

TALLINNA ÜLIKOOL
Loodus- ja terviseteaduste instituut
Keskkonnakorralduse õppekava

Kadi Karmen Kaldma

**Tallinna kogukonnaedade mulla mikrobioloogilise
koostise määramine**

Magistritöö

Juhendajad: Professor Tiiu Koff

Lektor Kairi Koort

Tallinn 2021

Lühikokkuvõte

Tallinna kogukonnaaedade mulla mikrobioloogilise koostise määramine

Kadi Karmen Kaldma

Käesolevas magistritöös uuritakse linnaruumi rajatud kogukonnaaedades toidu kasvatamiseks kasutatavate muldade mikrobioloogilist koostist. Uuringu eesmärk on välja selgitada, kas need mullad sisaldavad inimtervisele kahjulikke mikrobioloogilisi organisme ehk patogeene. Linnaruumis esinevad transpordist ja muust inimtegevusest tulenevad negatiivsed häiringud, mis kajastuvad mullas. Samas on linnaaiandus oluline nii linnaruumi kujundamise, kogukondade sotsiaalse kaasatuse, tervislike eluviiside, bioloogilise mitmekesisuse säilitamise, keskkonnateadlikkuse kui ka toidupuuduse vähendamise aspektist. Uuritakse, kas linnaruumis toidu kasvatamiseks kasutatav muld on inimtervisele ohutu.

Uuringuga tuvastati, et linnaaedades kasutatav muld on inimtervisele ohutu. Mullas leidis inimtervisele kasulikke, immuunsüsteemi ergutavaid mikroobe ning tuvastati mitmeid orgaanilisi aineid hästi lagundavaid mikroobe.

Märksõnad: kogukonnaaed, patogeen, mullamikroobid, linnamuld

Sisukord

Mõisted ja lühendid	4
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Ökosüsteem ja inimese mikrobiota	8
1.2. Mulla mikrobiom	10
1.3. Kompost	14
1.5. Kogukonnaaianduse seos linna säilenõtkusega	15
Materjal ja meetodika	17
2.1. Valim	17
2.3. Proovide kogumine	25
2.4. DNA eraldamine	26
2.5. Eraldatud DNA kontsentratsiooni mõõtmine	28
2.6. Polümeraasi ahelreaktsioon	28
2.7. Agaroos-geelelektroforees	30
2.8. Sekvenerimisraamatukogude valmistamine	32
2.10. Prokarüootide 16S rRNA geenijärjestuste sekvenerimine	39
2.11. Eukarüootsete mikroobide ITS1 regiooni sekvenerimine	39
2.12. Bioinformaatiline analüüs	41
Tulemused ja arutelu	43
3.1. Mulla päritolu väljaselgitamine	43
3.2. Patogeenide esinemine kasvukastide mullas	45
3.3. Mullaproovidest DNA eraldamine ja analüüs	46
3.4. Agaroos-geelelektroforees	48
3.5. Mullaproovidest tuvastatud mikroobid	49
Kokkuvõte	54
Summary	56
Kasutatud kirjandus	58
Lisad	
Lisa 1. Analüüsi protokollid	66
Lisa 2.	72

Mõisted ja lühendid

Amplifitseerima – DNA- (RNA-) molekulide arvu mitmekordistamine

Annoteerima - annotatsiooni ehk lühikirjeldusega varustama, üles täheldama, kirja panema

Ekstraheerima - tahkete või vedelate ainete segust üht või mitut komponenti selektiivselt lahuse abil eraldama

Eukarüoot - päristuumsed, rakulised organismid (seened, vetikad, arhed)

Fülogenees – organismirühma põlvnemiskäik, osa evolutsiooniteooriast, mis käsitleb liigi, organismi või organismirühma põlvnemise arengut

Fülotüüp – keskkonna DNA järjestus või järjestuse rühm, millel on konkreetse pärilikkusteguri sarnasuse tase

Genoom – kogu geneetiline materjal organismis

ITS – *Internal Transcribed Spacer*, sisemine transkribeeritav speisser

Metabolism ehk ainevahetus – organismidele omaste biokeemiliste protsesside kogum, kus ained liiguvad organismi ja keskkonna vahel

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

Prokarüoot - eeltuumne, rakutuumata algeline organism (bakterid)

Proteoom – täielik valkude kogum, mis on kodeeritud genoomi poolt

OTU – *Operational Taxonomic Unit*, taksonoomiline ühik. Taksonoomilisse ühikusse ehk taksisesse on ühendatud mikroorganismid, kes on oma tunnuste poolest lähedased, kasutatakse suure mitmekesisusega süsteemides orienteerumiseks. OTU-de puhul tegemist mingite kindlate tunnuste poolest sarnaste organismide kogumiga

TBE – *Tris-boraat-EDTA*

16S rRNA – väikese ribosoomi subühiku ribosomaalne RNA

Sissejuhatus

Kogukonnaaianduse populaarsuse kasv aitab kaasa mitmetele Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni (ÜRO) säästva arengu tegevuskava eesmärkidele (Riigikantselei, s.a.), mis omakorda on osa „Säästev Eesti 21“ strateegiast (RT I 2005, 50, 396). Eesmärgi nr 2 **kaotada näljahäda** kohaselt soovitakse saavutada senisest parem toiduga kindlustatus ning kujundada paremaid toitumisharjumusi. Sellele aitab kaasa kogukonnaaiandus, kasvatades meie kliimasse sobivaid toidukultuure. Kogukonnaaiandus on jõukohane ka algajale aiapidajale, sest rohkem pannakse rõhku salati- ja maitsetaimedele, mida on kergem kasvatada väikesel maa-alal. Kogukonnaaedades lähtutakse permakultuuri põhimõtetest, kuid on ka kogukonnaaedu, kus aed on tööriist inimeste kokkukutsumiseks, sel juhul ei ole permakultuuri põhimõttest lähtumine kohustuslik. See on säästlik viis muldade majandamiseks, mille käigus nii öelda kasvatatakse lisaks toidule ka mulda, vältides tööstuslike väetiste kasutamist. Eesmärgi nr 11 **muuta linnad ja asulad kaasavaks, turvaliseks, vastupidavaks ja säästvaks** kohaselt soovitakse muuta linnad kestlikuks kvaliteetseks elukeskkonnaks, mille üks olulisi aspekte on sidusa rohelise ruumi olemasolu võimaldamine linlastele. Sidus avalik ruum tekitab turvatunnet ja vähendab ebavõrdsust, kaasates erinevaid ühiskonna rühmi linna kujunemisesse. Kaasamine aitab tuua kokku erineva taustaga inimesed, kes töötavad ühise eesmärgi nimel, tagades seeläbi sotsiaalse jätkusuutlikkuse. Eesmärk nr 13 **võtta kiiresti meetmeid kliimamuutuste ja nende mõjude vähendamiseks** kohaselt tuleb võidelda kliimamuutustest tulenevate negatiivsete mõjude vastu. Kogukonnaaiandus pakub ka seda võimalust. Kogukonnaaedade rajamisega suurenevad loodusliku mitmekesisusega rohealad, mis aitavad vähendada temperatuuri tõusu linnas, leevendades ekstreemseid kuumalaineid. Pikad kuumalained on ohtlikud vanemaealistele ning väikelastele, põhjustades liigsurmasid (Frantzeskaki, 2016). Kogukonnaaiad toetavad keskkonnateadlikkust ja -haridust ning selle kasvades teevad inimesed keskkonnateadlikumaid valikuid. Keskkonnateadlikud valikud omakorda aitavad teha jätkusuutlikumaid otsuseid, mis aitavad kaasa kestlikuma linna kujunemisele. Kogukonnaaedades kasvatatavad erinevad kultuurid tõstavad linnades bioloogilist mitmekesisust nii taimede kui ka uute elupaikade näol, aitavad mitmekesisuse kestma jäämisele kaasa. Kliimamuutuste negatiivseid mõjusid aitavad vähendada looduslikud pinnad, mida kogukonnaaianduse raames säilitatakse ja luuakse. Looduslikel pindadel on

võime akumulērida vihmavett, mis vähendab linnadele iseloomulike tehispindade kõrval ülejūtuse ohtu.

Kogukonnaiaandus muudab linnalist elukeskkonda kvaliteetsemaks, pakkudes rekreatiivseid võimalusi, rohelist, ökosüsteemiteenuseid, silmailu ja rikastab inimese toidulauda (Uustal, Kuldna, & Peterson, 2010). Positiivsetest külgedest on räägitud palju, kuid samas on alati olnud küsimärgi all linnas kultiveeritud toidu ohutus. Linnalises keskkonnas on toidu kasvatamise üks võimalik ohuallikas mulla mikrobioloogiline koostis.

Inimese keha on tohtu hulga erinevate mikroobide ehk mikrobioomiga ökosüsteem. Sellel ökosüsteemil on oluline roll inimese tervises. Viimastel aastakümnetel on inimeste elustiil palju muutunud, mis on kaasa toonud inimese soolestiku mikrobioomi muutused. Antibiootikumide ja kõrgete standarditega sanitaartingimustele lisaks on näiteks töödeldud toit põhjustanud inimese mikrobioomi soovimatuid muutusi, mida on raske tagasi pöörata. Mikrobioomi muutused ja sellega kaasneva teatud funktsionaalsete omaduste kadumise võib põhjustada tehiskeskkonnas elamine. Uuringud näitavad, et nii pidev kui ka lühiajaline kokkupuude loodusega mõjub positiivselt inimese soole- ja nahamikrobioomi mitmekesisusele. (Sonnenburg & Sonnenburg, 2019)

Selle magistritöö eesmärk on luua ülevaade kogukonnaaedades kasutatavatest muldadest ning selgitada välja linnaaedade muldade ohutus inimese tervisele, keskendudes mulla mikrobioloogilisele analüüsile. Mulla ohutuses veendumiseks tuvastatakse mikroobid taksonoomilise ühikuni välja, et selgitada patogeenide olemasolu. Mullaproove koguti nii 2019 aasta sügisel kui ka 2020 aasta sügisel, sel viisil saab võrrelda kahe aasta jooksul toimunud mulla mikrobioloogilis muutusi. Nimelt leidub mullas valdavas enamuses inimesele kasulikke mikroobe, kuid võib esineda ka organismidele negatiivse mõjuga mikroobe ehk patogeene (Baumgardner, 2012).

Magistritöö on seotud Tallinna keskkonna- ja kommunaal ameti poolt tellitud projektiga **TRU19218A** "Tallinna linnaaedade mulla- ja taimeproovide analüüs", kus töö autor aktiivselt kaasa lõi. Veel on töö seotud teadus- ja arendustegevuste rahastusel tehtava teadus- ja arendusprojektiga (**TF5419** „Tallinna linna kogukonna- ja õppeaedade mullastiku kompleksanalüüs ja aiasaaduste kasvatamise ohutuse hindamine“ Kairi Koort, LTI, TLÜ), millele antud magistritöö raames tehtud uuring sisendi annab.

Autor avaldab tänu oma juhendajatele Tiiu Koffile ja Kairi Koortile, kes olid toeks ja abiks ning jagasid häid näpunäiteid magistritöö kirjutamisel. Lisaks tänu Madis Metsisele jätkuva toetuse eest ning Krinsli Piusile töö tegemiseks vajalike tellimustega seotud abi eest. Autor tänab ka Tallinna keskkonna- ja kommunaalametit, kes rahastas projekti (**TRU19218A**), millest osa kuulub selle magistritöö alla. Samuti suur tänu teadus- ja arendustegevuse rahastajatele projekti (**TF5419**) rahastuse eest, mis aitas kanda selle magistritöö jaoks vajaminevaid kulutusi. Eriti suurt tänu avaldab autor Tallinna linnale, kes tunnustas töö vajalikkust ning nimetas autori Raestipendiumi stipendiaadiks.

Kirjanduse ülevaade

Elu ajalugu Maal on talletatud geoloogilistes kihtides, fossiilides ja kaasaegsete organismide genoomides. Neid andmeid koos uurides aitavad need lisaks teaduslikele ja biomeditsiinilistele omadustele tuvastada metaboolseid ja regulatiivseid radu ning annoteerida valgujärjestusi. Planeedialalüüs, kasutades erinevatest ökosüsteemidest pärit genoomi ja proteoomi andmestikke, annab parema ülevaate ja arusaama sellest, kuidas elu biosfääriga suhtleb ja globaalsete muutustega kohaneb. (Benner *et al.*, 2002)

Selle magistritöö raames kasutatav sekveneerimistehnoloogia on tänapäevane analüüsimismeetod proovidest mikroobide tuvastamise jaoks. See meetod on muutnud arusaama meie keha ja meie planeedi mikroobikooslusest. Sekveneerimistehnoloogiat saab kasutada seni uurimata bioloogilise mitmekesisuse ja ökoloogiliste omaduste dokumenteerimiseks, uurides nii terveid kooslusi kui ka üksikuid mikroobseid taksoneid. Kuna ITS ja 16S rRNA järjestused on väga head fülogeneetilised markerid, siis saab neid analüüsides ülevaate sellest, millised mikroobsed taksonid proovides esinevad. (Caporaso *et al.*, 2011)

1.1. Ökosüsteem ja inimese mikrobiota

Viimastel aastatel on üha enam hakatud rääkima ja tutvustama ühtse tervise (*One Health*) kontseptsiooni, mille kohaselt inimese tervis, ökosüsteemi tervis ja planeedi tervis on ühtne üksteisest sõltuv tervik (Haspeck, 2020). Kontseptsiooni kohaselt on kasulik nt mulla, taime ja looma tervist uurida ühtse tervikuna. Kõigi ökosüsteemis olevate organismide tervislik seisund on seotud mikroobikoosluste liikumisega keskkonnast (mullast) taimedele, loomadele, inimestele ja seejärel tagasi keskkonda. Omavahel ühendatud mikrobiomide roll taime- ja loomatervishoiu edendamisel on tähtis mõistmaks kuidas edendada ja stimuleerida tervislikku ja mitmekesist mikrobioomi inimese domineeritud ökosüsteemis. Oluline on ökosüsteemi ja mulla tervise säilitamine taimekoosluste mitmekesistamise ja hallatavate ökosüsteemide oligotrofeerumise kaudu. (van Bruggen *et al.*, 2019).

Viimastel aastakümnetel on linnalistes keskkondades sagenenud inimeste immuunhaiguste (Grönroos *et al.*, 2018) ja põletikuliste haiguste esinemine (Reber *et al.*, 2016).

Immuunhaiguste esinemise sagedust seostatakse tehiskeskkonnas suurenenud hügieenitasemega ning vähenenud kontaktiga loodusliku bioloogilise mitmekesisusega. Grönroos kolleegidega testis, kuidas mõjutab lühiajaline kontakt looduslike materjalidega inimese bakterite mitmekesisust. Katsealustel võeti nahalt proovid enne katset ja peale käte hõõrumist looduslike materjalidega nagu muld, taimed. Selgus, et ajutine kokkupuude looduslike materjalidega suurendas naha üldist mikrobioomi mitmekesisust ning bakteri hõimkondade *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ning alfa-, beeta ja gamma proteobakterite mitmekesisust. (Grönroos *et al.*, 2018) Eluslooduse süstemaatika kategooriad on välja toodud lisa 2. Kokkupuude looduskeskkonnas esinevate mikroobidega suurendab naha- ja soolemikrobioomi mitmekesisust, tugevdades immuunsüsteemi (Nurminen *et al.*, 2018). Põletikuliste haiguste esinemist seostatakse stressiga, mis häirib mikrobiootat ja mikrobioota ning peremehe vahelist bioloogilist harmooniat. Viimane aitab säilitada organismis toimuvate protsesside tasakaalu ning vältida süsteemis toimuda võivaid negatiivseid kõrvalekaldeid. Seega võib öelda, et mikrobioota mitmekesisus mõjub kehale antidepressiivselt ja on vajalik organismi normaalseks funktsioneerimiseks. (Reber *et al.*, 2016)

Soomes viidi 2020. aastal läbi uuring, kus võrreldi erinevate päevahoidude laste (vanuses 3-5 aastat) soolestikus ja nahal olevate mikroobide mitmekesisust. Osa uuringus osalenud lapsi veetsid õues aega linnalises keskkonnas kõnniteedel, plaaditud pindadel ja kruusaga kaetud hoovides, teised mängisid regulaarselt rohealadel ning kolmandad käisid uuringu ajal igapäevaselt looduses. 28 päeva jooksul väldanud uuringu järel oli selge, rohealadel ja igapäevaselt looduses käinud laste soolestiku ja naha mikrobioota oli selle lühikese ajaga mitmekesisustunud. Mitmekesine soolestiku ja naha mikrobioota tugevdab laste immuunsüsteemi ning vähendab allergiaid. (Roslund *et al.*, 2020)

Senised uuringud on näidanud inimeste soolestiku mikrobikoosluse mitmekesisuse vähenemise märke, mis tuleneb läänelikust dieedist ja elustiilist, aga ka sünnituste vastuvõtmisel keisrilõike laialdasest kasutamisest, antibiootikumide tarvitamisest, imikutele piimasegude söötmisest ja elukeskkonna sanitaartingimustest. Soolestiku mikroobide mitmekesisuse vähenemisega suureneb selliste krooniliste põletikulise haiguste nagu põletikuline soolehaigus, diabeet, rasvumine, allergiad ja astma levimus. Varajases elus keskkonna mikroobidega kokkupuude suurendab soolestiku mikroobide mitmekesisust,

seega linnastumisest tingitud muutus maakasutuses ja sellest tulenev mulla bioloogilise mitmekesisuse vähenemine võib olla rahvatervise oht. Keskkonnas toimuvad suured muutused võivad katkestada mikrobiota tervisliku arengu ja suurendada põletikuliste haiguste riski. (Tasnim *et al.*, 2017)

Soomes viidi läbi uuring, kus otsiti seost elukeskkonna ja inimese soolestiku mikrobiota vahel (Parajuli *et al.*, 2020). Uuringu käigus koguti eakatelt soomlastelt väljaheiteproovid, millest tuvastati bakterifülotüüpe, kasutades 16S rRNA sekveneerimist. Tulemustest selgus, et põõsaliikide arvukus soodustab eakate soolestiku mikrobiota homöostaasi. Uuritavate mikrobiota hõimkondade *Firmicutes*, *Bacteroidetes* tasemel täheldati, et *Ruminococcaceae* sugukonna ja *Faecalibacterium* perekonna esindajad olid arvukamad ning *Clostridiaceae* sugukonna ja *Clostridium* perekonna esindajad vähearvukad, kui õue põõsaliikide arv oli suurem. *Clostridiaceae* sugukonna *Clostridium* perekonna liikmete hulgas on patogeenne, seevastu *Faecalibacterium* perekonna liikmed on seotud hästitoimiva ja terve soolestikuga. Õistaimede liikide arvukus oli positiivselt seotud inimese mikrobiota hõimkonna *Bacteroides* klass *Bacteroidia* liikmete esinemisega. *Bacteroidia* klassi kaks sugukonda *Prevotellaceae* ja *Bacteroidaceae* on soolestiku mikrofloora levinuimad. (Parajuli *et al.*, 2020)

1.2. Mulla mikrobiom

Mulla mikrobioloogiast sai mullateaduse eraldi haru 1838. aastal kui Prantsuse põllumajanduskeemik Boussingault märkas, et kaunviljad võivad omastada lämmastikku õhust. Viiskümmend aastat hiljem eraldas Hollandi teadlane Beijerick kaunviljade juure sõlmedest bakterid. Said alguse mulla mikrobioloogia alased uuringud. (Giri *et al.*, 2005)

Mulla mikrobiom kujutab endast üht kõige keerulisemat mikrobikooslust planeedil Maa, hõlmates tuhandeid taksonid ja ainevahetusradasid (Naylor *et al.*, 2020). Mikroorganismid elavad kõikides keskkondades Maal, täites olulist rolli süsiniku ja toitainete ringluses, looma- ja taimetervises, põllumajanduses ning ülemaailmses toiduvõrgustikus (Cavicchioli *et al.*, 2019). Muld on looduslik keskkond, milles mikrobid elavad, paljunevad ja surevad. Mikrobikoosluste mitmekesisus on väga oluline teema, olles seotud paljude valdkondadega. Mulla viljakus ei sõltu ainult mulla keemilisest koostisest, vaid ka selles

elavate mikroorganismide olemusest. Mitmekesise ja elujõulise mikroobikoosluse säilitamine on mulla jätkusuutlikkuse alus. (Giri *et al.*, 2005)

Inimtegevus vähendab linnakeskkonna mitmekesisust, mis omakorda muudab mikroobikooslusi. Vaesunud mikroobikooslused mõjutavad linnaelanikke kuna mikroobidega kokkupuute vähenemine mõjutab negatiivselt inimese immuunsüsteemi ja see omakorda suurendab mittenakkuslike haiguste väljakujunemise tõenäosust. (Hui *et al.*, 2019) Antropogeensed maakasutuse muutused põhjustavad mitmesuguseid nakkushaiguste puhanguid ning muudavad endeemiliste infektsioonide levikut. Selline tegur on näiteks linnakeskkonda kontsentreerumine või linnakeskkonna laienemine. (Patz *et al.*, 2004)

Ökosüsteemitervis mõjutab otseselt inimeste tervist ja seetõttu tuleb ökoloogilist taastamist käsitleda rahvatervise teenusena. Maakasutuses tuleb arvestada n.-ö. maastiku immuunsuse tugevdamist, mis aitaks ära hoida linnkeskkonnas zoonooside ehk loomadelt inimestele levivate haiguste esinemist. (Reaser *et al.*, 2020) Maastiku ökoloogilised muustrid määravad elustiku leviku ja rohkuse, puhverdades seejuures haiguste dünaamikat. Keskkonnastress mõjutab looduslikku vastuvõtlikkust patogeenidega nakatumisele, kuna inimeste muudetud maastikud toovad eluslooduse koduloomadele ja inimestele lähemale, suurendades seeläbi tõenäosust, et patogeenid hakkavad levima ka teiste liikide populatsioonides. (Reaser *et al.*, 2020) Kohalike taimede taasasustamine tugevdab ökoloogilisi vastumeetmeid säilienõtkust suurendades (Reaser *et al.*, 2020).

Osa mullas leiduvaid baktereid ja seeni võivad olla patogeensed, põhjustades haigusi. Organismi võivad patogeenid sattuda mullaosakeste allaneelamisel, saastunud toidu allaneelamisel või mullaosakeste sissehingamise teel. (Baumgardner, 2012)

Mikroseened on mullas leiduvad väga edukad organismid, kes on oma plastilisusega võimelised kohanema erinevate ebasoodsate tingimustega. Samuti omavad seened võimet toota rakuväliseid ensüüme, mille abil lagundada erinevaid orgaanilisi aineid ning reguleerida süsiniku ja toitainete tasakaalu. (Frac *et al.*, 2015) Paljud seeneliigid koguvad oma viljakehadesse toksilisi metalle, olles pinnase tervendajad, ehkki need toksilised ained võivad pärssida seente kasvu ja mõjutada nende paljunemist (Baldrian, 2003). Nagu bakterite puhulgi, reguleerivad seente mitmekesisust ja kasvu mitmed biotilised tegurid - taimed ja teised organismid ning abiotilised tegurid – mulla pH, niiskus, soolsus, struktuur

ja temperatuur (López-Bucio *et al.*, 2015). Seened elavad väga erinevates pH ja temperatuuri vahemikes, mistõttu leidub neid pea kõigis keskkondades. Mullaseeni on võimalik liigitada nende funktsionaalsuse järgi:

- Bioloogilised tõrjevahendid,
- Ökosüsteemi reguleerijad,
- Orgaanilise aine lagundajad.

Bioloogiliste tõrjevahenditena suudavad seened reguleerida teiste organismide haigusi, kahjureid ja kasvu. Näiteks mükoriisaseened parandavad taimede kasvu, kaitsevad taimi patogeenide eest ning suurendavad taimede toitainete omastamist. Ökosüsteemi reguleerijatena osalevad seened mulla struktuuri ja teiste organismide elupaiga moodustamisel ning orgaanilise aine lagundajatena mängivad olulist rolli orgaanilise aine stabiilsena hoidmisel ning jääkide lagundamisel. (Frac *et al.*, 2018)

Juba 1950. aastatel kaeti põllukultuuride seemneid kasvu ja saagikuse parandamiseks bakterikultuuridega (*Azotobacter chroococcum* või *Bacillus megaterium*) (Brown, 1974). 1980. aastateks oli paljudel erinevatel bakteritel, peamiselt *Pseudomonas*, aga ka *Azospirillum*, kirjeldatud taimekasvu soodustavat toimet (Burr *et al.*, 1978) Tänapäevaks on teada palju mikroobe *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Glomus*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Rhodococcus* perekondadest, mille puhul on tõestatud taimekasvatust suurendavad omadused (Backer *et al.*, 2018). Mikroobide aktiivsus hoogustab taimede kasvu mullas levivate toitainete biosaadavuse suurendamise abil. Mulla mikroobid vabastavad taimedele toitaineid nagu lämmastik (N), fosfor (P) ja väävel (S), mis on seotud orgaanilistes molekulides ja on seetõttu taimedele muidu raskesti omastatavad. Nendele toitainetele juurdepääsul sõltuvad taimed mulla mikroobide - bakterite ja seente - kasvust. Kasulike mikroobide lisamine mulda võib olla ülitähtis keskkonna stressi tingimustes kui esineb toitainete piiratus, patogeenid, kahjurid, kõrge soola- või raskmetallide sisaldus. (Jacoby *et al.*, 2017)

Mullaseente ja taimejuurte vahel on sümbiootiline kooslus, mida nimetatakse mükoriisaks. Mükoriisa mängib võtmerolli ökosüsteemi toitainete ringluses ja kaitsevad taimi

keskkonnastressi eest. Kõige tavalisem mükoriisa tüüp on arbuskulaarne mükoriisa (AM). Arbuskulaarne mükoriisa moodustab omaette hõimkonna *Glomeromycota* (krohmseened). Krohmseened vajavad oma elutegevuseks taimi, mis tähendab, et tegemist on obligatoorsete sümbiontidega. (Smith & Read, 2008) Krohmseente inokuleerimise ehk kaitsepookimise positiivne mõju taimekasvule ja -tervisele on tunnustatud viis, millega on võimalik vähendada keemiliste väetiste ja pestitsiidide kasutamist, mille poole tänapäevane taimekasvatus liigub. (Azcón-Aguilar & Barea, 1997)

Linnamuldade mikrobioloogiline analüüs võimaldab teha järeldusi mulla saastumise kohta polütsükliiliste aromaatsete süsivesinikega (PAH). PAH-ide puhul on tegemist orgaaniliste ainetega, mis tekivad ühendite mittetäielikul põlemisel, linnakeskkonnas mõjutavad nende esinemist kõige enam liiklusest paisatavad heitmed. Nimelt kogunevad PAH-id mulda ning nende olemasolu mullas võib muuta mulla mikroobide koosluste koostist. On täheldatud, et PAH-ide kontsentratsiooni suurenemisega mullas suureneb deltaproteobakterite suhteline arvukus ning sugukonna *Flavobacterium* ja *Rhodanobacter* liikide arvukuse vähenemine. Paljud sugukonna deltaproteobakterid on suutelised PAH-e lagundama ja seetõttu on neid PAH-idega saastunud pinnases rohkem kui saastumata pinnases. Kõige enam muudab PAH-idega saastatus hõimkondade *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ja *Bacteroidetes* arvukust. (Roslund *et al.*, 2018)

Mulla mikroobide leviku ja aktiivsuse oluliseks keskkonnateguriks peetakse mulla pH-d. Mulla pH mõjutab mulla mikroobide liigilist koosseisu – atsidofiilsed liigid on happelembesed, neutrofiilid eelistavad elada neutraalse pH-ga keskkonnas ja alkalifiilsed mikroobiliigid eelistavad leeliselist keskkonda (Elsas, 2019). Mulla pH avaldab otsest mõju mikroorganismidele ja kaudset mõju taimekooslustele, mulla toitainetingimustele, raskmetallide lahustuvusele ning toksilisusele. Mulla pH mõjutab bakterite ja seente arvukuse tasakaalu mullas, seejuures kõrgema pH väärtuse korral on bakterite kasv suurem. (Fernández-Calviño & Bååth, 2010)

1.3. Kompost

Tihti kasutatakse mulla rikastamiseks komposti. Komposti puhul on tegemist orgaanilise ainega (taimised ja/või loomsed jäägid), mida on lagundanud mikroorganismid - bakterid, seened. Komposti valmistatakse näiteks lehtedest, õlgedest, puu- ja köögivilja jääkidest, sõnnikust. Kompost on kergesti valmistatav, hõlpsasti kättesaadav ning oluline mulla ja saagi kvaliteedi parandamise allikas. Muuhulgas parandab mulla struktuuri ning muudab toitaineid taimedele kergemini omastatavamateks. (Meena *et al.*, 2021) Komposteerumise ajal muutuvad kompostis temperatuurivahemikud, temperatuuri varieeruvusega muutuvad tingimused osa mikroorganismidele sobivateks ja teistele mitte. Kompostimisega tegeleb kaks erinevat aeroobset mikroorganismide rühma – mesofiilid ja termofiilid. Erinevad mikroorganismid – bakterid, aktinomütseedid, hallitusseened ja pärmid domineerivad kompostimise erinevates faasides. Kompostimine algab mesofiilsest etapist, kus temperatuur jääb vahemikku 20-40° C. Ka looma (sh. inimese) organismis elavad mikroobid ja patogeenid on mesofiilid (Graves, 2000). Komposteerimise mesofiilsele etapile järgneb termofiilne etapp, kus temperatuur jääb vahemikku 40-70° C ja toimub aktiivsem lagunemine. Termofiilses etapis mesofiilsed organismid surevad või muutuvad mitteaktiivseteks ning termofiilide ja/või temperatuuritolerantsete bakterite, aktinomütseelide ja seente populatsioon ning mitmekesisus suurenevad. Termofiilsele etapile järgneb jälle mesofiilne etapp, milles kompost n.-ö küpseb. (Ayilara *et al.*, 2020)

Hiinas koguti erinevate provintside kompostiproove tuvastamiseks sealseid mikroobe 16S rRNA järjestuste alusel. Selgus, et erinevate provintside kompostis leidis erinevaid mikroobikogukondi. Ligi 90% proovidest leidis 26 taksonoomilist ühikut (OTU), mis kuulusid hõimkonda *Firmicutes* (perekonnad *Cerasibacillus*, *Atopostipes* ja *Bacillus*) ja *Actinobacteria* (perekonnad *Thermobifida*, *Actinomadura* ja *Nocardiopsis*), enamik neist bakteritest on seotud orgaanilise aine lagundamisega. Ühtlasi leiti kompostist koguni 629 potentsiaalselt inimesele või loomale patogeenset mikroobiliiki bakteriperekondadest *Helicobacter*, *Staphylococcus*, *Acinotobacter*, *Streptococcus*, *Myobacterium* ja *Enterococcus*, mis moodustasid 1,21% kogu uuritud geneetilisest materjalist. (Wang *et al.*, 2020)

1.4. Varasemad uuringud Tallinna kogukonnaaedades

Laagna kogukonnaaia mulla uuringute kohta on varasemalt kirjutatud bakalaureusetöö (Kaldma, 2019), mille eesmärk oli hinnata mulla seisundit toidukultuuride kasvatamiseks. Teostati raskmetallide analüüs, millest ei selgunud inimese toidulauale potentsiaalselt jõuda võivate raskmetallide sisalduse olulist suurenemist. Mineraal ja orgaanilise aine sisalduse analüüs näitas suurt orgaanilise aine sisaldust ning pH oli kasvatuskastide mullas 7 lähedane, mis on optimaalne tase taimekasvuks. Samuti teostati mulla mikrobioomi uuringud, kuid lõpuni jäi uurimata toidukultuuride kultiveerimise ohutuse küsimus mulla mikrobioloogilisest aspektist. (Kaldma, 2019)

Tallinna Keskkonna- ja Kommunaalamet tellis Tallinna Ülikooli töörühma käest Tallinna kogukonna- ja õppeaedu uuriva monitooringu, veendumaks linnalises keskkonnas kasvatatud toidu ohutuses. Valitud kogukonna- ja õppeadest koguti 2019. aasta sügisel mullaproovid, kust määrati mulla raskmetallide (Zn, Cu, Pb, Hg, Cd ja Ni), pH, orgaanilise aine sisaldust ja inimpatogeenide tuvastamise esinemist ning taimeproovidest määrati raskmetallide (Zn, Cu, Pb, Hg, Cd ja Ni) sisaldust. Kõikides analüüsitud muldades oli taimedele ja mikroorganismidele sobiv pH (7). Orgaanilise aine sisaldus ületas kõikides aedades 45%, mille alusel võib pidada aedade mulda kvaliteetseks. Mõnes uuringus osalenud aias oli raskmetallide sisaldus kehtestatud piirnormidest suurem, kuid selline tulemus võis tuleneda ka asukoha eripärast, muretsemiseks ei olnud põhjust kuna neutraalse pH (7) juures on raskmetallide liikuvus madal. Mikrobioloogilise analüüsi käigus jõuti mullas olevad liigid identifitseerida seltsi tasemeni. (Kaldma *et al.*, 2019)

1.5. Kogukonnaaianduse seos linna säilenõtkusega

Linna säilenõtkuse all mõeldakse linna kui urbanistliku süsteemi vastupidavust šokile ja stressile, samal ajal positiivselt kohanedes ja muutudes jätkusuutlikkuse suunas. Oluline on seejuures süsteemi võime peale stressi säilitada normaalne funktsioon või taastada stressieelne olukord kiiresti. Üheks stressiallikaks, millele linnad peavad vastu seisma, on kliimamuutused. (Leichenko, 2011) Linnaaiad ja linnalähedane põllumajandus annavad olulise panuse kohanemiseks kliimamuutustega ja parema valmisoleku tagamiseks kliimamuutustega toimetulekuks. Looduslikud alad on linnale abiks, pakkudes

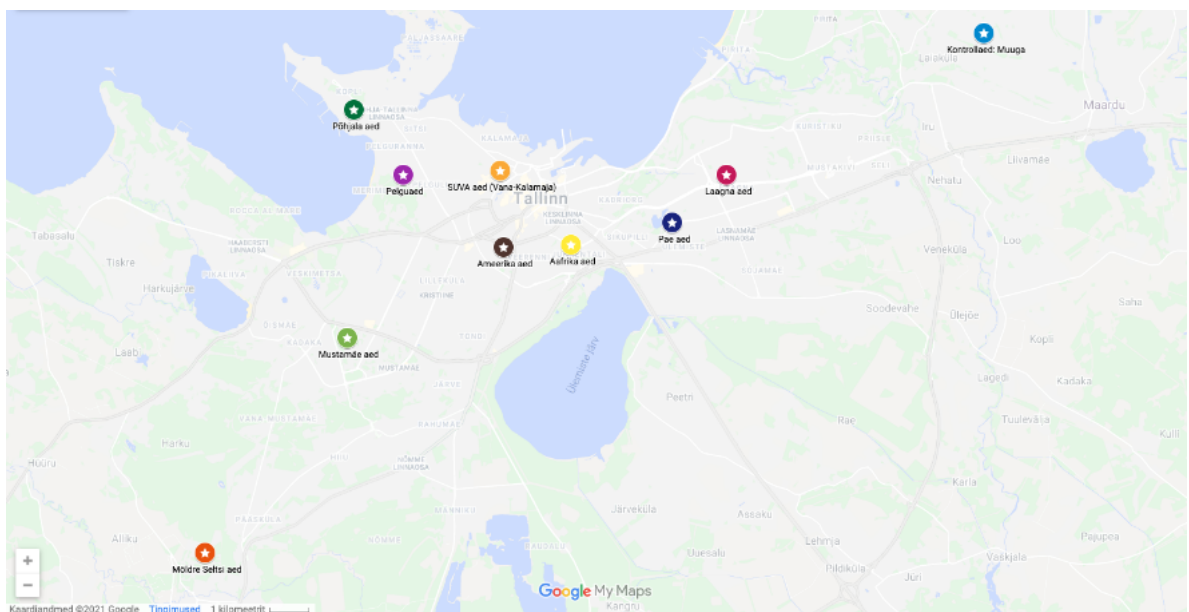
ökosüsteemiteenuseid (soojasaarefekti vähenemine, mulla teke, bioloogiline mitmekesisus, sademevee imbumine jne) ja loodushariduse võimalust (McPhearson *et al.*, s.a.). Lisaks looduslikele teguritele aitavad linnaaiad linna säilenõtkemaks muuta läbi sotsiaalse toimetulekuvõime. Linnaaiad mõjuvad positiivselt linlaste liikumisharjumustele, lisaks aias tegutsemine ja suhtlus tekitab rahulolu tunnet, suurendab keskkonna õiglust mõjudes samal ajal stressi maandavalt. (Martin *et al.*, 2016) Kogukonnaaedades ja üldse linnalähedastes piirkondades toidu kasvatamine vähendab sõltuvust ülemaailmsest toidusüsteemist, vähendades seeläbi haavatavust piirkonna toiduvarude suhtes (Olsson *et al.*, 2016). Seega aitavad kogukonnaaiad suurendada kogukondade säilenõtkust (Sellberg *et al.*, 2015), sotsioökoloogilist säilenõtkust ehk inimeste koostööst ja bioloogilise mitmekesisuse suurenemisest tulenevat kasu (McPhearson *et al.*, s.a.) ning püsida kollektiivsel mälul, säilitades taimekasvatuse oskuseid (Barthel *et al.*, 2015)

Materjal ja metoodika

Järgnevalt tutvustatakse magistritöö eksperimentaalse osa valimit ja töö metoodikat. Kõik kirjeldatud eksperimendid, välja arvatud patogeeni analüüs on teostanud Kadi Karmen Kaldma poolt. Töö oli osa Tallinna keskkonna- ja kommunaalameti poolt tellitud projektist **TRU19218A** „Tallinna linnaaedade mulla- ja taimeproovide analüüs“ ning Kairi Koorti teadus- ja arendustegevuste rahastusel tehtavast teadus- ja arendusprojektist **TF5419** „Tallinna linna kogukonna- ja õppeaedade mullastiku kompleksanalüüs ja aiasaaduste kasvatamise ohutuse hindamine“, millele antud magistritöö raames tehtud uuring sisendi annab.

2.1. Valim

Mullaproovid võeti üheksast Tallinna kogukonnaaiast: Pae aed, Aafrika aed, Ameerika aed, Pelguaed, Põhjala aed, Vana-Kalamaja aed, Laagna aed, Mustamäe aed ja Möldri Seltsi aed (joonis 1). Lisaks kogukonnaaedadele võeti mullaproove Tallinna külje all olevast eraaiast kontrollaiana.



Joonis 1. Kogukonnaaedade asukohad kaardil värviliste täppidena: Pae aed tumesinine, Aafrika aed kollane, Ameerika aed pruun, Pelguaed lilla, Põhjala aed tumeroheline, Vana-Kalamaja aed (SUVA) oranž, Laagna aed roosa, Mustamäe aed heleroheline, Möldri Seltsi aed tumeoranž, Muuga kontrollaed helesinine. Kaardi koostanud K. K. Kaldma *Google My Maps* kaardirakenduses, 2021 (kuvatõmmis).

2.2. Uuringualad

Pae aed (Joonis 2) asub Tallinnas, Lasnamäe linnaosas, Pae 19. Tegemist on Lasnamäe Tegevuskeskuse hoovis tegutseva aiaga, mille eestvedajateks on Lasnaidee.



Joonis 2. Pae aed sügisel (K.K.Kaldma, 2020)

Aafrika aed (joonis 3) asub Tallinnas, Juhkentali rajoonis, Püssirohu 7. Tegemist on kortermaja ees oleva väikese aiaga, mis koosneb kümnekonnast kõrgpeenrast, lisaks on alal vihmaveekogumisanum, kompostkast.



Joonis 3. Aafrika aed sügis (K.K. Kaldma, 2020)

Ameerika aed (Joonis 4) asub Tallinna kesklinnas, Väike-Ameerika 5. Kogukonnaaed asub praeguse Superministeeriumi taga, lastestaadionil, taraga piiratud hoovis. Vahetult tara taga asub sõidutee. Aeda on ehitatud hulganisti pinke ja laudu, et aiapidajate ajaveetmise võimalusi suurendada ja nautida loodut.

Hetkel kogukonnaaed samas asukohas ei tegutse. Jaanuaris 2021. a koliti kogukonnaaiaga Suur-Ameerika tänavalt ära, nüüd tegutseb Ameerika kogukonnaaed Eesti Looduskaitse Seltsi hoovis, aadressil Koidu 80.



Joonis 4. Ameerika aed sügis (K. K. Kaldma, 2020)

Pelgu aed (joonis 5) asub Tallinnas, Põhja-Tallinna linnaosas, Ehte 40. Tegemist on alaga, mis asub kõrgepingeliinide all, Ehte tänava ja garaažibokside vahetus läheduses.



Joonis 5. Pelgu aed sügis (K. K. Kaldma, 2020)

Põhjala aed (Joonis 6) asub Tallinnas, Põhja-Tallinna linnaosas Marati 7. Tegemist on Põhjala kummitoodete tehasehoonete vahele rajatud kogukonnaaiaga. Kõrgpeenraid on loodud õue, nagu näha (Joonis 5) vasakul ja kasvuhoonesse (Joonis 5) paremal. Lisaks on alates 2020. aastast Põhjala aial oma mesitarud ja kanaaedik. 2020 aasta proovide võtmise ajal käis Põhjala kogukonnaaia vahetus läheduses vilgas ehitustegevus, millest taimed olid valge tolmu korraga kaetud.



Joonis 6. Põhjala aed sügis (K. K. Kaldma, 2020)

Vana-Kalamaja SUVA aed asub Tallinnas, Põhja-Tallinna linnaosas, Vana-Kalamajas. 2019. aastal oli SUVA aed (Joonis 7. vasakul) SUVA vabrikupoe (Vana-Kalamaja 16) esisel muruplatsil, kuid 2020. aasta sügisel leidsime kogukonnale pühendatud aia hoopis Kalamaja muuseumi (Kotzebue 16) hoovist (joonis 7. paremal). Tegemist on väga limiteeritud pinnale loodud aiaga. Kogukonnaaeda ümbritseb müür, vahetult müüri taga asuvad sõiduteed ja kortermajad.



Joonis 7. SUVA aed sügis (K. K. Kaldma, 2020)

Laagna aed (joonis 8) asub Tallinnas, Lasnamäe linnaosas, Võru 11. Tegemist on endise lasteaia hoonega, hetkel tegutseb hoones huvikool, raamatukogu jm. Kogukonnaaed on rajatud endise lasteaia hoovi, mis on aiaga ümbritsetud. Lisaks kogukonnaaiale on rajatud lava, liivakast, aia raamatukogu, istumispaigad.



Joonis 8. Laagna aed (K. K. Kaldma, 2020)

Mustamäe aed (joonis 9) asub Tallinnas, Mustamäe linnaosas, Ehitajate tee 82. Tegemist on Mustamäe Sotsiaalkeskuse hoovis tegutseva kogukonnaaiaga. Aed on laienenud kahe aasta jooksul jõudsalt, lisaks on aial nüüd oma kuur ja kasvuhoone. Sotsiaalkeskuse külastajad saavad kogukonnaaias käia pinkidel istumas ja raamatut lugemas.



Joonis 9. Mustamäe aed sügis (K.K.Kaldma, 2020)

Möldre tee seltsi aed (joonis 10), asub Tallinnas, Nõmme linnaosas, Möldre tee 14. Tegemist on Möldre Seltsi loodud kogukonnaaiaga, mis teenib ennekõike seltsi kuuluvate korteriühistute huve. Kogukonnaaed on loodud kortermajade hoovi, ala on aiaga piiratud, kuid kõrgem haljastus puudub sellel aia küljel, mis on sõidutee poole avatud. Proovide võtmise ajal paistis tee olevat üsna suure liikluskoormusega, sõitis palju nii tavaautosid kui ka liinibusse. Seltsi aias on kõrgpeenrad, põõsad ja maapinnal olevad peenrad. Lisaks on aias kompostkast, lauad-toolid ajaveetmiseks.



Joonis 10. Möldre Seltsi aed sügis (K. K. Kaldma, 2020)

Kontrollaed Muuga (joonis 11) asub Tallinna külje all Maardu linna alla kuuluvas Muuga aedlinnas. Tegemist on nurgapealse erahooviga, kõrgpeenarde ja väikese asulatee vahele jääb võrkaed elupuu hekiga. Lisaks kasvuhoonele ja kõrgpeenardele kasvatatakse primaarse, kompost- ja turvasmulla segus maapinnal asuvas peenras kartuleid.



Joonis 11. Muuga kontrollaed suvi (K.K.Kaldma, 2020)

2.3. Proovide kogumine

Enne proovide võtmist valmistati Tallinna Ülikooli Molekulaarteaduste laboris ette proovivõtukotid. Soonkinnisega kilekottidesse pandi värviindikaatoriga silikageeli ning markeeriti kotid proovivõtukohta nime, kuupäeva ja proovivõtja nime initsiaalidega.

Tallinna kogukonnaaedadest ja kontrollaiast koguti 2019. aasta mullaproove 18.10.2019. a kuiva pilves ilmaga, õhutemperatuur $+11^{\circ}\text{C}$; 24.10.2019. a ilm oli kuiv vahelduva pilvisusega, õhutemperatuur $+12^{\circ}\text{C}$ ja 05.11.2019. a kuiva pilves ilmaga, õhutemperatuur

+4°C. 2020. aasta mullaproove koguti 1.10.2020. a ilusa päikesepaistelise ilmaga, õhutemperatuur +17°C.

Proovide võtmisel kasutati kummikindaid, igas proovivõtukoahas puhastati etanooliga (70% EtOH) kühvel, ning tehti kolm paralleelset kaevist. Kaevist tehti nii, et peamine mullakord võeti ca ~10 cm tuseduselt ära, et vältida juhuslikult, näiteks tuulega mulla pinnale sattunud esemete/reostuse vms. sattumist proovidesse. Paralleelsetest kaevistest võeti igast ühest ühekordse plastlusikaga lusikatäis mulda ning pandi varasemalt ettevalmistatud proovivõtu kotti. Proovivõtu kott segati läbi, et silikageel saaks efektiivselt niiskust endasse imada. Kui silikageeli kuulikeste värvus muutus tumelillaks, lisati silikageeli juurde, kuna tumedaks värvumine näitab niiskusest küllastumist.

Igast kogukonnaaiast võeti kaks mullaproovi, mõlemad kasvatuskastidest. Kasvatuskastid valiti viisil, et ühes kastis kasvasid lühema vegetatsiooniperioodiga taimed ja teises pikema vegetatsiooniperioodiga taimed.

2.4. DNA eraldamine

Kogutud mullaproovidest DNA eraldamiseks kasutati *Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit*-i. Tegemist on spetsiaalse komplektiga, mis on mõeldud kiireks polümeraasi ahelreaktsiooni kvaliteediga (PCR-kvaliteediga) DNA eraldamiseks. Komplektiga on võimalik isoleerida grampositiivsete ja gramnegatiivsete bakterite, seente, vetikate, algloomade jt mikroobide DNA-d pinnaseproovidest. Komplektis on olemas suur osa vajaminevatest tarvikutest ning juhend töö läbiviimiseks (*Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit*, s.a.).

2019. aasta mullaproovidest eraldati DNA 19.12.2020. a ning 2020. aasta proovidest 25.03.2021. a.

1. Esmalt kaaluti *ZR BashingBead™ Lysis Tube*-i ca 250 mg mulda.
2. Mulla kaalumise järel lisati katsutisse 750 µl *BashingBead™ Buffer*-it ning suleti katsuti korralikult. Seejärel segati proove *Vortex-Genie 2* aparadi maksimum kiirusel kuni 5 minutit.
3. Segatud proovid pandi tsentrifuugi *ependrof Centrifuge 5424 R* üheks minutiks ning pöõreteks valiti 10 000 p.

4. Peale tsentrifuugimist tuleb katsutis sademest eraldunud vedelikku ehk supernatanti viia pipetiga üle 400 µl jagu *Zymo-Spin™ III-F Filter*-i peale, filtri alla lisati kogumiskatsuti, *Collection Tube*. Seejärel pandi proovid tsentrifuugi üheks minutiks, pööreteks valiti 8 000 p. Peale tsentrifuugimist filter utiliseeriti.
 - 4.1 Neljast 2019. aasta proovist (VK19, VK29, MG19 ja MG29) ei olnud võimalik supernatanti üle viia, sest muld oli töölahuse sisse imanud. Nende nelja proovi puhul lisati uuesti 750 µl *BashingBead™ Buffer*-it ning segati proove (samm 2) ja tsentrifuugiti (samm 3).
 - 4.2 Supernatanti ei olnud võimalik üle viia paljudest 2020. aasta proovidest, 2020. aasta proovide puhul lisati erinevad kogused *BashingBead™ Buffer*-it, kuna osal proovidest oli katsutis supernatanti liialt vähe, et pipeteerida 400 µl. Seega kogused jagunesid järgnevalt: Proovidele VK10, VK 20, MG 10 ja PA 10 lisati 750 µl *BashingBead™ Buffer*-it, proovidele MG 20, PA 20, PE 10, PE 20, PÕ 10, PÕ 20, AF 10, AF 20, MU 10, MU 20, LA 10, LA 20 lisati 400 µl *BashingBead™ Buffer*-it ning peale seda segati proovid läbi *Vortex-Genie 2* aparaadis (samm 2) ning tsentrifuugiti *ependrof Centrifuge 5424 R* (samm 3). Proovide AM 10, AM 20, MÖ 10, MÖ 20 puhul ei olnud vaja lisaks *BashingBead™ Buffer*-it lisada, sealt oli võimalik edukalt supernatanti pipeteerida.
5. Lisati 800 µl *Genomic Lysis Buffer*-it ja 400 µl 95% etanooli kogumiskatsutisse. Segati korralikult.
6. Sammus 5 segatud lahusest pipeteeriti 800 µl *Zymo-Spin™ IC Column* katsutisse ja tsentrifuugiti 1 000 p juures üks minut.
7. *Collection Tube*-i ehk filtri all olevasse kogumiskatsutisse kogunenud vedelik visati ära ja korrati sammu 6.
8. Vana kogumis katsuti utiliseeriti ning asendati uuega, lisati 200 µl *DNA Pre-Wash Buffer*-it *Zymo-Spin™ IC Column*-i filtrile ning tsentrifuugiti 10 000 p juures 1 minut.
9. Seejärel lisati *Zymo-Spin™ IC Column*-i filtrile 500 µl *g-DNA Wash Buffer*-it ning tsentrifuugiti 10 000 p juures 1 minut.
10. Peale tsentrifuugimist pandi *Zymo-Spin™ IC Column* filter puhtasse 1,5 ml mikrotsentrifuug katsutisse ja lisati ca 20 µl *DNA Elution Buffer*-it otse filtri keskele, tsentrifuugitakse 10 000 p juures 30 sekundit, et elueerida DNA.

11. Seejärel asetati *Zymo-Spin™ II-μHRC Filter* puhtasse kogumiskatsutisse, lisati 600 μl *Prep Solution*-it ning tsentrifugeeriti 8 000 p juures 3 minutit.
12. Elueeritud DNA viidi üle ettevalmistatud 1,5 ml-ses mikrotsentrifugeerimisvõttekatsutisse, lisati 600 μl *Prep Solution*-it ning tsentrifugeeriti 16 000 p juures 3 minutit.

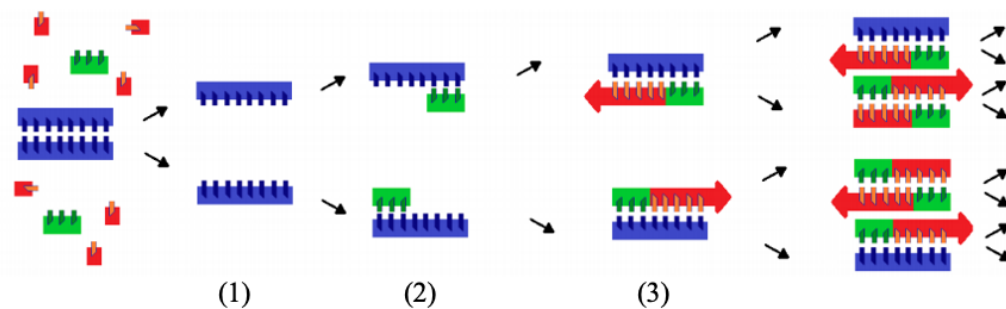
2.5. Eraldatud DNA kontsentratsiooni mõõtmine

DNA eraldamise järgselt mõõdeti elueeritud DNA kontsentratsiooni veendumaks, kas DNA kvaliteet on polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR (*Polymerase Chain Reaction*) teostamiseks küllaldane ja edasiseks tööks vastav. Kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati IMPLEN spektrofotomeetrit. Kontrolliks teostati esmalt standardite mõõtmine ning seejärel proovide mõõtmine. Mõõtmiseks lisati 1 μl eraldatud DNA-d spektrofotomeetri küvetile ning pandi peale kaas (Lid LP 0,2 mm, factor 50).

Mullaproovidest ekstraheeritud DNA puhtuse mõõdnuna kasutatakse nukleiinhapete lainepikkuste 260 nm ja 280 nm neeldumismaksimumide suhet. DNA puhul peetakse puhtaks A260/A280 suhet > 1,8 (Nanodrop Lite, s.a.). IMPLEN spektrofotomeetri protokoll järgi on 1 μl DNA lisamisel optimaalne A260/A280 suhe 0,010 – 1,6 ning optimaalne DNA kontsentratsioon 25 – 40 000 ng/μl. (Implen GmbH, s.a.)

2.6. Polümeraasi ahelreaktsioon

Polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR on meetod, mis võimaldab DNA või RNA molekule amplifitseerida ehk kordistada lühikese aja jooksul luues miljoneid koopiaid väikesest DNA lõigust (Bartlett & Stirling, 2003). DNA koopiade sünteesi algatamiseks ja suunamiseks kasutatakse oligonukleiinpraimereid, maatriksina kasutatakse DNA polümeraasi ja üheaahelalist DNA-d. Praimerid on seondunud mõlematesse DNA otsesse, mis võimaldab ahelat amplifitseerida mitmest kohast korraga, tekib ahelreaktsioon. PCR-i käigus amplifitseeritakse DNA järjestuse koopiaid temperatuurimuutuste abil kolmes etapis, mida korratakse tsükliliselt mitmeid (mitmekümneid) kordi. (Mullis *et al.*, 1986) Polümeraasi ahelreaktsiooni põhimõtte on kujutatud Joonisel 12.



Joonis 12. Polümeraasi ahelreaktsioon algab kaheahelalise DNA (sinine), DNA praimerite (roheline) ja nukleotiidide (punane) seguga. Reaktsioon koosneb kolmest peamisest etapist: 1. denaturatsioon: kuumutamise abil katkestatakse DNA nukleotiidide vahelised sidemed, tekitades üheaahelalisi DNA molekule. 2. Denatureeritud DNA seondumine praimeritega (ingl. *annealing*) 3. DNA süntees, kus üheaahelalise DNA järjestuse külge sünteesitakse komplementaarsusprintsiiibi alusel teine DNA ahel. (Sherina *et al.*, 2017) Sellisel viisil korratakse neid tsükleid palju kordi.

Prokarüootsete ehk 16S rRNA PCR reaktsioonisegu valmistamiseks, mahuga 1000 µl, kasutati: 500 µl ultrapuhast vett, 500 µl PCR *master mix*-i, 1 µl *forward* praimerit 515F (5´-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3´) 1 µl *reverse* praimerit 806R (5´-GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT-3´) (TAG Copenhagen A/S, Taani) .

Eukarüootsete ehk ITS 1 PCR reaktsioonisegu valmistamiseks, mahuga 1000 µl, kasutati: 500 µl ultrapuhast vett, 500 µl PCR *master mix*-i, 1 µl *forward* praimerit ITS1-F_KYO2 (5´-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3´) praimerit ja 1 µl *reverse* praimerit ITS2_KYO2 (5´-TTY RCT RCG TTC TTC ATC-3´) (TAG Copenhagen A/S, Taani) praimerit.

Forward praimer on PCR-i poolt amplifitseeritava piirkonna ühes otsas ning *reverse* praimer teises otsas. Praimerite nime sulgudes olevad tähed tähistavad praimeris olevaid nukleotiide, mis ei vasta klassikalisele komplementaarsusprintsiiibile, kus adeniinile (A) vastab alati tümiin (T) ning guaniinile (G) tsütosiin (C). Erilised on nimes olevad Y, M, N, Y, W ja R tähed, mis on varieeruvad positsioonid ehk võivad asendada mitut nukleotiidi. Varieeruvad positsioonid võivad asendada nukleotiide („Sequence notation“, s.a.):

- Y = C, T
- M = A, C
- N = A, C, G, T

- V = A, C, G
- W = A, T

Seejärel valmistati ette 2x 20 katsutit, kõikidesse katsutitesse pipeteeriti 2 µl DNA-d. Kahekümnesse katsutisse pipeteeriti 21 µl prokarüootide jaoks valmistatud PCR reaktsioonisegu ning ülejäänud kahekümnesse 21 µl eukarüootide jaoks valmistatud PCR reaktsioonisegu. Seejärel tsentrifuugiti lisatud lahused katsuti põhja ning teostati termotsükleris *Biometra TOne Thermal Cycler* PCR. Termotsükli programm:

- 95 °C, 3 minutit
- 20 tsükli:
 - 95 °C, 30 sekundit
 - 55 °C, 30 sekundit
 - 72 °C, 30 sekundit
 - 72 °C, 5 minuti
- Hoiti 4 °C juures.

2.7. Agaroos-geelelektroforees

Peale PCR-i teostati agaroos-geelelektroforees. Geelelektroforeesi abil on võimalik hinnata PCR-ist tulnud produktide pikkust ja hinnata visuaalselt kontsentratsiooni. Enne analüüsi teostamist valmistati 10x TBE (*Tris-boraat-EDTA*) lahust, selleks kaaluti 18,62 g EDTA (*disodium salt dihydrate*, $M = 372,24$ g/mol), millele lisati 80 ml ultrapuhast (*Milli-Q*) vett. Soolade lahustamiseks lisati naatriumhüdrosiidi (NaOH) pH 8 saavutamiseks, pH 8 juures lahustuvad soolad ning lahus muutub läbipaistvaks. Seejärel lisati 108 g *Tris ultrapure* ($M = 121,14$ g/mol), 55 g boorhapet ning 900 ml ultrapuhast (*Milli-Q*) vett. Analüüs teostati 0,5 kordses TBE (*Tris-boraat-EDTA*) puhvril, 2%-lisel agaroosil. 500 ml 2%-lise agaroos geeli valmistamiseks kasutati 475 ml ultrapuhast (*Milli-Q*) vett, 25 ml 10x TBE puhvrit, milles lahustati kuumutamise abil 10 g agaroosi. Jahtunud geelile lisati etiidumbromiidi (EtBr), mille lõppkontsentratsiooniks jäi 0,2 µg/ml, seega lisati 500 ml geeli sisse 10 µl etiidumbromiid (EtBr). Geel valati geelihammastega varustatud vormi, kus lasti geelil ~30 minutit tahkuda. Geelile lisati nii palju 0,5 kordset TBE puhvrit, et geel oli kaetud.

Geelihammastest tekkinud kaevud täideti 3 µl PCR-ist võetud prooviga. Seejärel pandi elektroforees tööle 30 minutiks 60 voldi juures. Agarooos geeli sisse tekivad voolu toimedel fragmendid, DNA olles negatiivse laenguga liigub geeli sees pluss laengu poole. Geeli sisse tekkinud fragmente hinnati UV transilluminaatori all.

Peale esimest agarooos-geelelektroforeesi, mis tehti originaal DNA proovidest, ei tulnud välja soovitud pikkusega fragmente. Katse kordamiseks tehti esialgu kahest proovist (proov MG 29 ja PA 10) 10x ja 100x lahjendus, et teada saada millise lahjendusega saab soovitud tulemuse. 10x lahjenduse saamiseks võeti 1 µl originaal DNA proovi ning lisati sellele 9 µl ultrapuhast (*Milli-Q*) vett. 100x lahjenduse saamiseks võeti 10x lahjendusest 1 µl lahjendatud DNA-d ja lisati 9 µl ultrapuhast (*Milli-Q*) vett. Tehti uus PCR *mix* koos 16S ja ITS2 praimeritega, kõigisse kuute (MG 29, PA 10, MG 29 10X lahjendus, PA 10 10x lahjendus, MG 29 100x lahjendus ja PA 10 100x lahjendus) katsutisse pandi 2 µl DNA-d/lahjendust ja 21 µl PCR *mix*-i. PCR teostati sel korral pikema tsükliga:

- 5 tsükliit:
 - 72 °C, 1 minut
- 40 tsükliit:
 - 98 °C, 30 sekundit
 - 57 °C, 45 sekundit
 - 72 °C, 1 minut
- 72 °C, 7 minutit
- Hoiti 4 °C, juures.

PCR järgselt teostati uus agarooos-geelelektroforees, mille tarbeks sulatati üles eelnevalt valmistatud 2% agarooos ning valati geelihammastega täidetud vormi, geeli tahkudes lisati kaevudesse 3 µl PCR-ist tulnud DNA-proove ning voolutati 60 voldi juures 30 minutit.

Kõige paremad tulemused tulid välja siiski originaal DNA-st tehtud PCR-iga ning kõik esmalt ebaõnnestunud katsed tehti (20x 16S ja 20x ITS) uuesti originaal DNA-st kasutades pikemat PCR tsükliit.

Eksperiment viidi läbi töö autori poolt Tallinna Ülikooli Molekulaarteaduste laboris.

2.8. Sekvenerimisraamatukogude valmistamine

Sekvenerimine on tänapäeva mikrobioloogias igapäevane meetod prokarüootsete bakterite ja eukarüootsete seente, vetikate, arhede identifitseerimiseks (Wang *et al.*, 2007). Sekvenerimistehnoloogia suur läbilaskevõime on avanud mikroobikoosluste analüüsimiseks uued piirid, pakkudes kulutõhusat viisi proovides leiduvate mikroobide fülötüüpide tuvastamiseks. Fülötüüpide puhul on tegemist keskkonna DNA järjestuse või järjestuste rühmaga, millel on konkreetse geenimarkeri sarnasuse tase. Laialdasemalt kasutatav fülogeeniline marker on väike subühiku ribosomaalne RNA geen rRNA. (Caporaso *et al.*, 2011)

Prokarüootsete mikroobide taksonoomilise mitmekesisuse tuvastamise jaoks kasutati 16S rRNA geeni V4 regiooni jaoks disainitud primereid: 515F (5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3') ja 806RB (5'-GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT-3') (TAG Copenhagen A/S, Taani).

Eukarüootsete mikroobide taksonoomilise mitmekesisuse tuvastamise jaoks kasutati ITS 1 regiooni jaoks valmistatud primereid ITS1-F_KYO2 (5'-TAG AGG AAG TAA AAG TCG TAA-3') ja ITS2_KYO2 (5'-TTY RCT RCG TTC TTC ATC-3') (TAG Copenhagen A/S, Taani).

Sekvenerimisraamatukogu koostamisel liideti DNA proovide mõlematesse otstes ük raamatukogu primer (indeks 1 ja indeks 2), mille järgi on võimalik proove hilisemate etappide järgselt üksteisest eristada. Sekvenerimisraamatukogu koostamise jaoks kasutati Illumina *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*-is (Illumina, USA) olevaid primereid.

Peale sekvenerimisraamatukogu koostamist teostati raamatukogu primeritega uus PCR ja agaros-geelelektroforees. PCR jaoks kasutati esimese PCR produkti 100x lahjendust. Elektroforeesile järgnes geeli sisse tekkinud fragmentide vaatamine UV transilluminaatori all, iga proovi fragmendile anti visuaalse vaatluse järel hinne pöördskaalas. Pöördskaalas hinde andmine tähendab proovide hindamist ühest kolmeni, seejuures tugevamale fragmendile anti hinne 1 ning nõrgemale fragmendile hinne 3. Peale hinnete andmist võrdusid hinded mikrolitritega (μl), vastavalt hindele pipeteeriti igast proovist hindele võrdne kogus mikrolitried (μl) ühte 1,5 ml-sse mikrotsentrifuugkatsutisse. Selle

tulemuseks saadi segu DNA-dest, kus kõikidel proovidel on oma unikaalne praimerite kombinatsioon ehk vöökood (inglise k. *barcode*), kombinatsioonid välja toodud tabelites 1 ja 2.

Tabel 1. 16S rRNA järjestuste proovide unikaalsed praimerite kombinatsioonid. Kombinatsioonid joondatud tabelis kaheksa kaupa vasakusse ja paremasse serva, sest töö tegemise etapis on proovid kaheksa kaupa reas, see teeb visuaalselt jälgimise lihtsamaks, millisel realt vastav proov pärit on.

Proov	Praimer 1	Praimer 2
PA 19	N701	S507
PA 29	N702	S507
AF 19	N703	S507
AM 19	N704	S507
AM 29	N705	S507
PE 19	N706	S507
PE 29	N707	S507
PÕ 19	N710	S507
PÕ 29	N701	S508
VK 29	N702	S508
LA 19	N703	S508
LA 29	N704	S508
MU 19	N705	S508
MU 29	N706	S508
MÖ 19	N707	S508
MÖ 29	N710	S508

MG 19	N701	S510
MG 29	N702	S510
PA 10	N703	S510
PA 20	N704	S510
AF 10	N705	S510
AF 20	N706	S510
AM 10	N707	S510
AM 20	N710	S510
PE 10	N701	S511
PE 20	N702	S511
PÕ 10	N703	S511
PÕ 20	N704	S511
LA 10	N705	S511
LA 20	N706	S511
MU 10	N707	S511
MU 20	N710	S511
MÖ 10	N703	S506
MÖ 20	N704	S506
MG 10	N705	S506
MG 20	N706	S506

Tabel 2. Seente, ITS järjestuste unikaalsed praimerite kombinatsioonid. Kombinatsioonid joondatud tabelis kaheksa kaupa vasakusse ja paremasse serva, sest töö tegemise etapis on proovid kaheksa kaupa reas, see teeb visuaalselt jälgimise lihtsamaks, milliselt realt vastav proov pärit on.

Proovi nimi	Praimer 1	Praimer 2
PA 19	N701	S513
PA 29	N702	S513
AF 19	N703	S513
AF 29	N704	S513
PE 19	N705	S513
PE 29	N706	S513
PÕ 19	N707	S513
PÕ 29	N710	S513
VK 19	N701	S515
VK 29	N702	S515
LA 19	N703	S515
LA 19	N704	S515
AM 19	N705	S515
AM 29	N706	S515
MU 19	N707	S515
MU 29	N710	S515
MÖ 19	N701	S516

MÖ 29	N702	S516
MG 19	N703	S516
MG 29	N704	S516
PA 10	N705	S516
PA 20	N706	S516
AF 10	N707	S516
AF 20	N710	S516
PE 10	N701	S517
PE 20	N702	S517
PÕ 10	N703	S517
PÕ 20	N704	S517
VK 10	N705	S517
VK 20	N706	S517
LA 10	N707	S517
LA 20	N710	S517
AM 10	N701	S518
AM 20	N702	S518
MU 10	N703	S518
MU 20	N704	S518
MÖ 10	N705	S518

MÖ 20	N706	S518
MG 10	N707	S518
MG 20	N710	S518

Teostati uus elektroforees, geeli sees olevad kaevud täideti vedelikuga, mis koosnes: 75 µl eelmises sammus tehtud PCR segust, 20 µl 6x *loading buffer* ning 155 µl ultrapuhtast veest (*Milli-Q*), segu tehti mahus 250 µl. Elektroforees pandi tööle kahekümneks minutiks 60 voldi juurde ning seejärel keerati võimsus kahekümneks minutiks 100 voldini.

Peale agaros-geelelektroforeesi võeti kasutusele QIAGEN-i *QIAquick Gel Extraction Kit and the QIAquick PCR & GEL Cleanup Kit*-i, mis sisaldas suures osas järgmiseks sammuks vajaminevaid vahendeid ning protokoll (Qiagen, 2018).

1. Esmalt pandi eelnevalt valmistatud agarosgeel UV illuminaatori alla, kus UV valguse käes lõigati helendav DNA fragment puhta, terava žiletiga välja.
2. Välja lõigatud fragmendid pandi läbipaistvasse katsutisse. Lisati 3 mahuosa *Buffer QG*-it ühe mahu geeli kohta, arvestusega 100 mg geeli on ~100 µl.
3. Geeli lahustamiseks inkubeeriti katsutit temperatuuril 50 °C 10 minutit või kui geel oli lõplikult lahustunud. Lahustumise kiirendamiseks pöörati katsutit iga 2-3 minuti järel. Geeli lahustumisel kasutati visuaalset vaatlust, kas segu on kollane (sarnast tooni *Buffer QG*-iga), kui ei olnud, lisati 10 µl 3 molaarset (M) naatriumatsetaati, pH-ga 5,0 ning segati. Segu muutus kollaseks.
4. Seejärel lisati ühe geelimahu jagu isopropanooli proovile ja segati.
5. *QIAquick* tsentrifuugkolonn asetati 2 ml-sse kogumiskolonnile. DNA sidumiseks kanti sama proov *QIAquick* tsentrifuugikolonnile ning tsentrifuugiti 1 minut 17 900x g / 13 000 rpm juures kuni lisatud vedelik oli tsentrifuugkolonnist läbi voolanud. Läbi voolanud vedelik visati ära ja *QIAquick* tsentrifuugkolonn pandi tagasi samasse kogumiskolonnile. Proovide, mille maht ületas >800 µl korrati sammu veel kord.

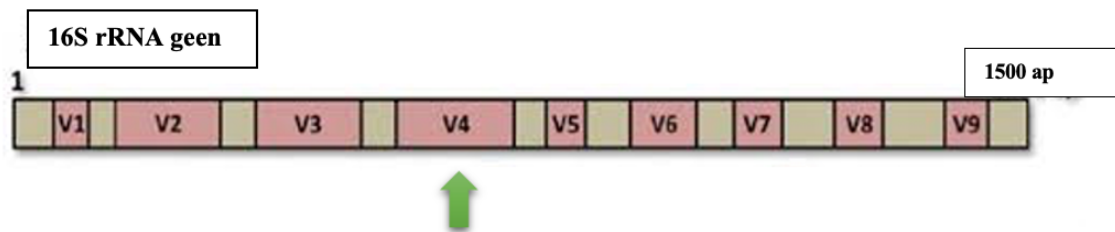
6. Proovide puhul, mille DNA sekveneeritakse, lisati *QIAquick* tsentrifuugkolonni 500 µl *Buffer QG*-t ja tsentrifuugiti 1 minut 17 900x g/ 13 000 rpm juures. Kogumiskolonni tekkinud vedelik visati ära.
7. Pesemiseks lisati *QIAquick* tsentrifuugkolonnile 750 µl *Buffer PE*-d ja tsentrifuugiti, alla kogumiskolonni tekkinud vedelik visati ära.
8. Nüüd tõsteti *QIAquick* tsentrifuugkolonn ümber puhtasse 1,5 ml-sesse mikrotsentrifuugkatsutisse.
9. DNA elueerimiseks lisati 50 µl *Buffer EB*-d (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) või ultrapuhast (*Milli-Q*) vett *QIAquick* tsentrifuugkolonni membraani keskele ja tsentrifuugiti 1 minut. DNA kontsentratsiooni suurendamiseks lisati 30 µl *Buffer EB*-d *QIAquick* tsentrifuugkolonni membraani keskele ja jäeti kolonn seisma 1-ks minutiks, et DNA jõuaks filtri küljest lahti tulla, seejärel tsentrifuugiti 1 minut. Peale *Buffer EB* lisamist *AIQuick* membraanile võib puhvri inkubeerimisega pikendada kuni 4 minutini, sellega suurendatakse puhastatud DNA toodangut.
10. Puhastatud DNA analüüsimiseks geelil lisati ühe mahu jagu *Loading Dye*-d 5 mahu puhastatud DNA kohta. Saadud segu segati pipeteerides üles-alla enne geelile laadimist.

2.9. Sekveneerimisraamatukogu kontsentratsiooni mõõtmine

Sekveneerimisraamatukogu kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati *Invitrogen life Technologies Qubit 3.0* fluoromeetrit ja kasutati *Invitrogen QubitTM dsDNA HS Assay Kit* komplekti. Esmalt pandi valmis kaks katsutit standardite jaoks ja üks katsuti proovi kohta. Valmistati ette *Qubit*-i töölahuse reagent, kuhu pandi 1:200 kohta *Qubit Buffer*-it ehk valmistati 200 µl töölahust iga standardi ja proovi kohta. Standard I valmistamise jaoks lisati 190 µl töölahust ja 10 µl standard #1, standard II valmistamise jaoks 190 µl töölahust ja 10 µl standard #2. Proovi jaoks lisati ette valmistatud katsutisse 198 µl töölahust ning 2 µl DNA raamatukogu lahust.

2.10. Prokarüootide 16S rRNA geenijärjestuste sekveneerimine

16S rRNA ehk 16S väikese ribosomaalse subühiku geeni kasutatakse laialdaselt erinevate bakterikoosluste mitmekesisuse uurimiseks ja iseloomustamiseks erinevates ökoloogilistes paikades nagu inimese mikrobiom, muldkeskkond, ookeanid. Prokarüootsetes organismides on 16S geen üldlevinud, mis teeb selle geeni kasutamise sobivaks markeriks. Samuti teeb 16S geeni kasutamise optimaalseks temas sisalduvad konserveerunud piirkonnad (joonis 13), mida saab kasutada amplifikatsioonipraimerite kujundamiseks taksonites ja hüpervarieeruvad piirkonnad (V1-V9), mida kasutatakse taksonite eristamiseks. (Mizrahi-Man, Davenport, & Gilad, 2013)



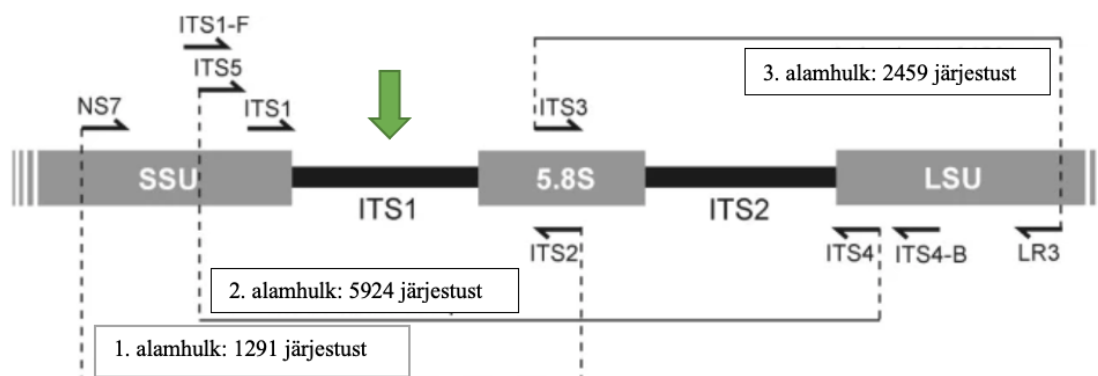
Joonis 13. 16S rRNA geeni piirkonnad, roosaga muutlikud piirkonnad ja beežiga konserveeritud piirkonnad, roheline nool tähistab kasutatud V4 regiooni.

Analüüsiks kasutatud 16S rRNA geeni kogupikkus on 1500 aluspaari. Geenis on kümme konserveerunud regiooni, konserveerunud regioonide vahel on hüpervarieeruvad regioonid. Selle töö raames kasutatud V4 regiooni koosneb hüpervarieeruvast regioonist, millest mõlemal pool asub üks konserveerunud regioon. V4 regioon on bakterite tuvastamiseks sobiv oma laia spektri ja suure katvuse tõttu. (Zhang *et al.*, 2018)

2.11. Eukarüootsete mikroobide ITS1 regiooni sekveneerimine

Seeneriiki kuulub enam kui 1,5 miljonit liiki, kes mängivad olulist rolli igas maa bioomis. Seeneriigi tundmaõppimiseks ja mitmekesisuse hindamiseks kasutatakse ribosoomi korduse sisemise transkribeeritud speisseri ehk ITS (*internal transcribed spacer*) (joonis 14) piirkonda. (Toju *et al.*, 2012). Viimase 15 aasta jooksul on DNA sisemist transkribeeritud speisserit ehk ITS-i kasutatud keskkonnaproovidest seente mitmekesisuse analüüsimise jaoks, olles valitud seene DNA võotkudeerimise (*barcoding*) standartseks markeriks

(Bellemain *et al.*, 2010). ITS praimerid aitavad süstematiseerida erinevate seente taksonoomiliste rühmade vahel (Toju *et al.*, 2012).



Joonis 14. ITS 1 regioon, rohelise noolega näidatud töös kasutatud regiooni. (Toju *et al.*, 2012)

Sekveneerimise jaoks kasutati Illumina protokoll A: standardset normaliseerimismeetodit (Illumina, 2016). Protokollis kohaselt valmistati esmalt ette tööks vajalikud reagentid. Esmalt valmistati värske naatriumhüdroksiidi (NaOH) lahendus, selle jaoks lisati mikrotsentrifuugkatsutisse 900 µl ultrapuhast (*MilliQ*) vett ja 100 µl 1.0 N NaOH-d ning segati katsutit pöörates mõned korrad. Hübridisatsioonipuhvrit (*Hybridization Buffer*) hoiustatakse -25°C kuni -15 °C juures, mis võeti enne kasutuselevõttu sulama, sulatatuna hoiustati jääl ning enne kasutuselevõttu segati korralikult *Vortex* aparadi abil.

Raamatukogude ühendamiseks enne *MiniSeq* aparadi laadimiseks tuleb raamatukogu normaliseerida, 10 nanomolaarse (nM) raamatukogu normaliseerimiseks viidi 10 µl igast raamatukogust vastavasse PCR katsutisse, seejärel arvutati valemi:

$x \mu l = (10 \mu l)(y \text{ nM}) / (10 \text{ nM}) - 10 \mu l$ järgi, kui palju ultrapuhast (*MilliQ*) vett tuleb raamatukogule lisada, et saada 10 nM raamatukogu. Valemis tähistab y üksiku raamatukogu kontsentratsiooni ja x ultrapuhast (*MilliQ*) vee mahtu. Proovi segati vaikselt pipeteerides.

Järgmise sammuna võeti uus mikrotsentrifuugkatsuti, kuhu lisati igast 10 nM-st raamatukogust 10 µl lahust. Nüüd lahjendati raamatukogu 1 nM-ni, selleks võeti 10 µl raamatukogu mahtu ning 90 µl ultrapuhast (*MilliQ*) vett. Segati korralikult *Vortex* aparadi abil ning tsentrifuugiti 1 minut.

Raamatukogu denatureerimise jaoks pipeteeriti uude mikrotsentrifuugkatsutisse 5 µl 1 nM raamatukogu ja 5 µl 0,1 N NaOH-d, segati *Vortex*-i abil ning tsentrifuugiti 1 minut 280 x g

juures. Peale tsentrifugimist inkubeeriti 5 minutit lahust toatemperatuuril ning seejärel lisati 5 µl 200 nM Tris-HCl (pH 7,0), segati uuesti *Vortex*-i abil ja tsentrifugiti 1 minut 280 x g juures. Järgmiseks lahjendati raamatukogu laadimiskontsentratsiooniks sobivaks. Selleks lisati eelnevale lahusele eelsoojendatud HT1, et denatureeritud 20 pM raamatukogu lõpliku lahuse maht oleks 1 ml. Lahus segati lühidalt *Vortexi* abil ja tsentrifugiti 1 minut kiirusel 280 x g.

Järgmiste sammude teostamiseks tuli esmalt denatureerida ja lahjendada *Phix Control* lahus 4 nM-ni. Esmalt sulatati 10 nM *PhiX*-i katsuti. Seejärel segati mikrotsentrifuugkatsutisse 10 µl 10 nM *Phix*-i ja 15 µl ultrapuhast (*MilliQ*) vett, kogumahuks sai 25 µl 4 nM lahust. Lahust segati *Vortex*-i abil ning tsentrifugiti pulseerides. *PhiX* denatureerimiseks lisati mikrotsentrifuugkatsutisse 5 µl nM *PhiX*-i ja 5 µl 0,1 N NaOH-d, segati *Vortex*-i abil ning tsentrifugiti pulseerides. Lahust inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, seejärel lisati 5 µl 200 nM Tris-HCl (pH 7,0), segati ning tsentrifugiti 1 minut 280 x g juures.

Nüüd lahjendati denatureeritud *PhiX* kontsentratsiooni, lisades sellele HT1, et denatureeritud 20 pM *PhiX* lahjendaks lõpliku laadimiskontsentratsioonini mahuga 1 ml. Segati *Vortex*-i abil ja tsentrifugiti 1 minut kiirusel 280 x g.

Lõpuks ühendati raamatukogu ja *PhiX Control*, selle jaoks viidi kokku 5 µl denatureeritud ja lahjendatud *PhiX Control*-i ja 500 µl denatureeritud ja lahjendatud raamatukogu (protokoll A) kokku. Saadud reagenti hoiustati jääl selle kassetile laadimiseni.

Valmis raamatukogud laeti 300 tsüklilisele reaktiivkassetile *Illumina MiniseqTM Mid Output Reagent Cartridge* ning pandi *Illumina MiniseqTM* sekveneerimismasinasse. Sekveneerimine viidi läbi Tallinna Ülikooli molekulaarteaduste laboris Kairi Koorti juhendamisel.

2.12. Bioinformaatiline analüüs

Bioinformaatiline analüüs teostati kasutades *Illumina BaseSpace* tarkvara *BaseSpace Sequence Hub*, mis pakub mitmekesiseid järgmise põlvkonna sekveneerimise analüüsimiseks välja töötatud rakendusi. Tulemuste interpreteerimiseks kasutatakse hierarhilist klasterdamist kaalumata paaride meetodil. Rakenduses on võimalik genoomiandmeid jagada, analüüsida ja salvestada. Samuti võimaldavad rakendused andmeid liigitada, visualiseerida, tõlgendada. (Illumina, 2017) Peale sekveneerimist edastab sekvenaator andmed *fastq* jadafailina. Andmed võrreldi *BaseSpace 16S* ja ITS *Greengenes*

andmebaasi vastu ning leitud OTU nimekirjast arvatati välja taksonoomia jaotused vastavalt sagedusele.

Tulemused ja arutelu

Käesolevas peatükis antakse ülevaade kogukonnaaedade kasvukastide mullast ning selles sisalduvast mikroobikooslusest.

3.1. Mulla päritolu väljaselgitamine

Uuringualade mulla päritolu väljaselgitamiseks võttis töö autor telefonitsi ühendust Tallinna Keskkonna- ja Kommunaalameti linnaaianduse projektijuhi Maria Derlõš'iga. Uuringualadel kasutatava mulla päritolu on välja toodud tabelis 3, suurem osa muldasid pärines Pärnamäe jäätmejaamast, ülejäänud pärinesid Veo pro OÜ-st, Biomuld OÜ-st, poest. Ühe aia mulla päritolu kohta andmed puuduvad ning kontrolliaia muld on segu primaarsest mullast, poemullast ja aias toodetud kompostmullast (tabel 3).

Tabel 3. Kogukonnaaedade mulla päritolu. Kontrollitud mullaks loetakse antud tabelis neid muldi, mis on toodetud vastavalt komposti tootmis nõuetele ning omavad sertifikaati. Kontrollitud muld märgitud plussiga (+), kontrollimata miinusega (-).

Kogukonnaaed	Mulla päritolu	Kontrollitud muld (+)/kontrollimata muld (-)
Pae aed	Pärnamäe kompostmuld	+
Aafrika aed	Pärnamäe kompostmuld, lisatud poemulda	+
Ameerika aed	Veo pro OÜ-st. Muld pärineb kaevetöödelt, muld on sorteeritud, lisatud sõnnikut. Sorteeritud muld seisnud 1-2 aastat ja seejärel läbi kaevatud, sõelatud.	-
Pelguaed	Kompostmuld Biomuld OÜ-st	+
Põhjala aed	Pärnamäe kompostmuld	+

Vana-Kalamaja aed	Poemuld	-
Laagna aed	Pärnamäe kompostmuld	+
Mustamäe aed	Pärnamäe kompostmuld	+
Möldri Seltsi aed	Andmed puuduvad	-
Muuga kontrollaed	Kasvatuskasti muld kodu kompostri kompostmulla ja poemulla (turba segu) segu, maapealse peenra muld segu primaarsest mullast, turvasmullast ja kodukompostri kompostmullast.	-

Pärnamäe Jäätmejaama („Kompost/Muld | Jäätmejaam“, s.a.) ja Biomuld OÜ („Tunnustamine – Bioplus“, s.a.) kompostmuld on toodetud vastavalt 8. aprillil 2013. aastal kehtestatud määrusele nr 7 „Biolagunevatest jäätmetest komposti tootmise nõuded“ (RT I, 18. 12. 2020, 23) ning omavad vastavat sertifikaati. Nimetatud määruse lisa 2 on välja toodud komposti ohutus- ja kvaliteedinäitajad, mille kohaselt on kontrollitud *Salmonella* bakteri puudumist 25 g materjalis, võõraste piirväärtuseks on < 0,5% kuivaines ning idanemisvõimeliste umbrohuseemnete piirväärtuseks < 2 seemet liitri kohta.

Pae, Aafrika, Pelgu, Põhjala, Laagna ja Mustamäe kogukonnaaedade muld pärineb Pärnamäe jäätmejaamast ning Biomuld OÜ-st, seega on nende aedade mullast kontrollitud *Salmonella* mitte esinemist.

Kontrollaed Muugal valiti välja seetõttu, et seal on peenraid kasutatud aastaid ning see võib anda aimu, kuidas linnalähedane keskkond on mõjutanud mulla mikrobioloogilist kooslust, ühtlasi on tegemist aiaga, kus on segamini uus muld, kompostmuld ning primaarne muld. Kogukonnaaedades ei ole kasutatud primaarset mulda, vaid taimi kasvatatakse kõrgetes peenrakastides lisatud mullaga.

3.2. Patogeenide esinemine kasvukastide mullas

Terviseameti nakkushaiguste laboris teostati 2019. aastal kogutud mullaproovidest inimpatogeenide *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* ja *Listeria monocytogenes* tuvastamiseks analüüsid (vt lisa 1, analüüsiprotokollid), analüüside tulemused nimetatud patogeenide suhtes olid negatiivsed (tabel 4). Analüüsis uuriti *Salmonella spp.* esinemist 50 grammis uuritavas materjalis, *Listeria monocytogenes* esinemist 25 grammis uuritavas materjalis ning *Escherichia coli* pesasid moodustavaid ühikuid 1 grammi kohta. PMÜ-pesasid moodustavad ühik näitab minimaalset mikroobide hulka, mis on võimelised söötmel kolooniaid moodustama.

Tabel 4. Patogeenide esinemine mullaproovides. *Salmonella spp.* ja *Listeria monocytogenes* tulbas loetakse tulemust negatiivseks, kui vastavalt mikroobile ei esine patogeeni 50 g või 25 g analüüsitud materjalis. *Escherichia coli* puhul loetakse patogeeni esinemist negatiivseks, kui väärtused on < 3 pesasid moodustavates ühikutes 1g grammis materjalis.

Kogukonnaaed	<i>Salmonella spp.</i> Esinemine/ 50 g	<i>Escherichia coli</i> Pesasid moodustavad ühikud (PMÜ)/ 1 g/ 1 g	<i>Listeria monocytogenes</i> Esinemine/ 25 g
Pae	ei esine	< 3	ei esine
Põhjala	ei esine	< 3	ei esine
Ameerika	ei esine	< 3	ei esine
Pelgu	ei esine	< 3	ei esine
Mustamäe	ei esine	< 3	ei esine
Muuga kontrollaed	ei esine	< 3	ei esine

Inimpatogeenide tuvastamine teostati klassikalisi mikrobioloogilisi külvimeetodeid kasutades Terviseameti nakkushaiguste laboris. Analüüsi tulemusena ei tuvastatud ühestki

proovivõtukohest *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* ja *Listeria monocytogenes* baktereid. (Kaldma, *et al.*,2019)

Pae, Aafrika, Pelgu, Põhjala, Laagna ja Mustamäe kogukonnaaia puhul oli oodatav tulemus, et Salmonellat ei esine kuna nendes aedades kasutatav muld pärines Pärnamäe jäätmejaamast või Biomuld OÜ-st, kus kontrollitakse *Salmonella* esinemist. Ameerika aias ja Muuga kontrollaias, kus on kasutusel varasemalt kontrollimata muld ei esinenud samuti *Salmonella* bakterit.

3.3. Mullaproovidest DNA eraldamine ja analüüs

Kogutud mullaproovidest eraldati DNA mille kontsentratsioon ning puhtus kontrolliti. Lainepikkuste A260/A280 neeldumissuhete maksimumi ja DNA kontsentratsioonid on välja toodud kahe tabelina, 2019. a proovide tulemused (tabel 5) ja 2020. a proovide tulemused (tabel 6). A260/A280 suhe näitab nukleiinhappe puhtust. Vastavalt protokollile (Implen GmbH, s.a.) loetakse A260/A280 lainepikkuste optimaalseks suhteks 0,010-1,6 ning heaks DNA kontsentratsiooniks 25-40 000 ng/μl.

Tabel 5. 2019. aasta mullaproovide kontsentratsioonid peale DNA-eraldamist.

Proov	A260/A280	Kontsentratsioon ng/μl
PA 19	1, 860	400
PA 29	1, 851	310
AF 19	1, 857	455
AF 29	1, 833	358
PE 19	1, 823	360
PE 29	1, 821	383
PÕ 19	1, 825	365
PÕ 29	1, 827	448
VK 19	1, 779	343

VK 29	1, 765	300
LA 19	1, 802	388
LA 29	1, 812	580
AM 19	1, 828	558
AM 29	1, 746	602
MU 19	1, 840	602
MU 29	1, 843	498
MÖ 19	1, 779	343
MÖ 29	1, 767	323
MG 19	1, 780	222
MG 29	1, 072	185

Tabel 6. 2020. aasta mullaproovide kontsentratsioonid peale DNA-eraldamist.

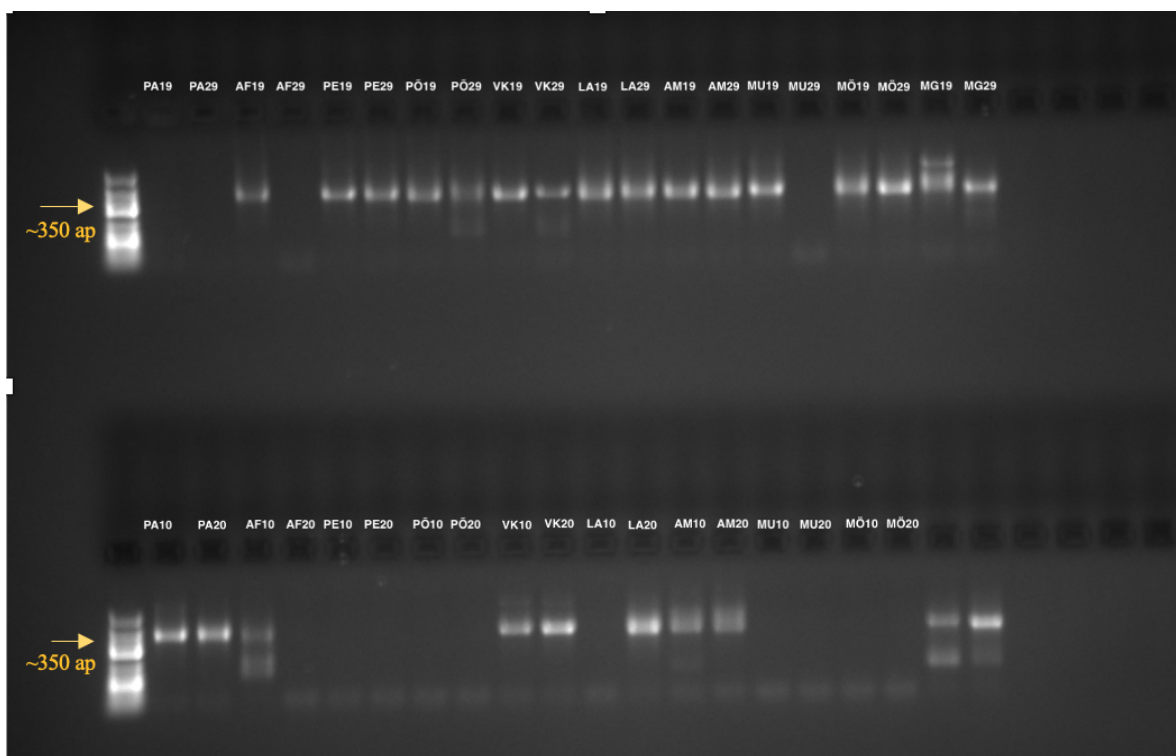
Proov	A260/A280	Kontsentratsioon ng/μl
PA 10	1, 441	123
PA 20	1, 589	290
AF 10	1, 595	148
AF 20	1, 600	260
PE 10	1, 607	225
PE 20	1, 667	375
PÕ 10	1, 649	305
PÕ 20	1, 688	202
VK 10	1, 593	215
VK 20	1, 583	95

LA 10	1, 661	232
LA 20	1, 719	245
AM 10	1, 654	215
AM 20	1, 681	290
MU 10	1, 603	232
MU 20	1, 662	270
MÖ 10	1, 646	198
MÖ 20	1, 628	175
MG 10	1, 654	108
MG 20	1, 708	102

Peale õnnestunud DNA eraldamist teostati uuritava 16Sr RNA geeni piirkonna kordistamiseks PCR ning saadud PCR-produktide kvaliteedi hindamiseks agaros geelelektroforees. Geelelektroforeesi tulemusi hinnatakse visuaalselt UV-illuminaatoris ning fragmendi oodatav pikkus on ~350 bp (joonis 15).

3.4. Agaros-geelelektroforees

Peale esimest PCR-i teostati teine PCR, kus igale proovile lisati unikaalne praimerkombinatsioon. Teise PCR-i järgselt teostatud agaros-geelelektroforees, mille abil määrati fragmentide intensiivsus pöördskaalas ja pipeteeriti DNA triipkoodidega varustatud proovid kokku.



Joonis 15. UV-illuminaatoris tehtud pilt, mis näitab PCR-i järgselt tugevaid fragmente. Mõlema rea esimeses kaevus suurusmarker, tähistatud kollase noolega oodatava ~350 aluspaari (ap) juures.

Peale sekveneerimisraamatukogu koostamist teostati sekveneerimine kasutades Illumina MiniSeq sekvenaatorit. Sekveneerimisel läbis seatud kvaliteedifiltri 97,3 % järjestustest ning sekveneeritud klastrite tihedus oli 60000/mm².

3.5. Mullaproovidest tuvastatud mikroobid

Sekveneeritud järjestused analüüsiti, tuvastamaks kogukonnaaedade kasvatuskastide mulla mikroobne koosseis. Pae aiast tuvastati 2019. aasta proovides *Lewinella* (PA 19) ja *Leptothrix* (PA 29) perekonna liikmete domineerimine. Aafrika aias domineerisid (AF 19) *Pseudomonas* ja Pelgu aias (PE 29) *Chitinophaga* perekonna liikmed. Pae aias tuvastati bakteriliik *Lewinella marina* (proov PA19) ja Aafrika aias (proov AF 19) *Pseudomonas parafulva*.

Hõimkondade *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* ning klasside *Gammaproteobacteria* ja *Betaproteobacteria* liikmete mitmekesisus tuleneb vähemalt ajutisest looduslike materjalidega kokkupuutest, mis suurendab naha üldist mikroobioomi mitmekesisust

(Grönroos *et al.*, 2018) nende hõimkondade seast olid Aafrika (AF 19) ja Pae (PA 19, PA 29) aias esindatud liikmeid. Linnakeskkonnas tekib kütuste mittetäieliku põlemise tagajärjel polütsükilisi aromaatsaid süsivesinikke (PAH), mis paisatakse õhku ning nende jõudmisel mulda võivad mõjutada mulla mikroobset koostist, tuvastatud hõimkondade *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* esindatus mullas võib olla sellest tingitud. Hõimkonna *Proteobacteria* ning perekonna *Pseudomonas* ja *Lewinella* (Koshlaf *et al.*, 2019) liikmed on võimelised pinnasest PAH-e lagundama. (Roslund *et al.*, 2018) On täheldatud, et õue põõsaliikide suure arvukuse korral on hõimkonna *Bacteroidetes* esindatus aiatöödega tegelenud inimese soolestikus suurem, mis on positiivne kuna see soodustab soolestiku mikrobiota homöostaasi. Samuti mõjutab soolestiku mikrobiotat positiivselt hõimkonna *Bacteroides* esindatus, mis on seotud õistaimede arvukusega. (Parajuli *et al.*, 2020) Perekonna *Pseudomonas* liikmete esindatus mullas on väga hea, kuna selle perekonna liikmete taime kasvu soodustav mõju on teadatud (Backer *et al.*, 2018). *Pseudomonas parafulva* esinemine mullas on mitmete taime- ja seenhaigusi põhjustavate mikroobide elutegevust pärssiva toimega (Liu *et al.*, 2015).

Hõimkonna *Bacteroidetes* alla kuuluva sugukonna *Saprospiraceae* mikroobe, kelle perekonda kuulub *Lewinella*, on enim isoleeritud veekeskkonnast, peamiselt merega seotud keskkondadest, kuid ka mageveest ja aktiivmudast. Isoleeritud sugukonna liikmetel on tõestatud süsinikuallikate lagundamise võime, mis teeb nad oluliseks orgaaniliste ainete lagundajateks keskkonnas. (McIlroy & Nielsen, 2014) *Lewinella* perekonna liikmed vajavad kasvuks merevett (Hahnke *et al.*, 2016). Võime oletada, et *Lewinella* perekonna liikmed on Pae aia kasvatuskasti (PA 19) sattunud vetikaid sisaldavaid väetisi või vetikaid kasutades. Teiseks võimaluseks on, et Pärnamäe jäätmejaamast pärit komposti hulgas on olnud muda, mis on *Lewinella* perekonna liikidele samuti sobivaks elukeskkonnaks.

Pae aia kasvatuskastist (PA 29) tuvastatud perekonda *Leptothrix* võib leida veekeskkondadest, mis sisaldavad piisavas koguses orgaanilist ainet. *Leptothrix* perekonnas olevad liikmed on võimelised rauda ja mangaani oksüdeerima, neil on võimemoodustada toitainevaeses keskkonnas enda ümber rauda ja mangaani sisaldavaid kest. Sellised kestad jäetakse paljunevate bakterite poolt tihti tühjuna maha. (Kunoh *et al.*, 2015)

Perekonda *Chitinophaga* kuulub kümme keskkonnabakteri liiki (Crémet *et al.*, 2009), perekonda nimetati esimest korda 1981. aastal kuid *Chitinophaga* liigid on üsna uued

(Sangkhol & Skerman, 1981). *Chitinophaga* perekonda kuuluv liik *Chitinophaga rhizosphaerae* on isoleeritud tomati taime risosfääri mullast, tal on taimekasvu soodustavad omadused (Kim *et al.*, 2017). 2020. aastal kogutud Mustamäe aia kasvatuskastis kasvasid tomatid, mille kasvu toetas *Chitinophaga* perekonda kuuluv liik.

Kogukonnaedade mullast tuvastati arbuskulaarset mükoriisat, mis moodustab omaette hõimkonda *Glomeromycota* (krohmseened). Krohmseened on obligatoorsed sümbiondid ehk vajavad oma elutegevuseks taimi. (Smith & Read, 2008) Krohmseente rühm on väga laialt levinud maismaaökosüsteemides, kus nad mängivad olulist rolli mõjutades taime kasvu ja ökosüsteemi protsesse (Stürmer & Kemmelmeier, 2021).

Hõimkonna *Ascomycota* liikmed domineerivad kuivades ökosüsteemides, olles olulised süsiniku- ja lämmastikuringes. *Ascomycota* perekonda kuuluvatel seened hoiavad mulda stabiilsena, osalevad taime biomassi lagunemises ning on endofüütilises suhtes taimedega ja parandab osa taime kasvu. (Challacombe *et al.*, 2019)

Kogukonnaedades leidis arvukalt hõimkonna *Ascomycota* alla kuuluvaid klasse: *Sordariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes* ja *Dothideomycetes*, mis on ka maailmas loetud kõige levinumateks seene klassideks mulla keskkonnas. Nende lai esindatus mullas näitab suurt stressitaluvust ja võimet ressursse omastada, mis võimaldab paremini asustada väga erinevaid keskkondi. (Egidi *et al.*, 2019) *Sordariomycetes* klassi kuuluvad *Monocillium* perekonnast pärit seened on laialdaselt levinud lagunevatel taimesubstraatidel, näiteks taime koorel, eriti okaspuu koortel (Gams *et al.*, 2019). *Monocillium* kõrge esindatus aedades võib tuleneda mulla päritolust, enamik muldi on pärit Pärnamäe jäätmejaamast, kust tehakse komposti haljastus ja kalmistu koristustöödest tulevast orgaanilisest materjalist. Tallinna kalmistutel kasvab tavapäraselt palju okaspuid.

Klassi *Eurotiomycetes* kuuluvad perekond *Penicillium* liikmed on ühed levinuimad ja tuntumad seeni mullas. *Penicillium* perekonna liikmete põhifunktsioon looduses on orgaanilise materjali lagundamine. Ühtlasi võivad põhjustada toidukultuuridel mädanikke. (Visagie *et al.*, 2014) Kogukonnaedade muldadest leitud seltside *Hypocreales*, *Microascales*, *Sordariales* ja *Eurotiales* liikmed on saprofoorsed organismid ehk elavad surnud orgaanilisel ainel ning on seetõttu kompostis, mullas ja sõnnikus laialt levinud organismid (Langarica-Fuentes, Fox, & Robson, 2015).

Chytridiomycota hõimkonnast domineerisid perekonnad *Kappamyces* ja *Phlyctochytrium*. *Chytridiomycota* liikmetel võivad esineda resistentsed struktuurid, mis võimaldavad ellujäämist perioodilise kuivatamise ja põllukultuuride jaoks kasutatavale pinnasele omase kõrgema suvetemperatuuriga (Freeman *et al.*, 2009).

Väga palju leidus *Metschnikowia* perekonna liikmeid, paljudes aedades esines liik *Metschnikowia santaceeiliae*, *Metschnikowia* perekonna liikmete hulka kuulub hulgaliselt mullabaktereid mis eelistavad külmemat kliimat, sellesse perekonda kuuluvad liigid on väga hea stressitaluvusega (Pawlikowska *et al.*, 2019).

Ka perekonda *Rhizoclomatium* esines arvukalt, eriti niisketes muldades. *Pseudallescheria* perekonna liikmed on levinud üle maailma erinevates mullatüüpides ning esinesid vähesel määral ka Tallinna kogukonnaaedade kasvukastide muldades.

Leotiomyces liikmed, eriti perekonna *Phaeohelotium* esindajad olid väga arvukad. Nad on saprotroofid kes saavad energiat surnud orgaanilisest ainest (Quandt & Haelewaters, 2021).

Ka *Basidiomycota* liikmed eriti *Tulasnella* esindajad on laialdaselt levinud ning toituvad surnud orgaanilisest ainest, nad on lagundajad, kes mängivad süsinikuringes olulist rolli. (Swann & Hibbett, 2012)

Uuringu käigus selgus, et kogukonnaaedades olev muld on inimtervisele ohutu ja ei sisalda inimtervisele kahjulikke uuritud patogeene. 2019. ja 2020. aasta kogutud mullaproovidest leiti mitmeid inimtervisele kasulikke mikroobe nagu näiteks hõimkondade *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* liikmeid, kes tõstavad inimese mikrobiomi mitmekesisust. Samuti esines suurel hulgal lagundajaid, kes on kompostmullas tavapärased ja vajalikud mikroorganismid. Selgitati välja kogukonnaaedade mulla päritolu. Pae, Aafrika, Põhjala, Laagna ja Mustamäe aias kasutatakse Pärnamäe jäätmajaamast pärit kompostmulda. Vana-Kalamaja aias kasutatakse poemulda, Pelguaeda telliti muld Biomuld OÜ-st, Ameerika aia muld toodud Veo pro OÜ-st ning kontrollaia muld on segu poemullast, kompostmullast ning primaarsest mullast.

Magistritöö eesmärk tuvastada kogukonnaaedaades olevad mikroobid operatsiooniliste taksonoomiliste ühikuteni välja, õnnestus. Kogukonnaaedade populariseerimine ja toetamine on linlastele vajalik kuna looduslikke materjalide kokkupuutel püsivad inimesed tervemad. Linnaruumi mikrobioloogilise vaesumise korral võib aga inimeste tervis

halveneda kuna mikroobikogukondade mitmekesisus võib vaesuda, mis omakorda mõjutab negatiivselt inimese immuunsüsteemi ja vaimset toimetulekut.

Kokkuvõte

Kogukonnaaedade pidamine kogub üha enam populaarsust ning ning mõjub linlastele positiivselt. Aiad muudavad linnakeskkonda kvaliteetsemaks elukeskkonnaks ning toetavad inimeste sotsiaalseid läbikäimisi, rikastavad nende toidulauda ning pakuvad rekreatiivseid võimalusi. Kogukonnaaedade pidamine peab olema ohutu, seega on selle magitritöö raames uuritakse kogukonnaaedade mulla mikrobioloogilist koostist ja kogukonnaaedades kasutatava mulla päritolu. Mikrobioloogilise koostise määramine on oluline, et tuvastada inimtervisele ohtlikke patogeene esinemist ja veenduda kogukonnaaedade mulla ohutuses.

Uuringus selgitati väljavalitud linnaaedade kasutatava mulla päritolu, mis oli enamasti pärit Pärnamäe jäätmejaamast, Biomuld OÜ-st või oli tegemist kaupluses müüdava mullaga. Primaarset mulda oli kasutatud vaid kontrollaias.

2019. aastal kogutud mullaproovidest kontrolliti patogeene esinemist kasvukastide mullas. Selleks teostati Terviseameti nakkushaiguste laboris analüüsid inimpatogeene *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* ja *Listeria monocytogenes* tuvastamiseks. Ühtki nimetatud patogeeni üheski proovis ei tuvastatud.

Seejärel eraldati kogutud mullaproovidest DNA, mille kontsentratsioon ning puhtus kontrolliti. Õnnestus eraldada kvaliteetne DNA, mis oli sobilik polümeraasi ahelreaktsiooni teostamiseks. Selle tulemuste visualiseerimiseks teostati agaros geelelektroforees. Koostati sekveneerimisraamatukogu ning teostati sekveneerimine. Sekveneerimisel läbis seatud kvaliteedifiltri 97,3 % järjestustest ning sekveneeritud klastrite tihedus oli 60000/mm².

Kogukonnaaedade kasvuskastide mulla mikroobse koostise tuvastamiseks analüüsiti sekveneeritud järjestused. Erinevates aedades tuvastati *Lewinella* ja *Leptothrix* perekonna liikmete domineerimine, *Pseudomonas* ja *Chitinophaga* perekonna liikmeid ning *Lewinella marina* ja *Pseudomonas parafulva* bakteriliike. Kogukonnaaedade mullast tuvastati arbuskulaarset mükoriisat, mis moodustab omaette hõimkonna *Glomeromycota* (krohmsened). Kogukonnaaedades leidis ka arvukalt hõimkonna *Ascomycota* alla kuuluvaid klasse: *Sordiariomycetes*, *Leotiomycetes*, *Eurotiomycetes* ja *Dothideomycetes*, mis on kõige populaarsemad seene klassid mulla keskkonnas. Nende lai esindatud mullas näitab suurt stressitaluvust ja ressursside omastamist, mis võimaldab paremini asustada

väga erinevaid keskkondi. Tuvastatud liigid soodustavad kasulikke mikroobe nagu näiteks hõimkondade *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* liikmeid, kes tõstavad inimese mikrobioomi mitmekesisust. Tehtud uuringu tulemustest saab järeldada, et linnaruumis toiduks kasutatav muld ei sisalda inimese tervisele ohtlikke baktereid ega seeni ning kogukonnaaiandus linnaruumis on tervikuna inimese tervisele ohutu. See on oluline järeldus, sest linnaaiandus omab äärmiselt positiivset mõju nii linnaruumile, bioloogilisele mitmekesisusele kui ka inimese tervisele, samuti lahendab sotsiaalseid probleeme.

Püstitatud eesmärk, teostada mulla mikrobioomi analüüsid, et tõestada linnas kasvatatava toidu ohutus, õnnestus täita vaatamata keerukatele oludele uuringu koostamise ajal ning mitmetele ootamatutele tagasilöökidele. Püstitatud hüpotees, et linnas kasvatatav toit on inimese tervisele ohutu, õnnestus teostatud uuringute käigus tõestada. Siiski on linnaruum kaugel tasakaalustatud elupaigast ning oluliselt mõjutatud inimtegevusest. Seetõttu on otstarbekas mitte vaid tehtud uuringu tulemustele lootma jääda, vaid korrata teostatud analüüse toiduohutuse tagamiseks perioodiliselt.

Summary

The determination of soil microbiological composition in Tallinn community gardens

Kadi Karmen Kaldma

Last decades have changed the human lifestyle significantly. Urban lifestyle has also come with changes in microbiota of the human gastroenterological system. These changes in microbiota and the loss of certain functions have been associated with living in an artificial environment.

As many studies have proved, both short-term and long-term exposure to natural compounds has a positive effect on the diversity of human skin and gastroenterological microbiota. The recent trend of growing food in urban community gardens can give this exposure but also contribute to solving many other problems that occur in modern cities. Problems such as social exclusion, loss of biodiversity, planning of the urban room, growing lack of environmental knowledge, growing food shortages and many more are increasingly important. Therefore, this study is focused on the microbiological research of soils in urban community gardens to find out if this activity, positive in so many fields, is also safe for human health.

For this research, 10 community gardens of Tallinn, the capital of Estonia, have been chosen to microbiologically analyse the soil used in these gardens for food production. From the community gardens of Pae, Aafrika, Ameerika, Pelgu, Põhjala, Vana-Kalamaja, Laagna, Mustamäe, Möldri Selts and a control garden in Muuga soil samples have been collected during two years. These samples have been analysed using next generation sequencing technology that enables the study of microbiological diversity of soils. Bacteria and fungi have been identified up to operational taxonomic units.

The results of this study show that no studied pathogens harmful to human health have been identified in collected soil examples. On the contrary, many bacteria that have a positive influence on human health and the growth of plants, have been identified. This shows that

community gardens can have a positive influence on urban lifestyle on many levels and are also not harmful to human health and food grown in urban Tallinn is safe to eat.

Keywords: community garden, pathogen, soil microbes, urban soil

Kasutatud kirjandus

- Ayilara, M. S., Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O., & Odeyemi, O. (2020). Waste management through composting: Challenges and potentials. *Sustainability (Switzerland)*, 12(11), 1–23. <https://doi.org/10.3390/su12114456>
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1997, märts 3). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae*, Kd 68, lk 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00954-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00954-5)
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... Smith, D. L. (2018, oktoober 23). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, Kd 871, lk 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 78–91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4)
- Barthel, S., Parker, J., & Ernstson, H. (2015). Food and Green Space in Cities: A Resilience Lens on Gardens and Urban Environmental Movements. *Urban Studies*, 52(7), 1321–1338. <https://doi.org/10.1177/0042098012472744>
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols* (lk 3–6). <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Baumgardner, D. J. (2012). Soil-Related Bacterial and Fungal Infections. *J Am Board Fam Med*, 25(5). <https://doi.org/10.3122/jabfm.2012.05.110226>
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Biologunevatest jäätmetest komposti tootmise nõuded. (08.04.2013) Riigi Teataja. RT I, 18. 12. 2020, 23
- Burr, T. J. (1978). Increased Potato Yields by Treatment of Seedpieces with Specific Strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68(9), 1377. <https://doi.org/10.1094/Phyto-68-1377>

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011a). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011b). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., ... Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(9), 569–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
- Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue, L. A., Lipton, M., Purvine, S., ... Kuske, C. R. (2019). Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>
- Crémet, L., Bemer, P., Zambon, O., Reynaud, A., Caroff, N., & Corvec, S. (2009, juuli). Chitinophaga terrae bacteremia in human. *Emerging Infectious Diseases*, *Kd 15*, lk 1134–1135. <https://doi.org/10.3201/eid1507.090124>
- Eesti säästva arengu riikliku strateegia „Säästev Eesti 21“ heakskiitmine. (14.09.2005). *Riigi Teataja*. RT I 2005, 50, 396
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., ... Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- Elsas, J. D. van. (2019). The Soil Environment *. *Modern Soil Microbiology*. <https://doi.org/10.1201/9780429059186-1>
- Fernández-Calviño, D., & Bååth, E. (2010). Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiology Ecology*, *73*(1), 149–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00873.x>

- Frac, M., Hannula, S. E., Belka, M., & Jędryczka, M. (2018, april 13). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology*, Kd 9, lk 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- Frac, M., Jezierska-Tys, S., & Yaguchi, T. (2015). Occurrence, Detection, and Molecular and Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health. *Advances in Agronomy* (Kd 132, lk 161–204). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.02.003>
- Frantzeskaki, N. (2016). *Urban Resilience A concept for co-creating cities of the future*. 51. Salvestatud http://urbact.eu/sites/default/files/resilient_europe_baseline_study.pdf
- Freeman, K. R., Martin, A. P., Karki, D., Lynch, R. C., Mitter, M. S., Meyera, A. F., ... Schmidt, S. K. (2009). Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18315–18320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907303106>
- Gams, W., Stielow, B., Gräfenhan, T., & Schroers, H. J. (2019). The ascomycete genus *Niesslia* and associated monocillium-like anamorphs. *Mycological Progress*, 18(1–2), 5–76. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1459-5>
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., & Varma, A. (2005). Microbial Diversity in Soils. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (lk 19–55). https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_2
- Graves, R. (2000). Composting. *Environmental Engineering National Engineering Handbook*, 2–22.
- Grönroos, M., Parajuli, A., Laitinen, O. H., Roslund, M. I., Vari, H. K., Hyöty, H., ... Sinkkonen, A. (2018). Short-term direct contact with soil and plant materials leads to an immediate increase in diversity of skin microbiota. *MicrobiologyOpen*, (January), 2018. <https://doi.org/10.1002/mbo3.645>
- Haspeck, M. (2020). Ecosystem Health and the One Health Concept. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20077.92649>
- Hui, N., Grönroos, M., Roslund, M. I., Parajuli, A., Vari, H. K., Soininen, L., ... Sinkkonen, A. (2019). Diverse environmental microbiota as a tool to augment

- biodiversity in urban landscaping materials. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00536>
- Illumina. (2016). MiniSeq™ System. 770-2015-039, (April 2018), 1–13.
- Illumina. (2017). BaseSpace Sequence Hub Overview. Salvestatud 3. mai 2021, https://support.illumina.com/help/BaseSpace_Sequence_Hub/Source/Informatics/BS/SoftwareOverview_swBS.htm
- Implen GmbH. (s.a.). *NanoPhotometer® P-Class User Manual Declaration of conformity for the NanoPhotometer® P-Class (P300/P330/P360)*.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Kalda, A., Kukk, E., Masing, V., Trass, H., & Vaga, A. (1965). *Botaanika I õpik kõrgematele koolidele* (A. Arak, Toim). Tallinn: Valgus.
- Kaldma, K K, Koort, K., Vacht, P., Järvamägi, K., Metsis, M., & Koff, T. (2019). *Tallinna linnaaedade mulla- ja taimeproovide analüüs*. Tallinn.
- Kaldma, Kadi Karmen. (2019). *Laagna kogukonnaaia mulla uuringutest*.
- Kim, S. J., Cho, H., Ahn, J. H., Weon, H. Y., Joa, J. H., Hong, S. B., ... Kwon, S. W. (2017). Chitinophaga rhizosphaerae sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of a tomato plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3435–3439. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002134>
- Koshlaf, E., Shahsavari, E., Haleyur, N., Mark Osborn, A., & Ball, A. S. (2019). Effect of biostimulation on the distribution and composition of the microbial community of a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated landfill soil during bioremediation. *Geoderma*, 338, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.12.001>
- Kunoh, T., Suzuki, T., Shiraishi, T., Kunoh, H., & Takada, J. (2015). Treatment of Leptothrix cells with ultrapure water poses a threat to their viability. *Biology*, 4(1), 50–66. <https://doi.org/10.3390/biology4010050>
- Langarica-Fuentes, A., Fox, G., & Robson, G. D. (2015). Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology*, 1921–1932. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000153>

- Leichenko, R. (2011, mai). Climate change and urban resilience. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, Kd 3, lk 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2010.12.014>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015, aprill 20). Trichoderma as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, Kd 196, lk 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- Martin, G., Clift, R., & Christie, I. (2016). Urban cultivation and its contributions to sustainability: Nibbles of food but oodles of social capital. *Sustainability (Switzerland)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/su8050409>
- McPhearson, T., Hamstead, Z. A., & Kremer, P. (s.a.). *Urban Ecosystem Services for Resilience Planning and Management in New York City*. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0509-8>
- Meena, A. L., Karwal, M., Dutta, D., & Mishra, R. P. (2021). Composting: Phases and Factors Responsible for Efficient and Improved Composting. *Agriculture & Food*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13546.95689>
- Mizrahi-Man, O., Davenport, E. R., & Gilad, Y. (2013). Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE*, 8(1), e53608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053608>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Nanodrop Lite. (s.a.). *T123-TECHNICAL BULLETIN Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Salvestatud www.thermoscientific.com/nanodrop
- Naylor, D., Fansler, S., Brislawn, C., Nelson, W. C., Hofmockel, K. S., Jansson, J. K., & McClure, R. (2020). *Deconstructing the Soil Microbiome into Reduced-Complexity Functional Modules*. 11(4), 1–19.
- Olsson, E. G. A., Kerselaers, E., Kristensen, L. S., Primdahl, J., Rogge, E., & Wästfelt, A. (2016). Peri-urban food production and its relation to urban resilience. *Sustainability (Switzerland)*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/su8121340>

- Parajuli, A., Hui, N., Puhakka, R., Oikarinen, S., Grönroos, M., Selonen, V. A. O., ... Sinkkonen, A. (2020). Yard vegetation is associated with gut microbiota composition. *Science of the Total Environment*, 713, 136707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136707>
- Patz, J. A., Daszak, P., Tabor, G. M., Aguirre, A. A., Pearl, M., Epstein, J., ... Zakarov, V. (2004). Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1092–1098. <https://doi.org/10.1289/ehp.6877>
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112(10), 1425–1445. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01272-w>
- Qiagen. (2018). *QIAquick Gel Extraction Kit (50) QIAquick Gel Extraction Kit (250)*. (July), 2011.
- Quandt, C. A., & Haelewaters, D. (2021). Phylogenetic Advances in Leotiomycetes, an Understudied Clade of Taxonomically and Ecologically Diverse Fungi. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819990-9.00052-4>
- Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit*. (s.a.). Salvestatud www.zymoresearch.com
- Reaser, J., Hunt, B. E., Ruiz-Aravena, M., Tabor, G. M., Patz, J. A., Becker, D., ... Plowright, R. (2020). *Reducing land use-induced spillover risk by fostering landscape immunity: policy priorities for conservation practitioners*. <https://doi.org/10.32942/OSF.IO/7GD6A>
- Reaser, J. K., Witt, A., Tabor, G. M., Hudson, P. J., & Plowright, R. K. (2020). Ecological countermeasures for pandemic prevention: when ecological restoration is a human health imperative. *EcoEvoRXiv*, 1–11.
- Reber, S. O., Siebler, P. H., Donner, N. C., Morton, J. T., Smith, D. G., Kopelman, J. M., ... Lowry, C. A. (2016). Immunization with a heat-killed preparation of the environmental bacterium *Mycobacterium vaccae* promotes stress resilience in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), E3130–E3139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600324113>

- Riigikantselei. (s.a.). *Ülevaade ÜRO tegevuskava 2030 elluviimisest Eestis*.
Salvestatud <https://www.riigikantselei.ee/sites/default/files/content-editors/>
- Roslund, M. I., Grönroos, M., Rantalainen, A. L., Jumpponen, A., Romantschuk, M., Parajuli, A., ... Sinkkonen, A. (2018). Half-lives of PAHs and temporal microbiota changes in commonly used urban landscaping materials. *PeerJ*, 2018(3). <https://doi.org/10.7717/peerj.4508>
- Roslund, M. I., Puhakka, R., Grönroos, M., Nurminen, N., Oikarinen, S., Gazali, A. M., ... Sinkkonen, A. (2020). Environmental Studies biodiversity intervention enhances immune regulation and health-associated commensal microbiota among daycare children. *Science Advances*, 6(42), eaba2578. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba2578>
- Sangkhobol, V., & Skerman, V. B. D. (1981). Chitinophaga, a New Genus of Chitinolytic Myxobacteria. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*.
- Sellberg, M. M., Wilkinson, C., & Peterson, G. D. (2015). Resilience assessment: A useful approach to navigate urban sustainability challenges. *Ecology and Society*, 20(1). <https://doi.org/10.5751/ES-07258-200143>
- Sequence notation. (s.a.). Salvestatud 10. mai 2021, https://www.bioinformatics.nl/molbi/SCLResources/sequence_notation.htm#Reverse_complement
- Sherina, V., McMurray, H. R., Powers, W., Land, H., Love, T. M. T., & McCall, M. N. (2017, detsember 8). Statistical Approaches to Decreasing the Discrepancy of Non-detects in qPCR Data. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/231621>
- Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3. tr). Academic Press.
- Sonnenburg, J. L., & Sonnenburg, E. D. (2019, oktoober 25). Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, Kd 366. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>
- Stürmer, S. L., & Kimmelmeier, K. (2021). The Glomeromycota in the Neotropics. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.553679>
- Swann, E., & Hibbett, D. S. (2012). Basidiomycota. Salvestatud 26. mai 2021, <http://tolweb.org/Basidiomycota/20520>

- Tasnim, N., Abulizi, N., Pither, J., Hart, M. M., & Gibson, D. L. (2017). Linking the gut microbial ecosystem with the environment: Does gut health depend on where we live? *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01935>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(7), 40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Uustal, M., Kuldna, P., & Peterson, K. (2010). *Elurikas linn. Linnaelustiku käsiraamat*. Tallinn: SA Säästva Eesti Instituut.
- van Bruggen, A. H. C., Goss, E. M., Havelaar, A., van Diepeningen, A. D., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2019, mai 10). One Health - Cycling of diverse microbial communities as a connecting force for soil, plant, animal, human and ecosystem health. *Science of the Total Environment*, Kd 664, lk 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.091>
- Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). NaïveNaïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy † Downloaded from. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 73(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, Y., Gong, J., Li, J., Xin, Y., Hao, Z., Chen, C., ... Li, J. (2020). Insights into bacterial diversity in compost: Core microbiome and prevalence of potential pathogenic bacteria. *Science of the Total Environment*, 718, 137304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137304>
- Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., ... Lu, Z. (2018). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of The Total Environment*, 618, 1254–1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>

Lisad

Lisa 1. Analüüsi protokollid



TERVISEAMET

Nakkushaiguste labor

Protokoll nr. **ML2020/E3042M**

Proov: Pae aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: PA 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma iseärasusteta proov
Proov võetud: 15.10.2019 kell: 15:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 15:40
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 10:37 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1 g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollid tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Protokoll nr. **ML2020/E3041M**

Proov: Põhjala aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: PÕ 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma isecärasusteta proov
Proov võetud: 15.10.2019 kell: 14:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 15:30
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 10:35 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollit tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Protokoll nr. **ML2020/E3038M**

Proov: Ameerika aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: AM 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma isecärasusteta proov
Proov võetud: 15.10.2019 kell: 15:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 14:30
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 10:31 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollit tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Protokoll nr. **ML2020/E3037M**

Proov: Pelgu aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: PE 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma isecärasusteta proov
Proov võetud: 15.10.2019 kell: 15:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 14:30
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 10:29 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollit tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Protokoll nr. **ML2020/E3036M**

Proov: Mustamäe aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: MU 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma isecärasusteta proov
Proov võetud: 10.10.2019 kell: 15:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 13:30
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 10:28 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollit tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Protokoll nr. **ML2020/E3033M**

Proov: Muuga kontrollala aia muld
Täiendavad andmed: Partii nr: MG 4
Tootja nimetus:
Proovivõtu koht:
Töö tellija: Tallinna Ülikool Narva mnt 25, Tallinn, Harjumaa, 10120 / Loodus- ja Terviseteaduste Instituut
Proovivõtja: Tiiu Koff
Proovi seisund laborisse saabumisel: Ilma isecärasusteta proov
Proov võetud: 26.11.2020 kell: 15:00 Analüüs alustatud: 11.03.2020 kell: 11:00
Proov toodud laborisse 11.03.2020 kell: 08:31 Analüüs lõpetatud: 16.03.2020
Proovi koodnumber: Protokoll vormistatud 27.03.2020

Uuringu tulemused

Näitaja	Ühik	Tulemus	Meetod
Salmonella spp.	Esinemine/ 50 g	ei esine	CEN/TR 15215-3
Escherichia coli	PMÜ/1g/ 1 g	< 3	CEN/TR 15214-3
Listeria monocytogenes	Esinemine/ 25 g	ei esine	ISO 11290-1:2017

Seletus: PMÜ- pesa moodustav ühik.

vanemspetsialist S.Rudõka

Katsetulemused kehtivad uuritud proovide kohta. Protokollid tohib paljundada ainult tervikuna.

Lk. nr.1(1)

Terviseamet
Aadress: Paldiski mnt. 81, Tallinn, 10617
Reg. nr.: 70008799



tel: 7 943 600
nakkus@terviseamet.ee
www.terviseamet.ee

Lisa 2.

Lisa 2. Eluslooduse süstemaatika kategooriad (Kalda, et al., 1965).

Eesti keele	Inglise keele	Ladina keel
Riik	Kingdom	Regnum
Hõimkond	Phylum/division	Phylum/divisio
Klass	Class	Classis
Selts	Order	Ordo
Sugukond	Family	Familia
Perekond	Genus	Genus
Liik	Species	Species

Autorideklaratsioon ja lihtlitsents

Mina, **Kadi Karmen Kaldma**,
(*autori nimi*)

1. olen koostanud magistritöö iseseisvalt. Teiste autorite uurimistööd, olulised seisukohad kirjandusest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.
2. annan Tallinna Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Tallinna kogukonnaaedade mulla mikrobioloogilise koostise määramine“
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on professor **Tiiu Koff** ja lektor **Kairi Koort**,
(*juhendajate nimed*)

- 2.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja elektroonilise avaldamise eesmärgil Tallinna Ülikooli Akadeemilise Raamatukogu repositooriumis alates lõputöö positiivsele tulemusele hindamisest kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
- 2.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Ülikooli Akadeemilise Raamatukogu repositooriumis alates lõputöö positiivsele tulemusele hindamisest kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktis 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitset reguleerivatest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Töö autor: _____
(*digitaalne*) allkiri, kuupäev

Töö on kaitsmisele lubatud.

Juhendaja: (*ees- ja perekonnanimi, teaduslik kraad*) _____
(*digitaalne*) allkiri, kuupäev

Juhendaja: (*ees- ja perekonnanimi, teaduslik kraad*) _____
(*digitaalne*) allkiri, kuupäev

Kuraator: (*ees- ja perekonnanimi, teaduslik kraad*) _____
(*digitaalne*) allkiri, kuupäev

Kaitsmine toimub Tallinna Ülikooli loodus- ja terviseteaduste instituudi magistritööde kaitsmiskomisjoni avalikul koosolekul _____ 2021. aastal kell _____ Tallinnas, aadressil Narva mnt. 29 ruumis _____.