

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogia erialal (12 EAP)

**Metaani tootmise ja tarbimise mikrobioloogiline potentsiaal
erinevat tüüpi haljaskatustel**

Kadri Kuusk

Juhendajad: Mikk Espenberg, PhD

Alar Teemusk, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

allkiri, kuupäev

Tartu 2020

Annotatsioon

Järjest suurenev linnastumine on põhjustanud mitmeid probleeme (nt soojusaare efekt, õhureostus), mida on võimalik haljaskatustega leevendada. Linnad on ka tundlikud kliimamuutustega, mille üheks põhjustajaks on kasvuhoonegaas metaan, kaasnevatele ekstreemumitele: üleujutused, kuuma- ja külmalained. Käesolevas töös uuriti bakterite, arhede, metanogeenide ja metanotroofide arvukusi ja proportsiooni mõjutavaid füüsikalisi ja keemilisi parameetreid erinevat tüüpi haljaskatustel. Lisaks hinnati geeniparameetrite seoseid CH₄ emissiooniga. Tulemustest selgus, et katusetüüp ei mõjuta statistiliselt oluliselt ühegi geeniparameetri arvukusi mullas, kuid mullapõhistel katustel on enam mõnevõrra metanotroofe ja seega ka suurem potentsiaal CH₄ siduda. Metanotroofide arvukusi mõjutasid peamiselt mullaniiskuse, pH, orgaanilise aine, süsiniku, lämmastiku ja fosfori muutused mullas. Haljaskatused ei ole sobivaks elupaigaks metanogeenidele.

Märksõnad: haljaskatused, metaan, mikrobioloogia

CERCS kood: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll, B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Abstract

The microbiological potential of methane production and consumption on different types of green roofs

Urbanisation has caused many problems (e.g. urban heat islands, air pollution), which can be alleviated with green roofs. Cities are also sensitive to the extremes that are caused by climate change. Among others, methane is considered one of the greenhouse gases contributing to that. The aim of this study was to research the abundance of bacteria, archaea, methanogens and methanotrophs and the physical and chemical parameters that affect their proportion on different types of green roofs. In addition, correlations between genetic parameters and CH₄ emission were also researched. The results showed that green roof type does not affect the abundance of genetic parameters, but soil-based green roofs' soils include more methanotrophs and have bigger potential for CH₄ binding. The abundance of methanotrophs was mainly affected by the changes of moisture content, pH, organic matter, carbon, nitrogen and phosphorus content in the soil. Green roofs are not suitable habitats for methanogens.

Keywords: green roofs, methane, microbiology

CERCS code: T270 Environmental technology, pollution control, B230 microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

1. Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1 Ökotehnoloogilisi lahendusi linnades	7
2.2 Haljaskatused	7
2.2.1 Keskkonnatingimused ja mikroobikooslus haljaskatustel	9
2.3 Metaan keskkonnas ja linnades	10
2.3.1 Metaani tootvad ja tarbivad mikroorganismid	11
2.3.2 Metaani bioloogilist tootmist ja tarbimist mõjutavad keskkonnategurid	11
2.4 Reaalaja PCR	12
3. Metoodika	14
3.1 Proovialade ja -võtu kirjeldus	14
3.2 DNA eraldamine ja DNA kvaliteedi hindamine	15
3.3 Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaja PCR meetodil	15
3.4. Reaalaja PCR andmete analüüs ja geenikoopiate arvutamine	17
3.5 Statistiline analüüs	17
4. Tulemused	18
4.1 Füüsikalised-keemilised parameetrid ja metaani gaasiemissioonid proovialal	18
4.2 Bakterite ja arhede arvukused ja nende omavaheline suhe pinnases	19
4.3 Metanogeenide ja metanotroofide arvukused ja proportsioonid prokariootidest pinnases ..	22
4.4 Geeniparameetrite omavahelised seosed ning nende seosed metaaniemissiooniga.....	24
5. Arutelu	26
6. Kokkuvõte	28
Summary	29
Tänuavaldused	31
Kirjandus	32

1. Sissejuhatus

Viimastel aastakümnetel on linnastumine olnud kiire ja tänasel päeval elab *ca* 53% inimpopulatsioonist linnapiirkondades (Moreno-Monroy *et al.*, 2020) ning seega mõjutavad nendes kohtades olevad keskkonnatingimused miljardite inimeste elukvaliteeti ja tervist (D'amato *et al.*, 2001). Linnades esinevad keskkonnaprobleemid kätkevad endas välisõhu (Daniels *et al.*, 2004; Dias & Tchepel, 2011) ja veevarude saastumist, mürareostust, ebapiisavat jäätmekäitlust ja haljasalade puudust (Hasan & Mulamoottil, 1994). Lisaks sellele on linnasüsteemid üsnagi tundlikud aina tihedamini esinevatele kliimamuutustega kaasnevatele ekstreemumitele nagu näiteks kuuma- ja külmalained, põuad, tormid ja tugevad vihasajud (üleujutused) (Filho *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2020). Samuti võimendavad kõrged ja äärmiselt kõrged temperatuurid ka linna soojussaare efekti, mis suurendab oluliselt terviseriske linnades (Santamouris, 2020). Eelnevalt nimetatud probleemidega tuleb linnakorralduses ja ka linnade ruumilisel planeerimisel arvestada (Jabareen, 2015). Nende küsimuste lahendamiseks peetakse üheks parimaks alternatiiviks mitmesuguseid kuluefektiivseid ökotehnoloogilisi lahendusi, milleks on teiste seas ka haljaskatused (Dong *et al.*, 2020). Linnamaastikul kasutatakse haljaskatuseid hoonete jahutamiseks, sademevee vooluhulga tasandamiseks ja puhastamiseks, haljasalade loomiseks ja õhureostuse vähendamiseks (Rowe & Getter, 2006). Ühe kõige olulisema probleemina on linnaõhu kvaliteedi parendamine saanud aina enam tähelepanu ja haljaskatused võivad selles osas aina suuremat rolli omandada (Speak *et al.*, 2012). Õhusaasteainete hulka loetakse ka kasvuhoonegaasid süsihappegaas (CO₂), metaan (CH₄) ja naerugaas (N₂O) (Freedman, 1995) ning neist CH₄ on 25 korda tugevam kasvuhoonegaas kui CO₂ 100 aasta lõikes (Zhang & Xu, 2018). CH₄ tekib anoksilistes keskkondades ning seda toodavad peamiselt arhede hulka kuuluvad metanogeenid (Kallistova *et al.*, 2017). CH₄ oksüdeerimine on eelkõige aeroobsetes keskkondades toimuv protsess, mida viivad läbi peamiselt bakteritest metanotroofid (Kallistova *et al.*, 2017; Kalyuzhnaya *et al.*, 2019).

Nende kahe mikroobse protsessi (metanogenees ja metanotroofsus) arvukuse ja aktiivsuse tasakaal mängib peamist rolli CH₄ ringluses pinnase ja atmosfääri vahel. Haljaskatuste võimalik roll CH₄ emissiooni vähendamises ja sellega seotud mikroobsete protsesside tagamaad on suures osas ebaselged. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida bakterite ja arhede ning metanogeenide (märklaudgeen *mcrA*) ja metanotroofide (märklaudgeen *pmoA*) arvukusi

ja proportsiooni mõjutavaid füüsikalis-keemilisi faktoreid ning hinnata geeniparameetrite seoseid CH₄ emissiooniga erinevat tüüpi haljaskatustel.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Ökotehnoloogilisi lahendusi linnades

Ökotehnoloogilisi lahendusi linnakeskkonna parandamiseks on mitmeid: haljaskatus (*green roof*) (Dong *et al.*, 2020), haljassein (*green wall*) (Jim, 2015), sademevee kasutus (*rainwater harvesting*) (Deitch & Feirer, 2019), imbsüsteem (*infiltration system*) (Conley *et al.*, 2020), puhverriba/haljasriba (*filter strip*) ning viibekraav (*swale*) (Gavrić *et al.*, 2019), taimestatud viibeala (*bioretention system*) (de Macedo *et al.*, 2017), vett läbilaskev kate (*pervious pavement*) (Hwang *et al.*, 2017), linnatiigid (*urban ponds*) ja -märgalad (*urban wetlands*) (Griffiths & Mitsch, 2020). Ühise omadusena aitavad need kõik looduslähedased meetmed linnades peamiselt sademevee vooluhulki ökotehnoloogiliselt kontrollida (Shuster & Dadio, 2017). Muu hulgas nimetatakse neid ka rohetaristuteks, mille eesmärk on ühendada looduslikud ja antropogeensed struktuurid ning tuua nii ökoloogilist kui ka sotsiaalmajanduslikku kasu, pakkudes uusi tegevusi ja võimalusi kohaliku elu edendamiseks läbi turismi, ökoturismi ning vabaaja- ja õppetegevuse (EEA, 2017)

2.2 Haljaskatused

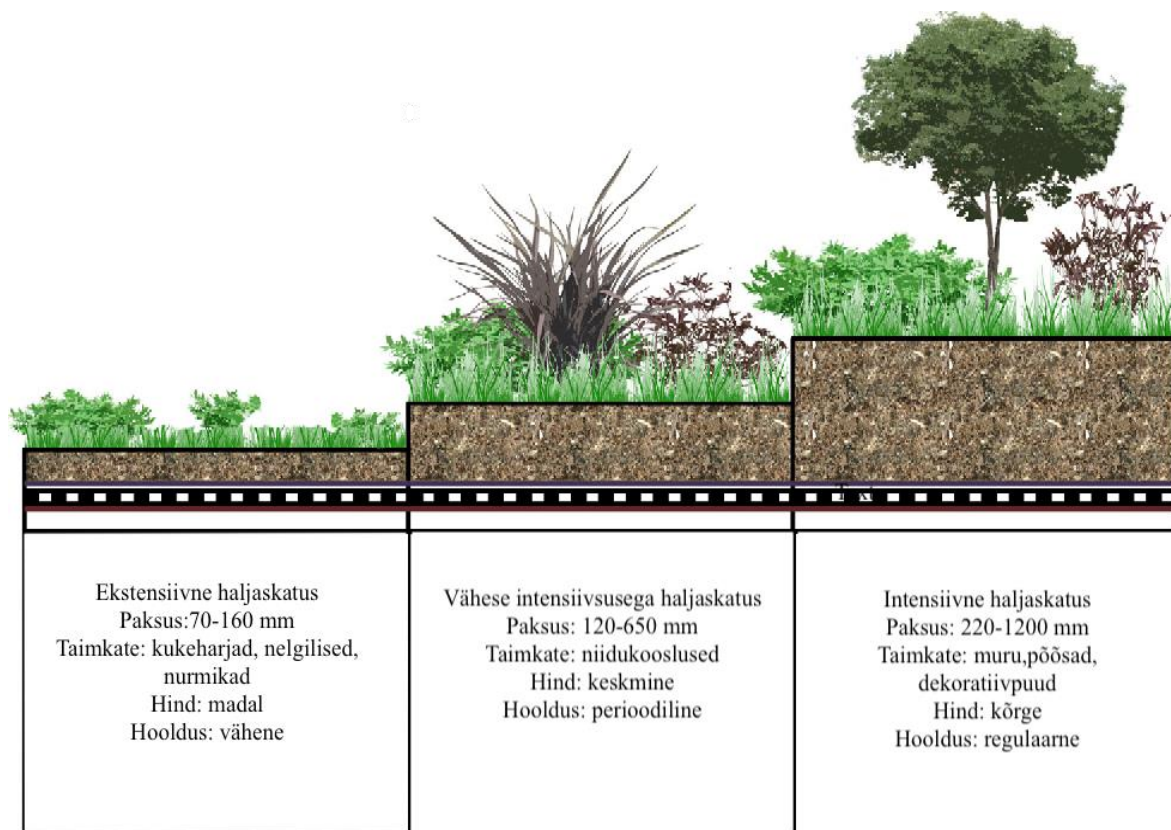
Haljaskatused erinevad tavakatustest selle poolest, et nende peal kasvab taimestik kergkruusal, mullal või nende kahe segul. Lisaks võib nende nimetamiseks kasutada ka mõisteid *murukatus*, *rohekatus* või *rohukatus* ja *taimekatus* (Teemusk, 2005).

Intensiivne ehitustegevus linnades on seal põhjustanud rohealade vähenemise, kuid seda on püütud pidurdada haljaskatuste rajamisega. Haljaskatused seovad passiivsete filtritena mitmesuguseid saasteaineid, teiste seas näiteks O₃, SO₂ ja NO₂, ja selle läbi puhastavad ka õhku linnas (Yang *et al.*, 2008; Speak *et al.*, 2012). Samuti on neil oluline roll hoonete energiatõhusamaks muutmisel, üleujutuste ja soojussaare efekti vähendamisel ning linnapildi ilusamaks muutmisel (Rowe & Getter, 2006). Soojussaare efekti vähendamiseks suurendavad haljaskatused katuste pindade albeedot ehk suureneb pinna peegeldumisvõime ning päikeseenergiat salvestub vähem. Sellele lisaks jahutavad taimed õhku transpiratsiooni tõttu ja jahutavale efektile aitab kaasa ka veel substraadikihi aurumine (Santamouris, 2014). Haljaskatused muudavad hooneid energiatõhusamaks, kätitudes isolatsioonikihina ja hoides suvel siseruumid jahedamad ning talvel soojemad. Haljaskatuste soojustav mõju on suurim, kui substraadikiht on piisavalt paks ning sisaldab palju õhku, mis on halb soojusjuht (Castleton *et al.*, 2010). Kliima soojenemise tõttu on muutunud tihedamaks ekstreemsete vihmasadude esinemine (Filho *et al.*, 2019) ning seetõttu on oluline, et sademevett juhitakse ära efektiivselt.

Haljaskatused suudavad lühikest aega endas säilitada vihmavett, mis vähendab korraga kanalisatsiooni jõudvat äravooluhulka (Theodosiou, 2009). Samuti seotakse osa sademetest substraadikihi pooriruumi ja taimestikku, kust see võib transpiratsiooni teel jõuda ka tagasi atmosfääri (Nagase & Dunnett, 2012). Belgias tehtud uuringuga on näidatud, et haljaskatustel on linnamüra summutav efekt ning ekstensiivne haljaskatus võib vähendada müra kuni 10 dB (van Renterghem & Botteldooren, 2008).

Enim levinud haljaskatuste jaotusviisi on kirjeldatud järgmiselt (Koorberg, 2001) (joonis 1):

- (1) Ekstensiivne katusehaljastus – pinnase kihid on valdavalt õhukesed (70–160 mm) ja kasvusubstraadiks on kergkruus. Neil haljaskatustel kasvavad peamiselt peaaegu hooldusvabad ja vähenõudlikud taimed nagu näiteks kukeharjad, nelgilised ja nurmikad. Üldjuhul ei ole ekstensiivsed haljaskatused käidavad.
- (2) Väheese intensiivsusega katusehaljastus – pinnase kihtide paksus on 120–650 mm ja taimkatteks on tavaliselt niidukooslused, mis vajavad võrreldes eelmise tüübiga enam hooldust.
- (3) Intensiivne katusehaljastus – pinnase kihtide paksus on 220–1200 mm. Nende haljaskatuste taimkate koosneb murust, põõsastest ja dekoratiivpuudest, mis vajavad rohkelt hooldust. Sellised haljaskatused on käidavad.



Joonis 1. Haljaskatuste levinuim jaotusviis. (Fernandez-Cañero *et al.*, 2013)

2.2.1 Keskkonnatingimused ja mikroobikooslus haljaskatustel

Haljaskatustel valitsevad keerulised keskkonnatingimused, sest need on avatud paljude tegurite koosmõjule (nt tuul ja päikese kiirgus), ja üldjuhul koloniseerivad neid elupaiku vastupidavad liigid (Fulthorpe *et al.*, 2018). Olulisemateks kasvuparameetriteks on temperatuur ja mullaniiskus, mis mõjutavad haljaskatustel tekkivaid ja kasvavaid organismide kooslusi (Baryła *et al.*, 2019). Erinevate kasvusubstraatidega saab edendada sobivate mikroobikoosluste ja taimkatte tekkimist (Molineux *et al.*, 2014). Mikroobikooslus võib muuta taimed nii soolaja põuakindlamaks kui ka patogeenidele vastupidavamaks. Nende mõjul muutuvad samuti toitained taimedele kättesaadavamaks ning soodustub fütohormoonide tootmine (Fulthorpe *et al.*, 2018). Mikroobikooslused mõjutavad haljaskatuste ökosüsteemi (Rumble & Gange, 2013) ning mitmekesisem mikroobikooslus võimaldab haljaskatusel kasvada rohkematel taimedel ning suurendab liigirikkust (Molineux *et al.*, 2015). Lisaks on näidatud, et arbuskulaarse mükoriisaga seente spooride ja kompostimikroobidega rikastatud kasvusubstraadi mõjul kasvasid taimed lopsakamalt ning suurenes ka taimede lehepinna indeks (Molineux, 2010).

Kõrgem mullatemperatuur stimuleerib mikroorganismide aktiivsust, mis omakorda suurendab CO₂ emissiooni. Oluliseks parameetriks on ka mullaniiskus, mis reguleerib orgaanilise aine

tsükli ja suurendab bioloogilist aktiivsust substraadikihis. Mullaniiskus sõltub peamiselt õhuniiskusest, päikesekiirgusest ja evapotranspiratsioonist (Marasco *et al.*, 2014). CO₂ voogu mõjutab ka ümbritsevate hoonete vari haljaskatustele: päeval ajal varjus paiknevate katuste mullatemperatuur on madalam ning mullaniiskus kõrgem ning seetõttu on CO₂ voog väiksem kui päikesele avatud haljaskatusel (Teemusk *et al.*, 2019). N₂O emissioon sõltub peamiselt substraadikihi paksusest (Carter *et al.*, 2011; Teemusk *et al.*, 2019). CH₄ seotakse hästi aereeritud substraadikihis, mis on õhurikas ning piisavalt niiske (Teemusk *et al.*, 2019).

2.3 Metaan keskkonnas ja linnades

Märgaladelt pärineb 30% globaalsest CH₄ emissioonist (Yu *et al.*, 2010), kuna seal on CH₄ tekkeks soodsad tingimused: palju orgaanikat ja sügavamal paiknevad anaeroobsed kihid (Whalen, 2005). Sellegipoolest on oluline märgalaid mitte kuivendada, vältimaks ladestunud süsiniku oksüdeerimist süsihappegaasiks ning ökosüsteemide liigirikkuse hävitamist (Heilig, 1994). Looduslikku päritolu on ka geoloogiline CH₄, mille hulka kuulub lisaks geotermaalsetest ja (muda)vulkaanilistest aladest pärinevale metaanile, mida satub atmosfääri aastas 40–60 Tg, ka ookeanisetetes leiduv metaanhüdraat, mille emissiooniks on hinnatud aastas 4–5 Tg (Etiopie, 2010). Samuti toodavad seedetraktis fermentatsiooni kõrvalproduktina CH₄ termiidid, kelle aastast panust emissiooni on varasemalt ülehinnatud 310 Tg, kuid kes on siiski loodusliku CH₄ allikaks, tootes alla 10 Tg CH₄ aastas (Bignell, 2010).

Rohkem kui 60% globaalsest CH₄ emissioonist on antropogeenne (Heilig, 1994; Saunio *et al.*, 2017). Sellisteks peamisteks metaaniallikateks on õli- ja gaasitööstuse lekkes, söetööstus, rafineerimistehased, prügilad, reoveepuhastid, biomassi põletamine, riisipõllud ning karjakasvatus (Heilig, 1994; Schwietzke *et al.*, 2017). CH₄ emissiooni karjakasvatusest põhjustavad metanogeenid, kes elutsevad mäletsejate seedetraktis ning toodavad hapnikuvabas keskkonnas CH₄ (Heilig, 1994). Prügilate metaaniallikaks on prügilagaas, mis koosneb peamiselt metaanist ja süsihappegaasist, mis tekib prügis sisalduva orgaanilise aine anaeroobsel lagunemisel. Selle kompenseerimiseks kasutatakse kattekihte, kus on sobivad elutingimused metanotroofidel (Heinsoo, 2016). Lisaks kogutakse prügilagaasi ning seda kasutatakse prügilas kütusena soojusenergia või elektrienergia saamiseks, kuid lisandite tõttu on seda vaja enne gaasivõrku saatmist puhastada (Ayodele *et al.*, 2020).

Tööstuspiirkonnad asuvad linnadele lähedal ja see on põhjustanud seal CH₄ kontsentratsiooni suurenemist. Samuti on inimeste arvu kasv linnades toonud kaasa autode rohkuse ning seega ka nendest pärinevate heitgaaside (CO₂, CH₄, NO) suurema koguse (Nakagawa *et al.*, 2005)

2.3.1 Metaani tootvad ja tarbivad mikroorganismid

Metanogeenid on mikroorganismid, kes toodavad anaeroobilise lagundamise käigus kõrvalproduktina metaani (Enzmann *et al.*, 2018). Metanogeenid kuuluvad arhede domeeni ja on klassifitseeritud kahte hõimkonda: *Euryarchaeota* ja *Crenarchaeota* (Ma *et al.*, 2016). Metanogeenide markeriks on ensüümi metüül-koensüüm M reduktaasi kodeerimises osalev *mcrA* geen (Juottonen, 2008; Milferstedt *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2016).

Metanotroofid ehk CH₄ oksüdeerivad bakterid on mikroorganismid, kes oksüdeerivad CH₄ süsiniku ja energia saamiseks. Metanotroofid on võimelised CH₄ kasutama energiaallikana tänu ensüümile, mida nimetatakse metaani monoooksügenaasiks ja mida kodeerib geen *pmoA*. Selle sama ensüümi tõttu on metanotroofe võimalik kasutada ka bioremediatsiooniks, oksüdeerides orgaanilisi reostusained, nagu näiteks alkaane, aromaatsed ühendeid, halogeenitud alkeene (Pandey *et al.*, 2014). Aeroobsed metanotroofid kuuluvad 3 fülogeneetilisse gruppi: tüüp I, tüüp II ja tüüp X. Tüüp I moodustavad gammaproteobakterid, kelle hulka kuuluvad *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylothermus*, *Methylohalobius*, *Methylosarcina* ja *Methylosphaera*. Tüüp II moodustavad alfavroteobakterid, nagu näiteks *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocapsa* ja *Methylocella*. Tüüp X moodustavad samuti gammaproteobakterid *Methylococcus*, *Methylocaldum* *Crenothrix polyspora* ja *Clonothrix fusca* (Kalyuzhnaya *et al.*, 2019).

CH₄ tarbivad ka bakterid, mis rakendavad N-DAMO (nitritist sõltuv anaeroobne CH₄ oksüdeerimine) mehhanismi. N-DAMO protsessi käigus redutseeritakse nitrit lämmastikoksiidiks, mis omakorda muudetakse molekulaarseks lämmastikuks ning hapnikuks. Hapnik osaleb CH₄ oksüdeerimisel (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2018). Kuigi metanotroofid on peamiselt bakterid, siis leidub ka anaeroobselt CH₄ oksüdeerivaid arhesid (ANME), kellel on välja arenenud metanogeneesi pöördreaktsioon ning kes on võimelised tarbima CH₄, et toota energiat (Hallam *et al.*, 2004). N-DAMO ja ANME on suhteliselt hiljuti kirjeldatud protsessid ning nende roll metaaniringes on suuresti veel selgumisel.

2.3.2 Metaani bioloogilist tootmist ja tarbimist mõjutavad keskkonnategurid

Metanogeenid elavad rangelt anoksilistes tingimustes, kus on piisavalt orgaanilist materjali. Metanogeenide arvukusega pöördvõrdelises sõltuvuses on süsihappegaasi ja lahustunud hapniku kontsentratsioon (Lew & Glińska-Lewczuk, 2018)

Metanotroofe on leitud nii aeroobsetest, anaeroobsetest, happelistest kui ka aluselitest keskkondadest. Samuti mageveekogudest kui ka soolastest veekogudest ning oligotroofsetest ja saastunud keskkondadest (Kalyuzhnaya *et al.*, 2019). Neid võib muuhulgas leida ka ekstreemsetest oludest (Samad, 2012). Kuigi metanotroofid on looduses laialt levinud, on täheldatud, et nad saavad üldiselt paremini hakkama aeroobsete ja anaeroobsete keskkondade piirpinnal, kus on palju CH₄, mida toodavad anaeroobses keskkonnas olevad metanogeenid (Kalyuzhnaya *et al.*, 2019).

Soojärvedes metanotroofide ja metanogeenide kohta tehtud uuringust selgus, et kuigi metanotroofide jaoks on optimaalseks keskkonnaks pinnalähedased hästi oksüdeeritud veekihiid, siis leidub neid ka järve põhjas ning nende elutegevus ei sõltu ainuüksi lahustunud hapniku juuresolust (Lew & Glińska-Lewczuk, 2018). Samuti on metanotroofid võimelised paremini kohanema muutuvate elutingimustega kui metanogeenid ja nende aktiivsus sõltub vähem hapniku kontsentratsioonist. Järvepõhjas on metanotroofidele oluline orgaanilise lämmastiku ja CO₂ hulk. Uppsala ülikoolis tehtud uuring näitas, et parasvöötme järvedes oli metanotroofide arvukus sõltuv aastaajast ehk talvel oli nende hulk suurem ja suvel väiksem, kuigi bakterite koguarv oli suvel suurem (Samad, 2012). Madalamatel temperatuuridel domineerivad Tüüp I metanotroofid ning kõrgematel Tüüp II metanotroofid (Mohanty *et al.*, 2007).

2.4 Reaalaja PCR

Reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative Polymerase Chain Reaction* – qPCR) põhineb pideva mõõdetava signaali (fluorestsentsignaali) detekteerimisel, mis tekib polümeraasi ahelreaktsiooni amplifikatsiooni käigus ning selle abil saab kvantifitseerida proovis sisalduva markergeeni hulka (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). qPCR võimaldab kvantifitseerida spetsiifilist geeni ning märklaudgeenideks võivad olla nii bakterite 16S rRNA ja arhede 16S rRNA geenid kui ka mitmesugused funktsionaalsed geenid nagu näiteks *mcrA* ja *pmoA*. qPCR kasutab fluorestseeruvaid määrgiseid, mis seonduvad produktidega reaktsiooni käigus (Thies, 2015).

qPCR-i protsessis toimub arvukalt tsükleid ning igas tsüklis on mitu etappi. Esimeses etapis, mida nimetatakse denaturatsiooniks, toimub kaheaheelalise DNA harutamine üheaheelaliseks DNA-ks. Järgmisena seonduvad praimerid (*annealing*) markergeenidele. Praimeritest sõltub see, et millist DNA lõiku amplifitseeritakse ja selleks on vaja kasutada nii pärisuunalist kui ka vastassuunalist praimerit. Siis sünteesitakse protsessis DNA-d praimeritega seonduvad alalt

(DNA süntees). Reaktsioonilahusse lisatud fluorestseeruv aine seondub sünteesil DNA-ga ja tekitab fluorestsentsignaali, mis peegeldab produkti kogust. Esimeste tsüklite järel on fluorestsentsignaali nõrk, kuid produkti akumulatsioonil korduvate tsüklite käigus signaal suureneb eksponentsiaalselt, kuni lõpeb mõne olulise komponendi hulk reaktsioonilahuses ning seega reaktsiooni enam ei toimu ja fluorestsentsignaali jõuab platoole (Kubista *et al.*, 2006).

Märklauageenide koopiate arvude rehkendamiseks uuritavas materjalis kasutatakse analoogselt analüüsitud kaliiberkõveraid, mis on saadud teatud koguses vastavat geenilõiku sisaldavast standardlahuse reast (Espenberg *et al.*, 2018)

3. Metoodika

3.1 Proovialade ja -võtu kirjeldus

Käesolevas töös uuritud haljaskatused asusid üle Eesti erinevates kohtades ja neid saab jaotada kasvukihi alusel kolme klassi: matipõhised haljaskatused (3 katust), kergkruusapõhised haljaskatused (4 katust) ja mullapõhised haljaskatused (7 katust) (Tabel 1). Lisaks haljaskatustele võeti proovid ka looduslikult kontrollalalt (Naage). Detailsed kirjeldused leiab katuste asukoha ja taimkatte kohta Kert Kelleri magistriltööst (Keller, 2017).

Tabel 1. Töös uuritud haljaskatused ja nende tüübid (kergkruusapõhised (K) ja mullapõhised (M) katused) ning looduslik kontrollala (L) rajamise aasta ning pinnasekihi paksusega.

Kood	Katus	Katuse asukoht	Rajatud	Tüüp	Kihi paksus (mm)
Arc	Archimedes	Tartu (Tartumaa)	2003	Kergkruusakatus (K)	100
TÜTI	TÜTI e Tehnoloogiainstituut	Tartu (Tartumaa)	2005	Kergkruusakatus (K)	120
EMÜ	Maaülikool	Tartu (Tartumaa)	2007	Kergkruusakatus (K)	110
VP	Viimsi Pargi lasteaed	Viimsi alevik (Harjumaa)	2002	Kergkruusakatus (K)	200
Iis	Iisaku	Iisaku alevik (Ida-Virumaa)	2012	Kukeharjamatikatus (K)	50
Pal	Palamuse	Palamuse alevik (Jõgevamaa)	2010	Kukeharjamatikatus (K)	30
Rak	Rakvere algkool	Rakvere (Lääne-Virumaa)	2006	Kukeharjamatikatus (K)	60
HH	Haanja Horoski	Horoski küla (Võrumaa)	2005	Mätaskatus (M)	120
L03	Loomaaed'03	Tallinn (Harjumaa)	2003	Mätaskatus (M)	150
L08	Loomaaed'08	Tallinn (Harjumaa)	2008	Mätaskatus (M)	150
MG	Mägede garaaž	Mägede küla (Järvamaa)	2009	Mätaskatus (M)	250
MK	Mägede kelder	Mägede küla (Järvamaa)	2011	Mätaskatus (M)	200
Uus	Uusküla	Uusküla küla (Ida-Virumaa)	2013	Mätaskatus (M)	100
UK	Ujula Konsum	Tartu (Tartumaa)	2007	Lame murukatus (M)	100
Naa	Naage	Harjumaa		Loopealne (L)	100–150

Iga katuse pinnasekihist võeti komposiitproov kogu profiili ulatuses mikrobioloogilisteks ja keemilisteks analüüsideks 2016. aasta augustis. Koheselt määrati proovidest standardmeetoditega pH, üldsüsiniku (C), orgaaniline aine, üldlämmastiku (N), nitraadi (NO₃-N), ammoniumi (NH₄-N), üldfosfori (P), üldväävlit (S), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca) ja magneesiumi (Mg) väärtused (Keller, 2017). Mikrobioloogilisteks analüüsideks säilitati pinnaseproovid -20 °C juures sügavkülmikus.

Haljaskatustelt koguti CH₄ emissioonid staatilise suletud pimekambri meetodil ja proovides määrati CH₄ kontsentratsioon hiljem laboris gaaskromatograafia. Lisaks mõõdeti igal välitööde päeval ka mullatemperatuur ja -niiskus. Välitöid tehti 2016. aasta maist kuni septembrini (Keller, 2017). Töö autor proovivõtul ning keemia- ning gaasiparameetrite mõõtmisel ja määramisel ei osalenud.

3.2 DNA eraldamine ja DNA kvaliteedi hindamine

Mullaproovidest DNA eraldamiseks kasutati komplekti PowerSoil® DNA Isolation Kit (Qiagen, USA) järgides tootjapoolset juhendit. DNA eraldati 0,25 g proovidest ning erinevalt juhendist toimus proovide homogeniseerimine 5000 pööret minutis 20 sekundi jooksul homogenisaatoril Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). Samuti modifitseeriti juhendit, et suurendada DNA kontsentratsiooni: 60 µl C6 lahust lisati filtrile ning tsentrifuugiti 30 sekundit 10 000 x g juures. Filtrit läbinud lahus kanti uuesti filtrile ning tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Viimasena lisati 40 µl C6 lahust filtrile ning tsentrifuugiti 30 sekundit. Spektrofotomeetrit Infinite 200 M (Tecan AG, Austria) kasutati DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja kvaliteedi hindamiseks. Edasiste analüüside jaoks säilitati eraldatud DNA -20 °C juures sügavkülmikus.

3.3 Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaaja PCR meetodil

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) abil määrati proovidest bakterite ja arhede 16S rRNA ning funktsionaalsete *mcrA* ja *pmoA* geenide arvukused. Kõik qPCR-i reaktsioonid viidi läbi termotsükleriga Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). Analüüsitava proovi maht oli 10 µl, mis sisaldas 1 µl eraldatud DNA-d, 0,3 µl (*mcrA* geeni praimerite puhul 0,4 µl) päri- ja vastassuunalist praimerit, 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ning ülejäänud koguses destilleeritud vett. Kolmes korduses amplifitseeriti kõiki proove ja ka negatiivset kontrollproovi, millesse DNA-d ei lisatud.

Bakterite märklaudgeeni 16S rRNA (päri- ja äraspidiste praimerite järjestused (5'-3') vastavalt GCCAGCAGCCGCGGTAA (Liu *et al.*, 2007) ja CGACARCCATGCASCACCT (Huse *et al.*,

2008)) kvantifitseerimiseks kasutati järgmist qPCR programmi: 50 °C juures 2 minutit ning sellele järgnes esmane denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 35 tsüklit 95 °C 30 sekundit denaturatsiooni, 60 °C 45 sekundit seondumise ja 72 °C 45 sekundit ekstensiooni etappi.

Arhede märklaudgeeni 16S rRNA (päri- ja äraspidiste praimerite järjestused (5'-3') vastavalt CAGYCGCCRCGGTAA ja GCYCCCCCGCCWATTC (Espenberg *et al.*, 2016)) qPCR programm: 50 °C juures 2 minutit ning sellele järgnes esmane denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 35 tsüklit 95 °C 15 sekundit denaturatsiooni, 56 °C 30 sekundit seondumise ja 72 °C 30 sekundit ekstensiooni etappi.

Märklaudgeeni *mcrA* (päri- ja äraspidiste praimerite järjestused (5'-3') vastavalt CASTTYGGHGGWTCHCA ja TGVAGRTCGTADCCRWAGAA (Espenberg *et al.*, 2016)) qPCR programm: 50 °C juures 2 minutit ning sellele järgnes esmane denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 55 tsüklit 95 °C 15 sekundit denaturatsiooni, 51 °C 30 sekundit seondumise ja 72 °C 30 sekundit ekstensiooni etappi.

Märklaudgeeni *pmoA* (päri- ja äraspidiste praimerite järjestused (5'-3') vastavalt GGNGACTGGGACTTCTGG ja CCGGMGCAACGTCYTTACC (Costello & Lidstrom, 1999)) qPCR programm: 50 °C juures 2 minutit ning sellele järgnes esmane denaturatsioon 95 °C 10 minutit, millele järgnes 35 tsüklit 95 °C 15 sekundit denaturatsiooni, 57 °C 30 sekundit seondumise ja 72 °C 30 sekundit ekstensiooni etappi.

Kõik qPCR programmid lõppesid ahelate sulatamise etapiga: 65-95 °C, kus tõsteti temperatuuri 0,35 °C kaupa.

3.4. Reaalaja PCR andmete analüüs ja geenikoopiate arvutamine

Andmete esmaseks analüüsiks kasutati termotsükleri Rotor-Gene Q tarkvaraprogrammi Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen, USA), mille abil tehti amplifikatsiooni- ja sulamiskõverate analüüs enne programmi LinRegPCR (v 2018.0) (Holland) kasutamist. Selle programmiga hinnati iga proovi amplifikatsiooni efektiivsust ja sellega võeti ka efektiivsus geenikoopiate arvude rehkendamisel arvesse. Programmiga STATISTICA (v 7.1) (TIBCO, USA) kontrolliti ühefaktorilise dispersioonianalüüsiga (*one-way ANOVA*) proovide efektiivsuste põhjal, et kas proove on vaja amplikonideks jagada. Kuna statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud proovide amplifikatsiooni efektiivsuste vahel erinevate haljaskatuste tüüpide puhul, siis ei jagatud proove amplikonideks. Geenikoopiate arvukuse leidmiseks kasutati kaliiberkõvera vahemikke. Detailsemalt on kirjeldatud geenikoopiate arvude arvutamist Espenbergi ja kolleegide töös (Espenberg *et al.*, 2018)

Geenikoopiate arvukus on esitatud geenide koopiaarvudena ühe grammi kuiva mulla kohta (GK/g KA). Funktsionaalsete geenide arvukus on esitatud lisaks ka proportsioonina prokarüootidest ehk bakterite ja arhede koguarvukusest.

3.5 Statistiline analüüs

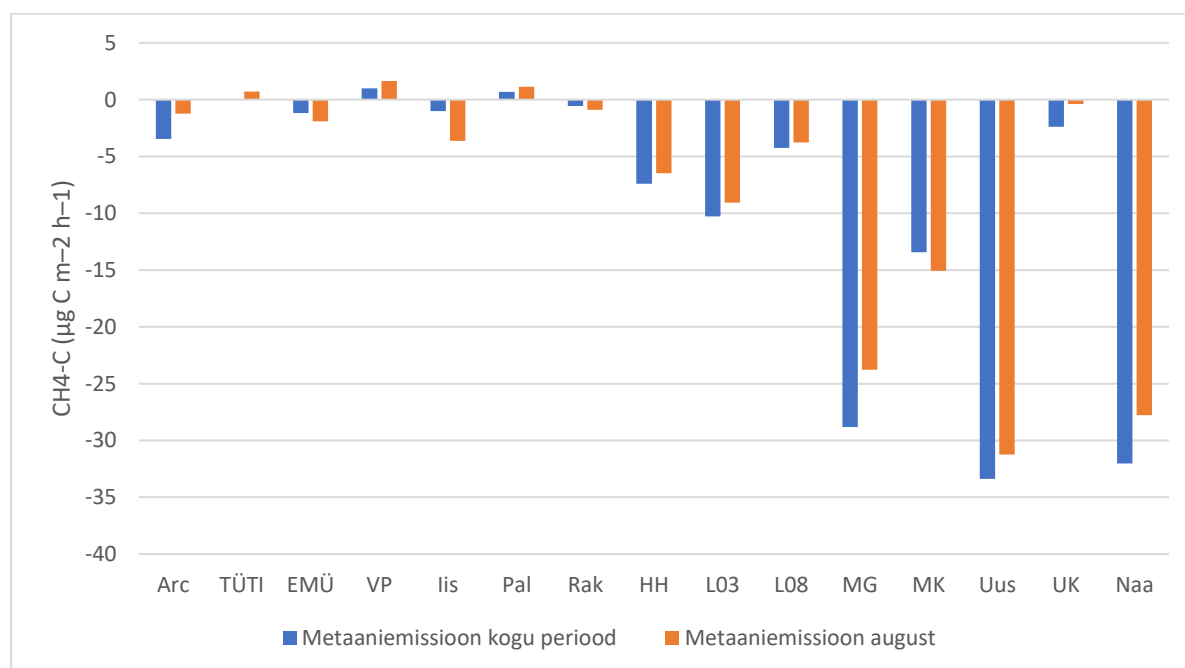
Geeniparameetreid analüüsiti kõik koos ja kahes rühmas (kergekruusa- ja mullapõhised katusetüübid). Analüüsid tehti programmiga STATISTICA, kasutades t-testi ning Spearmani korrelatsioonikoefitsienti. T-testiga võrreldi geeniparameetreid kahes rühmas (kergekruusa- ja mullapõhised katusetüübid). Spearmani testiga võrreldi geeniparameetreid ja füüsikaliskemiliseid parameetreid kõikide katusetüüpide lõikes (N=14) ning ka ainult mullapõhiste (N=7) ja kergkruusapõhiste (N=7) haljaskatuste lõikes.

4. Tulemused

4.1 Füüsikalis-keemilised parameetrid ja metaani gaasiemissioonid proovialal

Haljaskatuste keskmine mullatemperatuur augustikuus oli 18 °C. Kogu mõõteperioodi (mai-august) mullatemperatuur oli keskmiselt 22 °C. Augustis oli keskmine mullaniiskus 0,23 m³/m³ ning kogu mõõteperioodi mullaniiskus oli keskmiselt 0,30 m³/m³. Haljaskatuste muldade pH varieerus vahemikus 4,57–7,82. Mulla lämmastikisisaldus varieerus vahemikus 0,05–0,68%; mulla süsinikisisaldus 0,95–9,77% ning mulla väävlisisaldus 0,01–0,10%. Orgaanilise aine sisaldus mullas jäi vahemikku 1,16–15,18%. NO₃-N sisaldus haljaskatuste muldades oli vahemikus 0,00–2,26 mg/kg ning NH₄-N sisaldus vahemikus 1,64–8,61 mg/kg. Haljaskatuste mullad sisaldasid vahemikus 8,70–249,25 mg/kg fosforit, 10,32–132,16 mg/kg kaaliumi ning 5,84–158,47 mg/kg magneesiumi. Detailsema kirjelduse leiab Kert Kelleri magistritööst (Keller, 2017).

CH₄ voog augustis olid keskmiselt –6,71 µg C m⁻² h⁻¹ (joonis 2). Kogu perioodi keskmine CH₄ voog oli –7,68 µg C m⁻² h⁻¹. Detailsed mõõtmistulemused on kirjeldatud Kert Kelleri magistritöös (Keller, 2017).



Joonis 2. Augusti ja kogu mõõtmisperioodi keskmised metaaniemissioonid eri tüüpi haljaskatustel. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

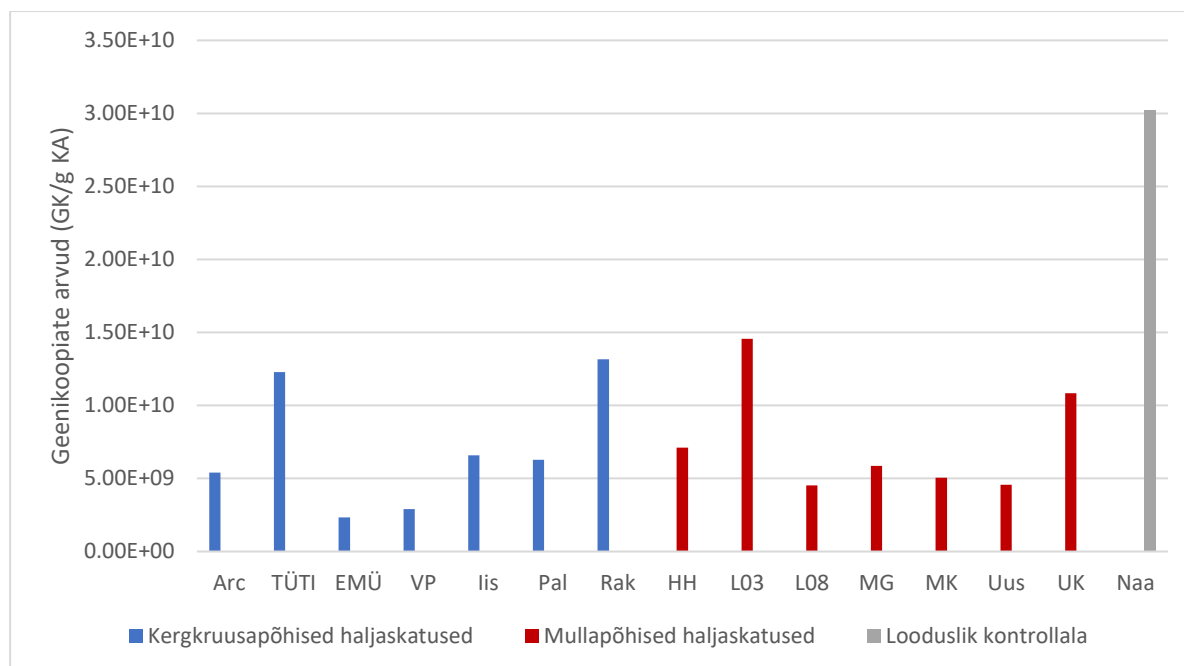
Mullapõhiste katuste muldadel oli oluliselt suurem mullaniiskus augustis ($p < 0,01$) ja ka kogu mõõtmisperioodil ($p < 0,01$) kui kergkruusakatuste muldadel. T-testi tulemustest ilmses veel, et kergkruusakatuste pH oli kõrgem kui mullapõhiste haljaskatuste pH ($p < 0,05$). Samuti oli oluliselt kõrgem kergkruusakatuste mulla magneesiumisisaldus ($p < 0,01$) ja väävlisisaldus ($p < 0,05$) kui mullapõhistel katustel.

T-test näitas, et mullapõhistel katustel esines suurem CH_4 sidumine nii augustis ($p < 0,05$) kui ka perioodi käigus ($p < 0,05$).

4.2 Bakterite ja arhede arvukused ja nende omavaheline suhe pinnases

Uuritud katuste pinnaseproovide bakterite geenikoopiate arvukus oli vahemikus $2,33 \cdot 10^9$ kuni $1,46 \cdot 10^{10}$ GK/g KA (joonis 3). Kergkruusakatuste bakterite geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $6,99 \cdot 10^9 \pm 4,24 \cdot 10^9$ GK/g KA ja mullapõhiste katustel katustel oli $7,51 \cdot 10^9 \pm 3,81 \cdot 10^9$ GK/g KA. Kergkruusa- ja mullapõhistel katustel ei ilmnunud bakterite geenikoopiate arvukuses olulist erinevust.

Mulla lämmastiksisalduse ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel oli oluline positiivne seos ($R=0,70$; $p < 0,01$) ning positiivne seos oli ka mulla süsiniksisalduse ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel kõigi katuste lõikes ($R=0,64$; $p < 0,05$). Mulla magneesiumsisalduse ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel oli oluline positiivne seos kõigi katuste lõikes ($R=0,56$; $p < 0,05$). pH ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel oli oluline negatiivne seos kergkruusapõhistel katustel ($R=-0,79$; $p < 0,05$).



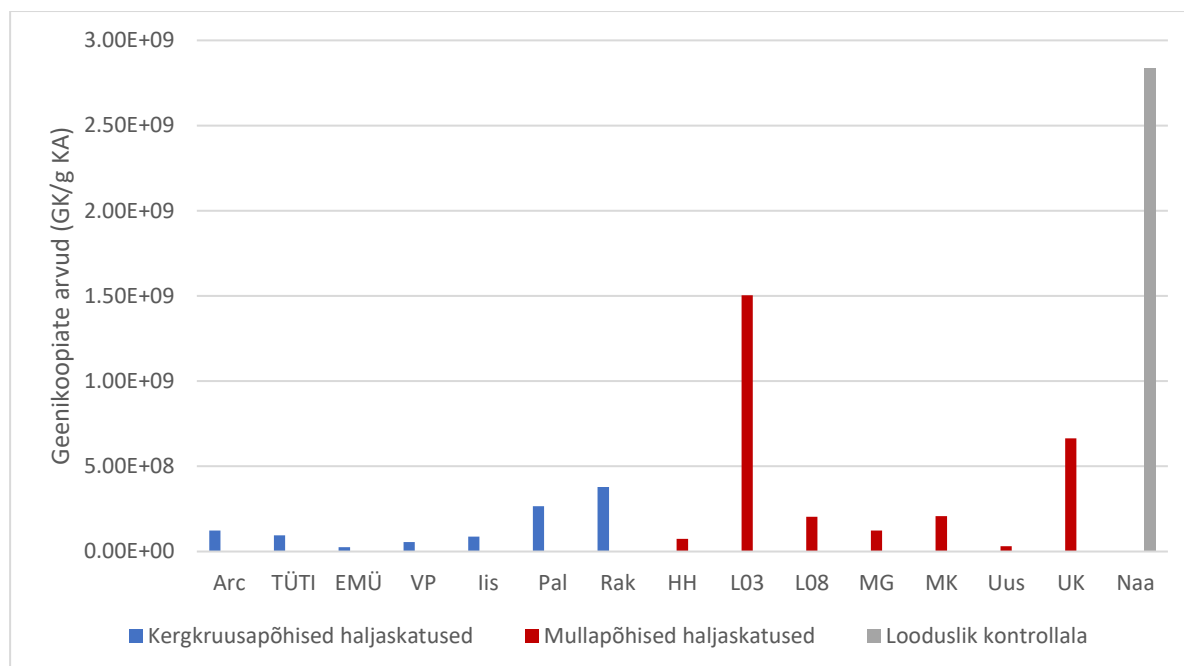
Joonis 3. Bakterite geenikoopiate arvukused erinevat tüüpi haljaskatustel ja looduslikul kontrollalal. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

Katuste pinnaseproovide arhede geenikoopiate arvukus oli vahemikus $2,52 \cdot 10^7$ kuni $1,50 \cdot 10^9$ GK/g KA. Kergkruusakatuste arhede geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $1,47 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8$ GK/g KA ja mullapõhistel katustel $4,01 \cdot 10^8 \pm 5,30 \cdot 10^8$ GK/g KA (joonis 4). Kergkruusa- ja mullapõhistel katustel ei ilmnenud arhede geenikoopiate arvukuses olulist erinevust.

Mullaniiskuse ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel oli positiivne seos ($R=0,60$; $p<0,05$) ning positiivne seos oli samuti mulla lämmastiksisalduse ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel kõigi katuste lõikes ($R=0,60$; $p<0,05$). Statistiliselt oluline seos oli ka fosfori ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel kõigi katuste lõikes ($R=0,70$; $p<0,01$).

Kergkruusapõhistel haljaskatustel oli oluline negatiivne seos pH ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel ($R=-0,86$; $p<0,05$) ning positiivne seos mulla väävlisisalduse ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,77$; $p<0,05$).

Mullapõhistel katustel oli oluline positiivne seos pH ja arhede geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,79$; $p<0,05$).

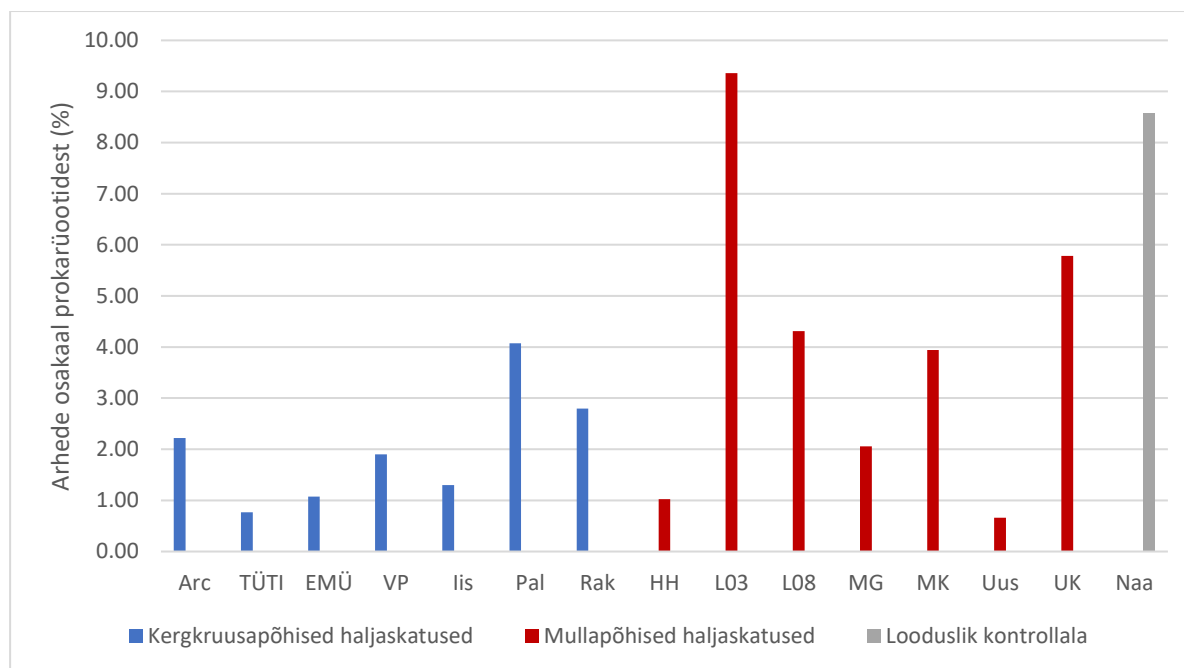


Joonis 4. Arhede geenikoopiate arvukused erinevat tüüpi haljaskatustel ja looduslikul kontrollalal. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

Prokraüootidest moodustasid kõikide katuste lõikes keskmiselt 2,95% arhed (joonis 5). Positiivne seos oli arhede osakaalul prokarüootidest ja mullas sisalduva fosfori vahel kõigi katuste lõikes ($R=0,71$; $p<0,01$). Mullaniiskuse ja arhede osakaalu prokarüootidest vahel oli positiivne oluline seos kõigi katuste lõikes ($R=0,57$; $p<0,05$).

Kergkruusapõhistel haljaskatustel oli oluline negatiivne seos mullatemperatuuri ja arhede osakaalu prokarüootidest vahel ($R=-0,82$; $p<0,05$) ning positiivne seos mullaniiskuse ja arhede osakaalu prokarüootidest vahel ($R=0,86$; $p<0,05$).

Mullapõhistel katustel oli oluline positiivne seos pH ja arhede osakaalu prokarüootidest vahel ($R=0,89$; $p<0,05$).



Joonis 5. Arhede osakaal prokarüootidest erinevat tüüpi haljaskatustel ja looduslikul kontrollalal. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

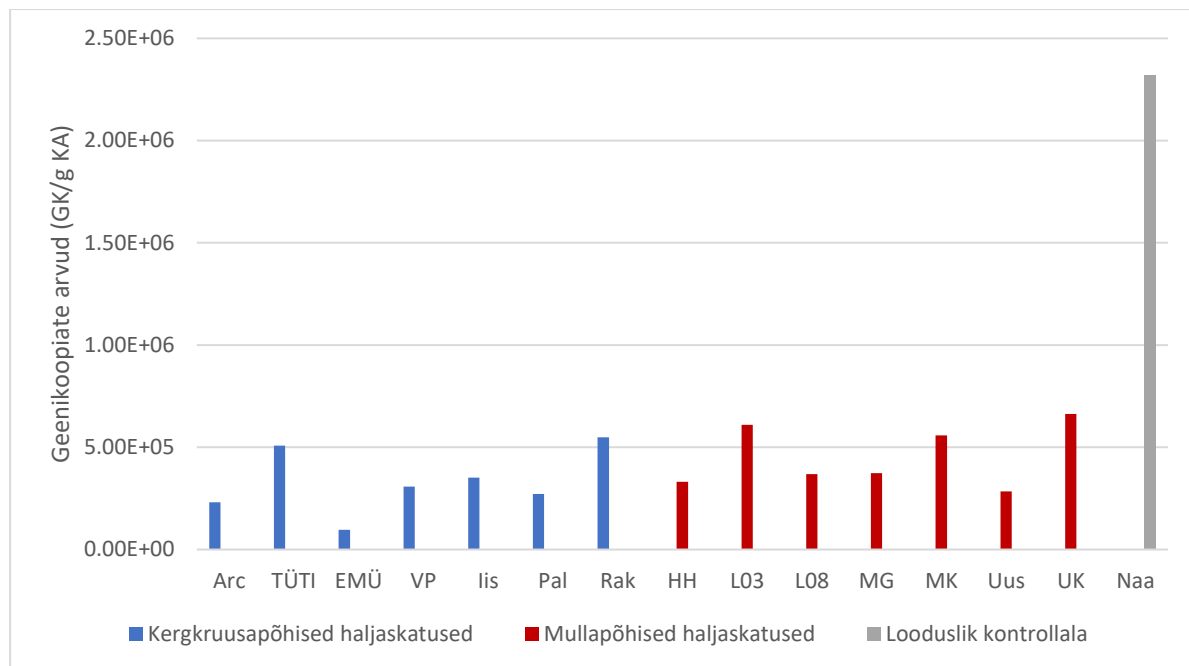
4.3 Metanogeenide ja metanotroofide arvukused ja proportsioonid prokarüootidest pinnases

Metanogeenide geenikoopiate arvukust oli võimalik määrata ainult kahel haljaskatusel (Arc (K): $3,39 \cdot 10^4$; UK (M): $7,75 \cdot 10^4$).

Katuste pinnaseproovide metanotroofide geenikoopiate arvukus oli vahemikus $9,67 \cdot 10^4$ kuni $6,64 \cdot 10^5$ GK/g KA. Kergkruusakatuste metanotroofide geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $3,31 \cdot 10^5 \pm 1,57 \cdot 10^5$ GK/g KA ja mullapõhiste katuste metanotroofide geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $4,56 \cdot 10^5 \pm 1,51 \cdot 10^5$ GK/g KA (joonis 6). Kergkruusa- ja mullapõhistel katustel ei ilmnenud metanotroofide ja metanogeenide geenikoopiate arvukuses olulist erinevust.

Kõikide katuste lõikes oli positiivne seos mullas sisalduva fosfori ja metanotroofide geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,56$; $p<0,05$). Oluline positiivne seos oli mullas sisalduva lämmastiku ja metanotroofide geenikoopiate vahel ($R=0,58$; $p<0,05$) ning samuti ka mulla süsiniku ja metanotroofide geenikoopiate arvukuse vahel kõigi katuste lõikes ($R=0,55$; $p<0,05$).

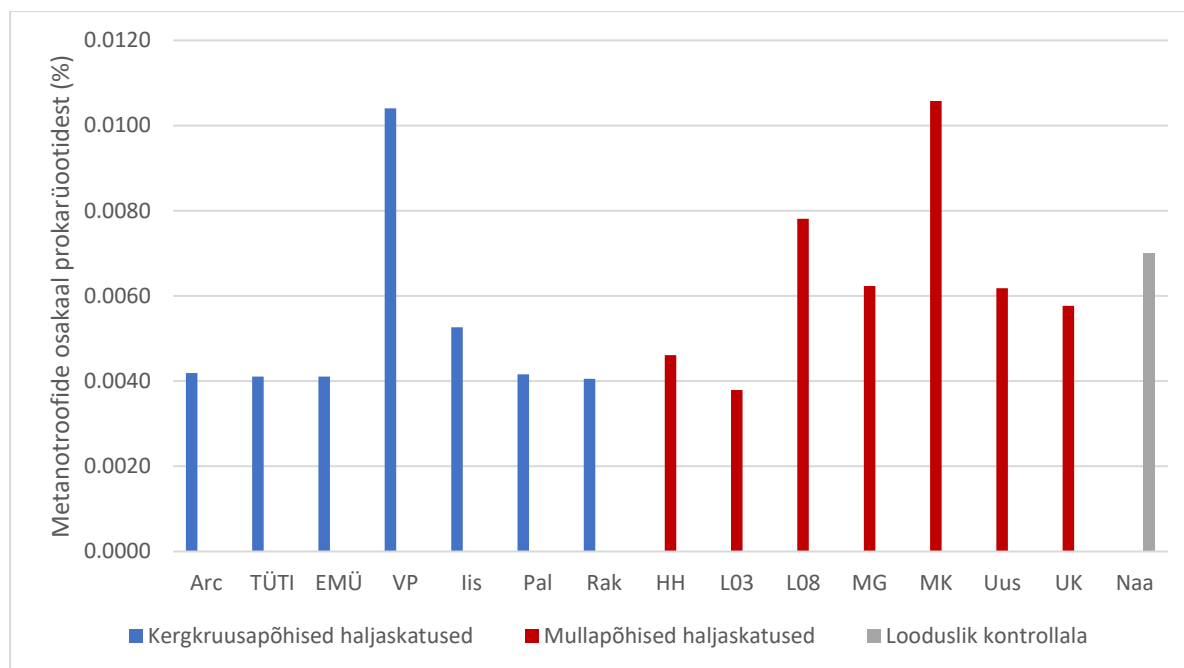
Kergkruusapõhistel katustel oli oluline positiivne seos mulla orgaanilise aine sisalduse ja metanotroofide geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,79$; $p<0,05$).



Joonis 6. Metanotroofide geenikoopiate arvukused erinevat tüüpi haljaskatustel ja looduslikul kontrollalal. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

Prokarüootidest moodustasid metanotroofid keskmiselt 0,006% kõikide katuste lõikes (joonis 7). Kergkruusa- ja mullapõhistel katustel ei ilmnenud metanotroofide osakaalu prokarüootidest statistiliselt olulist erinevust.

Kõikide katuste lõikes oli oluline negatiivne seos mulla väävli ja metanotroofide osakaalu prokarüootidest vahel ($R=-0,59$; $p<0,05$) ning ka mulla magneesiumisisalduse ja metanotroofide osakaalu prokarüootidest vahel ($R=-0,76$; $p<0,01$).



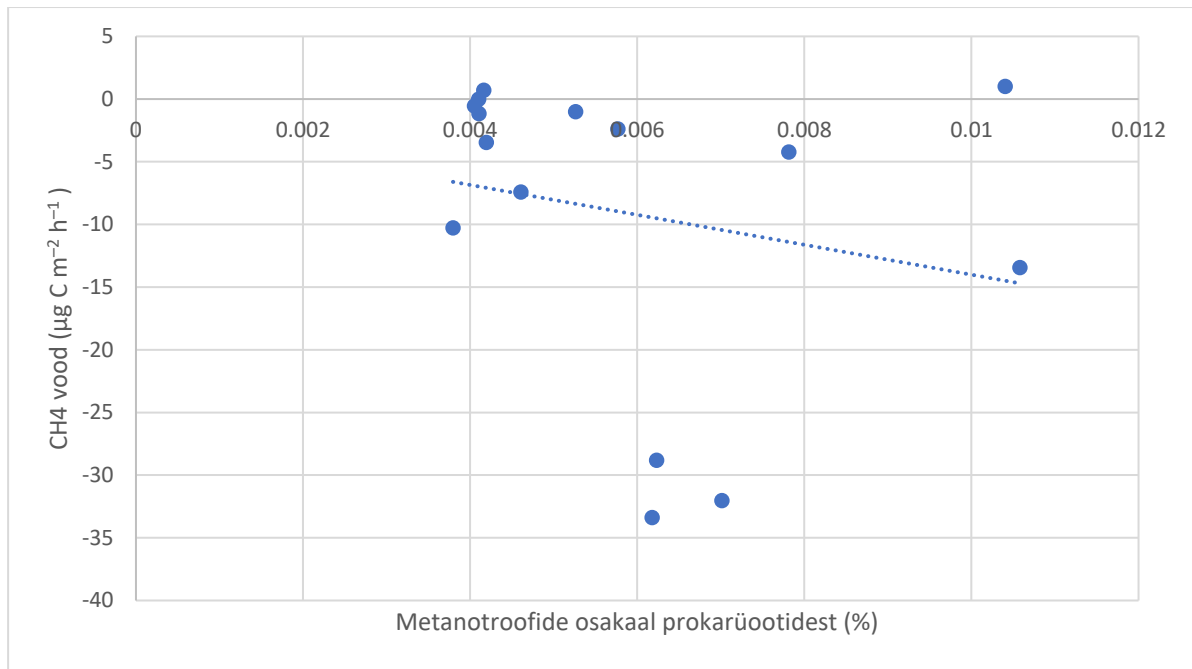
Joonis 7. Metanotroofide osakaal prokarüootidest erinevat tüüpi haljaskatustel ja looduslikul kontrollalal. Vaata koodide tähendusi Tabel 1.

4.4 Geeniparameetrite omavahelised seosed ning nende seosed metaaniemissiooniga

Kõikide katuste lõikes oli oluline positiivne seos arhede ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,63$; $p<0,05$), metanotroofide ja bakterite geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,64$; $p<0,05$) ning metanotroofide ja arhede arvukuse vahel ($R=0,71$; $p<0,01$).

Kergkruusapõhistel haljaskatustel oli oluline positiivne seos bakterite ja metanotroofide arvukuse vahel ($R=0,89$; $p<0,01$). Mullapõhistel haljaskatustel oli oluline positiivne seos arhede ja metanotroofide geenikoopiate arvukuse vahel ($R=0,93$; $p<0,01$).

Geeniparameetrite ja metaaniemissioonide vahel statistiliselt olulisi seoseid ei leitud, kuid on näha tendents, et metanotroofide osakaalu suurenemisel prokarüootidest seotakse enam CH_4 haljaskatustel (joonis 8).



Joonis 8. Prokarüootidest metanotroofide osakaalu ja kogu perioodi keskmise metaaniemissiooni vaheline seos haljaskatustel.

5. Arutelu

Geeniparameetrite arvukused erinevatel katusetüüpidel ei erinenud statistiliselt oluliselt teineteisest ehk katusetüüp ei mõjuta liiga oluliselt erinevate geeniparameetrite arvukust haljaskatuste mullas. Mullapõhised katused seovad rohkem CH₄ kui kergkruusapõhised, kuid nende haljaskatuste pinnases ei ole statistiliselt oluliselt rohkem metanotroofe, kuigi mõnevõrra olid metanotroofide arvukused ja osakaalud siiski suuremad mullapõhistel katustel. Lisaks oli näha tendentsi, et metanotroofide osakaalu suurenedes seoti ka enam CH₄. Sellist seost *pmoA* geenikoopiate ja CH₄ emissiooni vahel on näidatud ka teistes uuringutes, kuigi erinevates keskkondades (Crevecoeur *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2019). Samuti oli mullapõhistel katustel kõrgem mullaniiskus, mis võib seletada mullapõhiste katuste paremat CH₄ sidumisvõimet. Nimelt on leitud, et mullaniiskus on koos -temperatuuriga üks peamiseid bioloogilist aktiivsust mõjutavaid tegureid (Teemusk *et al.*, 2019) ning need tegurid võisid mõjutada positiivselt ka metanotroofide aktiivsust.

Kuigi metanotroofid eelistavad üldiselt muldi, millel on neutraalne pH, on leitud ka atsidoofiilseid metanotroofe (Nguyen *et al.*, 2018), mis võib selgitada mullapõhiste katuste madalamat pH-d ning kõrgemat CH₄ sidumisvõimet. Samuti korreleerub see analüüside tulemustega, milles selgus, et mullapõhistel katustel toob kõrgem pH kaasa nii kõrgema arhede geenikoopiate arvukuse kui ka kõrgema arhede osakaalu prokarüootidest vahel. Arhede hulka kuuluvad ka kõik metanogeenid (Kallistova *et al.*, 2017). Mida madalam pH, seda vähem arhesid (ja võimalik, et ka metanogeenid) ja seda vähem CH₄ seal produtseeritakse ning metanotroofid võivad enam siduda CH₄ atmosfäärist.

Kuigi metanogeenide geenikoopiate arvukust oli võimalik määrata vaid kahel haljaskatusel, siis ei tähenda see, et teistel katustel metanogeenid puudusid. Nende hulk oli küll tõenäoliselt liiga väike usaldusväärseks detekteerimiseks. Metanogeenide vähest arvukust võib seostada liiga õhukese ja aeroobse kasvusubstraadiga (Teemusk *et al.*, 2019), sest metanogeenid on anaeroobsed mikroorganismid (Kallistova *et al.*, 2017).

Kergkruusapõhistel katustel oli metanotroofide geenikoopiate arvukus positiivselt seotud mulla orgaanilise aine sisaldusega, mis näitas viimase olulisust nendele mikroorganismidele. Selline seos on näidatud *pmoA* geeni omavate organismide ja mulla orgaanilise aine vahel ka hoopis teistsuguses keskkonnas nagu näiteks riisipõldudel (Seo *et al.*, 2014). Samuti mõjutasid metanotroofe positiivselt mulla süsiniku-, lämmastiku- ja fosforisisaldus haljaskatustel, mis

kuuluvad mitmete oluliste ühendite koosseisu ning on vajalikud mikroorganismide elutegevuseks.

Mulla väävlisisaldus oli kõrgem kergkruusapõhistel haljaskatustel ning samuti oli kergkruusa katustel kõrgem arhede geenikoopiate arvukus. Need tulemused korreleeruvad ka sellega, et kõikide katuste lõikes oli negatiivne seos mulla väävlisisalduse ja metanotroofide osakaalu prokarüootidest vahel. See võib viidata sulfaate redutseerivate arhede olemasolule kergkruusapõhistes haljaskatustes. Kuna kergkruusapõhistel haljaskatustel esines kohati metaaniemissiooni, siis võib eeldada mõningate metanogeenide olemasolu. On leitud, et sulfaate redutseerivad arhed ja metanogeenid on võimelised koos samu elupaiku asustama (Ozuolmez *et al.*, 2015).

Kui mulla magneesiumisisaldus on kõrge, siis on haljaskatuste pinnases sisalduvate bakterite geenikoopiate arvukus suur, kuid metanotroofide osakaal prokarüootidest on väike. Mida rohkem sisaldub mullas magneesiumi, seda rohkem on baktereid, kuid mitte metanotroofe. Magneesium on oluline tegur bakterite jagunemisel ja protoplasma tootmisel (Webb, 1949).

6. Kokkuvõte

Linnade erinevaid keskkonnaprobleeme on väga edukalt võimalik lahendada kuluefektiivselt mitmesuguste ökotehnoloogiliste lahendustega nagu näiteks haljaskatused, mis muuhulgas aitavad kaasa ka linnaõhu puhastamisele. Metaaniringe protsesse haljaskatuste pinnases viivad läbi erinevad mikroorganismid. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida bakterite ja arhede ning metanogeenide ja metanotroofide arvukusi ja proportsiooni mõjutavaid füüsikalisi-keemilisi faktoreid ning hinnata geeniparameetrite seoseid CH₄ emissiooniga erinevat tüüpi haljaskatustel.

Viieteistkümnest kogutud pinnaseproovist eraldati DNA ja määrati reaalaja PCR meetodil arhede ja bakterite spetsiifiliste 16S rRNA ja metanogeenide (*mcrA*) ja metanotroofide (*pmoA*) markergeenide arvukused. Töö tulemustest selgus, et erinev haljaskatuse tüüp ei mõjutanud statistiliselt oluliselt geenikoopiate arvukusi, kuigi mõnevõrra oli metanotroofide enam mullapõhistel katustel ning oli näha tendentsi, et metanotroofide osakaalu suurenedes seoti ka enam CH₄. Samuti on mullapõhistel katustel kõrgem niiskusesisaldus, mis võib suurendada mikrobioloogilist aktiivsust ja tõsta CH₄ sidumise võimekust. Samuti võib mullapõhiste katuste CH₄ sidumisvõimet seostada madala mulla pH-ga, mis tõi kaasa väiksema arhede hulga kasvusubstraadis ning kõrge mulla magneesiumisisaldusega, mis on vajalik element bakterite, sh metanotroofide, jagunemisel. Ka mulla orgaanilise aine sisaldus ja süsiniku-, lämmastiku- ja fosforisisaldus mõjutasid positiivselt metanotroofide arvukust haljaskatustel. Kergkruusapõhiste katuste kõrgem väävlisisaldus tingis kõrgema arhede geenikoopiate arvukuse. Kuigi metanogeenide oli haljaskatuste muldades liiga vähe, et neid reaalaja PCR-i abil tuvastada, võib eeldada, et neid seal siiski leidub ning sobivatel tingimustel võivad nad ka aktiivsed olla.

The microbiological potential of methane production and consumption on different types of green roofs

Kadri Kuusk

Summary

The aim of this study was to research the abundance of bacteria, archaea, methanogens (target gene *mcrA*) and methanotrophs (target gene *pmoA*) and the physical and chemical parameters that affect their proportion on different types of green roofs. In addition, another purpose was to research correlations between genetic parameters and CH₄ emission.

The main idea was to examine whether the abundance of methanogens and methanotrophs was dependent on the green roofs type and which type of green roof to use so that the binding of the CH₄ would be maximised. Using green roofs to slow down global warming by binding the CH₄, a potent greenhouse gas, is one possible solution which simultaneously makes the urban environment nicer. Green roofs also help to lessen the effect of urban heat islands in the cities along with purifying the air from pollutants like SO₂, NO₂ and O₃. Along with other urban technologies that help to manage stormwater, green roofs can also be used to reduce the water quantity that reaches the sewer at once.

The 14 green roofs were categorised into three groups: 1) soil-based green roofs; 2) LWA-based (LWA–*lightweight aggregate*) green roofs; 3) green roofs with sedum mats. Mat-based green roofs were later accounted for soil-based green roofs. A natural reference area was also included. In August 2016, a soil sample was taken from every green roof from which 0,25 g was used to determine genetic parameters through qPCR analysis. The qPCR results were analysed with LinRegPCR (v 2018.0) and STATISTICA (v 7.1) and calculated to dry matter. The soil samples were analysed for chemical parameters which were pH, total carbon, total nitrogen, total phosphorus, total sulphur, nitrate, ammonia, potassium, calcium, magnesium and organic matter. CH₄ fluxes were gathered with closed chamber technique and later measured with a gas chromatograph.

The results show that the green roof type does not affect the abundance of any genetic parameter, but it shown that soil-based green roofs are able to bind more CH₄ than LWA-based green roofs. Soil-based roofs have higher moisture content, which might increase microbiological activity and raise CH₄ binding potential. In addition, soil-based green roofs

have lower pH, which causes lower archaea abundance. Soil-based green roofs have higher magnesium concentrations which may account for the high bacteria multiplicity (including methanotrophs) since magnesium participates in cell division. The results indicate that LWA-based green roofs' high sulphur concentration is caused by higher archaea abundance. LWA-based green roofs also exhibited some CH₄ emission. Research has shown that sulphur reducing archaea and methanogens are able to successfully coexist. Soil's organic matter content along with carbon, nitrogen and phosphorus supply also affected positively the abundance of methanotrophs in the soil. Although there were not enough methanogens in the soil to detect with qPCR, it can be assumed that methanogens can be active in appropriate environment.

Tänuavaldused

Autor soovib tänada oma juhendajaid, kes aitasid selle bakalaureusetöö valmimisele kaasa.

Eriline tänu juhendajale Mikk Espenbergile kannatlikkuse ja abivalmiduse eest.

Kirjandus

Ayodele, T. R., Alao, M. A. & Ogunjuyigbe, A. S. O. (2020). Effect of collection efficiency and oxidation factor on greenhouse gas emission and life cycle cost of landfill distributed energy generation. *Sustainable Cities and Society*, 52, p. 101821. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scs.2019.101821>.

Baryła, A., Gnatowski, T., Karczmarczyk, A. & Szatyłowicz, J. (2019). Changes in temperature and moisture content of an extensive-type green roof. *Sustainability (Switzerland)*, 11(9). doi: 10.3390/su11092498.

Bignell, D. E. (2010). Termites. in Reay, D., Smith, P., and van Amstel, A. (eds) *Methane and climate change*. Earthscan, p. 62–74.

Carter, M. S., Ambus, P., Albert, K. R., Larsen, K. S., Andersson, M., Priemé, A., van der Linden, L. & Beier, C. (2011). Effects of elevated atmospheric CO₂, prolonged summer drought and temperature increase on N₂O and CH₄ fluxes in a temperate heathland. *Soil Biology and Biochemistry*. Pergamon, 43(8), p. 1660–1670. doi: 10.1016/J.SOILBIO.2011.04.003.

Castleton, H. F., Stovin, V., Beck, S. B. M. & Davison, J. B. (2010). Green roofs; building energy savings and the potential for retrofit. *Energy and Buildings*. Elsevier, 42(10), p. 1582–1591. doi: 10.1016/J.ENBUILD.2010.05.004.

Conley, G., Beck, N., Riihimäki, C. A. & Tanner, M. (2020). Quantifying clogging patterns of infiltration systems to improve urban stormwater pollution reduction estimates. *Water Research X*. Elsevier, 7, p. 100049. doi: 10.1016/J.WROA.2020.100049.

Costello, A. M. & Lidstrom, M. E. (1999). Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), p. 5066 LP – 5074. Available at: <http://aem.asm.org/content/65/11/5066.abstract>.

Crevecoeur, S., Vincent, W. F., Comte, J., Matveev, A. & Lovejoy, C. (2017). Diversity and potential activity of methanotrophs in high methane-emitting permafrost thaw ponds. *PLoS ONE*, 12(11), p. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0188223.

D'amato, G., Liccardi, G., D'amato, M. & Cazzola, M. (2001). The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respiratory Medicine*. W.B. Saunders, 95(7), p. 606–611. doi: 10.1053/RMED.2001.1112.

- Daniels, M. J., Dominici, F., Zeger, S. L. & Samet, J. M.** (2004). The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part III: PM10 concentration-response curves and thresholds for the 20 largest US cities. *Research report (Health Effects Institute)*, (94 Pt 3).
- Deitch, M. J. & Feirer, S. T.** (2019). Cumulative impacts of residential rainwater harvesting on stormwater discharge through a peri-urban drainage network. *Journal of Environmental Management*. Academic Press, 243, p. 127–136. doi: 10.1016/J.JENVMAN.2019.05.018.
- Dias, D. & Tchepel, O.** (2011). Quantification of health benefits related with reduction of atmospheric PM10 levels: implementation of population mobility approach.
- Dong, J., Lin, M., Zuo, J., Lin, T., Liu, J., Sun, C. & Luo, J.** (2020). Quantitative study on the cooling effect of green roofs in a high-density urban Area—A case study of Xiamen, China. *Journal of Cleaner Production*. Elsevier, 255, p. 120152. doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2020.120152.
- EEA.** (2017). *Green Infrastructure and Flood Management: Promoting cost-efficient flood risk reduction via green infrastructure solutions*. Publications Office of the European Union, Luxembourg. doi: 10.2800/324289.
- Enzmann, F., Mayer, F., Rother, M. & Holtmann, D.** (2018). Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 8(1), p. 1. doi: 10.1186/s13568-017-0531-x.
- Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J. & Mander, Ü.** (2016). Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PLOS ONE*. Public Library of Science, 11(9), p. e0163864. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163864>.
- Espenberg, M., Truu, M., Mander, Ü., Kasak, K., Nõlvak, H., Ligi, T., Oopkaup, K., Maddison, M. & Truu, J.** (2018). Differences in microbial community structure and nitrogen cycling in natural and drained tropical peatland soils. *Scientific Reports*, 8(1), p. 4742. doi: 10.1038/s41598-018-23032-y.
- Etiopie, G.** (2010). Geological Methane. in Reay, D., Smith, P., and van Amstel, A. (eds) *Methane and climate change*. Earthscan, p. 42–62.
- Fernandez-Cañero, R., Emilsson, T., Fernandez-Barba, C. & Herrera Machuca, M. Á.** (2013). Green roof systems: A study of public attitudes and preferences in southern Spain.

Journal of Environmental Management. Academic Press, 128, p. 106–115. doi: 10.1016/J.JENVMAN.2013.04.052.

Filho, W. L. et al. (2019). Assessing the impacts of climate change in cities and their adaptive capacity: Towards transformative approaches to climate change adaptation and poverty reduction in urban areas in a set of developing countries. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 692, p. 1175–1190. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2019.07.227.

Freedman, B. (1995). Emission, Transformation, and Toxicity of Air Pollutants. in *Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses*. doi: 10.1016/B978-0-08-050577-0.50007-8.

Fulthorpe, R., MacIvor, J. S., Jia, P. & Yasui, S. L. E. (2018). The green roof microbiome: Improving plant survival for ecosystem service delivery. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(FEB), p. 1–10. doi: 10.3389/fevo.2018.00005.

Gavrić, S., Leonhardt, G., Marsalek, J. & Viklander, M. (2019). Processes improving urban stormwater quality in grass swales and filter strips: A review of research findings. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 669, p. 431–447. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.072.

Griffiths, L. N. & Mitsch, W. J. (2020). Nutrient retention via sedimentation in a created urban stormwater treatment wetland. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 727, p. 138337. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.138337.

Hallam, S. J., Putnam, N., Preston, C. M., Detter, J. C., Rokhsar, D., Richardson, P. H. & DeLong, E. F. (2004). Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 305(5689), p. 1457–1462. doi: 10.1126/science.1100025.

Hasan, S. & Mulamoottil, G. (1994). Environmental problems of Dhaka city: A study of mismanagement. *Cities*. Pergamon, 11(3), p. 195–200. doi: 10.1016/0264-2751(94)90059-0.

Heilig, G. K. (1994). The Greenhouse Gas Methane (CH₄): Sources and Sinks, the Impact of Population Growth, Possible Interventions. *Population and Environment*. Springer, 16(2), p. 109–137. Available at: <http://www.jstor.org/stable/27503384>.

Heinsoo, M. (2016). *Kudjape prüigila metaanilagunduskatte uuring*. MSc thesis. Eesti Maaülikool.

Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A. & Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics*, 4(11). doi: 10.1371/journal.pgen.1000255.

Hwang, V., Masters, A., Arocho, M. & Hwang, S. (2017). Fly ash-amended pervious concrete pavement followed by bamboo bioretention basin with *Dracaena sanderiana* for urban stormwater runoff control. *Construction and Building Materials*. Elsevier, 132, p. 161–169. doi: 10.1016/J.CONBUILDMAT.2016.11.134.

Jabareen, Y. (2015). City planning deficiencies & climate change – The situation in developed and developing cities. *Geoforum*. Pergamon, 63, p. 40–43. doi: 10.1016/J.GEOFORUM.2015.05.017.

Jim, C. Y. (2015). Thermal performance of climber greenwalls: Effects of solar irradiance and orientation. *Applied Energy*. Elsevier, 154, p. 631–643. doi: 10.1016/J.APENERGY.2015.05.077.

Juottonen, H. (2008). *Archaea , Bacteria , and methane production along environmental gradients in fens and bogs. Methods.* Available at: <http://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22054/archaeab.pdf?sequence=1>.

Kallistova, A. Y., Merkel, A. Y., Tarnovetskii, I. Y. & Pimenov, N. v. (2017). Methane formation and oxidation by prokaryotes. *Microbiology (Russian Federation)*, 86(6), p. 671–691. doi: 10.1134/S0026261717060091.

Kalyuzhnaya, M. G., Gomez, O. A. & Murrell, J. C. (2019). *The Methane-Oxidizing Bacteria (Methanotrophs). Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes.* doi: 10.1007/978-3-319-60053-6_10-1.

Keller, K. (2017). *Haljaskatuste gaasivoo sõltuvus katuse tüübist ja vanusest.* MSc thesis. Tartu Ülikool.

Kong, D., Li, S., Jin, Y., Wu, S., Chen, J., Hu, T., Wang, H., Liu, S. & Zou, J. (2019). Linking methane emissions to methanogenic and methanotrophic communities under different fertilization strategies in rice paddies. *Geoderma*, 347, p. 233–243. doi: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.04.008>.

Koorberg, P. (2001). *Ekstensiivse katusehaljastuse loomine ja selle linnaökoloogiline tähendus.* MSc thesis. EPMÜ.

Kubista, M. et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. Pergamon, 27(2–3), p. 95–125. doi: 10.1016/J.MAM.2005.12.007.

- Lew, S. & Glińska-Lewczuk, K.** (2018). Environmental controls on the abundance of methanotrophs and methanogens in peat bog lakes. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 645, p. 1201–1211. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.07.141.
- Liang, L., Deng, X., Wang, P., Wang, Z. & Wang, L.** (2020). Assessment of the impact of climate change on cities livability in China. *Science of The Total Environment*. Elsevier, p. 138339. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.138339.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D. & Knight, R.** (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), p. e120–e120. doi: 10.1093/nar/gkm541.
- Ma, Y., Liu, F., Kong, Z., Yin, J., Kou, W., Wu, L. & Ge, G.** (2016). The distribution pattern of sediment archaea community of the poyang lake, the largest freshwater lake in China. *Archaea*, 2016. doi: 10.1155/2016/9278929.
- de Macedo, M. B., Rosa, A., do Lago, C. A. F., Mendiando, E. M. & de Souza, V. C. B.** (2017). Learning from the operation, pathology and maintenance of a bioretention system to optimize urban drainage practices. *Journal of Environmental Management*. Academic Press, 204, p. 454–466. doi: 10.1016/J.JENVMAN.2017.08.023.
- Marasco, D. E., Hunter, B. N., Culligan, P. J., Gaffin, S. R. & McGillis, W. R.** (2014). Quantifying evapotranspiration from urban green roofs: A comparison of chamber measurements with commonly used predictive methods. *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society, 48(17), p. 10273–10281. doi: 10.1021/es501699h.
- Milferstedt, K., Youngblut, N. D. & Whitaker, R. J.** (2010). Spatial structure and persistence of methanogen populations in humic bog lakes. *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 4(6), p. 764–776. doi: 10.1038/ismej.2010.7.
- Mohanty, S. R., Bodelier, P. L. E. & Conrad, R.** (2007). Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(1), p. 24–31. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00370.x.
- Molineux, C. J.** (2010). *Development of suitable growing media for effective green roofs*. PhD thesis. University of East London.
- Molineux, C. J., Gange, A. C., Connop, S. P. & Newport, D. J.** (2015). Are microbial communities in green roof substrates comparable to those in post-industrial sites?—a preliminary study. *Urban Ecosystems*, 18(4), p. 1245–1260. doi: 10.1007/s11252-015-0450-z.

- Molineux, C. J., Connop, S. P. & Gange, A. C.** (2014). Manipulating soil microbial communities in extensive green roof substrates. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 493, p. 632–638. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2014.06.045.
- Moreno-Monroy, A. I., Schiavina, M. & Veneri, P.** (2020). Metropolitan areas in the world. Delineation and population trends. *Journal of Urban Economics*. Academic Press, p. 103242. doi: 10.1016/J.JUE.2020.103242.
- Mukhopadhyay, A., Deplancke, B., Walhout, A. J. M. & Tissenbaum, H.** (2008). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to detection by quantitative real-time PCR to study transcription factor binding to DNA in *Caenorhabditis elegans*. *Bone*, 23(1), p. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Nagase, A. & Dunnett, N.** (2012). Amount of water runoff from different vegetation types on extensive green roofs: Effects of plant species, diversity and plant structure. *Landscape and Urban Planning*. Elsevier, 104(3–4), p. 356–363. doi: 10.1016/J.LANDURBPLAN.2011.11.001.
- Nakagawa, F., Tsunogai, U., Komatsu, D. D., Yamada, K., Yoshida, N., Moriizumi, J., Nagamine, K., Iida, T. & Ikebe, Y.** (2005). Automobile exhaust as a source of ¹³C- and ²D-enriched atmospheric methane in urban areas. *Organic Geochemistry*. Pergamon, 36(5), p. 727–738. doi: 10.1016/J.ORGGEOCHEM.2005.01.003.
- Nguyen, N.-L., Yu, W.-J., Gwak, J.-H., Kim, S.-J., Park, S.-J., Herbold, C. W., Kim, J.-G., Jung, M.-Y. & Rhee, S.-K.** (2018). Genomic Insights Into the Acid Adaptation of Novel Methanotrophs Enriched From Acidic Forest Soils. *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 1982. doi: 10.3389/fmicb.2018.01982.
- Ozuolmez, D., Na, H., Lever, M., Kjeldsen, K., Jørgensen, B. & Plugge, C.** (2015). Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence? *Frontiers in Microbiology*, 6, p. 492. doi: 10.3389/fmicb.2015.00492.
- Pandey, V. C., Singh, J. S., Singh, D. P. & Singh, R. P.** (2014). Methanotrophs: Promising bacteria for environmental remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(1), p. 241–250. doi: 10.1007/s13762-013-0387-9.
- Raghoebarsing, A. A. et al.** (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440(7086), p. 918–921. doi: 10.1038/nature04617.

- van Renterghem, T. & Botteldooren, D.** (2008). Numerical evaluation of sound propagating over green roofs. *Journal of Sound and Vibration*. Academic Press, 317(3–5), p. 781–799. doi: 10.1016/J.JSV.2008.03.025.
- Rowe, D. B. & Getter, K. L.** (2006). The role of extensive green roofs in sustainable development. *HortScience*, 41(5), p. 1276–1285.
- Rumble, H. & Gange, A. C.** (2013). Soil microarthropod community dynamics in extensive green roofs. *Ecological Engineering*. Elsevier, 57, p. 197–204. doi: 10.1016/J.ECOLENG.2013.04.012.
- Samad, S.** (2012). Thesis: Environmental control of methanotrophic bacteria in temperate lakes. *Thesis*.
- Santamouris, M.** (2014). Cooling the cities – A review of reflective and green roof mitigation technologies to fight heat island and improve comfort in urban environments. *Solar Energy*. Pergamon, 103, p. 682–703. doi: 10.1016/J.SOLENER.2012.07.003.
- Santamouris, M.** (2020). Recent progress on urban overheating and heat island research. Integrated assessment of the energy, environmental, vulnerability and health impact. Synergies with the global climate change. *Energy and Buildings*. Elsevier, 207, p. 109482. doi: 10.1016/J.ENBUILD.2019.109482.
- Saunio, M. et al.** (2017). Variability and quasi-decadal changes in the methane budget over the period 2000-2012. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(18), p. 11135–11161. doi: 10.5194/acp-17-11135-2017.
- Schwietzke, S. et al.** (2017). Improved Mechanistic Understanding of Natural Gas Methane Emissions from Spatially Resolved Aircraft Measurements. *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 51(12), p. 7286–7294. doi: 10.1021/acs.est.7b01810.
- Seo, J., Jang, I., Gebauer, G. & Kang, H.** (2014). Abundance of methanogens, methanotrophic bacteria, and denitrifiers in rice paddy soils. *Wetlands*, 34(2), p. 213–223. doi: 10.1007/s13157-013-0477-y.
- Shuster, W. D. & Dadio, S.** (2017). An applied hydrogeological perspective on the rendering of ecosystem services from urban soils. in *Urban Soils*. CRC Press, p. 261–274. doi: 10.1201/9781315154251.

- Speak, A. F., Rothwell, J. J., Lindley, S. J. & Smith, C. L.** (2012). Urban particulate pollution reduction by four species of green roof vegetation in a UK city. *Atmospheric Environment*. Pergamon, 61, p. 283–293. doi: 10.1016/J.ATMOSENV.2012.07.043.
- Teemusk, A.** (2005). *Murukatuse temperatuuri reguleerimise ja vee kinnipidamise võime Eesti kliimatingimustes*. MSc thesis. Tartu Ülikool.
- Teemusk, A., Kull, A., Kanal, A. & Mander, Ü.** (2019). Environmental factors affecting greenhouse gas fluxes of green roofs in temperate zone. *Science of The Total Environment*. Elsevier, 694, p. 133699. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2019.133699.
- Theodosiou, T.** (2009). Green roofs in buildings: Thermal and environmental behaviour. *Advances in Building Energy Research*, 3(1), p. 271–288. doi: 10.3763/aber.2009.0311.
- Thies, J. E.** (2015). *Molecular Approaches to Studying the Soil Biota*. 4th edn. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 4th edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-415955-6.00006-2.
- Webb, M.** (1949). The Influence of Magnesium on Cell Division: The Effect of Magnesium on the Growth of Bacteria in Simple Chemically Defined Media. *Journal of General Microbiology*. Microbiology Society, 3(3), p. 418–424. doi: 10.1099/00221287-3-3-418.
- Whalen, S. C.** (2005). Biogeochemistry of Methane Exchange between Natural Wetlands and the Atmosphere. in *Environmental Engineering Science*.
- Xu, Y., Tong, T., Chen, J., Li, B. & Xie, S.** (2018). Nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria seasonally and spatially shift in a constructed wetland used for treating river water. *Ecological Engineering*. Elsevier, 110, p. 48–53. doi: 10.1016/J.ECOLENG.2017.10.005.
- Yang, J., Yu, Q. & Gong, P.** (2008). Quantifying air pollution removal by green roofs in Chicago. *Atmospheric Environment*. Pergamon, 42(31), p. 7266–7273. doi: 10.1016/J.ATMOSENV.2008.07.003.
- Yu, Z., Loisel, J., Brosseau, D. P., Beilman, D. W. & Hunt, S. J.** (2010). Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum. *Geophysical Research Letters*, 37(13), p. 1–5. doi: 10.1029/2010GL043584.
- Zhang, X.-B. & Xu, J.** (2018). Optimal policies for climate change: A joint consideration of CO₂ and methane. *Applied Energy*. Elsevier, 211, p. 1021–1029. doi: 10.1016/J.APENERGY.2017.10.067.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Kuusk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Metaani tootmise ja tarbimise mikrobioloogiline potentsiaal erinevat tüüpi haljaskatustel“, mille juhendajad on Mikk Espenberg ja Alar Teemusk, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kadri Kuusk

28.05.2020