloomustab äge neerupuudulikkus, hemolüütiline aneemia ja trombotsütopeenia (madal vereliistakute arv). Enamik saadaolevaid andmeid STEC-i kohta on seotud serotüübiga O157:H7, kuna see on biokeemiliselt teistest tüvedest kergesti eristatav. *E. coli* O157:H7 on ohtlik oma vastupidavuse tõttu madalale pH-le (~ 2,5), mis võimaldab läbida mao, väikese nakkusliku doosi (ainult 10 rakku) ja kõrge patogeensuse tõttu (Tilden et al., 1996). (WHO, 2018)

**Enteroinvasiivsed *E. coli* (EIEC)** serotüübid on võimelised tungima inimese jämesoole distaalsesse sooleepiteelirakkudesse ja paljunema. Haigust iseloomustavad kõhukrambid, kõhulahtisus, palavik, oksendamine, üldine halb enesetunne ning vere ja lima olemasolu nakatanute isikute väljaheites. Horvaatias läbiviidud uuring näitas, et *E. coli* O124 võib sageli isoleerida gastroenteriidi, enterokoliidi ja düsenteeria juhtudest. (Cabral, 2010)

### 1.2.3 Soole enterokokid

Enterokokkide perekond hõlmab üldlevinud gram-positiivsete bakterite rühma, mis on inimeste nakkushaiguste levinumad põhjustajad. Enterokokid, nagu ka kolibakterid, ei moodusta puhkerakke ehk spore. Ümarad rakud ehk kokid võivad olenevalt liigist esineda üksikult, paaride, ahelate või rühmadena. Enterokokid on homofermentatiivse metabolismiga fakultatiivsed anaeroobid. Süsivesikute fermentatsiooni peamine lõpp-produkt on piimhape. Enterokokkide tuvastamise tunnusteks on oksüdaas- ja katalaasnegatiivsus, hea soola taluvus (kuni 6,5%) ja resistentsus 40% sapi suhtes. Optimaalne kasvu/paljunemise temperatuur on 35-37 °C. Tänu nende üldlevinud esinemisele inimeste (ja loomade) väljaheites ja hea püsivuse tõttu keskkonnas on enterokokid võetud inimeste väljaheitega seotud veesaaste näitajaks – fekaalse reostuse indikaatoriks. (Cabral, 2010; García-solache & Rice, 2019)

Tervete inimeste seedetraktist pärit fekaalsed enterokokid ei ole üldiselt virulentsed, kuid mõned enterokokkide tüved on omandanud resistentsuse mitme ravimi suhtes ja on peamiseks põhjuseks haiglas omandatud infektsioonide levikule, põhjustades aastatel 2011-2014 USA-s 14% kõikidest haiglas omandatud nakkustest, mis on 11% suurem kui aastal 2007 (Hidron et al., 2008; Weiner et al., 2016). Enterokokid võivad põhjustada ka haava-, kuseteede-, vereringe- või muid infektsioone (Põhja-Eesti Regionaalhaigla, 2018). (Boehm & Sassoubre, 2014; Fiore et al., 2019)

Enamasti põhjustavad enterokokkinfektsiooni kaks liiki: *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*, mõlemal liigil esineb resistentsus tavaliste antibiootikumide, nagu tsefalosporiinid, aminoglükosiidid, klindamütsiin ja trimetopriimsulfametoksasool, suhtes. Esineb ka vankomütsiin-resistentseid enterokokke (Põhja-Eesti Regionaalhaigla, 2018). Tänu märkimisväärselt plastilisele genoomile, võivad need kaks liiki hõlpsasti omandada resistentsuse ka edasiste antibiootikumide suhtes, kas mutatsiooni või resistentsust määravate geneetiliste elementide horisontaalse ülekande kaudu. (García-solache & Rice, 2019)

Enamik enterokokkide liike elutseb imetajate, roomajate, lindude ja teiste loomade soolestikus. Inimese seedetraktis on valdavaks liigiks *E. faecalis*, kuigi teatud juhtudel on domineerivaks *E. faecium*. Kui inimese väljaheites esineb põhiliselt kaks nimetatud liiki, siis loomadel on sagedasemad sõltuvalt peremeesliigist *E. avium*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum* ja *E. hirae*. Keskkonda satuvad enterokokid väljaheidetega – fekaalse reostatusega. (Cabral, 2010)

Inimese väljaheites on soole enterokokkide arvukus üldjuhul suurusjärgu võrra väiksem kui *E. coli* arvukus (Cabral, 2010). Väliskeskkonnas on need vastupidavamad kui *E. coli* bakterid ning seetõttu viitab nende esinemine proovis pigem varem toimunud või kaudsele reostusele, eriti juhul kui enterokokid esinevad proovis, kuid kolibakterid puuduvad. (Künnis-Beres et al., 2018)

### 1.3 Mikrobioloogiliste vee kvaliteedinäitajate piirväärtused

Eestis reguleerib vee kasutamist ja kaitset veeseadus. Sademeveele ei ole kehtestatud norme mikrobioloogilise koostise kohta. Nõuded on kehtestatud suplusveele, kuhu teatud juhtudel on suunatud ka sademevesi, st. on sademevee poolt mõjutatud.

Nõuded suplusvee kvaliteedile on kehtestatud Sotsiaalministri 03.10.2019 määruses nr 63 „Nõuded suplusveele ja supelrannale“. Suplusvee kvaliteeti hindab Eestis Terviseamet, kes klassifitseerib supluskoha (rannikuvesi) kvaliteedi „väga heaks“, „heaks“, „piisavaks“ või „halvaks“ (tabel 1).

**Tabel 1.** Suplusvee klassifikatsioon mikrobioloogiliste näitajate alusel. (\*) - põhineb 95-protsentiili hindamisel; (\*\*) - põhineb 90-protsentiili hindamisel.

Mikroorganismid	Väga hea kvaliteet	Hea kvaliteet	Piisav kvaliteet
Soole enterokokid (pmü/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)
Escherichia coli (pmü/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)

Määruse nr. 63 lisas 1 on välja toodud suplusvee kvaliteedi näitajad ja nende piir- ehk kontrollväärtused (tabel 2). Kontrollväärtus (\*) on väärtus, mille ületamise korral hinnatakse, kas suplusvees sisalduvad mikroorganismid kujutavad inimese tervisele sellist ohtu, mis nõuab asjakohaste kvaliteedijuhtimismeetmete rakendamist.

**Tabel 2.** Suplusvee mikrobioloogilised kontrollväärtused ja nende analüüsimiseks soovitatud meetodid.

<b>Mikroorganismid</b>	<b>Kontrollväärtud (*)</b>	<b>Analüüsi standardmeetodid</b>
Soole enterokokid (pmü/100 ml)	100	ISO 7899-1 või ISO 7899-2
Escherichia coli (pmü/100 ml)	1000	ISO 9308-3 või ISO 9308-1

## 2. Töö eesmärk

Tallinna lahe vee kvaliteedi ja üldise ökosüsteemi määravateks teguriteks on eutrofeerumine ja prahistumine. Kõige rohkem toitaineid satub merre elukondliku reoveega, mida ei ole enne merre suubumist piisavalt puhastatud, ja osaliselt ka sademe- ja uhtevetega.

Toitainete sissekande ja sellest tingitud eutrofeerumise üheks väljundiks on suviti randa kanduvad vetikad, mis rannal ja rannalähedases vees lagunedes haisema hakkavad. Selline ebameeldiv nähtus on Pirita tee äärsel mereala probleem, mille leevendamiseks on lahendusi püütud leida juba aastaid. Vetikate vohamise ja haisva lagunemise põhiteguriks on Soome ja Tallinna lahe eutrofeerumine, mille suurimaks põhjuseks on ilmselt Pirita jõe veega merre kantavad toitained, kuid ebameeldiva haisu teket soodustavad ka vähekontrollitud Tallinna lahte juhivad sademeveed.

Uurimisprobleemiks on välja selgitada Tallinna lahte Pirita tee äärsel rannalõigul Vana Sadamast Pirita purjekeskuseni suubuvate sademevee kollektorite vee mikrobioloogiline koostis, et määrata kindlaks merre lisanduv reostuskoormus.

Lõputöös püstitati hüpotees: Tallinna lahte suubuv sademevesi võib teatud juhtudel kanda merre fekaalset reostust ning fekaalse päritoluga mikroorganisme, mille olemasolu sademevees tavapäraselt ei eeldata.



### 3. Materjal ja meetodika

#### 3.1 Uurimispiirkond ja proovivõtt

2021. aasta septembrist detsembrini koguti fekaalsete soolebakterite analüüside läbiviimiseks torude otstest veeproove seitsmel korral (19.09, 21.09, 05.10, 19.10, 18.11, 24.11, 10.12).

19.09.2021 – võetud proovid: Saare tee, Lillepaviljon, Lasnamäe sademevee kollektor, Surfi maja (*väga madal veeseis*)

05.10.2021 – võetud proovid: Saare tee, Lillepaviljon, Surfi maja

19.10.2021 – võetud proovid: Saare tee, Kadriorg

18.11.2021 – võetud proovid: Saare tee, Surfi maja, Kadriorg

24.11.2021 – võetud proovid: Surfi maja, Kadriorg

10.12.2021 – võetud proovid: Saare tee, Lillepaviljon, Sademevee kollektor, Surfi maja, Kadriorg

Proovivõtukohtade asukohad on esitatud *joonisel 1* (vt ka Lisad).



**Joonis 1.** Proovivõtukohtade paiknemine Tallinna lahe rannas.

## **Proovivõtukohtade ehk sademevee kollektorite iseloomustus**

Saare tee väljalask (Nr. 1) – Saare tee sademevee väljalasku kogutakse Maarjamäe, osaliselt Kose ning ka Pirita keskosa sademeveed. Pirita keskosast juhitakse sademevesi rannahoone juures olevasse sademeveepumpplasse Pirita 2 ja sealt üle Pirita jõe Pirita 1 sademeveepumbajaama, mis suunab veed Saare tee sademevee väljalasku, mis asub Saare tee ja Pirita tee ristmiku lähedal. (Tallinna Keskkonnaamet, 2012)

Lillepaviljoni toru (Nr. 2) – sademevee kogumisala teadmata. Merre voolava vee hulk väheldane.

Lasnamäe (lauluväljaku) kollektor (Nr. 3) – sademevesi kogutakse kokku tänavatorustikega ja juhitakse Lasnamäe sademevee tunnelkollektorisse. Kollektori alumine lõik on ehitatud ühise tunnelina, milles sademe- ja reovesi on eraldatud vaheseinaga. Sademevesi juhitakse lauluväljaku piirkonnas merre. Valingvihma korral on võimalik tunnelis sademevee segunemine reoveega ja seetõttu mere reostamine. (Tallinna Keskkonnaamet, 2012)

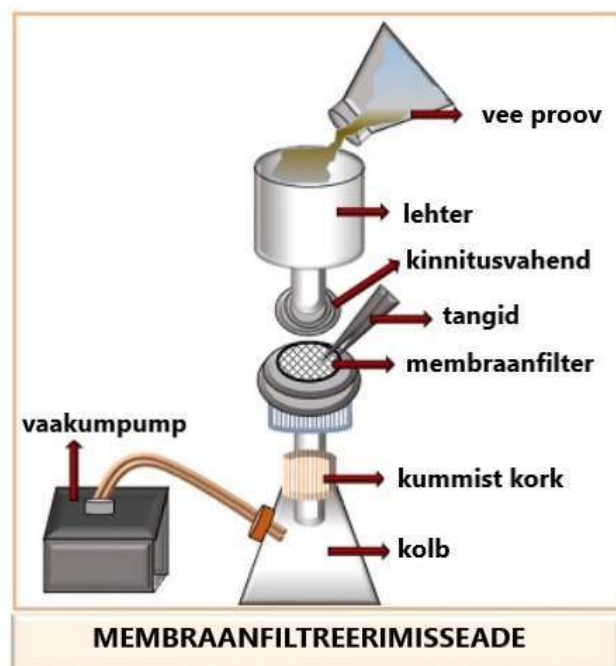
Surfi maja „oja“ (Nr. 4), Russalka läheduses paikneva Surfimaja kõrval – sademevee kogumisala teadmata. Torust välja voolav sademevesi on rannaliiva uuristanud oja.

Kadrioru kanal (Nr. 5) – proovid kogutud Kadrioru pargist Kadrioru Selveri tagant sademevee kanalist, mis enne Reidi tee ehitamist suubus eraldi toruna merre. Peale Reidi tee valmimist on kanali vesi liidetud teiste Vanasadama poolsete sademevee kollektoritega ja proovivõtt sademevee merre juhtimise kohast pole enam käsitsi võimalik. Kadrioru kanali vesi pärineb Suur-Sõjamäe ja Tartu maantee piirkonnast, kuhu suunatakse ka vajadusel liigne vesi Ülemiste järvest (ülevool kõrgvee ajal).

## **3.2 Bakterite kultiveerimine**

### **3.2.1 Membraanfiltreerimise meetodi iseloomustus**

Membraanfiltreerimise meetod hõlmab erinevate veeproovi koguste filtreerimist läbi standardse läbimõõdu ja poori suurusega filtrite. Meetodit kasutatakse bakterite vähesel kontsentratsioonil (Kator & Rhodes, 2003). Filtrid asetatakse selektiivsele söötmele Petri plaadil, plaate inkubeeritakse kindlal temperatuuril ja aja jooksul, mille tulemusel membraanile kinni jäänud bakterirakud kasvavad kolooniateks, mis identifitseeritakse ja loendatakse. Indikaatorbakterid külvatakse söötmele, mis on spetsiaalselt formuleeritud kasvatamiseks just seda liiki, mis meid huvitab, ning inhibeerida teiste liikide/organismide kasvu. Filtreerimisseade koosneb filtreerimiskolonnist koos filterpaberiga, mis on ühendatud vaakumpumbaga (*Joonis 2*). (Forster & Pinedo, 2015)



Joonis 2. Membraanfiltreerimisseade. Mugandatud: (Supriya, n.d.)

### 3.2.2 Bakterite kultiveerimiseks kasutatud selektiivsöötmed

**Slanetz and Bartley söödet** kasutatakse enterokokkide tuvastamiseks ja loendamiseks veeproovides. Söötmekoostis on toodud tabelis *Tabelis 3*.

**Tabel 3.** Slanetz and Bartley söötme koostis (g/L). (Condalab, 2020)

Glükoos	2
Naatriumasiid	0,4
Pärmi ekstrakt	5
Dikaaliumvesinikfosfaat	4
Bakterioloogiline agar	10
Trüptoos	20
2,3,5-Trifenüültetrazoliumkloriid (TTC)	0,1

Trüptoosi roll söötmes on pakkuda kasvuks hädavajalikke lämmastikke, vitamiine, mineraale ja aminohappeid. Pärmiekstrakt on vitamiinide (pehnilised B-grupp) allikaks. Glükoos on fermenteeritav süsivesik, mis annab süsinikku ja energiat. Dikaaliumvesinikfosfaat täidab söötmes puhvri rolli. Naatriumasiid on vajalik gramnegatiivsete bakterite kasvu pärssimiseks. TTC redutseeritakse enterokokkide poolt lahustumatuks formasaniks bakterirakus, moodustades

tumepunase värvusega kolooniad. Bakterioloogiline agar on tahkestav aine. (Condalab, 2020; Laboratories, 2019)

### Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agar (ISO)

Kromogeenset kolibakteri agarit kasutatakse kolibakterite kiireks ja täpseks detekteerimiseks ning loendamiseks toidu ja vee proovides (*ISO 9308-1:2014 Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*). Sihtorganismi eristamiseks sisaldab sööde spetsiifilisi ensüüme, mille tõttu värvuvad erinevat liiki bakterite kolooniad erinevalt (*Joonis 3*). Agari koostis on välja toodud *tabelis 4*. (Pay & Scopes, 2017)



**Joonis 3.** Thermo Scientific Chromogenic Coliform agaril (ISO) moodustab *E. coli* membraanfiltril kasvades värvuselt siniseid ja teised kolilaadsed bakterid roosasid kuni punaseid kolooniad. (Pay & Scopes, 2017)

Kromogeensel kolibakteri agaril moodustavad kolilaadsed bakterid roosasid kuni punaseid kolooniaid lõhustades kromogeeni 6-kloro-3-indoksüül- $\beta$ -galaktopüranosiidi (Salmon Gal)  $\beta$ -D-galaktosidaasi toimet. *E. coli* moodustab siniseid kolooniaid tänu võimele lõhustada nii kromogeeni 6-kloro-3-indoksüül- $\beta$ -galaktipüranosiidi kui ka 5-bromo-4-kloro-3-indoksüül- $\beta$ -D-glükuroonhapet  $\beta$ -D-glükuronidaasi toimet. (Thermo Fisher Scientific, 2018)

**Tabel 4.** Kromogeense kolibakteri agari koostis (g/L). (Thermo Fisher Scientific, 2018)

Ensümaatilisel lagundatav kaseiin	1
Pärmiekstrakt	2
Naatriumkloriid	5
Naatriumdivesinikfosfaat dehüdraat 2H <sub>2</sub> O	2,2
Dinaatriumvesinikfosfaat	2,7
Naatriumpüruvaat	1
Sorbitool	1
Trüptofaan	1
Tergitol 15-S-7	0,15
6-kloro-3-indoksüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiid	0,2

5-bromo-4-kloro-3-indoksüül-β-D-glükuroonhape	0,1
IPTG (isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid)	0,1
Agar	13,55

Vajalikud toitained tagavad kaseiin ja pärmiekstrakt. Pärmiekstrakt tagab ka B vitamiinid, mis on kasvamiseks vajalikud. Naatriumkloriid varustab elektrolüütidega ja aitab säilitada osmootsuse tasakaalu söötmes. Naatriumvesinikfosfaat ja dinaatriumvesinikfosfaat on puhverdavad ained, mis loovad stabiilse pH. Naatriumpüruvaat soodustab kahjustatud rakkude eluiga. Tergitol pãrsib grampositiivsete rakkude kasvu. Kromogeene 6-kloro-3-indoksüül-β-D-galaktopüranosiidi ja 5-bromo-4-kloro-3-indoksüül-β-D-glükuroonhapet kasutatakse kolooniate eristamiseks. IPTG indutseerib β-D-galaktosidaasi tootmist. (Thermo Fisher Scientific, 2018)

### 3.2.3 Töövahendid

Vaakumpump; filtreerimise seade: kolb, voolik kolvi ja pumba ühendamiseks, filtrialus, klamber, proovitoru; steriilselt pakendatud membraanfiltrid (Millipore, EZ-Pak Mixed Cellulose Esters filters, valged ruudustikuga, filtri ø 47 mm, poori ø 0,45 µm); steriilne vesi proovide lahjendamiseks (vajadusel); söötmed: Slanetz and Bartley Medium ja Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agar (ISO); pintsetid; automaatpipetid; steriilsed pipetiotsikud; steriilsed mõõtesilindrid (100-200 ml); piirituslamp; piiritus; leegisüütaja; Petri tassid; kummikindad; kaalud; elektripliit; inkubaator (30-37 °C); steriilsed proovipudelid.

### 3.2.4 Membraanfiltreerimise protseduur

1. Söötmete valmistamine (toimub eelmisel päeval või proovivõtu päeva hommikul):
  - a. Kromogeenne kolibakterite sööde: 30 g suspendeerida 1 liitris destilleeritud vees. Segu lasta keema, et see täielikult lahustuks, pidevalt segades. Jahutada 50 °C, segada korralikult ja seejärel valada steriilsetesse Petri tassidesse tarduma.
  - b. Slanetz-Bartley sööde: suspendeerida 42 g 1 liitris destilleeritud vees. Edasised etapid samad kromogeense kolibakterite agariga.
2. Proovi filtreerimine filtrile (poor 0,45 mm).
  - a. Steriilsete pintsentidega (korra leegist läbi, lasta jahtuda). Ettevaatlikult eemaldada steriilne membraani filter pakendist, hoides pintsettidega ainult selle äärest. Filter asetada filtreerimisaparaadile.
  - b. Proovide segamine, pöörates konteinerid (pudelid) mitu korda ümber ja tagasi püsti.
  - c. Täpse mahu proovi lisamine filtritorusse. Mahtu valitakse lähtudes varasemast kogemusest. Kui filtreeritava proovi maht jääb alla 5 ml tuleb bakterite parema filtrile jaotumise eesmärgil proovi maht suurendada steriilse lahjendusveega.
  - d. Rakendada imikolbile vaakum, et proov jookseks läbi filtri.

- e. Eemaldada membraanifilter filtrialuselt steriliseeritud (leegis) pintsetiga, haarates ainult filtri servast.
  - f. Filter asetada agarsöötmele alustades ühest servast, et vältida õhumullide jäämist membraani ja söötme vahele. Märjastada Petri tass vajalike andmetega.
3. Asetada tassid filtritega inkubaatorisse temperatuurile 30-34 °C ja hoida seal 24-36 h.
4. Inkubeerimisaja möödudes võetakse tassid inkubaatorist ning viiakse läbi filtrile kasvanud kolooniate identifitseerimine, loendamine, protokollimine ja tulemuste arvutamine (tulemused esitatakse 100 ml proovi kohta).
- a.  $PMÜ/100 \text{ ml kohta} = (\text{membraanil olevate kolooniate arv} / \text{filtreeritud proovi maht}) \times 100$

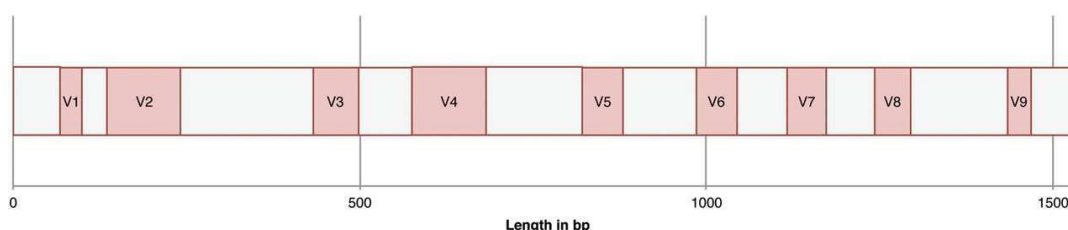
### 3.3 Selektiivsöötmele saadud tulemuste kontrollimine sekveneerimise meetodil

#### 3.3.1 16S ribosomaalse RNA sekveneerimise iseloomustus

16S ribosomaalseid RNA geenide sekveneerimist on laialdaselt kasutatud mikroobide tuvastamiseks ja klassifitseerimiseks keerulistes bioloogilistest segudest, nagu keskkonnaproovid ja sooleproovid. (Ley et al., 2005; Schmidt et al., 1991)

16S rRNA on väga konserveerunud ja universaalne geen, mille järjestus on ligikaudu 1500 aluspaari pikkune ning koosneb üheksast hüpervarieeruvast piirkonnast (V1-V9), mis on eraldatud konserveerunud segmentidega (Joonis 4). Taksonoomilise klassifikatsiooni jaoks piisab individuaalse hüpervarieeruva piirkonna järjestamisest kogu geeni pikkuse asemel, mis on kulutõhusam. Enamikus mikroobiliikides koosneb 16S neljas hüpervarieeruv (V4) piirkond 254 aluspaarist, erinedes omavahel üksnes mõne aluspaari võrra. (Cox et al., 2013; Soriano-Lerma et al., 2020)

Universaalsed PCR-praimerid saab disainida 16S konserveerunud piirkondade sihtmärgiks, võimaldades amplifitseerida geeni paljudes erinevates mikroorganismides ühes proovis. Kuigi konserveeritud piirkonnad teevad universaalse amplifikatsiooni võimalikuks, võimaldab varieeruvate piirkondade järjestamine eristada erinevaid mikroorganisme. (Cox et al., 2013)



**Joonis 4.** Ligikaudu 1500 aluspaari pikkune *E. coli* 16S rRNA geen, mis koosneb üheksast hüpervarieeruvast piirkonnast, mis muudab selle ideaalseks sihtmärgiks fülogeneetilise markergeenina. (Cox et al., 2013)

Sekveneerimise käigus bakteriaalne DNA ekstraheeritakse tervetest rakkudest ja kasutatakse PCR-i („*Polymerase Chain Reaction*“ – polümeraasi ahelreaktsioon) matriitsina, et amplifitseerida

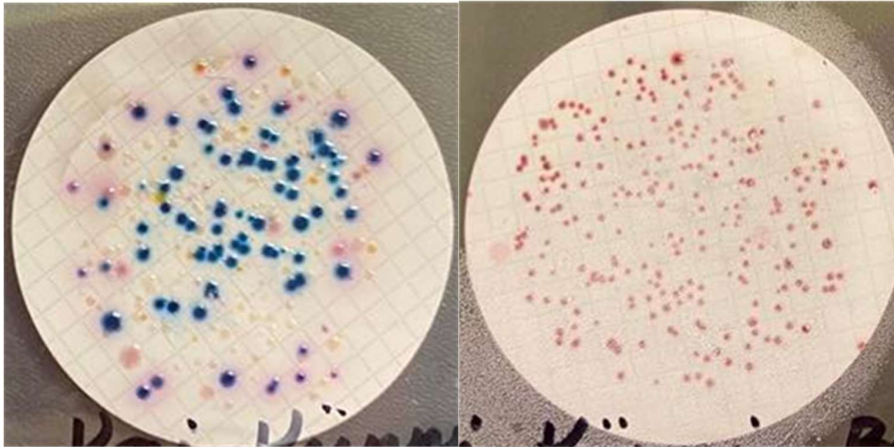
ligikaudu 500 või 1500 aluspaari pikkust segmenti 16S RNA geenijärjestusest. PCR produktid puhastatakse, et eemaldada liigsed praimerid ja nukleotiidid. Järgneb tsükli järjestamine, kus matriitsina kasutatakse esimese PCR-tsükli puhastatud produkti. Nii päri („*forward*“)- kui ka vastupidist järjestust („*reverse sequence*“) kasutatakse matriitsina eraldi reaktsioonides, milles kasutatakse ainult päri- või vastupidist praimerit. Selle etapi produktiks on erineva pikkusega DNA-de segu. See saavutatakse spetsiaalselt märgistatud aluste (värviterminaatorite) lisamisega, mis juhuslikult teise tsükli lisades järjestuse lõpetavad. Produktid seejärel järjekordselt puhastatakse ja igaühe pikkus määratakse kapillaarelektroforeesi või geelelektroforeesi abil. Tulemuseks saadakse iga fragmendi pikkused ja terminaalset alused, mille kaudu saab määrata aluste järjestust. DNA kaks ahelat sekveneeritakse eraldi, genereerides nii päri- kui ka vastupidised (komplementaarsed) järjestused. Loodud DNA järjestused koondatakse päri- ja vastupidise järjestuste joondamise teel, seejärel võrreldakse seda konsensusjärjestust analüüsitarkvara abil andmebaasidega (tuntuim näiteks GenBank). (Clarridge 3rd, 2004)

### 3.3.2 Sekveneerimise korraldamine

Fekaalse reostuse indikaatorbakterite analüüsitulemuste täiendavaks kontrollimiseks telliti Russalkast paremal asuva surfimaja kõrval asuva sademevee kollektoritorust kuupäevadel 18.11 ja 24.11 võetud veeproovide sekveneerimisanalüüs Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskus AS-lt (TFTAK).

Bakterite identifitseerimiseks korjati mõlemal filtri paberil olnud kolooniatest materjali, lisati lüüsilahus, segati 30 minutit toatemperatuuril ning seejärel fuugiti. DNA eraldamiseks kasutati ZymoBIOMICS™ DNA MiniPrep komplekti (Zymo Research, Lot 206392). Saadud DNA kontsentratsioon mõõdeti kasutades Qubit Broad Range komplekti (Invitrogen, Cat no. Q32853). Bakteriaalse DNA tuvastamiseks kasutati 16S rRNA geeni v4 regiooni sekveneerimise meetodit ja Illumina iSeq100 sekvenaatorit.

TFTAK-ile esitati membraanfiltrid, millel peal olid selektiivsöötmetel (Slanetz and Bartley Agar, Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agar) inkubeerimisest kasvanud bakterite kolooniad (joonis 5).



**Joonis 5.** Sekvenerimiseks edastatud filtrid: vasakpoolne Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agaril kasvanud bakterikolooniad (*E. coli* – sinine); parempoolne Slanetz and Bartley Agaril kasvanud bakterikolooniad (soole enterokokid roosad kuni punased). Proovid on võetud Russalka/Surfimaja väljalasu veest.

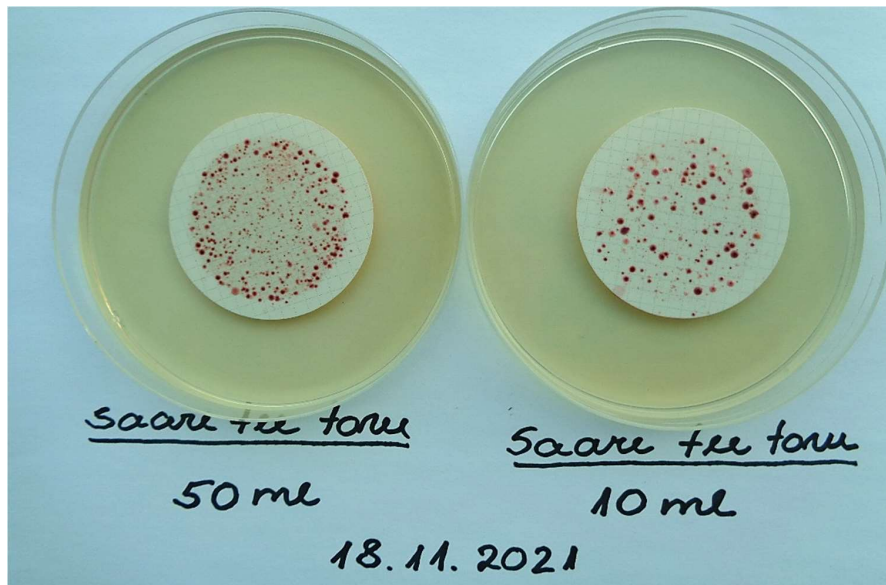


## 4. Tulemused

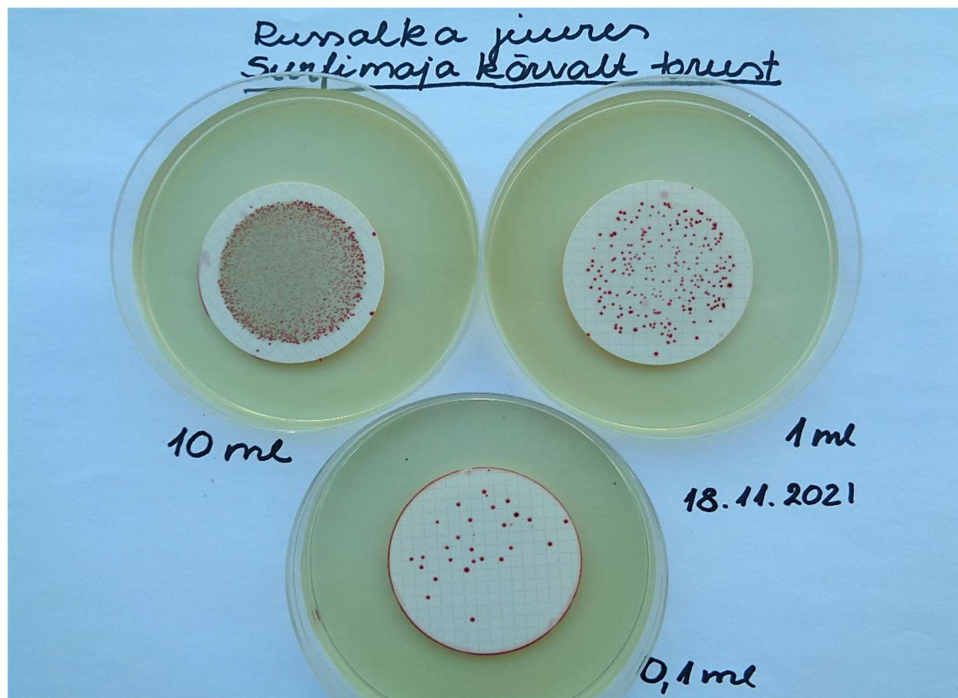
Neljast suurema vooluhulgaga sademevee kollektorist/torust kandsid järjepidevalt lahte fekaalseid baktereid (*E. coli*, soole enterokokid) Saare tee torust (Nr.1) väljuv sademevesi (joonis 6) ja Russalkast Piritä pool paikneva surfimaja kõrval avaneva sademevee kollektori (Nr. 4) vesi (joonis 7). Fekaalsete bakterite erilise rohkusega paistis silma just surfimaja kõrval paikneva kollektori vesi. Kõrge fekaalbakterite järjepidev kontsentratsioon nimetatud väljalaskude vees, näitab, et reostus ei olnud seal juhuslik ning merre ei suunata üksnes sademevett, vaid torustikku peab olema juhitud ka olme-/fekaalvett. Seevastu Kadrioru kanali vesi, mis koos linna poolsete kollektorite veega Reidi tee ehituse käigus uuendatud merrelasu kaudu Tallinna lahte suunatakse, oli eelnevalt nimetatutest puhtam (vt. joonis 8). Lillepaviljoni torus väljavoolava vee hulk oli väheldane ning vee kvaliteet hea, mistõttu pole sellel reostavat mõju, nii nagu seda on täheldatud eelnevatel aastatel (Künnis-Beres 2017, 2018). Lasnamäe kollektori Lauulväljaku piirkonnas paiknev väljalast asub rannast kaugemal meres betoonist ehitise keskel (nelja toru otsad). Tulenevalt asukohast oli sealt veeproove võimalik võtta üksnes madala veeseisu korral 19. septembril ja 10. detsembril 2021. Nendel kuupäevadel oli torudest väljavoolava vee hulk suur ja bakterite arvukused madalad. Teostatud analüüside lõplikud tulemused on esitatud Tabelis 5.

**Tabel 5.** 2021. aasta sügistelvel Piritä tee ääres Tallinna lahte avanevate sademevee kollektorite/torude vee fekaalse reostuse indikaatorbakterite analüüside tulemused.

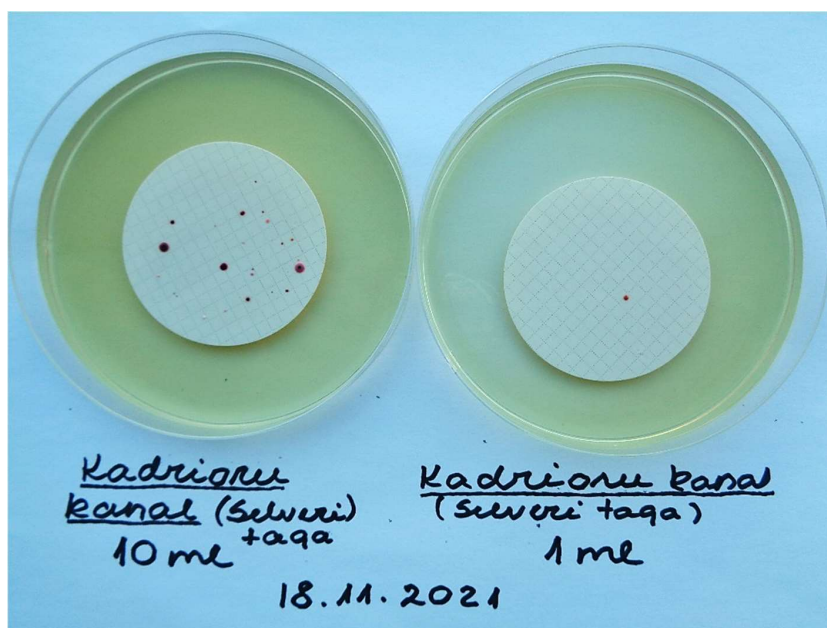
Kuupäev	Proovi nr.	Proovivõtu koht	<i>Escherichia coli</i> , pmü/100 ml	Enterokokid, pmü/100 ml
19.09.2021	Nr. 1	Saare tee toru	176	24
	Nr. 2	Lillepaviljoni toru	200	90
	Nr. 3	Lasnamäe sademevee kollektor	68	3
05.10.2021	Nr. 4	Russalka/surfimaja toru	20000	3060
	Nr. 1	Saare tee toru	282	42
	Nr. 2	Lillepaviljoni toru	210	1970
19.10.2021	Nr. 4	Russalka/surfimaja toru	16000	800
	Nr. 1	Saare tee toru	695	279
	Nr. 5	Kadrioru kanal	2050	680
18.11.2021	Nr. 1	Saare tee toru	8100	1200
	Nr. 4	Russalka/surfimaja toru	74000	26100
	Nr. 5	Kadrioru kanal	570	130
24.11.2021	Nr. 4	Russalka/surfimaja toru	7700	11550
	Nr. 5	Kadrioru kanal	800	1500
10.12.2021	Nr. 1	Saare tee toru	2100	860
	Nr. 2	Lillepaviljoni toru	0	0
	Nr. 3	Lasnamäe sademevee kollektor	400	8100
	Nr. 4	Russalka/surfimaja toru	31000	5000
	Nr. 5	Kadrioru kanal	4000	70



**Joonis 6.** Saare tee kollektorist 18.11.2021 võetud veeproovi analüüsi tulemused. Lähtudes varasematest analüüsitulemustest on läbi membraanfiltri filtreeritud 50 ml ja 10 ml proovi (filtrile kasvanud kolooniate tihedus peab võimaldama nende loendamist palja silma või 10x suurendava luubiga).



**Joonis 7.** Russalka lähedalt Surfimaja kõrval paikneva sademevee kollektorist 18.11.2021 võetud veeproovi analüüsi tulemused. Lähtudes varasematest analüüsitulemustest on läbi membraanfiltri filtreeritud 10 ml, 1 ml ja 0,1 ml proovi.



**Joonis 8.** Kadrioru kanalist 18.11.2021 võetud veeproovi analüüsi tulemused. Lähtudes varasematest analüüsitulemustest on läbi membraanfiltrit filtreeritud 10 ml ja 1 ml proovi.

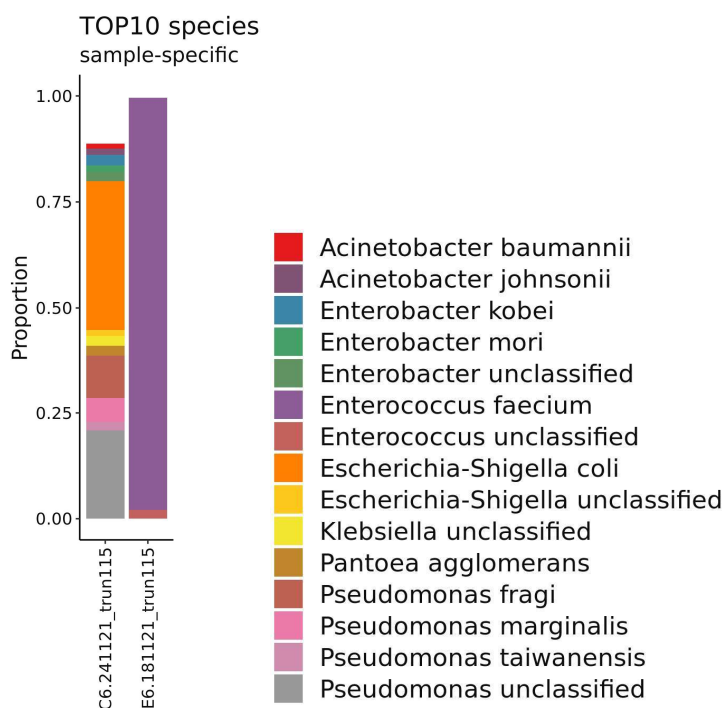
Kuna TTÜ Meresüsteemide instituudi akrediteeritud laboris pole *Escherichia coli* ega soole enterokokkide analüüside meetodikad akrediteeritud, tekkis vajadus saadud tulemusi täiendavalt kontrollida, milleks kasutati 16S rRNA sekveneerimist. Vastavate võimaluste puudumisel tellite sekveneerimisanalüüs samas hoones paiknevast Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskus AS-lt (TFTAK).

Sekveneerimiseks valitud proovide DNA sisaldused on välja toodud tabelis 6.

**Tabel 6.** Sekveneerimiseks kasutatud proov

Jrk	Proov	DNA kontsentratsioon [ng/μl]
1	C6-241121 (Joonis 5 vasakul olev külv)	180
2	E6-181121 (Joonis 5 paremal olev külv)	153

16S rRNA sekveneerimise tulemused on esitatud joonisena (joonis 9) ja tabelina (tabel 7). Bakteriaalse DNA sekveneerimise tulemusena tuvastati uuritud proovides vastavalt 13 ja 2 bakteriliiki, mille osakaal on suurem kui 0,1 %.



Joonis 9. TOP10 proovi-spetsiifilisi bakteriliiki.

Tabel 7. 16S rRNA geeni sekveneerimise tulemused. Proov # C6-241121 *E. coli* ja kolilaadsete bakterite tuvastamine Russalka/Surfimaja väljalasude veest:

Tuvastamise taksonoominile täpsus	Taksonoomiline üksus	Normaliseeritud osakaal
Liik	<i>Escherichia-Shigella coli</i>	0.351 – <i>fekaalne kolibakter</i>
Perekond	<i>Pseudomonas spp</i>	0.209
Liik	<i>Pseudomonas fragi</i>	0.102
Liik	<i>Pseudomonas marginalis</i>	0.056
Liik	<i>Enterobacter kobei</i>	0.025
Liik	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.023
Perekond	<i>Klebsiella spp</i>	0.023
Perekond	<i>Enterobacter spp</i>	0.022
Liik	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0.021
Liik	<i>Enterobacter mori</i>	0.016
Liik	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0.014
Perekond	<i>Escherichia-Shigella spp</i>	0.014
Liik	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.012

Proov # E6-181121 Enterokokkide tuvastamine Russalka/Surfimaja väljalasu veest:

Tuvastamise taksonoomiline täpsus	Taksonoomiline üksus	Normaliseeritud osakaal
Liik	<i>Enterococcus faecium</i>	0.974 – fekaalne enterokokk
Perekond	<i>Enterococcus spp</i>	0.021

**Analüüside tulemused õigustasid läbiviidud uuringut ja kinnitasid töö hüpoteesi „Tallinna lahte suubuv sademevesi võib teatud juhtudel kanda merre fekaalset reostust ning fekaalse päritoluga mikroorganisme, mille olemasolu sademevees tavapäraselt ei eeldata“ paikapidavust.**

Kõige üllatavam oli Russalka läheduses paikneva Surfimaja kõrval avanevast kollektorist (sademevee kogumisala teadmata) väljavoolava vee kõrge fekaalne reostatus. See avastus on seda olulisem, et just see liivas sängi uuristanud ojake on laste meelis mängupaik ja surfarite poolt aktiivselt kasutatav (ühe proovivõtu ajal pesid selles ennast kaks noormeest). Kõneallosel väljavool on ka ainus, mille vett seni pole analüüsitud.

Sekveneerimine kinnitas visuaalset tähelepanekut, et *E. coli* analüüsimiseks/tuvastamiseks väljatöötatud kromogeensööde *Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agar* on vähem selektiivne kui juba aastakümneid kasutusel olnud soole enterokokkide analüüsimise selektiivsööde *Slanetz and Bartley Agar*. *Slanetz and Bartley Agaril* kasvanud bakteritest oli fekaalsete ehk soole enterokokkide normaliseeritud osakaal 0,974, mis on väga kõrge. *Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agari* väiksema selektiivsuse fekaalsete kolibakterite suhtes kompenseerib väga selge värvipõhine kolooniate eristumine. Vastavalt meetodikale võetakse arvesse ainult tumesinised kuni sinised kolooniad, mis kuuluvad *Escherichia coli*-le.

## 5. Lahendused

Läbiviidud uurimistöö tõestas, et sademevee puhastamise enne merre juhtimist on siiski vajalik. On üsna tõenäoline, et lisaks bakteritele kannavad sademe- ja uhteveed merre ka keemilist saastet, õlijääke ja plasti, sh. mikroplasti. Järgnevalt on kirjanduses loetu põhjal välja pakutud mõned võimalused sademevee reostuskoormuse vähendamiseks.

### 5.1 Sademevee puhastamine

Saastunud sademevesi tuleb puhastada juba vahetult tekkekohas, puhastatud sademevesi ei tohiks kokku puutuda saastunud veega. Kui sademevee saastumist ei saa vältida, tuleks tegeleda sademevee (eel)puhastamisega vahetult saastunud sademevee tekkekohas, ning seejärel juhtida vesi keskkonda või täiendavaks puhastamiseks reoveepuhastisse. Puhastamist vajava veekoguse vähendamiseks on oluline vältida sademevee sattumist reoveekanalisesse. Saastatud sademevee tekke vältimiseks või selles reoainete koguse vähendamiseks peab reoveekogumisalade teid, väljakuid ja muid alasid, millelt sademevett ära juhitakse regulaarselt kuivalt puhastama. (Kooskora et al., 2018)

Loodusmaastikul imbub sademevesi maapinda, aurub, omastatakse ja aurustatakse taimede poolt ning osa veest jõuab lõpuks ka ojadesse ja jõgedesse. Ühiskonna ja majanduse arengust tingitud järjepidev linnastumine tekitab aga suuri muutusi loomulikus veeringes. Vett mitteläbilaskvate katusepindade ja kõvakattega pindade (teed, parklad) suure osakaalu tõttu on suurenenud sademevee äravool, vähenenud imbumine ja evapotranspiratsioon (koguaurumine vee pinnalt ja läbi taimestiku) ning halvenenud pinnasesse ja veekogudesse juhitava sademevee kvaliteet. Vett mitteläbilaskvate pindadele langev sademevesi muutub kiiremini ja suuremas koguses pindmiseks äravooluks, mis võib põhjustada üleujutusi, reostust ja erosiooniprobleeme. (Kuris et al., 2021)

Sademeveeprobleeme on võimalik lahendada kanalisatsiooni vastuvõtuvõime suurendamisega, kuid enamasti on kasulikum ja ka rahaliselt soodsam kasutada alternatiive – looduspõhiseid lahendusi, mis tõhustavad veekäsitlust, ühtlustavad veerežiimi, aga ka aitavad puhastada sademevett. (Kuris et al., 2021)

### 5.2 Looduslähedased sademeveesüsteemid

Looduslähedased ehk säästlikud sademeveesüsteemid (SUDS – *Sustainable Urban Drainage System*) on sademevee ärajuhtimiseks kasutatavad looduslikud rajatised, mis võimaldavad sademevee tõhusamat ja keskkonnasõbralikumalt käitlemist. Säästlike lahenduste peamine eesmärk on vähendada sademevee äravoolu kogust ja voolukiirust, hajutades, immutades ning kasutades sademevett selle tekkekohas nii palju kui võimalik. Looduslähedaste sademeveelahendustes kasutatakse taimedel põhinevaid süsteeme ja maastikuelemente, mis tähendab rohealade kujundamist, loodusliku mitmekesisuse ning esteetilise väärtuse suurendamist linnases ruumis. Selleks rajatakse peamiselt sademevee kogumissüsteeme, rohekatuseid ja -seinu, immutusribasid, nõvasid, vett läbilaskvaid kõnniteid, parklaid jne. Sellised sademeveesüsteemid ei

asenda niinimetatud klassikalist, torustikest ja kaevudest koosnevat süsteemi, vaid neid on mõistlik rakendada kombineeritult. (Kuris et al., 2021)

Looduslähedase sademeveesüsteemiga on võimalik ka vähendada sademevee saastesisaldust. Madala saastesisaldusega (näiteks otse katuselt tulenevat) sademevett saab kasutada kastmis- või majapidamisveeks. Keskmise ja madala saastetasemega sademevett võib üldjuhul ohutult pinnasesse immutada. (Kuris et al., 2021)

### **5.3 Sademevett puhastavad looduslähedased sademeveelahendused**

Lisaks sademevee ärajuhtimisele ja ajutisele mahutamisele võimaldavad teatud meetodid ka vee puhastamist saasteainetest. Saasteainete eemaldamine võib toimuda mitmel viisil – läbi pinnase/filterkihi filtreerimise teel, settimise käigus või bioloogiliselt (taimede ja mikroorganismide kaasabil). Sellised sademeveelahendused on täidisdreen, puhverriba, nõva, tiik, tehismärgala, imbkaev, imbkraav ja imbväljak/immutusala. (Kuris et al., 2021)

#### **Täidisdreen**

Täidisdreen on poorse materjaliga (killustik, kivid jne) täidetud süvend, milles tavaliselt paikneb ka drenaažitoru. See lahendus võimaldab sademevett filtreerida, ajutiselt mahutada ja seejärel juhtida järgmistesse sademeveesüsteemi komponentidesse. Täidisdreenid võivad edukalt asendada traditsioonilist torustikku sademevee edasijuhtimisel ning teede ääres kaob vajadus kasutada äärekive ja sademeveerenne.

#### **Puhverrida**

Puhverrida ehk haljariba on taimestikuga kaetud üle 2,5 meetri laiune kaldega ala, mis immutab sademevett, aeglustab selle voolukiirust ja puhastab vett mudast ning muudest tahketest osakestest ning saasteainetest. Selline lahendus on lihtsalt ja soodsalt rajatav ning sobib sademevee eelpuhastamiseks enne selle suunamist järgnevatesse säästliku sademeveesüsteemi komponentidesse.

#### **Nõva**

Nõva ehk viibekraav on madal, laugete nõlvadega taimestikuga kaetud nõgu sademevee kogumiseks, juhtimiseks, immutamiseks ja puhastamiseks. Nõva koosneb erineva veeläbilaskvusega filterkihtidest (taimede orgaaniline kiht, kasvupinnas, liiv (killustik) ja vajadusel dreenitoru). Nõva võib olla alalise ja ajutise veetäitega.

#### **Tiik**

Tiik on püsivalt veega täidetud veekogu, mille veetase tõuseb suuremate sadude korral. Tiigid aitavad maandada üleujutusohu, puhastavad vett (settimise, mikroorganismide ja taimestiku abil), mitmekesistavad linnalist ruumi ja toetavad elurikkust.

### **Tehismärgala**

Tehismärgalad on kunstlikult loodud märgala ökosüsteemid sademevee (ja ka reovee) puhastamiseks. Puhastus toimub füüsikalise-keemiliste ja bioloogiliste protsesside abil, nagu settimine, sadenemine, taimede poolt omastamine ja mikroobne lagunemine. Märgalad eemaldavad sademeveest setteid, raskmetalle ja lahustunud toitaineid. Selline lahendus talub sademeveele iseloomulikku kõikuvat hüdraulilist ja reostuskoormust, mis on probleem tavapuhastites.

### **Imbkaev**

Imbkaev on vett läbilaskva materjaliga täidetud maa-alune mahuti, kuhu sademevesi saab ajutiselt koguneda ja sealt aeglaselt pinnasesse imbuda. Imbkaevud aitavad vältida lompide teket, puhastavad äravoolavat sademevett ja taastavad põhjavett.

### **Imbkraav**

Imbkraav on madal kruusa või muu poorse materjaliga täidetud süvend, mis mahutab ajutiselt äravoolavat vett ja immutab seda pinnasesse. Imbkaev vähendab ja aeglustab märkimisväärselt sademevee äravoolu ning puhastab vett, kuid vajab regulaarset hooldust, et vältida ummistumist.

### **Imbväljak/immutusala**

Imbväljak ehk immutusala on nõgu, mida kasutatakse sademevee pinnasesse immutamiseks ning vee puhastamiseks. Suure alana võimaldab imbväljak korraga suure hulga sademevee käitlemist, kuid vältida tuleb saastunud vee sattumist põhjavette.



## 6. Arutelu

Erinevates uuringutes on välja toodud, et vetikate vohamise ja haisva lagunemise üheks teguriks, lisaks Soome ja Tallinna lahe eutrofeerumisele, on vähekontrollitud Tallinna lahte juhitud sademeveed. Ebameeldiva haisu põhjuseks võib olla sademeveekollektoritega merre kantavad fekaalsed bakterid, kelle orgaanika lagunemise rajad ja tekkivad vahe- ja lõpp-produktid erinevad merebakterite omast. (Künnis-Beres, 2017; Künnis-Beres et al., 2018)

Eelnevates veeseirete analüüside tulemustest on selgunud, et *E. coli* ja soole enterokokid esinevad suurel hulgal Tallinna lahte suunatavas sademevees (Estonian, Latvian & Lithuanian Environment OÜ (ELLE OÜ), 2021). Kuna sademevee puhul viitab fekaalsete bakterite rohke esinemine kokkupuutele või segunemisele elukondliku reoveega, mis alati sisaldab lisaks mikroobidele ka rohkesti toitaineid, siis võib sellist vett pidada terviseohu tekitajaks, aga ka eutrofeerumise soodustajaks.

Töös läbiviidud uuringud kinnitasid püstitatud hüpoteesi – uurimispiirkonnas neljast suurema vooluhulgaga sademevee kollektorist/torust juhtisid järjepidevalt lahte fekaalsete bakteritega (*E. coli*, soole enterokokid) reostunud vett niimetatud Saare tee toru ja Russalkast Pirita pool paikneva surfimaja kõrval avanev sademevee kollektor (voolab lookleva ojana merre). Fekaalsete bakterite erilise rohkusega paistis silma just surfimaja kõrval paikneva kollektori vesi. Kõrge fekaalbakterite järjepidev kontsentratsioon nimetatud väljalaskude vees, näitab, et merre ei suunata üksnes sademevett, vaid torustikku peab olema juhitud ka fekaalvett (olmevett).

Lõputöös saadud analüüsitulemused kinnitavad varasemaid teadlaste seisukohti, et vähemalt osa sademevee sissevooludest Tallinna lahte tuleks likvideerida. Selleks tuleks suunata sademevesi reoveepuhastitesse ja/või kasutada erinevaid looduslähedasi sademeveesüsteeme kombineeritud traditsiooniliste süsteemidega. Kõrge *E. coli* ja soole enterokokkide sisaldusega vesi võib olla nakkusohtlik ja sisaldada ka mitmesuguseid patogeenseid mikroorganisme. Terviseriski suurendab ka asjaolu, et kõige reostatumaks osutunud sademevee väljalask (surfimaja kõrval paiknev kollektor) asub inimeste poolt külastatavas kohas, kus toimub aastaringne puhketegevus. Samuti soodustavad fekaalsed bakterid rannas vetikate lagunemist eriti haisval moel, mis on suureks probleemiks piirkonnas elavatele elanikele ja külastajatele.

## Kokkuvõte

Tallinna lahe ökosüsteemi ja vee kvaliteeti määravateks teguriteks on eutrofeerumine ja prahistumine. Toitainete sissekande ja sellest tingitud eutrofeerumise üheks väljundiks on suviti randa kanduvad vetikad, mis massilise esinemise korral rannal ja rannalähedases vees lagunema ning haisema hakkavad. Erinevates uuringutes on välja toodud, et vetikate vohamise ja haisva lagunemise põhiteguriks on küll Soome ja Tallinna lahe eutrofeerumine, mille suurimaks põhjuseks on suure tõenäosusega Pirita jõe veega merre kantavad toitained, kuid ebaseeldiva haisu teket soodustavad ka vähekontrollitud Tallinna lahte juhitud sademeveed. (Künnis-Beres, 2016, 2017; Künnis-Beres et al., 2022)

Käsitleva lõputöö eesmärgiks oli välja selgitada Tallinna lahte Pirita tee äärsel rannalõigul Vana Sadamast Pirita purjekeskuseni suubuvate sademevee kollektorite vee mikrobioloogiline koostis, et kindlaks määrata sademeveega merre lisanduv tegelik mikrobioloogiline reostuskoormus. Sel eesmärgil analüüsiti sademevees fekaalse reostuse indikaatorbakterite *Escherichia coli* (*E. coli*) ja soole enterokokkide esinemist ja arvukusi. Kuna sademevee puhul viitab fekaalsete bakterite rohke esinemine kokkupuutele või segunemisele elukondliku reoveega, mis alati sisaldab lisaks mikroobidele ka rohkesti toitaineid, siis võib sellist vett pidada terviseohu tekitajaks ja eutrofeerumise soodustajaks.

Töös tehtud uuringud kinnitasid hüpoteesi, et Tallinna lahte suubuv sademevesi võib teatud juhtudel kanda merre fekaalset reostust ning fekaalse päritoluga mikroorganisme. Uurimispiirkonnas juhtisid Tallinna lahte järjepidevalt fekaalsete bakteritega (*E. coli*, soole enterokokid) reostunud vett neljast suurema vooluhulgaga sademevee kollektoritest kaks – niinimetatud Saare tee toru ja Russalkast Pirita pool paikneva surfimaja kõrval avanev sademevee kollektor. Fekaalsete bakterite erilise rohkusega paistis silma just surfimaja kõrval paikneva kollektori vesi. Kõrge fekaalbakterite järjepidev kontsentratsioon nimetatud väljalaskude vees, näitab, et merre ei suunata üksnes sademevett, vaid torustikku peab olema juhitud ka fekaalvett (olmevett).

Lõputöös läbiviidud uuringud kinnitavad varasemaid teadlaste seisukohti, et vähemalt osa sademevee sissevooludest tuleks likvideerida. Selleks tuleks suunata sademevesi reoveepuhastitesse ja/või kasutada erinevaid looduslähedasi sademeveesüsteeme kombineeritud traditsiooniliste süsteemidega. Kõrge *E. coli* ja soole enterokokkide sisaldusega vesi võib olla nakkusohtlik ja sisaldada ka mitmesuguseid patogeenseid mikroorganisme. Terviseriski suurendab ka asjaolu, et kõige reostatumaks osunud sademevee väljalask (surfimaja kõrval paiknev kollektor) asub inimeste poolt külastatavimas kohas, kus toimub aastaringne puhketegevus. Samuti soodustavad fekaalsed bakterid rannas vetikate lagunemist eriti haisval moel, mis on suureks probleemiks piirkonnas elavatele elanikele ja külastajatele.

Antud lõputöö käigus läbiviidud uuringud viitavad edasiste täiendavate uuringute, aga ka ilmnunud reostuse likvideerimise vajadusele. Selline teadmine on väga oluline Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete kavandamisel.

## **Tänuavaldused**

Autor soovib tänada käesoleva lõputöö juhendajat Kai Künnis-Berest, kes oli suuresti abiks oma teadmiste ja soovitustega töö valmimise protsessis. Samuti sooviks ka tänada Sirje Sildvere ning teisi TTÜ Meresüsteemi Instituudi töötajaid, kes olid igati abivalmid vajadusel aitama.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2014). Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6212), 954–959. <https://doi.org/10.1126/science.1260144>
- Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46(3), 241–280. <https://doi.org/10.1128/mr.46.3.241-280.1982>
- Boehm, A. B., & Sassoubre, L. M. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, & N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/#indicators.Enterococci\\_as\\_Indicators\\_of](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/#indicators.Enterococci_as_Indicators_of)
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/mubr.00023-12>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Publishing Group*, 16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Cabral, J. P. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 367–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Clarridge 3rd, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Condalab. (2020). *Slanetz-Bartley Medium ISO*. <https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/158-11512-slanetz-bartley-medium-iso.html> (31.05.2022)
- Cox, M. J., Cookson, W. O. C. M., & Moffatt, M. F. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 22(R1), R88–R94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398>
- Davis, C. P. (1996). Normal Flora. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. (4th ed.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Devane, M. L., Moriarty, E., Weaver, L., Cookson, A., & Gilpin, B. (2020). Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring. *Water Research*, 185, 116204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116204>
- Erm, A., Buschmann, F., Maljutenko, I., Listak, M., & Rebane, J. (2014). *Reostuse tekkepõhjuste ja edasikandemehhanismide uuring Kadrioru-Maarjamäe rannikumeres (projektiaruanne)*. Tallinn: TTÜ Meresüsteemide Instituut.
- Estonian, Latvian & Lithuanian Environment OÜ (ELLE OÜ). (2021). *Tallinna sademevee seire 2019-2021*.
- Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum*, 7(4), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018>
- Forster, B., & Pinedo, C. A. (2015). *Bacteriological Examination of Waters: Membrane Filtration Protocol*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/Protocols/Bacteriological-Examination-of-Waters-Membrane-Fi> (31.05.2022)

- García-solache, M., & Rice, L. B. (2019). The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *American Society for Microbiology*, 32(2).
- Grice, E. A. (2015). The intersection of microbiome and host at the skin interface: genomic- and metagenomic-based insights. *Genome Research*, 25(10), 1514–1520. <https://doi.org/10.1101/gr.191320.115>
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29(11), 996–1011. <https://doi.org/10.1086/591861>
- Horan, N. J. (2003). Faecal indicator organisms. In D. Mara & N. Horan (Eds.), *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (pp. 105–112). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50008-X>
- Hussain, Q. A. (2019). Bacteria: The natural indicator of environmental pollution. In D. Mara & N. Horan (Eds.), *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems* (pp. 393–220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>
- Jaanus, A., Torn, K., & Kotta, I. (2011). Tallinna lahe veekeskonna ja põhjelaestiku muutused viimastel aastakümneditel. Tallinn: *AS Eesti Ajalehed*, Inimmõju Tallinna keskkonnale VI (90-94).
- Kator, H., & Rhodes, M. (2003). Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance. In D. Mara & N. Horan (Eds.), *Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (pp. 113–144). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50009-1>
- Kooskora, T., Viirma, M., Tamm, P., & Kalberg, H. (2018). *Kombineeritud sademevee strateegia*. [https://www.etag.ee/wp-content/uploads/2019/02/Sademevesi\\_Lõpparuann\\_KEM.pdf](https://www.etag.ee/wp-content/uploads/2019/02/Sademevesi_Lõpparuann_KEM.pdf) (31.05.2022)
- Künnis-Beres, K. (2016). *Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete katsetamine ja mõju hindamine. I etapp: Tallinna lahe rannatsoonis perioodiliselt ilmuva haisu ning vetikate seoste konkretiseerimine (vahearuanne)*. Tallinn: TTÜ Meresüsteemide Instituut.
- Künnis-Beres, K. (2017). *Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete katsetamine ja mõju hindamine (15.07.2016–15.12.2017) (lõpparuanne)*. Tallinn: TTÜ Meresüsteemide Instituut.
- Künnis-Beres, K., Elken, J., & Lips, I. (2018). *Merevees esinevate võimalike patogeenide pilootseire*. Tallinn: TTÜ Meresüsteemide Instituut.
- Künnis-Beres, K., Uipoupin, R., Väli, G., Sildever, S., & Siht, E. (2022). *Tehniline uuring Pirita tee äärsel rannaala ja kaldakindlustuse ümberkujundamiseks* (p. 53). TTÜ Meresüsteemide Instituut.
- Kuris, M., Mandre, G., Kuusemets, V., & Mik, A. (2021). *Looduslähedased sademeveesüsteemid: Eesti kliimasse sobivad sademeveelahendused*. Tallinn: UrbanStorm.
- Laboratories, H. (2019). *Slanetz and Bartley Medium*. <https://himedialabs.com/TD/M6121.pdf> (31.05.2022)
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Lutsar, I., Mikelsaar, M., & Karki, T. (2007). *Meditiiniline mikrobioloogia: bakterioloogia ja*

mükoloogia, II osa. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

- Odonkor, S. (2013). E. coli as an indicator of bacteriological quality of water: An overview. *Microbiology Research*, 4. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>
- Paalme, T. (2011). *Tallinna lahe keskkonnaseisundit mõjutavad survetegurid, nende põhjused ning mõjude vähendamise võimalused (aruanne)*. Tallinn: TÜ Eesti Mereinstituut.
- Pay, H., & Scopes, E. (2017). *Thermo Scientific Chromogenic Coliform Agar (ISO) Demonstrates Superior Detection of Coliform From Water With Low Bacterial Numbers*. [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-Chromogenic-Coliform-Agar-\(ISO\)-Demonstrates-Superior-Detection-of-Coliforms-From-Waters-With-Low-Bacterial-Numbers-LT2327A-global-EN.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-Chromogenic-Coliform-Agar-(ISO)-Demonstrates-Superior-Detection-of-Coliforms-From-Waters-With-Low-Bacterial-Numbers-LT2327A-global-EN.pdf) (31.05.2022)
- Põhja-Eesti Regionaalhaigla. (2018). *Vankomütsiin-resistentne enterokokk*. Põhja-Eesti Regionaalhaigla. [https://haiglateliit.ee/wp-content/uploads/2015/03/Vankomutsiinresistentne\\_enterokokk1.pdf](https://haiglateliit.ee/wp-content/uploads/2015/03/Vankomutsiinresistentne_enterokokk1.pdf) (31.05.2022)
- Reid, G., Howard, J., & Gan, B. S. (2001). Can bacterial interference prevent infection? *Trends in Microbiology*, 9(9), 424–428. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02132-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02132-1)
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 99–117. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00235-0)
- Scharschmidt, T. C., & Fischbach, M. A. (2013). What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome. *Drug Discovery Today. Disease Mechanisms*, 10(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2012.12.003>
- Schmidt, T. M., DeLong, E. F., & Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*, 173(14), 4371–4378. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4371-4378.1991>
- Soriano-Lerma, A., Pérez-Carrasco, V., Sánchez-Marañón, M., Ortiz-González, M., Sánchez-Martín, V., Gijón, J., Navarro-Mari, J. M., García-Salcedo, J. A., & Soriano, M. (2020). Influence of 16S rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples. *Scientific Reports*, 10(1), 13637. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70141-8>
- Supriya, N. (n.d.). Membrane Filtration Method. *Biology Reader*. <https://biologyreader.com/membrane-filtration-method.html> (31.05.2022)
- Tallinna Keskkonnaamet. (2012). *Tallinna sademevee strateegia aastani 2030*. <https://www.riigiteataja.ee/aktilisa/4090/3201/3041/2110123505.attachment.pdf#> (31.05.2022)
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Oxoid Dehydrated Culture Medium. Chromogenic Coliform Agar*. [http://www.mesdia.com/upload/attach/CM1205\\_IFUEng.pdf](http://www.mesdia.com/upload/attach/CM1205_IFUEng.pdf) (31.05.2022)
- Tilden, J. J., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J., & Morris, J. G. J. (1996). A new route of transmission for Escherichia coli: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health*, 86(8), 1142–1145. [https://doi.org/10.2105/ajph.86.8\\_pt\\_1.1142](https://doi.org/10.2105/ajph.86.8_pt_1.1142)
- Veeseadus. (2019). Riigiteataja, 13.02.2016 otsus nr 385. <https://www.riigiteataja.ee/akt/122022019001> (31.05.2022)
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Baño, J., Baquero, F., &

- Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Vogt, R. L., & Dippold, L. (2005). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002. *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)*, 120(2), 174–178. <https://doi.org/10.1177/003335490512000211>
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288–1301. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.174>
- WHO. (2008). Guidelines for Drinking-Water Quality. In *World Health Organization* (Vol. 1, Issue 3, pp. 307–312). WHO Press. <https://doi.org/10.1248/jhs1956.35.307>
- WHO. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> (31.05.2022)
- Wilson, M. (2004). *Microbial Inhabitants of Humans*. UK: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511735080>

## Lisad

### LISA 1. Proovivõtu kohad.

Saare tee toru (1):



Lillepaviljoni toru (2):





**Sademevee kollektor (3):**



**Russalka/Surfimaja toru (4):**



**Kadrioru kanal (5):**



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Grete Jõgisoo

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
TALLINNA LAHTE SUUBUVA SADEMEVEE MIKROBIOLOOGILINE KVALITEET,  
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Kai Künnis-Beres

*(juhendaja nimi)*

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

01.06.2022 (kuupäev)