

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogia erialal (12 EAP)

**Prokarüootide ja seente denitrifikatsiooni potentsiaali hindamine  
erinevates ökosüsteemides reaalaja PCR meetodiga**

Karmel Kikas

Juhendaja PhD Mikk Espenberg

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja: .....

*Allkiri, kuupäev*

Tartu 2023

## **Annotatsioon**

### **Prokarüootide ja seente denitrifikatsiooni potentsiaali hindamine erinevates ökosüsteemides reaalaja PCR meetodiga**

Dilämmastikoksiid ( $N_2O$ ) ehk naerugaas on ohtlik kasvuhoonegaas, mille atmosfääri soojendamise potentsiaal on 300 korda võimsam võrreldes süsihappegaasiga ( $CO_2$ ). Nimetatud lämmastikuühendi peamisteks allikateks on nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon. Lisaks looduslikele protsessidele, on inimtegevuse tagajärjel atmosfääri paisatud  $N_2O$  kogus suurenenud ja viimasel paaril aastakümnel on päevakorda kerkinud kliimamuutustega seonduvad probleemid. Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli analüüsida erinevate ökosüsteemide mõju denitrifikatsioonist tulevale  $N_2O$  emissioonidele. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kasutati tuvastamiseks denitrifikatsiooni läbiviivate geenide arvukus: seente *nirK* ning prokarüootide *nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII* on peamised uuritavad markergeenid. Tulemustest selgus, et seente mõju  $N_2O$  emissioonidele on suurim liigniisketel ja üleujutatud metsaaladel, nagu näiteks kase- ja kuusemets. Prokarüootide geenikoopiate arvukuse poolest on denitrifikatsiooni esinemise potentsiaal suurim tehismärgaladel ja liigniiske pinnasega metsades.

Märksõnad: mikrobioloogia, denitrifikatsioon, seened, prokarüoodid, markergeenid, dilämmastikoksiid,  $N_2O$

## **Abstract**

### **Assessment of denitrification potential of prokaryotes and fungi in different ecosystems using the real-time PCR method**

Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), also known as laughing gas, is a dangerous greenhouse gas. Its warming potential is 300 times greater compared to carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). The primary sources of this nitrogen compound are nitrification and denitrification processes. In addition to natural processes, anthropogenic activities have released significant amounts of N<sub>2</sub>O into the atmosphere. In recent decades, issues related to climate change have gained prominence. The aim of this thesis work was to analyze the impact of different ecosystems and their potential to produce N<sub>2</sub>O emissions through denitrification. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the total volume of genes involved in denitrification. The main marker genes studied in this research were the fungal *nirK* and prokaryotic *nirK*, *nirS*, *nosZI*, and *nosZII*. The results revealed that the impact of N<sub>2</sub>O emissions caused by fungi were greatest in excessively wet and flooded forest areas, like the birch and spruce forest. In terms of gene copies abundance, the highest potential for prokaryotic denitrification occurred in constructed wetlands and water-saturated forests.

Keywords: microbiology, denitrification, fungi, prokaryotes, marker genes, nitrous oxide, N<sub>2</sub>O

# Sisukord

Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Denitrifikatsioon.....	7
1.1.1 Prokariootide denitrifikatsioon .....	8
1.1.2 Seente denitrifikatsioon .....	9
1.2 Lämmastikuringe erinevates ökosüsteemides .....	9
1.2.1 Metsad.....	10
1.2.2 Märgalad.....	11
1.2.3 Rannikud .....	11
1.2.4 Rohumaad .....	12
1.2.5 Põllumaad .....	12
1.2.6 Tehismärgalad.....	13
1.2.7 Bioelektrokeemilised süsteemid .....	14
1.3 Reaalaja PCR (qPCR) .....	14
2 Metoodika.....	16
2.1 Proovialade ja proovide kirjeldus.....	16
2.1.1 Mets (hall lepik).....	16
2.1.2 Mets (kase- ja kuusemets).....	16
2.1.3 Troopilised sood.....	17
2.1.4 Mahajäetud turbakaevandusala.....	18
2.1.5 Rannikud .....	18
2.1.6 Jõelamm .....	19
2.1.7 Põllumajandusosalad ja taastatud märgalad .....	20
2.1.8 Tehismärgala.....	20
2.1.9 Bioelektrokeemilised süsteemid .....	21

2.2	Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil ja andmeanalüüs .....	21
3	Tulemused .....	23
3.1	Seente denitrifikatsioon.....	23
3.2	Prokariootide denitrifikatsioon.....	23
3.3	Prokariootide ja seente denitrifitseerijate omavahelised suhted.....	26
4	Arutelu .....	28
	Kokkuvõte.....	30
	Summary .....	31
	Tänuavaldused .....	32
	Kasutatud kirjandus .....	33

## Sissejuhatus

Erinevad ökosüsteemid mõjutavad oluliselt diämmastikoksiidi ehk naerugaasi (N<sub>2</sub>O) teket ja emissiooni atmosfääri. N<sub>2</sub>O on tugeva toimega kasvuhoonegaas, mis põhjustab muutusi Maa kiirgusbilansis ja kliimas (Butterbach-Bahl et al., 2013). N<sub>2</sub>O soojenemispotentsiaal on 300 korda suurem võrreldes CO<sub>2</sub> (Lourenço et al., 2022). N<sub>2</sub>O pikk eluiga (120 aastat) võimaldab sellel akumulereuda atmosfääris ja lagundada stratosfäärset osoonikihti (Prather et al., 2015). Valitsustevahelise Kliimamuutuste Nõukogu (IPCC) 2019. aasta raporti andmetel on N<sub>2</sub>O kontsentratsioon atmosfääris jõudnud 332 ppb piirini, mis on tööstusrevolutsioonile järgneva perioodi kõrgeim mõõdetud tulemus (Mukherji et al., s.a.).

N<sub>2</sub>O emissioone mullast mõjutavad mitmesugused tegurid: mulla pH, niiskusesisaldus, orgaanika olemasolu ja temperatuur (Galloway et al., 2003). Lisaks eelmainitud teguritele on just lämmastikväetiste liigne kasutamine põhjuseks, mistõttu iga aasta ligi 60% kogu antropogeensest N<sub>2</sub>O pärineb just põllumajandusest (Lourenço et al., 2022). N<sub>2</sub>O tekkimise protsess võib toimuda nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes (Skiba, 2008). Nitrifikatsiooni tulemusel muundatakse ammoniaak mikroorganismide toimele nitraadiks (NO<sub>3</sub>). Liigniisketel muldadel võib nitrifikatsiooni esimeses etapis tekkida nitriti (NO<sub>2</sub>) asemel hoopis N<sub>2</sub>O (Graf et al., 2014). Seejärel võidakse nitraat redutseerida mittetäielikul denitrifikatsioonil N<sub>2</sub>O-ks või täielikul denitrifikatsioonil molekulaarseks lämmastikuks (N<sub>2</sub>) (Aldossari & Ishii, 2021). Denitrifikatsiooni võivad läbi viia nii prokarüootid (bakterid, arhed) kui ka seened, kuigi seente denitrifikatsioon on mittetäielik ehk alati N<sub>2</sub>O allikas (van Groenigen et al., 2015).

Denitrifikatsiooni iseloomustamiseks molekulaarbioloogiliste meetodite abil kasutatakse erinevaid funktsionaalseid geene: prokarüootid (*nirK* ja *nirS* (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO), *nosZI* ja *nosZII* (N<sub>2</sub>O → N<sub>2</sub>)) ja seened (seente *nirK* (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO) või *P450nor* (NO → N<sub>2</sub>O)). Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) abil saab hinnata denitrifikatsioonigenide arvukust ja arvukuse muutust erinevate tingimuste korral (Kralik & Ricchi, 2017). Prokarüootide ja seente denitrifikatsiooni määramine erinevates ökosüsteemides on oluline, et hinnata nende potentsiaali N<sub>2</sub>O allikana või sidujana (Martikainen, 2022).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodi abil prokarüootide ja seente denitrifikatsiooni toimumise potentsiaali erinevates ökosüsteemides.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Denitrifikatsioon

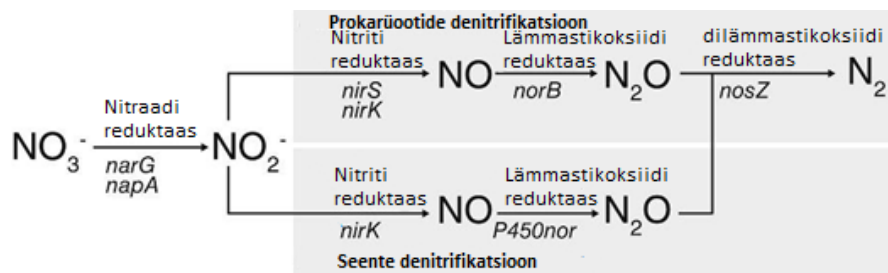
Kõige suuremad lämmastikuvarud asuvad litosfääris ja atmosfääris. Hapniku ja süsiniku järel on lämmastik kolmas element, mida leidub rohkesti taimses biomassis. Taimede jaoks on lämmastiku ammutamine mullast elulise tähtsusega, sest selle elemendi abil toodetakse mitmeid orgaanilisi ühendeid (nukleiin- ja aminohapped) ning samuti osaleb lämmastik fotosünteesi protsessis (Marschner & Rengel, 2007). Lämmastikuringe sisendvoogudeks on orgaanilise materjali lagundamine seente, bakterite või arhede poolt. Orgaaniliseks materjaliks on näiteks surnud taimed ja loomad ning ekskrementid (Galloway et al., 2003).

Denitrifikatsioon on mikrobioloogiline protsess, kus nitrit ( $\text{NO}_2$ ) ja nitraat ( $\text{NO}_3$ ) redutseeritakse gaasiliseks lämmastikoksiidiks ( $\text{NO}$ ), dilämmastikoksiidiks ( $\text{N}_2\text{O}$ ) ja molekulaarseks lämmastikuks ( $\text{N}_2$ ) (Skiba, 2008). Protsess pärsib taimede kasvu, sest kergesti omastatav reaktiivne lämmastik viiakse tagasi kujule  $\text{N}_2$ . Denitrifikatsioon leiab aset anoksilises keskkonnas (vaba hapnikuta keskkond) ja seda viivad läbi fakultatiivsed anaeroobid (mikroorganismid, kes suudavad teostada nii hapnikuhingamist kui ka mineraalset hingamist).  $\text{NO}$  on elektronakseptoriks hapnikuvabas keskkonnas, aga hapniku juuresolekul on elektronakseptoriks hapnik ise (Knowles, 1982). Denitrifikatsiooni tulemuseks on teatud tingimustel  $\text{N}_2\text{O}$ , mis on ohtlik kasvuhoonegaas, aga kui denitrifikatsioon läheb lõpuni, siis emiteeritakse molekulaarne lämmastik ( $\text{N}_2$ ) (Aldossari & Ishii, 2021).  $\text{N}_2$  on inertne gaas, mis on atmosfääri peamiseks keemiliseks komponendiks (Zumft, 1997).  $\text{N}_2\text{O}$  on aga kasvuhoonegaas, mille globaalne soojenemise potentsiaal on ligi 300 korda suurem võrreldes süsihappegaasiga ( $\text{CO}_2$ ) (Lourenço et al., 2022). Suurenenud  $\text{N}_2\text{O}$  emisioonid mõjutavad ka meid kaitsva osoonikihi lagundamist. Fotolüüsi käigus muundatakse stratosfäärne  $\text{N}_2\text{O}$  lämmastikoksiidiks. Tekkinud uus ühend, lämmastikoksiid ( $\text{NO}_x$ ), reaktsioonil osooniga ( $\text{O}_3$ ) lõhustab osoonimolekuli kahe-aatomiliseks hapnikuks ( $\text{O}_2$ ) (Portmann et al., 2012).

Põllumajanduses soovitakse pärssida  $\text{N}_2\text{O}$  tekkimist, sest see mitte ainult ei kahjusta eluskeskkonda vaid paneb põllumehi mullaviljakuse eesmärgil rohkem väetist ostma ja kasutama (Wang et al., 2018). Kui põllumajanduses üritatakse denitrifikatsiooni takistada, siis reoveepuhastuses toimitakse vastupidiselt, sest üritatakse üleliigne lämmastik süsteemist välja saada näiteks  $\text{N}_2$  kujul. Reovesi võib sisaldada kõrgel kontsentratsioonil erinevaid lämmastikuühendeid, mis keskkonda sattudes võivad põhjustada veekogude eutrofeerumist ja

põhjavee reostust. Denitritseerijate elutegevuse tulemusel võidakse muundada üleliigne lämmastik kahjutuks N<sub>2</sub>-ks (Ni et al., 2016).

Olenevalt denitritseerivatest mikroorganismidest saab jagada protsessi seente ehk mittetäielikuks denitritfikatsiooniks ja prokariootide ehk täielikuks denitritfikatsiooniks (Joonis 1) (Aldossari & Ishii, 2021). Mõlemat denitritfikatsioonirada kontrollivad erinevad ensüümid ja neid kodeerivad geenid. Seente funktsionaalseid denitritfikatsioonigeene pole nii põhjalikult uuritud võrreldes prokariootidega, mistõttu on ebaselge kui suur osa denitritfikatsioonist erinevates ökosüsteemides on põhjustatud just seente poolt (Zumft, 1997).



**Joonis 1.** Seente ja prokariootide denitritfikatsiooni protsesside skeem, kuhu on märgitud juurde ka protsessi läbiviivad reduktaasid ja geenid (Ma et al., 2019).

### 1.1.1 Prokariootide denitritfikatsioon

Prokariootide denitritfikatsiooni võivad läbi viia heterotroofsed mikroobid, kes saavad eluks vajaliku süsiniku orgaanilisest ainest (elektrondoonor). Doonoriks on enamjaolt orgaaniline süsinik, mida leidub hapete või kompleksete süsinikuühendite näol. Anaeroobne keskkond on eelistatud, sest limiteeritud hapnikuga keskkonnas kasvavad denitritseerivad mikroobid kõige paremini (Aldossari & Ishii, 2021). Enim denitritfikatsiooniga seotud bakterite perekonnad on *Pseudomonas*, *Paracoccus*, ja *Bacillus*, mida leidub peaaegu igas ökosüsteemis, sealhulgas setetes, reoveepuhastus süsteemides ning pinnases (Zumft, 1997).

Denitritfikatsioon hõlmab endas mitmeid ensümaatilisi reaktsioone (Joonis 1). Esmalt redutseeritakse nitraat (NO<sub>3</sub>) nitritiks (NO<sub>2</sub>) mikroorganismide poolt, kes omavad *narG* või *napA* geene (Ni et al., 2016). Nitriti redutseerimine lämmastikoksiidiks (NO) toimub läbi vaske sisaldava reduktaasi NirK või tsütokroom cd1-sisaldava NirS-i. Lämmastikoksiid redutseeritakse N<sub>2</sub>O-ks läbi reduktaas *norB*. Täieliku denitritfikatsiooni viimaseks etapiks on N<sub>2</sub>O redutseerimine N<sub>2</sub> ja protsessi viib läbi *nosZ* geeni poolt kodeeritud dilämmastikoksiidi reduktaas (Aldossari & Ishii, 2021).

Prokarüootsel denitrifikatsioonil on oluline roll lämmastikuringes, muutes potentsiaalse saasteaine (nitraadi) lämmastikgaasiks (Aldossari & Ishii, 2021). Protsess reguleerib lämmastiku taset atmosfääris ja seeläbi aitab kaasa toitainete ringlusele ning omab praktilist rakendust reoveepuhastuses, kus liigne lämmastik eemaldamiseks reoveest (Ni et al., 2016).

### **1.1.2 Seente denitrifikatsioon**

Lisaks prokarüootidele on leitud ka seeni (*Ascomycetes* ja *Basidiomycetes*), kes omavad denitrifikatsiooni läbiviivaid reduktaase. Nende hõimkondade esindajad on leitavad erinevatest setetest, muldadest ja samuti rakendatakse neid ka reoveepuhastuses (Martikainen, 2022). Nagu prokarüoodid, eelistavad ka seened anaeroobset või limiteeritud hapnikuga keskkonda ja kasutavad toiduks kergesti kättesaadavat orgaanilist materjali (Zumft, 1997).

Denitrifitseerivatel seentel on vaske sisaldav nitriti reduktaas (*nirK*), mis on seotud mitokondriaalse hingamisahelaga ja sellel on võtmeroll ATP süsteesis. Kõik *nirK* ensüümide järjestused on ühefaasilised ja sarnanevad bakteriaalse *nirK* omadega, mis viitab endosümbiootilise geeniülekanne võimalikkusele minevikus (Martikainen, 2022). Lisaks geenile *nirK* on denitrifitseerivatel seentel olemas ka tsütokroom P450<sub>nor</sub>, mis on lämmastikoksiidi (NO) redutseeriv geen. P450<sub>nor</sub> on seega kõige otsesemalt seotud N<sub>2</sub>O tekkega ja ühtlasi ka üks enimkasutatavaid markergeene seente denitrifikatsiooni protsessis koos seente *nirK* geeniga (Aldossari & Ishii, 2021; Ma et al., 2019).

Seente denitrifikatsiooni ökoloogiline tähtsus ei ole nii üheselt mõistetav võrreldes prokarüootidega, sest puuduvad sellekohased uuringud, mis kvantifitseeriks seente poolt tekitatud N<sub>2</sub>O emissioonide kogust (Ni et al., 2016). Vaatamata sellele, on seentel ja bakteritel ensümaatilistes protsessides palju ühist, mistõttu võib eeldada, et seente panus ja mõju N<sub>2</sub>O ja N<sub>2</sub> emissioonidele võib olla arvatust suurem (Martikainen, 2022).

## **1.2 Lämmastikuringe erinevates ökosüsteemides**

Lämmastiku ringe on biogeokeemiline protsess, mis hõlmab lämmastikuühendite muundumist ühest ühendist teise ning liikumist erinevate ökosüsteemikomponentide vahel (Elser & Bennett, 2011). Erinevused kliima, inimtegevuse ja taimestiku tüübi vahel võivad mõjutada lämmastiku muundumis- ja liikumiskiirust (Cheng et al., 2019). Gaasiline lämmastikuringe on põhjustatud peamiselt nelja mikroobse protsessi tulemusel: nitraadi reduktsioon ammooniumiks (DNRA), nitrifikatsioon, anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon

(ANAMMOX), denitrifikatsioon (van Groenigen et al., 2015). Denitrifikatsiooni tulemusel tekib molekulaarne lämmastik siis, kui mikroorganism omab reduktaasi *nosZ*. (Duan et al., 2023). ANAMMOX protsessi läbiviivatel bakteritel on spetsiaalsed ensüümid (*HZS*, *HDH* ja *NirS*), mille tulemusel toimub ammooniumi ( $\text{NH}_4$ ) ja nitriti ( $\text{NO}_2$ ) redutseerumine  $\text{N}_2$ -ks (Zhang et al., 2022).

Kuna atmosfääris on kõige suurem lämmastikuvaru siis on inimesed õppinud fikseerima õhulämmastikust anorgaanilist lämmastikku. Anorgaaniline lämmastik on taimedele kättesaadav ning sellest toodetakse mineraalväetiseid. Lisaks väetistele saab mulla lämmastiku kontsentratsiooni suurendada liblikõieliste taimedega (Jenkinson, 2001). Liblikõielised taimed on sümbioosis lämmastikku fikseeriva mullabakteriga. Mullabakter (*Rhizobium*) muundab atmosfäärilämmastiku kujule, mis on taimedele kättesaadav, nagu seda on ammoniaak ja nitraadid (Galloway et al., 2003). Põllumajanduses on soovitatav kasvatada mõnda liblikõielist taime, näiteks hernest, vaheldumisi põhisaga (Anas et al., 2020). Sellisel viisil majandatud põllul kasutatakse vähem mineraalväetiseid ja põllu produktiivsus intensiivse saagikoristuse tagajärjel ei vähene (Wang et al., 2018).

### 1.2.1 Metsad

Kõige enam ehk 99,5% lämmastikust asub atmosfääris ja kõigest 0,01% on metsades (Cheng et al., 2019). Suurenenud kogused lämmastikku aineriingetes mõjutavad ka metsaökosüsteeme nii lokaalselt kui ka globaalselt. On näidatud muutusi metsakooslustes, mis on põhjustatud rohkest lämmastikühendite olemasolust atmosfääris (Anas et al., 2020). Intensiivne põllumajandus ja Haber-Boschi protsess on kaks peamist põhjust, miks lämmastiku sadestamine on viimaste kümnenditega võrreldes järsult kasvanud (Gilliam, 2021). Liigne lämmastik metsamullas võib muuta lehtpuude puidu pehmemaks ja poorsemaks, mistõttu on puistu vastuvõtlikum tugevamatest tuultest tingitud kahjustustele. Ilmastikule vastuvõtlikum mets on tulevikustsenaariumeid arvestades probleemne, sest kliimamudelid ennustavad tormide sagenemist (Gilliam, 2021; Lilleskov et al., 2019).

Mulla lämmastikukao kogus ja toimumise tõenäosus sõltub lämmastikühenditest ja kliimatilistest tingimustest. Metsades toimuvad järgnevad protsessid, mis võivad põhjustada lämmastiku ärakannet (Cheng et al., 2019; Chenga et al., 2020). Lämmastiku mineralisatsioon, kus orgaaniline lämmastik muundatakse taimedele omastatavale anorgaanilisele kujule. Nitrifikatsiooni protsessis oksüdeeritakse ammoniaak ( $\text{NH}_3$ ) nitraadiks ( $\text{NO}_3$ ). Ammooniumi

(NH<sub>4</sub>) ja nitraadi (NO<sub>3</sub>) immobilisatsiooni tulemusel kasutavad mikroorganismid eelmainitud lämmastikuühendeid oma elutegevuseks ja lõppsaadusena produtseerivad orgaanilist lämmastikku, mis on taimedele kättesaamatu (Burger & Jackson, 2003). Nitrifikatsiooni käigus tekkinud nitraat võib leostuda välja või muundatakse denitrifikatsiooni tulemusel N<sub>2</sub>O-ks või N<sub>2</sub>-ks (Cheng et al., 2019). Ohtlik kasvuhoonegaas (N<sub>2</sub>O), mis on peamiselt mulla mikrobiomi nitrifikatsiooni ja mittetäieliku denitrifikatsiooni tulem moodustab 70% kogu globaalsest N<sub>2</sub>O emissioonist (Butterbach-Bahl et al., 2013).

### **1.2.2 Märgalad**

Looduslikel märgaladel toimuv lämmastikutsükel tagab ümbritseva valgala kättesaadavuse lämmastikuühenditega. Peamisteks toimuvateks lämmastikuringe protsessideks on nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon (Koutsou et al., 2021). Kuna nitrifikatsioon vajab hapniku olemasolu toimub antud protsess pigem vee pinnakihtides. Denitrifikatsioon on anaeroobsetes tingimustes aset leiduv protsess, mis peamiselt toimub sügavamates vee kihtides ja setetes. Taimed ja vetikad muudavad anorgaanilises vormis lämmastikku orgaaniliseks (Yousaf et al., 2021). Erinevad tegurid nagu näiteks süsiniku kättesaadavus, hapniku olemasolu, mikroorganismide ja taimede kooslused mõjutavad denitrifikatsiooni toimumise tõenäosust ja kiirust. Pikalt vee all olevatel ja halvasti aereeritud aladel toimub peamiselt täielik denitrifikatsioon (Hu et al., 2023).

### **1.2.3 Rannikud**

Ranniku lämmastikuringe on lämmastiku vormi muundumine ja transport, mis leiab aset estuaarides, rannikumärgaladel ja rannikulähedases merekeskkonnas. Sellistel mereäärsetel aladel on oluline roll veekvaliteedil (Marshall et al., 2023). Toitainete rikas sisendvesi (jões, heitvesi, äravool põllumaadelt) põhjustab eutrofeerumist, mille tagajärjel võivad kalad ja teised mereelukad jääda hapnikupuudusesse (Galloway et al., 2003). Sobivates anaeroobsetes tingimustes võib ANAMMOX-i tulemusel lämmastiku kadu (N<sub>2</sub> kujul) rannikualadel olla isegi kuni 75%, mis ületab denitrifikatsioonist põhjustatud kadusid (Marshall et al., 2023). N<sub>2</sub>O emissioonid rannikualadel on rangelt perioodilised ja alluvad globaalsele aastaegade tsüklile. Emissioonid on suuremad suvisel ajal ja väiksemad kevadel. Globaalsete N<sub>2</sub>O emissioonide

erinevused on põhjustatud hooajalisest apvellingust, mis enim mõjutab troopilisi meresid, ja külma-sooja mere segunemisest Lõuna-Jäämeres (Yang et al., 2020).

#### **1.2.4 Rohumaad**

Rohke väetiste kasutamine on muutnud lämmastikuringet ja koosluste mustreid rohumaadel. Mulla süsiniku, lämmastiku ja fosfori (C:N:P) suhe mõjutab taimekooslusi (Schleuss et al., 2019). Kui ühe elemendi kontsentratsioon järsult muutub, näiteks lämmastik, siis väheneb taimkatte võime omastada vajalikke toitaineid, mille tulemusel mõned taimeliigid võivad välja surra ja asenduda teiste liikidega (Wuaden et al., 2020). Üleliigne lämmastik võib põhjustada mulla hapestumist. Happeline muld on enamusele bakteritele ja seentele ebasoodne keskkond, mille tulemusel väheneb ka mullahingamine (Giraud et al., 2021).

Rohumaid on soovitatav väetada varakevadel, mil uuesti tärkavad taimed on toitainenäljas. Väetise kasutamine kasvuperioodi alguses vähendab lämmastikukao tõenäosust atmosfääri või ümbritsevasse keskkonda (Giraud et al., 2021). Karjatavatel rohumaadel on lämmastikukao vähendamine raskendatud pideva loomsete kõrvalsaaduste tekkimise tõttu. Suurenenud lämmastiku koguste juures kasvab ka lämmastiku lendumine ja N<sub>2</sub>O emissioon (Hoekstra et al., 2020). N<sub>2</sub>O on mulla hapestumise üks peamisi põhjustajaid (Giraud et al., 2021). Nitraadi (NO<sub>3</sub>) leostumise tagajärjel võib lämmastik jõuda põhjavette ja lähedal asuvasse veekogudesse põhjustades eutrofeerumist. Rohumaadelt moodustab ligikaudu 86% kogu N<sub>2</sub>O netoheitmest (Dangal et al., 2019).

#### **1.2.5 Põllumaad**

Inimtegevuse mõjud ökosüsteemidele võivad muuta oluliselt looduslikku keskkonnaseisundit. Lageraie puidu aga ka põllu- ja rohumaamaa juurde saamise eesmärgil põhjustab igal aastal miljonite puude langetamist (Xu et al., 2023). Kõige enam on ohustatud Amazonase vihmamets, mis on kaotanud peaaegu 20% oma pindalast (Reygadas et al., 2023). Lageraie tulemusel kaovad kooslused, loomade ja lindude elukohad ning suureneb pinnase erosioonioht. Kuna taimestik seob endasse süsinikku, siis metsade lageraie kiirendab kliimamuutusi (Reygadas et al., 2023; Xu et al., 2023).

Põllumaadel on oluline lämmastikväetiste efektiivsem kasutamine. Umbes 30% põldudele kantud väetisest kasutatakse taimede poolt ja ca 70% ei jõua taimedeni, sest kandub minema tuule ja vee tõttu või emiteerub atmosfääri mikrobioloogiliste protsesside tulemusel (Anas et al., 2020). Suurte lämmastikukadude põhjuseks on üleväetamine ja valede põllumajandusvõtete kasutamine, kuigi kasutades paremaid meetmeid võib seda vähendada 40-55%. Liblikõieliste taimede kasutamine (Wang et al., 2018), ühtlase taimkatte pidev hoidmine, kattekultuurid, tilkväetamine ehk sensorite ja seiremeetodite abil arvutatakse välja igale taimeliigile optimaalne lisaväetise kogus – need on vaid vähesed näited, mis korrektsel kasutamisel vähendaksid lämmastikkadu (Abdalla et al., 2019; Anas et al., 2020; Houlton et al., 2019).

Süntetiliste- ja mineraalväetiste asemel on kasutatud uut ja keskkonnasõbralikumat bioväetist, mis sisaldab bakterit *Bacillus subtilis*. Antud väetis vähendas lämmastiku kadu põllumaalt 54% ja suurendas taimede lämmastiku sidumisvõimet 11,2%, mis kasvatas üleüldist saagikust 5% võrra. Lisaks leiti, et *Bacillus subtilis*, vähendas *nirS*, *nirK* ja *nosZ* geenide arvukust mullas (Sun et al., 2020). Antud kolme geeni puudumine viitab suuremale nitrifikatsiooni võimele ja vähenenud denitrifikatsioonile. Bioväetise kasutamise tulemusel vähenes toitainete leostumine ja ärakandumine põllult ning suurenes üleüldine mulla tervis ja produktiivsus (Ali et al., 2019; Sun et al., 2020).

Põllumajandusest pärineb ca 60% antropogeenset  $N_2O$ . Intensiivse põllumajandustegevuse tulemusel on põllud koormatud ja vajavad pidevat väetamist, et hoida produktiivsus kõrgena. Üleväetamine aga ei too alati soovitud tulemust, sest toiteained, mida taimed ei suuda omastada, muudetakse denitrifikatsiooni tulemusel tagasi gaasilisteks ühenditeks ( $N_2O$  ja  $N_2$ ) (van Groenigen et al., 2015).  $N_2$  pole keskkonnale ohtlik, aga põhjustab siiski lämmastiku kadusid mullast. Olenevalt mulla mikrobiomist, vee- ja hapnikurežiimist võib toimuda ka mittetäielik denitrifikatsioon, mille lõppsaaduseks on kasvuhoonegaas  $N_2O$  (Galloway et al., 2003). Samuti võib kasutamata jäänud lämmastik kastmisvee ja vihma tulemusel edasi kanduda lähedal asuvasse veekogudesse põhjustades seal eutrofeerumist (Galloway et al., 2003; Sun et al., 2020).

### **1.2.6 Tehismärgalad**

Põldudel ja metsas kasutatavad väetised põhjustavad hajureostust ning need võivad hõlmata suurt ala. Sellistel puhkudel on sobivaks meetmeks tehismärgalad, mis aitavad parandada

veekvaliteeti eemaldades üleliigseid toiteaineid. Olenevalt saasteainetest ja veehulgast võib muutuda süsteemi puhastamisvõime ja saadusteks võib enam tekkida keskkonna mõttes kahjulikke lenduvaid gaasilisi ühendeid nagu näiteks CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S ja N<sub>2</sub>O (Koutsou et al., 2021). Looduslikud märgalad emiteerivad 2-10 korda vähem kasvuhoonegaase võrreldes tehismärgaladega (Hu et al., 2023). N<sub>2</sub>O limiteerimiseks võib kaaluda mitmeid võtteid nagu näiteks vähendada sissetulevat lämmastikku, parandada hapniku kättesaadavust, tasakaalustada peale tulevat veekogust ja soodustada sobiva taimestiku kasvu (Hu et al., 2023; Koutsou et al., 2021). Tehismärgalad võivad omada nii positiivset kui ka negatiivset mõju (Hu et al., 2023).

### **1.2.7 Bioelektrokeemilised süsteemid**

Bioelektrokeemilisteks süsteemideks (BES) nimetatakse süsteeme, mis seovad omavahel bioloogilised ja elektrokeemilised protsessid (Gadegaonkar et al., 2023). Lisaks rohelisema energiatootmise potentsiaalile on BES-idel ka võimekus keskkonnaseisundi parandamiseks ja reovee puhastamiseks (Zheng et al., 2020). Lämmastiku poolest seisneb BES-i tööpõhimõtte lämmastiku redutseerumisprotsessi kiirendamises läbi elektronide vahetuse. Anaeroobsed mikroorganismid kasutavad elektrist saadavaid elektrone näiteks denitrifikatsiooni läbiviimiseks (Gadegaonkar et al., 2023). BES-idel on võimelised reoveest eemaldama üleliigseid lämmastikuühendeid efektiivsemalt võrreldes looduslike- või tehismärgaladega. BES-is olevad mikroobid viivad läbi täielikku denitrifikatsiooni ning ANAMMOX-i, mille tulemusel nitraat (saastatuse indikaatoraine) redutseeritakse inertseks lämmastikuks (N<sub>2</sub>) (Gadegaonkar et al., 2023).

### **1.3 Reaalaja PCR (qPCR)**

Reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) abil on võimalik määrata mitmete protsesside võtmegeenide arvukusi keskkonnaproovides (Fitzpatrick et al., 2010). Näiteks on hinnatud lämmastiku- ja süsinikuringe protsesside toimumist geenikoopiate arvukuste alusel mitmesuguste ökosüsteemides: metsad (Truu et al., 2020) turbaalad (Espenberg et al., 2016; Bahram et al., 2022; Espenberg et al., 2018), põllumaad ja taastatud märgalad (Kasak et al., 2021), murukatused (Teemusk et al., 2022), bioelektrokeemilised süsteemid (Gadegaonkar et al., 2020).

qPCR-iga amplifitseeritakse ehk kordistatakse uuritavat DNA lõiku (Nolan et al., 2013). DNA koosneb kahest nukleotiidide ahelast, mis on omavahel kokku keerdunud ja tekkivat struktuuri nimetatakse kaksikheeliksiks (Powledge, 2004). qPCR-meetodi kasutamine põhineb polümeraasi ahelreaktsioonil ja selleks on vaja DNA-d või RNA-d ning kahte praimerit, mis ühendatakse DNA mõlematesse otsadesse ning mille abil algab lõigu amplifitseerimine. Primerid ise on üheaahelalised ja koonevad nukleotiididest ning nad on sihtmärgispetsiifilised (Mestdagh et al., 2009, Powledge, 2004).

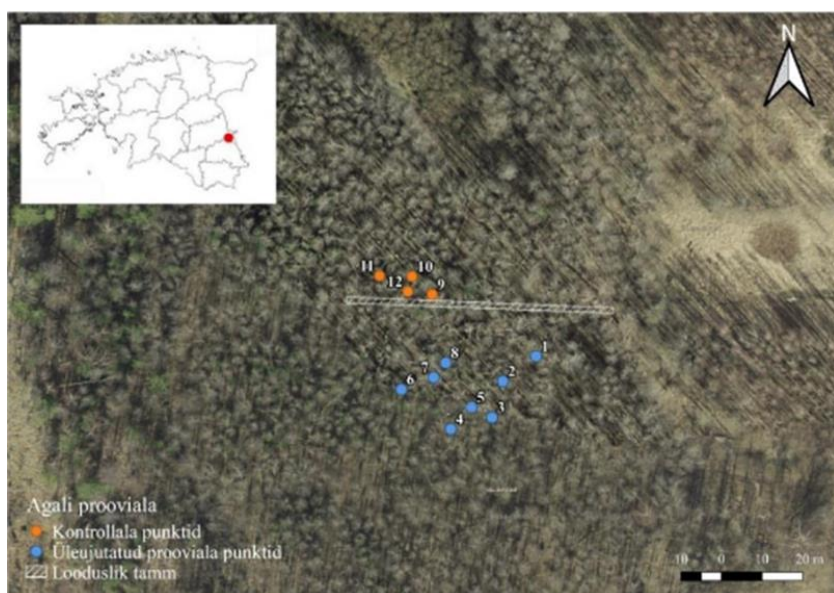
qPCR koosneb kolmest etapist. Esmalt saadakse DNA kaksikahelast üksikahel ehk toimub kuumutamise abil denaturatsioon (Powledge, 2004). Pärast seda toimub üheaahelaliste primerite liitumine üheaahelalise DNA-ga (Valasek & Repa, 2005). Viimane etapp on polümeraasi abil uue DNA lõigu sünteesimine. See toimub tsükliliselt palju kordi tekitades nõnda DNA fragmentidest miljoneid koopiaid, mida on võimalik detekteerida (Powledge, 2004). Reaalaja PCR-meetod baseerub fluorestsentssignaali määramisel, mida tehakse reaalajas. SYBE Green I on üks levinumaid fluorestsentsi andvatest ainetest qPCR-i kasutamisel (Spanamberg et al., 2023). Fluorestsentssignaal annab teavet otsitava geeni olemasolust ja kogusest (Sidstedt et al., 2020).

## 2 Metoodika

### 2.1 Proovialade ja proovide kirjeldus

#### 2.1.1 Mets (hall lepik)

Prooviala paiknes Järvelja õppe- ja katsemetskonnas ning Agali asula külje all, kus oli halllepikumets (*Alnus incana*) (Joonis 2) (Reiss, 2021; Schindler et al., 2020). Põõsa- ja rohurinne on peamiselt domineeritud hariliku angervaksa (*Filipendula ulmaria*), hariliku toominga (*Filipendula ulmaria*) ja vaarikapõõsaste poolt (*Rubus idaeus*). 2017. aastal viidi läbi üleujutus eksperiment, kui sama aasta suvel (24.07. kuni 07.08) pumbati proovialale 55-75 m<sup>3</sup> vett ööpäevas ja üleujutades ala. Selles uuringus kasutati kaht mullaproovi (0-10 cm) kuupäevadelt (25.07. ja 16.08.).

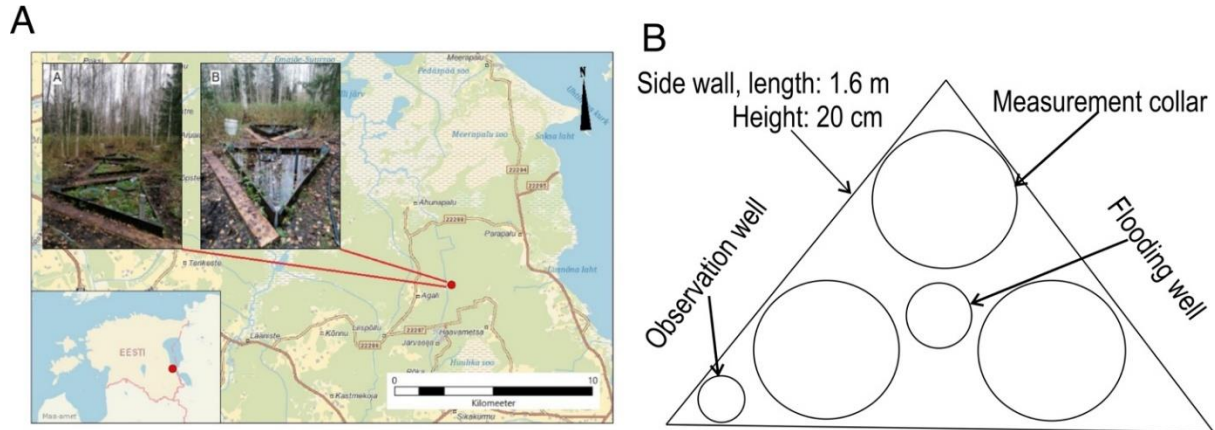


**Joonis 2.** Agali prooviala asukoht ja proovivõtu punktid, kus sinisega on märgitud üleujutatud ala ja oranžidega kontrollala (Reiss, 2021)

#### 2.1.2 Mets (kase- ja kuusemets)

Prooviala paiknes Järvelja õppe- ja katsemetskonnas ning Agali asula lähistel, kus domineerisid kase(*Betula*)- ja kuusepuud (*Picea abies*) (Joonis 3) (Masta et al., 2023). 2020. aasta juulil rajati kuus katselappi. Katselapid erinesid tulenevalt veerežiimi manipulatsioonist. Üleujutatud katselappidele pumbati lisavett Apna kraavist, et tekitada anoksiline keskkond. Kuivendatud katselappidel juhiti vett tsentraalkaevu ja pumba abil alalt eemale.

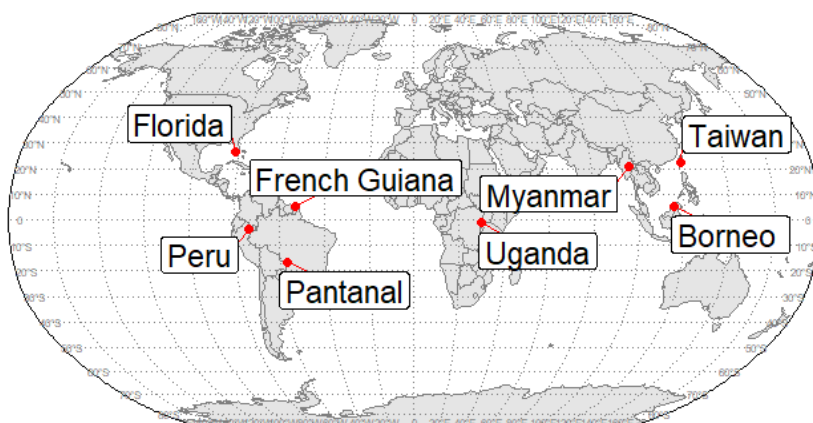
Mullaniiskused olid 71-92% üleujutatud aladel ja 50-65% kuivendatud katselappidel. Selles uuringus kasutati üht mullaproovi kuivendatud ja üht üleujutatud alalt (0-10 cm).



**Joonis 3.** Katseala asukoht (A) ja katselapi ülesehituse skeem (B) (Masta et al., 2023).

### 2.1.3 Troopilised sood

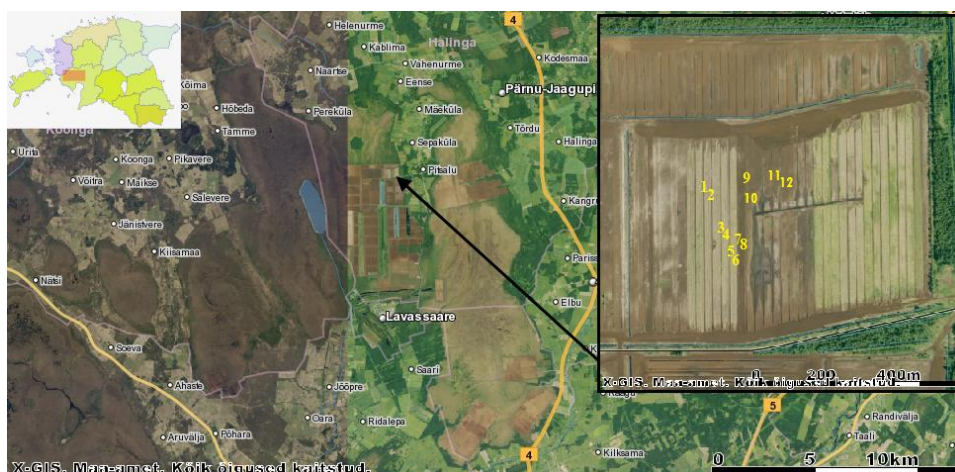
Prooviajad olid troopilistes soodes Aasias, Ameerikas ja Aafrikas (Joonis 4) (Espenberg et al., 2019; Bahram et al., 2022; Espenberg et al., 2022). Kuigi koguti ligi paarsada turbaproovi, siis selles uuringus kasutati üht turbaproovi (0-10 cm) Taiwanist ja Ugandast ja mõlemad alad olid inimtegevusest mõjutatud vastavalt kuivendamise või põllumajanduse näol.



**Joonis 4.** Troopiliste soode asukohad (Espenberg et al., 2022).

## 2.1.4 Mahajäetud turbakaevandusala

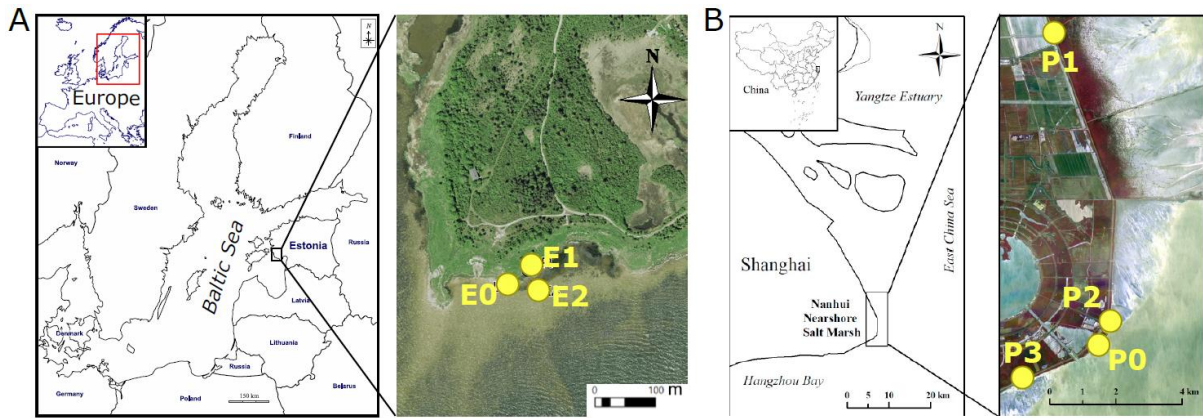
Prooviala paiknes Lavassaare soos mahajäetud freesturba tootmisalal Pärnu maakonnas (Joonis 5) (Espenberg, 2013; Espenberg et al., 2016). Uuring tehti kolmel päiderooga (*Phalaris arundinacea*) kultiveeritud ja kolmel ilma taimestikuta alal, kus kõik katselapid poolitati ning ühele poolele lisati väetist ja teine pool jäeti väetamata. Selles uuringus kasutati kaht mullaproovi (0-20 cm) päiderooga (*Phalaris arundinacea*) kultiveeritud ja väetamata alalt.



**Joonis 5.** Mahajäetud turbakaevandusala (Lavassaare/Pärnumaa) katselapid: 1-6 on taimestatud päiderooga (väetamata (1, 4, 6) ja väetatud (2, 3, 5)); 7-12 on taimestamata (väetamata (7, 10, 12) ja väetatud (8, 9, 11)) (Espenberg, 2013).

## 2.1.5 Rannikud

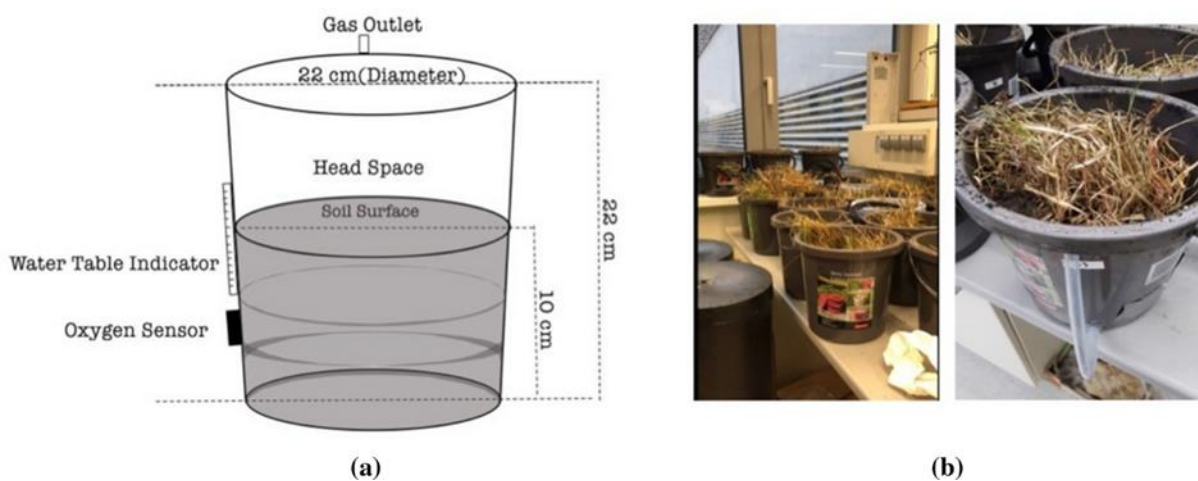
Proovialadeks olid riimveelised rannikualad Lääne-Eestis (Pivarootsi) ja Ida-Hiinas (Nanhui) (Joonis 6) (Espenberg et al., 2021; Pille, 2020). Eesti alad olid taimkatteta või taimestunud peamiselt hariliku pillirooga (*Phragmites australis*) või kare-kaislaga (*Schoenoplectus tabernaemontanii*) ja Hiina alad olid samuti taimkatteta või kõrkjate ja sooheina poolt asustatud ala, noor sooheinaga taimestunud ala ja peamiselt vanemast sooheinast koosnev ala. Selles uuringus kasutati nelja mullaproovi (0-10 cm) järgmistelt aladelt: taimkatteta (Eesti), hariliku pillirooga (Eesti), sooheina *Spartina alterniflora* ja kõrkja *Scirpus mariqueter*'iga taimestunud ala (Hiina), vanema sooheina *S. alterniflora*'ga (Hiina) (Pille, 2020).



**Joonis 6.** Katsealade asukohad Eestis (A) ja Hiinas (B): taimestamata (E0 ja P0), *Phragmites australis* (E1), *Schoenoplectus tabernaemontanii* (E2), *Spartina alterniflora* ja *Scirpus mariqueter* (P1), vanem *Spartina alterniflora* (P2), and noorem *Spartina alterniflora* (P3) (Espenberg et al., 2021).

### 2.1.6 Jõelamm

Katses kasutati polüvinüülkloriidist valmistatud ämbreid (kokku kolmkümmend kuus), kuhu sisse lisati 10 cm paksune turbakiht, mis pärines Tartu lähedal asuvast Kardla looduskaitsealalt (Joonis 7) (Masta et al., 2022). Erinevates töötlustes manipuleeriti veetasemega (kuivad, keskmise veetasemega või üleujutatud). Selles uuringus kasutati üht mullaproovi (0-10 cm) kuivadest töötlustest.



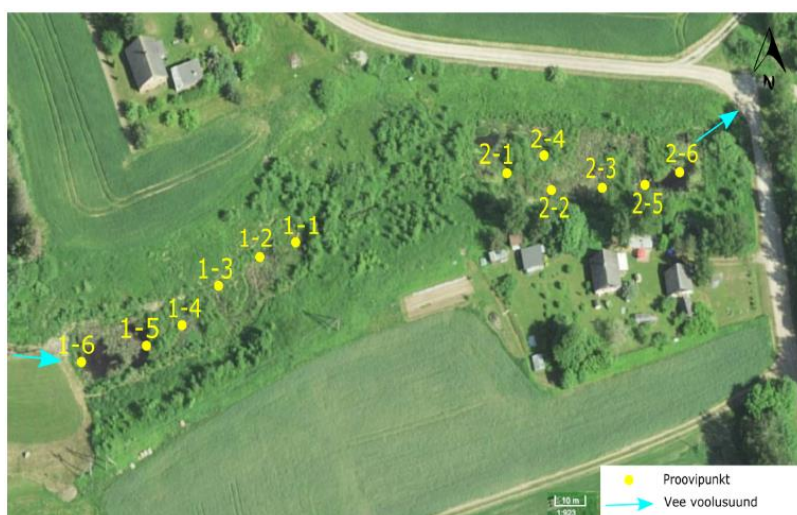
**Joonis 7.** Jõelammi mulla mesokosmid skemaatiliselt (a) ja fotona (b) (Masta et al., 2022).

### 2.1.7 Põllumajandusalad ja taastatud märgalad

Proovialad olid seitsmes ökosüsteemis: kolm ala olid põllumajandusmaad ja neli ülejäänut taastatud looduslikud märgalad (Kasak et al., 2021). Selles uuringus kasutati üht mullaproovi (0-10 cm) vastavatest ökosüsteemidest: maisipõld oli rajatud kuivendatud turbaalale ja nõudis intensiivset fosfor- ja lämmastikväetiste kasutamist; *Alfa* põld (mitmeaastane kaunvili, mida peamiselt kasvatatakse veisekarja toiduks; väga kiire kasvuga, millest tulenevalt võib hea aasta jooksul korjata saaki isegi kuni seitsmel korral); kariloomade karjamaa on saanud Sherman-i niiske orgaanikarikka rohumaad kuivendamisel; East End märgala on taastatud märgalana põllumajandusest.

### 2.1.8 Tehismärgala

Tartu maakonnas Uhti külas asub Vända avaveeline märgala, mis puhastab põhja- ja pinnavett, mis on saastunud piirkonna põllumajanduse hajureostusest (Joonis 8) (Kuusk, 2022). Tehismärgala koosneb settetiigist, mille pindala on ligikaudu 1800 m<sup>2</sup> ja kahest väiksemast madalaveelisest märgalast, kus kumbki on 2200 m<sup>2</sup>. Peamiseks domineerivaks taimkatteks on pilliroog ja hundinui. 2019. aasta vegetatsiooniperioodil koguti tehismärgalalt 24 setteproovi (0-10 cm), millest selles uuringus kasutati proove punktidest 1-2 ja 2-1 (Joonis 8).

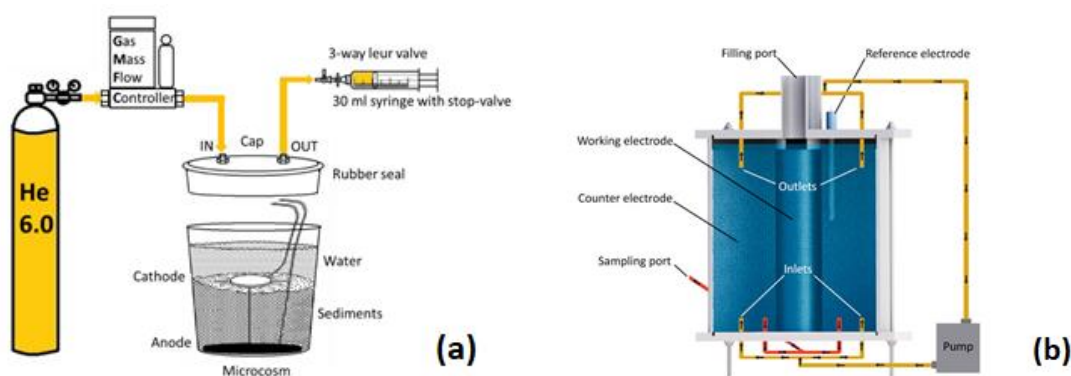


**Joonis 8.** Proovipunktid Vända tehismärgalal (Kuusk, 2021).

## 2.1.9 Bioelektrokeemilised süsteemid

Tehismärgalade mikroobset elektrokeemilist snorkelsüsteemi kasutati lämmastikreostuse puhastamiseks (Joonis 9a) (Gadegaonkar et al., 2020). Selles uuringus kasutati kaht tüüpi katoodidega (erineva suurusega grafiitvilt (1:2) ja vask katoodina) jookstatud katse setet mikrobioloogilisteks analüüsideks.

Katse viidi läbi mikroobses elektrosünteesireaktoris (Joonis 9b), millega puhastati nitraadirikast sünteetilist reovett, mis imiteeris reostunud põhjavett (Lust et al., 2022). Selles uuringus kasutati anoodi ja katoodi grafiitvilti mikrobioloogilisteks analüüsideks.



**Joonis 9.** Skeem settest ja snorkeli ülesehitusest (a) (Gadegaonkar et al., 2020). Mikroobne elektrosünteesireaktor (b) (Lust et al., 2022).

## 2.2 Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil ja andmeanalüüs

Geenikoopiate arvukuse määramisel kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR). Proovidest määrati seente denitrifikatsiooni *nirK* geenide arvukused. Varasemalt on eelnevates uuringutes juba määratud prokariootide denitrifikatsiooni (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) kodeerivate geenide arvukused. Kõik geenikoopiate määramised tehti termotsükler Rotor-Gene Q (Qiagen, USA) kasutades.

Märklaudgeenide praimereid, praimerite kontsentratsioonid ja qPCR programmid on välja toodud tabelis 1. Reaktsioonisegu koguseks oli 10 µl, millest 1 µl moodustas proovist eraldatud DNA, päri- ja vastassuunalisi praimerid (vt kontsentratsioone tabelist 1), 5 µl reagent Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ja ülejäänud vesi. Igat proovi

amplifitseeriti kolmes korduses ning igale mõõtmisele lisati negatiivsed kontrollproovid tuvastamiseks võimalikku saatumist.

Esmane tulemuste kvaliteedikontroll tehti tarkvaraga RotorGene Series Software v. 2.0.2. Programmiga LinRegPCR v.2021.2 (Ruijter et al., 2009) võeti arvesse efektiivsused. Kaliiberkõveraaid kasutades arvutati geenikoopiate arvud vastava geeni koopiate arvuna grammi kuivaine kohta (koopiat/gKA kohta). Detailsem kirjeldus rakendatud qPCR-i meetodist ja geenikoopiate arvude arvutamisest on saadaval Espenberg et al., 2018.

**Tabel 1.** qPCR-i praimerid ja nende karakteristikud ning programmid.

Märklaud-geen	Praimer	Praimerite kontsentratsioonid (µM)	Amplikoni pikkus (bp)	qPCR programm	Viide
Seente <i>nirK</i>	FnirK-R2	0,8	233	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30s	(Chen et al., 2016)
	FnirK-F3				
<i>nirK</i>	nirK876	0,8	165	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 58°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s <sup>a</sup>	(Hallin & Lindgren, 1999)
	nirK1040				
<i>nirS</i>	nirSCd3af	0,8	431	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s <sup>a</sup>	(Kandeler et al., 2006)
	nirSR3cd				
<i>nosZI</i>	nosZ2F	0,8	267	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s <sup>a</sup>	(Henry et al., 2006)
	nosZ2R				
<i>nosZII</i>	nosZIIF	0,6	~700	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s, 80°C 45 s <sup>a</sup>	(Jones et al., 2013)
	nosZIIR				

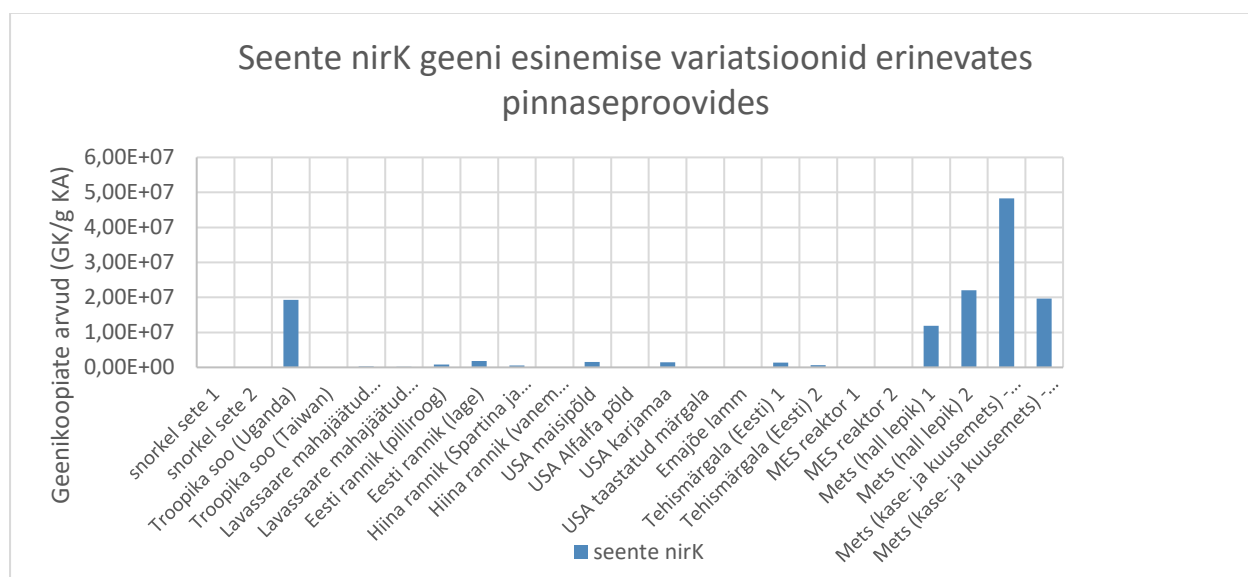
<sup>a</sup> - Fluorestsentsignaali mõõtmine

Andmetöötlus toimus Microsoft Excelit kasutades, millega on tehtud ka töös kasutatavad joonised. Bakalaureusetöö autor kasutas eelnevalt proovidest eraldatud DNA-d. Autor viis ise läbi kvantitatiivse polümeraasiahel reaktsiooni (qPCR) seente denitrifikatsiooni jaoks ja arvutas välja geenikoopiate arvud. Lisaks tegi autor andmeanalüüsi.

### 3 Tulemused

#### 3.1 Seente denitrifikatsioon

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni tulemusel leidus enim seente *nirK* gene just Eesti Agali proovidest (Joonis 10). Enamus Agali proove on kogutud üleujutatud Järvelja katsealadelt, mis olid liigniisked alad. Kõige kõrgem oli seente *nirK* geenide arvukus ( $4,83 \times 10^7$  geenikoopiat grammis kuivaines (GK/g KA)) liigniiskes kase- ja kuusemetsas. Samuti olid kõrged seente *nirK* geenikoopiate arvukused veel hall leplikus. Geenikoopiate arvukuse poolest oli kolmandal kohal proov kuivendatud kase- ja kuusemetsaga alalt ( $1,96 \times 10^7$  GK/g KA). Lisaks Eesti proovialadele näitas küllaltki kõrget geenikoopiate arvukust Uganda troopiline soo ( $1,93 \times 10^7$  GK/g KA). Troopiline soo Taiwanis, alfalfa põld, jõelammi ala ja MES reaktori proovides oli seente *nirK* geenikoopiate arvukus alla määramispiiri. Väikeses koguses seente *nirK* gene leidus USA maisipõllult ja Eesti rannikualadelt.

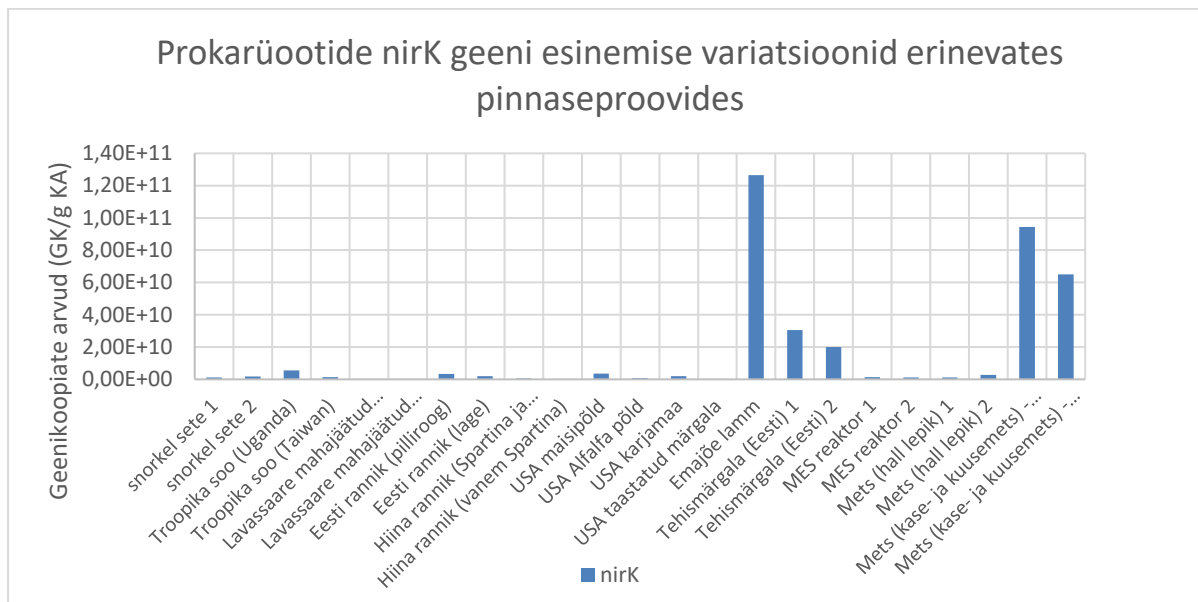


Joonis 10. Seente *nirK* geenikoopiate arvukus uuritud ökosüsteemides.

#### 3.2 Prokarüootide denitrifikatsioon

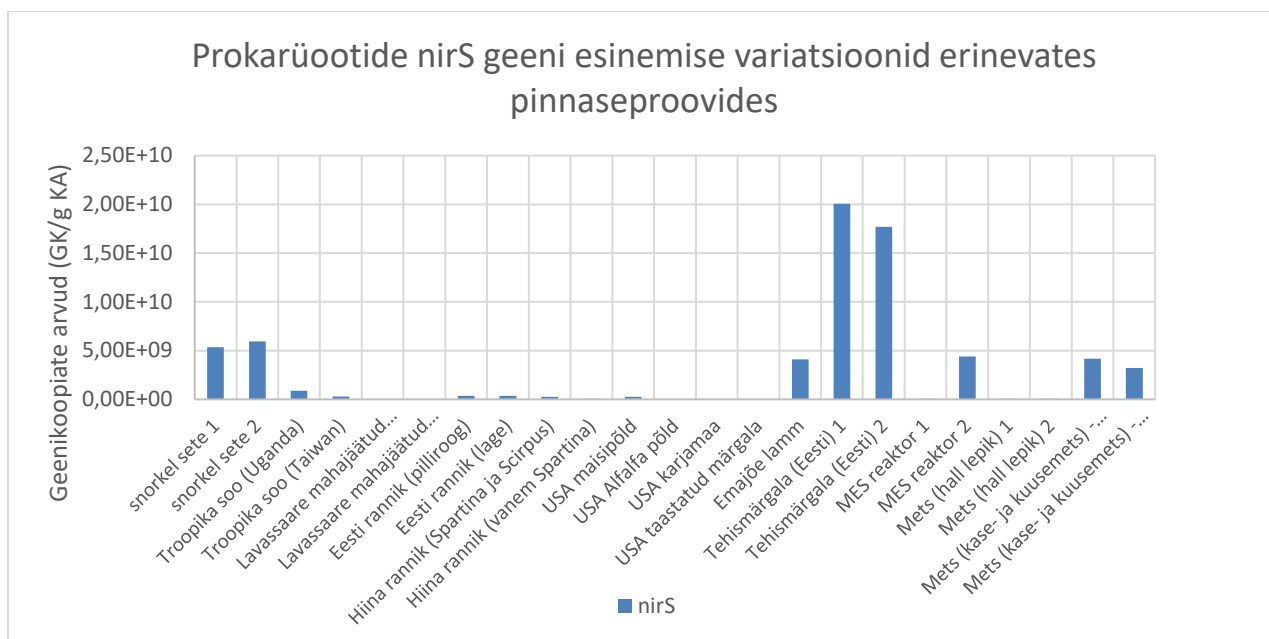
Enim prokarüootide *nirK* geenikoopiaid ( $1,26 \times 10^{11}$  GK/g KA) oli jõelammil (joonis 11). Sarnaselt seente denitrifikatsiooni geenile, leidus ka Agali kuivendatud ja üleujutatud kuusemetsa proovist võrdlemisi suures kontsentratsioonis prokarüootset *nirK* geeni. Tehismärgalalt võetud proovides oli prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukus  $1,99 \times 10^{10}$  ja

3,06x10<sup>10</sup> GK/g KA kohta. Ülejäänud alade prokariootide *nirK* geenikoopiate arvukus jäi vahemikku 1,52x10<sup>8</sup> kuni 5,47x10<sup>9</sup> GK/g KA kohta.



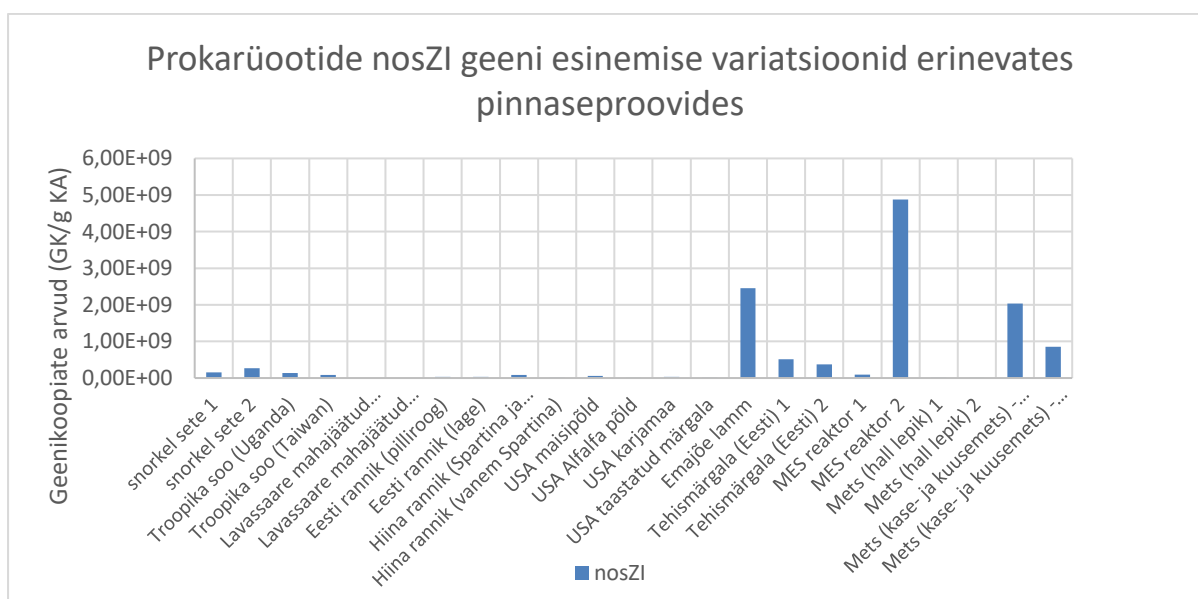
**Joonis 11.** Prokariootide *nirK* geenikoopiate arvukus uuritud ökosüsteemides.

Prokariootide *nirS* geenikoopiate arvukus oli tehismärgalal 2,00x10<sup>10</sup> ja 1,77x10<sup>10</sup> GK/g KA (Joonis 12). Snorkelsüsteemide settes oli *nirS* geenikoopiate arvukus ca5,00x10<sup>9</sup> GK/g KA, mis on sarnane mikroobse elektrosünteesireaktori proovidele. Kase- ja kuusemetsa ökosüsteemides oli *nirS* geenidel palju väiksem osatähtsus võrreldes eelnevate *nirK* geenikoopiatega.



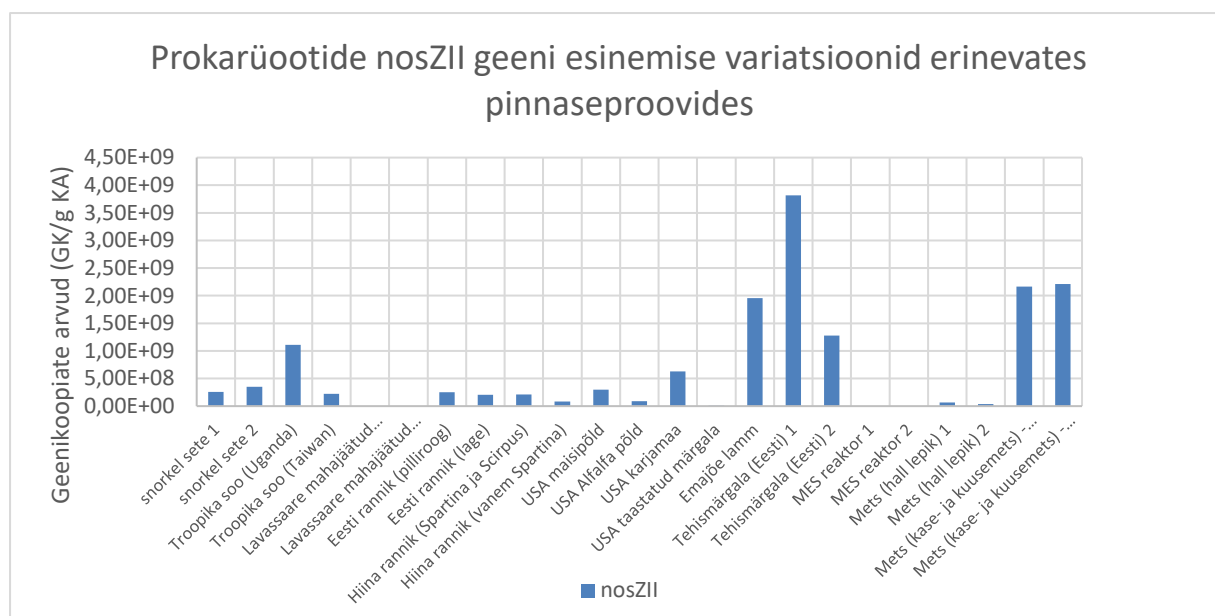
**Joonis 12.** Prokarüootide *nirS* geenikoopiate arvukus uuritud ökosüsteemides.

*nosZI* geenikoopiate arvukus oli suurim järgnevates ökosüsteemides: mikroobne elektrosünteesireaktor (MES) katood, jõelamm, üleujutatud ja kuivendatud kase- ja kuusemetsa mullaproovid (Joonis 13). Kõige kõrgem oli *nosZI* geenikoopiate arvukus MES-i katoodis ( $4,87 \times 10^9$  GK/g KA). Samuti tuvastati rohke geenikoopiate koguarvukus jõelammi mullaproovist ( $2,45 \times 10^9$  GK/g KA) ja tehnilikult liigniiskeks muudetud Järvselja katsemetsas ( $2,03 \times 10^9$  GK/g KA).



**Joonis 13.** Prokarüootide *nosZI* geenkoopiate arvukus uuritud ökosüsteemides.

Geen *nosZII* oli tuvastatav nähtavalt kõige rohkematest ökosüsteemidest (Joonis 14). Kui *nosZI* geenikoopiate arvukus oli tehismärgalal võrdlemisi väike, siis *nosZII* on just enim detekteeritud tehismärgala ülemjooksul ( $3,81 \times 10^9$  GK/g KA). Tehismärgalale järgneb geenikoopiate arvukuse poolest kuivendatud ( $2,21 \times 10^9$  GK/g KA) ja liigniiske ( $2,16 \times 10^9$  GK/g KA) kase- ja kuusemetsa ala proovid. Jöelammi ning Uganda troopiline soo mullad sisaldasid samuti küllaltki märkimisväärset koguses *nosZII* geeni. Hiina ranniku, USA karjamaa ja taastatud märgala *nosZII* geenikoopiate arvukus oli väike. Väikses vahemikus  $9,76 \times 10^6$  kuni  $6,27 \times 10^8$  GK/g KA leidis denitrifitseerivat geeni *nosZII* ka USA karjamaalt ning kõrkjate ja sooheina poolt asustatud Hiina rannikualalt.

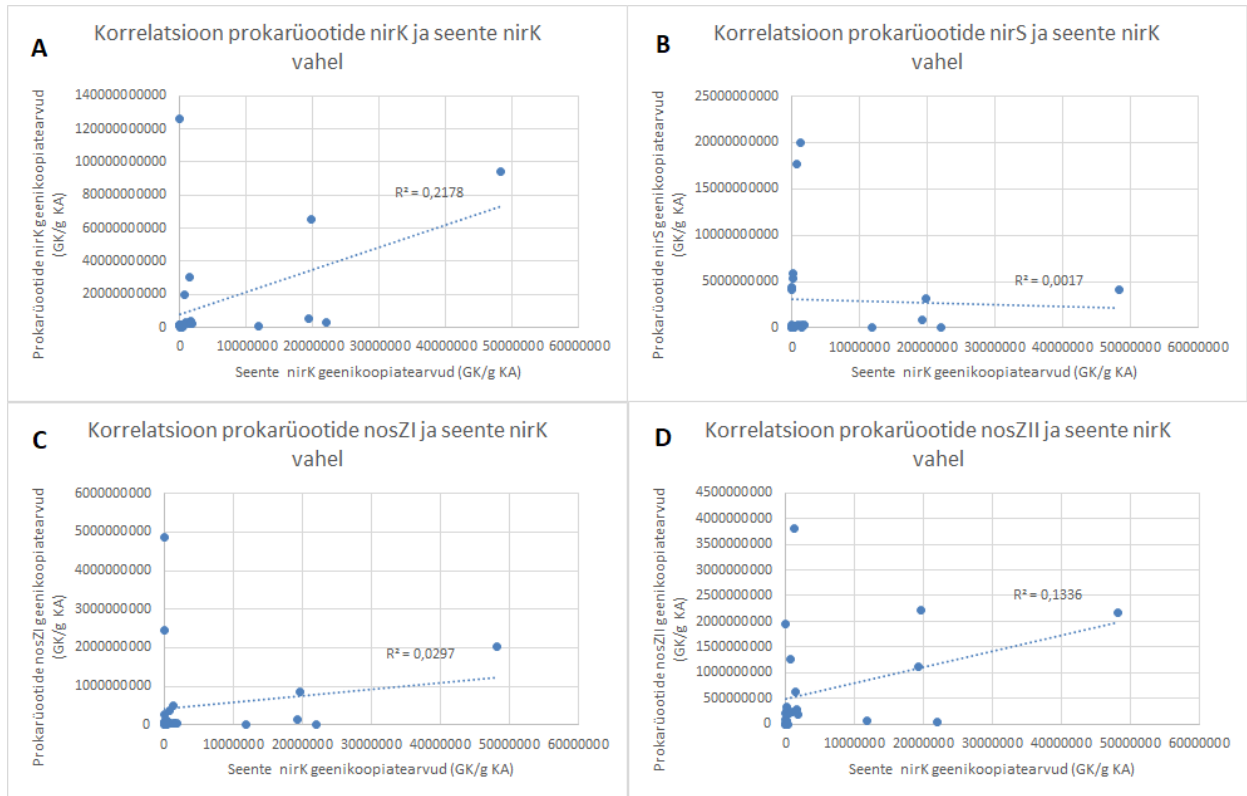


**Joonis 14.** Prokarüootide *nosZII* geenikoopiate arvukus uuritud ökosüsteemides.

### 3.3 Prokarüootide ja seente denitrifitseerijate omavahelised suhted

Seos praktiliselt puudub seente *nirK* geenide arvukuse ja *nirS* geenikoopiate arvu ning *nirK* geenide arvukuse ja *nosZI* geenikoopiate arvu vahel (Joonis 15B). Kõige tugevam positiivne seos ( $R^2 = 0,2178$ ) on nähtav joonisel 15A, kus prokarüootide *nirK* ja seente *nirK* geenide

arvukused on seoses. Samuti on positiivne seos seente *nirK* geenide arvukuse ja *nosZII* geenikoopiate arvu vahel.



**Joonis 15.** Seente *nirK* ja prokarüootsete markergeenide (*nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII*) ja vahelised seosed.

## 4 Arutelu

Denitrifikatsiooni mõjutab erinevate ökosüsteemide pinnase niiskusesisaldus ja lämmastikuühendite rohkus. Geenide kvantifitseerimisel selgus, et enim denitrifitseerivaid mikroorganisme leidis just üleujutatud või liigniisketel aladel.

Kõige enam seente denitrifitseerivaid gene (seente *nirK*) leidis üleujutatud Agali kase- ja kuusemetsas. Niisked tingimused loovad denitrifitseerivatele mikroorganismidele soodsa keskkonna, kus läbi viia nitraadi ( $\text{NO}_3$ ) konverteerimist dilämmastikoksiidiks ( $\text{N}_2\text{O}$ ) või prokarüootide puhul ka molekulaarseks lämmastikuks ( $\text{N}_2$ ). Samuti mängib denitrifikatsiooni protsessi toimumises olulist rolli ka mullatemperatuur. Üleujutatud Agali hall lepikus oli seente *nirK* geenikoopiate arvukus juulis 53% suurem võrreldes augustiga. Juuli on Eestis kõige soojem kuu, seega siit võib välja järeldada positiivset seost temperatuuri ja mikroorganismide arvukuse vahel. Denitrifikatsiooni sõltuvus füüsikalistest parameetritest on kirjeldatud ka Schindler et al., 2020 uuringus, kus leiti, et denitrifitseerivatele prokarüootidele ja seentele sobis niiskusesisaldus, mis jäi vahemikku  $0.5\text{--}0.6 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ .

Seente, kes omavad *nirK* geeni, olemasolu USA maisipõllul ja Eesti rannikualadel võib põhjendada sellega, et maisipõld vajab saagikuse hoidmiseks palju lisaniisutust ja rannikuala pinnas on perioodiliste veetasemete kõikumise poolest küllastunud, mis viib anoksilise keskkonna ja denitrifitseerivate seente vohamisele.

Prokarüootide denitrifikatsioonigenide arvukused olid kõige kõrgemad aladel, kus lisaks suurele niiskusesisaldusele oli ka toitaineid väetiste või reovee kujul. Espenberg et al., 2018 uuringus leiti, et turbaaladel panustavad *nirS* geeni omavad prokarüoodid just enim denitrifikatsiooni protsessi. Antud bakalaureusetöö raames tehtud qPCR analüüs näitas samuti, et prokarüoote, kes omavad *nirS* gene, oli võrreldes teiste *nirK* ja *nosZ* gene omavate prokarüootidega kõige rohkem jõelammi alal.

Kõige väiksem geenikoopiate arvukus oli USA taastatud märgalal, mis asub Californias. Ala oli nii toitainerikas kui ka liigniiske. Kuigi selline ala peaks denitrifitseerivatele mikroorganismidele sobima, siis olid siiski denitrifitseerivaid markergeene omavate mikroobide arvukus väike. Kasak et al., 2021 näitas, et vanemad märgalad, mis on uuesti taastatud, pigem seovad süsinikku ja vähendavad märkimisväärselt  $\text{N}_2\text{O}$  emissioone.

*nosZ* geenil võib olla kaks klaadi *nosZI* ja *nosZII*. Kahe geeni erinevus seisneb geneetilises järjestuses. Enim detekteeriti *nosZI* olemasolu Vända tehnikult märgalalt. Märgaladega

üritatakse puhastada reovett läbi nitrifikatsiooni ja dentrifikatsiooni protsesside ja lõppsaaduseks võiks olla molekulaarne lämmastik ja mitte diämmastikoksiid. Kasak et al., 2021 leidis, et N<sub>2</sub>O emissioonide potentsiaal on tingitud nirK ja nirS geenide rohkusest. Lisaks on näidatud tugevat korrelatsiooni *nirK* geenide ja *nosZ* geenide vahel Bahram et al., 2022 töös. Bakalaureusetöö raames tehtud andmeanalüüsis, aga ei tuvastatud selget korrelatsiooni *nosZI*, *nosZII* ja *nirK* geenide vahel.

## Kokkuvõte

Dilämmastikoksiidi ehk N<sub>2</sub>O emissioone mõjutavad eelkõige liigniisked pinnased, mis põhjustavad hapnikuvaese mullakeskkonna tekkimist ja soodustavad seeläbi denitrifitseerivate prokarüootide (bakterid ja arhed) aga ka denitrifitseerivate seente vohamist. Küllaltki hästi on teada inimtekkeliste tegurite roll kliimamuutustes, aga vähem on uuritud ökoloogiliste protsesside kaudu atmosfääri sattuvate N<sub>2</sub>O emissioonide hulka.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, millistest looduslikest ökosüsteemidest pärinevad N<sub>2</sub>O emissioonid ja kui mõjutavad seda prokarüootid ja seened.

Uuringus kasutati 24 pinnaseproovi erinevatest ökosüsteemidest. Kokku 11 proovi olid kogutud Eesti ökosüsteemidest: metsad (Agali hall leplik ning kase- ja kuusemets), tehismärgala (Vända), jõelamm (Kardla) ning rannikupiirkonnast (Lääne-Eesti). Neli mullaproovi pärinesid Ameerika Ühendriikidest, kaks Hiina rannikult, kaks troopilistest Taiwani ja Uganda soodest ning neli proovi olid bioelektrokeemilistest reaktorkatsetest. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooniga tuvastati kõigist proovidest denitrifikatsiooni protsessi läbiviivad markergeenid (seente *nirK*, prokarüootide *nirK*, *nirS*, *nosZ* klaad I ja klaad II) ning nende geenikoopiate arvukus.

Töö tulemustest järeldus, et liigniisketel aladel domineerivad seente *nirK* ja prokarüootide *nirK*, *nirS* ja *nosZII* geenid. *nosZ* klaad I geenikoopiate koguarv oli suurim mikroobse elektrosünteesireaktori setteproovis, mis oli rikastatud lämmastikuühenditega, et imiteerida reostunud põhjavett. Uuringu tulemustest on näha, et seente denitrifikatsiooni rolli globaalses N<sub>2</sub>O ringes on väga vähe uuritud ja panust alahinnatud.

## Summary

Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions are primarily influenced by flooded areas, causing the soil to turn into an anoxic environment that promotes denitrifying prokaryotes (bacteria and archaea) as well as denitrifying fungi. The role of anthropogenic factors in climate change is fairly known, but less research has been conducted on the ecological processes that also emit N<sub>2</sub>O emissions into the atmosphere.

The aim of this bachelor's thesis was to examine the sources of N<sub>2</sub>O emissions from natural ecosystems and to determine the extent to which prokaryotes and fungi contribute to these emissions.

The study utilized 24 soil samples that were collected from various continents. A total of 11 samples were gathered from local forests in Estonia (Agali alder, birch and spruce forests), constructed wetland (Vända), a river floodplain (Kardla), and coastal areas in Western Estonia. Four soil samples originated from the United States, two from the Chinese coast, two from tropical swamps in Taiwan and Uganda, and four samples were sediments from bioelectrochemical reactor experiments. Real-time polymerase chain reaction was employed to detect marker genes (fungal *nirK* and prokaryotic *nirK*, *nirS*, *nosZ* clade I, and clade II) involved in denitrification processes in all samples, along with quantifying their gene copies.

Results of the study concluded that fungal *nirK*, prokaryotic *nirK*, *nirS*, and *nosZII* genes dominate in excessively moist areas. The total number of *nosZ* clade I gene copies was highest in the sediment sample from a MES reactor that was enriched with nitrogen compounds to simulate contaminated groundwater. Based on the findings of this study, it can be assumed that the contribution of fungal denitrification to the global N<sub>2</sub>O flux has been previously underestimated, and further research is needed in this field to demonstrate the significance of fungi in the nitrogen cycle.

## **Tänuavaldused**

Töö autor soovib tänada oma suurepärast juhendajat Mikk Espenbergi, kes oli antud bakalaureusetöö valmimisel suureks abiks. Samuti soovin tänada ka kõiki kaasautoreid, kelle kogutud proove ja eraldatud DNA-d ja tulemusi oma töös kasutasin.

## Kasutatud kirjandus

- Abdalla, M., Hastings, A., Cheng, K., Yue, Q., Chadwick, D., Espenberg, M., Truu, J., Rees, R. M., & Smith, P. (2019). *A critical review of the impacts of cover crops on nitrogen leaching, net greenhouse gas balance and crop productivity*. *Global Change Biology*, 25(8), 2530–2543. <https://doi.org/10.1111/gcb.14644>
- Aldossari, N., & Ishii, S. (2021). *Fungal denitrification revisited – Recent advancements and future opportunities*. *Soil Biology and Biochemistry*, 157, 108250. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108250>
- Ali, A. F., Salim, H. A., & Alsaady, M. H. M. (2019). *Response of two wheat cultivars to inoculation of Bacillus subtilis and Phosphorus fertilizer*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1294(9), 092036. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/9/092036>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z.-L., Li, Q., Zeng, X.-P., Liu, Y., & Li, Y.-R. (2020). *Fate of nitrogen in agriculture and environment: Agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency*. *Biological Research*, 53(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>
- Bahram, M., Espenberg, M., Pärn, J., Lehtovirta-Morley, L., Anslan, S., Kasak, K., Kõljalg, U., Liira, J., Maddison, M., Moora, M., Niinemets, Ü., Öpik, M., Pärtel, M., Soosaar, K., Zobel, M., Hildebrand, F., Tedersoo, L., & Mander, Ü. (2022). *Structure and function of the soil microbiome underlying N<sub>2</sub>O emissions from global wetlands*. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29161-3>
- Burger, M., & Jackson, L. E. (2003). *Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping*

- systems*. Soil Biology and Biochemistry, 35(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00233-X)
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E. M., Dannenmann, M., Kiese, R., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). *Nitrous oxide emissions from soils: How well do we understand the processes and their controls?* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1621), 20130122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>
- Chen, H., Yu, F., & Shi, W. (2016). *Detection of N<sub>2</sub>O-producing fungi in environment using nitrite reductase gene (nirK)-targeting primers*. Fungal Biology, 120(12), 1479–1492. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.012>
- Cheng, Y., Wang, J., Chang, S. X., Cai, Z., Müller, C., & Zhang, J. (2019). *Nitrogen deposition affects both net and gross soil nitrogen transformations in forest ecosystems: A review*. Environmental Pollution, 244, 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.054>
- Dangal, S. R. S., Tian, H., Xu, R., Chang, J., Canadell, J. G., Ciais, P., Pan, S., Yang, J., & Zhang, B. (2019). *Global Nitrous Oxide Emissions From Pasturelands and Rangelands: Magnitude, Spatiotemporal Patterns, and Attribution*. Global Biogeochemical Cycles, 33(2), 200–222. <https://doi.org/10.1029/2018GB006091>
- Duan, L., Fan, J., Wang, Y., Wu, Y., Xie, C., Ye, F., Lv, J., Mao, M., & Sun, Y. (2023). *Interaction mechanism between nitrogen conversion and the microbial community in the hydrodynamic heterogeneous interaction zone*. Environmental Science and Pollution Research, 30(3), 5799–5814. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22549-0>
- Elser, J., & Bennett, E. (2011). *A broken biogeochemical cycle*. Nature, 478(7367), Article 7367. <https://doi.org/10.1038/478029a>
- Espenberg, M. (2013). *Päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju mulla arhede kooslusele ja selle metaanitootmise potentsiaalile mahajäetud freesturba tootmisalal*. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/31548>

- Espenberg, M., Pärn, J., Kasak, K., Mander, Ü. (2019). *Lämmastiku mikrobioloogiline aineriing ning N<sub>2</sub>O ja N<sub>2</sub> emissioonid troopilistel turbaaladel*. 308–322, Tartu Ülikooli Kirjastus. <https://www.etis.ee/Portal/Publications/Display/e9bc98a7-d9f0-4494-96919cd348e0485e>
- Espenberg, M., Pärn, J., & Mander, U. (2022). *Impact of Management on Tropical Peatland Nitrogen Cycle: Soil Microbiome and N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> Fluxes*. 2022, B12J-1159.
- 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), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23032-y>
- 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*, 11(9), e0163864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163864>
- Espenberg, M., Yang, B., Pille, K., Maddison, M., Li, X., & Mander, Ü. (2021, märts 4). *Different plant species drive the microbial methane and nitrogen cycles and CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions on coasts affected by brackish water*. vEGU: Gather Online. <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu21-9314>
- Fitzpatrick, K. A., Kersh, G. J., & Massung, R. F. (2010). *Practical Method for Extraction of PCR-Quality DNA from Environmental Soil Samples*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4571–4573. <https://doi.org/10.1128/AEM.02825-09>
- Gadegaonkar, S. S., Mander, Ü., & Espenberg, M. (2023). *A state-of-the-art review and guidelines for enhancing nitrate removal in bio-electrochemical systems (BES)*. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103788. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103788>

- Gadegaonkar, S. S., Philippon, T., Rogińska, J. M., Mander, Ü., Maddison, M., Etienne, M., Barrière, F., Kasak, K., Lust, R., & Espenberg, M. (2020). *Effect of Cathode Material and Its Size on the Abundance of Nitrogen Removal Functional Genes in Microcosms of Integrated Bioelectrochemical-Wetland Systems*. *Soil Systems*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/soilsystems4030047>
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). *The Nitrogen Cascade*. *BioScience*, 53(4), 341–356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- Gilliam, F. S. (2021). *Responses of Forest Ecosystems to Nitrogen Deposition*. *Forests*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/f12091190>
- Giraud, M., Groh, J., Gerke, H. H., Brüggemann, N., Vereecken, H., & Pütz, T. (2021). *Soil Nitrogen Dynamics in a Managed Temperate Grassland Under Changed Climatic Conditions*. *Water*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/w13070931>
- Graf, D. R. H., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). *Intergenomic Comparisons Highlight Modularity of the Denitrification Pathway and Underpin the Importance of Community Structure for N<sub>2</sub>O Emissions*. *PLOS ONE*, 9(12), e114118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>
- Hallin, S., & Lindgren, P.-E. (1999). *PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1652–1657. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999>
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). *Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181–5189. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-06>

- Hoekstra, N. J., Schulte, R. P. O., Forrester, P. J., Hennessy, D., Krol, D. J., Lanigan, G. J., Müller, C., Shalloo, L., Wall, D. P., & Richards, K. G. (2020). *Scenarios to limit environmental nitrogen losses from dairy expansion*. *Science of The Total Environment*, 707, 134606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134606>
- Houlton, B. Z., Almaraz, M., Aneja, V., Austin, A. T., Bai, E., Cassman, K. G., Compton, J. E., Davidson, E. A., Erisman, J. W., Galloway, J. N., Gu, B., Yao, G., Martinelli, L. A., Scow, K., Schlesinger, W. H., Tomich, T. P., Wang, C., & Zhang, X. (2019). *A World of Cobenefits: Solving the Global Nitrogen Challenge*. *Earth's Future*, 7(8), 865–872. <https://doi.org/10.1029/2019EF001222>
- Hu, S., Zhu, H., Bañuelos, G., Shutes, B., Wang, X., Hou, S., & Yan, B. (2023). *Factors Influencing Gaseous Emissions in Constructed Wetlands: A Meta-Analysis and Systematic Review*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijerph20053876>
- Jenkinson, D. S. (2001). *The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture*. 3–13. <https://doi.org/10.1023/A:1004870606003>
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). *The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink*. *The ISME Journal*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., & Philippot, L. (2006). *Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957–5962. <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>
- Kasak, K., Espenberg, M., Anthony, T. L., Tringe, S. G., Valach, A. C., Hemes, K. S., Silver, W. L., Mander, Ü., Kill, K., McNicol, G., Szutu, D., Verfaillie, J., & Baldocchi, D. D. (2021). *Restoring wetlands on intensive agricultural lands modifies nitrogen cycling*

- microbial communities and reduces N<sub>2</sub>O production potential.* Journal of Environmental Management, 299, 113562. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113562>
- Koutsou, O. P., Fountoulakis, M. S., Matsoukas, C., Fyllas, N. M., & Stasinakis, A. S. (2021). *Estimation of N<sub>2</sub>O emissions from wastewater characteristics in constructed wetlands.* Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(6), 106632. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106632>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). *A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything.* Frontiers in Microbiology, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kuusk, K. (2022). *Lämmastikreostuse eemaldamise geneetiline potentsiaal vabaveelistes tehismärgalades.* <https://dspace.ut.ee/handle/10062/82225>
- Lilleskov, E. A., Kuyper, T. W., Bidartondo, M. I., & Hobbie, E. A. (2019). *Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: A review.* Environmental Pollution, 246, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.074>
- Lourenço, K. S., Costa, O. Y. de A., Cantarella, H., & Kuramae, E. E. (2022). *Ammonia-oxidizing bacteria and fungal denitrifier diversity are associated with N<sub>2</sub>O production in tropical soils.* Soil Biology and Biochemistry, 166, 108563. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108563>
- Lust, R., Nerut, J., Gadegaonkar, S. S., Kasak, K., Espenberg, M., Visnapuu, T., & Mander, Ü. (2022). *Single-chamber microbial electrosynthesis reactor for nitrate reduction from waters with a low-electron donors' concentration: From design and set-up to the optimal operating potential.* Frontiers in Environmental Science, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.938631>

- Ma, Y., Zilles, J. L., & Kent, A. D. (2019). *An evaluation of primers for detecting denitrifiers via their functional genes*. *Environmental Microbiology*, 21(4), 1196–1210. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14555>
- Marshall, A. J., Phillips, L., Longmore, A., Hayden, H. L., Heidelberg, K. B., Tang, C., & Mele, P. (2023). *Temporal profiling resolves the drivers of microbial nitrogen cycling variability in coastal sediments*. *Science of The Total Environment*, 856, 159057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159057>
- Martikainen, P. J. (2022). *Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle*. *Soil Biology and Biochemistry*, 168, 108611. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108611>
- Masta, M., Espenberg, M., Gadegaonkar, S. S., Pärn, J., Sepp, H., Kirsimäe, K., Sgouridis, F., Müller, C., & Mander, Ü. (2022). *Integrated isotope and microbiome analysis indicates dominance of denitrification in N<sub>2</sub>O production after rewetting of drained fen peat*. *Biogeochemistry*, 161(2), 119–136. <https://doi.org/10.1007/s10533-022-00971-3>
- Masta, M., Espenberg, M., Kuusemets, L., Pärn, J., Thayamkottu, S., Sepp, H., Kirsimäe, K., Sgouridis, F., Kasak, K., Soosaar, K., Mander, Ü. (2023). *15N tracers and microbial analyses reveal in situ N<sub>2</sub>O sources in contrasting water regimes on drained peatland forest*. *Pedosphere*.
- Mukherji, A., Thorne, P., Cheung, W. W. L., Connors, S. L., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Simpson, N. P., Totin, E., Blok, K., Eriksen, S., Fischer, E., Garner, G., Guivarch, C., Haasnoot, M., Hermans, T., Ley, D., Lewis, J., Nicholls, Z., ... Yassaa, (2019). *SYNTHESIS REPORT OF THE IPCC SIXTH ASSESSMENT REPORT (AR6)*.
- Ni, B.-J., Pan, Y., Guo, J., Viridis, B., Hu, S., Chen, X., & Yuan, Z. (2016). *Denitrification Processes for Wastewater Treatment* (1k 368–418). <https://doi.org/10.1039/9781782623762-00368>

- Nolan, T., Huggett, J., Sanchez, E., Sanders, R., Redshaw, N., & Wilkes, T. (2013). *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15943.96162>
- Pille, K. (2020). *Erinevate taimeliikide mõju mikrobioloogilisele metaani- ja lämmastikuringele ning CH<sub>4</sub> ja N<sub>2</sub>O emissioonidele riimveest mõjutatud rannikul*  
<https://dspace.ut.ee/handle/10062/67595>
- Portmann, R. W., Daniel, J. S., & Ravishankara, A. R. (2012). *Stratospheric ozone depletion due to nitrous oxide: Influences of other gases*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1256–1264.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0377>
- Powledge, T. M. (2004). *The polymerase chain reaction*. *Advances in Physiology Education*, 28(2), 44–50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>
- Prather, M. J., Hsu, J., DeLuca, N. M., Jackman, C. H., Oman, L. D., Douglass, A. R., Fleming, E. L., Strahan, S. E., Steenrod, S. D., Søvde, O. A., Isaksen, I. S. A., Froidevaux, L., & Funke, B. (2015). *Measuring and modeling the lifetime of nitrous oxide including its variability*. *Journal of Geophysical Research. Atmospheres*, 120(11), 5693–5705.  
<https://doi.org/10.1002/2015JD023267>
- Reiss, K. (2021). *Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioloogilisele lämmastikuringele kaldaäärses lepikus*. <http://hdl.handle.net/10062/72792>
- Reygadas, Y., Spera, S. A., & Salisbury, D. S. (2023). *Effects of deforestation and forest degradation on ecosystem service indicators across the Southwestern Amazon*. *Ecological Indicators*, 147, 109996. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.109996>
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). *Amplification efficiency: Linking baseline and bias*

- in the analysis of quantitative PCR data*. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Schindler, T., Mander, Ü., Machacova, K., Espenberg, M., Krasnov, D., Escuer-Gatius, J., Veber, G., Pärn, J., & Soosaar, K. (2020). *Short-term flooding increases CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum*. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60058-7>
- Schleuss, P.-M., Widdig, M., Heintz-Buschart, A., Guhr, A., Martin, S., Kirkman, K., & Spohn, M. (2019). *Stoichiometric controls of soil carbon and nitrogen cycling after long-term nitrogen and phosphorus addition in a mesic grassland in South Africa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 135, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.018>
- Skiba, U. (2008). *Denitrification*. S. E. Jørgensen & B. D. Fath, *Encyclopedia of Ecology* (1k 866–871). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00264-0>
- Spanamberg, A., Ravazzolo, A. P., Araujo, R., Franceschi, N., & Ferreiro, L. (2023). *Bovine ringworm—Detection of Trichophyton verrucosum by SYBR-Green real-time PCR*. *Medical Mycology Case Reports*, 39, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2023.01.002>
- Sun, B., Gu, L., Bao, L., Zhang, S., Wei, Y., Bai, Z., Zhuang, G., & Zhuang, X. (2020). *Application of biofertilizer containing Bacillus subtilis reduced the nitrogen loss in agricultural soil*. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107911. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107911>
- Zhang, B., Sun, H., Wang, N., Sun, Y., Zang, L., & Xue, R. (2022). *Metagenomics uncovers the effect of nitrogen-doped graphene on anammox consortia and microbial function*. *Bioresource Technology*, 351, 126998. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126998>
- Zheng, T., Li, J., Ji, Y., Zhang, W., Fang, Y., Xin, F., Dong, W., Wei, P., Ma, J., & Jiang, M. (2020). *Progress and Prospects of Bioelectrochemical Systems: Electron Transfer and*

- Its Applications in the Microbial Metabolism*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00010>
- Zumft, W. G. (1997). *Cell biology and molecular basis of denitrification*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 533–616.
- Teemusk, A., Espenberg, M., & Mander, Ü. (2022). *Archaea rather than bacteria govern green roofs greenhouse gas production*. *Ecological Engineering*, 176, 106530. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106530>
- Truu, M., Nõlvak, H., Ostonen, I., Oopkaup, K., Maddison, M., Ligi, T., Espenberg, M., Uri, V., Mander, Ü., & Truu, J. (2020). *Soil Bacterial and Archaeal Communities and Their Potential to Perform N-Cycling Processes in Soils of Boreal Forests Growing on Well-Drained Peat*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.591358>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). *The power of real-time PCR*. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- van Groenigen, J. W., Huygens, D., Boeckx, P., Kuyper, T. W., Lubbers, I. M., Rütting, T., & Groffman, P. M. (2015). *The soil N cycle: New insights and key challenges*. *SOIL*, 1(1), 235–256. <https://doi.org/10.5194/soil-1-235-2015>
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). *Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions*. *Frontiers in Plant Science*, 9(313), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>
- Wuaden, C. R., Nicoloso, R. S., Barros, E. C., & Grave, R. A. (2020). *Early adoption of no-till mitigates soil organic carbon and nitrogen losses due to land use change*. *Soil and Tillage Research*, 204, 104728. <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104728>

- Xu, J., Zeng, Q., & Zhang, Z. (2023). *The Relationship between Amazon Rainforest Deforestation and Economic Development*. *Highlights in Business, Economics and Management*, 5, 273–278. <https://doi.org/10.54097/hbem.v5i.5085>
- Yang, S., Chang, B. X., Warner, M. J., Weber, T. S., Bourbonnais, A. M., Santoro, A. E., Kock, A., Sonnerup, R. E., Bullister, J. L., Wilson, S. T., & Bianchi, D. (2020). *Global reconstruction reduces the uncertainty of oceanic nitrous oxide emissions and reveals a vigorous seasonal cycle*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 11954–11960. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921914117>
- Yi Chenga, Jing Wangb, Jinyang Wangc, , Shenqiang Wangd, , Scott X. Change, , Zucong Caia, Jinbo Zhanga, Shuli Niuj, & , Shuijin Hu. (2020). *Nitrogen deposition differentially affects soil gross nitrogen transformations in organic and mineral horizons*. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.103033>
- Yousaf, A., Khalid, N., Aqeel, M., Noman, A., Naeem, N., Sarfraz, W., Ejaz, U., Qaiser, Z., & Khalid, A. (2021). *Nitrogen Dynamics in Wetland Systems and Its Impact on Biodiversity*. *Nitrogen*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/nitrogen2020013>

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

Mina, Karmel Kikas,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Prokarüootide ja seente denitrifikatsiooni potentsiaali hindamine erinevates ökosüsteemides reaalaja PCR meetodiga“, mille juhendaja on Mikk Espenberg, 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 4.0, 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.

*Karmel Kikas*

**23.05.2023**