



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Pestitsiidide mõju mulla mikroobikooslusele

Magistritöö tööstusökoloogia erialal

Juhendaja/õppejõud: Sander Kutti, MSc

Üliõpilane: Janno Jegers
132523NAEMM

Üliõpilase meiliaadress: janno.jegers@gmail.com

Õppekava nimetus: tööstusökoloogia

Tartu 2017

Autorideklaratsioon

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

.....
Kuupäev

.....
Allkiri

Sisukord

Jooniste loetelu	5
Tabelite loetelu	6
Sissejuhatus	7
1 Kirjanduse ülevaade	9
1.1 Bakterid	9
1.1.1 Keskkonnatingimused	10
1.1.2 Paljunemine	11
1.1.3 Ainevahetus	12
1.2 Seened.....	13
1.2.1 Keskkonnatingimused	14
1.2.2 Ainevahetus	14
1.3 Arhed ja mikrovetikad	16
1.4 Mikroorganismide omavahelised suhted	18
1.5 Põllumajanduses kasutatavad pestitsiidid.....	20
1.5.1 Peamised pestitsiidide rühmad	21
1.5.2 Pestitsiidide keemiline koostis ja omadused	21
1.5.3 Pestitsiidide toimemehhanismid	23
1.5.4 Mikroorganismide reageering pestitsiididele	25
2 Materjal ja meetodika.....	28
2.1 Mikroorganismide biomassi ja mikroobikoosluse hingamisaktiivsuse määramine	29
2.2 Kasutatud söötmeplaadid.....	31
2.3 Inhibitsioonitest	32
2.4 Bakterite ja seente identifitseerimine	33
3 Tulemused	35
3.1 Mikroorganismide biomass ja mikroobikoosluse hingamisaktiivsus.....	35
3.2 Inhibitsioonitest	36
3.2.1 Karate	36
3.2.2 Fastac	37

3.2.3 Ranger.....	38
3.2.4 Stomp.....	39
3.2.5 Kontroll.....	40
3.3 Bakterite ja seente identifitseerimine	40
4 Arutelu	42
Kokkuvõte	46
Summary.....	48
Tänuõnad.....	50
Kasutatud kirjandus	51
Lisa 1	55
Lisa 2	56

Jooniste loetelu

Joonis 1. Mikroorganismide biomass SIR meetodil.....	35
Joonis 2. Mikroorganismide hingamisaktiivsus (BA).....	36
Joonis 3. Bakterite KMÜ-d Karatega töödeldud söötmeplaatidel.....	36
Joonis 4. Seente KMÜ-d Karatega töödeldud söötmeplaatidel.....	37
Joonis 5. Bakterite KMÜ-d Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel	37
Joonis 6. Seente KMÜ-d Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel	38
Joonis 7. Bakterite KMÜ-d Rangeriga töödeldud söötmeplaatidel.....	38
Joonis 8. Seente KMÜ-d Rangeriga töödeldud söötmeplaatidel.....	39
Joonis 9. Bakterite KMÜ-d Stompiga töödeldud söötmeplaatidel.....	39
Joonis 10. Seente KMÜ-d Stompiga töödeldud söötmeplaatidel	40

Tabelite loetelu

Tabel 1. Bakterite söötmeplaadi koostisosad	31
Tabel 2. Seente söötmeplaadi koostisosad	32
Tabel 3. Bengaalpunase 5% lahus	34

Sissejuhatus

Maailmas kasutatakse aastas umbes 3,5 miljonit tonni pestitsiide (Aislabie *et al*, 2013). Sealjuures jõuab umbes 0,3% kasutatud pestitsiidist kahjurini, keda soovitakse tõrjuda (Munoz-Leoz *et al*, 2011). Seetõttu on pestitsiidide või nende jääkide esinemine mullas muutunud tõsiseks keskkonnaprobleemiks (Morillo *et al*, 2017). Pestitsiidid on mõeldud kahjurite tõrjumiseks, mis üldiselt tähendab, et kahjureid soovitakse hävitada, seega peavad pestitsiidid mõjuma toksiliselt. Tänapäeval kasutatakse kõrge selektiivsusega pestitsiide, aga ka need mõjuvad toksiliselt mitte ainult kahjuritele vaid ka teistele organismidele. Kuna suur osa kasutatavatest pestitsiidide jõuab mulda, siis hakkab see mõjutama mullaelustikku. Seetõttu on oluline teada, mis pestitsiidiga mullas toimub ja kuidas reageerivad pestitsiidile mullas elavad organismid. (Bending *et al*, 2007)

Mulda sattunud pestitsiidid lagundatakse ja kahjutustatakse peamiselt mulla mikroobikoosluse poolt. Vähe on teada, kuidas mõjutavad pestitsiidid mulla mikroorganisme, sest puuduvad standardiseeritud katsed, mis võimaldaks mõõta pestitsiidide mõju samadel alustel (Karpouzas *et al*, 2014). Käesolev töö ei paku välja kuidas mõõta standardiseeritult kõikide pestitsiidide mõju kõikidele mulla organismidele, kuid astub sammukese lähemale mõistmaks, kuidas reageerivad mikroorganismid mulda sattunud pestitsiidile.

Käesolev töö annab ülevaate peamistest mullas esinevatest mikroorganismidest. Lisaks annab ülevaate erinevatest pestitsiididest, nende liigitustest ja toimemehhanismidest. Uurimuse eesmärkideks olid:

- välja selgitada, kas erinevatel pestitsiididel on erinev mõju mulla mikroobikooslusele
- uurida, kas pestitsiididel on mõju mulla mikroobikoosluse liigirikkusele
- uurida, millistel kontsentratsioonidel omavad erinevad pestitsiidid mikroorganismide jaoks inhibeerivat efekti

Töö käigus teostati katseid, kus kasutati erinevatel kontsentratsioonidel herbitsiide ja insektitsiide. Töö põhilised uurimisülesanded olid:

- kas katsetes kasutatud pestitsiidid mõjuvad sarnaselt kui teaduskirjanduses kirjeldatud
- kas väga suur pestitsiidikontsentratsioon, mis ületab oluliselt tootjapoolset soovitusi, on võimeline hävitama mulla mikroobipopulatsiooni
- välja selgitada, millised bakteri- ja seeneperekonnad on vastupidavad pestitsiidijääkidele

1 Kirjanduse ülevaade

Kõiki eluvorme arvesse võttes on mulla elurikkus palju suurem kui üheski teises elukeskkonnas maakeral. Eriti märkimisväärse osa mulla elustikust moodustavad mikroorganismid. Praeguse nägemuse kohaselt jagunevad elusolendid kolme domeeni – eukariootid, bakterid ja arhed, keda võib ühiselt nimetada ka prokariootideks. Mikroorganismid kuuluvad nii eukariootide kui ka prokariootide hulka. (Betsy *et al*, 2005)

Käesolevas töös käsitletakse detailsemalt baktereid ja seeni, sest ülejäänud mulla mikroorganismid ei ole samadel alustel laboritingimustes kultiveeritavad.

1.1 Bakterid

Mullas elutsevad bakterid on väga tähelepanuväärsed, moodustades külluslikke populatsioone ja olles tavaliselt suuremaarvulisim rühm mulla mikroorganismide hulgas. Sobilike keskkonnatingimuste juures on bakterid võimelised plahvatuslikult paljunema, lagundades sealjuures suures koguses erinevaid toitaineid. (Alexander, 1977)

Kuna bakterid on mõõtmetelt väga väikesed, on neil toitainete omastamisel eelis. Mida suurem on bakteri raku pindala ja ruumala suhe, seda paremini on võimalik omastada toitaineid ka madalate kontsentratsioonide korral. Selle tingib asjaolu, et bakteri rakk on vahetumas kohtaktis füüsilise keskkonnaga ja seal leiduvate toitainetega. Lisaks teistele mikroorganismidele, konkureerivad bakterid toitainetele ka omavahel. Näiteks omavad spiraali-kujulised bakterid eelist kepi-kujuliste bakterite ees, kuna esimestel on suurem raku pindala ja ruumala suhe, mistõttu omandab toitaineid paremini ja tõrjuvad piiratud toitainete tingimustes kepi-kujulised bakterid välja. (Soil microbiology ..., 2007)

Vähesed mikroorganismid moodustavad rakus sisemisi spore ehk endospore. Endospore moodustavad näiteks *Bacillus* ja *Clostridia* perekonda kuuluvad bakterid,

olles sealjuures vastupidavad vaenulikele keskkonnatingimustele, näiteks äärmuslikud temperatuurid ja kõrge rõhk. (*Ibid*)

Baktereid ümbritseb tugev rakukest, mis kaitseb rakku tsütolüüsi eest. Rakukesta ehituse järgi jaotatakse bakterid grampositiivseteks, gramnegatiivseteks ja mükoplasmadeks (Bergey's manual ..., 2005). Grampositiivsete bakterite rakukest koosneb ühest kihist peptidoglükaanist, mis ümbritseb rakumembraani. Peptidoglükaan on polümeer, mis koosneb omavahel ühendatud N-atsetüülglükosamiini ja N-atsetüülmuraanhappe ahelatest. Tavaliselt sisaldab grampositiivsete bakterite rakukest ka teihhoiinhapet, mis on ribitooli või glütserooli polümeer, olles seotud fosfaatide rühmaga, sisaldades aminohappeid ja suhkruid. Gramnegatiivsete bakterite rakukest koosneb õhemast peptidoglükaani kihist, mis on ümbritsetud välimise membraaniga. Peptidoglükaani ja välimise membraani vahel on periplasmaatiline ruum, mis sisaldab ensüüme, mille abil toimub toitainete omandamine, elektronide transport ja toksiinide eest kaitsmine. (*Soil microbiology ...*, 2007)

Mükoplasmaid ehk rakukestata bakterid ei sünteesi peptidoglükaani, seetõttu puudub neil rakusein. Mükoplasmaid on ümbritsetud välismembraaniga. (Bergey's manual ..., 2005)

1.1.1 Keskkonnatingimused

Mitmed muutujad mõjutavad mullas elavate bakterite populatsioonide kooslust ja arvukust. Põhilisteks mõjutajateks on keskkonnatingimused – niiskus, õhustatus, temperatuur, orgaanilise- ja anorgaanilise aine sisaldus ja happelisus. (Alexander, 1977)

Sobiliku hulga niiskuse olemasolu on bakteritele väga oluline, kuna vesi on protoplasma olulisim komponent. Samas ei tohi niiskust ka liiga palju olla, sest see pärsib bakterite vohamist. Seda eelkõige sellepärast, et vesi takistab rakkude gaasivahetust, alandades omastamiseks kättesaadava hapniku hulka, moodustades anaeroobse keskkonna. Leidub ka baktereid, kes elavad ainult liigniisketes muldades ja vajavad anaeroobset keskkonda. (*Ibid*)

Õhustatuse tasemest sõltub, millise eluviisiga bakterid suudavad vastavas keskkonnas elada. Baktereid võib klassifitseerida, eristades aeroobse, anaeroobse ja fakulatiivanaeroobse eluviisiga baktereid. Aeroobsed bakterid vajavad hapnikku, mis aeroobse hingamise käigus toimiks elektroni aktseptorina. Anaeroobsed bakterid vajavad molekulaarse hapniku puudumist, kasutades teisi anorgaanilisi elektroni aktseptoreid. Fakulatiivaneroobsed bakterid võivad elada nii aeroobses kui ka anaeroobses keskkonnas. Sellised bakterid on tavaliselt denitriifitseerijad, kasutades hapniku asemel lämmastikku elektroni aktseptorina. (Soil microbiology ..., 2007)

Temperatuur on üks olulisimaid baktereid mõjutavaid keskkonnatingimusi. Igal bakteril on optimaalne temperatuurivahemik, millise juures toimub kõige kiirem kasv. Enamik baktereid on mesofiilid, kasvades kõige meelsamini temperatuurivahemikus 25 – 35°C, jäädes ellu ka vahemikus 15 – 45°C. Psührofiilid elavad külmades keskkonnatingimustes, kus temperatuur ei ületa 20°C. Termofiilide jaoks optimaalne temperatuurivahemik on 45 – 65°C.

Orgaanilise aine sisaldus mõjutab oluliselt bakterite arvukust. Rohke orgaanilise aine sisaldusega, huumuserikastes muldades on bakterite arvukus märkimisväärselt kõrgem, kui vähese orgaanilise aine sisaldusega muldades. Kuigi orgaaniline süsinik on toitainetest üks olulisimaid, vajavad bakterid kasvamiseks ka anorgaanilisi toitaineid. (Alexander, 1977)

Tugevalt happelised ja aluselised mullad mõjuvad bakteritele inhibeerivalt. Üldiselt eelistavad bakterid neutraalseid või selle lähedasi muldasid. (*Ibid*)

1.1.2 Paljunemine

Bakterid on kohanenud eluks keskkonnades, mis tuleb kiiresti koloniseerida. Seda eesmärki täidab bakterite kiire paljunemisvõime. Valdav enamus baktereid paljuneb pooldumise teel, mis ideaalsetes tingimustes võib toimuda iga 20 minuti järel. Bakterite paljunemiseks toimub rakus kromosoomide replikatsioon, mis loob eelduse raku pooldumiseks, moodustades kaks rakku, mis mõlemad sisaldavad samu geene. (Microbial physiology, 2002)

Viies bakterid konkurentsivabasse keskkonda, kus valitsevad neile sobilikud tingimused, hakkab populatsioon kiiresti kasvama. Esialgu toimub bakteritel uue keskkonnaga kohandumine, misjärel algab eksponentsiaalse kasvu periood. Eksponentsiaalne kasv lõpeb, kui populatsioon jõuab konkreetse elupaiga taluvuspiirini. Peale seda jätkub bakterirakkude jagunemine, aga samal ajal hukub võrdvärsel hulgal baktereid, hoides populatsiooni arvukuse taluvuspiiri lähedal. Taluvuspiiriks kujuneb tavaliselt esialgse toitainearvu ammendumine, toksiliste jääkproduktide kuhjumine, hapniku ärakasutamine või ebasobiliku pH taseme tekkimine. (*Ibid*)

1.1.3 Ainevahetus

Bakterite ainevahetus on väga mitmekesine ja hõlmab substraadi oksüdatsiooni ja lagundamise keemilisi reaktsioone. Nende reaktsioonide käigus lagundatakse molekule, mille tulemusel toimub energia tootmine. Toodetud energia talletamiseks moodustuvad kõrge energiasisaldusega ühendid adensiindifosfaadid (ADP) ja adensiinrifosfaadid (ATP), mis ladustatakse rakus. Üheks levinud viisiks energia tootmiseks on orgaaniliste ühendite oksüdatsioon, ehk heterotroofne ainevahetus. Heterotroofsed bakterid vajavad juba olemasolevaid orgaanilisi ühendeid, ega ole võimelised neid ise tootma. Kõige sagedamini kasutatakse toitaineteks sahhariide, rasvu ja valke, mida oksüdeerides sünteesitakse energiaallikad ehk ATP-d. Sama protsessi käigus toodetakse ka lihtsamaid orgaanilisi ühendeid, mida bakteri rakk kasutab biosünteesiks või assimilatsiooni reaktsiooniks. (*Medical microbiology, 1996*)

Fototroofsed organismid on võimelised süsihappegaasist glükoosi sünteesima, kasutades vett vesinikuallikana, päikesevalgust energiaallikana ja nitraate lämmastikuallikana. (*Ibid*)

Autotroofsed organismid kasutavad anorgaanilisi ühendeid, süsihappegaasi ja lämmastikuallikana ammooniumit, nitraate või molekulaarset lämmastikku. Nad ei vaja energiaallikana päikesevalgust, vaid kasutavad spetsiifiliste anorgaaniliste ühendite oksüdatsioonil saadud energiat. Autotroofide hulgas leidub ka baktereid, kes on võimelised väävlühendeid oksüdeerima. (*Ibid*)

1.2 Seened

Seentel on ökosüsteemides väga tähtis roll, olles lagundajatena oluliseks lüliks toiduahelas ja ainerings. Seened on erinevates suhetes nii elusate kui ka surnud organismidega. Kõik seened on heterotroofsed, seega sõltub nende elutegevus orgaanilise aine olemasolust, mida kasutatakse energiaallikana. Lisaks on seened olulised mutualistid, moodustades taimejuurtega koos mükoriisa. Mükoriisa moodustub 90% taimede juurestikus, kus seened toodavad taimedele tarvilikke toitaineid. (Carlile *et al*, 2001)

Seeni on praeguseks kirjeldatud üle saja tuhande erineva liigi, mida arvatavasti on vähemalt suurusjärgu võrra vähem kui tegelik liikide arv. Seened on mikroorganismide üheks peamiseks komponendiks, asustades peaaegu igat elupaika. Seened jagunevad vähemalt kuude hõimkonda – kandseened (*Basidiomycota*), kottseened (*Ascomycota*), krohmseened (*Glomeromycota*), viburseened (*Chytridiomycota*), jõnksviburseened (*Blastocladiomycota*) ja *Neocallimastigomycota*. Geneetilised andmed viitavad rohkemate hõimkondade olemasolule, aga nende seosed ei ole päris täpselt kirjeldatud. (Watkinson *et al*, 2016)

Seened kuuluvad eukariootide hulka, seetõttu on nende rakuehitus sarnane loomade, taimede ja protistide omaga. Seentel on rakumembraan, rakutuum ja keerukad rakusisesed membraanide süsteemid. Enamikel liikidel on mitokondrid, ning esineb ka selliseid organelle, mida taimedel või loomadel ei ole (*Ibid*). Seente rakumembraan sisaldab kitiini, mida taimede või loomade rakukestad ei sisalda (Webster *et al*, 2007). Selle omaduse järgi saab seeni eristada näiteks taimedest.

Enamus seeni moodustavad ja koosnevad hüüfidest, mis on pikad silinderjad rakud. Mullas esinevad hüüfid sageli pikkade hargnenud niidistikena ehk mütseelidena. Mütseelid koosnevad seega paljudest rakkudest ja võivad olla mitme kilomeetri pikkused (Hariduskeskus, 2015). Pärmseened hüüfe ei moodusta, vaid kasvavad pungumisega. Pärmseened on ainuraksed organismid. Leidub ka seeni, kellel võib esineda nii pärmseene vorm kui ka hüüfe moodustava mütseeli vorm. Erinevad vormid esinevad vastavate keskkonnatingimuste avaldudes. (DiSalvo, 2017)

1.2.1 Keskkonnatingimused

Seened suudavad kasvada väga erinevate keskkonnatingimuste juures. Nagu varasemalt mainitud, on seened heterotroofsed, seega on esimeseks kasvu mõjutavaks keskkonnatingimuseks süsinikuallikate olemasolu. Seened suudavad elada nii happelises kui ka aluselises keskkonnas, hõivates kohati ka selliseid elupaiku, kus bakterid pole võimelised elama. Seeni võib leida elupaikades mille pH on üle kahe ja ka kohtadest, mille pH on üle üheksa. (Alexander, 1977)

Enamike seente jaoks on vesi väga oluline, milleta pole praktiliselt võimalik kasvada. Seda seetõttu, et seened pole ilma veeta võimelised ainevahetuseks vajalikke keemilisi protsesse läbi viima. Sealjuures leidub ka sellist tüüpi seeni, kes elavadki keskkonnades, kus on vähe vett. Sellised seened on kohanenud eluks keskkonnas, kus nad võivad ära kuivada, kuid vaba vee olemasolu korral hakkavad jälle kasvama. (Karch, 2008)

Valdav osa seentest on mesofiilse eluviisiga, termofiilsed seened esinevad üldiselt ainult kuumenenud kompostis või mulla pindmistes kihtides, kus päike soojendab mulda üle 40°C. Leidub ka perekondi, kes paljunevad söötmeplaatidel 6°C juures. (Alexander, 1977)

Haritud muldades elavad seened valdavalt ülemistes kihtides, kuigi sageli on leitud suuri populatsioone ka 50 cm sügavusel ja madalamalgi. Sügavuse kasvades muutuvad ka dominantsed perekonnad. Mulla sügavusest oleneb sageli toitainete kvaliteet ja kättesaadavus ning hapniku ja süsihappegaasi kontsentratsioon. Seetõttu eelistavad teatud perekonnad sügavamaid horisonte, kui teised elavad pindmises kihis. (*Ibid*)

1.2.2 Ainevahetus

Kõik seened vajavad elutegevuseks orgaanilist süsinikku ja energiat. Lisaks kindlasti ka põhilisi toitaineid: lämmastikku, fosforit, väävlit, kaltsiumit, kaaliumit ja magneesiumit. Seente ainevahetuslikud rajad on loomadele sarnased, mille käigus lagundatakse suhkruid energia saamiseks. Selleks kasutatakse valdavalt glükolüütilist, trikarboksüülhappe või pentoosfosfaadi ainevahetuslikku rada. Seente eelistatumaks toitaineiks on glükoos, kuid

seada ei kohta seened eriti sagedasti. Küll aga esineb looduses arvukalt vabu glükaani polümeere, näiteks tselluloosi. Üldiselt kasutavad seened selliseid suhkruid, mille esinemissagedus on suur ja mis nõuab vähim energiat lagundamiseks (Watkinson *et al*, 2016). Samas on seened võimelised omastama toitaineid ka väga madalate kontsentratsioonide juures (Webster *et al*, 2007), tarvitades esmalt monosahhariidid ja disahhariidid, hiljem ka polüsahhariidid (Watkinson *et al*, 2016).

Tselluloos on kõige laialdasemalt levinud süsinikuühend, mida leidub hulgaliselt taimedes ja taimede jäänustes. Enamik saprotroofseid seeni suudavad lagundada tselluloosi ja kasutada seda süsiniku allikana. Looduslikku tselluloosi leidub taimede rakukestas, see on vees lahustumatu, tugev ja vastupidav hüdrofüüsile. Tselluloosi lagundamiseks kasutavad seened spetsiaalseid ensüüme, mis poolitavad tselluloosi kiud, võimaldamaks edasist lagundamist. Teine võimalus on tselluloosi kiudu lagundada otstest, mis toimub samuti ensüümide toimel (Watkinson *et al*, 2016). Aeroobsetes tingimustes toimub tselluloosi täielik lagundamine süsihappegaasiks ja veeks. Anaeroobsetes tingimustes on tselluloosi lagundamise saadusteks süsihappegaas, metaan ja vesi. (Perez *et al*, 2002)

Seened kasutavad aminohapete metabolismiks ja valkude biosünteesiks teiste eukariootidega sarnaseid meetodeid. Samas ei ole näiteks loomad võimelised anorgaanilistest ainetest aminohappeid tootma, kuid seened on. Seened kasutavad mullas leiduvat nitraati ja ammooniumit ning moodustavad sellest vajalikud aminohapped. Samas ei suuda seened omastada lihtainena lämmastikku, seega tuleb neil lämmastikuühendite pärast konkureerida taimedega, kuid saprotroofsed seened omistavad lämmastikuühendeid ka puidu lagundamisel. (Watkinson *et al*, 2016)

1.3 Arhed ja mikrovetikad

Arhede olemasolu avastas Carl Woese poolt juhitud töögrupp 1977. aastal, kes tõestasid rRNA põhjal, et tegemist on eraldiseisva domeeniga. Arhed on võimelised koloniseerima ekstreemseid elupaiku, kus esineb näiteks kõrge soolsus, madal pH, kõrge temperatuur. Samas leidub arhesid kindlasti ka tavalistes keskkondades. Arhede areng on olnud märkimisväärselt aeglasem, kui bakteritel või eukariootidel. Kuna arhed on sageli hüpertermofiilid, ei ole nende geenid palju muutunud, vastasel juhul oleksid võinud neile tüüpilised omadused evolutsiooni käigus teiseneda. Seetõttu arvatakse, et arhed on ühed vanimad eluvormid Maal. Arhede rakuehitus varieerub suures ulatuses, näiteks võib olla sfääriline, kepikujuline, spiraaljas, kettakujuline või sootuks ebaregulaarse kujuga. Rakukest võib olla sarnane bakteritele, koosnedes pseudopeptidoglükaanist, samas leidub arhesid, kelle rakukestas puuduvad polüsahhariidsed ühendid. Enim levinud on arhed, kelle rakukest koosneb valgulisest S-kihist. (Encyclopedia of soils ..., 2004)

Elukeskkondade järgi jagatakse arhed kolme gruppi (*Ibid*):

- halofiilid – elavad eriti kõrge soolsusega keskkondades, mis mõjuvad letaalselt enamikule organismidest, näiteks sooldunud muldades. Halofiilide plasmamembraan laseb läbi ainult teatavaid soolaioone, võimaldades rakul normaalselt toimida. *Halobacteriumi* rakk kasutab kõrge soolsusega toime tulemiseks kaaliumit (K^+), millega täidetakse rakus olev vaba ruum kontsentratsioonini, mis ületab väliskeskkonnas oleva naatriumi (Na^+) kontsentratsiooni. See võimaldab hoida ionide tasakaalu raku ja väliskeskkonna vahel
- metanogeenid – elavad anaeroobsetes tingimustes, kus puuduvad nitraadid, sulfaadid ja rauaühendid. Metanogeene võib leiduda ka aereeritud mullas väikestes hapnikuvabades taskutes. Metanogeenid kasutavad elutegevuseks teiste mikroorganismide poolt moodustatud vesinikku ja atsetaati, olles viimaseks lüliks orgaanilise aine lagundamisel. Selle tulemusel tekib metaan
- hüpertermofiilid – elavad kõrge temperatuuri tingimustes, mis võib ulatuda üle $100^{\circ}C$. Valdavalt leidub hüpertermofiile väävli või sulfidi sisaldusega

keskkondades, sest enamik hüpertermofiile on anaeroobid, kes kasutavad väävlit elektroni aktseptorina anaeroobses hingamises või elektroni doonorina kemosünteesis

Ekslikult arvatakse, et vetikad elavad ainult vees või äärmisel juhul veekogudele väga lähedal. Tegelikult leidub ka maismaal elavaid mikrovetikaid. Kuna mikrovetikad on fotosünteesivad organismid, vajavad nad ainevahetuseks päikesevalgust. Seetõttu võib mikrovetikaid kohata üldiselt mulla pindmistes kihtides (Alexander, 1977). Kuid leidub ka selliseid mikrovetikaid, kes elavad kohtades, kuhu muld alles hakkab tekkima, näiteks liustike alt vabanenud maa või vulkaanipurske tagajärjel tekkinud maa. (Soil microbiology ..., 2007)

Mullas elavad mikrovetikad on samuti oluliseks aineriingete ja primaarproduktiooni osaks. Mullas elava mikrovetika hukkudes asuvad teised mikroorganismid nende rakke lagundama. Mikrovetikate rakud sisaldavad palju orgaanilist süsinikku ja lämmastikku, mis vabanevad raku lagundamise käigus ja kaasatakse aineriingetesse. Lisaks aitavad mikrovetikad ja teised mikroorganismid, tavaliselt seened, muuta kättesaadavaks lahustumatuid toitaineid, mis asuvad mulla mineraalses osas. (*Ibid*)

1.4 Mikroorganismide omavahelised suhted

Mullaorganismid, peaausjalikult bakterid ja seened, vastutavad orgaaniliste ainete lagundamise ja aineringluste toimimise eest. Kuid mikroorganismid on võrdlemisi tundlikud keskkonnatingimuste muutumise suhtes, seega on nad ka indikaatorid, mille järgi tuvastada ökosüsteemi tervise halvenemist või paranemist. Paraku on mullamikroorganismide uurimine keeruline. Tänapäevaste meetoditega suudetakse tuvastada, millised mikroorganismid uuritavas mullas elavad, aga sealjuures jääb teadmatuks, milliseid funktsioone need organismid täidavad. (Soil microbiology and ..., 2010)

Mullas on kõige arvukamalt baktereid, keda võib arvuliselt olla kuni 10^8 - 10^9 ühes grammis mullas. Bakterid domineerivad arvukuse poolest seni kuni neil jätkub süsinikuallikaid. Seeni on ühes grammis mullas mitu suurusjärku vähem, tavaliselt 10^5 - 10^6 . Häirimata muldades on tavaliselt seened arvukamad kui bakterid, aga selliseid keskkondi on vähe. Bakterid on keskkonnatingimuste suhtes tolerantsemad, seetõttu on nende arvukus enamikes keskkondades suurem. (Hoorman *et al*, 2010)

Bakterid ja seened moodustavad üle 95% mulla biomassist, kus nad elavad koos mikrofauna, mesofauna ja makrofauna alla kuuluvate organismidega. Mulla orgaanilise aine lagundamine on valdavalt bakterite ja seente ülesanne, ainult 10 – 15% orgaanilisest ainest lagundatakse teiste organismide poolt. (Soil microbiology and ..., 2010)

Mullas toimuvaid biogeokeemilisi protsesse viivad läbi ainult aktiivsed mikroorganismid, keda on 0,1 – 2% kogu mikroorganismide biomassist. Ülejäänud mikroorganismid on kas potentsiaalselt aktiivsed või ooteseisundis. Potentsiaalselt aktiivseid mikroorganisme on 10 – 60%, kes võivad paari tunni jooksul neile sobilikke toitaineid omistama hakata, kui need kättesaadavaks muutuvad. (Blagodatskaya *et al*, 2013)

Bakterite ja seente kooselu üheks kõige paremaks näiteks on mükoriisa ehk seene juur (Dighton, 2016). Hüüfe moodustavad seened eritavad keskkonda ensüüme, mis aitavad neil kasvada. Sageli jäävad osad ensüümid kasutamata, millele on teiste mikroobide poolt suur konkurents. Valdavalt tarvitatakse need toitained bakterite poolt ära, harvemini ka

teiste seente poolt. Selle tulemusel aitavad seened kaasa mulla mikroorganismide mitmekesisuse kasvule ja biomassi suurenemisele. (Aislabie *et al*, 2013)

1.5 Põllumajanduses kasutatavad pestitsiidid

Pestitsiidide kasutamine on tänapäeva põllumajanduses laialt levinud praktika. Eeldatavasti hakati pestitsiide kasutama põllumajanduse algusaegadel. Tänapäevaste pestitsiidide kasutusele võtmine toimus 19. sajandil, kui seente, putukate ja bakterite tõrjeks hakati kasutama kaltsium-arsenaati, pliarsenaati ja fumigant vesiniksüaniidhapet. Järgmise generatsiooni pestitsiidid põhinevad sünteetiliste orgaaniliste ühendite kasutamisel, millistest tähelepanuväärseim on diklorodifenüültrikloroetaan ehk DDT. DDT on sünteetiline aine, mille esmakordselt sünteesis 1873. aastal Othmar Zeider, aga mille insektitsiidne toime avastati 1939. aastal Paul Mulleri poolt. DDT-d peeti kahjurite tõrjel esialgu revolutsiooniliseks vahendiks, seda eelkõige laia toimespektrumi, püsivuse, vees mittelahustuvuse, odavuse ja lihtsa kasutuse pärast. DDT kasutamisest sai alguse pestitsiidide intensiivne kasutamine põllumajanduses. Pestitsiidides nähti vahendit, mis suudab rahuldada kasvava inimpopulatsiooni toiduvajadused. Pestitsiididega töötlemata põllukultuuride puhul vähendavad kahjurid saagikust keskmiselt 30 – 45%. Elimineerides kahjurid, on võimalik samalt maa-alal saada rohkem saaki. (Pesticides in ..., 2011)

Tänapäeval on pestitsiidina defineeritav iga vahend, mida kasutatakse taime, mulla, vee, koristatud saagi, rõivaste, elusloomade või mööbli töötlemiseks, eesmärgiga tappa, meelitada, peletada, reguleerida, mõjutada kasvu ja paljunemist ükskõik millisel kahjuriks peetaval organismil. Pestitsiidid hõlmavad paljusid kemikaale, mis omavad erinevaid eesmärke ja funktsioone. Sageli eristatakse pestitsiide sihtrühmade järgi, mille tõrjumiseks vahendeid kasutatakse. (Cornell University, 2012)

Sagedasti arvatakse, et pestitsiidide kasutamine on jätkuvalt kasvav trend, kuid pestitsiidide tarvitamine jõudis maksimumini juba 1980-ndatel aastatel. Peale seda on pestitsiidide kasutamine pisut langenud ja püsib stabiilselt samal tasemel. Selle üheks põhjuseks on uute toimeainetega pestitsiidide väljatöötamine, mis mõjuvad efektiivsemalt ja mille selektiivsus on suurem. Seetõttu on vaja kasutada vähem pestitsiide, saavutamaks piisav kahjuritõrje. Teiseks teguriks on mahepõllumajanduse populaarsuse kasv, kus ei kasutata keemilisi pestitsiide. (Klaassen, 2013)

1.5.1 Peamised pestitsiidide rühmad

Pestitsiidide jaotus sihtrühmade järgi (University of Minnesota ...):

- avitsiidid – mõjuvad mürgiselt lindudele
- bakteritsiidid – mõjuvad mürgiselt bakteritele
- desinfektandid – mõjuvad mürgiselt mikroorganismidele
- fungitsiidid – mõjuvad mürgiselt seentele
- herbitsiidid – mõjuvad mürgiselt taimedele
- akaritsiidid – mõjuvad mürgiselt lestadele
- molluskitsiidid – mõjuvad mürgiselt tigudele ja nälkjatele
- nematotsiidid – mõjuvad mürgiselt ümarussidele
- insektitsiidid – mõjuvad mürgiselt putukatele
- kalamürgid (i.k *piscicides*) – mõjuvad mürgiselt kaladele
- repellendid – peletavad ebasoovitud loomi, linde ja putukaid
- rodentitsiidid – mõjuvad mürgiselt närilistele
- defoliandid – mõjuvad taimede kasvu pärssivalt, põhjustades lehtede varisemist
- desikandid – põhjustavad taimede kuivamist või niiskuse kadu taimede kudedest

1.5.2 Pestitsiidide keemiline koostis ja omadused

Keemilised pestitsiidid liigitatakse anorgaanilisteks- ja orgaanilisteks pestitsiidideks. Anorgaanilised pestitsiidid koosnevad mitmetest toksilistest ühenditest, tavaliselt arseenist, vasest, tinast ja elavhõbedast. Need ühendid ei lagune traditsioonilisel moel ja pestitsiidina kasutamisel kuhjuvad keskkonda. Tavaliselt muutuvad nad elusorganismidele kättesaadamatuks, leostudes mulla madalamatesse kihtidesse, kuid esineb ka keemilisi reaktsioone, mille käigus anorgaanilised ühendid kahjutustavad. Anorgaanilised pestitsiidid on näiteks Bordoo vedelik ja erinevad arseeni sisaldavad ühendid. (Freedman, 1995)

Orgaanilised pestitsiidid on keemiliselt mitmekesised. Mõned orgaanilised pestitsiidid on looduslikku päritolu, eraldatud näiteks taimedest, kuid enamik on sünteesitud laborites.

Looduslikku päritolu orgaanilise pestitsiidi heaks näiteks on insektitsiid nikotiin ja sellest tuletatud nikotinoidid, mida eraldatakse tubakataimedest. Lisaks toodetakse ka nikotiin sulfaate, looduslikke püetroide ja rotenooni. Sünteetiliste orgaaniliste pestitsiidide hulka kuuluvad (*Ibid*):

- sünteetilised metallorgaanilised pestitsiidid – valdavalt fungitsiidid. Kõige sagedamini kasutatakse organo-elavhõbeda ühenditel baseeruvaid kemikaale, näiteks fenüülelavhõbeda atsetaate, metüülelavhõbedat ja metoksüetüülelavhõbeda kloriiti
- fenoolid – fungitsiidid, sagedasti kasutatakse puidu ja muu orgaanika töötlemiseks. Fenoolide hulka kuuluvad triklorofenool, tetraklorofenool ja pentaklorofenool
- organokloriidid – väga mitmekesine rühm, kuhu kuuluvad alamrühmad: DDT ja DDT-sarnased pestitsiidid, lindaan, tsükloдиеen ja klorofenoksühape. Esimese kolme alarühma pestitsiidid on insektitsiidid, viimane alarühm on herbitsiid
- organofosfaadid – samuti mitmekesine rühm, kasutatakse valdavalt insektitsiidina. Looduses laguneb võrdlemisi kiiresti, kuid omab toksilist toimet näiteks veeorganismidele. Insektitsiidina kasutatakse peamiselt paratiooni, fenitrotiooni ja malatiooni, herbitsiidina glüfosaati
- sünteetilised püetroidid – laialdaselt kasutatavad insektitsiidid. Sünteetilised püetroidid on toksilised paljudele organismidele: kaladele, selgrootutele ja imetajatele. Siia hulka kuuluvad tsüpermetriin, deltametriin ja permetriin.
- triasiin – herbitsiidid
- karbamiidid – kasutatakse sageli insektitsiidina
- dinitroaniliin – herbitsiidid
- amiidid – herbitsiidid
- tiokarbamaadid – herbitsiidid
- atsetaldehüüdi polümeer – molluskitsiid

1.5.3 Pestitsiidide toimetehhanismid

Kahjurite tõrjumiseks võib kasutada ka keskkonnategureid – kliimat, looduslikke vaenlasi, topograafiat ning toitainete ja vee kättesaadavust. Kuna varasemalt mainitu on aeglane ja tihti ebaefektiivne, kasutatakse sageli ka bioloogilist-, kultuuride, ja mehaanilist kontrolli. Kõige kindlama tulemuse tagab keemiline kahjurite kontroll ehk pestitsiidide kasutamine. (Waxman, 1998)

Erinevate pestitsiidide toimetehhanismid on väga erinevad, kuid üldiselt saab need jaotada kaheks (*Ibid*):

- akuutse toimega – mürgistuse mõju avaldub lühikese ajaga, peale ühekordset pestitsiidiga kokkupuudet. Mõju ulatus sõltub mürgisusest sihtrühmale, kokkupuute kestvusest ja pestitsiidi kasutamise viisist
- kroonilise toimega – mürgistuse mõju avaldub peale korduvate madalate kontsentratsioonidega pestitsiidiga kokkupuudet, mis ühekordse doosina ei ole letaalsed, aga tekitavad pikema aja jooksul pöördumatuid kahjustusi

Sagedamini kasutatavad insektitsiidid kuuluvad organokloriinide, organofosfaatide või karbamiidide klassi. Insektitsiidid toimivad tavaliselt kahjurputuka närvisüsteemi häirides, takistades atsetüülkoliini esteraasi, häirides atsetüülkoliini retseptoreid või γ -aminovõihappe retseptoreid. Herbitsiidid tapavad või mõjutavad taimi häirides või takistades ainevahetuslikke radu, näiteks blokeerides fotosünteesi, karetenoidi sünteesi või aromaatsed ja hargnenud ahelaga aminohapete sünteesi. Lisaks mõjutavad herbitsiidid taimede kasvu, hingamist, raku ja tuuma jagunemist või valkude ja rasvade sünteesi. Fungitsiidid mõjutavad seente ainevahetuslikke radu, mis häirib raku funktsioneerimist, blokeerib rasvade ja valkude biosünteesi või takistades ensüümide tootmist või toimet. (Kalia *et al*, 2011)

1.5.3.1 Ensüümiinhibiitorid

Osad pestitsiidid hävitavad kahjureid inhibeerides ensüümide toimet. Toksiinid reageerivad ensüümidega või transportproteiinidega ja inhibeerivad normaalset talitlust. See on võimalik, sest pestitsiidide ühendid blokeerivad ensüümid, kuna on sarnased

looduslikele toitainetele. Näiteks on see omane insektitsiididele, mille toimeaineks on karbamiidid ja organofosfaadid, mis inhibeerivad ensüümi atsetüülkoliini esteraasi. Samuti leidub herbitsiide, mis inhibeerivad taimedes aminohapete sünteesiks olulisi ensüüme, näiteks glüfosaadid ja glüfosinaadid. (Stenersen, 2004)

Ensüümiinhibiitorite mõju sõltub sellest, mis rolli omab mõjutatav ensüüm kahjuri organismis. Taimedel puudub närvisüsteem ja atsetüülkoliini esteraas ei ole teiste protsesside jaoks oluline. Seetõttu ei mõju karbamiidid ja organofosfaadid taimedele toksiliselt. Sarnaselt ei tooda loomad teatud liiki olulisi aminohappeid ja neid ei mõjuta nende aminohapete sünteesiks oluliste ensüümide inhibeerimine glüfosaatide ja glüfosinaatide poolt. (*Ibid*)

1.5.3.2 Keemilise signaalisüsteemi häirimine

Organismid kasutavad kemikaale, et edastada informatsiooni mitmetel korralduslikel tasemetel. Pestitsiidid sisaldavad mitmeid ühendeid, mis häirivad nende süsteemide toimimist. Toksiinid, mis rikuvad signaalisüsteemi toimimist, on väga võimekad ja sageli suure selektiivsusega. Nad imiteerivad õige signaali ühendeid, mistõttu edastatakse signaale liiga tugevalt, liiga kaua või valel ajal. Selliseid toksine nimetatakse agonistideks. Agonisti näiteks on nikotiin, mis annab närvisüsteemi atsetüülkoliinile sarnase signaali, mida aga ei elimineeri atsetüülkoliini esteraas. Antagonist seevastu blokeerib retseptori õige signaali ühendite eest. Antagonistina käitub suksinüülkoliin, mis blokeerib närviraku ja lihase vahelise kontakti, reageerides atsetüülkoliini retseptoriga, takistades signaali edastamise. (Stenersen, 2004)

1.5.3.3 Reaktiivsed molekulid, mis hävitavad rakukomponente

Enamik redoksreaktsioone hõlmab kahe elektroni vahetust. Kuid leidub ka ühendeid, mida saab oksüdeerida või redutseerida ühe elektroni vahetamisega, mille käigus formuleeritakse reaktiivseid vahesaadusi. Sageli on sellistesse reaktsioonidesse kaasatud hapnik. Sellise vaba radikaali moodustaja näiteks on herbitsiid *paraquat*, mis varastab mitokondri või kloroplasti elektroni transpordi ahelast ühe elektroni ja muudab selle molekulaarseks hapnikuks. Tekkinud superoksiidi anioon võib reageerida vesiniksuperoksiidiga, moodustades hüdroksüüli radikaale. Hüdroksüüli radikaalid on

väga aktiivsed, rünnates esimest molekuli, keda kohtavad. Selle tulemusel tekib ahelreaktsioon, mille käigus hävineb mitmeid biomolekule. (Stenersen, 2004)

Toksiinid, mis toodavad vabu radikaale, on harva selektiivsed. Selle asemel toimivad nad pigem kui laviin, mis hävitab rakumembraane, nukleiinhappeid ja teisi rakustruktuure. Aeroobse eluviisi käigus on organismidel arenenud vabade radikaalide vastu ka kaitsesüsteeme. (*Ibid*)

1.5.3.4 Nõrgad orgaanilised happed või alused, mis muudavad mitokondri ja membraani pH gradienti

Keemilised ühendid võivad olla toksilised, sest nad lahustuvad raku happelisemas mitokondri membraanis ja on võimelised sealt kaasa võtma H^+ iooni, viies selle vähemhappelisse mitokondrisse. Mitokondris ja kloroplastis on pH erinevus väga oluline, sest selle abil toimub raku energia tootmine. Kui tasakaal saab häiritud, ei ole rakk võimeline energiat tootma, ning raku normaalne toimimine katkeb. Sellist mehhanismi kasutavad näiteks ammoniaak ja fenoolid. Samas on taimed ja loomad sellega ka kohanenud, kasutades toksiinidest vabanemiseks vastavalt glutamiini või karbamiidi tootmist. (Stenersen, 2004)

1.5.4 Mikroorganismide reageering pestitsiididele

Tänapäeva põllumajanduses on pestitsiidide intensiivne kasutamine tavapärane praktika (Yang, 2006). Uuringud näitavad, et 0,3% kasutatavatest pestitsiididest jõuab kahjurini, keda soovitakse mõjutada. Ülejäänud 99,7% pestitsiidist paisatakse keskkonda, eelkõige mulla pinnale. Mulla pinnalt liiguvad pestitsiidid sügavamatesse kihtidesse, kus nad lagundatakse valdavalt mikroorganismide poolt (Munoz-Leoz *et al*, 2011). Kuna mulla mikroorganismid on põhilised lagundajad ja vastutavad ka aineringete läbiviimise eest, võivad pestitsiidid mõjutada mikroorganismide võimet pestitsiide lagundada ja aineringeid läbi viia (Filip, 2002; Eisenhauer *et al*, 2009; Lo, 2010). Sellest tulenevalt võib mulla mikroorganisme pidada biomarkeriteks, kelle arvukuse ja reageeringu järgi võib hinnata pollutantide mõju mulla kvaliteedile (Filip, 2002).

Glüfosaadiga töödeldud mullas märgati madalate kontsentratsioonide juures mikroorganismide elutegevust kiirendavat toimet. Selle põhjuseks võib olla pestitsiidiga mulda lisandunud toitained C, N ja P. Kõrgemate kontsentratsioonide juures täheldati inhibeerivat toimet, mis püsis pikka aega (Gomez *et al*, 2008). Pestitsiididega töödeldud mullas on tuvastatud keskmisest kõrgem kontsentratsioon mikroorganisme, kes lagundavad pestitsiide. Lancaster *et al* poolt läbi viidud katsest uuriti mullale lisatud glüfosaadi lagunemist. Selgus, et katstes, kus lisati glüfosaati viis korda, lagundati pestitsiid kiiremini kui neljakordsel lisamisel (Lancaster *et al*, 2009). Fungitsiididega teostatud katsed on näidanud, et mida kõrgem on mullas leiduva fungitsiidi kontsentratsioon, seda pikem on ka selle poolestusaeg (Munoz-Leoz *et al*, 2011).

Bakterite mitmekesisus on pestitsiididega saastatud mullas eeldatavasti mitu suurusjärku väiksem kui puhtas mullas. Selle põhjuseks arvatakse olevat saasteaine toksiline toime osadele bakteritele, samas mõned bakterid hakkavad kasutama saasteaineid toidainetena ja muutuvad sealjuures dominantseks (Imfeld *et al*, 2011). Mikroorganismid, kes ei ole pestitsiidile nii tundlikud, võivad kasutada toidaineteks ka pestitsiidi tõttu hukkunud mikroorganismide rakke, suurendades oma arvukust seni kuni toitaineid jätkub (Cycon *et al*, 2013).

Viimastel kümnenditel on agrokemikaale tootvad ettevõtted arendanud palju uusi pestitsiide, mis on kõrge selektiivsusega ja vähese toimeainesisaldusega. Üheks selliseks on herbitsiid, mille toimeaineks on nikosulfuroon, mis mõjub inhibeerivalt umbrohtudele, takistades atsetohüdrosüülhappe süntaasi (AHAS). AHAS esineb ka bakterites ja seentes, mistõttu võib eeldada, et nikosulfurooni kasutamine mõjub negatiivselt ka mulla mikroorganismidele. Karpouzas *et al* poolt läbi viidud katstes uuriti, millise kontsentratsiooni juures mõjub nikosulfuroon mikroorganisme inhibeerivalt. Selgus, et laborikatse puhul märgati seeni inhibeerivat toimet kontsentratsiooni juures, mis ületab viiekordselt soovituslikku kontsentratsiooni. Baktereid inhibeeriv toime tuvastati 20-kordse soovitusliku kontsentratsiooni juures. Sama katset korraldati ka põllul, kus ei tuvastatud mikroorganismide inhibeerimist kontsentratsioonidel kuni viiekordne soovituslik kontsentratsioon. (Karpouzas *et al*, 2014)

Cycon *et al* teostas uuringu, kus võrreldi herbitsiidi napropamiid mõju heterotroofsetele-, nitrifitseerivatele- ja denitrifitseerivatele bakteritele. Selgus, et madal kontsentratsioon

napropamiidi mõjutab heterotroofseid baktereid ainult lühiajaliselt (kuni üks päev), pärast seda bakterite arvukus pigem kasvas. Nitrifitseerivate bakterite arvukuses tuvastati pestitsiidi kasutamisel langustrend, sealjuures tuvastati tugev seos pestitsiidi kontsentratsiooni suurenemise ja bakterite arvu vähenemise vahel. Samas napropamiidi lisamisel denitrifitseerivate bakterite arvukus pigem kasvas. (Cycon *et al*, 2013)

2 Materjal ja metoodika

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida pestitsiidide mõju mulla mikroorganismidele. Katse viidi läbi TTÜ Tartu Kolledži mullabioloogia laboratooriumis. Katse käigus uuriti mikroorganismide biomassi substraadi poolt indutseeritud hingamise meetodil, mikroobikoosluse hingamisaktiivsust, teostati inhibitsiooniteste ja määrati pestitsiididega töödeldud söötmeplaatidel esinenud peamised bakterite ja seenete perekonnad.

Katseteks tarvilik muld võeti TTÜ Tartu Kolledži territooriumilt. Samast mullast tehti ka füsioloogiline lahus, kuhu lisati 50 ml destilleeritud vett, 0,5 grammi soola ja 5 grammi mulda. Füsioloogilist lahust hoiti katsete teostamise ajal inkubaatoris 37 °C juures.

Katses kasutati pestitsiide Stomp ® 330 EC (edaspidi Stomp), Karate ® Zeon (edaspidi Karate), Ranger PRO ® (edaspidi Ranger) ja Fastac ® 50 (edaspidi Fastac). Pestitsiidide mõõtmiseks kasutati mõõtepipetti.

Stomp on herbitsiid, mille toimeaineks on pendimetaaliin, mis kuulub dinotroaniliinide klassi (Extension Toxicology ...). Stomp on peamiselt mõeldud kasutamiseks mullale kandmiseks, tungides taimedesse juurte kaudu, mõjudes ka varte ja lehtede kaudu tärkamisjärgselt. Lisaks on pestitsiidi jäägid pikaajalise toimega, tõrjudes ka peale pritsimist tärغانud umbrohtusid. Stomp'i toime on kõige tõhusam kõrreliste-, kaheiduleheliste, ja laialeheliste umbrohtudele. Stomp on keskkonnaohtlik kemikaal, mõjudes eriti mürgiselt veeorganismidele. (Baltic Agro)

Karate on insektitsiid, mille toimeaine on lambda-tsühalotriin, mis kuulub püretroidide klassi. Karate on kontaktne ja söötmürk, mõeldud kasutamiseks lestade ja imevate kahjurputukate tõrjeks, läbistades kutiikuli ja paralüseerides kahjurputuka närvisüsteemi. Pestitsiidi toime võib avalduda juba mõne minuti jooksul, põhjustades desorientatsiooni ja toitumistegevuse katkemist. Karate on keskkonnaohtlik kemikaal, mõjudes eriti mürgiselt veeorganismidele. (Syngenta Eesti, 2017)

Ranger on herbitsiid, mille toimeaine on glüfosaat, mis kuulub organofosfaatide hulka (Food and agriculture ..., 2016). Ranger on süsteemse üldhävitava toimega, mõjudes kaheidulehelistele umbrohtudele, ning ühe- ja mitmeaastastele kõrreliste. Toimeaine liigub taime lehtedest ja vartest juurtesse, kus inhibeerib ensüüme, mis osalevad aminohapete tootmisel. Pestitsiid ei mõju veel idanemata seemnetele või mullas paiknevatele taimede osadele. (Põllumajandusamet)

Fastac on insektitsiid, mille toimeaine on alfa-tsüpermetriin, mis kuulub püretroidide klassi (Heitzman). Fastac on kontaktne ja pika järelmõjuga, tungides peale pritsimist ka taimi katvasse vahakihti, toimides sellisel viisil ka söötemürgina. Mõjub väga mürgiselt veeorganismidele, säilitades pikaajaliselt keskkonnaohtliku toime. (BASF crop protection ...)

2.1 Mikroorganismide biomassi ja mikroobikoosluse hingamisaktiivsuse määramine

Katsete käigus kasutati mikroorganismide biomassi hindamiseks substraadi poolt indutseeritud hingamise (SIR) meetodit. SIR-meetod võimaldab mõõta hapniku tarbimist mikroorganismide poolt. Selleks lisatakse proovile sobilikku toitainet, käesoleva katse puhul glükoosi, mis on mikroorganismidele kergesti omandatavad. Mikroobikoosluse elutegevuse käigus kasutatud hapnik vähendab rõhku katseanumas, mille langus fikseeritakse OxiTop® mõõtesüsteemiga, mis vastab rahvusvaheliste standardite poolt kehtestatud nõuetele. Seadme mõõtemääramatus on 1 mbar. Vältimaks eralduva süsihappegaasi mõju katse tulemustele, lisati anumatesse absorbenti, mis seob katse käigus eralduva CO₂. Eralduva süsihappegaasi sidumine on vajalik, et vältida rõhu tõusmist CO₂ eraldumise tagajärjel. Selle meetodiga ei ole võimalik eristada struktuurseid muutuseid mikroobikoosluses, see võimaldab tuvastada, kas pestitsiidide lisamisel tekkis inhibeeriv toime (Langer *et al*, 2010). Katse teostamiseks kaaluti kaheksasse standardsesse katseanumasse 50 grammi mulda, millele lisati 0,25 grammi glükoosi. Katse käigus lisati kahte anumasse Karate lahust, lahjendusega 1:10, kahele anumale Stomp'i lahust, lahjendusega 1:10, kahele anumale Fastac'i lahust, lahjendusega 1:10. Lisatud pestitsiidide kontsentratsioonid olid võrdsed põllumajanduses kasutatavate

soovituslike kontsentratsioonidega. Kahte anumasse pestitsiide ei lisatud, võimaldamaks tulemuste võrdlemist. Iga katseanuma sisud segati. Katseanumad suleti hermeetiliselt ja asetati 24 tunniks 22°C juurde. Rõhu muutumise tuvastamiseks kasutati OxiTop® manomeetrilist mõõtesüsteemi. Mikroorganismide biomassi süsiniku sisalduse arvutamiseks kasutati järgnevat seost (Lin *et al*, 1999):

$$1 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} = 28 \text{ mg biomass C g}^{-1}$$

Lisaks teostati mikroobikoosluse hingamisaktiivsuse (BA) määramise katse. Selleks kasutati kaheksat standardset katseanumat, igapähe mõõdeti 100 grammi mulda. Katse käigus lisati kahte anumasse Karate lahust, lahjendusega 1:10, kahele anumale Stomp'i lahust, lahjendusega 1:10, kahele anumale Fastac'i lahust, lahjendusega 1:10. Lisatud pestitsiidide kontsentratsioonid olid võrdsed põllumajanduses kasutatavate soovituslike kontsentratsioonidega. Kahte anumasse ei lisatud pestitsiide, võimaldamaks tulemusi võrrelda. Iga katseanuma sisud segati. Katseanumad suleti hermeetiliselt ja asetati 96 tunniks 25°C juurde. Katse läbiviimiseks kasutati OxiTop® mõõteseadmeid.

Hapnikutarve arvutati järgmise valemi järgi (Platen, 1999):

$$BA = \frac{M_R(O_2)}{R \times T} \times \frac{V_{\text{õhk}}}{M_{Bt}} \times \Delta p$$

Kus BA – hapnikutarve, mg O₂/kg KA

M_R(O₂) – hapniku molaarmass, 32 000 mg/mol

V_{õhk} – õhu ruumala mõõtmisanumas, liitrites (L)

R – universaalne gaasikonstant, 83,14 L x mbar/mol x K

T – mõõtmistemperatuur, kelvinites (K)

M_{Bt} – kuivaine mass mõõtmisüsteemis, kg KA

Δp – rõhu langus mõõtmisüsteemis, mbar (1 mbar = 1hPa)

Mõõtmisanumas oleva õhu ruumala arvutati järgmise valemi järgi (*Ibid*):

$$V_{\text{õhk}} = V_{\text{üld}} - V_{\text{pinnas}}$$

Kus V_{õhk} – õhu ruumala mõõtmisanumas, L

$V_{\text{üld}}$ – mõõtmisanuma üldruumala, L

V_{pinnas} – pinnaseproovi ruumala, L

2.2 Kasutatud söötmeplaadid

Söötmeplaat kasutati kahte liiki, neist üks oli mõeldud bakterite kultiveerimiseks ja selle täpsemad koostisosad on toodud tabelis 1. Bakterite söötmeplaatide komponentidena kasutati destilleeritud vett, agarat, peptooni, soola ja pärmiekstrakti. Kõik osised segati omavahel, misjärel paigutati 30-60 minutiks 110°C juurde autoklaavi. Pärast autoklaavimist oodati söötme jahtumist, misjärel lisati seeni inhibeeriva toimega tsükloheksamiidi ja piirituse lahust. Tsükloheksamiid lisati peale autoklaavimist, vastasel juhul oleks see oma mõju kaotanud. Söötme jahtudes valati see Petri tassidesse, *circa* 25 ml ühe plaadi kohta ja oodati täielikku tahkestumist.

Tabel 1. Bakterite söötmeplaadi koostisosad

destilleeritud vesi	250 ml
agar	3,75 g
peptoon	1,25 g
sool	1,25 g
pärmiekstrakt	0,5 g
tsükloheksamiid	0,2 g
piiritus 90%	10 ml

Teist liiki söötmeplaat kasutati seente kultiveerimiseks, selle täpsemad koostisosad on toodud tabelis 2. Seente söötmeplaatide komponentidena kasutati destilleeritud vett, linnaseekstrakti, agarat ja kloramfenikooli, mis pärsib bakterite elutegevust. Kõik osised segati omavahel, misjärel paigutati 30-60 minutiks 110°C juurde autoklaavi. Söötme jahtudes valati see Petri tassidesse, *circa* 25 ml ühe plaadi kohta ja oodati täielikku tahkestumist.

Tabel 2. Seente söötmeplaadi koostisosad

destilleeritud vesi	250 ml
Linnaseekstrakt	5 g
Agar	3,75 g
Kloramfenikool	0,05 g

2.3 Inhibitsioonitest

Vältimistesti teostamiseks kasutati alapeatükis 2.2 välja toodud spetsiifilisi söötmeplaate. Bakterite kultiveerimiseks kasutati tabelis 1 nimetatud koostisosadega söötmeplaate, seente kultiveerimiseks kasutati tabelis 2 nimetatud osistega söötmeplaate. Katses kasutati pestitsiide Karate, Stomp, Fastac ja Ranger.

Vältimistest teostati kolmes osas. Esimeses osas valmistati 20 söötmeplaati, neist kümme bakterite kultiveerimiseks ja kümme seente kultiveerimiseks. Iga pestitsiidi jaoks valmistati neli söötmeplaati, kaks bakterite kultiveerimiseks ja kaks seente kultiveerimiseks. Lisaks valmistati neli söötmeplaati kontrolliks, kuhu pestitsiide ei lisatud, kaks söötmeplaati bakterite kultiveerimiseks ja kaks söötmeplaati seente kultiveerimiseks. Katse teostati pestitsiidide lahjendusega 1:10-le, mis vastab soovituslikule põllumajanduses kasutatavale kontsentratsioonile.

Vältimistesti teise osa teostamiseks valmistati 36 söötmeplaati, neist 18 bakterite kultiveerimiseks ja 18 seente kultiveerimiseks. Iga pestitsiidi jaoks valmistati kaheksa söötmeplaati, neist neli bakterite kultiveerimiseks ja neli seente kultiveerimiseks. Lisaks valmistati neli söötmeplaati kontrolliks, kuhu pestitsiide ei lisatud, neist kaks söötmeplaati bakterite kultiveerimiseks ja kaks söötmeplaati seente kultiveerimiseks.

Iga pestitsiidiga teostati katse nelja erineva kontsentratsiooniga. Kasutatud kontsentratsioonid olid: 1 ml lahjendamata puhast pestitsiidi, lahjendus 1:2-le, lahjendus 1:4-le ja lahjendus 1:8-le.

Kolmandas osas teostati katsed ühe konkreetse seenega ja ühe bakteriga. Bakter ja seen valiti varasematelt söötmeplaatidelt visuaalse vaatluse põhjal, kasutades selliseid organisme, kelle esinemissagedus oli suur ja kes olid pestitsiididele vastupidavad. Bakterite ja seente väljakülv söötmeplaatidele toimus tikuga, mille ots viidi kontakti välja valitud bakteri või seene kolooniaga. Seejärel tõmmati uuele söötmeplaadile tikuga nelinurkselt neli triipu, mille kõik nurgad, välja arvatud algus ja lõpp, puutusid kokku. Sealjuures vähendati iga tahu juures tõmbekorduste arvu, s.t esimene triip tõmmati neljakordselt, teine triip kolmekordselt jne. See meetod võimaldab vaadelda bakterite ja seente kasvuaktiivsust, eeldades, et igal järgneval triibul on väiksem arv rakke, kuna igal järgneval triibul korduste arv väheneb ja iga tõmbega jääb tikule vähem rakke järgi.

Katset teostati erinevate pestitsiidide kontsentratsioonide juures alustades 1 ml lahjendamata pestitsiidist, järgnesid lahjendused 9-1, 8-2, 7-3 ja 6-4, kus esimene number indikeerib mitu osa pestitsiidi lisati ja teine number indikeerib lahjenduseks lisatud destilleeritud vee osasid.

Katses kasutati bakterite ja seente kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaate, mida valmistati bakterite kultiveerimiseks kokku 22, iga pestitsiidi erineva kontsentratsiooni jaoks üks ja seente kultiveerimiseks kokku 22, iga pestitsiidi erineva kontsentratsiooni jaoks üks. Nii bakterite kui ka seente söötmeplaatidest kaks jäid kontrolliks, kuhu pestitsiide ei lisatud.

2.4 Bakterite ja seente identifitseerimine

Bakterite ja seente perekondade identifitseerimiseks kasutati kahtkümmet söötmeplaati, kuhu külvati varasemate katsete söötmeplaatidelt erinevad bakterid ja seened. Väljakülvide aluseks oli silma järgne hinnang, eesmärgiga külvata võimalikult palju erinevaid perekondi. Täiendav väljakülv oli vajalik, et identifitseeritavad rakud oleksid värsked ja elus.

Väljakülvidest eraldati bakterid ja seened, mis kinnitati klaasplaadile, võimaldamaks valgusmikroskoobiga vaatlemist. Selleks tilgutati klaasplaadile 10 µl destilleeritud vett, mille sisse pandi tikuga pisut uuritavat materjali. Vedeliku täieliku aurustumiseni jäeti

klaasplaadid tõmbekapi alla kuivama. Pärast kuivamist teostati uuritavate rakkude kuumfikseerimine. Selleks liigutati klaasplaati mõned korrad läbi leegi, et bakterite või seente valgud denatureeruksid klaasi pinnale.

Identifitseerimiseks töödeldi seente plaate bengaalpunasega, mis hõlbustab nende vaatlemist. Värvimiseks valmistati 5%-line bengaalpunase lahus, mille koostisosad on tabelis 3. Lahuse tegemiseks kasutati bengaalpunase pulbrit, piiritust ja destilleeritud vett. Värvimist teostati kolmel korral, mille vahel eemaldati üleliigne värv destilleeritud veega.

Tabel 3. Bengaalpunase 5% lahus

destilleeritud vesi	1,9 ml
Piiritus 90%	0,1 ml
Bengaalpunane	0,01 g

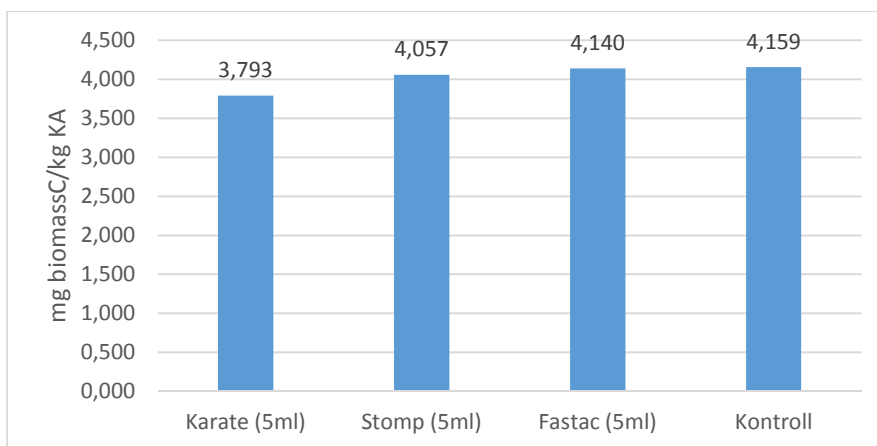
Bakterite plaatidel kasutati Gram'i värvimist, mis põhineb gramnegatiivsete ja grampositiivsete bakterite rakukesta ehituse erinevusel. Grampositiivsete bakterite rakukest koosneb paksemast peptidoglükaani kihist kui gramnegatiivsete bakterite rakukest. Rakukesta ehituse erinevuse tõttu saab Gram'i värvimise meetodil eristada gramnegatiivseid ja grampositiivseid baktereid. Bakterite värvimiseks töödeldi klaasplaati kristallvioletiga, peale mida kasutati Lugoli lahust. Lugoli lahus kinnitab kristallvioleti grampositiivsete bakterite peptidoglükaani kihile. Järgnevalt pesti klaasplaati piiritusega, mis eemaldas gramnegatiivsetelt bakteritelt värvi, samas grampositiivsed bakterid jäid violetseks. Gramnegatiivsete bakterite värvimiseks kasutati safraniini, mis värvis need roosaks või punaseks.

Bakteritega ja seentega klaasplaadid fotografeeriti valgusmikroskoobi külge kinnitatud fotokaameraga. Fotode järgi identifitseeriti bakterite ja seente perekonnad. Täpsem klassifitseerimine ei olnud käesoleva töö raames võimalik.

3 Tulemused

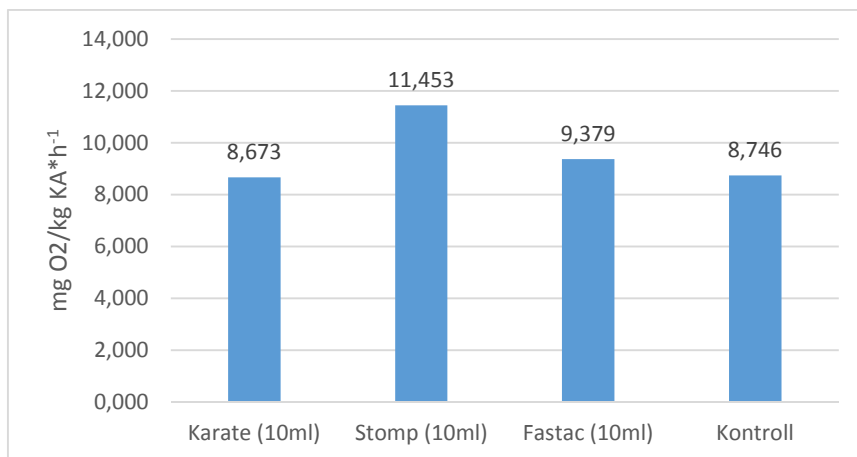
3.1 Mikroorganismide biomass ja mikroobikoosluse hingamisaktiivsus

Mikroorganismide biomassi hindamist teostati SIR meetodil, mille tulemused on joonisel 1. SIR katse käigus uuriti mikroorganismide biomassi peale 24 tunnist inkubatsiooniaega. Selgus, et kõikide katsetatud pestitsiidide lisamine mõjus mikroorganismide biomassi kahandavalt. Kontrollanumate keskmine mikroorganismide biomass oli 4,159 mg biomassC/kg KA. Kõige rohkem mõjutas mikroorganismide biomassi Karate lisamine. Karatega töödeldud katseanumate mikroorganismide biomass oli 3,793 mg biomassC/kg KA ehk ligikaudu 8,8% väiksem kui pestitsiidiga töötlemata katseanumates. Stompiga ja Fastaciga töödeldud katseanumate mikroorganismide biomass oli vastavalt 4,057 mg biomassC/kg KA ja 4,104 mg biomassC/kg KA.



Joonis 1. Mikroorganismide biomass SIR meetodil

Mikroorganismide hindamisaktiivsuse tulemused on toodud joonisel 2. Mikroorganismide hingamisaktiivsus oli kõrgeim Stompiga töödeldud katseanumates 11,453 mg O₂/kg KA*h⁻¹, madalaim Karatega töödeldud katseanumates 8,673 mg O₂/kg KA*h⁻¹. Sarnasel tasemel oli ka kontrollanumate mikroorganismide hingamisaktiivsus 8,746 mg O₂/kg KA*h⁻¹, ning Fastaciga töödeldud kontrollanumate mikroorganismide hingamisaktiivsus 9,379 mg O₂/kg KA*h⁻¹.

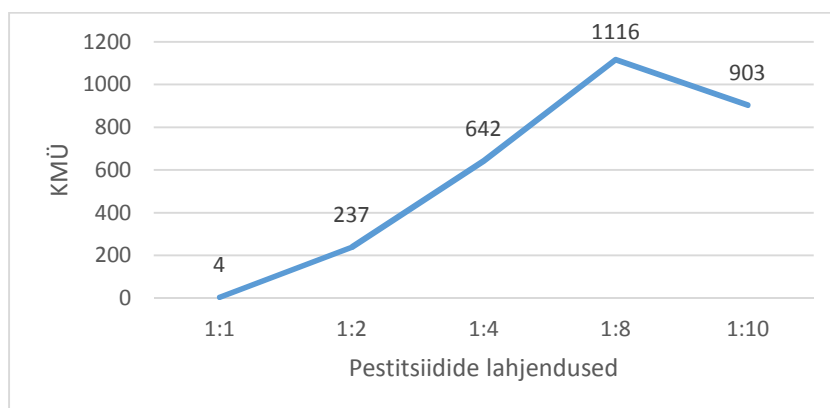


Joonis 2. Mikroorganismide hingamisaktiivsus (BA)

3.2 Inhibitsioonitest

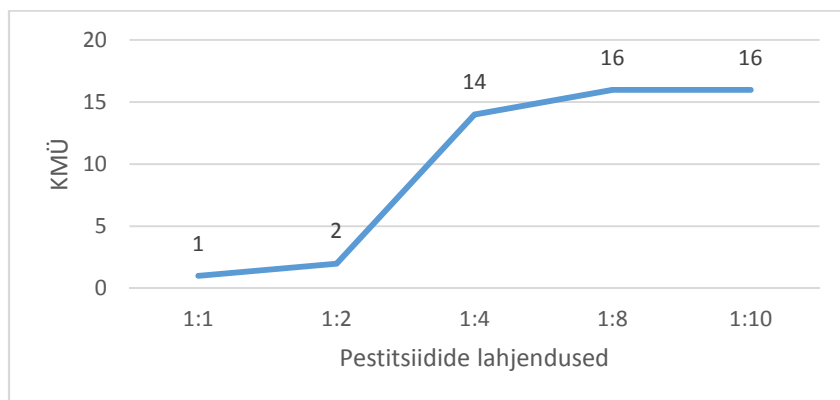
3.2.1 Karate

Inhibitsioonitesti käigus teostatud katsetest selgus, et suuremad kontsentratsioonid pestitsiidi Karate mõjuvad mikroorganisme pärssivalt. Tulemused on visualiseeritud joonisel 3. Bakterite söötmeplaatidel loendati lahjendamata Karate lisamisel ainult neli KMÜ-d, lahjendusel 1:2 oli KMÜ-sid 237. Järgnesid lahjendused 1:4, 1:8 ja 1:10, millelt loendati vastavalt 642, 1116 ja 903 KMÜ-d. Lisa 1 on toodud näited söötmeplaatidest ja seal moodustunud KMÜ-dest, pärast Karatega ja Rangeriga töötlemist.



Joonis 3. Bakterite KMÜ-d Karatega töödeldud söötmeplaatidel

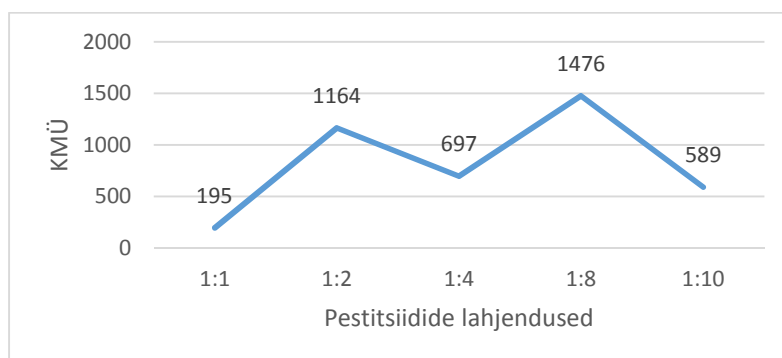
Joonisel 4 on toodud seente KMÜ-d Karatega töödeldud söötmeplaatidel. Lahjenduseta pestitsiidiga söötmeplaatidel oli ainult üks KMÜ, lahjendusega 1:2 söötmeplaadil oli kaks KMÜ-d, lahjenduse 1:4 juures moodustus 14 KMÜ-d. 16 KMÜ-d moodustus lahjenduse 1:8 ja 1:10 juures.



Joonis 4. Seente KMÜ-d Karatega töödeldud söötmeplaatidel

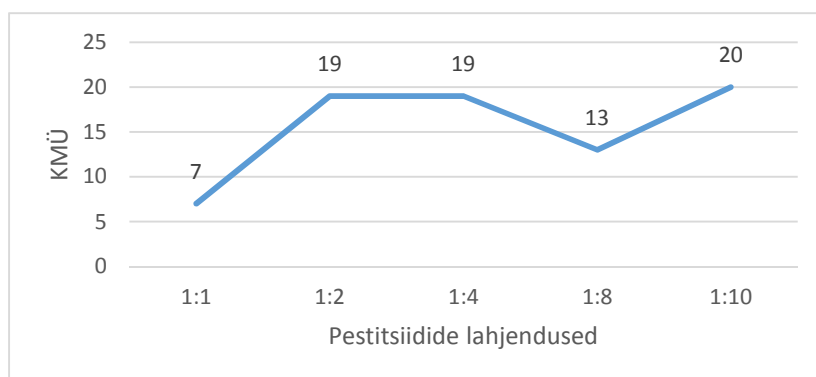
3.2.2 Fastac

Teostatud katsetest selgus, et Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel moodustus lahjendamata pestitsiidiga töödeldud söötmeplaadil 195 KMÜ-d. Üllatavalt moodustus lahjendusega 1:10 söötmeplaadil 589 KMÜ-d ja lahjendusega 1:4 söötmeplaadil 697 KMÜ-d. Seevastu lahjendusega 1:2 ja 1:8 söötmeplaatidel moodustus vastavalt 1164 ja 1476 KMÜ-d. Antud tulemused on ära toodud joonisel 5.



Joonis 5. Bakterite KMÜ-d Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel

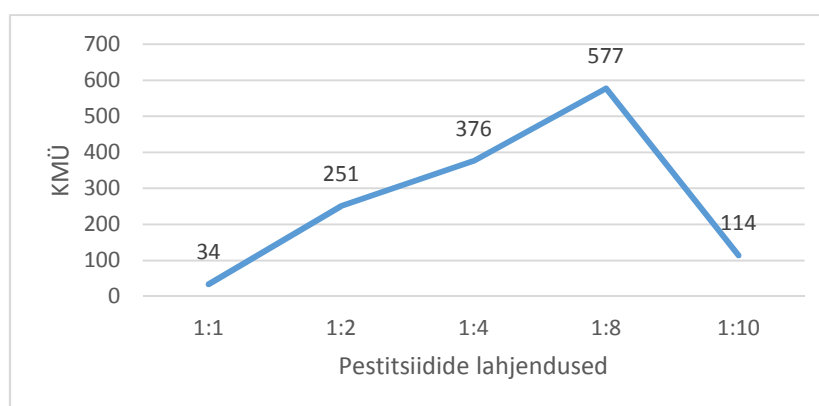
Seente kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaatidel loendati Fastaciga töötlemisel KMÜ-sid, mille tulemused on joonisel 6. Lahjendamata pestitsiidi puhul loendati seitse KMÜ-d. Kolooniaid moodustus lahjenduste 1:2 ja 1:4 juures võrdselt 19. Söötmeplaatidel, mis olid töödeldud Fastaci lahustega 1:8 ja 1:10 moodustus vastavalt 13 ja 20 KMÜ-d.



Joonis 6. Seente KMÜ-d Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel

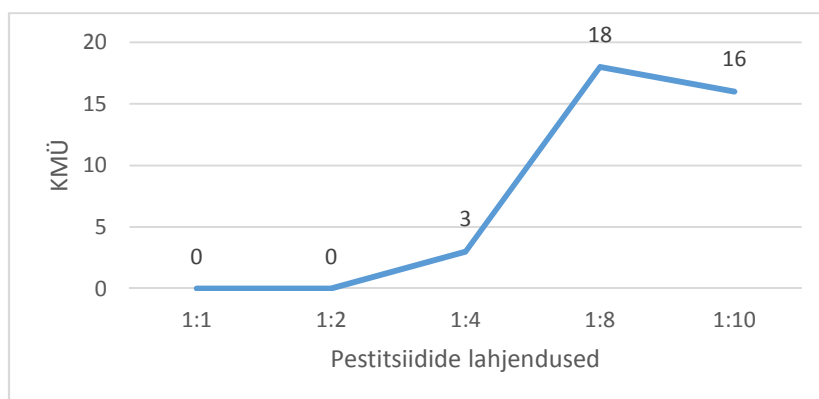
3.2.3 Ranger

Rangeriga töödeldud söötmeplaatidel moodustunud KMÜ-d on kujutatud joonisel 7. Katses selgus, et lahjenduseeta Rangeri lisamisel bakterite kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaadile moodustus 34 KMÜ-d, lahjenduse 1:2 juures moodustus 251 KMÜ-d, lahjenduse 1:4 juures moodustus 376 KMÜ-d, lahjenduse 1:8 juures moodustus 577 KMÜ-d ja lahjenduse 1:10 juures moodustus 114 KMÜ-d.



Joonis 7. Bakterite KMÜ-d Rangeriga töödeldud söötmeplaatidel

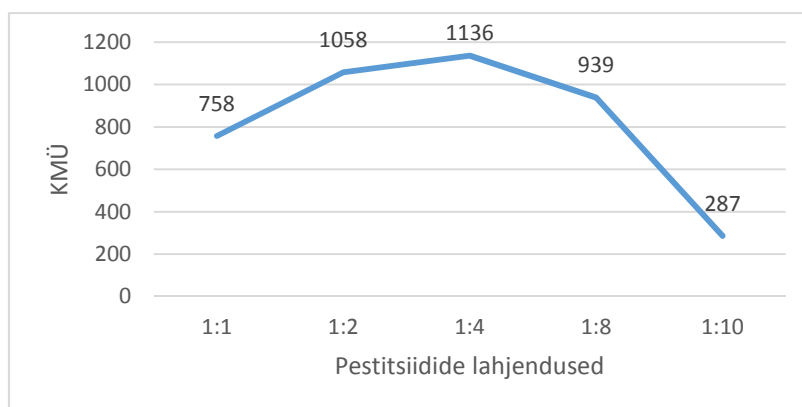
Lahjendamata pestitsiidi ja lahjenduse 1:2 juures ei moodustunud seente kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaatidel ühtegi KMÜ-d. Lahjenduse 1:4 juures loendati kolm KMÜ-d, lahjenduse 1:8 juures loendati 18 KMÜ-d ja lahjenduse 1:10 juures loendati 16 KMÜ-d. Seente KMÜ-de loenduse tulemused Fastaciga töödeldud söötmeplaatidel on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Seente KMÜ-d Rangeriga töödeldud söötmeplaatidel

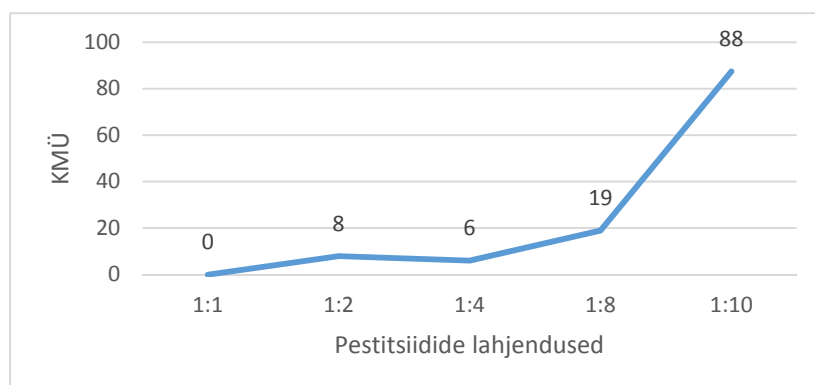
3.2.4 Stomp

Stompiga töödeldud bakterite KMÜ-de moodustamine on joonisel 9. Lahjendamata Stompiga töödeldud bakterite kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaatidel moodustus 758 KMÜ-d, lahjenduse 1:2 juures moodustus 1058 KMÜ-d ja lahjenduse 1:4 juures moodustus 1136 KMÜ-d. Järgnevalt loendati lahjenduse 1:8 juures 939 KMÜ-d ja lahjenduse 1:10 juures 287 KMÜ-d.



Joonis 9. Bakterite KMÜ-d Stompiga töödeldud söötmeplaatidel

Stompiga töödeldud seente kultiveerimiseks mõeldud söötmeplaatidelt loendatud KMÜ-d on kujutatud joonisel 10. Lahjendamata Stompiga töödeldud söötmeplaadilt ei tuvastatud ühtegi KMÜ-d, lahjenduse 1:2 juures loendati kaheksa KMÜ-d, lahjenduse 1:4 juures loendati kuus KMÜ-d ja lahjenduse 1:8 juures loendati 19 KMÜ-d. Eraldi paistis silma lahjendus 1:10, mille juures loendati 88 KMÜ-d.



Joonis 10. Seente KMÜ-d Stompiga töödeldud söötmeplaatidel

3.2.5 Kontroll

Kontrollkatseid, mille käigus teostati KMÜ-de loendus ja kuhu ei lisatud pestitsiide, teostati nii bakterite kui ka seentega kokku kaheksa. Bakterite kultiveerimisel loendati keskmiselt 1103 ± 132 KMÜ-d, seente kultiveerimisel loendati keskmiselt 24 ± 14 KMÜ-d.

3.3 Bakterite ja seente identifitseerimine

Katsetes kasutatud söötmeplaatidelt tuvastati seitse bakterite perekonda ja üheksa seente perekonda. Tuvastatud bakterite perekondadest viis olid grampositiivsed ja kaks gramnegatiivsed. Tuvastatud seente perekondadest olid seitse hallitusseened ja kaks pärmseened. Identifitseeritud bakterid ja seened kuuluvad järgmistesse rühmadesse:

- gramnegatiivsed bakterid: *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*

- grampositiivsed bakterid: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Bacillus*
- hallitusseened: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Richoderma*, *Mucor*, *Fusarium*
- pärmid: *Candida*, *Pichia*

Kümnest klaasplaadist, kuhu kinnitati bakterid, osutusid ainult seitse erinevatest perekondadest olevateks. Kümnest klaasplaadist, kuhu kinnitati seemed, tuvastati üheksa perekonda, ühte perekonda ei õnnestunud määrata. Lisa 2 on toodud kahe erineva seene mikroskoopilise fotografeerimise näited.

4 Arutelu

Laboris kultiveeritav osa mulla mikroorganismidest ei pruugi olla heaks näiteks esindamiseks kogu mullas leiduvat mikroobset elurikkust (Jacobsen *et al*, 2014). Laboris kultiveeritavaks peetakse tavaliselt 1% bakteritest ja kuni 17% seentest, seda seetõttu, et mikroorganismid vajavad kasvamiseks erinevaid keskkonnatingimusi, mida muld neile pakub, aga laboris pole võimalik kõiki tingimusi tagada (Lin *et al*, 1999; Soil microbiology and ..., 2010). Kuid teatavaid järeldusi saab sellest siiski teha. Edaspidistes uurimustes tuleks kindlasti käesoleva töö tulemusi võrrelda looduses teostatud katsete tulemustega.

Käesoleva töö käigus selgus, et pestitsiididel on mikroorganismide biomassi inhibeeriv toime. SIR katsest selgus, et kõikides pestitsiidiga katseanumates oli mikroorganismide biomass väiksem kui kontrolli puhul. Sarnase tulemuseni jõudis ka Lin *et al* teostatud katse, kus uuriti fungitsiidi, bakteritsiidi ja herbitsiidi mõju mulla mikroorganismidele. Teostatud katse näitas, et mikroorganismide biomass mõõdetuna SIR meetodiga, oli igal ajahetkel madalam võrreldes kontrolliga. Mikroorganismide biomass ei taastunud isegi peale 25-päevast katseperioodi. (Lin *et al*, 1999)

Seevastu mikroorganismide hingamisaktiivsus oli kontrolli puhul peaaegu kõige madalam, 8,746 mg O₂/kg KA*h⁻¹. Sellest veel madalam oli ainult Karatega töödeldud katseanuma hingamisaktiivsus 8,673 mg O₂/kg KA*h⁻¹. Sellest võib järeldada, et kontrollkatseanumas toimus võrdlemisi rahulik mikroorganismide elutegevus, kes reageerisid mulda lisatud glükoosile ootuspäraselt ja hakkasid kasvama. Samas pestitsiididega töödeldud katseanumates mõjusid pestitsiidid mikroorganismide inhibeerivalt. Mikroorganismide biomass vähenes, sest mõnda tüüpi bakterid ja seened ei talunud pestitsiide. Kuid alles jäänud mikroorganismid aktiveerusid nii mulda lisandunud glükoosi tõttu kui ka pestitsiidi tõttu, hakates ka pestitsiidi lagundama, omastamiseks toitaineid. Eeldatavasti on just sellest tingitud mikroorganismide kõrgem hingamisaktiivsus Stompiga ja Fastaciga töödeldud mulla puhul, võrreldes pestitsiidita mullaga. Stompist ja Fastacist erineb Karate, millega töödeldud katseanumas oli mikroorganismide hingamisaktiivsus madalam kui kontrollil ja ka mikroorganismide

biomass oli märkimisväärselt madalam 3,793 mg biomassC/kg KA, võrreldes 4,057 mg biomassC/kg KA Stompi puhul ja 4,140 mg biomassC/kg KA Fastaci puhul. Sellest võib järeldada, et Karate mõjub mikroorganisme enim inhibeerivalt. Mikroorganismide hingamisaktiivsus oli Karate puhul kõige madalam, jäädes ainukesena alla kontrolli hingamisaktiivsusele. Kuna Stompiga ja Fastaciga töödeldud mulla mikroorganismide hingamisaktiivsus oli kõrgem kui kontrollil, kuid Karatega töödeldud mullas madalam, võib järeldada, et Karate mõjub mikroorganismidele kõige toksilisemalt.

Sarnase tulemuse, kus tuvastati pestitsiidi lisamisel mikroorganismide hingamisaktiivsuse vähenemine, sai ka Munoz-Leoz *et al* kes tegi katse herbitsiidiga, mille toimeaine on tebukonasool. Katses tuvastati kõikide kontsentratsioonide juures mikroorganismide hingamisaktiivsuse vähenemine. Selle põhjuseks peeti negatiivset mõju seentele (Munoz-Leoz *et al* 2011). Seevastu herbitsiidiga napropamiid teostatud katsest selgus, et mikroorganismide hingamisaktiivsus tõusis esimestel päevadel peale pestitsiidi lisamist (Guo *et al*, 2008). Nendest tulemustest võib järeldada, et erinevad pestitsiidid võivad mikroorganismide hingamisaktiivsust nii pärssida kui ka soodustada. Hingamisaktiivsuse soodustamise üheks põhjuseks on peetud ka mikroorganismide reageeringut mitteoptimaalsetele tingimustele, mis häirib mikroobide ainevahetust. See võib tekitada olukorra, kus süsinikku kasutatakse ainult hingamiseks, kuid mitte kasvamiseks. (Eisenhauer *et al*, 2009)

Karate toksilisust kinnitab osaliselt ka KMÜ-de loendus söötmeplaatidelt, kus lahjendamata Karatega töödeldud söötmeplaadilt loendati ainult neli bakterite KMÜ-d ja lahjenduse 1:2 juures 237 KMÜ-d. Seevastu lahjendamata Stompi ja Fastaciga söötmeplaatidel loendati vastavalt 758 KMÜ-d ja 195 KMÜ-d ja lahjenduse 1:2 juures vastavalt 1058 KMÜ-d ja 1164 KMÜ-d. Madalamate kontsentratsioonide juures ei olnud vahed nii suured. Sarnane seos tuvastati ka seente KMÜ-de loendamisel, kus lahjendamata pestitsiidi lisamisel moodustus Karate, Stompi ja Fastaci lisamisel vastavalt üks, null ja seitse KMÜ-d, ning lahjenduse 1:2 juures kaks, kaheksa ja 19 KMÜ-d. Samas järgnevate kontsentratsioonide juures tuvastati, et Stomp omas seente inhibeerimisele suuremat mõju kui Karate

Inhibitsioonitesti tulemuste järgi omab kõige toksilisemat mõju nii bakteritele kui ka seentele Ranger. Paraku ei olnud Rangerit võimalik SIR katse ja mikroorganismide

hingamisaktiivsuse katse juures kasutada. Eeldatavasti oleks mikroorganismide biomass ja -hingamisaktiivsus Rangeriga töödeldud mullas jäänud madalamaks kui Karatega töödeldud mullas.

Madalamate pestitsiidide kontsentratsioonide juures moodustus võrdlemisi sageli sarnane arv KMÜ-sid, aga moodustunud kolooniad olid palju väiksemad ja seened ja bakterid polnud visuaalse hinnangu juures nii hästi arenenud kui ilma pestitsiidita kontrollkatse puhul. Kui KMÜ-de arvude vaatamisel võib sageli tunduda, et kontsentratsioonide 1:8 ja 1:10 puhul sageli erinevust kontrolliga ei olnud, siis tegelikult oli pestitsiidi inhibeeriv tulemus sageli näha, eelkõige seente puhul. Seened moodustasid kontrollkatsetes söötmeplaatidel sageli suuri lopsakaid kolooniaid, kuid pestitsiididega töödeldud söötmeplaatidel olid kolooniad väiksemad, kuigi KMÜ-de loendamisel võis tulemus olla sarnane.

Lisaks peab KMÜ-de loendamise juures arvestama ka kolooniate kokkukasvamist. Kui pestitsiidi poolt inhibeerivat toimet ei olnud või oli see vähene, kasvasid paljud kolooniad omavahel kokku, ning neid polnud võimalik omavahel eristada.

Mikroorganismide võimet kasvada pestitsiidiga saastatud söötmel on sageli põhjendatud sellega, et kasvama hakkavad nende mikroobide populatsioonid, kes on pestitsiidile resistentsemad. Lisaks on võimalik mikroorganismidel kasutada pestitsiidi mõju tõttu surnud rakke, kust vabanevad toitained. (Cycon *et al*, 2013)

Kuigi laboritingimustes söötmeplaatidel on esindatud ainult umbes 1% kogu mulla mikroorganismide arvust, saab nendest katsetest siiski järeldusi teha. Seda seetõttu, et laboris kultiveeritavad mikroorganismid on üldiselt suured ning vastupidavad ja moodustuvad umbes 80% mullas leiduvate mikroorganismide biomassist. Lisaks on KMÜ-de arv seotud ensüümide- ja hingamise aktiivsusega, millest tulenevalt saab KMÜ-de loendamise tulemusel teha järeldusi ka mullas toimuvate muutuste kohta. (Blagodatskaya *et al*, 2013)

Tuvastatud bakterite ja seente hulgas esines mitmeid perekondi, keda peetakse enim pestitsiidide lagundajateks. Need bakterid ja seened on heterotroofsed, kes kasutavad pestitsiidi toitainena. Käesoleva katse tulemustes olid sellisteks perekondadeks

Streptomyces, *Pseudomonas*, *Bacillus* ja *Agrobacterium* bakterite hulgas ja *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* ja *Fusarium* seente hulgas (Alexander, 1977). Katse ei võimaldanud tuvastada, mis perekonnast bakterid või seened enim pestitsiidi lagundasid. Kuid niivõrd suur osakaal identifitseeritud perekondadest olid kirjanduse põhjal otseselt seotud pestitsiidide lagundamisega. Sellest võib järeldada, et pestitsiidi lisamisel võisid hukkuda mõnest teisest perekonnast seened ja bakterid, kelle koha võtsid üle katse käigus tuvastatud seened ja bakterid. Järelikult võib eeldada, et pestitsiidide lisamine mõjutab mulla mikroobikooslust, luues sellised keskkonnatingimused, milliste juures mõned mikroorganismid asenduvad teistega. Teostatud katsetest ei selgu, kas selline muutus on positiivne või negatiivne. Ilmselt on sellel kaks tahku – populatsiooni muutumine tõi kaasa pestitsiide lagundavate mikroobide esinemise, mis on positiivne, sest pestitsiid lagundatakse selle käigus ära, ega kuhju keskkonnas. Samas toimus pestitsiidi lisamisel mikroobikoosluse muutus, mis tähendab, et pestitsiidi lisamise eelne mikroorganismide tasakaal ja elutegevus sai häiritud. Samuti võisid hukkuda just taimekasvuks eriti vajalikud bakterid ja seened (sümbiondid) ning katse üle elada pigem taimepatogeenid.

Tavapärase pestitsiidide kasutamise juures ei ole tõenäoline, et pestitsiidide kontsentratsioonid mullas muutuvad nii kõrgeks, et hävitavad suures osas mikroorganismid. Küll aga mõjutavad pestitsiidid kindlasti tavapära oludes mikroobikooslusi, mille tulemusel ei täida mikroorganismid enam oma välja kujunenud rolle, milleks võib pidada aineringluse tagamist ja mullaviljakuse tõstmist. Seetõttu võib eeldada, et põllumajanduse kohapealt on pestitsiidide kasutamine nagu kahe teraga mõök – tõrjudes kahjureid, vähendatakse ka mullaviljakust.

Pestitsiidide mõju mulla mikroorganismidele sõltub paljuski mulla tüübist, varasemast pestitsiidide kasutamisest, mullas elavatest mikroorganismidest jt teguritest. Seetõttu ei saa tegelikult lõplikke järeldusi teha, sest paljud katsed annavad täiesti erinevaid tulemusi. Vaja on paremate uurimismeetodite juurutamist, mis võimaldaks tulemusi võrrelda ja teha suuremaid üldistusi. Praeguste meetodite juures jäävadki teadmised piiratuks ja tõlgendused poolikuks.

Kokkuvõte

Pestitsiidide või nende jääkide esinemine mullas on muutunud tõsiseks keskkonnaprobleemiks, mille on tinginud pikaajaline pestitsiidide kasutamine (Morillo *et al.*, 2017). Seetõttu on oluline teada, mis mõju omavad pestitsiidid mitte ainult tõrjutavatele kahjuritele, vaid ka erinevatele keskkonna osadele, näiteks mulla mikroobikooslusele (Bending *et al.*, 2007). Standardiseeritud katsete puudumise tõttu ei ole palju teada, kuidas pestitsiidid mõjutavad mulla mikroorganisme. Tuginedes teaduskirjandusele, võib järeldada, et pestitsiidide mõju mulla mikroobikooslusele on küll uuritud, aga tulemused ei ole sellised, mille põhjal võiks üldistusi teha (Eisenhauer *et al.*, 2009). Selle põhjuseks on peaaesjalikult suur hulk erinevaid pestitsiidi toimeaineid, mis mõjuvad mikroorganismidele erinevalt ja laialdane varieeruvus mulla mikroobikoosluste hulgas.

Käesoleva uurimustöö käigus selgus, et erinevatel pestitsiididel on erinev mõju mulla mikroobikooslusele. Seda kinnitasid kõik teostatud katsed. Mikroobse biomassi määramisel tuvastati pestitsiidide inhibeeriv toime kõikide katseanumate puhul, sealjuures inhibitsiooni määrad olid erinevad. Samuti tuvastati kontrollist erinevad tulemused ka mikroorganismide hingamisaktiivsuses. Inhibitsioonitesti käigus uuriti söötmeplaatidel kultiveeritavate mikroorganismide reageeringut erinevatele pestitsiidide kontsentratsioonidele. Inhibitsioonitesti katsetest selgus, et erinevad pestitsiidid mõjuvad mikroorganismidele erinevalt, sealjuures kõige toksilisemalt mõjub herbitsiid Ranger, mille toimeaineks on glüfosaat.

Uurimuse käigus ei selgunud, kas pestitsiidide lisamine *de facto* mõjutab mikroobikoosluste liigirikkust. Katsete käigus tuvastati, et pestitsiididega töödeldud söötmeplaatidel esinev mikroobikooslus on kirjanduse põhjal suuresti selline, mida võib eeldada pestitsiidiga saastunud muldade puhul. Kuid käesoleva töö raames ei teostatud mikroorganismide identifitseerimist katsetes kasutatud füsioloogilisest lahusest, mis ei olnud pestitsiidide poolt mõjutatud. Samas tuginedes kirjandusele ja teostatud katsete tulemustele, võib arvata, et pestitsiidid siiski mõjutavad mikroobikoosluste liigirikkust.

Pestitsiidide inhibeeriv toime mulla mikroorganismidele tuvastati praktiliselt iga pestitsiidi kontsentratsiooni juures. Pestitsiidi madala kontsentratsiooni juures esinev inhibeeriv toime oli kõige paremini tuvastatav mikroorganismide hingamisaktiivsuse ja mikroobse biomassi hindamise katsetes.

Uurimustöö käigus tuvastati, et katsetes kasutatud pestitsiidid mõjuvad võrdlemisi sarnaselt teaduskirjanduses kirjeldatule. Samas esines ka mõningaid vastupidiseid tulemusi, aga selle põhjuseks oli arvatavasti erinevate toimeainete erisugune mõju. See oli ka ootuspärane, sest võrreldes erinevaid teaduskirjandusi, oli ka sealsed tulemused erinevad. See kinnitab taaskord, et praeguste võimaluste juures ei ole pestitsiidide mõju mulla mikroobikooslustele lõplikult teada ja kinnitab edasiste uuringute vajadust, mis suudaksid arvesse võtta rohkem erinevaid muutujaid.

Käesolevast tööst selgus, et väga suur pestitsiidikontsentratsioon on võimeline hävitama seente populatsiooni ja väga tugevalt häirima bakterite populatsiooni. Seente populatsiooni hävimine tuvastati kokku kolmel korral, bakterite populatsioonides hävimist ei tuvastatud, aga lahjendamata insektitsiidi Karate lisamisel loendati ainult neli KMÜ-d.

Uurimuse käigus tuvastati, et pestitsiidijääkidele on vastupidavad valdavalt sellised bakterite- ja seente perekonnad, keda kirjanduse põhjal peetakse enim pestitsiidide lagundajateks. Kuid esines ka teistest perekondadest baktereid ja seeni, kes ilmselt ei olnud seotud pestitsiidide lagundamisega vaid olid pestitsiidide toksilisele mõjule resistentsed.

Uurimuse eesmärgid ja ülesanded said täidetud. Käesolevast tööst ja teaduspublikatsioonidest selgus, et pestitsiidid kahtlemata mõjutavad mulla mikroobikooslusi. Madalad kontsentratsioonid ei mõju mikroobikooslustele letaalselt, kuid siiski inhibeerivalt. Samuti võib järeldada, et pestitsiidide mõjul muutuvad ka mikroobikooslused, mistõttu ei toimu mullas enam samu protsesse, mis enne pestitsiidi lisamist. See on valdkond, mida tuleks kindlasti täiendavalt uurida.

Summary

„The impact of pesticides on soil microbial community“

The aim of this Master's thesis was to examine the impact of pesticides on soil microbial community. It is relevant because pesticides or residues of pesticides have become a serious environmental problem. Studies show that only about 0,3% of applied pesticides reach the targeted pests and 99,7% is sprayed in the environment and most of it ends up in the soil (Munoz-Leoz *et al*, 2011). Therefore, it is important to know how pesticides influence soil and soil microbial communities because soil microorganisms are responsible for nutrient cycles, organic material degradation and also degradation of pesticides (Eisenhauer *et al*, 2009).

The tests were carried out in Tallinn University of Technology Tartu College's soil biology laboratory. The most relevant, in this study, was to determine whether different pesticides influence soil microbial communities differently, whether application of pesticides impact soil microbial diversity and in what concentration different pesticides pose inhibition effect to soil microbial communities.

In this study four pesticides were used: Fastac with the active ingredient (AI) alpha-cypermethrin, Stomp with the AI pendimethalin, Karate with the AI lambda-cyhalothrin and Ranger with the AI glyphosate. The used pesticides are insecticide, herbicide, insecticide and herbicide, respectively. Three main tests were carried out, which was substrate induced respiration (SIR), basal respiration (BA) and inhibition test. Afterwards, bacterial and fungal classes were identified via microscopy.

The results of this study showed that, in fact, different pesticides do influence soil microbial communities differently. Pesticide impact to soil microbial diversity was not determined for sure because microbial diversity was not studied before pesticide application. But bacterial and fungal classes found on agar plates, which were treated with pesticides, showed that according to the literature, there were mostly classes who are responsible for pesticide degradation (Alexander 1977). For example *Streptomyces*,

Pseudomonas, *Bacillus* and *Agrobacterium* in bacterial classes and *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* and *Fusarium* in fungal classes So it can be concluded that the application of pesticides does impact soil microbial diversity.

Inhibition test was carried out with different pesticide concentrations and was noticed that pesticide influenced microbial communities at any given rate.

Due to the importance of this subject, the author recommends that further studies are needed to develop new methodology for studying the impact of pesticides on microbial communities.

Tänuõnad

Autor soovib tänada käesoleva töö juhendajat Sander Kuttit, tema kannatlikkuse ja igakülgse abivalmiduse eest.

Lisaks tänab autor oma abikaasat Liisa Õunloo-Jegersit, kes oli suureks toeks käesoleva töö valmimise ajal ja Rivo Saviojat, kes oli oma tegudega eeskujuks.

Kasutatud kirjandus

- Aislabie, J., Deslippe, J. R. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. Lincoln : Manaaki Whenua Press.
- Alexander, A. (1977). Introduction to soil microbiology. 2nd ed. Florida : Krieger publishing company.
- Baltic Agro. Stomp CS. <http://www.balticagro.ee/taimekaitse/muud-herbitsiidid/stomp-cs> (20.05.2017)
- BASF crop protection Eesti. Fastac 50. http://www.agro.basf.ee/agroportal/ee/et/special/product_catalogue_1/product_details_1766.html (20.05.2017).
- Bending, G. D., Rodriguez-Cruz, M. S., Lincoln, S. D. (2007). Fungicide impacts on microbial communities in soil with contrasting management histories – *Chemosphere*, 69, (2007), 82 – 88.
- Bergey's manual of systematic bacteriology : volume two, part A. (2005). / ed. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. 2nd ed. Springer.
- Betsy, T., Keogh, J. (2005). Microbiology demystified. USA : McGraw-Hill
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches – *Soil biology & biochemistry*, 67, (2013), 192 – 211.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001). The fungi. 2nd ed. San Diego : Academic Press.
- Cornell University. (2012). Types of pesticides. <http://psep.cce.cornell.edu/Tutorials/core-tutorial/module13/index.aspx> (20.05.2017)
- Cycon, M., Wojcik, M., Borymski, S., Piotrowska-Seget, Z. (2013). Short-term effects of the herbicide napropamide on the activity and structure of the soil microbial community assessed by the multi-approach analysis - *Applied soil ecology*, 66, (2013), 8 – 18.
- Dighton, J. (2016). Fungi in ecosystem processes. 2nd ed. CRC Press.
- DiSalvo, A. 2017. Mycology – chapter one. Introduction to mycology. <http://www.microbiologybook.org/mycology/mycology-1.htm> (20.05.2017)

Eisenhauer, N., Klier, M., Parsch, S., Sabais, A. C. W., Scherber, C., Weisser, W. W., Scheu, S. (2009). No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration – *Applied soil Ecology*, 42, (2009), 21 – 36.

Encyclopedia of soils in the environment : Volume one. (2004). / ed. D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks. New York : Academic Press.

Extension Toxicology Network. (1993). Pendimethalin.
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/metiram-propoxur/pendimethalin-ext.html> (20.05.2017)

Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters - *Agriculture, ecosystems and environment*, 88, (2002), 169 – 174.

Food and agriculture organization of the United Nations. (2016). FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides – Glyphosate.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate_2016_02_10.pdf (20.05.2017)

Freedman, B. (1995). Environmental ecology : The ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses. 2nd ed. London : Academic Press.

Gomez, E., Ferreras, L., Lovotti, L., Fernandez, E. (2008). Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina – *European journal of soil biology*, 45, (2009), 163 – 167.

Guo, H., Chen, G., Lv, Z., Zhao, H., Yang, H. (2008). Alteration of microbial properties and community structure in soils exposed to napropamide – *Journal of environmental sciences*, 21, (2009), 492 – 502.

Hariduskeskus. (2015). Bakterid.
<http://www2.hariduskeskus.ee/opiobjektid/mikrobioloogia/?MIKROORGANISMID:BAKTERID> (20.05.2017)

Heitzman, R. J. Alphacypermethrin.
<http://www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e08.htm> (20.05.2017).

Hoorman, J. J., Islam, R. (2010). Understanding soil microbes and nutrient recycling. <http://ohioline.osu.edu/factsheet/SAG-16> (20.05.2017)

Imfeld, G., Vuilleumier, S. (2011). Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review – *European journal of soil biology*, 49, (2012), 22 – 30.

Jacobsen, C. S., Hjelmso, M. H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity – *Environmental biotechnology*, 27, (2014), 15 – 20.

Kalia, A., Gosal, S. K. (2011). Effect of pesticide application on soil microorganisms – *Archives of agronomy and soil science*, 6, (57), 569 – 596. DOI 10.1080/03650341003787582

Karch, C. (2008). Water and fungi. <https://www.emlab.com/s/sampling/env-report-02-2008.html> (20.05.2017).

Karpouzas, D. G., Kandeler, E., Bru, D., Friedel, I., Auer, Y., Kramer, S., Vasileiadis, S., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Martin-Laurent, F. (2014). A tiered assessment approach based on standardized methods to estimate the impact of nicosulfuron on the abundance and function of the soil microbial community – *Soil biology & biochemistry*, 75, (2014), 282 – 291.

Klaassen, C. D. (2013). Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 8th ed. McGraw-Hill.

Lancaster, S. H., Hollister, E. B., Senseman, S. A., Gentry, T. J. (2009). Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate – *Wiley interscience*, 66, (2010), 59 – 64. DOI 10.1002/ps.1831

Langer, U., Rinklebe, J. (2010). Priming effect after glucose amendment in two different soils evaluated by SIR- and PLFA-technique – *Ecological Engineering*, 37, (2011), 465 – 473.

Lin, Q., Brookes, P. C. (1999). Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and biovolume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils – *Soil biology and biochemistry*, 31, (1999), 1999 – 2014.

Lo, C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community – *Journal of environmental science and health*, 5, (45), 348 – 359.

Medical microbiology. (1996). / ed. Baron, S. 4th ed. University of Texas medical branch at Galveston.

Microbial physiology. (2002). / ed. A. G. Moat, J. W. Foster, M. P. Spector. 4th ed. USA : Wiley-Liss.

Morillo, E., Villaverde, J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils - *Science of total environment*, 586, (2017), 576 – 597.

Munoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C. (2011) Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity - *Soil biology & biochemistry*, 42, (2011), 2176 - 2183

Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview – *International microbiology*, 5, (2002), 53 – 63. DOI 10.1007/s10123-002-0062-3

Pesticides in the modern world – trends in pesticide analysis. (2011). / ed M. Stoytcheva. InTech.

Platen, H., Wirtz, A. (1999). Measurement of the respiration activity of soils using the OxiTop® Control measuring system : basic prinriples and process characteristic quantities. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co.

Põllumajandusamet. Ranger XL – infoleht.
<http://www.pma.agri.ee/download.php?getfile2=5291> (20.05.2017).

Soil microbiology and sustainable crop production. (2010). / ed. G. R. Dixon, E. L. Tilston. Springer.

Soil microbiology, ecology, and biochemistry. (2007). / ed. E. A. Paul. 3rd ed. USA : Elsevier.

Stenersen, J. (2004). Chemical pesticides : mode of action and toxicology. USA : CRC Press.

Syngenta Eesti. (2017). Karate Zeon. <https://www.syngenta.ee/product/crop-protection/insektitsiid/karate-zeon> (20.05.2017)

University of Minnesota extension. Chapter 1 – integrated pest management. https://www.extension.umn.edu/agriculture/pesticide-safety/ppat_manual/Chapter%201.pdf (20.05.2017)

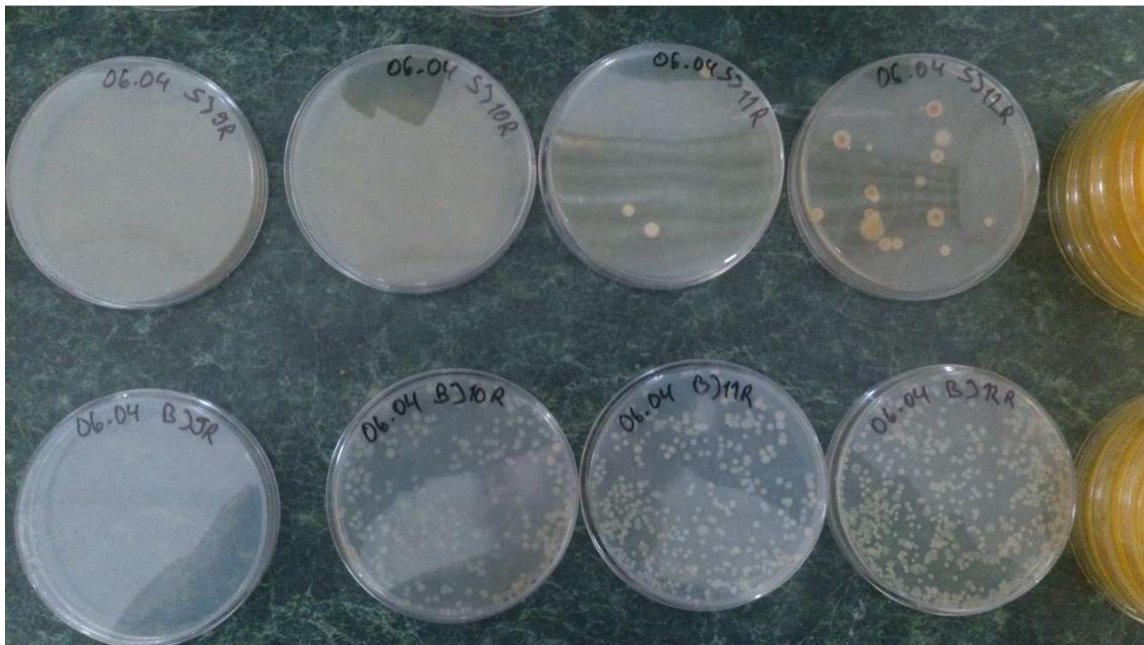
Watkinson, S. C., Boddy, L., Money, N. P. (2016). The fungi. 3rd ed. Ühendkuningriik : Academic Press.

Waxman, M. F. (1998). Agrochemical and pesticide safety handbook. USA : Lewis Publishers.

Webster, J., Weber, R. (2007). Introduction to fungi. 3rd ed. USA : Cambridge University Press.

Yang, C., Sun, T., He, W., Zhou, Q., Chen, S. (2006). Single and joint effects of pesticides and mercury on soil urease – *Journal of environmental sciences*, 19, (2007), 210 – 216.

Lisa 1



Lisa 2

