

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
GEOGRAAFIA OSAKOND

Magistritöö keskkonnatehnoloogias

**PÄIDEROOGA KULTIVEERIMISE JA VÄETAMISE MÕJU MULLA
ARHEDE KOOSLUSELE JA SELLE METAANITOOTMISE
POTENTSIAALILE MAHAJÄETUD FREESTURBA TOOTMISALAL**

Mikk Espenberg

Juhendaja: vanemteadur Marika Truu

Tartu 2013

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	3
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1. Sood kui ressursiallikad.....	5
1.1.1. Soode kuivendamine.....	5
1.1.2. Turba kaevandamine ja kasutamine.....	6
1.2. Keskkonnatingimused jääksoodes.....	7
1.2.1. Ekspuuteeritud alade kasutamine.....	8
1.2.2. Ekspuuteeritud alade taastamine soodena.....	9
1.3. Metaan keskkonnas	10
1.3.1. Metanogeenid	11
1.3.2. Metanotroofid	12
1.3.3. Metaani emissiooni mõjutavad keskkonnaparameetrid.....	13
1.4. Keskkonnaproovide mikroobikoosluse analüüs geenikoopiate arvu määramise abil ...	15
1.4.1. Reaalaja-PCR.....	16
1.4.2. Markergeeni kordistamiseks kasutatavad praimerid.....	17
2. MATERJAL JA METOODIKA	19
2.1. Uurimisala kirjeldus	19
2.1.1. Proovivõtu kirjeldus.....	19
2.2. DNA eraldamine ja kontsentratsiooni määramine	22
2.3. Praimerite disain ja qPCR reaktsioonitingimuste optimeerimine	22
2.4. Geenikoopiate arvu määramine turbaproovidest reaalaja-PCR meetodil	24
2.5 . Andmeanalüüs ja töö autori osalus uurimuses	25
3. TULEMUSED.....	27
3.1. Katselappide füüsikalis-keemilised parameetrid freesturbas	27
3.2. Arhede 16S rRNA ja <i>mcrA</i> geenide arvukuste määramine turbaproovidest.....	30
3.2.1. Arhede 16S rRNA ja <i>mcrA</i> geeni detekteerimiseks väljatöötatud praimerite omadused ...	30
3.2.2. Arhede 16S rRNA ja <i>mcrA</i> geeni koopiate arvukuste ning <i>mcrA</i> geeni osakaal katselappide freesturbas.....	30
3.3. Füüsikalis-keemiliste faktorite mõju 16S rRNA ja <i>mcrA</i> geeni koopiate arvukustele ning <i>mcrA</i> geeni osakaalule freesturba arhede koosluses	32
3.3.1. Geeniparameetrite seosed füüsikalis-keemiliste näitajatega päiderooga taimestatud katselappidel.....	32
3.3.2. Geeniparameetrite seosed füüsikalis-keemiliste näitajatega väetatud ja väetamata katselappidel.....	34
3.3.2.1. Geeniparameetrite seosed veetaseme ja temperatuuriga uuritud katselappide turbasambas kolm kuud peale väetamist.....	36
3.4. Metaani emissiooni seos arhede 16S rRNA ja <i>mcrA</i> geenide arvukuste ning <i>mcrA</i> proportsiooniga arhede koosluses	38
4. ARUTELU	40
KOKKUVÕTE.....	45
SUMMARY	47
TÄNUAVALDUSED	49
KASUTATUD KIRJANDUS	50
LISAD	57

SISSEJUHATUS

Turbaalad on kõige enam levinud märgalade tüüp maailmas. Need on olulised globaalse kliima mõjutajad süsinikuringe kaudu, sest neis sisaldub $\frac{1}{3}$ kogu maailma mullasüsinikust (Joosten, Clarke 2002). Turbaalade alla kuuluvad sood, kus turbakihi paksus on üle 30 cm ning selle ladestumine ei ole katkenud (Paal 2011). Inimene on soode ökosüsteeme oluliselt mõjutanud kuivenduse kaudu, mille eesmärgiks on üldjuhul põllu-, karja- ja metsamaa rajamine, turba kaevandamine või infrastruktuuri arendamine (Silvius et al. 2008).

Sooderikastes maakohtades ja isoleeritud piirkondades on kaevandatud turvas oluliseks energiaressursiks (Joosten, Clarke 2002; Silvius et al. 2008; Virtanen, Valpola 2011). Turvas on laialdaselt kasutusel ka alus- ja aiandusturbana (Basiliko et al. 2007; Paal 2011; Virtanen, Valpola 2011), sest turvas on puhas ja steriilne materjal, mis takistab taimehaiguste levikut ja parandab taimede kasvukeskkonda (Joosten, Clarke 2002; Reedik 2003). Turvast kasutatakse veel kompostimisvabrikutes, biofiltritena, isoleerimismaterjalina, tekstiilitööstuses, balneoloogias ja meditsiinis (Veski 1998; Joosten, Clarke 2002; Silvius et al. 2008; Virtanen, Valpola 2011).

Tänapäevase tehnikaga turba kaevandamisel tekivad ulatuslikud frees-jääksood (mahajäätud turbaalad), kus taimestik hävitatud ja veerežiim muudetud (Triisberg et al. 2011). Lisaks eemaldatakse kaevandamisega ka enamuse mikroobide biomassist, mis paikneb peamiselt turba ülemises kihis (Andersen et al. 2013). Seega muutuvad kaevandamise tagajärjel oluliselt ka kasvuhoonegaaside (CH_4 , N_2O , CO_2) vood, mis on otseselt seotud mikroorganismide aktiivsusega turbas (Basiliko et al. 2007).

Uuringud on näidanud, et kaevandamise tagajärjel väheneb toitainete kättesaadavus ning uue pealmise turbakihi kohati kuivemad tingimused kahandavad küll CO_2 ja CH_4 produktsiooni (Basiliko et al. 2007), kuid samas ilma ühegi taastustöota emiteerub neilt aladelt kasvuhoonegaase atmosfääri veel aastakümneid (Andersen et al. 2013). Lisaks avaldavad mahajäätud turbaväljad ümbruskonna veerežiimile negatiivset mõju, suurendavad põlengute riski, vähendavad bioloogilist ja maastikulist mitmekesisust (Paal 2011). Seepärast on vajalik antud alade taastamine soodena (Andersen et al. 2013) või keskkonnatehnoloogiline kasutamine (Mander et al. 2012).

Metaan (CH_4) on tähtsuset teine kasvuhoonegaas süsihappegaasi (CO_2) järel, mille osaks loetakse ca 18% kogu kasvuhoonegaasiefektist (Eusufzai et al. 2010). Atmosfääri emiteerunud CH_4 kogus oleneb mikroorganismide poolt toodetud metaanist (metanogeneesi) ja selle tarbimise ehk oksüdeerimise (metanotroofsus) tasakaalust (Bridgham et al. 2013).

Metanogeensed arhed viivad läbi orgaanilise aine lagundamise viimast etappi, mille produktiks on metaan. Seda vahendab ensüüm metüülkoensüüm M reduktaas, mille ühte olulist subühikut kodeerib geen *mcrA* (Juottonen et al. 2006). Tugeva konserveerumise ja spetsiifilisuse tõttu on *mcrA* geen kasutusel biomarkerina keskkonnauuringutes metanogeense koosluse uurimisel (Luton et al. 2002; Galand 2004; Juottonen et al. 2006; Freitag, Prosser 2009; Narihira, Sekiguchi 2011; Ma et al. 2012).

Kliima soojenemist mõjutavate tegurite mõistmine oleneb olulisel määral sellest, kuidas saadakse aru metanogeensete arhede seostest nende elukeskkonnaga ja mõistetakse sellest tulenevat CH₄ produktsiooni dünaamikat. Uuringud on näidanud, et metanogeensete arhede aktiivsus märgalades sõltub komplekselt füüsikalise-keemilistest tingimustest, mikroobikooslusest ja taimede liigilisest koosseisust, kuid teadmised neist mehhanismidest on piiratud (Bridgham et al. 2013). Samuti on piiratud mahajäetud turbaalade paremate kasutusvõimaluste ja nendega seotud mikroobsete protsesside uurimuste arv (Andersen et al. 2013).

Käesoleva magistritöö eesmärkideks olid:

1. Võimalikult universaalsete ja hästi töötavate arhedespetsiifiliste 16S rRNA ja *mcrA* geenide detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks mõeldud praimerite konstrueerimine ja reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) tingimuste optimeerimine Lavassaare (Pärnumaa) mahajäetud freesturba tootmisala turbaproovide analüüsiks.
2. Konstrueeritud praimerite abil hinnata päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju arhede 16S rRNA geeni koopiate arvukusele ja *mcrA* geeni koopiate arvukusele ning proportsioonile arhede koosluses turbasambas.
3. Analüüsida määratud geenikoopiate arvukusi ja proportsiooni mõjutavaid füüsikalise-keemilisi faktoreid ning hinnata geeniparameetrite seoseid metaani emissiooniga erineva töötlusega freesturba katselappidel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Sood kui ressursiallikad

Sood ei moodusta protsentuaalselt suurt osa maismaast, kuid sooderikastes piirkondades on need ökosüsteemid olulisteks inimeste mõjutajateks. Nimelt on sood inimestele materiaalselt kasulikud läbi produktsiooni-, kandja- ja regulatsioonifunktsiooni (Joosten, Clarke 2002). Produktsioonifunktsioon väljendub pakutavates ressursides nagu turba kaevandamine ja kasutamine, joogivee saamine, taimkatte ja loomastiku kasutamine, alade eksploateerimine põllu- või metsamaana. Kandjafunktsioon näitab, milleks on võimalik antud ala kasutada (näiteks veereservuaarina ja puhkealana, kalatiikidena jne). Regulatsioonifunktsioon hõlmab endas globaalset ja regionaalset kliima, hüdroloogia ja hüdrokeemia ning pinnase tingimuste regulatsiooni.

Erinevat tüüpi soode peamised kasutusvaldkonnad on olnud erinevad. Kui madal- ja siirdesoode arvelt on suurendatud metsa- ja põllumajanduslikke alasid, siis rabasid on rohkem kasutatud turba kaevandamiseks (Paal 2011). Rabade kasutamist metsanduses pärsib nende madal metsakasvatuslik väärtus. Toitainete (fosfor ja lämmastik) puudust saab parandada kuivendamise ja väetamise teel, kuid tegemist on kuluka ettevõtmisega. Rabade põllumajanduslikust kasutamisest ollakse huvitatud ainult maa nappuse korral (Valk 2005). Seega on üldjuhul rabade peamiseks ressursiks turvas.

1.1.1. Soode kuivendamine

Soode kasutusele võtmine metsa- või põllumajandusmaana kui ka turba kaevandamisalana eeldab esmalt nende kuivendamist. Selle jaoks rajatakse kinniste või lahtiste kuivenduskraavide võrgustik, mille abil alandatakse veetaset (Paal 2011).

Kuivendussüsteemide ülesandeks on luua vajalikud tingimused edasiseks olenevalt kasutuseesmärgist. Metsa- ning põllumajanduslike alade rajamisel tagatakse kultiveeritavatele taimeliikidele sobivad niiskus- ja aeratsioonitingimused ning turba kaevandamisel masinatele soodsad töötingimused. Kaevandamisele mineval alal jaotatakse kraavidega kogu ala ristkülikukujulisteks väljadeks (Alexander et al. 2008; Paal 2011). Veetaseme kõrgus ja dünaamika sõltub kraavide vahekaugusest ja sügavusest (Valk 2005).

On leitud, et esmalt toob kuivendamine esile muutused turbas ja seejärel muutub ka kogu turbaala ökosüsteemi toimimine. Turba kokkuvajumise ja mineralisatsiooni tõttu väheneb turbaala kõrgus, mis tingib esialgu järjepideva kuivenduskraavide sügavdamise (Joosten, Clarke 2002). Pärast esialgset kuivendamist eemaldatakse kaevandusväljadelt taimkate

(Alexander et al. 2008; Paal 2011). Turba kaevandamiseks sobiv niiskuse tase saavutatakse kuivendusvõrguga väljal tavaliselt 4-6 aasta pärast (Paal 2011).

Kuivendamise tagajärjel peatub turba moodustumine ja akumulatsioon ning soo teiseneb uute omadustega sekundaarseks ökosüsteemiks (Paal 2011). Uuringud on näidanud, et veetaseme alanemise tõttu toimub lisaks turba vajumisele ja mineralisatsioonile ka turbakihi lõhenemine, mis vähendab turba veesidumisvõimet. Samuti on täheldatud varem seotud ainete üleminekut liikuvasse vormi, mis soodustab toitainete emissiooni ja suurendab kasvuhoonegaaside emissiooni (Joosten, Clarke 2002).

Kuivendamine mõjutab peale kraavitatud ala enda ka selle ümbrust (Joosten, Clarke 2002; Paal 2011). Kuivenduse kaudse mõju ulatus sõltub kuivendusobjekti asukohast soos, soo suurusest ja tüübist. Sellest johtuvalt võib mõjuala moodustada 20-150% kuivendusobjekti pindalast (Paal 2011). Kuivendamisest põhjustatud füüsikalised ja keemilised muutused turbas suurendavad tundlikkust mullaerosiooni ja tulekahjude suhtes (Silvius et al. 2008).

1.1.2. Turba kaevandamine ja kasutamine

Kõik turba kaevandamise meetodid hõlmavad kuivendust ja taimkatte eemaldamist. Turvast on kaevandatud käsitsi ja mehhaniseeritult. Mehhaniseeritult toimub turbatootmine plokkurbana ja mätaste lõikamise ning freesimise teel. Viimaste puhul on vajalikud sügavamad kraavid ja süstemaatilisem kuivenduskraavide võrgustik (Alexander et al. 2008).

Peamiste kasutusvalade järgi jaguneb kaevandatav turvas kaheks. Vähelagunenud sfagnumturvas on peamiselt hinnatud aianduses kasvusubstraadina ja hästilagunenud turvas läheb valdavalt kütteks. Kui madalsoodes moodustab kasvuturvas kogu lasundi, siis rabades ainult pealmise kihi, mille all lasub kütteturvas (Ilomets 2003). Laialt kasutatavale aiandusturbale on üritatud ka asendusmaterjale leida, kuid siiani pole need piisava kvaliteediga või suurtes kogustes toodetavad turba asendamiseks (Joosten, Clarke 2002; Silvius et al. 2008).

Lisaks on turvas veel sobilik ka mitmete saasteainete eraldamiseks erinevatest reovetest. Vähelagunenud turbaga on tsingi ja vase metalliioone eemaldatud vastavalt 97-99% ja 85-100% ulatuses väävlikaevanduse nõrgveest (Ringqvist et al. 2002). Eelnevalt keemiliselt töötlemata turbaga on võimalik eemaldada veekeskkonnas olevaid orgaanilisi saasteaineid (benseen, toluen, etüülbenseen, ksüleen, isomeerid) (Costa et al. 2012).

Liigsete fosfori koguste eemaldamisel reoveest on samuti turvas osutunud efektiivseks materjaliks, sest see sisaldab suuri alumiiniumi ja raua koguseid, mis on vajalikud vahetusreaktsioonides fosfaadi sidumiseks (Kõiv et al. 2009; Xiong, Mahmood 2010).

Tehismärgalades on reovee käitlemiseks kasutatud filtermaterjali lisandina ka turvast, mille eesmärgiks on olla süsiniku allikaks denitrifitseerivale mikroobikooslusele üleliigse lämmastiku eemaldamiseks (Xiong et al. 2011).

Turba aladel kasvanud tupp-villpea (*Eriophorum vaginatum*) juurtest moodustuvad pruunid 5-20 cm pikkused kiud, mis on piisavalt pehmed tekstiilitööstuses kasutamiseks (Joosten, Clarke 2002; Korhonen 2012). Balneoloogilistel (ravimise) eesmärkidel kaevandatud turvast on kasutatud mitmetes riikides reumaatiliste haiguste, günekoloogiliste probleemide ja nahahaiguste raviks, aga samuti stressi ning taastusravi korral (Joosten, Clarke 2002; Orru jt. 2007; Orru et al. 2011). Samuti leiab turvas kasutust veel kosmeetilistes protseduurides (Orru jt. 2007; Wollina 2009) ja saunaturbana (Orru jt. 2007).

1.2. Keskkonnatingimused jääksoodes

Jääksood on kitsamalt käsitledes edasiseks masinatega kaevandamiseks ammendunud alad, kus turba jääklasundi paksus jääb enamasti alla 0,5 meetri. Jääksoode tekkeviisi ja iseloomulike omaduste põhjal eristatakse suhteliselt tasase reljeefiga frees-jääksoid ning liigendatud pinnamoega karjääri-jääksoid (Paal 2011). Viimased neist on kujunenud tükkturba kaevandamise tulemusena, kus on tehtud osaline pindmine kuivendus ning mõjutused soo ökosüsteemile on suhteliselt väikesed ja lokaalsed. Ulatuslikud frees-jääksoode alad tekkisid sügavate kuivenduskraavide ja taimkatte ning pea kogu turbakihi eemaldamise tagajärjel (Triisberg et al. 2011).

Kaevandamise tulemusel paljandunud kihid sisaldavad endas hästi lagunenuid turvast, kus on väiksem mikrobioloogiline aktiivsus ja muutlikud füüsikalised-keemilised parameetrid (Andersen et al. 2010). Pealmiseks kihiks saanud turbalasundi sügavamad kihid on halva veehoide ja -mahutavusega. Seal võib sademevesi moodustada ajutisi pinnapealseid väikeveekogusid või vooluvete võrgustikke, kuid ka kiiresti kaduda jääkturbakihi olevate lõhede kaudu, mis on kujunenud kuivenduse tagajärjel või aurustuda tuule ning temperatuuri mõjul (Paal 2011).

Pinnase- ehk vabavee tase on jääksoodes suhteliselt madal ja varieeruv (Basiliko et al. 2007). Taastamata alade veekeemia erineb märgatavalt taastatud ja looduslike turbaalade omast suurema vee aurustumise ja muutliku hüdroloogia tõttu, mis mõjutab redokstingimusi turbasambas. Enim ilmnevad erinevused vee keemilistes parameetrites kliimaatilistest tingimustest põhjustatult kesksuvel (Andersen et al. 2010).

Turba lämmastikisisaldust mõjutab turba lagunemisaste, pH, aeratsioonitingimused, mikroobne aktiivsus ja taimkatte areng (Paal 2011). Kõrgema lagunemisastmega turbas on

leitud rohkem anorgaanilist lämmastikku (Caisse et al. 2008). Vähelagunenud turbas on suurem nitraatlämmastiku sisaldus, kuid kõrge lagunemisastmega turvastes suureneb ammoniumlämmastiku kontsentratsioon. Kõrgem pH soodustab aeroobsete nitrifitseerivate bakterite aktiivsust turbas. Suhteliselt kõrge ja stabiilne lämmastiku tase püsib turbas nii kaua, kuni taimestik selle ära tarbib (Paal 2011).

Taimestik koloniseerib freesitud turbaalasid aeglaselt ja hõredalt, sest kuivematel perioodidel võib mineraalmaal asuv turbakiht täielikult läbi kuivada (Andersen et al. 2013). Samuti pärsivad tuuleerosioon ja külmakohrutus seemnete idanemist ja taimede kasvu freesitud turbaaladel (Triisberg et al. 2011). Lisaks eelnevatele põhjustele pole ka jääksoode turbakihis välja kujunenud mikroobikooslust, mis aitaks selles leiduvad toitained taimedele kättesaadavasse vormi viia (Paal 2011). Taimed kannatavad taastamata jääksoodes peamiselt fosfori puuduse käes (Andersen et al. 2010). Võrreldes frees-jääksoodega taimestuvad karjääri-jääksood iseeneslikult paremate keskkonnatingimuste tõttu oluliselt kiiremini (Triisberg et al. 2011).

1.2.1. Ekspluateeritud alade kasutamine

Jääksoo edasine kasutamine sõltub selle suurusest, seisukorrast (jääkturba paksus, turba lagunemisaste, taimede liigiline koosseis, happesus, toitainete ja toksiliste ainete sisaldus), veerežiimist (sadevee äravool, üleujutused) ja hapnikusisaldusest turbalasundis kaevandamise lõpetamisel (Paal 2011). Seepärast ei saa jääksoode edasist kasutamist otsustada üheselt (Caisse et al. 2008; Paal 2011). Mahajääatud turbaalasid on kasutatud erinevatel viisidel: põllumajandus ja marjakasvatus (Albert et al. 2011), metsastamine (Caisse et al. 2008), energiaheinakasvatus (Saarmets 2008; Värnik jt. 2011; Mander et al. 2012), turbakaevandamisala kuivendusvee puhastus (Paal 2011) ja veekogude rajamine (Higgins, Colleran 2006; Klavins et al. 2010).

Marjakasvatuste rajamisel on kultuurideks olnud jõhvikad (*Oxycoccus palustris*) ja kannasmustikad (*Vaccinium angustifolium*) (Paal 2011). Mustikaistanduste puhul on näidatud, et mahajääatud turbaväljal on kõrge saagikuse ja kvaliteedi saavutamiseks ülimalt oluline õigete väetiskoguste doseerimine (Albert et al. 2011). Marjakultuuriga kaetud jääksoosaladel hakkab teatud aja möödudes akumulieruma ka turvas (Paal 2011).

Jääksoode metsastamise eesmärkideks on peale raie veel looduslike turbaalade ümbruse mitmekesistamine ja tuulevarju rajamine (Caisse et al. 2008). Jääksoode metsastamist takistavad turba jääklasundi toitainete vähesus ja tasakaalustamatus, ebasoodne mikrokliima (hilis- ja varakülmade oht, maapinna kõrge temperatuur), mulla halb poorsus, ebasobiv

niiskusrežiim (Paal 2011). Tingimusi metsakasvatuseks saab parandada veerežiimi reguleerimisega. Samuti on väetamise vajadus vältimatu, kuid selle mõju püsib 4-6 aastat, misjärel võib vaja minna korduvväetust (Caisse et al. 2008). Metsastamiseks on soodsamad looduslikud tingimused õhukese jääkturbakihiga aladel, kus on tekkinud viljakas glei-madalsoomuld (Paal 2011).

Üheks jääksoode kasutamise võimaluseks on energianiidu rajamine katlamajades põletatava rohumassi kasvatamiseks. Põhja-Euroopas sobib päideroog energia tootmiseks tänu oma kiirele uuenemisele, suurele saagikusele ja headele põlemisomadustele (Paal 2011; Värnik jt. 2011). Päideroo kasvatamine jääksoodes aitab vähendada selle negatiivseid keskkonnamõjusid (Saarmets 2008; Mander et al. 2012). Toitainevaestes jääksoodes on energiaheina kasvatamisel oluline alasiid väetada (Paal 2011; Mander et al. 2012).

Kaevandamisega tekkinud turbatolm reostab vett heljumi ja orgaanilise ainega. Turbakaevandamisaladelt lähtuva kuivendusvee puhastamiseks on peale settebasseinide võimalik kasutada ka puhastuslodusid. Need on veepuhastuse märgalad, milleks võivad olla ka selleks kohaldatud jääksood. Jääksoid on võimalik rakendada selliste puhastusprotsesside (füüsikalised, keemilised, bioloogilised) puhul, mis vajavad hea puhastusefekti saavutamiseks pikka viibeaega (Paal 2011).

Jääksoid on muudetud ka madalapõhjalisteks järvedeks (>1 m). Pärast kaevandamist eemaldatakse suur osa turbast paljastades ka mineraalset pinda selleks, et luua järvenõgu (Higgins, Colleran 2006; Klavins et al. 2010), kuigi on ka teine meetod, mil turvast enne üleujutamist praktiliselt ei eemaldata (Higgins, Colleran 2006). Eemaldatud turvast kasutatakse järve külgnevate vallide rajamiseks. Järvevesi on madaluse tõttu hästi aereeritud ja sesoonsetele temperatuurimuutustele kergesti alluv. Jääksoojärvede veekeemia parameetrid sõltuvad oluliselt aluspõhjaks olevast turbakihi tüübist ja/või mineraalpinnast, sissetuleva vee päritolust ja veerežiimist (Higgins, Colleran 2006). Olenevalt tekitatud järvede sügavusest, suuruselt, veekeemiast ja vegetatsioonist saab neid kasutada rekreatsioonikohaks või elupaigaks veelindudele (Klavins et al. 2010).

1.2.2. Eksploateeritud alade taastamine soodena

Eksploateeritud alade taastamise eesmärgiks on taastada taimestik ja hüdroloogiline režiim võimalikult sarnaseks selle sama piirkonna looduslike soodega (Andersen et al. 2010; Juottonen et al. 2012). Taastatud turbaalad peaksid akumulerima lagunevat orgaanilist ainet, siduma atmosfäärist süsinikku, omama töötavat toitainete ringet ja suutma vastu panna sissetungivatele võõrliikidele (Andersen et al. 2010). Taastaimestamine on kaevandatud

turbaaladel tihtipeale pikaajaline protsess ja oleneb oluliselt kaevandamise meetodist (Triisberg et al. 2011). Nõrgalt kuivendatud ja käsitsi kaevandatud jääksoodes toimub taastamine ja seeläbi taimestumine oluliselt kiiremini kui suurtel tasastel ja lagedatel ning sügavate kuivenduskraavidega freesturbaväljadel (Alexander et al. 2008).

Freesturbaväljasid on taastatud nn Kanada metoodikaga (*moss transfer technique*) Kanadas (Andersen et al. 2013) kui ka Eestis (Paal 2011). Kanada metoodikas toimub taimestiku aktiivne taastamine ja taimede kasvuks sobivate stabiilsete niiskustingimuste loomine. Kuigi jääksoodesse viidud turbasambla fragmendid lähevad sobiva veerežiimi korral üsna hästi kasvama, võib soo taastumiseks kuluda 10-20 aastat (Paal 2011). Väetamisega saab tõsta fosfori sisaldust taastavatel aladel (Andersen et al. 2010). Turbakaevandamise jääkväljade taassoostamine sõltubki peamiselt veerežiimi taastamise, taimestiku rajamise ja viimaks uue turbakihi moodustumise edukusest (Basiliko et al. 2007).

Ekspluateeritud alade taastamise edukuse hindamisel omab olulist rolli seire (Andersen et al. 2010). Taastatud alade seire on näidanud, et kolme aastaga taastub vegetatsioonikiht, milles domineerib turbasammal, kuid mikroorganismide biomass taastub kauem. On leitud, et viis aastat pärast taastamist on mikroobide aktiivsus suurem ja CO₂ emiteerub rohkem taastatud aladelt võrreldes looduslike turbaaladega (Andersen et al. 2013). Suurest veetaseme kõikumisest tekkiv aeratsioon tingib uue moodustunud orgaanilise aine kiiremat lagundamist. Uus akrotelm ehk turbatekkekiht hakkab järk-järgult vähendama veetaseme kõikumisi (Andersen et al. 2010).

Taastatud ja looduslik turbaala on erinevad veekeemia poolest ka pärast mitmeid aastaid. On leitud, et veetaseme kõikumise amplituud on oluliselt suurem taastatud turbaalal, mis ilmneb selgelt kuivemates oludes suveperioodil (Andersen et al. 2010). Sellel ajal kontsentreeruvad vette näiteks Ca, Mg, Na, Cl ja ka NH₄, mis tõstavad pH-d ja suurendavad elektrijuhtivust turbas. Stabiilsete metaani tootjate ja tarbijate mikroobipopulatsiooni taastumine on samuti pärsitud kaevandatud alade hüdroloogilise režiimi ebaregulaarsusest (Andersen et al. 2013).

1.3. Metaan keskkonnas

CH₄ kontsentratsioon on üle 1775 ppb (*parts per billion*) atmosfääris (Hunger et al. 2011) ja selle sisaldus kasvab seal tõusvas trendis (Bridgham et al. 2013). Hinnanguliselt püsib metaani molekul atmosfääris 9-12 aastat (Earl et al. 2003). Ennustatakse, et CH₄ koos teiste kasvuhoonegaasidega tõstab globaalset maapinnalähedast keskmist temperatuuri 2-4,5 °C 100 aasta jooksul (Eusufzai et al. 2010).

CH₄ märgatav kasv atmosfääris on peamiselt inimtegevusest põhjustatud ning antropogeenne emissioon on ca 1,5-2,5 korda suurem looduslikust (Singh et al. 2012a). Suurimad antropogeensed metaaniallikad on kariloomad, biomassi põletamine, prügilad ja muud jäätmekäitlustehnoloogiad, fossiilsete kütuste kasutamine ja riisipõllud (Bridgham et al. 2013). Veekogude eutrofeerumine soodustab samuti CH₄ produktsiooni, sest antropogeensete tegurite tõttu lisandub vette substraati metaani tootmiseks (West et al. 2012). Ainuüksi riisipõldudelt emiteerub ca 10% globaalsest metaanist (Ma et al. 2012).

Looduslikest allikatest emiteerub enim metaani märgaladelt (27-53% maailma CH₄ emissioonist) (Hunger et al. 2011), millest suurima osa omavad troopilised märgalad (Bridgham et al. 2013). Märgaladest võib metaani eralduda difusioonil, mullidena ja/või taimede poolt vahendatud transpordi kaudu (Galand 2004; Bridgham et al. 2013). Metaani eraldub atmosfääri veel setetest (Juottonen et al. 2006), ookeanidest, mäletsejatest metsloomade ja osade putukate (termiidid) elutegevuse tagajärjel (Galand 2004). Alla 1% globaalsest metaani voost tuleb keskkonda taimede poolt vahendatud aeroobseid radu pidi (Bridgham et al. 2013).

Reovete puhastamisel metaankäätustankides püütud metaanist toodetakse energiat, mis katab osaliselt või täielikult metaani tootmiskulud ning vähendab CH₄ emissiooni atmosfääri ja seega ka globaalse soojenemise potentsiaali (Steinberg, Regan 2009). Mitmed uuringud on leidnud, et reovee puhastamiseks kasutatavates tehismärgalades on võimalik metaani emiteerimist atmosfääri kontrollida taimestamise kaudu (Truu et al. 2009).

1.3.1. Metanogeenid

Kõik teadaolevad metanogeensed mikroobid kuuluvad arhede hõimkonda *Euryarchaeota* jagunedes klassidesse *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri*. Kuus seltsi (*Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*) hõlmavad metanogeenide 33 perekonda. *Methanomicrobia* on fülogeneetiliselt ja füsioloogiliselt kõige mitmekesisem klass (Narihiro, Sekiguchi 2011). Seltsi *Methanocellales* arhed taluvad erinevalt teistest metanogeenidest paremini oksilisi (Ma et al. 2012).

Metanogeneesiks on vajalikud substraadid nagu H₂/CO₂, atsetaat, metanool ja formaat (Hunger et al. 2011) või muud metüülgruppi sisaldavad ühendid (Narihiro, Sekiguchi 2011). Toitumistüübilt saabki metanogeneene jaotada kolme rühma: hüdrogenotroofsed, atsetoklastilised ja muid metüülgruppe sisaldavaid ühendeid lagundavad (Galand 2004). Sugukonnad *Methanosaetaceae* ja *Methanosarcinaceae* kasutavad substraadina ainult

atsetaati, kuid ülejäänud metanogeenigrupid tarvivad suhteliselt laia substraadivalikut (Narihiro, Sekiguchi 2011; Angel et al. 2012; Bridgham et al. 2013). Enamustes veeökosüsteemides on tüüpiliselt domineeriv atsetoklastiline ja ombrotroofsetes rabades hüdrogenotroofne metanogenees (Bridgham et al. 2013).

Metaani tootmiseks on vajalik ensüüm metüülkoensüüm M reduktaas, mis osaleb metaani sünteesi viimases etapis ja katalüüsib koensüüm M-ga seotud metüülrühma redutseerimist (Narihiro, Sekiguchi 2011). Metüülkoensüüm M reduktaas koosneb kolmest komponendist: A, väike kofaktor B ja C. Neist komponendis C arvatakse asuvat metüüli reduktsioon ja see koosneb alaühikutest α , β ja γ , mida kodeerivad vastavalt geenid *mcrA*, *mcrB*, ja *mcrG* (Earl et al. 2003).

Mullapooride suurus, gaaside läbivus ja hüdrauliline juhtivus pinnastes määravad väga oluliselt ära metanogeenide leviku ja aktiivsuse (Frey et al. 2011). Metanogeenide arvukus ja koosluse struktuur muutub märgalade vertikaalses läbilõikes oluliselt (Galand 2004; Juottonen et al. 2006; Watanabe et al. 2010; Akiyama et al. 2011; Bridgham et al. 2013). Turbaaladel on sügavuse suurenedes täheldatud metanogeenide aktiivsuse langevat trendi (Bridgham et al. 2013).

Metanogeene on eraldatud anoksilistest keskkondadest nagu riisipõllud (Watanabe et al. 2010; Ma et al. 2012; Singh et al. 2012a), märgalad (Juottonen et al. 2006; Hunger et al. 2011; Kanokratana et al. 2011), igikelts (Simankova et al. 2003; Shcherbakova et al. 2011), prügilad (Luton et al. 2002), setted (West et al. 2012; Meslé et al. 2013), mäletsejate magu (Wright et al. 2008; Singh et al. 2012b). Metanogeene rakendatakse metaantankides suure hulga orgaanilisi ühendeid sisaldavate munitsipaal-, põllumajandus- ja tööstusreovete puhastamiseks, mille käigus toodetakse metaani kui taaskasutatavat energiaallikat (Steinberg, Regan 2008).

1.3.2. Metanotroofid

Metaani oksüdatsioon toimub keskkonnas enamasti aeroobsete bakterite (metanotroofid) või anaeroobse koosluse (metanotroofsed arhed ja väävlit või nitraati redutseerivad bakterid) osavõtul (Wendlandt et al. 2010). Olenevalt tingimustest kasutatakse 10-90% toodetud metaanist metanotroofide poolt ära enne atmosfääri jõudmist. Metanotroofid on võimelised teatud tingimustes CH_4 atmosfäärist siduma (Semrau et al. 2010).

Metanotroofid kasutavad gaasilist metaani elektrondonorina ja süsinikuallikana, mille juures on hapnik elektronaktseptoriks (Wendlandt et al. 2010). Metanotroofid jagunevad kahte bakterite hõimkonda *Proteobacteria* ja *Verrucomicrobia* (Andersen et al. 2013). *Proteobacteria*

hõimkonnas eristatakse füsioloogia, biokeemia ja morfoloogia alusel kaht rühma: tüüp I ja tüüp II, kus esimene neist jaguneb veel omakorda alatüüpideks Ia ja Ib (Ho, Frenzel 2012). Tüüp I metanotroofsed bakterid on arvukad kõrge hapniku- ja madala metaani kontsentratsiooniga tingimustes ning vastupidistes oludes on eelisseisus tüüp II metanotroofid (Truu et al. 2009).

Enamikul metanotroofidel on metaani oksüdeerimise esimene etapp vahendatud ensüüm monooksügenaasi (MMO) poolt (Akiyama et al. 2011). MMO on võimeline oksüdeerima ka teisi orgaanilisi ühendeid (alkaanid, metaanasendatud derivaadid, alkeenid, eetrid, aromaatsed ja heterotsüklised süsivesinikud). Olenevalt keskkonna vase kontsentratsioonist ja Cu omastamisest rakkude poolt sõltub, kas MMO on rakus lahustunud kujul ehk sMMO (*soluble MMO*) või membraaniga seotult ehk pMMO (*particulate MMO*) (Wendlandt et al. 2010).

Metanotroofid on laialt levinud vees ja muldades (Wendlandt et al. 2010). Metanotroofide levikut, aktiivsust ja arvukust mõjutavad tegurid on niiskussisaldus, temperatuur ning CH₄, lämmastiku ja vase kontsentratsioon (Semrau et al. 2010). Kui alatüübis Ia on üldiselt meso- või psührofiilsed bakterid, siis alatüübis Ib on termotolerantsed ja termofiilsed bakterid. Siiski eelistavad tüüp I metanotroofid madalamaid temperatuure võrreldes ka kuumastressile paremini vastu pidavate tüüp II metanotroofidega (Ho, Frenzel 2012).

Metanotroofseid baktereid on uuritud prügilates, mageveejärvedes, põllumaadel, igikeltsal (Wendlandt et al. 2010), aga ka turbaaladel (Akiyama et al. 2011) ja riisipõldudel (Ho, Frenzel 2012; Singh et al. 2012a). Metanotroofseid baktereid on kasutatud biotehnoloogia valdkonnas saastatud alade bioremediatsioonis ja biosünteesil (biolaguneva plasti tootmine ja bioproteiinide tootmine loomasöödaks) (Semrau et al. 2010; Wendlandt et al. 2010).

Anaeroobne metaani oksüdatsioon (AOM, *Anaerobic oxidation of methane*), kus kasutatakse hapniku asemel alternatiivseid elektronaktseptoreid, võib vähendada metaani emissiooni atmosfääri 5-20% (Wendlandt et al. 2010). Fülogeneetiliselt metanogeenidega lähedalt seotud AOM-i arhedest on leitud metüülkoensüüm M reduktaasi (Mcr) sarnane valk (Steinberg, Regan 2008). 16S RNA geeni võrdlus näitas, et AOM-i arhed on geneetiliselt lähedased seltside *Methanomicrobiales* ja *Methanosarcinales* metanogeenidele (Wendlandt et al. 2010). Anaeroobsel CH₄ oksüdatsioonil võidakse ära kasutada üle 90% mereökosüsteemides toodetud metaanist (Bridgham et al. 2013).

1.3.3. Metaani emissiooni mõjutavad keskkonnaparameetrid

Oksilised ja anoksilised tingimused mõjutavad oluliselt süsinikuringet keskkonnas, sest metanogeenid on ranged anaeroobid ja metanotroofid on enamasti aeroobid (Akiyama et al.

2011). Metanogeensed arhed produtseerivad pea kogu Maa biogeense metaani (Angel et al. 2012). Metaani tootmine sõltub metanogeenide arvukusest ja aktiivsusest, taimede biomassist ja ammooniumi (NH_4^+) kontsentratsioonist mullas. Taimed mõjutavad juureeritiste kaudu metanogeenide mitmekesisust ja kõik metanogeenid kasutavad NH_4^+ lämmastikuallikana (Singh et al. 2012a). Metanogeneesi võivad pärssida orgaanilise materjali kogus ja kvaliteet, madal mulla pH ja alternatiivsete elektronaktseptorite olemasolu keskkonnas (Angel et al. 2012). On leitud, et metanogeneesiks vajalike substraatide olemasolu keskkonnas sõltub oluliselt olemasolevast bakterikooslusest (Singh et al. 2012a).

Uuringud on näidanud, et makropooride ruumala vähesus ja vee infiltratsiooni pärsitus muldades takistab aeratsiooni ja soodustab anaeroobsete protsesside toimumist ning mõjub positiivselt metanogeenide arvukusele (Frey et al. 2011). On leitud, et metanogenees on täielikult inhibeeritud hapniku juuresolekul nii puhaskultuuride puhul kui ka muldades. Siiski suudavad metanogeenid hapnikust tingitud stressitingimusi üle elada (Angel et al. 2012). Nimelt on metanogeene detekteeritud ka ülemistest, hästi aereeritud mullakihtidest põllumaadelt, metsadest ja rohumaadelt (Frey et al. 2011; Angel et al. 2012). Samuti suudavad metanogeensed organismid üle elada mõõdukat kuivendust või aeratsiooni riisipõldude mullas (Ma et al. 2012) ning olla aktiivsed isegi veega täidetud anaeroobsetes mikropoorides (Andersen et al. 2013).

Metaani produktsioon on oluliselt pärsitud seni, kuni keskkonnast on eemaldunud peale molekulaarse hapniku ka nitraat, raud(III), mangaan(IV) ja sulfaat (Frey et al. 2011), mis muidu konkureeriksid alternatiivsete elektroniaktseptoritena metanogeneesiga (Angel et al. 2012). Ma et al. (2012) leidsid, et riisipõldudel vahelduv drenaaž (kuivad/märjad tsüklid) pärssis oluliselt metaani produktsiooni ja vähendas emissiooni võrreldes kestva üleujutusega, ehkki samal ajal metanogeenne kooslus ei muutunud. Nimelt muutus metanogeenide metaboolne aktiivsus tugevalt lühiajalisest aeratsioonist põhjustatud redokstingimuste muutuse ning raud(III) ja sulfaadi kontsentratsioonide suurenemise tõttu.

Metanogeenid toodavad metaani nii külmades kui ka happelistes looduslikes keskkondades (tundra, turbaalad, järvesetted) (Steinberg, Regan 2008; Steinberg, Regan 2009), kuid siiski emiteerivad ka sood põhjapoolsetel laiuskraadidel enamuse metaanist soojematel kuudel (Juottonen et al. 2008). Talvel võib emissioon olla 4-33% aastasest metaanivoost (Juottonen et al. 2008), mil temperatuurid on sobivad psührotolerantsetele või aktiveeruvad psührofiilsed metanogeensed arhed (Simankova et al. 2003). Temperatuur mõjutab metanogeensete arhede kooslust nii otseselt kui ka kaudselt substraadi kättesaadavuse muutmise kaudu. Lisaks sellele

sõltub soodes CH₄ produktsioon veel peamiselt veetasemest ja turba pH-st (Juottonen et al. 2008).

1.4. Keskkonnaproovide mikroobikoosluse analüüs geenikoopiate arvu määramise abil

Looduskeskkonnas on mikroorganismidest vähem kui 1% kultiveeritavaid liike (Torsvik, Øvreås 2002). Seetõttu on oluline keskkonna mikrobiökoloogia uurimiseks kasutada molekulaarseid meetodeid, kus analüüsi kaasatakse ka mittekultiveeritavaid liike (Steinberg, Regan 2008; Smith, Osborn 2009; Hargreaves et al. 2013). Nende meetodite puhul eraldatakse esmalt proovist nukleiinhapped (DNA, RNA), mille järel on võimalik märklaudgeenide koopiate arvukusi määrata järjestusspetsiifiliselt polümeraasi ahelreaktsiooni meetoditega (Sharma et al. 2007).

Uuritavas proovis sisalduvate geenikoopiate kvantifitseerimiseks on välja töötatud kolm polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevat meetodit: piirlahjendustel põhinev PCR (MPN-PCR), konkureeriv PCR (cPCR) ja reaallaja-PCR (qPCR) (Sharma et al. 2007; Smith, Osborn 2009). Neist kolmest on oma praktilise lihtsuse ja kiiruse tõttu kõige laialdasemalt kasutusel viimane (Smith, Osborn 2009; Hargreaves et al. 2013).

Reaallaja-PCR-i abil on võimalik detekteerida ja määrata erinevate taksonoomiliste ja funktsionaalsete geenide hulka erinevates keskkonnaproovides (Smith, Osborn 2009; Nölvak et al. 2012; Hargreaves et al. 2013). Selle meetodiga on uuritud mitmesuguste keskkonnategurite (toitained, hapniku kontsentratsioon, pH, reoained, agrokemikaalid, veesisaldus ja temperatuur) mõju erinevate geenide arvukusele ja ekspressioonile mullas (Sharma et al. 2007). Reaallaja-PCR-i on kasutatud arhede üldkoosluse ja metanogeenide uurimiseks märgalades (Juottonen et al. 2008; Kim et al. 2008; Akiyama et al. 2011; Juottonen et al. 2012), riisipõldudel (Eusufzai et al. 2010; Ma et al. 2012; Singh et al. 2012a), setetes (Colwell et al. 2008; Swan et al. 2010), kuivades mullades (Angel et al. 2012), mäletsejate maos (Singh et al. 2012b), reoveepuhastites (Nunoura et al. 2008; Shin et al. 2010).

Kuna geenikoopiate arv ei ole üks-üheselt seotud rakkude arvuga, siis ei võimalda see näitaja rakkude arve keskkonnas täpselt määrata (Vianna et al. 2006; Kim et al. 2008; Freitag, Prosser 2009; Ince et al. 2010; Swan et al. 2010). Arhede 16S rRNA geenikoopiate arv varieerub eri liikide mikroobirakkudes ühest neljani (Vianna et al. 2006), kuid kirjanduses võib leida keskmiseks geenikoopiate arvuks üks (Swan et al. 2010; Meslé et al. 2013) või ka 1,5 koopiat rakus (Ince et al. 2010; Swan et al. 2010). Metanogeenidel varieerub *mcrA* geenikoopiate arv kuni kaheni rakus (Vianna et al. 2006; Freitag, Prosser 2009), kuid

enamasti loetakse geenikoopiate ja rakkude arv võrdseks (Kim et al. 2008; Freitag, Prosser 2009; Meslé et al. 2013).

1.4.1. Reaalaja-PCR

Reaalaja-PCR (qPCR) on robustne, korratav ja tundlik meetod, mis võimaldab produkti moodustumist jälgida protsessi käigus (reaalajas) (Smith, Osborn 2009). Reaktsioonil tekib pidev mõõdetav signaal (fluorestsentssignaal), mille intensiivsus sõltub otseselt toodetava amplikoni kogusest. Amplifikatsiooni efektiivsuse abil saab arvutada algse märklaud DNA (RNA) fragmentide arvukuse proovis (Kubista et al. 2006). Amplifikatsiooni efektiivsus sõltub suuresti uuritava geeni nukleotiidide järjestusest ja qPCR-is kasutatavast reaktsioonisegust (Nölvak et al. 2012).

qPCR-is toimub arvukalt tsükleid. Igas tsüklis esmalt denatureeritakse DNA matriits, seejärel praimerid seonduvad spetsiifiliselt DNA üksikahelalisele järjestusele, millele järgneb DNA polümeraasi poolt vahendatud komplementaarse ahela pikendamine (Smith, Osborn 2009). Algustsükli puhul on produktide emiteeritud fluorestsentssignaal nõrk (Kubista et al. 2006). Andmed on kasutatavad analüüsiks, kui signaal ületab piisavalt taustamüra, mida näitab lävemejoon (Sharma et al. 2007). Selle ületamiseks vajalikku tsükli arvu nimetatakse tsükliilävemeks (CT). Mida rohkem sihtmärkmolekule on mõõdetavas proovis, seda kiiremini on akumulunud produkti võimalik detekteerida ja seda madalam on CT väärtus (Kubista et al. 2006; Smith, Osborn 2009).

Produkti akumulereerimisel signaal kasvab eksponentsiaalselt. Lõpuks jõuab signaal platoole ja küllastub mõne olulise reaktsioonikeskkonna komponendi ammendumisel (praimerid, reporter, dNTP – nukleotiid trifosfaadid) (Kubista et al. 2006). Keskkonnaproovides kasutatakse pigem fluorestseeruva reporterina SYBR Green I, mille puhul saab kvaliteetse andmestiku ning kõrgemad ja stabiilsemad amplifikatsiooni efektiivsused (Nölvak et al. 2012). Amplifikatsiooni efektiivsust võivad mõjutada ka proovis sisalduvad inhibiitorid (valgud, soolad, fenoolsed ühendid jne), mille tõttu puhastatakse proove eelnevalt inhibeerivate ainete vähendamiseks (Kubista et al. 2006; Hargreaves et al. 2013).

Märklaudgeenide koopiate arvud uuritavates proovides arvutatakse vastavat geenifragmenti sisaldavast standardlahusest valmistatud ja analoogselt proovidega analüüsitud lahusterea kaliiberkõveraaid kasutades (Smith, Osborn 2009). Reaalaja-PCR-i meetodi kasutamisel on palju eeliseid: korratavus, täpsus, spetsiifilisus, tundlikkus (madal detekteerimise lävi), amplifikatsiooni efektiivsus, võimalus määrata erinevaid järjestusi samas proovis korraga, kiirus. Samas esineb reaalaja-PCR-il ka mõningaid puudusi: vajalik on spetsiaalse aparatuuri

ja tarkvara olemasolu, vajadus spetsiifiliste oligonukleotiidide järele, amplikoni pikkuse limitatsioon (Sharma et al. 2007).

1.4.2. Markergeeni kordistamiseks kasutatavad praimerid

Markergeeni kordistamise tõhusus sõltub olulisel määral amplifikatsiooni reaktsioonis kasutatavatest praimeritest (Juottonen et al. 2006; Narihiro, Sekiguchi 2011; Nõlvak et al. 2012; Hargreaves et al. 2013). Töötavaid primereid on võimalik disainida ainult geeni konserveerunud piirkondadesse (Galand 2004). Amplifikatsiooni efektiivsust mõjutavad sulamistemperatuurid, GC sisaldus (*GC content*) ja nukleotiidsed asendused praimerid järjestuses (kõdupositsioonid) (Hargreaves et al. 2013).

Üks olulisemaid praimerid omadusi on universaalsus markergeeni suhtes, mis mõjutab otseselt PCR-i põhiseid uurimusi (Galand 2004; Steinberg, Regan 2008). Vähesel universaalsusel korral on võimalik kasutada mitmeid praimeripaare, mis kataksid ära kogu koosluse mitmekesisuse (Galand 2004), kuid siis võib osutada probleemiks ülekattvus. Praimerite järjestustes olevate nukleotiidide modifitseerimisega on võimalik tõsta praimerite universaalsust. Lisaks võib olla positiivne efekt universaalsusele ka konserveerunud piirkondade praimerite järjestuste pikendamisel või lühendamisel mõne nukleotiidi võrra. Samas on hea, kui ei ole kõdupositsioone praimerite alguses ja lõpus, mis tekitavad probleeme praimerite seondumisel märklaujärjestustele (Steinberg, Regan 2008).

Praimerid disainil peab jälgima, et ei tekiks praimer-dimeere, mis põhjustavad mittespetsiifiliste amplifikatsiooniproduktide tõttu samuti ülehindamist fluorestsentssignaali kaudu. Selleks tuleb vältida üksteise suhtes komplementaarsete praimerite kasutamist (Sharma et al. 2007; Smith, Osborn 2009). Töötavate päri- ja äraspidiste praimerite sulamistemperatuurid peavad olema sarnased (Steinberg, Regan 2008). Ka kasutatav qPCR-i programm mõjutab oluliselt kvantifitseerimise tulemusi (Nõlvak et al. 2012).

Tabelis 1 on toodud arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimiseks kasutatavate päri- ja äraspidi praimerite olulisemate karakteristikute (universaalsused järjestuste andmebaaside põhjal, kõdupositsioonid arv praimerjärjestuses, praimeripaaride abil amplifitseeritavate fragmentide pikkused) kokkuvõtte teaduskirjanduses kasutatud praimerite põhjal. Nagu tabelist on näha, siis arhede 16S rRNA geeni ja *mcrA* geeni analüüsil on kasutusel väga erineva universaalsusega praimerid ja nende abil amplifitseeritud geenifragmentide pikkused erinevad suures ulatuses. Arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimiseks kasutatavad praimerid peaksid olema eelkõige võimalikult universaalsed (vastama kordistatava geeni erinevatele järjestustele), 100-

400 nukleotiidi pikkusega DNA lõike amplifitseerivad ja kõrge amplifitseerimise efektiivsusega.

Tabel 1. Ülevaade teaduskirjandusest leitud ja kasutusel olnud 16S rDNA ning *mcrA* praimeritest.

Märklau- järjestused	Praimerid	Praime- rite arv	Universaalsused andmebaasidest (%)	Kõdu- positsioonide arv	Fragmentide pikkused (bp)	Viited
16S rDNA (arhed)	päripidine	7	55,20-94,01*	1-5	70-660	Lima, Sleep 2007; Shin et al. 2010; Akiyama et al. 2011; Gantner et al. 2011; Pires et al. 2012; Yergeau et al. 2012; Meslé et al. 2013
	äraspidine	8	58,40-97,06*	0-4		
<i>mcrA</i>	päripidine	12	0,07-36,83**	0-8	100-760	Galand 2004; Juottonen et al. 2006; Colwell et al. 2008; Nunoura et al. 2008; Steinberg, Regan 2008; Pereyra et al. 2010; Yagi et al. 2010; Akiyama et al. 2011; Hunger et al. 2011; Kanokratana et al. 2011; Narihiro, Sekiguchi 2011; Angel et al. 2012; Ma et al. 2012; Nyssönen et al. 2012; West et al. 2012
	äraspidine	11	0,91-56,91**	3-5		

*The Ribosomal Database Project (RDP) (seisuga 20.12.2012)

**Functional Gene Pipeline/Repository (FGPR) (seisuga 20.12.2012)

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Uurimisala kirjeldus

Uurimisalaks oli Lääne-Eesti madalikul asuv Lavassaare soo. Selle Pärnumaal oleva ühe Eesti suurima soo pindala on 21868 ha, millest moodustab 19746 ha turbamaardla (Orru, Orru 2003). Lavassaare soo tekkis magedaveelise laguuni kinnikasvamisel, mis eraldus Litoriinamerest. Soo toitub sademetest ning ka põhja- ja valgveest. Kohati on turba all õhuke 0,1-0,2 m paksune järvemudakiht. Turvas ja järvemuda lasuvad liivsavil, saviliival ja liival. Lavassaare soostikus domineerib lageraba (50-60%). Soostikus asuvad ka 196 ha suurune järv ja mõned mineraalmaasaared. Soo servaala ääristab madalsoomets (Orru 1995).

Lavassaare soos on turvast kaevandatud üle 90 aasta, mille tõttu on seal palju jääksooalasi. 2006. aastal alustati ca 230 ha suurusel Lavassaare ammendunud turbatootmisväljal ettevalmistusi energiaheina kasvatamise katsetamiseks. Rajati kahe päideroo (*Phalaris arundinacea*) sordiga „Pedja“ ja „Palaton“ taimestatud katsealad, millest osa väetati erinevate mineraalsete ja orgaaniliste väetistega ning ülejäänud jäid väetamata kontrollaladeks (Saarmets 2008; Värnik jt. 2011).

ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni (FAO, *The Food and Agriculture Organization of the United Nations*) mulla klassifikatsiooni järgi oli käesoleva töö uurimisalal vähelagunenud turvasmuld (Fibric Histosol), kuid freesimise tõttu on paljandunud hästi lagunenud pilliroo-tarnaturvas (lagunemisaste on von Posti skaala järgi H7). Freesturbaalal oli lahtine kuivenduskraavide võrgustik. Kraavide tihedus on ca 400 m hektaril. Jääksooalal toimub mineraalirikka põhjavee immitsemine lubjasest põhjast ning lähedal olevast moreenseljandikult (Mander et al. 2012).

2.1.1. Proovivõtu kirjeldus

12 katselappi suurusega 2,5 x 10 m rajati 2012. aasta juunis Lavassaare freesturbaala varem väetamata kolmele päiderooga taimestatud laamile (2006. aastal rajatud väetamata kontrollalad taimestatud Eesti sordiga „Pedja“) ning kolmele taimestamata freesturba laamile (joonis 1) nii, et turbakihi sügavus mineraalse pinnani oleks kogu katselapi ulatuses 50-60 cm. Igale väljavalitud laamile rajati üks väetatud katselapp ning üks väetamata kontrolllapp. Katselapid asetsesid kuivenduskraavidest ca 4 meetri kaugusel, kaugus kontrolli ja väetatud lapi vahel oli vähemalt 4 m. Kraavid olid kogu katseperioodi vältel erinevalt veega täitunud. Katselappidest pooled väetati mineraalväetisega (30 kg/ha), milles oli kokkusegatult toitaineid suhtega 24N-6P-12K. Vajamineva väetise kogus ja toitainete suhted määrati uurimisala turba testproovide keemilise koostise alusel.

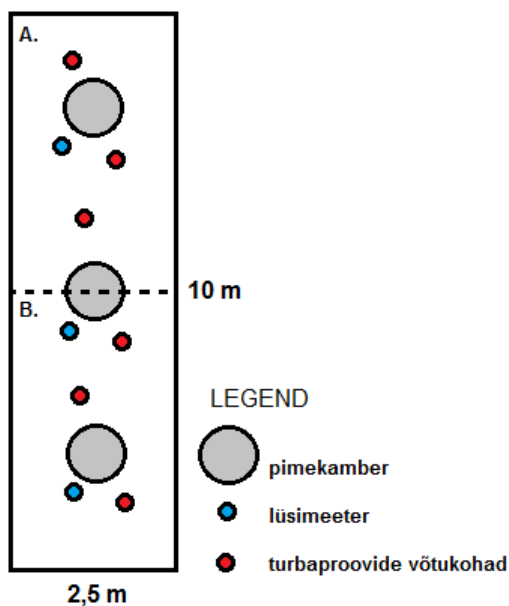


Joonis 1. Käesoleva töö uurimisala asukoht ($58^{\circ}34'20''$ N ja $24^{\circ}23'15''$ E, Lavassaare/Pärnumaa) ja katselappide paigutus (Maa-amet). Freesturbaala katselappidest on 1-6 taimestatud päiderooga, nende hulgas 1, 4, 6 on väetamata ning 2, 3, 5 on väetatud. Freesturbaala katselappidest on 7-12 taimestamata, nende hulgas 7, 10, 12 on väetamata ning 8, 9, 11 on väetatud.

Turbaproovid võeti 20. juunil 2012. aastal vahetult enne katselappide väetamist ning 3 kuud peale väetamist 20. septembril 2012 (joonis 2). Turbaproovide võtmiseks jagati iga katselapp veel kaheks võrdseks alaks (joonis 3). Mõlemalt alalt võeti turbapuuriga (\varnothing 5 cm) kolm puuri südamikku täit läbi turbakihi kuni mineraalse savikihini. Võetud kolmest südamikust koguti koondproovid kilekottidesse eraldi (0-20 cm, 20-40 cm ja 40-60 cm kihtidest). Mõlemal proovivõtu korral võeti 72 turbaproovi (kokku 144 proovi). Proove hoiti kuni laborisse jõudmiseni külmakamadega jahekastides.



Joonis 2. Päiderooga taimestamata ja väetatud freesturba katselapp kolm kuud peale väetamist (20.09.2012, foto Järvi Järveoja).



Joonis 3. Vee-, gaasi- ja turbaproovide võtukohtade skeem katselappidel. Turbaproovide võtmiseks jagati iga katselapp kaheks võrdseks alaks (A ja B) ja kummastki võeti kihtide (0-20, 20-40, 40-60 cm) kaupa kolmest kohast alaproovid, mis segati kokku koondproovideks.

Laboris eraldati mikrobioloogiliste uuringute jaoks ca 50 g materjali, mida hoiti kuni DNA eraldamiseni $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Lisaks sellele eraldati 100 g materjali, mida hoiti $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures kuni füüsikalise-keemiliste parameetrite määramiseni OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu filiaalis. Turbaproovidest määrati järgmised füüsikalise-keemilised parameetrid: kuivaine sisaldus (KA%); pH- H_2O ; üldsüsiniku (TC) sisaldus autoanalüsaatoriga; üldlämmastiku kontsentratsioon (TN) Kjeldahli meetodil; üldfosfori (TP), üldkaaliumi (TK), üldväävlü (TS) ja Ca^{2+} sisaldus ICP meetodil; lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC), ammoniumlämmastiku (NH_4^+ -N), nitraatse lämmastiku (NO_3^- -N), nitritlämmastiku (NO_2^- -N), fosfaatse fosfori (PO_4^{3-} -P) ja sulfaatiooni (SO_4^{2-}) kontsentratsioon.

Kõigilt proovialadelt koguti metaani proove kogu katseperioodi vältel nii enne väetamist kui ka pärast väetamist (esimesel kuul iganädalaselt, hiljem kahe nädalaste intervallidega) pimekambri meetodil (kolmest kambrit iga katselapi kohta) (joonis 4). Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudi Geograafia osakonna laboris määrati kogutud gaasiproovidest metaani kontsentratsioon gaaskromatograafia Shimadzu GC-2014 (Shimadzu Corporation, Jaapan). Lisaks fikseeriti temperatuur turbasamba eri kihtides (10, 20, 30, 40 cm) ning mõõdeti veetaseme kõrgus lüsimeetrites. Kohapealsed mõõtmised teostasid ja gaasiproovid kogusid Tartu Ülikooli teadur Martin Maddison ja doktorant Järvi Järveoja.



Joonis 4. Päiderooga taimestatud katselapil metaani proovide kogumine pimekambri meetodil (20.09.2012, foto Järvi Järveoja).

2.2. DNA eraldamine ja kontsentratsiooni määramine

Turbaproovidest DNA eraldamiseks kasutati *PowerSoil[®] DNA Isolation Kit*-i (MO BIO, USA). DNA eraldamine toimus vastavalt tootja poolt ette nähtud protokollile. Modifitseeritud toimus homogeniseerimisetapp, mis viidi läbi 20 sekundi jooksul (5000 pööret minutis) homogenisaatoril Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). DNA kontsentratsiooni suurendamiseks modifitseeriti ka filtrist DNA välja pesemise etappi. Esmalt lisati 60 µl C6 standardlahust filtrile ja tsentrifugeeriti 30 sekundit (kõik tsentrifugeerimised toimusid 10000 x g juures toatemperatuuril). Seejärel kanti filtri läbinud lahus uuesti filtrile ja tsentrifugeeriti 30 sekundit. Lõpuks lisati 40 µl C6 lahust filtrile ja tsentrifugeeriti 30 sekundit. Saadud DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga Infinite 200 M (Tecan AG, Austria). DNA säilitati –20 °C juures.

2.3. Praimerite disain ja qPCR reaktsioonitingimuste optimeerimine

Kirjanduse ülevaates toodud tingimustele vastavate arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimiseks kasutatavate praimerite ja nende paaride leidmiseks tehti järgnevad toimingud:

1. Töö teaduskirjandusega

Arhede üldkoosluse ja metanogeensete arhede detekteerimise jaoks leiti teadusartiklitest hulganisti kasutusel olnud praimereid (tabel 1). Kuna nõutavatele tingimustele vastavaid

praimereid kirjandusest ei leitud, siis modifitseeriti geenijärjestuste konserveerunud piirkondadele vastavad uued praimeripaarid.

2. Referentsandmebaaside koostamine ja nende järjestuste joondamine

Andmebaasi National Center for Biotechnology Information (NCBI) põhjal koostati 16S rRNA geeni jaoks 17 järjestusega referentsandmebaas, kus olid esindatud 1195-1500 nukleotiidi pikkuste järjestustega kõik arhede hõimkonnad (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeotes*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Thaumarchaeota*). NCBI ja Functional Gene Pipeline/Repository (FGPR) andmebaaside (kummastki 6 järjestust) põhjal tehti *mcrA* geeni jaoks 12 järjestusega referentsandmebaas, kus olid esindatud 1014-1253 nukleotiidi pikkused järjestused erinevatest metanogeenide seltsidest. FASTA-formaadis olevad järjestused referentsandmebaasides joondati programmiga CLUSTAL 2.1.

3. Praimerite positsioonide leidmine joondusel ja nende piirkondade analüüs

Teaduskirjanduses kirjeldatud praimerite alusel välja tulnud konserveerunud piirkonnad märgiti referentsandmebaasidest tehtud vastavate järjestuste joondustele. Kui mitu konserveerunud piirkonda paigutus ühte piirkonda joondusel, siis eelistati edasiseks analüüsiks neid, mis ühtisid joondatud referentsandmebaasi järjestustega paremini ja millel oli suurem universaalsus andmebaasides RDP või FGPR vastavate järjestuste suhtes ning mille järjestuses tuli kasutada vähem kōdupositsioone.

4. Praimerite modifitseerimine ja nende omaduste kindlaks tegemine

Eeltoodud analüüsi järel valiti välja sobiliku pikkusega geenifragmente amplifitseerivate praimeripaaride positsioonid joonduste konserveerunud piirkondades. Nendele piirkondadele vastavate praimerite nukleotiidide järjestusi modifitseeriti vastavalt jooduste järjestustele, mille abil saavutati praimerite parem katvus (universaalsus) andmebaasis olevatele järjestustele. Programmiga OligoAnalyzer 3.1 määrati uute modifitseeritud praimerite sulamistemperatuurid (päri- ja äraspidise praimerisulamistemperatuuride vahe peaks jääma alla 5 °C), juuksenõela moodustumise temperatuurid ja nende võime moodustada homodimeere selleks, et amplifitseerimise käigus ei tekiks soovimatuidprodukte.

5. Leitud uute potentsiaalsete praimeripaaride analüüs

Uutest praimeritest sai moodustada 11 praimeripaari arhede üldkoosluse ja 8 praimeripaari metanogeensete arhede detekteerimiseks. RDP andmebaasis sai kontrollida universaalsust ka praimeripaaridena. Arhede 16S rRNA geeni testimiseks laboris valiti välja kolm praimeripaari, mille universaalsused olid 87,4-91,3% (praimerite universaalsused eraldi olid 92,1-96,5%), fragmentide pikkused olid 241-393 nukleotiidi ja sulamistemperatuuride vahed olid 0,3-3,3 °C. *mcrA* testimiseks laboris valiti välja neli praimeripaari, mille praimerite

universaalsused eraldi olid 46,8-85,7%, fragmendi pikkused olid 135-386 nukleotiidi ja sulamistemperatuuride vahed olid 0,4-4,1 °C.

6. Praimeripaaride testimine laboris ja qPCR reaktsioonitingimuste optimeerimine

Välja töötatud praimeripaare testiti laboris qPCR-i reaktsioonis erinevat tüüpi mulla proovidega (erineva lagunemisastmega ja lagunemata turba proovid, põllumullad, tehismärgalade filtermaterjaliks olev kergkruus). Kõikide praimeripaaride reaktsioonitingimused optimeeriti tsükliläveme (CT) väärtuste, amplifikatsiooni efektiivsuste ja programmi tsüklites oleva seondumisetapi temperatuuride muutmise abil ning kõige väiksema CT ja kõrgema efektiivsusega praimeripaar valiti mõlema geeni detekteerimiseks (tabel 2). Lõpuks optimeeriti praimeripaaride kontsentratsioon reaktsioonisegus turbaproovidega töötamiseks.

Tabel 2. Töös kasutatud 16S rDNA ja *mcrA* praimerid ning nende järjestused.

Praimer	Märklaud-järjestused	Järjestus (5'-3')	Universaalsus andmebaasidest (%)	Kõdu-positsioonid	Fragmendi pikkus (bp)
Arc519F	16S rDNA	CAGYCGCCRCGGTAA*	96,45**	2	393
Arch 910R		GAATWGGCGGGGGRGC*	93,06**	2	
METH-F	<i>mcrA</i>	CASTTYGGHGGWTCHCA*	67,86***	5	135
mcrAqR		TTCTWYGGHTACGAYCTBCA*	64,62***	5	

*Kõdupositsioonide tähistused: Y = C/T; R = A/G; W = A/T; S = G/C; H = A/C/T; B = C/G/T

**The Ribosomal Database Project (RDP) (seisuga 20.12.2012)

***Functional Gene Pipeline/Repository (FGPR) (seisuga 20.12.2012)

2.4. Geenikoopiate arvu määramine turbaproovidest reaallaja-PCR meetodil

Arhedespetsiifilise 16S rRNA geeni ja *mcrA* geeni koopiate arvu määramiseks kasutati termotsüklerit Rotor-Gene Q (QIAGEN, Holland). Vastavate geenide kaliiberkõverate tegemiseks kasutati arhede 16S rRNA geeni puhul *Desulfurococcus sp.* (NCBI EF088324.1) geeni fragmenti ja *mcrA* puhul *Methanobacterium sp.* (NCBI DQ677519.1) geeni fragmenti, mis telliti firmast Eurofins MWG Operon (Saksamaa). Arhede 16S rRNA geeni puhul tehti vastavat geenifragmenti sisaldavatest standardlahustest valmistatud lahustereast kaliiberkõver (kümnekordsed lahjendused 10^3 - 10^9 geenikoopiat mikrolitris). Ka *mcrA* geeni puhul tehti vastavat geenifragmenti sisaldavatest standardlahustest valmistatud lahustereast kaliiberkõver (kümne- ja viiekordsed lahjendused 10^3 - 10^9 geenikoopiat mikrolitris). Mõlema geenianalüüsi puhul valmistati kaliiberkõver sarnastes reaktsioonitingimustes ja sama qPCR-i programmiga kui järgnev proovide analüüs.

Arhedespetsiifilise 16S rRNA geeni ja *mcrA* geeni koopiate arvu määramisel viidi PCR-i reaktsioon läbi 10 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 1 µl proovi DNA-d. Siduva proovina

kasutati kaliibri üht lahjendust, mida 10 µl reaktsioonisegus oli 1 µl. Antud töös kasutati 16S rRNA puhul kaliibri lahjendust 10⁵ geenikoopiat/µl ning *mcrA* puhul kaliibri lahjendust 10⁵ geenikoopiat/µl. Praimereid oli reaktsioonisegus 0,3 µM kontsentratsioonis 16S rRNA puhul ja 0,4 µM kontsentratsioonis *mcrA* puhul (tabel 2). Kõiki proove ja kaliiberlahuseid mõõdeti kolmes korduses.

16S rDNA praimeritega kasutati programmi parameetritega: esmalt 50 °C 2 minutit, seejärel esialgne denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 45 tsükli 95 °C 15 sekundit denaturatsiooni, 56 °C 30 sekundit seondumise, 72 °C 30 sekundit ekstensiooni etappidega ning programmi lõpuks ahelate sulatamise etapp 65-95 °C (tõstetakse 0,35 °C kaupa, enne esimest tõstmist 90 sek paus, pärast iga tõstmist 3 sek paus).

mcrA praimeritega kasutati programmi parameetritega: esmalt 50 °C 2 minutit, seejärel esialgne denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 50 tsükli 95 °C 15 sekundit denaturatsiooni, 51 °C 30 sekundit seondumise, 72 °C 30 sekundit ekstensiooni etappidega ning programmi lõpuks ahelate sulatamise etapp 65-95 °C (tõstetakse 0,35 °C kaupa, enne esimest tõstmist 90 sek paus, pärast iga tõstmist 3 sek paus).

qPCR-i järgselt analüüsiti proovide amplifikatsioonikõveraid ja sulamiskõverate kuju. Amplifikatsiooni efektiivsusi analüüsiti programmiga LinRegPCR 2012.3, mille põhjal tehti statistiline analüüs võõrväärtuste eemaldamiseks sarnaselt Nölvak et al. (2012). Geenikoopiate arvud arvutati kaliiberkõveraid kasutades ja on esitatud töös vastavate geeni koopiate arvuna grammi kuiva turba kohta (GK/g KA). *mcrA* geeni proportsioon arhede koosluses (*mcrA*/16S rRNA) on arvatud vastavatest amplifikatsiooni efektiivsustest ja CT väärtustest ning esitatud töös protsentidena (%).

2.5 . Andmeanalüüs ja töö autori osalus uurimuses

Analüüsides tulemusi analüüsiti järgmistes gruppides: taimestamise mõju uurimisel kõik taimestatud ja taimestamata lappide proovid ja väetamise mõju uurimisel eraldi väetatud taimestatud lappide proovid ja väetamata taimestatud (kontroll) lappide proovid ning väetatud taimestamata ja väetamata taimestamata (kontroll) lappide proovid. Uuritud gruppide geenikoopiate arvukuste ja proportsioonide, samuti füüsikalise-keemiliste parameetrite ja metaani emissiooni aritmeetilised keskmised, standardhälbed ja variatsioonikoefitsendid arvutati programmiga Microsoft Office Excel 2007.

T-testiga (GraphPad QuickCalcs) hinnati vaadeldavate rühmade vastavate parameetrite keskväärtuste erinevusi ($p < 0,05$). Mitteparameetrilise Spearmani korrelatsioonikordaja abil (STATISTICA V 7.1) analüüsiti määratud geeniparameetrite omavahelisi seoseid ja

füüsikalise-keemiliste näitajatega turbaproovides. Ühefaktorilise dispersioonanalüüsiga (*one way ANOVA*) (STATISTICA V 7.1) testiti geenikoopiate arvukuste ja nende suhete erinevusi uuritud gruppide turbasamba eri kihtides.

Töö autor osales katse planeerimises, katselappide ettevalmistamisel, turba-, vee- ja gaasiproovide võtmisel ning turbasamba temperatuuri määramisel katsealal, eraldas DNA, viis läbi kõik molekulaarsed analüüsid (määras DNA kontsentratsiooni, disainis praimerid, tegi kaliiberkõverad, määras geenikoopiate arvud ja proportsiooni) ning tegi andmetötluse ja statistilised analüüsid.

3. TULEMUSED

3.1. Katselappide füüsikalise-keemilised parameetrid freesturbas

Katselappide temperatuur turbasambas varieerus vahemikes 13,8-14,9 °C katseperioodi jooksul. Tabelis 3 on ära toodud aritmeetilised keskmised ja variatsioonikoefitsiendid temperatuuride ja veetasemete kohta uuritud gruppide turbasambas proovivõtmise päevadel ja nendevahelisel perioodil. Ühel laamil asuvate katselappide turbasamba samad kihid ei erinenud temperatuuri poolest kummagil proovivõtu päeval. T-testi tulemusena ilmnnes, et katseperioodi jooksul oli temperatuur taimestatud lappide turbasambas oluliselt ($p < 0,001$) kõrgem kui taimestamata lappidel.

Tabel 3. Temperatuuri ja veetaseme keskväärtused (n=3) ja sulgudes nende variatsioonikoefitsiendid (%) uuritud gruppide turbasambas proovivõtu päevadel ja nende vahepealsel perioodil. - tähistab veetaseme sügavust allpool maapinda. Katselappide grupe on tähistatud järgmiselt: päiderooga taimestatud kontrolllappid (PK), päiderooga taimestatud ja väetatud lapid (PV), taimestamata freesturba kontrolllappid (FK), taimestamata ja väetatud freesturba lapid (FV).

Rühm	temperatuur (°C)			veetase (cm)		
	20.06.2012	20.09.2012	periood	20.06.2012	20.09.2012	periood
PK	12,5 (7,1)	12,6 (1,3)	14,4 (1,0)	-50 (19,4)	-15 (30,6)	-26 (17,3)
PV	12,5 (7,1)	12,6 (1,3)	14,7 (1,4)	-48 (6,9)	-10 (36,6)	-22 (15,8)
FK	12,6 (2,2)	12,1 (1,6)	13,9 (1,0)	-53 (11,9)	-37 (47,7)	-43 (29,1)
FV	12,6 (2,2)	12,1 (1,6)	14,0 (1,0)	-65 (3,1)	-41 (39,5)	-46 (17,8)

Juunikuu proovivõtu ajal oli veetase oluliselt madalam ($p < 0,01$) kui septembris mõõdetud veetase. Juunis varieerus veetase taimestatud ja taimestamata katselappide turbasambas vastavalt 17 cm ja 21 cm ulatuses. Septembris oli taimestatud katselappide veetase ühtlasem (varieerumine 12 cm ulatuses), kuid taimestamata aladel erinevused lappide vahel suurenesid (varieerumine 35 cm ulatuses). Ühel laamil asuvate katselappide (kontrolllapp ja väetatud lapp) keskmised veetasemed varieerusid enamasti turbasambas katseperioodi jooksul kuni 4 cm ulatuses, kõige suuremad olid veetaseme vahed 7 (taimestatud laam) ja 11 cm (taimestamata laam). Statistiline analüüs näitas, et turbasambas oli nii proovivõtu päevadel ($p < 0,05$) kui ka katseperioodi jooksul ($p < 0,001$) veetase taimestatud lappidel kõrgem kui taimestamata lappidel.

Tabelis 4 ja 5 on ära toodud uuritud gruppide füüsikalise-keemiliste parameetrite keskväärtused ja nende varieerumine turbasamba kihtide kaupa juuni ja septembri proovivõtupäevadel. Turba pH varieerus katselappide erinevates kihtides 5,2-8,1. Väetatud taimestamata freesturba katselappidel oli kolmest kihist ülemises (0-20 cm) pH alati madalaim. päiderooga Taimestatud lappide turbasambas oli pH oluliselt madalam ($p < 0,001$) taimestamata lappidest.

Tabel 4. Uuritud gruppide füüsikalise-keemiliste parameetrite keskväärtused (n=6) ja sulgudes nende variatsioonikoefitsendid (%) katselappide turbasamba kihtide kaupa juunis. Katselappide grupe on tähistatud järgmiselt: päiderooga taimestatud kontrolllapid (PK), päiderooga taimestatud ja väetatud lapid (PV), taimestamata freesturba kontrolllapid (FK), taimestamata ja väetatud freesturba lapid (FV). Määratud parameetriteks olid happesus (pH) ja kuivaine (KA), üldsüsiniku (TC), lahustunud orgaanilise aine (DOC), üldfosfori (TP), fosfaate fosfori (PO₄³⁻-P), üldlämmastiku (TN), ammoniumlämmastiku (NH₄⁺-N), nitritlämmastiku (NO₂⁻-N), nitraate lämmastiku (NO₃⁻-N), üldväevli (TS), sulfaatiooni (SO₄²⁻), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca²⁺) sisaldus.

Rühm	Kiht (cm)	pH-H ₂ O	KA (%)	TC (%)	DOC (mg/kg)	TP (mg/kg)	PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	TN (mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	TS (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca ²⁺ (mg/kg)
PK	0-20	5,9 (2,1)	21,3 (6,8)	46 (2,3)	264 (21,9)	285 (19,1)	1,03 (48,0)	27667 (10,9)	11,5 (38,4)	0,32 (34,5)	20,67 (70,8)	8817 (9,4)	431 (82,8)	125 (48,9)	275 (43,7)
	20-40	6,0 (5,4)	16,5 (12,7)	46 (1,8)	448 (12,1)	247 (14,2)	0,99 (40,8)	28667 (5,7)	13,2 (33,6)	0,59 (60,5)	10,97 (73,7)	11550 (24,3)	1413 (103)	93 (45,9)	762 (48,9)
	40-60	5,9 (11,5)	27,7 (46,4)	21 (53,5)	250 (39,1)	275 (24,7)	2,01 (98,7)	16950 (44,8)	6,8 (51,1)	0,35 (158)	5,03 (97,9)	8350 (75,2)	4810 (118)	842 (44,0)	1898 (90,4)
PV	0-20	6,0 (6,1)	21,9 (14,7)	44 (6,4)	284 (23,5)	268 (25,5)	1,31 (52,2)	26167 (13,5)	8,5 (69,1)	0,34 (54,6)	16,15 (72,9)	8883 (13,3)	645 (96,1)	238 (120,8)	364 (50,4)
	20-40	6,2 (7,2)	16,8 (13,7)	45 (1,1)	444 (9,9)	253 (15,5)	1,53 (36,7)	28833 (5,6)	16,7 (65,0)	0,84 (58,8)	20,11 (77,4)	10900 (22,7)	1272 (105)	70 (23,1)	753 (62,1)
	40-60	6,0 (7,7)	20,0 (32,0)	30 (40,8)	310 (36,6)	292 (12,2)	1,41 (36,3)	23000 (28,4)	10,5 (97,9)	0,36 (181,9)	12,87 (74,8)	11200 (61,3)	4193 (87,4)	588 (59,5)	1597 (63,9)
FK	0-20	6,2 (9,1)	25,5 (11,9)	45 (1,9)	207 (26,2)	260 (12,9)	0,29 (64,2)	25500 (13,1)	6,8 (71,4)	0,48 (65,6)	35,73 (29,9)	8833 (12,3)	1083 (121)	60 (31,9)	481 (68,6)
	20-40	6,3 (7,6)	16,7 (18,4)	44 (5,5)	345 (32,7)	283 (14,9)	1,12 (85,4)	27167 (8,5)	20,0 (70,3)	0,76 (47,0)	15,48 (32,0)	11717 (28,5)	2062 (99,9)	111 (44,9)	991 (70,8)
	40-60	6,7 (5,7)	26,7 (30,8)	20 (58,4)	184 (52,9)	313 (22,1)	0,29 (57,4)	17983 (36,2)	11,1 (45,3)	0,58 (64,7)	5,45 (98,5)	5567 (31,2)	1300 (92,5)	1003 (66,2)	623 (27,6)
FV	0-20	6,1 (7,1)	23,7 (12,1)	45 (1,2)	216 (17,5)	262 (2,9)	0,18 (33,5)	25500 (8,9)	4,9 (48,0)	0,53 (36,9)	29,27 (43,4)	9467 (5,1)	998 (102)	45 (54,6)	449 (62,9)
	20-40	6,2 (3,6)	15,4 (6,2)	44 (2,7)	415 (10,0)	277 (10,6)	0,35 (47,4)	28667 (4,2)	12,9 (48,4)	0,77 (42,9)	13,02 (50,5)	11200 (14,9)	2188 (83,8)	48 (106,3)	685 (41,7)
	40-60	6,5 (6,0)	20,4 (29,2)	28 (47,4)	303 (53,6)	315 (14,0)	0,75 (110)	19417 (39,7)	18,8 (71,2)	0,59 (56,9)	4,70 (53,5)	9317 (55,1)	1736 (69,6)	855 (68,6)	744 (24,4)

Tabel 5. Uuritud gruppide füüsikalise-keemiliste parameetrite keskväärtused (n=6) ja sulgudes nende variatsioonikoefitsendid (%) katselappide turbasamba kihtide kaupa septembris. Katselappide grupe on tähistatud järgmiselt: päiderooga taimestatud kontrolllapid (PK), päiderooga taimestatud ja väetatud lapid (PV), taimestamata freesturba kontrolllapid (FK), taimestamata ja väetatud freesturba lapid (FV). Määratud parameetriteks olid happesus (pH) ja kuivaine (KA), üldsüsiniku (TC), lahustunud orgaanilise aine (DOC), üldfosfori (TP), fosfaate fosfori (PO₄³⁻-P), üldlämmastiku (TN), ammoniumlämmastiku (NH₄⁺-N), nitritlämmastiku (NO₂⁻-N), nitraate lämmastiku (NO₃⁻-N), üldväevli (TS), sulfaatiooni (SO₄²⁻), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca²⁺) sisaldus. - tähistab, et PO₄³⁻-P näitaja oli alla määramispiirkonna.

Rühm	Kiht (cm)	pH-H ₂ O	KA (%)	TC (%)	DOC (mg/kg)	TP (mg/kg)	PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	TN (mg/kg)	NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	TS (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca ²⁺ (mg/kg)
PK	0-20	5,8 (1,5)	20,3 (10,3)	46 (3,6)	240 (13,4)	285 (16,0)	0,21 (7,8)	27500 (6,0)	11,5 (27,7)	1,36 (57,0)	9,61 (76,5)	9133 (8,9)	679 (71,9)	145 (24,2)	312 (38,2)
	20-40	5,9 (5,1)	16,1 (10,6)	46 (2,1)	381 (7,0)	270 (7,4)	0,27 (51,8)	27500 (3,0)	18,0 (28,0)	2,74 (39,2)	3,52 (105)	11683 (19,1)	1636 (76,6)	154 (58,2)	768 (41,9)
	40-60	6,4 (10,2)	27,2 (40,8)	20 (52,3)	220 (33,8)	295 (32,6)	0,04 (245)	14533 (46,4)	12,0 (49,6)	1,77 (35,7)	3,89 (158)	8233 (79,1)	2080 (91,6)	993 (42,3)	973 (47,6)
PV	0-20	6,0 (4,7)	20,0 (10,7)	45 (7,0)	275 (21,9)	283 (20,0)	0,13 (19,3)	26833 (9,8)	12,1 (13,6)	2,16 (31,2)	11,97 (106)	9083 (11,0)	995 (92,9)	202 (38,6)	426 (53,8)
	20-40	6,1 (4,8)	17,1 (20,2)	46 (2,4)	360 (24,7)	280 (5,1)	0,15 (4,8)	28333 (4,3)	19,0 (26,7)	2,66 (17,8)	2,30 (52,4)	11683 (22,7)	1704 (91,3)	155 (64,5)	740 (58,9)
	40-60	6,2 (6,4)	24,1 (35,7)	25 (54,3)	223 (40,3)	295 (14,0)	0,29 (29,2)	15733 (47,6)	15,1 (65,2)	2,06 (62,6)	2,84 (66,2)	9367 (76,7)	2019 (77,5)	723 (49,0)	844 (58,9)
FK	0-20	6,1 (8,5)	21,9 (7,0)	44 (1,2)	185 (13,7)	278 (8,9)	-	25333 (10,2)	5,0 (86,0)	1,11 (20,3)	46,57 (39,0)	9317 (11,8)	1241 (116)	76 (35,9)	543 (77,8)
	20-40	6,2 (8,1)	15,8 (10,0)	44 (4,4)	267 (8,6)	288 (15,4)	0,12 (1,3)	28333 (7,3)	18,1 (109)	1,86 (13,6)	16,63 (57,5)	11583 (19,4)	2079 (120)	111 (88,5)	810 (88,1)
	40-60	6,5 (8,4)	22,3 (37,3)	26 (47,9)	205 (53,4)	330 (13,0)	0,02 (245)	18383 (50,4)	11,1 (101)	1,42 (28,8)	8,99 (102)	7283 (31,6)	1597 (85,6)	760 (56,2)	633 (58,9)
FV	0-20	5,9 (5,9)	20,7 (8,2)	45 (1,8)	197 (9,2)	277 (10,4)	0,23 (245)	26000 (8,1)	6,2 (66,1)	0,91 (57,2)	194,94 (60,2)	9867 (6,9)	1108 (120)	190 (28,6)	745 (50,2)
	20-40	6,5 (12,9)	14,8 (4,9)	45 (2,6)	296 (26,8)	283 (8,8)	0,53 (82,3)	29000 (3,1)	12,0 (76,2)	1,90 (49,5)	89,23 (187)	11300 (18,4)	1849 (79,9)	76 (50,1)	592 (62,5)
	40-60	6,5 (4,1)	21,2 (30,0)	27 (43,4)	201 (34,7)	350 (25,3)	0,49 (49,1)	15050 (43,7)	11,0 (103)	1,55 (24,1)	5,58 (80,2)	8883 (54,2)	1911 (104)	792 (47,2)	463 (44,3)

Turbasamba kuivaine sisaldus varieeruvus oli suurim sügavaimas kihis (40-60 cm). Sarnaselt olid kolmanda kihi varieerumised suurimad üldsüsinikul ja lahustunud orgaanilisel süsinikul. Turbasammaste võrdlemisel ilmnes, et lahustunud orgaanilise aine sisaldus oli statistiliselt oluliselt ($p < 0,001$) kõrgem päiderooga taimestatud lappidel võrreldes taimestamata lappidega. Samuti ilmnes, et lahustunud orgaanilise aine muutude võrdlemisel oli kontrolllappide muutus oluliselt ($p < 0,05$) väiksem võrreldes väetatud lappide muuduga.

Üldfosfori sisaldus varieerus turbaproovides suures ulatuses (170-500 mg/kg). $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ kontsentratsioon oli t-testi alusel oluliselt kõrgem ($p < 0,001$) turbasambas päiderooga taimestatud lappidel võrreldes taimestamata lappidega. Samuti ilmnes juuni ja septembri kontrolllappide võrdlemisel, et $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ sisaldus oli oluliselt suurem ($p < 0,001$) juunikuus. Ka oli oluliselt suurem ($p < 0,01$) $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ sisaldus väetatud taimestamata lappidel võrreldes nende kontrolllappidega.

Üldlämmastiku kontsentratsioon varieerus turbaproovides samuti suures ulatuses (6300-32000). Tabelist 4 ja 5 nähtub, et üldlämmastiku kontsentratsioon varieerub enam turba kõige sügavamas kihis (40-60 cm). Ammooniumi kontsentratsioon varieerus turbaproovides vahemikus 1,3-48,1 mg/kg. Nitritlämmastiku sisaldus kontrolllappide turbasambas oli t-testi alusel oluliselt kõrgem ($p < 0,001$) septembris võrreldes juuniga, kuid varieeruvused turbasambas olid üldjuhul juunis suuremad.

Kogu turbasamba analüüsist ilmnes, et $\text{NO}_3^-\text{-N}$ sisaldus oli oluliselt madalam ($p < 0,01$) päiderooga taimestatud lappidel võrreldes taimestamata lappidega. Samuti ilmnes, et $\text{NO}_3^-\text{-N}$ muutude võrdlemisel oli kontrolllappide muutus oluliselt väiksem ($p < 0,05$) võrreldes väetatud lappide muuduga. Nitraatse lämmastiku kontsentratsioon oli oluliselt kõrgem ($p < 0,05$) väetatud taimestamata lappidel võrreldes vastavate kontrolllappidega septembris.

Üldväävlis sisaldus varieerus turbaproovides suures vahemikus (1700-21000 mg/kg). Variatsioonikoefitsendi põhjal varieeruvus üldväävlis sisaldus kõige rohkem 40-60 cm kihis. Erinevused sulfaadi muutused olid katselappide erinevate paralleelide vahel suhteliselt suured (variatsioonikoefitsendid enamasti 100% lähedased). Kaaliumi sisaldus jäi uuritud proovides vahemikku 19-2300 mg/kg ning kaltsiumi oma 160-4214 mg/kg.

T-testi alusel ilmnes, et juunikuu kontrolllappide ja väetatavate lappide turbasammastes ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi füüsikalises-keemilistes parameetrites ($p > 0,05$). Lisaks erinevustele kogu samba füüsikalises-keemilistes näitajates rühmade vahel, leiti olulisi erinevusi ka uuritud rühmade turbasamba kihtide omavahelisel võrdluses, mis on välja toodud lisas 1. Sageli statistiliselt olulise erinevuse ilmnedes kogu turbasambas, ilmnes see ka ülemises (0-20 cm) kihis. Samal ajal ilmnes taimestatud ja väetatud katselappide võrdluses vastavate

kontrolllappidega $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ puhul kõigis turbakihtides statistiliselt oluline erinevus (lisa 1), kuid kogu turbasambas erinevust ei leitud.

3.2. Arhede 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste määramine turbaproovidest

3.2.1. Arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni detekteerimiseks väljatöötatud praimerite omadused

Arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimiseks välja töötatud praimerid olid andmebaaside põhjal vastavalt universaalsusega üle 93 ja 64 protsendi. Nende praimerite amplifitseeritavad lõigud olid vastavalt 393 ja 135 nukleotiidi. qPCR-i reaktsioonisegus andsid 16S rRNA ja *mcrA* praimerite katseliselt määratud kontsentratsioonid (vastavalt 0,3 μM ja 0,4 μM) ning programmi katseliselt määratud sulamistemperatuurid (vastavalt 56 ja 51 °C) parimad amplifikatsiooni efektiivsused.

qPCR-i algandmete statistilise analüüsi tulemusel ilmnis arhede 16S rRNA geeni amplifitseerimisel võõrväärtusi alla 5% (proovide ja nende paralleelide arv oli 432). Arhede 16S rRNA geeni amplifitseerimise efektiivsus kõikus 1,686-1,922 vahel ning keskmiseks efektiivsuseks oli 1,780. 16S rRNA geeni standardi tegemisel oli keskmine efektiivsus 1,738. *mcrA* geeni puhul tuli edasisest analüüsist välja jätta alla 7,5% esialgsetest amplifikatsiooni tulemustest (proovide ja nende paralleelide arv oli 432). *mcrA* geeni amplifitseerimise efektiivsus varieerus 1,242-1,544 vahel ning keskmiseks efektiivsuseks oli 1,377. *mcrA* geeni standardi tegemisel oli keskmine efektiivsus 1,395.

3.2.2. Arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopiate arvukuste ning *mcrA* geeni osakaal katselappide freesturbas

Tabelis 6 on ära toodud arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopiate arvukuste ning *mcrA* geeni osakaalu keskväärtused ja nende variatsioonikoefitsendid uuritud rühmades turbasamba kihtide kaupa proovivõtu päevadel. Turbasamba ülemises kihis (0-20 cm) oli 16S rRNA geeni koopiate arvukus ($6,94 \cdot 10^8$ - $2,33 \cdot 10^{10}$ GK/g KA). Keskmise kihi 16S rRNA geeni koopiate arvukuse varieeruvus oli väiksemas vahemikus ($5,22 \cdot 10^9$ - $9,50 \cdot 10^{10}$ GK/g KA). Kõige alumise kihi 16S rRNA geeni koopiate arvukus jäi vahemikku $7,12 \cdot 10^8$ - $5,83 \cdot 10^{10}$ GK/g KA. Taimestatud ja väetatud lappide 20-40 cm turbakihis ilmnis 16S rRNA geeni koopiate arvukuste statistiliselt oluline suurenemine ($p < 0,05$) võrreldes vastavate kontrolllappidega.

Taimestatud katselappidel oli 16S rRNA geeni koopiate arvukus oluliselt suurem 20-40 cm ja 40-60 cm kihis (mõlemad $p < 0,001$) võrreldes kõige ülemise (0-20 cm) kihiga. Taimestamata katselappidel ilmnis samuti, et oluliselt suurem oli teise ($p < 0,001$) ja kolmanda kihi ($p < 0,01$) 16S rRNA geeni koopiate arvukus võrreldes esimese kihiga. Oluliselt suurem ($p < 0,05$) oli ka

16S rRNA geeni koopiate arvukus väetatud taimestatud lappide kolmandas kihis võrrelduna samade lappide esimese kihiga.

Tabel 6. Uuritud gruppide arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopiate arvukuste ning *mcrA* geeni osakaalu keskvaartused (n=6) ja sulgudes nende variatsioonikoefitsendid (%) katselappide turbasamba kihtide kaupa proovivõtu päevadel. Geenikoopiate arv on esitatud grammi kuivaine kohta (GK/g KA). Katselappide grupe on tähistatud järgmiselt: päiderooga taimestatud kontrolllappid (PK), päiderooga taimestatud ja väetatud lappid (PV), taimestamata freesturba kontrolllappid (FK), taimestamata ja väetatud freesturba lappid (FV).

Rühm	Kiht (cm)	16S rRNA (GK/g KA)		<i>mcrA</i> (GK/g KA)		<i>mcrA</i> /16S rRNA (%)	
		20.06.2012	20.09.2012	20.06.2012	20.09.2012	20.06.2012	20.09.2012
PK	0-20	8,62*10 ⁹ (92,9)	5,93*10 ⁹ (56,9)	6,52*10 ⁶ (49,3)	7,42*10 ⁶ (76,1)	4,09 (109)	9,40 (111)
	20-40	2,44*10 ¹⁰ (49,4)	1,41*10 ¹⁰ (38,9)	2,45*10 ⁷ (69,4)	1,47*10 ⁷ (61,7)	5,28 (234)	4,31 (100)
	40-60	2,17*10 ¹⁰ (64,5)	1,70*10 ¹⁰ (70,9)	2,95*10 ⁷ (56,8)	2,52*10 ⁷ (66,9)	1,37 (103)	8,25 (144)
PV	0-20	6,74*10 ⁹ (91,4)	8,33*10 ⁹ (104)	9,51*10 ⁶ (57,7)	9,66*10 ⁶ (61,6)	7,37 (168)	1,57 (92,1)
	20-40	1,94*10 ¹⁰ (46,7)	2,32*10 ¹⁰ (30,9)	2,02*10 ⁷ (42,7)	3,03*10 ⁷ (25,8)	1,07 (98,1)	1,43 (181)
	40-60	2,99*10 ¹⁰ (55,7)	2,58*10 ¹⁰ (52,7)	5,41*10 ⁷ (96,1)	4,74*10 ⁷ (53,2)	1,00 (83,5)	0,56 (70,2)
FK	0-20	6,81*10 ⁹ (103)	6,10*10 ⁹ (98,6)	1,06*10 ⁷ (62,3)	8,21*10 ⁶ (29,2)	2,64 (80,1)	8,38 (91,8)
	20-40	2,55*10 ¹⁰ (113)	3,31*10 ¹⁰ (103)	3,86*10 ⁷ (114)	4,66*10 ⁷ (110)	7,24 (192)	4,57 (197)
	40-60	2,10*10 ¹⁰ (61,0)	2,07*10 ¹⁰ (40,2)	3,97*10 ⁷ (118)	2,95*10 ⁷ (60,6)	0,87 (149)	0,51 (47,7)
FV	0-20	5,46*10 ⁹ (76,0)	6,92*10 ⁹ (72,3)	8,30*10 ⁶ (82,4)	1,14*10 ⁷ (61,0)	4,84 (158)	2,99 (89,1)
	20-40	2,40*10 ¹⁰ (71,5)	2,65*10 ¹⁰ (81,7)	3,19*10 ⁷ (87,4)	3,53*10 ⁷ (91,2)	1,50 (114)	1,24 (64,8)
	40-60	2,22*10 ¹⁰ (49,5)	2,97*10 ¹⁰ (69,0)	2,52*10 ⁷ (64,6)	4,08*10 ⁷ (89,0)	4,62 (143)	0,72 (73,4)

Tabelist 6 nähtub, et *mcrA* geeni koopiate arvukus oli ülemises turbakihis enamasti madalam ($2,40 \cdot 10^6$ - $2,29 \cdot 10^7$ GK/g KA) võrreldes alumiste kihtidega. Keskmise kihi *mcrA* geeni koopiate arvukus oli vahemikus $6,17 \cdot 10^6$ - $1,28 \cdot 10^8$ GK/g KA ning kõige alumisel kihil oli see $2,85 \cdot 10^6$ - $1,58 \cdot 10^8$ GK/g KA. Kahe alumise kihi varieeruvus oli suurem kui ülemisel kihil. Taimestatud ja väetatud lappide turbasambas suurenes *mcrA* geeni koopiate arv oluliselt ($p < 0,05$) võrreldes vastavate kontrolllappidega septembrikuus. Oluline erinevus ilmnes just 20-40 cm turbakihis ($p < 0,01$).

Taimestatud katselappidel ilmnes, et *mcrA* geeni koopiate arvukus oli oluliselt suurem teises ($p < 0,05$) ja kolmandas kihis ($p < 0,01$) võrreldes ülemise turbakihiga. Samas oli neil lappidel ka kolmanda kihi arvukus oluliselt suurem teisest kihist ($p < 0,05$). Taimestamata katselappidel oli *mcrA* geeni koopiate arvukus oluliselt suurem 20-40 cm ($p < 0,01$) ja 40-60 cm kihis ($p < 0,05$) võrreldes 0-20 cm kihiga. Taimestatud kontrolllappide kolmandas kihis oli *mcrA* geeni koopiate arvukus oluliselt suurem ($p < 0,05$) esimesest kihist. Oluliselt suurem ($p < 0,01$) oli ka *mcrA* geeni koopiate arvukus väetatud taimestatud lappide kolmandas kihis võrrelduna samade lappide esimese kihiga.

mcrA geeni osakaal arhede koosluses varieerus uuritud proovides suures ulatuses. Kõige suuremad varieeruvused olid keskmises kihis (20-40 cm), kus see näitaja oli vahemikus 0,03-35,4%. Ülemises kihis (0-20 cm) jäi *mcrA* geeni osakaal vahemikku 0,13-32,4% ja kõige

alumises (40-60 cm) oli see 0,07-30,0% piirides. Uuritud gruppide erinevate kihtide vahel *mcrA* geeni proportsioonides ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi ($p > 0,05$).

Statistiline analüüs näitas, et *mcrA* geeni osakaal vähenes oluliselt ($p < 0,05$) väetatud lappide turbasambas võrreldes kontrolllappidega, kusjuures oluline erinevus ilmnes 0-20 cm turbakihis ($p < 0,05$). Samuti ilmnes, et taimestatud ja väetatud katselappidel oli *mcrA* geeni osakaal oluliselt ($p < 0,01$) väiksem võrreldes vastavate kontrolllappidega septembris.

Andmeanalüüsi tulemustest selgus, et nii taimestatud kui taimestamata katselappide turbasambas oli tugev positiivne seos arhede 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel (vastavalt $R = 0,81$; $p < 0,001$ ja $R = 0,84$; $p < 0,001$) ja negatiivsed seosed *mcrA* proportsiooni ning 16S rRNA (vastavalt $R = -0,42$; $p < 0,001$ ja $R = -0,39$; $p < 0,001$) ja *mcrA* ($R = -0,40$; $p < 0,001$ ja $R = -0,31$; $p < 0,01$) geenide arvukuste vahel.

Taimestatud väetatud katselappidel ning nende kontrolllappidel turbas ilmnesid erinevad seosed määratud geeniparameetrite vahel. Kui taimestatud kontrolllappidel ilmnesid seosed 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel ($R = 0,85$; $p < 0,001$) ning *mcrA* geenide arvukuse ja *mcrA* proportsiooni vahel ($R = -0,52$; $p < 0,05$), siis väetatud lappidel ilmnes seos ainult 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel ($R = 0,80$; $p < 0,001$).

Taimestamata ja väetamata kontrolllappide proovides oli arhede 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel tugev positiivne seos ($R = 0,83$; $p < 0,001$), samas kui nii 16S rRNA geeni arvukuse ja *mcrA* proportsiooni kui ka *mcrA* geeni arvukuse ja *mcrA* proportsiooni vahel ilmnesid negatiivsed seosed (vastavalt $R = -0,73$; $p < 0,001$ ja $R = -0,52$; $p < 0,05$). Väetatud taimestatud lappidel ilmnes positiivne seos vaid 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel ($R = 0,83$; $p < 0,001$).

Statistiline analüüs näitas, et määratud geeniparameetrid olid uuritud gruppide erinevates kihtides omavahel erinevalt seotud (Lisa 2) Samas ilmnes, et kuigi uuritud turbasamba kihtides ei leitud olulist seost *mcrA* geeni arvukuse ja *mcrA* proportsiooni vahel, ilmnes see seos kolme kihi koosanalüüsil kõikidel taimestamata lappide, taimestatud kontrolllappide ja taimestamata kontrolllappide turbas.

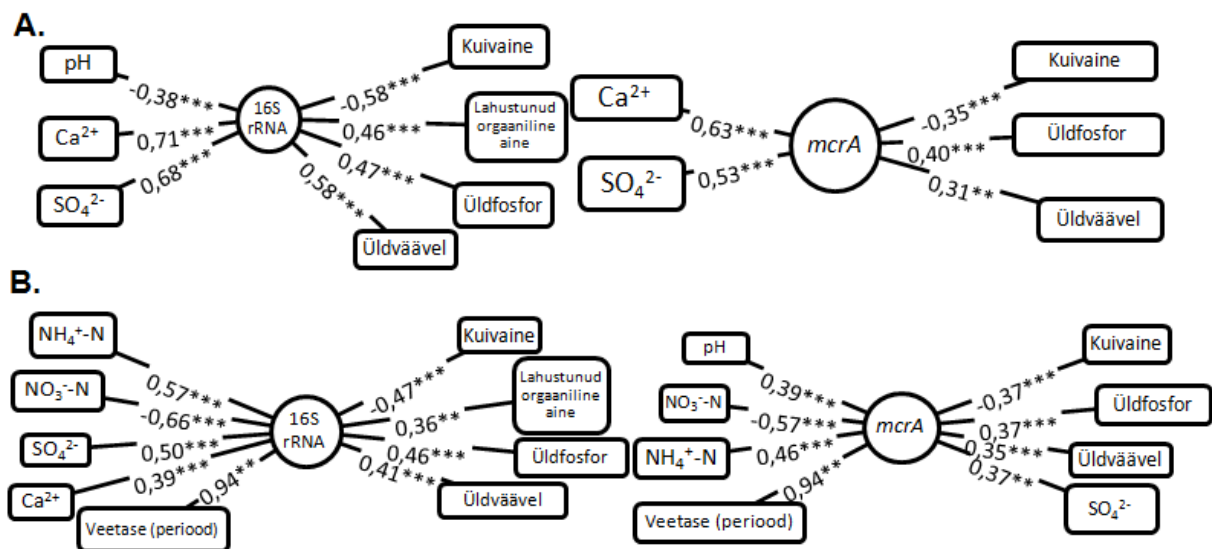
3.3. Füüsikalise-keemiliste faktorite mõju 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopiate arvukustele ning *mcrA* geeni osakaalule freesturba arhede koosluses

3.3.1. Geeniparameetrite seosed füüsikalise-keemiliste näitajatega päiderooga taimestatud katselappidel

Päiderooga taimestatud ja taimestamata lappidel ilmnes füüsikalise-keemiliste parameetrite ja 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel mitmeid statistiliselt olulisi seoseid (joonis 5). Nii taimestatud kui ka taimestamata lappidel oli 16S rRNA kui ka *mcrA* geenide arvukus

negatiivset seotud kuivaine sisaldusega ja positiivselt üldfosfori, üldvääveli ja sulfaadi sisaldusega turbas.

Ehkki erineva seoste tugevusega, olid taimestatud ja taimestamata lappidel 16S rRNA geeni koopiade arvud seotud veel lahustunud orgaanilise aine ja kaltsiumi sisaldusega. Kui taimestamata lappidel esines positiivne seos arhede 16S rRNA geeni koopiade arvu ja perioodi keskmise veetasemega tubasambas ning lisaks ammoniumlämmastiku sisaldusega, siis negatiivne seos ilmnes nitraatse lämmastiku sisaldusega. Taimestatud lappidel aga ilmnes nõrk, kuid oluline seos 16S rRNA arvukuse ja turba pH vahel.



Joonis 5. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad turba füüsikalise-keemiliste näitajate ja geenikoopiade arvude (16S rRNA ja *mcrA*) vahel päiderooga taimestatud (A) ja taimestamata (B) freesturba katselappidel (** p<0,01; *** p<0,001). Kõikide näitajate puhul on n=72, välja arvatud katesperioodi keskmine veetase (periood; n=6).

Spearmani korrelatsioonikordaja järgi erinesid taimestatud ja taimestamata lapid üksteisest statistiliselt oluliste seoste arvu poolest *mcrA* geeni koopiade arvude ja keskkonnaparameetrite vahel. Sarnaselt 16S rRNA geeni arvukusele, oli ka *mcrA* puhul taimestamata lappidel olulisi seoseid rohkem kui taimestatud lappidel ja lisaks sarnastele seostele mõjutas seda parameetrit taimestamata alade turbas veel NO₃⁻-N ning NH₄⁺-N sisaldus, pH ja perioodi keskmine veetase.

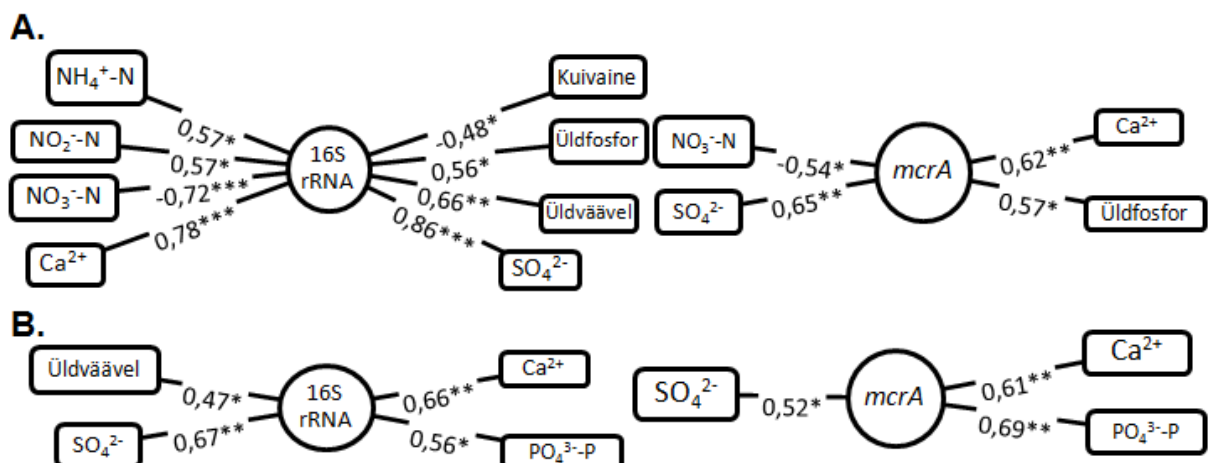
Statistiline analüüs näitas ka, et taimestamata ja taimestatud lappide erinevates kihtides esines füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geeniparameetrite vahel olulisi erinevusi (Lisa 3). Taimestatud katselappide erinevates kihtides leiti tunduvalt rohkem olulisi seoseid (enamasti ülemises ja alumises kihis) mõlema analüüsitud geeni arvukuste ja keskkonnaparameetrite vahel.

mcrA geenide arvukuse osakaal ei korreleerunud turbasambas taimestatud lappidel füüsikaliskemiliste parameetritega. Küll aga oli taimestamata lappidel *mcrA* proportsioon positiivses seoses nitraatse lämmastikuga ($R=0,37$; $p<0,01$). Kui taimestatud lappidel leiti vaid üks nõrk seos nitraatse lämmastiku ja *mcrA* proportsiooni vahel ülemises turbakihis, siis taimestamata lappidel leiti rohkem seoseid selle geeniparameetri ja keskkonnafaktorite vahel, mis ilmnesisid ainult keskmises kihis (Lisa 3).

3.3.2. Geeniparameetrite seosed füüsikaliskemiliste näitajatega väetatud ja väetamata katselappidel

Päiderooga taimestatud väetamata ja väetatud lappidel ilmnis füüsikaliskemiliste parameetrite ja 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel mitmeid statistiliselt olulisi seoseid (joonis 6). Spearmani korrelatsioonikordaja järgi on taimestatud väetamata ja väetatud lappidel nii 16S rRNA kui ka *mcrA* geenide arvukus sarnaselt seotud sulfaadi ja kaltsiumi sisaldusega.

Taimestatud väetamata ja väetatud lappidel 16S rRNA geeni koopiate arv sarnaselt seotud üldvääveli sisaldusega. 16S rRNA geeni koopiate arvukus oli kontrolllappidel võrreldes väetatud lappidega märgatavalt enam seotud erinevate keskkonnaparameetritega. Erinevalt väetatud lappidest leiti väetamata lappide puhul tugevad positiivsed korrelatsioonid ammoniumi, nitritlämmastiku ja üldfosforiga ning negatiivsed nitraatlämmastiku ja kuivaine sisaldusega turbas. Väetatud lappidel oli fosfaatne fosfor seotud 16S rRNA geeni koopiate arvukusega.



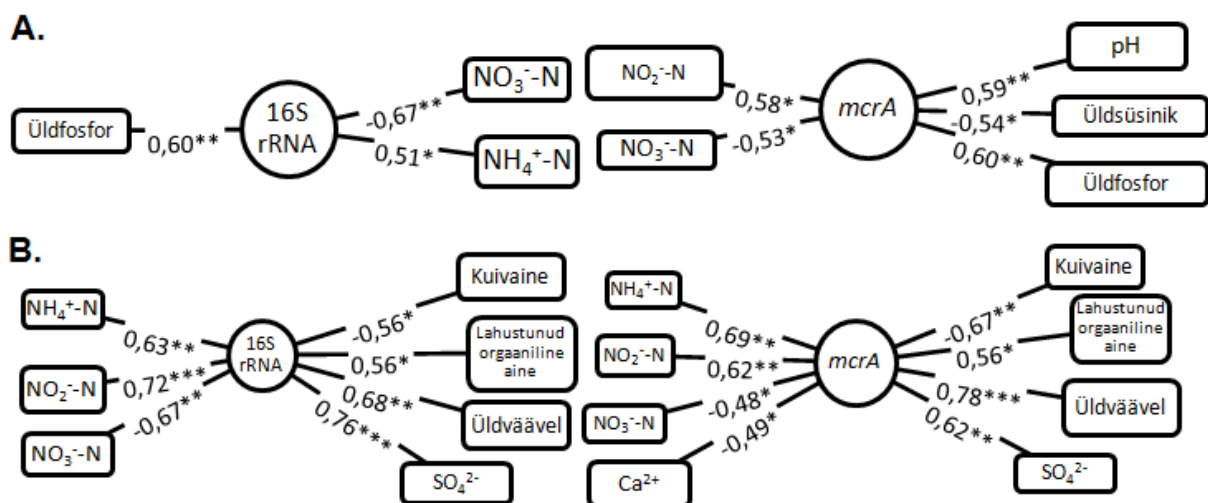
Joonis 6. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad turba füüsikaliskemiliste näitajate ja geenikoopiate arvude (16S rRNA ja *mcrA*) vahel päiderooga taimestatud kontroll (A) ja taimestatud väetatud (B) freesturba katselappidel (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Kõikide näitajate puhul on $n=18$.

Ka päiderooga taimestatud väetamata ja väetatud lappide turbasambas ilmnes suhteliselt vähe seoseid *mcrA* geeni koopiate arvude ja keskkonnaparameetrite vahel. Kontrolllappidel oli *mcrA* geeni koopiate arv negatiivselt korreleerunud nitraatse lämmastikuga ja positiivselt üldfosforiga, väetatud taimestatud lappidel aga positiivselt seotud fosfaatse fosforiga.

mcrA proportsioon arhede koosluses korreleerus taimestatud ja väetamata lappidel positiivselt nitraatse lämmastikuga ($R=0,48$; $p<0,05$), kuid taimestatud ja väetatud lappidel negatiivselt sulfaadiga ($R=-0,47$; $p<0,05$). Kui taimestatud väetamata lappidel leiti vaid üks nõrk seos kaaliumi ja *mcrA* proportsiooni vahel alumises turbakihis, siis taimestatud väetatud lappidel leiti rohkem seoseid selle geeniparameetri ja keskkonnafaktorite vahel (Lisa 4).

Välja on toodud ka taimestatud väetamata ja väetatud lappide füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geeniparameetrite kihtide vahelised seosed, mis on lisas 4. Taimestatud väetamata lappidel leiti geenikoopiate arvukuste ja keskkonnaparameetrite vahel ligi kaks korda rohkem statistiliselt olulisi seoseid kihtides võrreldes taimestatud väetatud lappidega.

Taimestamata kontrolllappidel ilmnes märgatavalt vähem statistiliselt olulisi seoseid füüsikalise-keemiliste parameetrite ja 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste vahel võrreldes vastavate väetatud lappidega (joonis 7). Taimestamata kontrolllappidel ja väetatud lappidel oli 16S rRNA geeni koopiate arv sarnaselt seotud ammoniumi ja nitraatse lämmastiku sisaldusega. Taimestamata väetatud lappidel ilmnemid tugevad positiivsed seosed 16S rRNA geeni koopiate arvukuste ja nitritlämmastiku, sulfaadi, üldvääveli, lahustunud orgaanilise ainega ning lisaks negatiivne seos turba kuivaine sisaldusega. Väetamata freesturba lappidel aga ilmnes oluline seos üldfosfori ja mõlema analüüsitud geeni arvukusega.



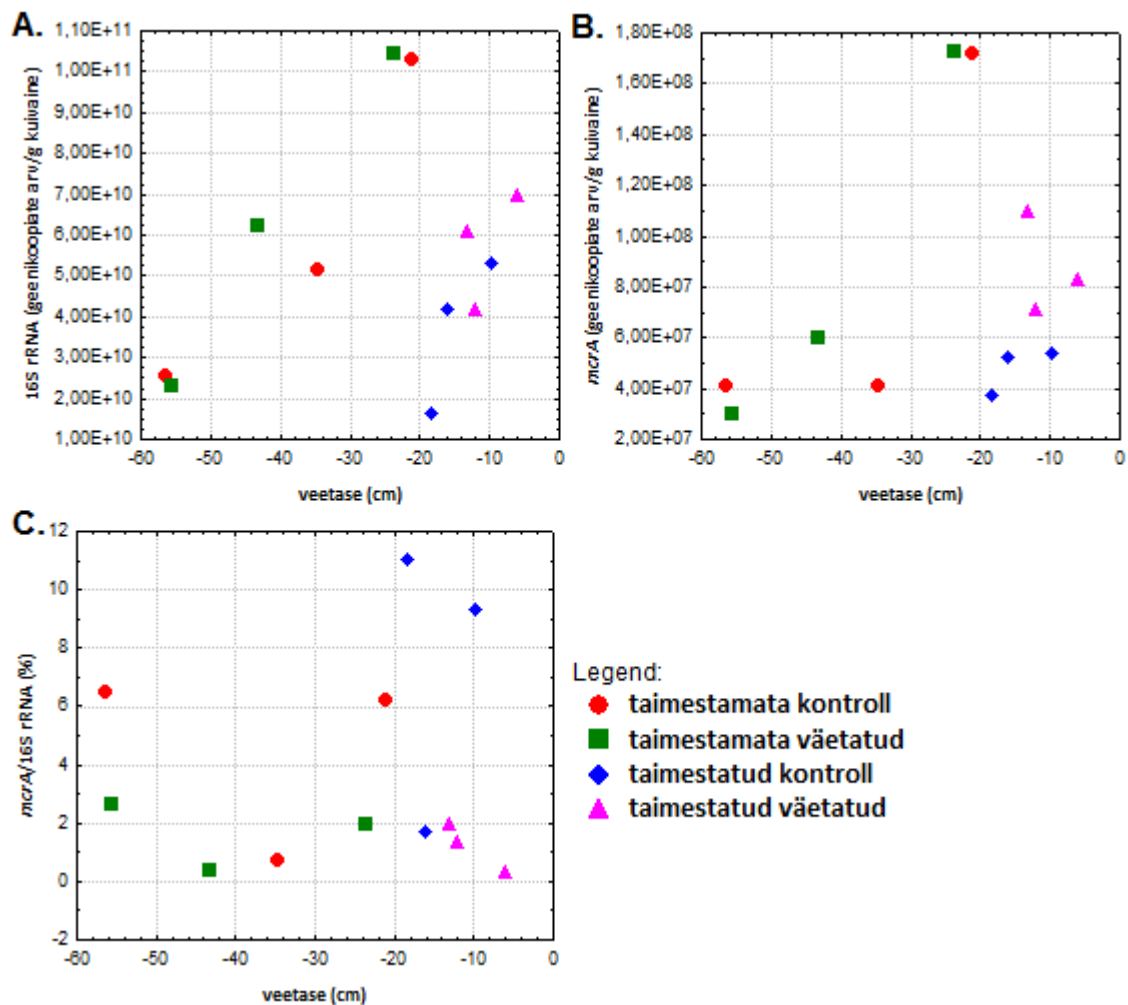
Joonis 7. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad turba füüsikalise-keemiliste näitajate ja geenikoopiate arvude (16S rRNA ja *mcrA*) vahel taimestamata kontroll (A) ja taimestamata väetatud (B) freesturba katselappidel (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Kõikide näitajate puhul on $n=18$.

mcrA geeni koopiate arv korreleerus mõlemas rühmas nitriti ja nitraadi kontsentratsiooniga. Lisaks leiti väetatud lappide puhul veel seosed ammoniumi, sulfaadi, üldväävl, lahustunud orgaanilise aine, kaltsiumi ja kuivaine sisaldusega turbas. Kontrolllappide turbas aga ilmnemiseid seosed pH, üldfosforiga ja üldsüsiniku sisalduse ning *mcrA* geeni arvukuse vahel. *mcrA* geenide osakaal oli taimestamata kontrolllappidel positiivselt seotud üldsüsiniku ($R=0,54$; $p<0,05$) ja nitraatse lämmastikuga ($R=0,80$; $p<0,001$), aga negatiivselt üldfosfori ($R=-0,46$; $p<0,05$) ja kaaliumi ($R=-0,66$; $p<0,01$) sisaldusega. *mcrA* geenide osakaaluga arhede koosluses taimestamata väetatud lappidel olulisi seoseid ei leidunud.

Lisas 4 on näidatud statistiliselt olulised seosed, mis ilmnemiseid taimestamata kontroll- ja väetatud lappide eri kihtides füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geeniparameetrite vahel. Taimestamata väetamata lappidelt leiti geenikoopiate arvukuste ja keskkonnaparameetrite vahel märgatavalt vähem statistiliselt olulisi seoseid kihtides võrreldes taimestamata väetatud lappidega. Taimestamata väetamata ja väetatud lappidel ilmnemiseid *mcrA* proportsiooni ja keskkonnaparameetrite vahel vähe olulisi seoseid ning neist kontrolllappidel olid seosed eranditult kõige ülemises kihis.

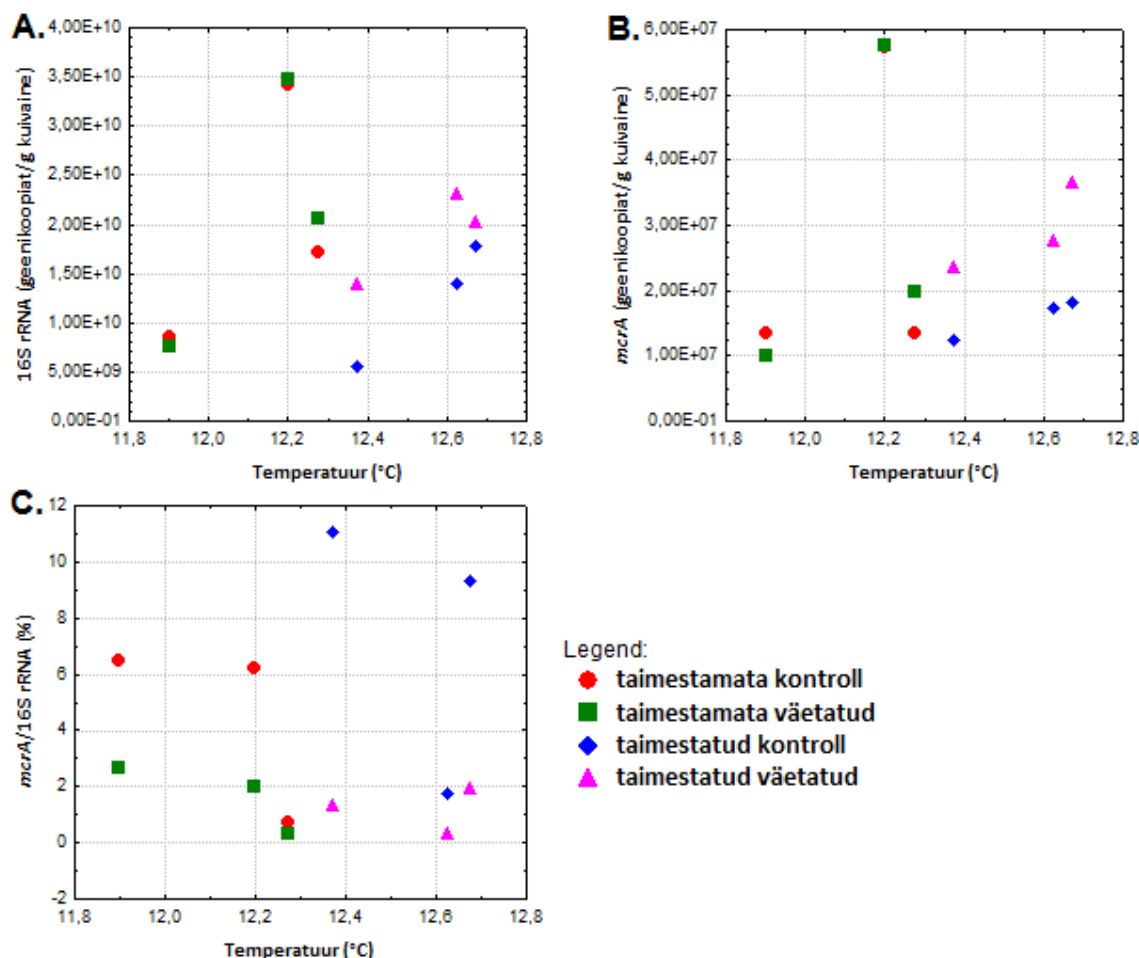
3.3.2.1. Geeniparameetrite seosed veetaseme ja temperatuuriga uuritud katselappide turbasambas kolm kuud peale väetamist

Taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata lappidel geeniparameetrite ja veetaseme ning temperatuuri seoste uurimiseks ei olnud võimalik kasutada mitteparameetrist Spearmani korrelatsioonikordajat, sest veetaseme ja temperatuuri mõõtmised olid keskmistatud iga katselapi kohta, mille tõttu oli sellise statistilise analüüsi jaoks liiga vähe andmeid ($n=3$). Joonisel 8 on välja toodud veetaseme ja 16S rRNA ning *mcrA* geenikoopiate arvude ja *mcrA* proportsiooni seosed taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata katselappidel septembrikuu turbaanalüüsi tulemuste alusel. Jooniselt nähtub, et nii veetaseme kui ka mõlema geeni arvukuste varieerumine oli märksa väiksem taimestatud lappidel. Lisaks oli veetasemel erinev mõju geenikoopiate arvule taimestatud ja taimestamata aladel ja *mcrA* proportsioonile arhede koosluses väetatud ja väetamata aladel.



Joonis 8. Veetaseme seos arhede 16S rRNA (A) ja *mcrA* (B) geenide arvukustega ning *mcrA* proportsiooniga (C) taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata katselappidel 20. septembri andmete alusel.

Joonisel 9 on ära toodud turbasamba keskmise temperatuuri ja keskmiste 16S rRNA ja *mcrA* geenikoopiate arvude ning *mcrA* proportsiooni seosed taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata katselappidel septembrikuu turbaanalüüsi tulemuste alusel. Jooniselt on näha, et ka temperatuuri ja geeniparameetrite seostes ilmnevad erinevused lappide taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata lappide vahel.



Joonis 9. Temperatuuri seos arhede 16S rRNA (A) ja *mcrA* (B) geenide arvukustega ning *mcrA* proportsiooniga (C) taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata katselappidel 20. septembri andmete alusel.

3.4. Metaani emissiooni seos arhede 16S rRNA ja *mcrA* geenide arvukuste ning *mcrA* proportsiooniga arhede koosluses

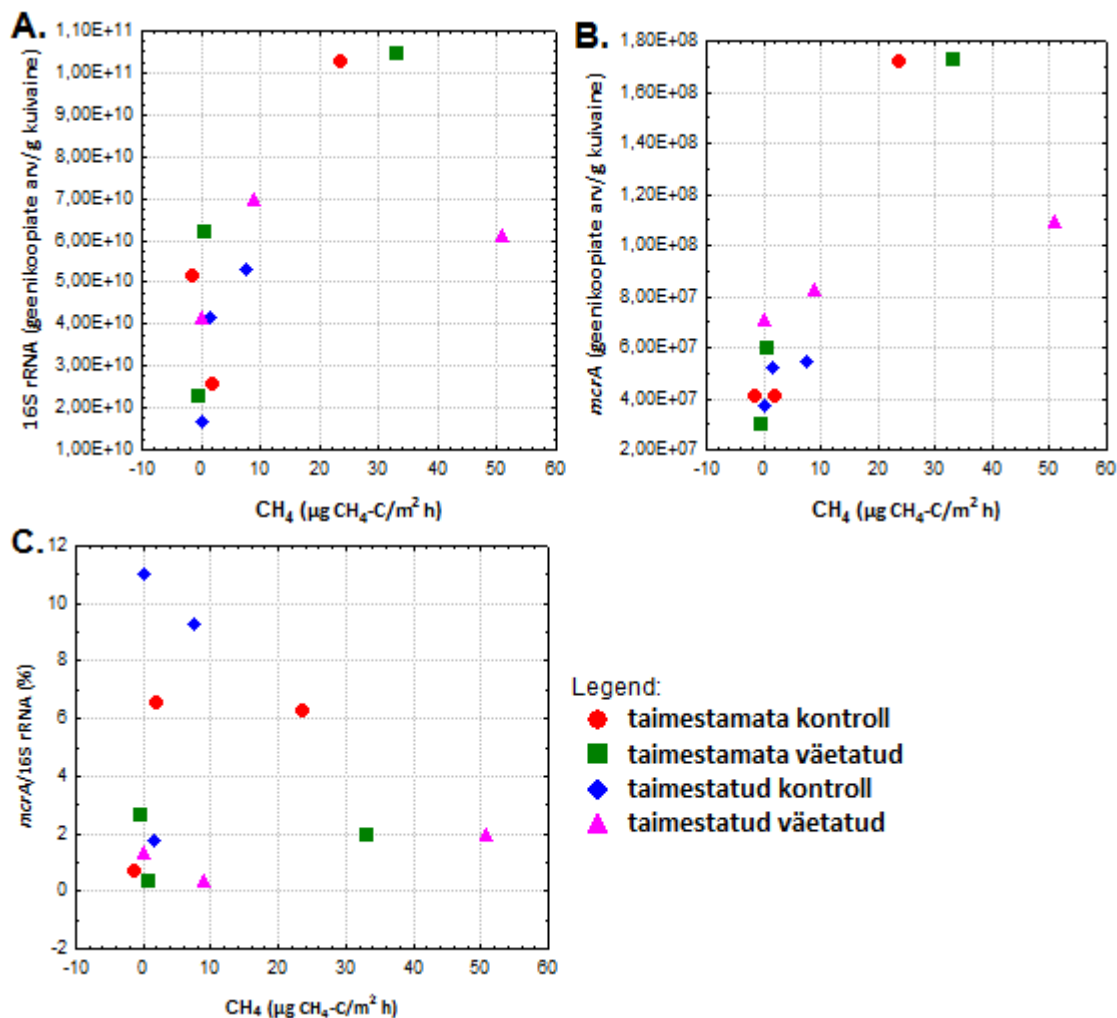
Metaani emissioon katselappidelt varieerus 20. juunil $-3,68-19,15 \mu\text{g CH}_4\text{-C/m}^2 \text{ h}$ ja septembris $-1,36-50,99 \mu\text{g CH}_4\text{-C/m}^2 \text{ h}$. Katseperioodi keskmine emissioon varieerus katsealal $2,58-27,48 \mu\text{g CH}_4\text{-C/m}^2 \text{ h}$. Metaani emissiooni keskvärtused ja selle varieerumine turbaproovide võtmise päevadel ja nendevahelisel perioodil uuritud rühmades on ära toodud tabelis 7. T-testi alusel ei ilmnenu statistiliselt olulisi erinevusi uuritud gruppide vahel metaani emissioonis nii 20. juuni ja 20. septembril kui ka katseperioodil keskmiselt.

Tabel 7. Metaani emissiooni keskvärtused (n=3) ja sulgudes nende variatsioonikoeffitsendid (%) uuritud gruppide turbaproovides proovivõtu päevadel ja nende vahepealsel perioodil. Katselappide gruppe on tähistatud järgmiselt: päiderooga taimestatud kontrolllapid (PK), päiderooga taimestatud ja väetatud lapid (PV), taimestamata freesturba kontrolllapid (FK), taimestamata ja väetatud freesturba lapid (FV).

Rühm	CH ₄ (μg CH ₄ -C/m ² h)		
	20.06.12	20.09.12	periood
PK	7,85 (130)	3,23 (123)	8,14 (80,0)
PV	7,28 (139)	20,13 (135)	18,70 (46,0)
FK	6,33 (49,9)	8,16 (167)	8,77 (104)
FV	3,95 (53,5)	11,24 (170)	7,24 (98,5)

Taimestatud lappidel ilmnes positiivne seos 16S rRNA geeni koopiate arvu ja proovivõtu ajal mõõdetud metaani emissiooniga ($R=0,65$; $p<0,01$). Taimestamata lappidel korreleerus *mcrA* geeni koopiate arv positiivselt katseperioodi keskmise metaani emissiooniga ($R=0,82$; $p<0,05$).

Taimestatud väetatud ja väetamata ning taimestamata väetatud ja väetamata gruppide metaani emissiooni ja geeniparameetrite seoste uurimiseks ei olnud võimalik kasutada mitteparameetrist Spearmani korrelatsioonikordajat, sest iga katselapi kohta oli sellise analüüsi jaoks (20. septembri andmed) liiga vähe andmeid ($n=3$). Siiski on välja toodud nii 16S rRNA kui ka *mcrA* geeni koopiate arvude suhted metaani emissiooni katselappide kaupa (joonis 10). Jooniselt on näha tendents, et 16S rRNA ja *mcrA* geenikoopiate arvude suurenemisega kaasneb metaani emissiooni tõus. Samuti ilmneb, et proportsioon kahaneb tugevalt väetamise korral, kuid metaani emissioon võib sellegi poolest tõusta.



Joonis 10. Metaani emissiooni seos arhede 16S rRNA (A) ja *mcrA* (B) geenide arvukustega ning *mcrA* proportsiooniga (C) taimestatud ja taimestamata ning väetatud ja väetamata katselappidel 20. septembri andmete alusel.

4. ARUTELU

Keskkonnaproovides olevate taksonoomiliste ja funktsionaalsete geenide uurimisel on tõhusaks töövahendiks kvantitatiivne-PCR, kuid usaldusväärsete tulemuste saamiseks peab järgima selle kasutamisel mitmeid olulisi aspekte (Nõlvak et al. 2012). Neist ühed olulisemad on kasutatavate praimerite universaalsus ja nende optimaalsed reaktsioonitingimused, mis kindlustavad keskkonnaproovide korrektsema kirjeldamise. Antud magistritöö jaoks välja töötatud arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimise praimerid olid kokkuvõttes aina täiustuvate ja seega ka täpsemate andmebaaside põhjal seni teaduskirjanduses kasutatud praimeritest parema universaalsusega. Samuti optimeeriti praimerite kontsentratsioon reaktsioonisegus ja kvantitatiivse-PCR-i programm proovidega töötamiseks nii, et amplifikatsiooni efektiivsused olid töötamiseks parimad.

Looduslik keskkond on kompleksne süsteem, mille protsesside kirjeldamiseks ei piisa ainult erinevate geenikoopiate arvude uurimisest. Seega tuleb uuringutes geeniparameetrite andmeid kombineerida erinevate keskkonnaparameetritega, mis võimaldavad märksa adekvaatsemaks mikrobioloogilisi protsesse kirjeldada (Akiyama et al. 2011; Bridgham et al. 2013).

Uuritud freesturba tootmisala turbast määratud keemiliste näitajate (pH, C, N, P, S) väärtused olid sarnased antud alalt varem mõõdetutega (Mander et al. 2012). Sellelt alalt on mõõdetud ka suhteliselt kõrged Ca^{2+} ja SO_4^{2-} kontsentratsioonid, mis on seletatavad ala aluspinna ja veeoludega, kus mineraalirikas põhjavesi põhjustab turbas vastavate ionide kõrgemaid sisaldusi. Suurematest kaltsiumi kontsentratsioonidest võib olla tingitud ka Lavassaare mahajäätud freesturba tootmisala kõrgem pH võrreldes sellega, mis on leidnud Basiliko et al. (2007) ning Triisberg et al. (2011) freesturbaaladel (mõlemal puhul pH=3,8).

Taimestatud lappidel oli freesturbaalal veetase oluliselt kõrgemal ja kõikus vähem võrreldes taimestamata lappidega, mis on ilmnunud ka teistes uuringutes (Basiliko et al. 2007; Andersen et al. 2010). Taimestatud lappidel oli turbasamba temperatuur samuti kõrgem. Päiderooga taimestatud lappide pH oli madalam taimestamata lappidest, mida on täheldatud ka sama ala varasemates uuringutes (Mander et al. 2012). Lahustunud orgaanilise aine sisaldus oli taimestatud lappidel suurem ilmselt taimede juureeritiste või taimede värske ja kergemini lagundatava taimse varise tõttu (Mander et al. 2012; Andersen et al. 2013).

Uuritud freesturba tootmisala turbast määratud geeni- ja füüsikalises-keemilistes parameetrites ning metaani emissioonides ei esinenud erinevusi väetamisele minevatel lappidel ja nende kontrolllappidel. Selle põhjal võib järeldada, et septembris täheldatud erinevused võrreldes kontrolllappidega võiksid olla põhjustatud väetamisest.

Väetamise mõjul suurenes lahustunud orgaanilise aine kontsentratsioon turbasambas, sest väetamine tõi turbasse juurde toitaineid kiirendades mineraliseerumisprotsesse. Näiteks on varasemates uuringutes leitud, et fosfori lisamine tõstab mikrobioloogilist aktiivsust, mille järel toimub ka kiirem turba mineralisatsioon (Caisse et al. 2008). PO_4^{3-} -P kontsentratsioon oli väetatud lappidel võrreldes väetamata lappidega kõrgem, sest lisatud väetise koostises oli ka fosfor.

NO_3^- -N sisaldus oli oluliselt madalam päiderooga taimestatud lappidel võrreldes taimestamata lappidega. Nimelt taimed omastavad lämmastikku ammooniumi või nitraadi kujul. Taimestamata väetatud lappidel tõusis ilmselt NO_3^- -N kontsentratsioon võrreldes nende kontrolllappidega lämmastikuga väetamise tagajärjel, sest pärast sinna lisandunud lämmastikühendite oksüdeerimisel toodeti enam nitraati, mis võis akumuldeeruda, sest puudusid seda substraati tarbivad taimed (Caisse et al. 2008).

Teaduskirjandusest selgub, et siiani ei ole metanogeenide koosluse struktuuri uuritud mahajäätud freesturba tootmisaladel (Andersen et al. 2013) ning samuti puuduvad mikrobioloogilised uuringud metanogeenide ja arhede koosluse kohta jääksoode energiaheinaga taimestamise katsealadel. Küll aga on tehtud metanogeenide koosluse uuringuid mahajäätud freesturba tootmisalade taassoostamise seire käigus (Juottonen et al. 2012).

Erineva meetodikaga (erinevad praimerid, qPCR-i reaktsioonisegu jne) määratud qPCR-i geenikoopiate arvud, ei ole erinevate uuringute vahel otseselt võrreldavad (Nölvak et al. 2012). Siiski võib oletada, et mahajäätud freesturba tootmisalade *mcrA* geeni koopiate arvukus sarnanes oma väärtustelt veekogu loodusliku kaldavööndi märgala vastavate väärtustega, sest ka seal on märksa muutlikum veetase võrreldes rabade ja madalsoodega, millega on ilmselt ainult teatud metanogeenide kooslused harjunud (Kim et al. 2008).

Uuritud freesturba tootmisala kogu 60 cm paksuses turbasambas olid metanogeenid detekteeritavad ja nende arvukuste vertikaalne jaotus uuritud turbagruppides oli erinev, mida on näidatud teisteski töödes (Galand 2004; Juottonen et al. 2006; Watanabe et al. 2010; Akiyama et al. 2011; Bridgham et al. 2013). Selgus, et nii 20-40 kui ka 40-60 cm kihis olid oluliselt suuremad 16S rRNA ja *mcrA* geenide koopiate arvukused võrreldes 0-20 cm kihiga taimestamata ja ka taimestatud freesturbaalal, mis näitab, et oluline osa metaani tootmise potentsiaalset asub just sügavamates turbakihtides.

Mahajäätud turbaalade kohta ei ole kirjandusest võimalik tuua võrdlusandmeid. Looduslikes märgalades on aga metanogeene detekteeritud 20 cm sügavuselt (Juottonen et al. 2008), 0-7,5 ja 7,5-15 cm sügavuselt (Juottonen et al. 2012), kuni 20 cm sügavuselt (Kim et al. 2008) ja

isegi kuni 200 cm sügavuselt (Akiyama et al. 2011). Akiyama et al. (2011) andmetel on kõige suuremad 16S rRNA ja *mcrA* geenide koopiate arvukused mõõdetud märgalade turbakihis 20-50 cm sügavuselt. Samas ei määra arvukus metanogeenide aktiivsust. Nimelt on Galand (2004) leidnud, et soodes on CH₄ produktsioon suurim 10-20 cm alla veetaseme, kus hapniku sisaldus on piisavalt vähenenud. Sealt on leitud ka, et seejärel metanogeenide aktiivsus väheneb kuni 40 cm sügavuseni, mil see on lähedane nulliga, mis on seletatav substraadi puudusega metanogeenidele (Galand 2004). Samas on tegemist anaeroobsete organismidega ning madala veetaseme korral võivad need paikneda turbaprofiili sügavamates kihtides (Andersen et al. 2013).

Väetatud lappide turbasambas vähenes *mcrA* geeni osakaal võrreldes kontrolllappidega, mis ilmselt tuleneb sellest, et väetamine mõjus positiivsemalt arhede üldkooslusele. Taimestatud ja väetatud lappide turbasambas toimus *mcrA* geeni koopiate arvu suurenemine, kuid *mcrA* geeni osakaalu vähenemine, mis oli ilmselt põhjustatud seega 16S geeni koopiate arvu suuremast tõusust neil lappidel. Väetamise tagajärjel tõuseb toitainete kontsentratsioon turbas, mis mõjub mikroobikooslustele positiivselt (Basiliko et al. 2007; Andersen et al. 2010).

16S rRNA ja *mcrA* geenide koopiate arvukused korreleerusid positiivselt kõikides uurimisgruppides, mis on kooskõlas teiste uuringute tulemustega (Akiyama et al. 2011; Singh et al. 2012a). Taimestatud ja taimestamata alade turbas ilmnemise 16S rRNA ning *mcrA* geenide koopiate arvukuste ja *mcrA* osakaalu vahel negatiivsed seosed, kuid nii taimestatud kui ka taimestamata lappidel väetamisega sellised seosed ei ilmnunud. Seega põhjustas väetamine muutusi, millele mikroobide arvukused kiirelt reageerisid. On täheldatud, et mikroobid reageerivad erinevatele keskkonnamuutustele kiirelt, sest neil on lühikesed generatsiooniajad, suur evolutsiooniline potentsiaal, suur raku pindala ja ruumala suhe (Kim et al. 2008; Andersen et al. 2013).

Kuigi metanogeenide ja ka arhede kooslus on temperatuurist sõltuvad (Juottonen et al. 2008; Akiyama et al. 2011), ei ilmnunud käesolevas töös uuritud gruppides 16S rRNA ning *mcrA* geeni koopiate arvukuste ja temperatuuri vahel seost, mida on täheldatud ka. Samas on ka teistes turbamulla uuringutes (Freitag, Prosser 2009).

Turbaaladel peaks vähenema metaani emissioon sulfaadi olemasolul, mis on põhjustatud sulfaadi redutseerijate ja fermenteerivate mikroorganismide konkurentsist elektronaktseptorite pärast ning sellest tulenevast substraadi puudusest metanogeenidele (Angel et al. 2012; Andersen et al. 2013). Käesolevas töös taimestatud ja taimestamata lappidel aga ilmnemise *mcrA* geeni koopiate arvul positiivne seos sulfaatiooni sisaldusega turbas. Sarnane seos oli ka kõikidel väetatud aladel. See võib olla tingitud sellest, et toitainete ladestumine sulfaadina või

nitraadina võib stimuleerida metaani produktsiooni või edendada metanogeenide aktiivsust üheskoos muude arhedega või anaeroobsete bakteritega (Andersen et al. 2013). Alternatiivne elektroniaktseptor nitraatne lämmastik mõjus metanogeenide arvukusele siiski negatiivselt kõigis uuritud gruppides (taimestamata lappid, taimestatud kontrolllappid, taimestamata kontrolllappid, taimestamata väetatud lappid), kus see seos esines (Angel et al. 2012).

Taimestamata lappidel esines veetaseme tõusuga ka *mcrA* geeni koopiate arvukuse kasv, mida ilmselt põhjustasid sellega kaasnevad anaeroobsed tingimused, mis on soodsad metanogeenidele (Frey et al. 2011). Samuti on 16S rRNA ning *mcrA* geeni koopiate arvukuste ning NH_4^+ vahel on positiivsed seosed, sest ammoonium on mikroobidele oluline lämmastikuallikas (Singh et al. 2012a). Taimestamata lappidel on *mcrA* geeni koopiate arvukus nõrgalt positiivselt seotud ka turba pH-ga. Mitmed autorid on leidnud, et madal pH (<5) ei ole soodne metanogeenide arenguks (Juottonen et al. 2008; Angel et al. 2012).

Üldistatult nähtub tulemustest, et kui väetamise tagajärjel ilmnes taimestatud lappidel vähem olulisi seoseid 16S rRNA ning *mcrA* geeni koopiate arvukuste ja keemiliste parameetrite vahel, siis taimestamata lappidel esines rohkem. See võib olla seotud sellega, et taimestatud lappidel tarbivad toitaineid ka taimed.

Metaani emissioonid katselappidelt olid sarnased antud alalt varasemate uuringute käigus mõõdetud emissioonidega (Mander et al. 2012). Uuritud gruppide metaani emissiooni ja geenikoopiate arvukuste vahel ilmnesid üksikud seosed. Kuna on teada, et DNA alusel saadud metanogeenide geenikoopiate arv näitab ainult protsessi potentsiaali, kuid mitte aktiivsust, siis ei pruugi CH_4 emissioon korreleeruda arvukusega (Ma et al. 2012; Singh et al. 2012a). Samuti tarbitakse osa metanogeenide toodetud metaanist ära metanotroofide poolt turbasambas, mille tõttu ei pruugi ka metaani emissioon metanogeenide geenikoopiate arvukusega otseselt seostuda (Akiyama et al. 2011). Mahajäätud freesturba tootmisala turbasambas soodustas metaani tarbimist ka veetaseme madalseisust tekkinud oksilised tingimused (Mander et al. 2012).

Andmeanalüüs näitas, et taimestatud lappidel oli metaani emissioonil positiivne seos 16S rRNA geeni koopiate arvuga turbaproovivõtu ajal ja taimestamata lappidel samuti positiivne seos *mcrA* geeni koopiate arvu ja katseperioodi keskmise metaani emissiooni vahel. Varasemates uuringutes on üsna selliseid seoseid leitud vähe. Ombrotroofsetes soodes on leitud nõrk positiivne seos *mcrA* geeni koopiate arvu ja metaani emissiooni vahel (Freitag, Prosser 2009). Ka taimestatud väetatud ja väetamata ning taimestamata väetatud ja väetamata gruppide analüüsil ilmnes metaani emissiooni ja geeniparameetrite seoses sama tendents. Väetamise tulemusena vähenes küll *mcrA* osakaal arhede koosluses, kuid metaan emissioon

siiski suurenes. Ka looduslikel ja taastatud turbaaladel leiti positiivne seos *mcrA* geeni koopiate arvu ja metaani emissiooni vahel (Juottonen et al. 2012).

Töö tulemused annavad olulist infot päideroo kasvatamise (sealhulgas väetamise) mõjule mikroobikoosluse metaanitootmise potentsiaalile mahajäetud freesturba tootmisalal. Järgnevalt tuleks katsealal tegeliku metanogeenide aktiivsuse hindamisel uurida geenide ekspressiooni RNA-l põhinevate meetoditega (pöördtranskriptaasi reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon, RT-qPCR) ning põhjalikult analüüsida kogu mikroobikoosluse (arhed, bakterid) struktuuri uue põlvkonna järjestamise meetoditega. Lisaks tuleks mikroobikoosluse ja keskkonnaparameetrite ning neist lähtuva metaani emissiooni seoste paremaks mõistmiseks uuringus saadud andmete kompleksust arvestades rakendada statistilisi mudeleid (nt üldine lineaarne segamudel) (Bridgham et al. 2013).

KOKKUVÕTE

Turvas on osutunud kasulikuks materjaliks mitmetes väga erinevates eluvaldkondades, mille tõttu seda unikaalset maavara kaevandatakse aktiivselt sooderikastes piirkondades. Turba kaevandamisel on tehnika arenguga kaasnenud produktiivsemate meetodite ja masinate kasutusele võtmine, millele tagatakse kuivendussüsteemidega soodne töökeskkond. Nende meetoditega kaevandamise järel tekivad ulatuslikud frees-jääksood (mahajäätud turbaalad), mis avaldavad keskkonnale negatiivset mõju. Ilma taastustöödeta emiteerub frees-jääksoodest aastakümneid kasvuhooonegaase (CH_4 , N_2O , CO_2).

Metanogeensed arhed toodavad kliima soojenemist mõjutavat metaani. Mahajäätud freesturba tootmisalal saab metaanitootmise potentsiaali määrata metanogeenide arvukuse alusel, mida võimaldab teha meetod reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR). Selle abil on võimalik suhteliselt kiirelt ja efektiivselt määrata metaani tootmisel viimast etappi kodeeriva *mcrA* geeni koopiate arvukust keskkonnaproovides, kuid selleks tuleb kasutada võimalikult universaalseid praimereid markergeeni suhtes ja amplifitseerimisel optimaalseid reaktsioonitingimusi.

Käesoleva töö eesmärkideks olid võimalikult universaalsete ja hästi töötavate arhedespetsiifiliste 16S rRNA ja *mcrA* geenide detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks mõeldud praimerite konstrueerimine ja reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) tingimuste optimeerimine Lavassaare (Pärnumaa) mahajäätud freesturba tootmisala turbaproovide analüüsiks. Lisaks oli eesmärgiks konstrueeritud praimerite abil hinnata päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju arhede 16S rRNA geeni koopiate arvukusele ja *mcrA* geeni koopiate arvukusele ning proportsioonile arhede koosluses turbasambas ja analüüsida määratud geenikoopiate arvukusi ja proportsiooni mõjutavaid füüsikalisi-keemilisi faktoreid ning hinnata geeniparameetrite seoseid metaani emissiooniga erineva töötlusega freesturba katselappidel.

Katseperioodi pikkuseks oli 93 päeva (20.06.2012-20.09.2013). Töö tulemusena selgus, et uued konstrueeritud arhede üldkoosluse (16S rRNA) ja metanogeensete arhede (*mcrA*) detekteerimise praimerid olid seni kirjanduses kasutatud praimeritega võrreldes suurema universaalsusega ja võimaldasid turbaproovidest vastavaid gene nõuetekohaselt kvantifitseerida hea efektiivsusega. Kvantifitseerimisel määratud geeniparameetrite alusel ilmnis mitmeid olulisi tulemusi päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju kirjeldamisel mahajäätud freesturba tootmisalal.

Kõigis uurimisgruppides (taimestatud lappid, taimestamata lappid, taimestatud väetatud lappid, taimestatud kontrolllappid, taimestamata väetatud lappid, taimestamata kontrolllappid) olid omavahel arhede üldkooslus ja metanogeenide arvukused positiivselt seotud. Taimestatud ja taimestamata lappide alumistes kihtides (20-40, 40-60 cm) olid arhede ja metanogeenide arvukused suuremad võrreldes ülemise (0-20 cm) kihiga.

Üldistatult nähtub tulemustest, et kui väetamise tagajärjel ilmnes taimestatud lappidel vähem olulisi seoseid 16S rRNA ning *mcrA* geeni koopiate arvukuste ja keemiliste parameetrite vahel, siis taimestamata lappidel esines rohkem. Näiteks taimestatud ja taimestamata lappidel ilmnes metanogeenidel positiivne seos sulfaadiga. Samasugune seos ilmnes ka sulfaadiga taimestamata ja taimestatud väetatud lappidel. Ka täheldati väetamise tulemusel väetatud lappidel arhede ja metanogeenide arvukuse tõusu turbasambas.

Taimestatud lappidel esines 16S rRNA geenikoopiate arvu ja metaani emissiooni vahel positiivne seos, aga taimestamata lappidel esines *mcrA* geenikoopiate arvu ja metaani emissiooni vahel positiivne seos. Samas täheldati ka taimestatud väetatud ja väetamata ning taimestamata väetatud ja väetamata lappidel geenikoopiate arvude (16S rRNA, *mcrA*) suurenemisega metaani emissiooni tõusu.

Effect of canary grass cultivation and fertilisation on soil archaeal community and its potential of methanogenesis in abandoned peat extraction area

Mikk Espenberg

SUMMARY

Peat is a useful material for people in different cases. Extracted peat is mainly used in energy generation or in horticulture, but there are also other outputs. All extraction methods require clearance of the surface vegetation and site drainage. The most modern peat mining is conducted using large scale milling and vacuum removal of recently dried peat. Thereafter remains abandoned peatlands, which have a negative impact on the environment. Without any kind of restoration, these areas emit greenhouse gases (CH₄, N₂O, CO₂) for decades.

Climate warming is affected by methane, which is produced by methanogenic archaea. The potential of methanogenesis in abandoned peat extraction area can be evaluated by the abundance of *mcrA* gene possessing methanogenic archaea. This gene is encoding an enzyme catalysing the final step of methanogenesis. A suitable approach to quantify abundance of functional genes from environmental samples is quantitative PCR (qPCR), but the results obtained using this method greatly depend on primers and reaction conditions used for the amplification.

The aims of this study were to design primers for detection and quantification of archaea specific 16S rRNA and *mcrA* genes and optimize qPCR reaction conditions and applying these primers in qPCR to evaluate the effect of canary grass cultivation and fertilisation on soil archaeal community and its methanogenic potential in experimental plots of the abandoned peat extraction area. In addition, the aim was to analyse the relationships between measured genes and physicochemical parameters and assess the relationship between archaeal 16S rRNA and *mcrA* gene abundance and *mcrA* proportion in peat archaeal community with methane emissions from the experimental plots. The experiment was carried out from 20.06.2012-20.09.2012 (three months).

The results from this study showed that new designed primers were with better universality compared to those used in previous studies and gave good quantification results. With these primers, abundance of archaea specific 16S rRNA and *mcrA* gene was determined. Several important results emerged from the analysis of the effect of canary grass cultivation and fertilisation on soil archaeal community and its potential of methanogenesis in abandoned peat extraction area.

Archaeal and methanogenic community abundances were positively related in all studied groups (planted plots, unplanted plots, planted control plots, planted fertilised plots, unplanted control plots, unplanted fertilised plots). Both in unplanted and planted plots the greater abundance of methanogenic archaea in the deeper peat layers (20-40, 40-60 cm) was measured compared to the shallow 0-20 cm layer.

Abundance of methanogenic community showed a positive correlation with sulphate in both unplanted and planted plots. A similar relationship was also seen in unplanted and planted fertilised plots. Also the size of the archaeal and the methanogenic community in fertilised plots increased in response to the fertilisation treatment.

In planted plots 16S rRNA gene copy number was positively related to methane emissions, but *mcrA* gene copy number was positively related to methane emissions in unplanted plots. Methane emission also increased with the gene copy numbers (16S rRNA, *mcrA*) in other plots (unplanted control plots, unplanted fertilised plots, planted control plots, planted fertilised plots).

TÄNUAVALDUSED

Autor avaldab tänu oma juhendajale Marika Truule õpetuse, nõuannete ja alati positiivse suhtumise eest. Tänan ka Hiie Nõlvakut ja professor Jaak Truud paljude asjakohaste märkuste ja kasulike soovitude eest. Lisaks soovin tänada veel Järvi Järveoja, Martin Maddisoni, Teele Sildveed ja kõiki teisi, kes aitasid kaasa käesoleva magistritöö valmimisele.

Käesoleva magistritööga seotud kulutused on kaetud projektide „Gloaalne soojenemine ja maastike aineringe. Maastike struktuuri ja funktsioonide muutused seoses globaalse kliima soojenemise ja inimtegevusega ning aineringe modelleerimine ja ökotehnoloogiline reguleerimine“ (IUT2-16) ja „Keskkonnamuutustele kohanemise tippkeskus“ arvelt (F11100PKTF).

(allkiri)

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid

- Albert, T., Karp, K., Starast, M., Moor, U., Paal, T., 2011. Effect of fertilization on the lowbush blueberry productivity and fruit composition in peat soil. *J. Plant Nutr.* 34: 1489 – 1496.
- Akiyama, M., Shimizu, S., Sakai, T., Ioka, S., Ishijima, Y., Naganuma, T., 2011. Spatiotemporal variations in the abundances of the prokaryotic rRNA genes, *pmoA*, and *mcrA* in the deep layers of a peat bog in Sarobetsu-gena wetland, Japan. *Limnology* 12: 1 – 9.
- Alexander, P. D., Bragg, N. C., Meade, R., Padelopoulos, G., Watts, O., 2008. Peat in horticulture and conservation: the UK response to a changing world. *Mires Peat* 3: 1 – 10.
- Andersen, R., Rochefort, L., Poulin, M., 2010. Peat, Water and Plant Tissue Chemistry Monitoring: A Seven-Year Case-Study in a Restored Peatland. *Wetlands* 30: 159 – 170.
- Andersen, R., Chapman, S. J., Artz, R. R. E., 2013. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. *Soil Biol. Biochem.* 57: 979 – 994.
- Angel, R., Claus, P., Conrad, R., 2012. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J.* 6: 847 – 862.
- Basiliko, N., Blodau, C., Roehm, C., Bengtson, P., Moore, T. R., 2007. Regulation of Decomposition and Methane Dynamics across Natural, Commercially Mined, and Restored Northern Peatlands. *Ecosystems* 10: 1148 – 1165.
- Bridgham, S. D., Cadillo-Quiroz, H., Keller, J. K., Zhuang, Q., 2013. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob. Change Biol.* 19: 1325 – 1346.
- Caisse, G., Boudreau, S., Munson, A. D., Rochefort, L., 2008. Fertiliser addition is important for tree growth on cut-over peatlands in eastern Canada. *Mires Peat* 3(11): 1 – 15.
- Costa, A. S., Roméo, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski Jr., A., Alexandre, M. R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technol.* 105: 31 – 39.
- Colwell, F. S., Boyd, S., Delwiche, M. E., Reed, D. W., Phelps, T. J., and Newby, D. T., 2008. Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin. *Appl. Environ. Microb.* 74: 3444 – 3452.

- Earl, J., Hall, G., Pickup, R. W., Ritchie, D. A., Edwards, C., 2003. Analysis of Methanogen Diversity in a Hypereutrophic Lake Using PCR-RFLP Analysis of *mcr* Sequences. *Microb. Ecol.* 46: 270 – 278.
- Eusufzai, M. K., Tokida, T., Okada, M., Sugiyama, S.-i., Liu, G. C., Nakajima, M., Sameshima, R., 2010. Methane emission from rice fields as affected by land use change. *Agr. Ecosyst. Environ.* 139: 742 – 748.
- Freitag, T. E., Prosser, J. I., 2009. Correlation of Methane Production and Functional Gene Transcriptional Activity in a Peat Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6679 – 6687.
- Frey, B., Niklaus, P. A., Kremer, J., Lüscher, P., Zimmermann, S., 2011. Heavy-Machinery Traffic Impacts Methane Emissions as Well as Methanogen Abundance and Community Structure in Oxic Forest Soils. *Appl. Environ. Microb.* 77: 6060 – 6068.
- Gantner, S., Andersson, A. F., Alonso-Sáez, L., Bertilsson, S., 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* 84: 12 – 18.
- Hargreaves, S. K., Roberto, A. A., Hofmockel, K. S., 2013. Reaction- and sample-specific inhibition affect standardization of qPCR assays of soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.* 59: 89 – 97.
- Higgins, T., Colleran, E., 2006. Trophic Status of Experimental Cutaway Peatland Lakes in Ireland and Implications for Future Lake Creation. *J. Environ. Sci. Heal. A* 41: 849 – 863.
- Ho, A., Frenzel, P., 2012. Heat stress and methane-oxidizing bacteria: Effects on activity and population dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 50: 22 – 25.
- Hunger, S., Schmidt, O., Hilgarth, M., Horn, M. A., Kolb, S., Conrad, R., Drake, H. L., 2011. Competing Formate- and Carbon Dioxide-Utilizing Prokaryotes in an Anoxic Methane-Emitting Fen Soil. *Appl. Environ. Microb.* 77: 3773 – 3785.
- Ilomets, M., 2003. Mille arvel kaevandame turvast? *EL* 2/3: 20 – 24.
- Juottonen, H., Galand, P. E., Yrjälä, K., 2006. Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* 157: 914 – 921.
- Juottonen, H., Tuittila, E.-S., Juutinen, S., Fritze, H., Yrjälä, K., 2008. Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archaeal communities and methanogenic potential in a boreal mire. *ISME J.* 2: 1157 – 1168.
- Juottonen, H., Hynninen, A., Nieminen, M., Tuomivirta, T. T., Tuittila, E.-S., Nousiainen, H., Kell, D. K., Yrjälä, K., Tervahauta, A., Fritze, H., 2012. Methane-Cycling Microbial Communities and Methane Emission in Natural and Restored Peatlands. *Appl. Environ. Microb.* 78: 6386 – 6389.

- Kanokratana, P. , Uengwetwanit, T., Rattanachomsri, U., Bunternngsook, B., Nimchua, T., Tangphatsornruang, S., Plengvidhya, V., Champreda, V., Eurwilaichitr, L., 2011. Insights into the Phylogeny and Metabolic Potential of a Primary Tropical Peat Swamp Forest Microbial Community by Metagenomic Analysis. *Microb. Ecol.* 61: 518 – 528.
- Kim, S.-Y., Lee, S.-H., Freeman, C., Fenner, N., Kang, H., 2008. Comparative analysis of soil microbial communities and their responses to the short-term drought in bog, fen, and riparian wetlands. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2874 – 2880.
- Klavins, M., Kokorite, I., Springe, G., Skuja, A., Parele, E., Rodinov, V., Druvietis, I., Strake, S., Urtans A., 2010. Water quality in cutaway peatland lakes in Seda mire, Latvia. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 10: 61 – 70.
- Korhonen, R., 2012. The suitability of the cotton grass fibres for the raw material of the textiles - studies from Finnish peatlands. *Suo - Mires and Peat* 63: 15 – 18.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27: 95 – 125.
- Kõiv, M., Vohla, C., Mõtlep, R., Liira, M., Kirsimäe, K., Mander, Ü., 2009. The performance of peat-filled subsurface flow filters treating landfill leachate and municipal wastewater. *Ecol. Eng.* 35: 204 – 212.
- Lima, G. P., Sleep, B. E., 2007. The spatial distribution of eubacteria and archaea in sand-clay columns degrading carbon tetrachloride and methanol. *J. Contam. Hydrol.* 94: 34 – 48.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., Riley, P. W., 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16s rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521 – 3530.
- Ma, K., Conrad, R., Lu, Y., 2012. Responses of Methanogen *mcrA* Genes and Their Transcripts to an Alternate Dry/Wet Cycle of Paddy Field Soil. *Appl. Environ. Microb.* 78: 445 – 454.
- Mander, Ü., Järveoja, J., Maddison, M., Soosaar, K., Aavola, R., Ostonen, I., Salm, J.-O., 2012. Reed canary grass cultivation mitigates greenhouse gas emissions from abandoned peat extraction areas. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 4: 462 – 471.
- Meslé, M., Périot, C., Dromart, G., Oger, P., 2013. Biostimulation to identify microbial communities involved in methane generation in shallow, kerogen-rich shales. *J. Appl. Microb.* 114: 55 – 70.
- Narihiro, T., Sekiguchi Y., 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microb. Biotechnol.* 4: 585 – 602.

- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, J., Miyashita, A., Imachi, H., Takai, K., 2008. Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 240 – 247.
- Nölvak, H., Truu, M., Truu, J., 2012. Evaluation of quantitative real-time PCR workflow modifications on 16S rRNA and tetA gene quantification in environmental samples. *Sci. Total Environ.* 426: 351 – 358.
- Nyysönen, M., Bomberg, M., Kapanen, A., Nousiainen, A., Pitkänen, P., Itävaara M., 2012. Methanogenic and Sulphate-Reducing Microbial Communities in Deep Groundwater of Crystalline Rock Fractures in Olkiluoto, Finland. *Geomicrobiol. J.* 29: 863 – 878.
- Pereyra, L. P., Hiibel, S. R., Prieto Riquelme, M. V., Reardon, K. F., Pruden, A., 2010. Detection and Quantification of Functional Genes of Cellulose-Degrading, Fermentative, and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea. *Appl. Environ. Microb.* 76: 2192 – 2202.
- Pires, A. C. C., Cleary, D. F. R., Almeida, A., Cunha, Â., Dealtry, S., Mendonça-Hagler, L. C. S., Smalla, K., Gomes, N. C. M., 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Barcoded Pyrosequencing Reveal Unprecedented Archaeal Diversity in Mangrove Sediment and Rhizosphere Samples. *Appl. Environ. Microb.* 78: 5520 – 5528.
- Reedik, H., 2003. Turba tootmine Eestis. *EL* 2/3: 14 – 15.
- Ringqvist, L., Holmgren, A., Öborn, I., 2002. Poorly humified peat as an adsorbent for metals in wastewater. *Water Res.* 36: 2394 – 2404.
- Saarmets, T., 2008. Ammendunud turbaväljade kasutamine taastuenergia tootmiseks. *Eesti Põlevloodusvarad ja -jäätmed* 1/2: 11.
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 496 – 531.
- Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Fuka, M. M., Engel, M., Schauss, K., Schloter, M., 2007. Quantification of functional genes from prokaryotes in soil by PCR. *J. Microbiol. Methods* 68: 445 – 452.
- Shcherbakova, V., Rivkina, E., Pecheritsyna, S., Laurinavichuis, K., Suzina, N., Gilichinsky, D., 2011. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 61: 144 – 147.
- Shin, S. G., Lee, S., Lee, C., Hwang, K., Hwang, S., 2010. Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge. *Bioresour. Technol.* 101: 9461 – 9470.

- Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R., Friedrich, M. W., 2003. Isolation and Characterization of New Strains of Methanogens from Cold Terrestrial Habitats. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 312 – 318.
- Singh, A., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., Joshi, C. G., Tripathi, A. K., Dubey, S. K., 2012a. Community structure of methanogenic archaea and methane production associated with compost-treated tropical rice-field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82: 118 – 134.
- Singh, K. M., Tripathi, A. K., Pandya, P. R., Parnerkar, S., Rank, D. N., Kothari, R. K., Joshi, C. G., 2012b. Methanogen diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*), assessed by 16S rDNA analysis. *Res. Vet. Sci.* 92: 451 – 455.
- Smith, C. J., Osborn, A. M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67: 6 – 20.
- Steinberg, L. M., Regan, J. M., 2008. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Appl. Environ. Microb.* 74: 6663 – 6671.
- Steinberg, L. M., Regan, J. M., 2009. *mcrA*-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Appl. Environ. Microb.* 75: 4435 – 4442.
- Swan, B. K., Ehrhardt, C. J., Reifel, K. M., Moreno, L. I., Valentine, D. L., 2010. Archaeal and Bacterial Communities Respond Differently to Environmental Gradients in Anoxic Sediments of a California Hypersaline Lake, the Salton Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 757 – 768.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240 – 245.
- Triisberg, T., Karofeld, E., Paal, J., 2011. Re-vegetation of block-cut and milled peatlands: an Estonian example. *Mires Peat* 8: 1 – 14.
- Truu, M., Juhanson, J., Truu, J., 2009. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Sci. Total Environ.* 407: 3958 – 3971.
- Veski, R., 1998. 7. Turba kasutamise võimalusi. *Eesti turvas* 1/2: 8 – 9.
- Vianna, M. E., Conrads, G., Gomes, B. P. F. A., Horz H. P., 2006. Identification and Quantification of Archaea Involved in Primary Endodontic Infections. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1274 – 1282.
- Virtanen, K., Valpola, S., 2011. Energy potential of Finnish peatlands. *Geological Survey of Finland*, Special Paper 49: 153 – 161.

- Watanabe, T., Wang, G., Taki, K., Ohashi, Y., Kimura, M., Asakawa, S., 2010. Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy fields. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 705 – 715.
- Wendlandt, K.-D., Stottmeister, U., Helm, J., Soltmann, B., Jechorek, M., Beck, M., 2010. The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology. *Eng. Life Sci.* 10: 87 – 102.
- West, W. E., Coloso, J. J., Jones, S. E., 2012. Effects of algal and terrestrial carbon on methane production rates and methanogen community structure in a temperate lake sediment. *Freshwater Biol.* 57: 949 – 955.
- Wollina, U., 2009. Peat: A natural source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* 2: 17 – 20.
- Wright, A.-D. G., Ma, X., Obispo, N. E., 2008. Methanobrevibacter Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microb. Ecol.* 56: 390 – 394.
- Orru, M., Übner, M., Orru, H., 2011. Chemical properties of peat in three peatlands with balneological potential in Estonia. *Est. J. Earth Sci.* 60: 43 – 49.
- Xiong, J. B., Guo, G., Mahmood, Q., Yue, M., 2011. Nitrogen removal from secondary effluent by using integrated constructed wetland system. *Ecol. Eng.* 37: 659 – 662.
- Xiong, J. B., Mahmood, Q., 2010. Adsorptive removal of phosphate from aqueous media by peat. *Desalination* 259: 59 – 64.
- Yagi, J. M., Suflita, J. M., Gieg, L. M., DeRito, C. M., Jeon, C.-O., Madsen, E. L., 2010. Subsurface Cycling of Nitrogen and Anaerobic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Revealed by Nucleic Acid and Metabolic Biomarkers. *Appl. Environ. Microb.* 76: 3124 – 3134.
- Yergeau, E., Lawrence, J. R., Sanschagrin, S., Waiser, M. J., Korber, D. R., Greer, C. W., 2012. Next-Generation Sequencing of Microbial Communities in the Athabasca River and Its Tributaries in Relation to Oil Sands Mining Activities. *Appl. Environ. Microb.* 78: 7626 – 7637.

Monograafiad, raamatud ja kogumikud

- Galand, P. E., 2004. Methanogenic *Archaea* in boreal peatlands. Academic Dissertation in General Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Ince, O., Kolukirik, M., Ince, B. K., 2010. Molecular Microbial Ecology of Marmara Sea Sediments. In: Mendez-Vilas, A. (Editor), Current Research, Technology and Education

Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Vol. 1. Formatex, Badajoz, Spain, pp 53 – 63.

Joosten, H., Clarke, D., 2002. Wise use of mires and peatlands - Background and principles including a framework for decision-making. International Mire Conservation Group, International Peat Society, Saarijärvi, Finland.

Orru, M., 1995. Eesti turbasood (teatmik). Eesti Geoloogiakeskus, Tallinn, lk 133 – 135.

Orru, M., Orru, H., 2003. Kahjulikud elemendid Eesti turbas. Eesti Geoloogiakeskus, Tallinn, lk 49 – 51.

Orru, M., Orru, H., Tuulik, V.-R., Übner, M., 2007. Eesti turba balneoloogiliste kasutamisvõimaluste uuring (III etapp). Eesti Geoloogiakeskus, Tallinn.

Paal, J., 2011. Jääksood, nende kasutamine ja korrastamine. Eesti Turbaliit, Tartu.

Silvius, M., Joosten, H., Opdam, S., 2008. Peatlands and People. In: Parish, F., Sirin, A., Charman, D., Joosten, H., Minayeva, T., Silvius, M., Stringer, L. (Editors), Assessment on peatlands, biodiversity and climate change: Main Report. Global Environment Centre, Kuala Lumpur and Wetlands International, Wageningen, Netherlands, pp 20 – 38.

Valk, U., 2005. Eesti rabad: ökoloogilis-metsanduslik uurimus. Eesti Põllumajandusülikool, Metsanduslik Uurimisinstituut, Tartu.

Värnik, R., Oper, L., Luik, H., Roosmaa, Ü., Kall, K., Prants, J., 2011. Energiakultuuride (päideroo) kasvatamise ja kasutamise majanduslik hinnang Eestis (lõpparuanne). Eesti Maaülikool, Tartu.

Internetiallikad

CLUSTAL 2.1 – <http://www.genome.jp/tools/clustalw> (03.12.2012)

Functional Gene Pipeline/Repository (FGPR) – <http://fungene.cme.msu.edu/index.spr> (20.12.2012)

GraphPad QuickCalcs – <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD> (22.04.2013)

Maa-amet – <http://xgis.maaamet.ee/xGIS/XGis> (13.02.2013)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (01.12.2012)

OligoAnalyzer 3.1 – <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer> (20.12.2012)

The Ribosomal Database Project (RDP) – <http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp> (20.12.2012)

LISAD

LISA 1. Statistiliselt olulised erinevused (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001) uuritud gruppide katselappide turbakihtides füüsikalise-keemiliste parameetrites. Kasutatud tähistused: kuivaine (KA), üldsüsinik (TC), lahustunud orgaaniline aine (DOC), üldfosfor (TP), üldlämmastik (TN), üldväävel (TS).**

Tunnus	Kiht (cm)	Rühmad					
		taimestatud vs taimestamata katselapid (n=24)	kontrollapid (jun vs sept) (n=12)	kontroll vs väetatavad lapid (jun) (n=12)	kontroll δ vs väetatud δ (sept-jun) (n=12)	taimestatud kontroll vs väetatud (sept) (n=6)	taimestamata kontroll vs väetatud (sept) (n=6)
pH-H ₂ O	0-20						
	20-40						
	40-60	*					
KA (%)	0-20	**	*				
	20-40						
	40-60						
TC (%)	0-20						
	20-40	***					
	40-60						
DOC (mg/kg)	0-20	***					
	20-40	**	*				
	40-60				*		
TP (mg/kg)	0-20						
	20-40	*					
	40-60	*					
PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	0-20	***	***			***	
	20-40		***			**	*
	40-60		**			***	**
TN (mg/kg)	0-20						
	20-40						
	40-60				*		
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	0-20	***					
	20-40						
	40-60		**				
NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0-20		***				
	20-40		***				
	40-60		***				
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	0-20	**			*		*
	20-40						
	40-60						
TS (mg/kg)	0-20						
	20-40				*		
	40-60						
SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	0-20						
	20-40						
	40-60	*					
K (mg/kg)	0-20	*					**
	20-40			*			
	40-60						
Ca ²⁺ (mg/kg)	0-20	*			*		
	20-40						
	40-60	**					

LISA 2. Arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopiate arvukuste (GK/g KA) ning *mcrA* geeni osakaalu (*mcrA*/16S rRNA; %) omavahelised statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$) uuritud rühmade turbakihtides.**

Tunnus	Kiht (cm)	Taimestatud lapid (n=24)		Taimestamata lapid (n=24)		Taimestatud kontrolllapid (n=6)		Taimestatud väetatud lapid (n=6)		Taimestamata kontrolllapid (n=6)		Taimestamata väetatud lapid (n=6)	
		16S rRNA	<i>mcrA</i>	16S rRNA	<i>mcrA</i>	16S rRNA	<i>mcrA</i>	16S rRNA	<i>mcrA</i>	16S rRNA	<i>mcrA</i>	16S rRNA	<i>mcrA</i>
<i>mcrA</i>	0-20	0,68***		0,56**		0,83*		0,83*					
	20-40	0,65***		0,78***						0,94**			
	40-60	0,73***		0,78***		0,83*				0,89*		0,83*	
<i>mcrA</i> /16S rRNA	0-20	-0,47*	-0,48*									-0,83*	
	20-40			-0,45*									
	40-60												

LISA 3. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001) arhede 16S rRNA ja *mcrA* geeni koopte arvukuste (GK/g KA) ning *mcrA* geeni osakaalu (*mcrA*/16S rRNA; %) ja füüsikalise-keemiliste parameetrite vahel taimestatud ja taimestamata katselappide turbakihtides. Kasutatud tähistused: kuivaine (KA), üldsüsinik (TC), lahustunud orgaaniline aine (DOC), üldfosfor (TP), üldlämmastik (TN), üldväävel (TS).**

Tunnus	Kiht (cm)	Taimestatud lapid (n=24)			Taimestamata lapid (n=24)		
		16S rRNA	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> /16S rRNA	16S rRNA	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> /16S rRNA
pH-H ₂ O	0-20	-0,77***			-0,51*		
	20-40					0,43*	
	40-60	-0,74***					
Kuivaine (%)	0-20	-0,74***	-0,47*		-0,46*	-0,54**	
	20-40	-0,45*	-0,51*				0,45*
	40-60	-0,90***	-0,66***				
TC (%)	0-20						
	20-40					-0,52**	
	40-60	0,87***	0,62**				
DOC (mg/kg)	0-20	0,57**			0,43*		
	20-40	0,51*					
	40-60	0,64***	0,62**				
TP (mg/kg)	0-20	0,84***	0,57**		0,69***		
	20-40		0,53**		0,41*	0,45*	
	40-60	0,61**	0,47*				
PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	0-20						
	20-40						
	40-60						
TN (mg/kg)	0-20	0,89***	0,48*		0,61**		
	20-40						0,41*
	40-60	0,81***	0,45*				
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	0-20						
	20-40						-0,44*
	40-60	0,47*	0,47*		0,48*	0,48*	
NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0-20						
	20-40						
	40-60						
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	0-20	-0,47*	-0,49*	0,48*			
	20-40				-0,58**	-0,50*	
	40-60						
TS (mg/kg)	0-20	0,73***			0,72***	0,49*	
	20-40				0,64***	0,52**	
	40-60	0,91***	0,55**		0,65***	0,43*	
SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	0-20	0,62**			0,67***		
	20-40	0,42*	0,43*				
	40-60	0,75***					
K (mg/kg)	0-20	-0,61**					
	20-40						
	40-60	-0,77***	-0,48*				
Ca ²⁺ (mg/kg)	0-20	0,74***			0,73***		
	20-40	0,44*					-0,44*
	40-60	0,66***					

LISA 4. Keskkonnaparameetrite ja arhede 16S rRNA (16S) ja *mcrA* geeni koopiite arvukuste (GK/g KA) ning arhede koosluse *mcrA* geeni osakaalu (*mcrA*%) ja füüsikalise-keemiliste näitajate vahelised statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) uuritud gruppide turbakihtides. Kasutatud tähistused: kuivaine (KA), üldsisinik (TC), lahustunud orgaaniline aine (DOC), üldfosfor (TP), üldlämmastik (TN), üldväävel (TS).

Tunnus	Kiht (cm)	Taimestatud kontrolllapid (n=6)			Taimestatud väetatud lapid (n=6)			Taimestamata kontrolllapid (n=6)			Taimestamata väetatud lapid (n=6)		
		16S	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> %	16S	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> %	16S	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> %	16S	<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> %
pH-H ₂ O	0-20				-0,97**					0,94**			
	20-40					-0,83*		0,93**	0,93**				
	40-60	0,89*											
Kuivaine (%)	0-20	-0,99***						-0,83*					-0,89*
	20-40	-0,83*	-0,89*			-0,81*							
	40-60	-0,83*	-0,83*		-0,94**						-0,89*		
TC (%)	0-20						-0,81*						
	20-40												
	40-60		0,83*		0,89*						0,94**		
DOC (mg/kg)	0-20	0,94**					-0,94**			-0,94**			
	20-40												
	40-60										0,89*		
TP (mg/kg)	0-20	0,88*						0,93**					
	20-40							0,83*	0,94**				0,84*
	40-60	0,94**				0,81*							
PO ₄ ³⁻ -P (mg/kg)	0-20	0,82*											
	20-40												
	40-60												
TN (mg/kg)	0-20		0,86*		0,88*			0,90*					
	20-40												
	40-60	0,83*			0,94**								0,83*
NH ₄ ⁺ -N (mg/kg)	0-20	0,89*											
	20-40										0,83*		
	40-60	0,94**				0,83*						0,83*	
NO ₂ ⁻ -N (mg/kg)	0-20												
	20-40	0,83*									0,89*		
	40-60												
NO ₃ ⁻ -N (mg/kg)	0-20	0,89*											
	20-40		-0,83*								-0,83*	-0,89*	
	40-60												
TS (mg/kg)	0-20	0,89*	0,89*				-0,89*	0,94**					0,99***
	20-40												0,99***
	40-60		0,83*		0,94**							0,99***	0,81*
SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	0-20						-0,83*			-0,94**			
	20-40					0,83*			-0,89*		0,94**		
	40-60	0,94**										0,82*	
K (mg/kg)	0-20						0,89*	-0,89*			-0,94**	-0,83*	
	20-40						0,82*						
	40-60			0,81*	-0,83*								
Ca ²⁺ (mg/kg)	0-20							-0,94**					
	20-40					0,88*							
	40-60												

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mikk Espenberg (sünnikuupäev: 11.02.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju mulla arhede kooslusele ja selle metaanitootmise potentsiaalile mahajäetud freesturba tootmisalal“, mille juhendaja on vanemteadur Marika Truu,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 20.05.2012