

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Magistritöö geoinformaatikas ja kartograafias (30 EAP)

Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioomile kaldaäärses lepikus

Kristel Reiss

Juhendajad: PhD Mikk Espenberg,

PhD Ülo Mander

Tartu 2024

Annotatsioon

Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobiomile kaldaäärses lepikus

Kliimamuutustega sagenevad ekstreemsed kliimasündmused, mille tulemusena suureneb üleujutusohu. Magistritöö eesmärk on uurida lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobiomile (lämmastiku (N) ja süsiniku (C) ringele) kaldaäärses lepikus. Üleujutuse ajal langes mulla nitraadi kontsentratsioon, mis muutis keskkonna lämmastiku fikseerijatele, *Bradyrhizobium* ja *Frankia* perekonda kuuluvatele bakteritele sobivamaks. Üleujutus mõjutas positiivselt ka süsinikuringega seotud perekondade *Bryobacter*, *Candidatus Solibacteri* ja *Geobacter* osakaale koosluses. Interpolatsiooni tulemused näitasid, et üleujutusega tekkisid punktid, kus esinesid metaani (CH₄) ja diämmastikoksiidi (N₂O) emissioonide ekstreemumid. Lühiajaline üleujutus mõjutas oluliselt bakterite mitmekesisust pära üleujutust, kui suurenesid mullast metaani (CH₄) emissioonid.

Märksõnad: lämmastikuringe, süsinikuringe, bakterid, seened, arbuskulaarse mükoriisa seened, üleujutus

CERCS kood: P510 – Füüsiline geograafia, geomorfoloogia, mullateadus, kartograafia, klimatoloogia

Abstract

Microbial community response to short-term flooding in a riparian forest

With climate change, extreme weather events are becoming more frequent, and as a result the risk of flooding has increased. The aim of this Master's thesis is to investigate the effect of short-term flooding on the soil microbiome (nitrogen (N) and carbon (C) cycles) in riparian alder forest. During the flood, soil nitrate concentration dropped, which made the environment more suitable for nitrogen-fixing bacteria such as *Bradyrhizobium* and *Frankia*. The flooding had a positive effect on the communities that are related to carbon cycle, genera *Bryobacter*, *Candidatus Solibacter* and *Geobacter*. The interpolation results showed that the short-term flood created points where the extremes of CH₄ and N₂O emissions occurred. The short-term flooding significantly affected bacterial diversity after the flood, with methane (CH₄) emissions from the soil increasing.

Keywords: nitrogen cycle, carbon cycle, bacteria, fungi, arbuscular mycorrhizal fungi, flooding

CERCS code: P510 – Physical geography, geomorphology, pedology, cartography, climatology

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Metsad kliimamuutustes.....	8
1.1.1. Süsinikuringe	8
1.1.2. Lämmastikuringe	10
1.2. Mulla mikrobiom metsas	14
1.2.1 Bakterid.....	15
1.2.2. Seened	16
1.3. Molekulaargeneetilised meetodid mikroobikoosluste uurimiseks.....	16
1.3.1. Kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon.....	17
1.3.2. Sekveneerimine.....	17
1.3.2.1 Amplikonipõhine sekveneerimine	18
1.3.2.2 Metagenoomika.....	18
2. Metoodika	20
2.1. Prooviala ja üleujutuskatse kirjeldus.....	20
2.2. Keemilised, mikrobioloogilised ja kasvuhoonegaaside emissiooni mõõtmised ja analüüsid	21
2.3. Bioinformaatiline analüüs	22
2.4. Ruumianalüüs.....	24
2.5. Statistiline analüüs (ja autori osalus).....	25
3. Tulemused.....	27
3.1. Bakterid	27
3.2. Seened	35

3.3. Arbuskulaarne mükoriisa	42
3.4. Seosed mikroobse mitmekesisuse ja protsesside ning keskkonnaparameetrite vahel.....	45
3.5 Ruumianalüüs.....	47
4. Arutelu	50
Kokkuvõte.....	56
Summary.....	58
Tänuavaldused	60
Kasutatud kirjandus.....	61

Kasutatud lühendid

AM – arbuskulaarne mükoriisa

C – süsinik

CH₄ – metüülhüdroid ehk metaan

CO₂ – süsinikdioksiid ehk süsihappegaas

COMAMMOX – täielik ammooniumi oksüdeerimine

DNRA – dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks

EM – ektomükoriisa

EXP – üleujutuskatse

KHG – kasvuhoonegaasid

N – lämmastik

N₂ – dilämmastik ehk molekulaarne lämmastik

N₂O – dilämmastikoksiid ehk naerugaas

NH₃ – ammoniaak

NH₄⁺ – ammoonium

NO₂⁻ – nitritioon

NO₃⁻ – nitraatioon

OTU – operatiivne taksonoomiline üksus

POST – eksperimendi järgne periood

POSTPOST – aasta peale üleujutust

PRE – üleujutuse eelne periood

qPCR – kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon

Sissejuhatus

Inimtegevus mõjutab maailma kliimat aina enam. IPCC raporti alusel oli 2019. a süsihappegaasi (CO₂) kontsentratsioon atmosfääris viimase kahe miljoni aasta kõrgeim. Ka metaani (CH₄) ja diämmastikoksiidi (N₂O) kontsentratsioonid õhus on oluliselt suurenenud ja on viimase 800 000 aasta kõrgeimad (H. Lee *et al.*, 2023). Inimtegevuse ja suurenenud kasvuhoonegaaside (KHG) kontsentratsiooni tulemusena on saagenud ekstreemsed kliimasündmused nagu näiteks kuumalained, põuad, intensiivsed sademed ja üleujutused, millega kaasnevad haiguste levikud, nälg ja suremus erinevates maailma piirkondades. Intensiivsed sademed mõjutavad madalal asuvaid alasid ja kaldaäärseid ökosüsteeme, kus sademete saagenemisega suureneb üleujutusohu.

Kaldaäärsed ökosüsteemid on maismaa ja veekeskonna vahelised piirkonnad, mida iseloomustab perioodiline üleujutus (Naiman *et al.*, 2010). Kaldaäärsed ökosüsteemid aitavad võidelda mitmete eelnevalt nimetatud probleemidega, kuid on ka ise mõjutatud ekstreemsetest kliimasündmustest, mille tõttu nimetatakse neid ka kriitilisteks üleminekutsoonideks. Nad on mitmekesised, dünaamilised ja mitmeid ökoloogilisi funktsioone pakkuvad alad (Naiman *et al.*, 2010; Riis *et al.*, 2020). Kaldaäärsetel aladel paiknevad metsad pakuvad nii aeroobseid kui ka anaeroobseid elupaiku mikroorganismidele, kes mõjutavad biogeokeemilisi protsesse mullas.

Bakterid ja seened viivad mullas läbi erinevaid süsiniku (C) ja lämmastiku (N) aineriingetega seotud protsesse. Mullabakterid ja -seened on seotud mitmete protsessidega mullas, näiteks lagundamisprotsessidega (Eichorst & Kuske, 2012), süsihappegaasi (CO₂) assimileerimisega (Saini *et al.*, 2011) ja molekulaarse lämmastiku (N₂) fikseerimisega (Reed *et al.*, 2011). Mükoriisa seened mõjutavad ka mulla orgaanilise aine mineraliseerumist (Jansa & Treseder, 2017). Lisaks on enamus taimi sümbiootilises suhtes arbuskulaarse mükoriisa (AM) seentega, kes varustavad neid lämmastiku ja fosforiga (van Der Heijden *et al.*, 2015). Süsiniku- ja lämmastikuringe koosurimise olulisust on rõhutatud ka eelnevates uuringutes nii mikroobsete protsesside kui ka KHG emissioonide aspektist (Espenberg *et al.*, 2024).

Mikroorganismide arvukuse ja koosluste muutused mullas on seotud N₂O (Espenberg *et al.*, 2018) ja CH₄ (Yang *et al.*, 2024) voogude muutustega. Arvatakse, et üleujutuste suurenemisega muutub tulevikus oluliselt kaldaäärsete alade liigirikkus, kuid täpne mõju ulatus ja suund on teadmata. Varasemalt on teada, et ekstreemsed üleujutused mõjutavad ökosüsteemi hüdroloogilist režiimi ja muudavad biogeokeemilisi protsesse, mis reguleerivad KHG vooge mullast (Schindler *et al.*,

2020). Üleujutused mõjutavad mulla poorsust, veesisaldust ja hapniku kättesaadavust ning seeläbi süsiniku (W. Zhang *et al.*, 2022) ja lämmastiku ringet (Jacinthe *et al.*, 2012). Üleujutusega võib järsult suurenda mulla N₂O emissioon ja emissiooni ulatus sõltub arvatavasti üleujutuse kestusest (Jacinthe *et al.*, 2012). Lisaks on näidatud, et üleujutuse järel suureneb oluliselt CH₄ emissioon mullast (Schindler *et al.*, 2020).

Magistritöö eesmärk on uurida lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobiomile (N ja C ringele) kaldaäärses lepikus. Lisaks uuriti, kuidas on mulla bakterite, seente ja AM seente kooslused seotud erinevate füüsikalise-keemiliste parameetritega ning CH₄ ja N₂O emissioonidega üleujutuse ajal.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Metsad kliimamuutustes

Metsad on ökosüsteemid, kus domineerivad püsivalt puittaimed, kuid nad hõlmavad ka muud taimestikku ja teisi sealolevaid elusorganisme (Waring & Schlesinger, 1985). Metsad on avatud süsteemid, sest nad vahetavad energiat ja aineid enda kõrval paiknevate ökosüsteemidega (Waring & Schlesinger, 1985). Nad mõjutavad meie kliimat vee, süsiniku, lämmastiku ja teiste aineringete kaudu (Bonan, 2008).

Kaldaäärsed ökosüsteemid on maismaa- ja veeökosüsteemide vahepealsed alad, mida iseloomustavad ajutised üleujutused. Kaldaäärseid ja üleujutuse mõjualasid on Euroopas kokku umbes 91 144 km² ja neid alasid on kõige rohkem Rootsis, Soomes ja Eestis (Clerici *et al.*, 2013). Kaldaäärsete ökosüsteemide tähtsus seisneb nende suures biomassi tootlikkuses ja võimes pakkuda erinevaid ökoloogilisi teenuseid nagu näiteks üleujutuste ja mullaerosiooni mõjude leevendamine (Riis *et al.*, 2020). Kaldaäärsed metsad on olulised süsiniku sidujad (Sutfin *et al.*, 2016) ja tõhusad lämmastiku puhveralad, mis aitavad peatada saasteainete levikut ja parandada vee kvaliteeti (Kozłowski, 2002; Riis *et al.*, 2020). Nende alade laius määrab lämmastiku eemaldamise efektiivsuse keskkonnas (Mayer *et al.*, 2007), kuigi puhverdusvõime sõltub ka põhjaveetaseme kõikumisest, mis reguleerib nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesse (Hefting *et al.*, 2004).

Kliimamuutustel on oluline mõju maismaa ökosüsteemidele ja mitmekesisusele. Kliimamuutused võivad mõjutada negatiivselt maailma toiduvarusid, põhjustada maismaa kõrbestumist ja degradeerumist, sagendada ekstreemseid ilmastikunähtusi ning muuta sademete mustreid paljudes piirkondades (Shukla *et al.*, 2019). Kliimamuutused ja üleujutused mõjutavad ka mulla mikroorganisme (Bardgett *et al.*, 2008) ja mulla hüdroloogilist režiimi, mis omakorda mõjutab biogeokeemilisi protsesse, mille tulemusena võivad suurenedada kasuhoonegaaside (N₂O ja CH₄) vood mullast ja puutüvedest (Schindler *et al.*, 2020).

1.1.1. Süsinikuringe

Süsinikuringe hõlmab atmosfääri, hüdroosfääri ja maismaa ökosüsteeme. Umbes 75% elustikuga seotud süsinikuvarudest esineb metsades ja süsinikuringe on kõige aktiivsem mullas (Janzen,

2004). Metsad võivad olla nii süsiniku sidujad kui ka nende allikad ning see sõltub fotosünteesist ja hingamisest (autotroofne juurehingamine ja heterotroofne mullamikroobide hingamine), lagunemisprotsessidest, tulekahjudest ja raietegevusest (Nabuurs *et al.*, 2008). Inimtegevus on oluliselt mõjutanud süsinikuringe tasakaalu peamiselt maakasutusmuutustega ja fossiilkütuste põletamisega (Janzen, 2004). Globaalne soojenemine mõjutab mikroorganismide aktiivsust mullas, millega suureneb nende heterotroofne tegevus ja selle tulemusena suureneb CO₂ emissioon mullast atmosfääri (Bond-Lamberty *et al.*, 2018). Süsinikuvaru mullas väheneb ka ekstreemsete põudadega ja nendega seotud erosiooniga (Breshears & Allen, 2002). Arvatakse, et kliimamuutuste tagajärjel võivad maismaa ökosüsteemid muutuda alates 2050. aastast süsiniku allikateks (Cox *et al.*, 2000).

CO₂ seotakse atmosfäärist biomassi fotosünteesiga ja muudetakse süsivesikuteks (CH₂O), mis on vajalik taimede elutegevuseks (Gower, 2003). Tagasi atmosfääri satub CO₂ mitmel viisil: autotroofse (juurehingamisega) või heterotroofse (mikroobse) hingamisega ja häiringutega (Falkowski *et al.*, 2000). Näiteks tulekahjudega oksüdeeritakse väga lühikese aja jooksul suur hulk orgaanilist ainet ja atmosfääri vabaneb CO₂ (Falkowski *et al.*, 2000). CO₂ emissioone iseloomustab sesoonne kõikumine ning need on suuremad kevadel ja suvel (Jacinthe, 2015). Lisaks on näidatud, et üleujutused võivad oluliselt mõjutada CO₂ emissioone mullast (Baskerville *et al.*, 2021; Jacinthe, 2015). Jacinthe (2015) näitas, et CO₂ emissioon mullast oli üleujutatud katsealal 1,6 korda suurem kui üleujutamata alal.

Metaaniringest tulenev CH₄ emissioon sõltub metanogeenide ja metanotroofide tasakaalust. Kui CH₄ tootvad metanogeenid on aktiivsemad kui CH₄ tarbivad metanotroofid, siis on keskkond CH₄ allikaks (Le Mer & Roger, 2001). CH₄ toodetakse orgaanilise aine lagundamisel anaeroobsetes muldades metanogeensete arhede poolt ja emissioon mullast toimub peamiselt difusiooni, mullide ja veetaimede aerenhüümide kaudu (Le Mer & Roger, 2001). Metanogeene on võimalik tuvastada keskkonnast *mcrA* geenide uurimisega (Morris *et al.*, 2014). Looduslikud metaaniallikad moodustavad umbes 30% CH₄ emissioonidest, kus suurimaks CH₄ allikaks on märgala mullad, mille kaudu emiteerub hinnanguliselt 100–200 Tg CH₄ aastas (Le Mer & Roger, 2001). CH₄ emissioonid varieeruvad oluliselt aastaegade lõikes ning on leitud, et soojemad temperatuurid soodustavad metanogeenide kasvu ja seeläbi CH₄ tootmist (J. Li *et al.*, 2023).

Atmosfääri emiteerunud CH₄ eemaldatakse troposfääris peamiselt oksüdatsiooni teel ja stratosfäärist klooriga reageerimise teel (Le Mer & Roger, 2001). Lisaks eemaldatakse CH₄ mullast mikroobsel oksüdatsioonil, mida viivad läbi metanotroofid (Le Mer & Roger, 2001), kes kuuluvad nii bakterite kui ka arhede hulka (Knittel & Boetius, 2009; Le Mer & Roger, 2001). Algselt arvati, et CH₄ oksüdatsiooni viivad läbi aeroobsed metanotroofsed bakterid (Knittel & Boetius, 2009) ja anaeroobsetes tingimustes arhebakterid (Hinrichs *et al.*, 1999), kuid nüüdseks on teada, et CH₄ oksüdatsiooni võivad läbi viia ka arhed anaeroobsetes tingimustes (Knittel & Boetius, 2009). Metanotroofide tuvastamiseks keskkonnas saab kasutada *pmoA* (Knief, 2015) või *mmoX* markergeeni (Kolb *et al.*, 2005). Üleujutamata mullad maismaal on ainukesed bioloogilised atmosfäärse CH₄ sidujad ja on leitud, et metsamullad on kõige efektiivsemad CH₄ sidujad (Le Mer & Roger, 2001). Gou ja teised (2023) leidsid, et temperatuuri tõusuga ja sademete vähenemisega suureneb metsades ja rohumaadel CH₄ kontsentratsioon. Sademete suurenemisega aga väheneb muldade võime CH₄ siduda ja CH₄ emissioonid kõrgemate alade muldadest suurenevad (Guo *et al.*, 2023). Jacinthe (2015) näitas samuti, et üleujutustega väheneb mulla poorides oleva hapniku hulk ja suureneb anaeroobne CH₄ tootmine mullas.

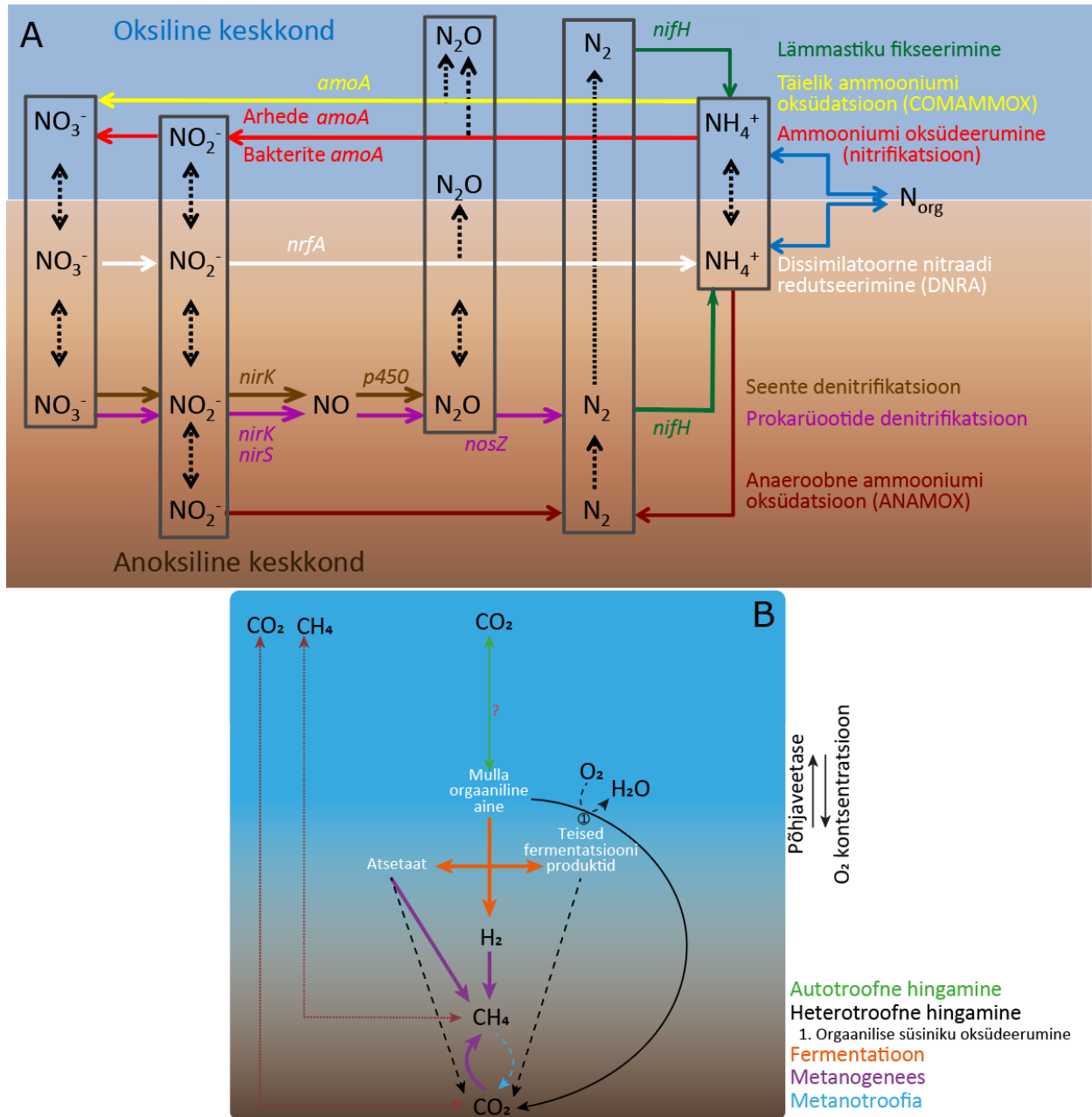
1.1.2. Lämmastikuringe

Globaalne lämmastikuringe on Maa biogeokeemilises ringes olulisel kohal, sest lämmastikku on vaja nukleiinhapete ja valkude sünteesiks (Canfield *et al.*, 2010). Lämmastik on neljas kõige levinum element rakkudes (Stein & Klotz, 2016) ja kõige suuremad lämmastiku varud on atmosfääris (Kuypers *et al.*, 2018). Lämmastikust 99% ei ole elusorganismidele kergesti kättesaadav, sest esineb molekulaarse lämmastiku (N₂) kujul, mida iseloomustab tugev kolmikside ja mille lõhkumiseks on vaja palju energiat (Fowler *et al.*, 2013).

Kaldaäärsetel ökosüsteemidel on oluline roll lämmastikuringes, sest nad on olulised puhveralad, kus eemaldatakse keskkonnast liigset lämmastikku (Lyu *et al.*, 2021; Petersen *et al.*, 2020). Lyu ja teised (2021) näitasid, et puhverala laiuse suurenemisega väheneb lämmastiku edasikanne nii pinna- kui ka põhjavees. Lisaks puhverala laiusele on oluline ka seal kasvav taimestik ja selle kooslus (Petersen *et al.*, 2020; Schade *et al.*, 2001). Kaldaäärne taimestik mõjutab lämmastiku kadu otseselt lämmastiku omastamisega ja selle sidumisega biomassi kui ka kaudselt stimuleerides risosfääris toimuvaid protsesse (Schade *et al.*, 2001). Petersen ja teised (2020) leidsid, et kohalikud

taimeliigid sidusid kaldaäärsetel puhveraladel toitaineid paremini kui invasiivsed liigid. Lämmastiku sidumisvõimet kaldaäärses metsas mõjutab ka metsa vanus ja on näidatud, et nooremad taimed omastavad lämmastikku ja fosforit kaldaäärsetes metsades paremini kui vanemad puud (Mander *et al.*, 1997). Kaldaäärsetes ökosüsteemides on levinud liigiks hall lepp, mis on sümbiootilises suhtes *Frankia* bakteritega ning seetõttu võimeline N₂ atmosfäärist siduma (Roy *et al.*, 2007). Lisaks on ka keskkonnateguritel nagu kliima, veekvaliteet, topograafia ja mulla omadused oluline mõju lämmastikuringele ja mikroorganismide poolt läbi viidavatele protsessidele kaldaäärsetes ökosüsteemides (Lyu *et al.*, 2021).

Lämmastikuringe reaktsioone viivad läbi erinevad mikroorganismid, kes muundavad lämmastikuühendeid 14 erineva reaktsiooniga ja kus lämmastiku oksüdatsiooniaste muutub vahemikus -3 kuni +5 (Kuypers *et al.*, 2018). Lämmastikuringe hõlmab järgmisi protsesse: lämmastiku fikseerimine, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (DRNA) ja nitritist sõltuv anaeroobne CH₄ oksüdeerimine (n-damo) (joonis 1).



Joonis 1. Modifitseeritud lämmastiku- (A) (Bahram *et al.*, 2022) ja süsinikuringe (B) (Gios *et al.*, 2024) joonised kirjeldamaks mikroobseid protsesse.

Lämmastikuringe üheks olulisemaks protsessiks on atmosfääris oleva molekulaarse lämmastiku fikseerimine ja muundamine taimedele kättesaadavaks ammooniumiks (NH_4^+). Kahte lämmastikuaatomit kooshoidvat tugevat kolmiksidet suudavad lõhkuda ja siduda mitmed prokarüootsed liigid (Mengel *et al.*, 2001), kellel on olemas nitrogeenaasi valk (Kuypers *et al.*,

2018). Lämmastiku sidujaid ehk diasotroofe leidub nii maismaal (nt *Azotobacter*) kui ka meredes (nt *Trichodesmium*) (Halbleib & Ludden, 2000). Mitmed diasotroofid elavad sümbioosis taimedega ja varustavad taimi vajalike toitainetega (Zahran, 1999). Näiteks bakterite perekond *Rhizobium* on sümbioosis liblikõielistega (Zahran, 1999). *Frankia* perekonda kuuluvad bakterid on võimelised lämmastikku fikseerima ka vabalt keskkonnas elades (Sellstedt & Richau, 2013). Lämmastiku fikseerivate mikroorganismide tuvastamiseks saab kasutada *nifH* markergeeni (Farnelid *et al.*, 2011).

Nitrifikatsioon ehk NH_4^+ oksüdeerumine on kaheetapiline protsess, kus toimub NH_4^+ transformatsioon nitriti (NO_2^-) kaudu nitraadiks (NO_3^-). Mikroorganismid, kes viivad läbi nitrifikatsiooni, on levinud keskkondades, kus leidub ammoniaaki (NH_3) ja hapnikku (O_2) (Stein & Nicol, 2011). Varasemalt teati, et nitrifikatsiooni viivad läbi kaks kemolitoautotroofsete bakterite rühma: NH_3 oksüdeerivad bakterid (AOB) ja NO_2 oksüdeerivad bakterid (NOB) (Hayatsu *et al.*, 2008). Hilisemad uuringud on näidanud, et mitte ainult bakterid on seotud nitrifikatsiooniga, vaid nitrifikatsiooni suudavad läbi viia ka arhed (AOA) (He *et al.*, 2007). Lisaks on avastatud *Nitrospira* perekonnast bakterid, kes on üksinda võimelised NH_4^+ oksüdeerima NO_3^- ks. Üheetapilist nitrifikatsiooni ehk täielikku ammooniumi oksüdatsiooni nimetatakse COMAMMOX-iks (Daims *et al.*, 2015; Van Kessel *et al.*, 2015). Nitrifikatsiooni saab tuvastada keskkonnast *amoA* markergeenide abil (He *et al.*, 2007).

O_2 puudumisel on NO_3^- eelistatuim elektronide aktseptor, mille võivad denitrifikatsiooni läbiviivad mikroorganismid redutseerida N_2 -ks (Mania *et al.*, 2014). Teisest küljest on leitud, et denitrifikatsioon võib toimuda ka kõikuvates aeroobsetes tingimustes, kui keskkonnas leidub redutseeritud süsinikku (Ji *et al.*, 2015). Täielik denitrifikatsioon koosneb neljast reaktsioonist, kus esimeses etapis redutseeritakse NO_3^- NO_2^- -ks NO_3 reduktaasiga *napA* või *narG* markergeenide poolt (Mania *et al.*, 2014). Järgnevas etapis redutseeritakse NO_2^- lämmastikoksiidiks (NO) NO_2^- reduktaasiga (*nirK* ja *nirS* markergeenid). Kolmandas etapis redutseeritakse NO N_2O -ks (*cNor* või *qNor* markergeenid) (Mania *et al.*, 2014). Denitrifikatsiooni viimane protsess on N_2O redutseerimine N_2 -ks. Protsessi on võimelised läbi viima bakterid ja arhed, kes omavad N_2O reduktaasi, kus markergeenideks on *nosZ* klaad I ja II (Graf *et al.*, 2014). Graf ja teised (2014) näitasid, et *nirS* geeni omavad mikroorganismid on suurema tõenäosusega täielikud denitrifitseerijad, sest nende esinemissagedus *nosZ* geenidega on suurem kui *nirK*-l. *nirK* geeni omavad mikroorganismid on suurema tõenäosusega N_2O emiteerijad (Graf *et al.*, 2014).

Lisaks bakteritele on denitrifikatsiooni (Shoun *et al.*, 1992) ja nitrifikatsiooni võimelised läbi viima ka mitmed seeneliigid (Zhu *et al.*, 2015). Zhu ja teised (2015) näitasid, et subtroopilises okasmetsas võivad NO_3^- tootvateks organismideks olla pigem seened kui bakterid. Erinevalt prokarüootsest denitrifikatsioonist ei ole seente poolt läbi viidud denitrifikatsioon enamasti täielik ning saaduseks on N_2O (Shoun *et al.*, 1992). Denitrifikatsiooni võivad läbi viia *Fusarium* perekonda kuuluvad seened, kes on võimelised NO_2^- anaeroobselt redutseerima (Shoun *et al.*, 1992). Sarnaselt bakteritele on leitud *Nar*, *Nir* ja *Nor* reduktaase denitrifitseerivatest seentest, kuid need on erineva ehitusega (Kobayashi *et al.*, 1996).

DNRA on kaheetapiline NO_3^- redutseerimise protsess, kuid lõpp-produktiks on NH_4^+ erinevalt denitrifikatsioonist. Esimeses etapis toimub NO_3^- redutseerimine NO_2^- -ks ja teises etapis redutseeritakse NO_2^- NH_4^+ -ks (Mania *et al.*, 2014). DRNA protsessiga ringleb enamasti lämmastik mullas ja rikastab muldasid taimedele kättesaadava ammooniumiga (Pandey *et al.*, 2020), kuigi teatud tingimustel võib emiteerida ka N_2O -d (Mania *et al.*, 2014). DRNA protsessi tuvastamiseks saab kasutada *nrfA* markergeeni (Welsh *et al.*, 2014).

Nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdatsioon (n-damo) on protsess, kus kasutatakse CH_4 välise elektronodonorina, ja mille käigus eemaldatakse keskkonnast liigset lämmastikku (Lin *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2018). N-damo protsessi viivad läbi NC10 perekonda kuuluvad bakterid, kes toodavad hapnikku kahest NO molekulist (Ettwig *et al.*, 2010). Saadud hapnikku kasutatakse CH_4 oksüdeerimiseks (Van Kessel *et al.*, 2015). Lin ja teised (2022) leidsid, et n-damo protsessita suureneksid CH_4 emissioonid mangroovidest kolmekordselt.

1.2. Mulla mikrobiom metsas

Mulla mikrobiom on maismaaökosüsteemidest üks keerukamaid, sest see sisaldab miljoneid mikroobe, kelle hulgas on baktereid, arhesid, seeni, viiruseid ja algloomi (Islam *et al.*, 2020). Mulla mikrobiom reguleerib taimede ja loomade eluks vajalike elementide biokeemilisi ringeid (Jansson & Hofmockel, 2020). Mulla mikrobiom koos taimedega reguleerivad süsinikuringe protsesse mullas, mille tulemusena emiteerub süsinik atmosfääri CO_2 või CH_4 kujul või seotakse süsinik mulda (Crowther *et al.*, 2016).

Elupaigad mullas on dünaamilised ehk pidevalt ajas muutuvad süsteemid ning enamus mullas levivaid organisme peavad olema kohanemisvõimelised (Jansson & Hofmockel, 2020). Mulla mitmed füüsilis-keemilised parameetrid mõjutavad mullakoosluse mitmekesisust (Schimel & Schaeffer, 2012). Muutused mulla mikrobioomis võivad mõjutada selle stabiilsust ning vastupanuvõimet tulevastele häiringutele (Jansson & Hofmockel, 2020). Lisaks võivad mõjutada mikroorganismide mitmekesisust ja struktuuri paljud tegurid nagu näiteks taimeistik (Lange *et al.*, 2015), mulla keemilised omadused, lõimis ja välised tegurid nagu üleujutused (J. Wang *et al.*, 2019). Kaldaäärsete ökosüsteemide mitmekesisust mõjutavad ka seda läbivad pinna- ja põhjavesi (Tolkkinen *et al.*, 2020). Arvatakse, et kaldaäärsetel aladel levivad organismid on harjunud ajutiste häiringutega ning pigem võivad neid endale sobivalt ära kasutada (Lopez, 2001). Näiteks võidakse üleujutusi kasutada levimise eesmärgil (Lopez, 2001).

1.2.1 Bakterid

Metsa mullabakterid osalevad aktiivselt erinevates (nt süsiniku, lämmastiku ja fosfori) aineringetes ja neid leidub seal erinevates elupaikades, näiteks risosfääris ja mulla biomassis (Lladó *et al.*, 2017). Kuigi bakteritel on oluline roll surnud taimse biomassi ja seenemütseeli lagundamisel (Lladó *et al.*, 2017), siis on nad võimelised lagundama ka mitmesuguseid saasteaineid mullas (Hoorman, 2011). Samas võivad lagundajad rakkudes kinni hoida olulisi toitained. Mitmed mullabakterid seovad mullaosakesi agregaatideks, mis parandavad mulla struktuuri ja filtreerimisvõimet (Hoorman, 2011).

Bakterite kooslusi ja struktuuri mullas mõjutavad maakasutuse tüüp ning mulla edaafilised tegurid (Kaiser *et al.*, 2016). Bakterite mitmekesisus mullas on positiivselt seotud mulla pH, niiskuse, orgaanilise aine ja lämmastiku sisaldusega (Ding *et al.*, 2022; J. Wang *et al.*, 2019). Bakterite koosluseid mullas mõjutavad kliimamuutustest tulenevad keskkonnamuutused, milleks on globaalne soojenemine, suurenenud CO₂ tase atmosfääris ja antropogeense lämmastiku ladestumine looduskeskkonda (Lladó *et al.*, 2017). Lisaks on uuringuga näidatud, et põua ja niisutamise stress mõjutab bakterite arvukust mullas (Chodak *et al.*, 2015).

1.2.2. Seened

Seened on eukariootsed mikroorganismid, kellel on oluline roll lagundajatena (Tedersoo *et al.*, 2014). Seened elavad tihti sümbioosis taimedega ja nad võivad olla olulised peremeesorganismidele, sest hangivad mullast vett, lämmastikku, fosforit ja muid toitaineid. Seened vahendavad ka mulla süsinikuringet (Tedersoo *et al.*, 2014) ning erikoid- ja ektomükoriisad (EM) omavad biokeemilisi ja füsioloogilisi omadusi, mis muudavad nad tõhusateks lämmastiku ja fosfori sidujateks mullast (Read *et al.*, 2004). Seentel on oluline roll mulla lämmastikuringes ja seda nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes (Hayatsu *et al.*, 2008; Shoun *et al.*, 1992). Seentel on võime denitrifikatsiooni läbi viia erinevates O₂ tingimustes ja seetõttu on neil suurem potentsiaal toota N₂O-d kui bakteritel, mis vajavad denitrifikatsiooniks anaeroobsemaid tingimusi (joonis 1) (Laughlin & Stevens, 2002).

Mükoriisade seas eristatakse kahte olulist tüüpi: arbuskulaarne mükoriisa (AM) ja ektomükoriisad (EM) (Blackwell, 2011), millest esimesed on laiemalt levinud (B. Wang & Qiu, 2006). AM seened domineerivad enamasti ariidsetes ja poolkuivades bioomides, kus mullad on madala orgaanilise aine sisaldusega (Allen *et al.*, 1995). AM seened moodustavad sümbioosi näiteks *Glomeromycota* hõimkonda kuuluvate seentega (Willis *et al.*, 2013). AM seened aitavad peremeestaimedel paremini toitaineid omastada ja vastutasuks saavad peremeestaimelt süsivesikud (Diagne *et al.*, 2020). AM seentel on ka oluline roll lämmastiku ainerings (Gui *et al.*, 2021; Huaisong *et al.*, 2024). Gui ja teised (2021) näitasid, et AM seened võivad kaudselt mõjutada N₂O emissioone mullast, mõjutades lämmastiku aineringega seotud geenide arvukust mullas. Lisaks on näidatud, et AM seened mõjutavad mulla ammoniaagi (NH₃⁺) emissioone (Huaisong *et al.*, 2024).

1.3. Molekulaargeneetilised meetodid mikroobikoosluste uurimiseks

Klassikalisi mikrobioloogilisi meetodeid kasutatakse bakterite, seente ja protistide uurimiseks ja need jaotatakse enamasti kasutatavate tehnoloogiate alusel kolme rühma: kultiveerimine ja aseptilised tehnikad, bakterite arvukuse määramine ning patogeenide identifitseerimine (A. Singh, 2022). Klassikalistel meetoditel on teatud piirangud, sest kultiveerida on võimalik vaid väikest osa mulla mikroobikooslusest (Van Elsas & Boersma, 2011). Seetõttu on kasutusel ka molekulaargeneetilised meetodid, mis põhinevad eraldatud DNA-l/RNA-l ja võimaldavad

vaadelda ka mittekultiveeritavat osa mikroorganismide mitmekesisusest ja arvukusest mullas (Van Elsas & Boersma, 2011).

1.3.1. Kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon

Kvantitatiivset polümeraasahelreaktsiooni (qPCR) kasutatakse spetsiifiliste praimeritega, et tuvastada organismide või organismirühmade olemasolu ja arvukust keskkonnaproovides (Hiorns *et al.*, 1995). qPCR meetodi põhimõte seisneb fluorestseeruva ja tuvastatava signaali genereerimises igas tsüklis (Van Elsas & Boersma, 2011). Iga tsükli järel suureneb amplikonide arv ja proportsionaalselt suureneb ka fluorestsentssignaal (Van Elsas & Boersma, 2011). qPCR-is toimub kolm faasi: eksponentsiaalne faas, lineaarne faas ja platoo (Van Elsas & Boersma, 2011). Esimeste tsüklite käigus on signaal nõrk ja seda on raske taustamürast eristada, kuid produkti akumulereerumisega suureneb signaal eksponentsiaalselt ja reaktsioon on kõige lähemal 100%-lisele efektiivsusele (VanGuilder *et al.*, 2008). Teises faasis on produkti kogus suurenenud, kuid selle akumulereerumine aeglustub, sest reaktsioonikomponendid hakkavad ammendumas. Platoofaasis lõpeb produkti akumulereerumine (VanGuilder *et al.*, 2008). Analüüsiks kasutatakse andmeid, kus mõõdetud fluorestsentssignaal on tugevam taustamürast ehk ületab baasjoone, aga pole jõudnud platoofaasi (Kubista *et al.*, 2006).

1.3.2. Sekveneerimine

Sekveneerimine ehk geenide järjestamine on mikroorganismide tuvastamise ja nende taksonoomia määramise meetod. Sekveneerimisel põhinevate analüüsides täpsus sõltub sellest, kui hästi on suudetud säilitada mikroobikoosluste algstruktuur proovide kogumise ja töötlemise vahel (Fricker *et al.*, 2019). Sekveneerimise tehnoloogiate areng on muutnud elu põhielementide uurimise üksikutest ja lokaliseeritud geenidest tervete genoomideni (Fricker *et al.*, 2019). Mikroobikoosluste ning üksikute komponentide ja funktsioonide sekveneerimispõhist iseloomustamist võimaldavad peamiselt kaks tehnikat: amplikonipõhine järjestamine ja metagenoomika.

1.3.2.1 Amplikonipõhine sekveneerimine

Amplikonipõhise sekveneerimisega kirjeldatakse mikroobikoosluse liigilist koosseisu ja sellega on võimalik luua koosluse taksonoomiline profiil. Meetod põhineb universaalse praimeride paaride selektiivsel seondumisel kõrgelt konserveerunud genoomide piirkondadega ja saadud PCR produktide sekveneerimisel (D'Amore *et al.*, 2016).

Amplikonide sekveneerimisel põhinevat mikrobiootat analüüsitakse erinevate bioinformaatiliste võtetega. Laialdaselt kasutatakse analüüsis operatiivseid taksonoomilisi üksuseid (OTU), mis kirjeldavad mikroobikoosluseid kasutades 16S/18S rRNA geenide amplikonjärjestamist (Lladó Fernández *et al.*, 2019; Schmidt *et al.*, 2014). Järjestused klasterdatakse OTU-desse samaväärsuslävendi abil, milleks on tavaliselt 97% (Knight *et al.*, 2018).

Schmidt ja teised (2014) leidsid, et klastrite moodustamise meetodite vahel võib olla olulisi erinevusi, kuigi OTU-d on üldiselt ökoloogiliselt järjepidevad ehk ühte OTU klastrisse on koondunud organismid, kes on ökoloogiliselt sarnased (Schmidt *et al.*, 2014). Koepple ja Wo (2013) testisid aga erinevate bakterite hõimkondade fülogeneetilist signaali ja leidsid, et vähesed OTU-d moodustasid rühma, mis koosnes ühisest esivanemast. OTU-d võivad hõlmata tegelikult mitmeid ökoloogilisi elupaiku (Koeppel & Wu, 2013).

1.3.2.2 Metagenoomika

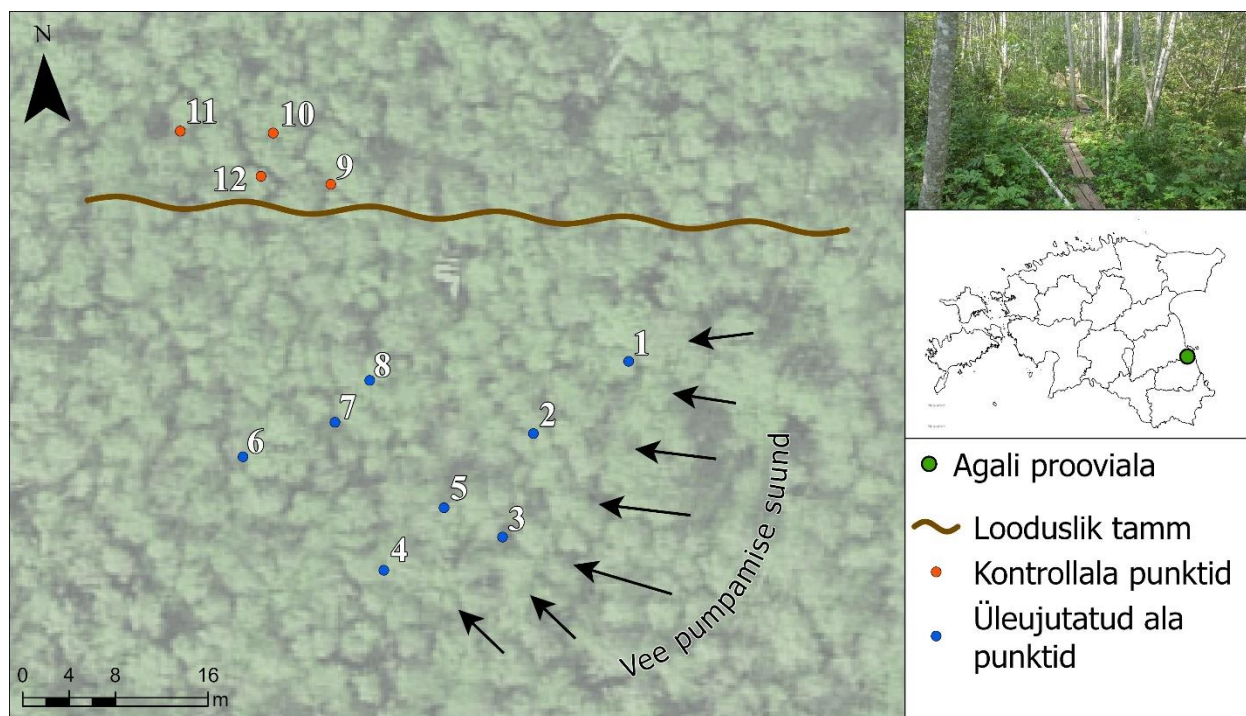
Metagenoomika kasutab genoomtehnoloogiat ja bioinformaatikat, et uurida mikroobide taksonoomiat ja funktsionaalsete geenide informatsiooni (Thomas *et al.*, 2012). Metagenoomika on keskkonnaproovides sisalduvate genoomide otsene geneetiline analüüs. Metagenoomika kasutab terve mikrobioomi koosluse DNA-d, et järjestada koosluse DNA materjal ja mitte ainult üht geenifragmenti (nt bakterite või arhede 16S rRNA) (Fricker *et al.*, 2019), ning annab seetõttu palju laiemat kirjeldust kui fülogeneetilised uuringud (Thomas *et al.*, 2012). Metagenoomika tulemused võivad kajastada baktereid, arhesid, seeni, viiruseid ja eukarüoote ning sisaldada plasmide ja kromosoomiväliseid elemente, aga ka peremeesorganismi, kloroplasti ja mitokondriaalset DNAd (Fricker *et al.*, 2019). Amplikonipõhise ja metagenoomilise analüüsi võrdlemisel on viimase uuringud rahaliselt kulukamad, sest sekveneerimissügavus peab olema piisav ka haruldasemate mikroorganismide tuvastamiseks (Fricker *et al.*, 2019).

NGS (ing keeles *Next-generation Sequencing*) sekveneerimist saab kasutada tervete genoomide järjestamiseks või saab piirduda ainult huvipakkuvate piirkondade ja DNA fragmentidega. NGS meetodite eelisteks on ensüümoloogia ja andmete korraldatud ja astmeline kogumine, mis võimaldab genereerida tuhandete kuni miljardite järjestusreaktsioonide paralleelse toimumise (McCombie *et al.*, 2019), ning järjestuse väljundi saamine ilma elektroforeesita (Van Dijk *et al.*, 2014). NGS peamiseks puuduseks on sage vajaliku infrastruktuuri puudumine, mille hulka kuulub näiteks arvutite võimsuse ja salvestusruumi piirangud ning keeruline andmete töötlus ja haldamine (Behjati & Tarpey, 2013).

2. Metoodika

2.1. Prooviala ja üleujutuskatse kirjeldus

Uurimistöo prooviala ($58^{\circ} 17' N$, $27^{\circ} 17' E$) asub linnulennult umbes 7,7 km kaugusel Peipsi järve Liisnõna lahest lääne suunas Agali külas Tartu maakonnas (joonis 2). Ala asub umbes 36 m kõrgusel merepinnast Ugandi lavamaa ja Peipsi järve madaliku vahel ning seda iseloomustab 30% ulatuses gleistunud nõrgalt leetunud (LkIg) ja 70% ulatuses leostunud (Go) muld (Maa-ameti kodulehekülg, 2023a). Mulla lõimises leidub jääjärvelistest setetest liiva, keskmist liivsavi ja saviliiva (150–120/ls₂(sl)) (Maa-ameti kodulehekülg, 2023a), mis on ladestunud kvaternaari ajastul (Maa-ameti kodulehekülg, 2023b). Huumushorisondi tusedus proovialal on vahemikus 18–25 cm (Maa-ameti kodulehekülg, 2023a). Proovialal paiknevas metsas domineerib 40-aastane hall lepp (*Alnus incana* (L.) Moench) (Schindler *et al.*, 2020).



Joonis 2. Agali prooviala. Sinised punktid on üleujutatud ala proovivõtupunktid ja punased on kontrollala proovivõtupunktid. Pruuni lainelise joonega on kujutatud looduslik tamm kahe prooviala vahel. Joonise aluskaart on 2017. a Maa-ameti ortofoto. Joonise tegemiseks on kasutatud tarkvara „ArcGIS Pro 3.3.3“.

Eksperimendi ajal jaotati Agali prooviala kaheks: kontrollala (20×20 m) ja üleujutatav ala (40×40 m). Prooviala ujutati lühiajaliselt üle 2017. aastal ja vajalikud proovid koguti puutüvedest ja mullast neljal eksperimendi perioodil mõlemalt proovialalt (Schindler *et al.*, 2020). Esimene periood oli üleujutuse eelne periood (PRE), kus proovid võeti mullast vahemikus 24. juuli kuni 7. august. Üleujutuskatse (EXP) viidi läbi 8. augustist 21. augustini, kus üleujutatavale alale pumbati iga päev $55\text{--}70$ m³ vett. Kahte prooviala eraldas looduslik tamm, mis takistas veevoolu üleujutatud alalt kontrollalale. Eksperimendijärgne periood oli vahemikus 22. august kuni 4. september (POST). Viimased proovid võeti 2018. aasta 15. augustil (POSTPOST). Proove võeti kokku kaheteistkümnest kohast, millest kaheksa olid üleujutatud alal ja neli kontrollalal (Schindler *et al.*, 2020).

2.2. Keemilised, mikrobioloogilised ja kasvuhoonegaaside emissiooni mõõtmised ja analüüsid

Eksperimendi ajal mõõdeti mullast temperatuuri ja mullaniiskust. Mullaproovid võeti proovialalt labidaga 0–10 cm sügavuselt ning hoiustati eraldi kilekottides külmkapis ($+4$ °C) ja sügavkülmas (-20 °C) kuni edasiste analüüsideni. Mullaproovidest määrati pH ning üldlämmastiku (N%), nitraadi (NO_3^-), ammooniumi (NH_4^+), fosfori (P), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca), magneesiumi (Mg) ja orgaanilise aine sisaldus. Mullaproovidest DNA ekstraheerimiseks kasutati PowerSoil® DNA Isolation Kit'i (Qiagen, USA), mille kasutamisel järgiti tootja protokollit. Mulla KHG vooge mõõdeti mullast automaatkambritega. Detailsem kirjeldus keemilistest analüüsides ja KHG mõõtmisest on saadaval Schindler ja teiste (2020) artiklis ja DNA eraldamisest Reissi bakalaureusetöös (2021).

Bakterite, üldseente ja AM seente mikrobikoosluse DNA sekveneeriti 84 mullaproovist. Amplikonipõhine polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ning sekveneerimine viidi läbi biotehnoloogiaettevõttes Asper Biogene OÜ (Tartu, Eesti). Sekveneerimine viidi läbi kasutades bakterite praimereid 515F and 806RB (Caporaso *et al.*, 2011), üldseente praimereid fITS7_o, fITS7 ja ITS4 (Ihrmark *et al.*, 2012; Kohout *et al.*, 2014; White *et al.*, 1990) ning AM seente praimereid WANDA ja AML2 (Dumbrell *et al.*, 2011; J. Lee *et al.*, 2008). Sekveneerimine viidi läbi Illumina MiSeq platvormil (Illumina, California, USA). Detailsem kirjeldus sekveneerimisest on saadaval Vahter ja teiste (2022) artiklis.

2.3. Bioinformaatiline analüüs

Bioinformaatiliseks analüüsiks kasutati tarkvarasid „R *version* 4.3.2“ ja „RStudio 2022.12.0“. Üldseente sekveneerimisandmed olid jaotatud üksikuteks proovipõhisteks .fastq laiendiga failideks. Esmalt eemaldati andmetes puuduvate järjestustega andmed kasutades *DADA2* laiendi funktsiooni *filterAndTrim()*. Üldseente fragmentidelt kontrolliti praimerite olemasolu ja nende järjestust ning seejärel eemaldati praimerite järjestused kasutades *cutadapt* programmi (Martin, 2011). Praimerite järjestustest eemaldatud fragmendid salvestati uuesti .fastq laiendiga failideks, mida analüüsiti *DADA2* paketiga. Eemaldatud praimeritega .fastq failid filtreeriti uuesti *filterAndTrim()* funktsiooniga, kus kasutati $MaxN = 0$, $truncQ = 2$ ja $rm.phix = TRUE$, mis on vaikimisi väärtused. $MaxEE$ määrab maksimaalse lubatud oodatud vigade (*expected errors*) arvu. Peale filtreerimist pandi järjestused kokku funktsiooniga *makeSequenceTable()* ning lisati taksonoomiad funktsiooniga *assignTaxonomy()*. Taksonoomiate lisamiseks kasutati UNITE andmebaasi (Kõljalg *et al.*, 2020).

Sekveneerimisandmete analüüsile eelnes andmete kontroll ja korrastamine, milleks kasutati R paketi *tidyr* funktsiooni *separate()*, *stringr* paketi funktsiooni *str_replace()*, *dplyr* paketi funktsioone *full_join()*, *select()*, *filter()*, *summarise()* ja *mutate()* ning *tibble* paketi funktsioone *column_to_rownames* ja *rownames_to_column()*. OTU, proovide ja taksonoomia tabelitest loodi *phyloseq* objektid, milles oli kokku 84 proovi. R-i laiend *phyloseq* on laialdaselt kasutusel fülogeneetiliste järjestuste andmete analüüsimiseks ja esitamiseks. *Phyloseq* võimaldab andmete kalibreerimist, filtreerimist, koondamist, alamhulkade loomist, mitme tabeli võrdlemist, mitmekesisuse analüüsi, ordineerimist ja graafikute loomist (McMurdie & Holmes, 2013).

Bakterite andmetabelist eemaldati kokku 35 589 ning üldseente ja AM seente tabelitest üks OTU, mida ei esinenud proovides. *Phyloseq* objekti loomiseks muudeti bakterite, üldseente ja AM seente andmetabelid maatriksiteks, mida saab kasutada funktsiooniga *phyloseq()*. *Phyloseq* objektile kasutati funktsiooni *taxa_fix()*, mis otsib objektis kõiki taksoneid, mis on kirjeldatud vähem kui nelja tähemärgiga (nt „g__“) või taksonid, mis on andmetabelis tühjad, ja täidab need kõrgema taseme taksoniga (Barnett, i.a). Funktsiooniga *tax_agg()* määrati väikseimaks taksoniks perekond, mis peab olema andmetabelis määratud (Barnett, i.a). Igale täidetud väljale lisati kirje lõppu taksonoomiline üksus, millega väli täideti. Näiteks täideti tühi perekonnaväli kõrgema taseme kirjega *Sphingomonadaceae_family*.

Taksonoomia rühmade osakaalu muutuste analüüsiks ja kuvamiseks muudeti *phyloseq* objektid tagasi andmetabeliteks. Selleks kasutati *phyloseq* funktsioone *tax_glom()* ja *psmelt()*. Funktsioon *tax_glom()* ühendab samas taksonoomiarühmas olevad liigid ja tulemus lisati funktsiooniga *psmelt()* andmetabelisse. Taksoni osakaalu näitamiseks arvutati suhteline arvukus üleujutatud ala ja kontrollala iga eksperimendiperioodi kohta. Suhtelise arvukuse arvutamiseks grupeeriti proovialad ja eksperimendiperioodid *dplyr* paketi funktsiooniga *group_by()*. Tulemuste näitamiseks kasutati paketti *ggplot2*, mis on andmete visualiseerimise pakett. Taksonite tulpdiaagrammide loomisel rakendati *ggplot* funktsioone *geom_col()* ja *facet_grid()*.

Võrgustike loomisel võeti funktsiooniga *subset_samples()* välja neli üleujutatud ala punkti (punktid 1, 2, 3 ja 4), et mõlemale proovialale jääks alles võrdne arv punkte. Seejärel arvutati *phyloseq* objektidesse suhtelised arvukused funktsiooniga *transform_sample_counts()* ning filtreeriti funktsiooniga *filter_taxa()*, kui võrgustik oli kuvamiseks liiga andmemahukas. Bakterite ja üldseente võrgustiku loomisel võeti välja OTUd, mille dispersioon oli suurem kui 10^{-5} . Võrgustikkuse arvutamisel kasutati Bray-Curtis koefitsienti, mis on *vegan* paketist *vegdist()*. Bray-Curtis distantis arvutati valemiga:

$$\frac{A+B-2J}{A+B},$$

kus A ja B on liikide arv võrreldud proovialadel ning J liikide arv, mis esinevad mõlemal proovialal (Oksanen *et al.*, 2022). Võrgustiku kuvamiseks proovialadel kasutati *phyloseq* paketi *plot_net()* ja *plot_network()* funktsioone. Mõlema funktsiooniga saab võrgustikku näidata nii proovide kui ka taksonite alusel (McMurdie & Holmes, 2024). Funktsioon *plot_net* ei vaja erinevalt *plot_network()* funktsioonist eraldi esilekutsumist *make_network()* funktsiooniga ega eraldi *igraph* objekti. Funktsiooni *plot_net* parameetriks *max_dist* kasutati bakteritel ja üldseentel 0,7. AM seente sugukondade võrgustikku ei kuvatud, sest sugukondi ei olnud piisavalt, et saada usaldusväärne võrgustik. Proovide võrgustiku loomisel seati *make_network* funktsiooni *max_dist* parameeter bakteritel 0,25-le, üldseentel 0,6-le ja AM seente proovidel 0,5-le (vaikimisi väärtus on 0,4). *Max_dist* on kahe proovi vaheline maksimaalne lubatud ökoloogiline kaugus, et proovid oleksid graafilises mudelis servaga (ing keeles *edge*) ühendatud (McMurdie & Holmes, 2024). Võrgustiku joonte paksus määrati sõltuvalt proovide või taksonite sarnasusele.

Bakterite mitmekesisuse arvutamiseks kasutati R paketi *phyloseq* funktsioone *estimate_richness()* ja *plot_richness()*, mis on laenatud funktsioonid *vegan* paketist. α -mitmekesisuse indeksid

hindavad koosluste liigirikkust ehk liikide arvu koosluses (ing keeles *richness*) ja ühe liigi organismide arvu koosluses (ing keeles *eveness*) (Xia & Sun, 2023). Mitmekesisuse hindamiseks arvutati α -mitmekesisuse Shannon–Weaver (H') α -mitmekesisuse indeks. Shannon–Weaver mitmekesisuse indeks paneb suurema kaalu liigirikkusele ja seda mõjutab valimi suurus (Konopiński, 2020). Shannon–Weaver (H') mitmekesisuse indeks arvutatakse valemiga:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i,$$

kus p_i on OTU i osakaal koosluses, S unikaalsete liikide arv ja b logaritmi alus (Oksanen *et al.*, 2022). H' minimaalne väärtus on 0, mis näitab, et kõik isendid kuuluvad ühte liiki ja seega mida suurem on indeks, seda mitmekesisem on liikide arv proovis (Thukral, 2017).

2.4. Ruumianalüüs

Keskkonnaparametrite ja mitmekesisuse ajalise ning ruumilise muutuse analüüsimiseks ja kaardistamiseks kasutati „ArcGIS Pro 3.3.3“ tarkvara. Interpoleerimiseks loodi ArcGIS Pro tööriistaga *Minimum Bounding Geometry* prooviala punktidest polügoon. Geomeetriatüübina kasutati *envelope*. Kasutades *Graphic Buffer* tööriista laiendati prooviala polügooni 5 m punktidest väljapoole, et interpoleerides oleks näha servalade mõju. Maapinna kõrgusandmetena kasutati 1 m eraldusvõimega geoTIFF-i, mis saadi Maa-ameti geoportaalist (Maa-ameti kodulehekül, 2020). Uurimisala asub 1:10 000 mõõtkavalise kaardi kaardilehel 54693. Kasutades ArcGIS Pro tööriista *Extract Values to Points* saadi kõrgus igas punktis. Maapinna kõrgusmudelit kasutati, et luua *Local Scene*, millega kuvatakse ArcGIS Pro-s kolmemõõtmelisi kaarte. Kasutades raster kalkulaatori tööriista *Hillshade* lisati prooviala 3D kaardile reljeefivarjutus. Prooviala reljeefi kuvamisel kasutati viiekordset reljeefi liialdust.

Interpoleerimiseks katsetati täpseid interpolaatoreid: kriging (ing keeles *co-kriging* ja *ordinary kriging*), splineid (ing keeles *splines*) ja pöördkaugusega kaalutud interpoleerimine (ing keeles *Inverse Distance Weighting* ehk IDW). Kriging on geostatistiline interpoleerimistehnika, mis kasutab andmete interpoleerimiseks semivariogrammi (Krivoruchko, 2012). Semivariogramm võtab arvesse punktide vahelist kaugust ja suunda, millega määratakse teadaolevatele väärtustele kaalud (P. Singh & Verma, 2019). Kriging interpoleerimist kasutatakse, kui andmetes on kauguse või suunaga seotud ruumiline korrelatsioon (esri, i.ab). Splineid on deterministlik interpolaator,

mis kasutab matemaatilisi funktsioone. Splainid interpoleerimismeetod läbib täpselt punkte ja minimeerib samal ajal pinna kumerust (esri, i.ac). IDW on samuti deterministlik interpolaator, mis põhineb matemaatilisel funktsioonil ja võtab arvesse punktide vahelist kaugust. Lähemal asuvad punktid saavad suurema kaalu (P. Singh & Verma, 2019).

Kriging ja IDW interpoleerimise puhul katsetati interpoleerimist nii *Geostatistical Wizard* kui ka *Spatial Analyst* tööriistadega. *Geostatistical Wizard*iga vaadati funktsioonide kokkulangevust ja keskmist standardviga (*cross-validation*) ning kriging interpoleerimisega semivariogrammi. *Geostatistical Wizard*iga tehtud meetodite võrdlemiseks kasutati *Compare Geostatistical Layers* tööriista, mis järjestab interpoleerimise tulemused automaatselt *cross-validation* statistika alusel (esri, i.aa). Parima meetodi valimiseks kasutati lisaks *cross-validation* statistikale ka prooviala rasterväärtuste ja punktide väärtuste vahet. Selleks kasutati tööriista *Extract Values to Point*, mis annab punktidele interpoleeritud pinna piksliväärtused antud asukohas. Seejärel arvutati atribuuditabelis *Calculate Field* tööriistaga proovide väärtuste ja rasterväärtuste vahed. Prooviala punktide väärtustena kasutati iga perioodi keskmisi väärtusi.

Interpoleerimiseks kasutati IDW interpoleerimismeetodit, sest kriging interpolatsioonimeetodiga ei leitud sobivat semivariogrammi. Interpoleerimiseks ei sobinud ka splineid, sest käsitletavates andmetes on mõned keskkonnaparameetrid proovialal suure varieeruvusega ja splineid ei sobi, kui tegemist on järskude muutustega (esri, i.ac). *Cross-validation* statistika ja *Exploratory Interpolation* tööriist näitasid, et IDW meetod on käesolevate andmetega sobilikum kui klassikaline kriging. Rasterväärtuste ja punktide väärtuste vahe oli IDW interpoleerimismeetodiga samuti väiksem. IDW interpoleerimismeetodi puhul kasutati *Spatial Analyst* tööriista, kus määrati *power 2*. *Power* on kauguse eksponent ja kontrollib ümbritsevate punktide olulisust (esri, i.ad). Mida suurem on *power*, seda väiksem on kaugemal asuvate punktide mõju (esri, i.ad). Mulla emissioonide, mullaniiskuse ja mitmekesisuse interpoleerimiseks kasutati keskmisi väärtusi.

2.5. Statistiline analüüs (ja autori osalus)

Statistiliseks analüüsiks kasutati tarkvarasid „R version 4.3.2“ ja „RStudio 2022.12.0“. Bakterite mitmekesisuse muutuse hindamiseks kasutati *ggpubr* paketi *stat_compare_means()* funktsiooni. Statistiliselt olulise seose hindamiseks kasutati Wilcoxon testi. Wilcoxon test on mitteparameetriline test, mis võrdleb kahe rühma keskmiste erinevust. Analüüsis võrreldi

üleujutatud ala ja kontrollala PRE ja EXP, EXP ja POST ning PRE ja POST keskmisi mitmekesisuse indekseid. Mitmekesisuse ja keskkonnaparameetrite vaheliste seoste ja olulisuse hindamiseks kasutati Spearmani korrelatsioonikoefitsienti. Korrelatsiooni arvutamiseks kasutati paketi *Hmisc* funktsiooni *rcorr()*, mis arvutab lisaks korrelatsiooni koefitsiendile ka seose olulisuse (p-väärtuse) (Harrell Jr, 2019). Korrelatsioonimaatriksi kuvamiseks on kasutatud paketti *corrplot*.

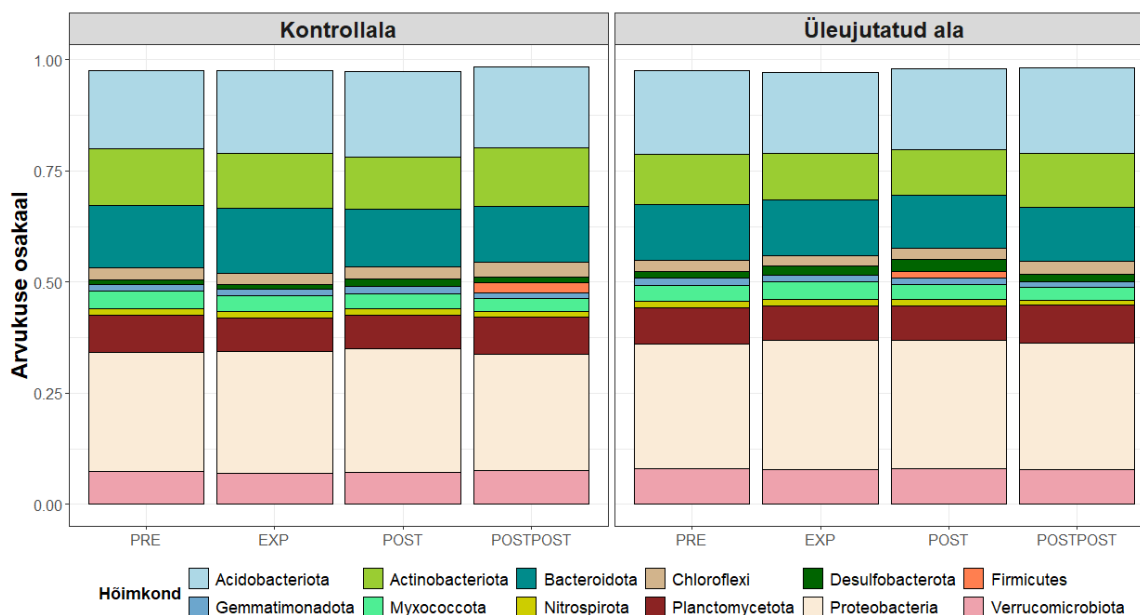
Liiasusanalüüsi (ing keeles *redundancy analysis* ehk RDA) tegemiseks loodi uued *phyloseq* objektid, sest keskkonnaandmetes esines puuduvaid andmeid ning RDA analüüsi kasutamisel ei tohi esineda andmetes tühimikke. Keskkonnaandmete lünkade täitmiseks kasutati *missMDA* paketti. Pakett imputeerib puuduvad väärtused (Husson *et al.*, 2023). Esmalt kasutati funktsiooni *estim_ncpPCA()*, et hinnata kasutatavate dimensioonide arvu ja seejärel kasutati funktsiooni *imputePCA()*, et täita andmelüngad varasemalt hinnatud dimensioonide arvuga. Objektidele rakendati *ps_mutate()* funktsiooni, mis kasutab dplyr paketi *mutate()* funktsiooni, et muuta olemasolevat *phyloseq* objekti (Wickham *et al.*, 2019). RDA analüüsis kasutati mikroorganismide suhtelisi arvukusi funktsiooniga *tax_transform()*. Paketiga *miceoViz* funktsioonidega *ord_calc()* ja *ord_plot()* arvutati ja loodi RDA joonised. Joonistel näidati taksoneid perekonna tasemel, va AM seened, mida kuvati sugukonna tasemel.

Autor viis läbi suurandmete koondamise ja analüüsideks ettevalmistamise, interpoleerimise (peatükk 2.4) ja ruumianalüüsi (peatükk 2.4) ning bioinformaatilise (peatükk 2.3) ja statistilise analüüsi (peatükk 2.5).

3. Tulemused

3.1. Bakterid

Bakterid jagunesid proovialal 31 hõimkonda ja arvukaim hõimkond oli *Proteobacteria* (joonis 3). Suure suhtelise arvukusega olid lisaks *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota* ja *Planctomycetota* hõimkonnad. *Bacteroidota* suhteline arvukus EXP perioodil kontrollalal ja üleujutatud alal suurenes, kuid kontrollalal suurenes suhteline arvukus kolm korda rohkem (vastavalt 0,68% ja 0,21%). *Acidobacteriota* arvukus EXP perioodil üleujutatud alal langes, kuid kontrollalal suurenes. POSTPOST perioodil oli see-eest muutus vastupidine. *Firmicutes* suhteline arvukus üleujutuse ajal tõusis ja peale üleujutust oli nende protsent üleujutatud alal 1,27%. Kontrollalal suurenes *Firmicutes* suhteline arvukus POSTPOST perioodil 1,61%-lt 2,25%-le. Samuti suurenes *Desulfobacterota* hõimkonna suhteline arvukus EXP ja POST perioodidel, kuid muutus oli suurem üleujutatud alal (kontrollalal suhteline arvukus EXP ja POST perioodidel vastavalt 1,16% ja 1,64% ning üleujutatud alal vastavalt 2,16% ning 2,87%). Joonisele 3 lisati hõimkonnad, mille summaarne suhteline arvukus oli eksperimendi erinevatel perioodidel suurem kui 1% (eemaldati 1,6-2,8% kõigist järjestustest).

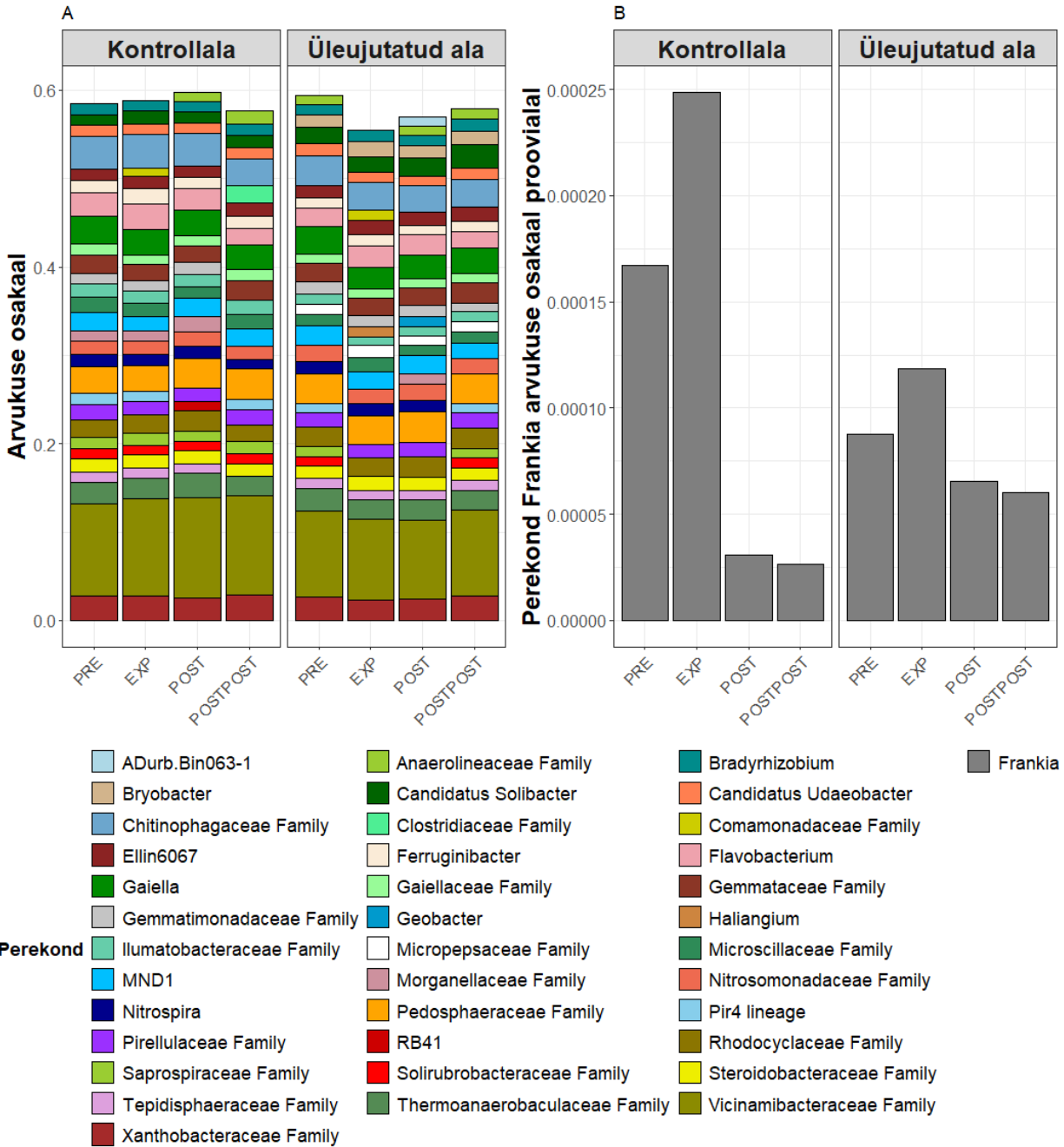


Joonis 3. Bakteri hõimkondade suhtelise arvukuse osakaal kontrollalal ning üleujutatud alal. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST).

Proovialadel oli kokku 557 erinevat perekonda, millest 478 olid esindatud kontrollalal ja 532 üleujutatud alal. Mõlemal proovialal oli kõige enam perekonna tasemel *Vicinamibacteraceae* sugukonda kuuluvaid baktereid (perekonna tasemel ei ole nimetust teada). Jooniselt 4 on näha, et *Vicinamibacteraceae* arvukus üleujutatud alal EXP ja POST perioodidel langes (vastavalt 0,75% ja 0,1%). Kontrollalal suurenes *Vicinamibacteraceae* arvukus samadel eksperimendiperioodidel (vastavalt 0,51% ja 0,33%).

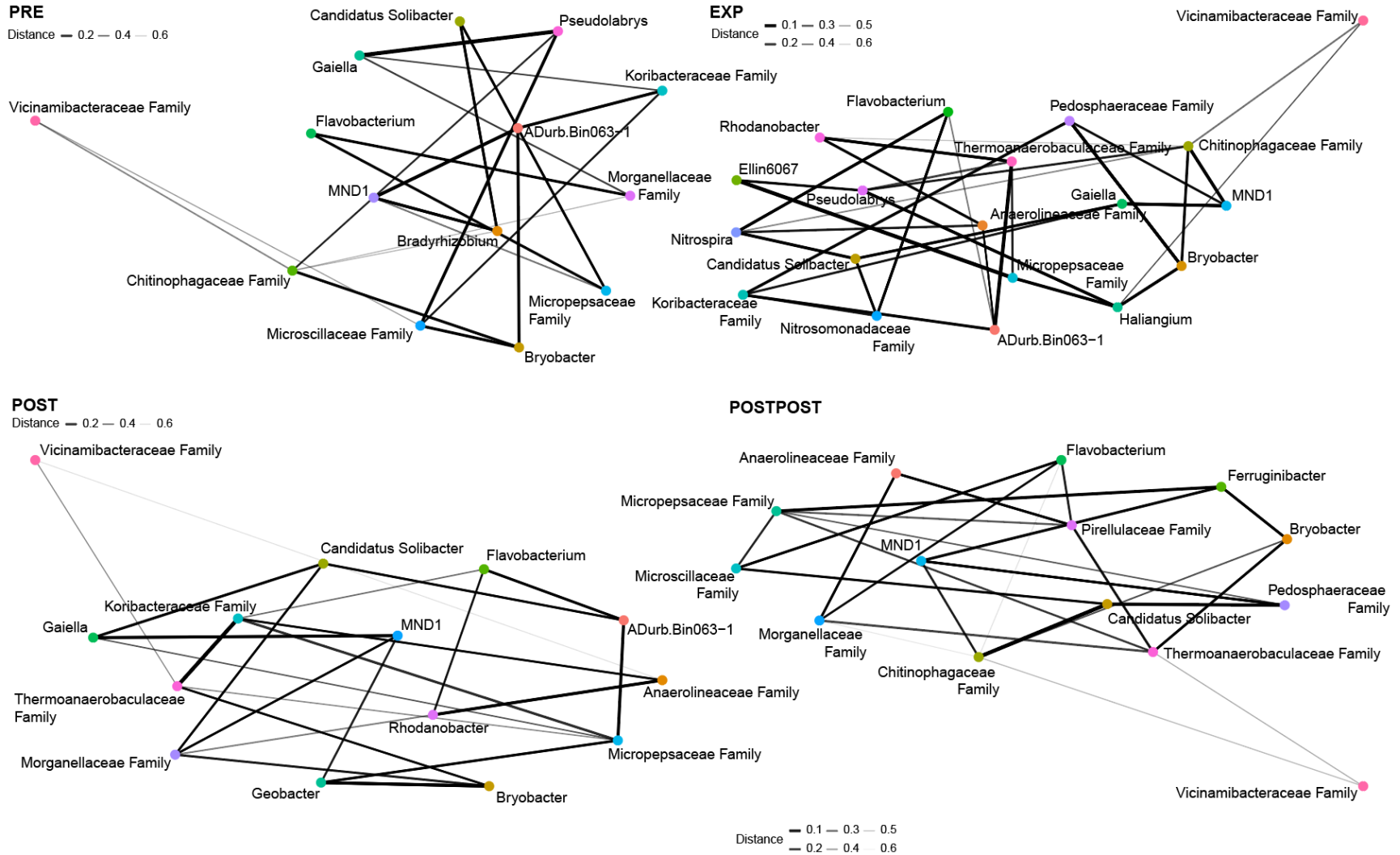
Teadaolevatest taksonitest oli perekonna tasemel kõige suurem osakaal *Gaiella* bakteritel. *Gaiella* perekonna arvukus vähenes EXP perioodil mõlemal proovialal ja suurenes peale üleujutust. *Nitrospira* suhteline arvukus langes samuti EXP perioodil mõlemal proovialal, kuid langus oli suurem üleujutatud alal. POSTPOST perioodil suurenes *Nitrospira* suhteline arvukus kontrollalal, kuid langes üleujutatud alal veelgi (alla ühe protsendi). *Microscillaceae* sugukonda kuuluvate bakterite arvukus suurenes see-eest EXP perioodil üleujutatud alal (0,24 %) ja langes kontrollalal (0,28 %). *Bryobacter*, *Ellin6067* ja *Bradyrhizobium* suhteline arvukus suurenes EXP perioodil üleujutatud alal ning langes peale üleujutust. Perekonna *Candidatus Solibacter* suhteline arvukus ei muutunud oluliselt EXP perioodil, kuid suurenes POST perioodil üleujutatud alal. Kontrollalal see-eest arvukus suurenes EXP perioodil ja vähenes POST perioodil.

Frankia ja *Geobacter* perekondadesse kuuluvate bakterite muutuse trend on mõlemal proovialal sarnane. *Frankia* suhteline arvukus suurenes EXP perioodil ning langes peale üleujutust. Suhtelise arvukuse langus oli suurim kontrollalal. Kontrollalal langes suhteline arvukus 0,021% ja üleujutatud alal 0,005%. *Geobacter* perekonna suhteline arvukus suurenes EXP ja POST perioodil mõlemal proovialal ja muutus oli suurem üleujutatud alal. Peale üleujutust suurenes suhteline arvukus 0,38% ja moodustas bakterite kooslusest 1,12%. Joonisele 4 lisati bakterite perekonnad, mille summaarne suhteline arvukus oli eksperimendi erinevatel perioodidel suurem kui 1% (eemaldati 40,24–44,5% kõigist järjestustest).

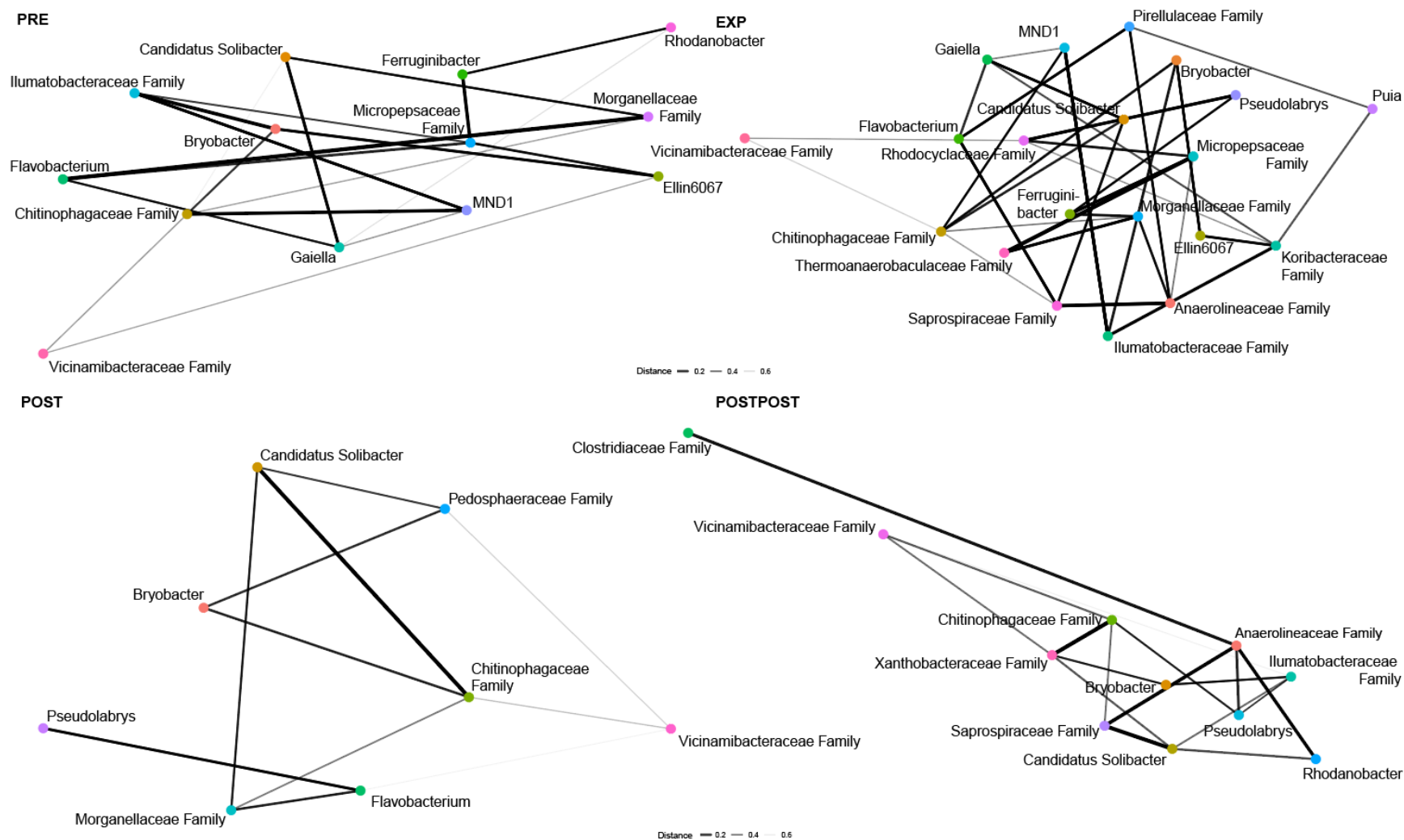


Joonis 4. Joonisel A on näidatud bakteri perekondade suhtelise arvukuse osakaal kontrollalal ja üleujutatud alal eksperimendi perioodi alusel. Joonisel B on välja toodud bakterite perekonna *Frankia* suhtelise arvukuse osakaal proovialadel. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST).

Jooniselt 5 ja 6 on näha, et bakterite võrgustik on tihedam EXP perioodil kui PRE ja POST perioodidel. Üleujutatud ala EXP ja POST võrgustikul on erinevalt PRE võrgustikust näha anaeroobseid *Thermoanaerobaculaceae* (Dedysh & Yilmaz, 2018) ja *Anaerolineaceae* sugukondadesse kuuluvaid baktereid. EXP perioodil on näha ka *Pedosphaeraceae* sugukonda kuuluvaid baktereid, keda on leitud mageveejärve taimestikust (Ivanova & Dedysh, 2023) ning *Nitrosomonadaceae* sugukonda kuuluvaid baktereid, kes on litoautotroofsed ammoniaagi oksüdeerijad (Prosser *et al.*, 2014). Lisaks tuli võrgustikus üleujutatud alal EXP perioodil esile *Ellin6067*, kes võib olla seotud lämmastikuringega (Prosser *et al.*, 2014). *Rhodanobacter* tuli võrgustikus esile EXP ja POST perioodidel, kuid ka kontrollalal enne üleujutuskatset. *Morganellaceae* sugukonda kuuluvaid baktereid oli näha üleujutatud ala PRE ja POST võrgustikel, kuid mitte üleujutuse ajal. Kontrollala EXP võrgustikul on samuti näha anaeroobset keskkonda eelistavaid bakterid nagu *Anaerolineaceae*, *Saprospiraceae* ja *Pirellulaceae* sugukondadesse kuuluvad bakterid, keda PRE ja POST perioodi võrgustikel näha ei ole. Kontrollala EXP perioodil oli näha ka aeroobseid baktereid nagu *Puia* perekond (Lv *et al.*, 2017). Kontrollala võrgustikus ei olnud peale EXP perioodi näha enam *Ferruginibacter* perekonda, kes on samuti aeroobsed bakterid (B.-I. Lee *et al.*, 2014).

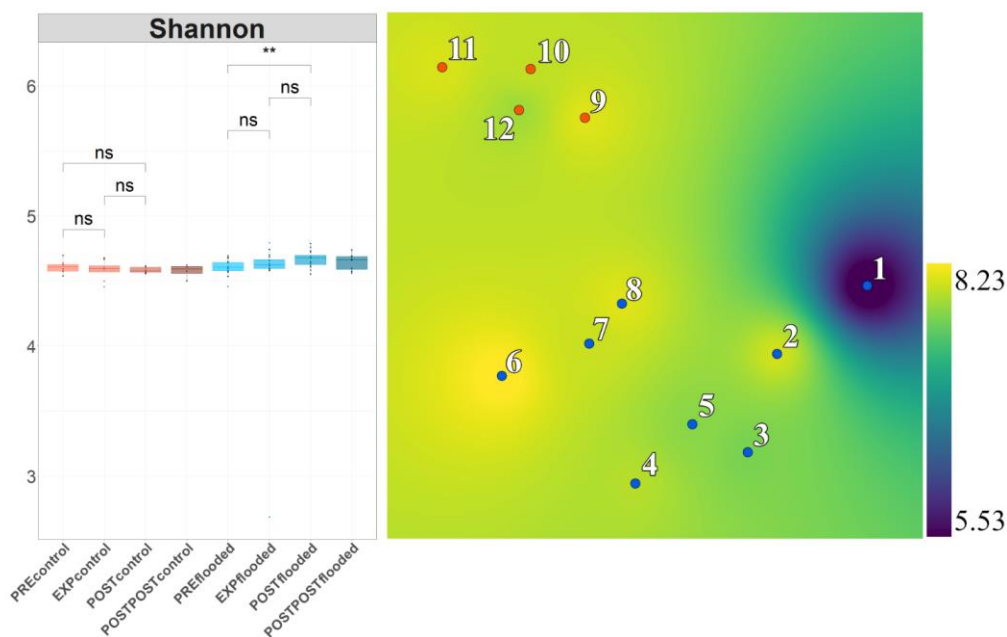


Joonis 5. Bakterite võrgustik üleujutatud ala neljas proovipunktis (proovipunktides 5, 6, 7 ja 8). Joonisel on näidatud bakterite võrgustik vastavalt eksperimendi perioodidele: PRE, EXP, POST ja POSTPOST perioodid. Punktidena on esitatud taksonid perekonna tasemel.



Joonis 6. Bakterite võrgustik kontrollalal. Joonisel on näidatud bakterite võrgustik vastavalt eksperimendi perioodidele: PRE, EXP, POST ja POSTPOST perioodid. Punktidena on esitatud taksonid perekonna tasemel.

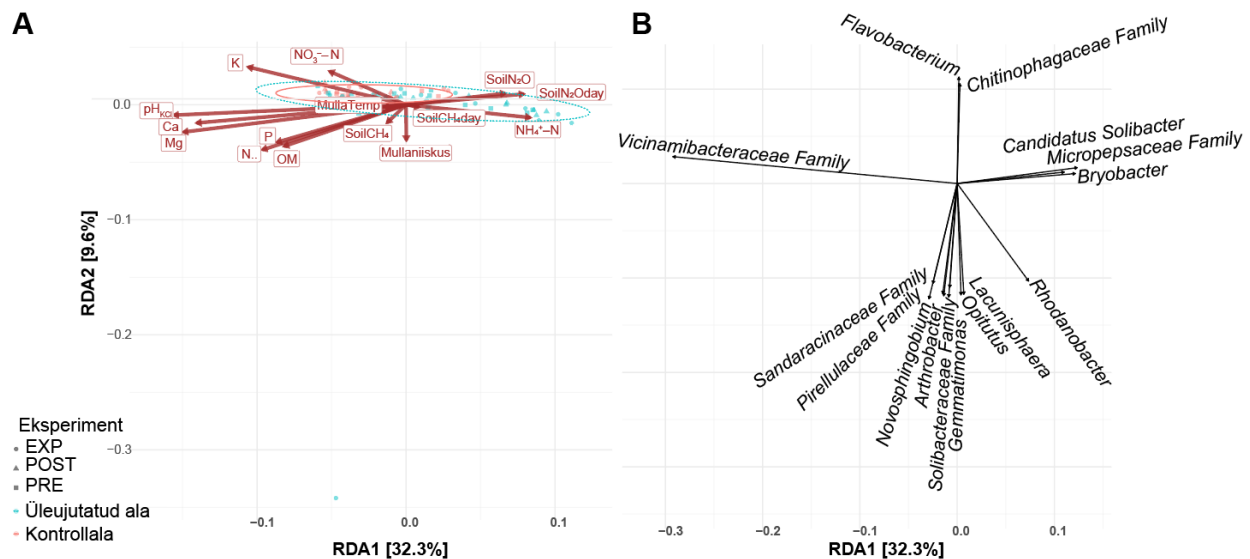
Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeks oli proovialal vahemikus 2,69–4,8. Bakterite mitmekesisus muutus üleujutatud alal statistiliselt oluliselt (joonis 7). Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeks näitas, et üleujutatud alal oli bakterite mitmekesisus PRE ja POST perioodidel statistiliselt oluliselt erinev ($p < 0,01$). PRE perioodil oli mitmekesisuse indeks keskmiselt 4,6 ja POST perioodil 4,67. Bakterite mitmekesisus ei muutunud kontrollalal statistiliselt oluliselt. Bakterite liigirikkuse ja mitmekesisuse ruumianalüüsi tulemustest on näha, et punktis 1 olid nii liigirikkuse kui liikide isendite arvude keskmised väärtused üleujutuse ajal alati kõige madalamad.



Joonis 7. Bakterite mitmekesisuse muutus kontrollalal (punane) ja üleujutatud alal (sinine). Tärnid joonisel näitavad mitmekesisuse indeksite olulist muutust (Wilcoxon'i test). Kaks tärna näitab $\alpha < 0,01$ ja ns tähistab seoseid, kus mitmekesisuse indeks oluliselt ei muutunud. Interpoleeritud pinnal on kasutatud keskmisi Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeksi väärtusi EXP perioodil. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POSTPOST).

RDA tulemused näitasid, et CH_4 emissiooniga olid positiivselt seotud *Lacunisphaera*, *Opiritatus*, *Gemmatimonas*, *Arthrobacter* ja *Novosphingobium* perekonnad ning *Sandaracinaceae*, *Pirellulaceae* ja *Solibacteraceae* sugukondadesse kuuluvad perekonnad (joonis 8). Loetletud

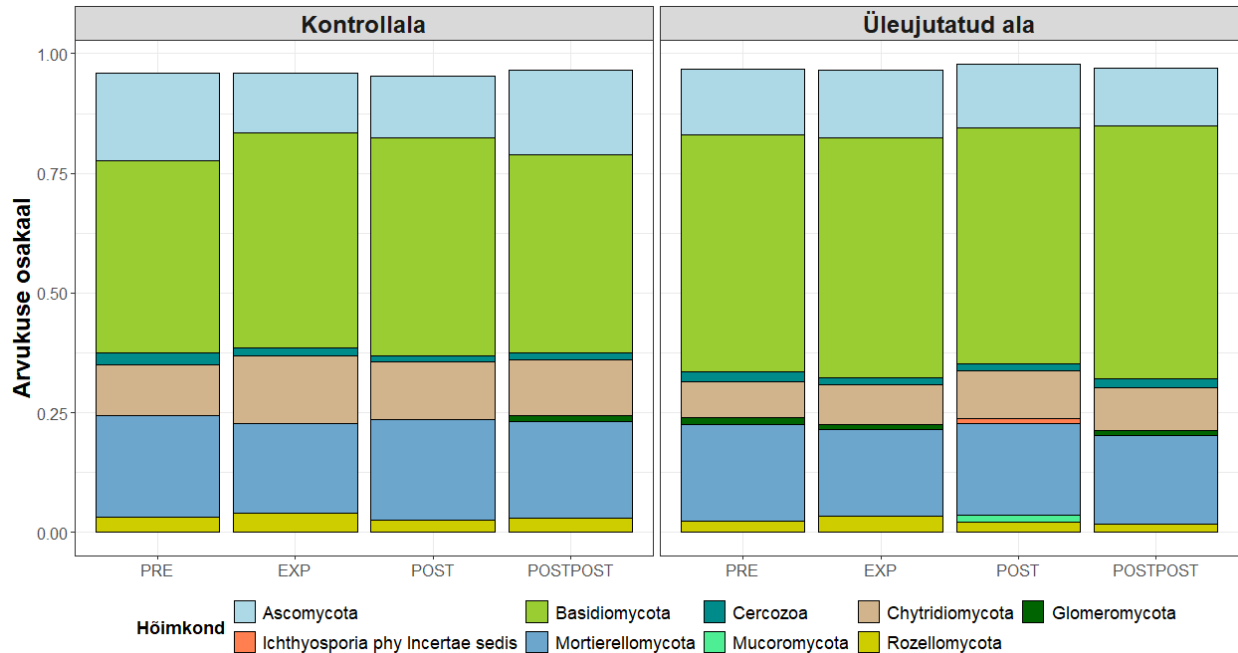
perekonnad eelistasid elukeskkonda, mis oli niiskem. Mullaniiskuse ja CH₄ emissioonidega olid negatiivselt seotud *Flavobacterium* ja *Chitinophagaceae* sugukondadesse kuuluvad perekonnad. *Vicinamibacteraceae* sugukonda kuuluvad bakterid eelistasid kõrgema NO₃⁻ kontsentratsiooniga keskkonda ning madalama NH₄⁺ kontsentratsiooniga keskkonda. *Rhodanobacter* eelistas vastupidist keskkonda *Vicinamibacteraceae* sugukonda kuuluvatele perekondadele. *Candidatus Solibacter*, *Bryobacter* ja *Micropepsaceae* sugukondadesse kuuluvad perekonnad eelistasid sarnast keskkonda. Nimetatud mikroorganismid olid positiivselt seotud mulla N₂O emissioonidega ja NH₄⁺ kontsentratsiooniga ning negatiivselt seotud mulla N%, P ja orgaanilise aine kontsentratsiooniga. Negatiivne seos esines lisaks mulla pH_{KCl}, Ca ja Mg kontsentratsioonidega.



Joonis 8. Bakterite perekondade ja keskkonnaparameetrite vahelised suhted. Joonisel A on kujunditega näidatud eksperimendi erinevate perioodide proove ja värviga on eristatud proovialad. Proovialade ja eksperimendiperioodide ümber on kujutatud 95% tõenäosusellips. Joonisel kasutatud lühendid: OM ehk orgaaniline aine, SoilN₂O ja SoilN₂Oday vastavalt mulla N₂O emissioon enne mõõtmisi ja summaarne päevane emissioon (samad lühendi CH₄ emissioonil) ning SoilTemp ehk mullatemperatuur.

3.2. Seened

Üldseente hõimkondade suhteliste arvukuste proportsioonid olid proovialade ja erinevate eksperimendiperioodide vahel üldjoontes sarnased (joonis 9). Proovialadel oli kokku 34 hõimkonda, millest kõik olid esindatud üleujutatud alal. Kontrollalal oli 32 erinevat hõimkonda. Kõige enam oli proovialadel *Basidiobolomycota* hõimkonda kuuluvaid seeni ja eksperimendiperioodide vahel ei nähtud hõimkonna osakaalu muutustes suuri erinevusi. *Ascomycota* hõimkonda kuuluvate seente osakaal vähenes kontrollalal EXP perioodil 5,76% võrreldes PRE osakaaluga. *Ascomycota* hõimkonna suhteline arvukus suurenes EXP perioodil üleujutatud alal 0,42%. *Rozellomycota* arvukus suurenes samuti EXP perioodil, kuid suhteline arvukus suurenes mõlemal proovialal ja joonisel 9 on näha, et see langes uuesti POST perioodil. *Glomeromycota* suhteline arvukus oli kontrollalal alla 1% kuni POSTPOST perioodini. Üleujutatud alal nende arvukus langes EXP perioodil, kuid suhteline osakaal oli siiski üle 1% (va POST periood). *Ichthyosporia phy Incertae sedis* suhteline arvukus langes EXP perioodil nii kontrollalal kui ka üleujutatud alal, kuid tõusis POST perioodil üleujutatud alal (osakaal 1,04%). *Mucoromycota* suhteline arvukus oli proovialadel samuti alla 1%, kuid üleujutatud alal suurenes POST perioodil nende suhteline arvukus kolmekordselt (suhteline arvukus 1,46%). Joonisele 9 lisati seente hõimkonnad, mille summaarne suhteline arvukus oli eksperimendi erinevatel perioodidel suurem kui 1 % (eemaldati 2,2–4,6 % kõigist järjestustest).

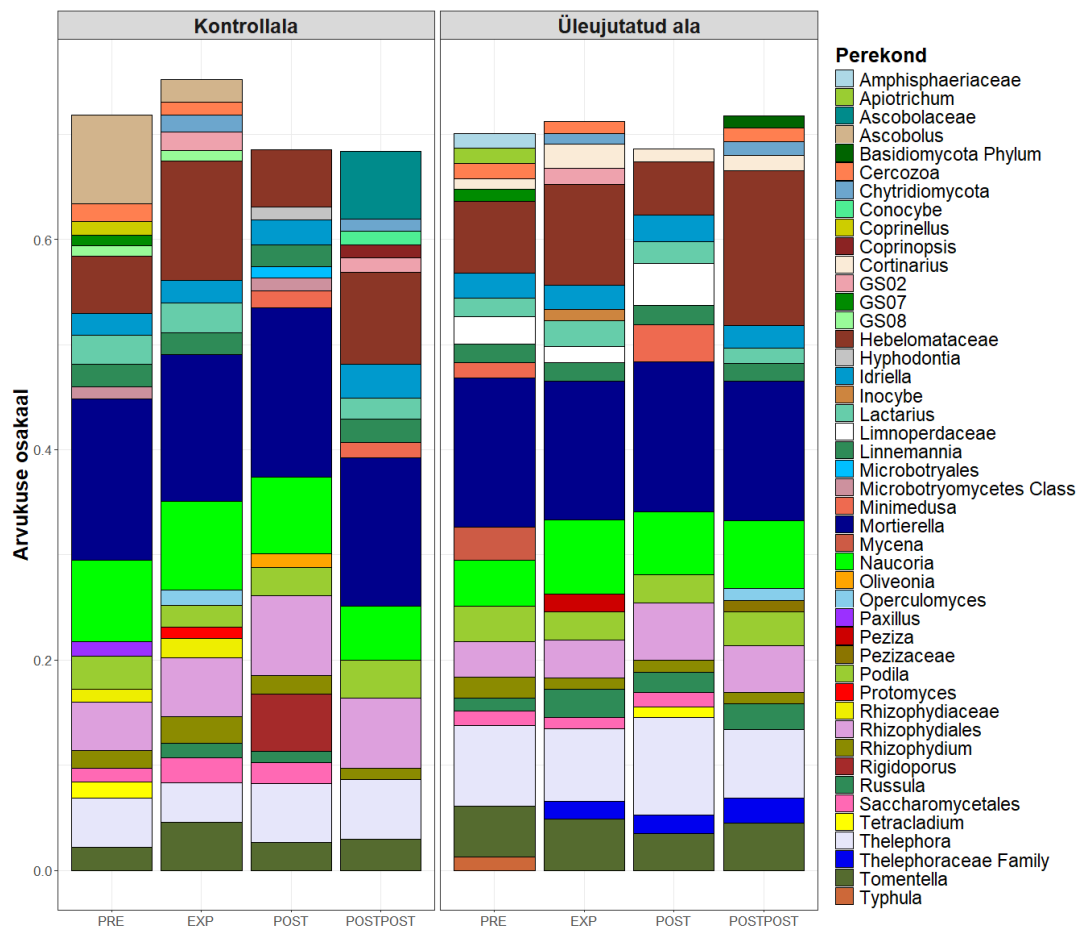


Joonis 9. Üldseente hõimkondade suhtelise arvukuse osakaal kontrollalal ja üleujutatud alal eksperimendi erinevatel perioodidel. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST).

Proovialal oli kokku 822 erinevat perekonda, millest 722 leidis üleujutatud alal ja 616 kontrollalal. Jooniselt 10 on näha, et perekonniti olid proovialad PRE perioodil üsna erinevad, kuid enamuse suurema osakaalu moodustavatest perekondadest esines mõlemal proovialal. Mõlemal proovialal moodustasid suure osakaalu *Mortierella*, *Hebelomataceae* ja *Naucoria* perekondadesse kuuluvad seened. Üldseente perekondadest oli kõige arvukam *Mortierella* ja proovialade vahel ei olnud näha suuri erinevusi. Mõlemal proovialal langes *Mortierella* suhteline arvukus EXP perioodil ja tõusis peale üleujutust. *Hebelomataceae* ja *Naucoria* osakaal muutus samuti mõlemal proovialal sarnaselt. Mõlema perekonna suhteline arvukus suurenes EXP perioodil ja langes POST perioodil. Lisaks oli näha suurt osakaalu muutust POSTPOST perioodil, kui *Hebelomataceae* suhteline arvukus suurenes üleujutatud alal 9,67% võrra.

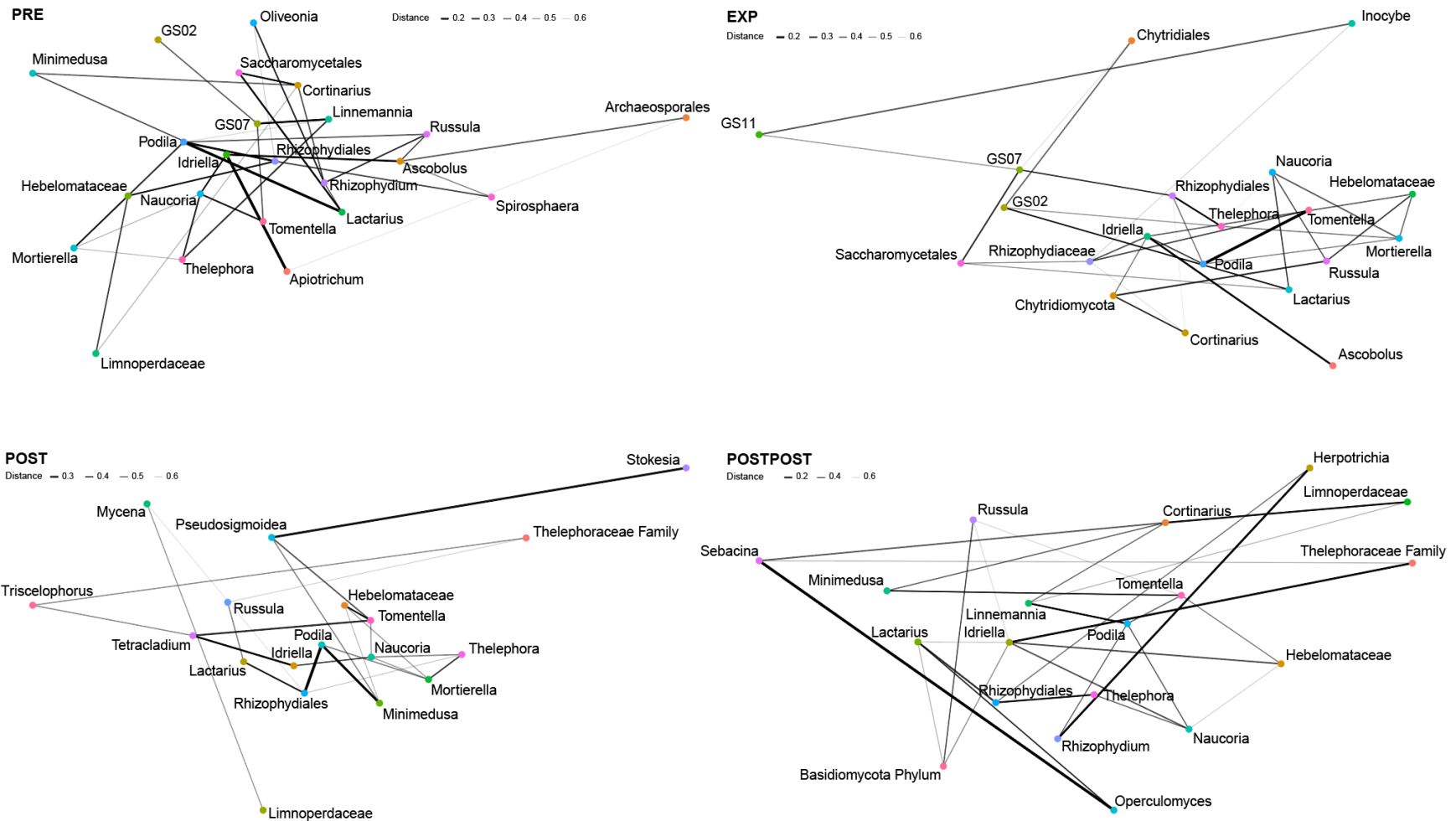
Tomentella arvukus suurenes EXP perioodil, kuid muutus oli suurem kontrollalal, kus arvukus suurenes 2,32% võrreldes üleujutatud ala 0,1%-ga. Peale üleujutust langes *Tomentella* suhteline arvukus mõlemal proovialal. *Cortinarius* perekonna ja *Thelephoraceae* sugukonda kuuluvate seente suhteline arvukus oli terve eksperimendiperioodi vältel kontrollalal alla 1%. Üleujutatud

alal oli perekonna *Cortinarius* suhteline arvukus PRE perioodil üle 1%, kuid *Thelephoraceae* sugukonda kuuluvate seente arvukus alla 1%. Lühiajaline üleujutus mõjutas mõlema sugukonna suhtelist arvukust positiivselt, sest see tõusis üle kahe korra. Peale üleujutust langes *Cortinarius* perekonna suhteline arvukus, aga *Thelephoraceae* sugukonda kuuluvate seente arvukus tõusis veelgi. *Peziza* perekonda kuuluvaid seeni kontrollalal ei täheldatud ja üleujutatud alal oli PRE perioodil nende suhteline arvukus alla 1%. Üleujutuse ajal suurenes nende suhteline arvukus 1,46% (1,65%). Joonisele 10 lisati üldseente perekonnad, mille summaarne suhteline arvukus oli eksperimendi erinevatel perioodidel suurem kui 1% (eemaldati 24,78–31,64% kõigist järjestustest).

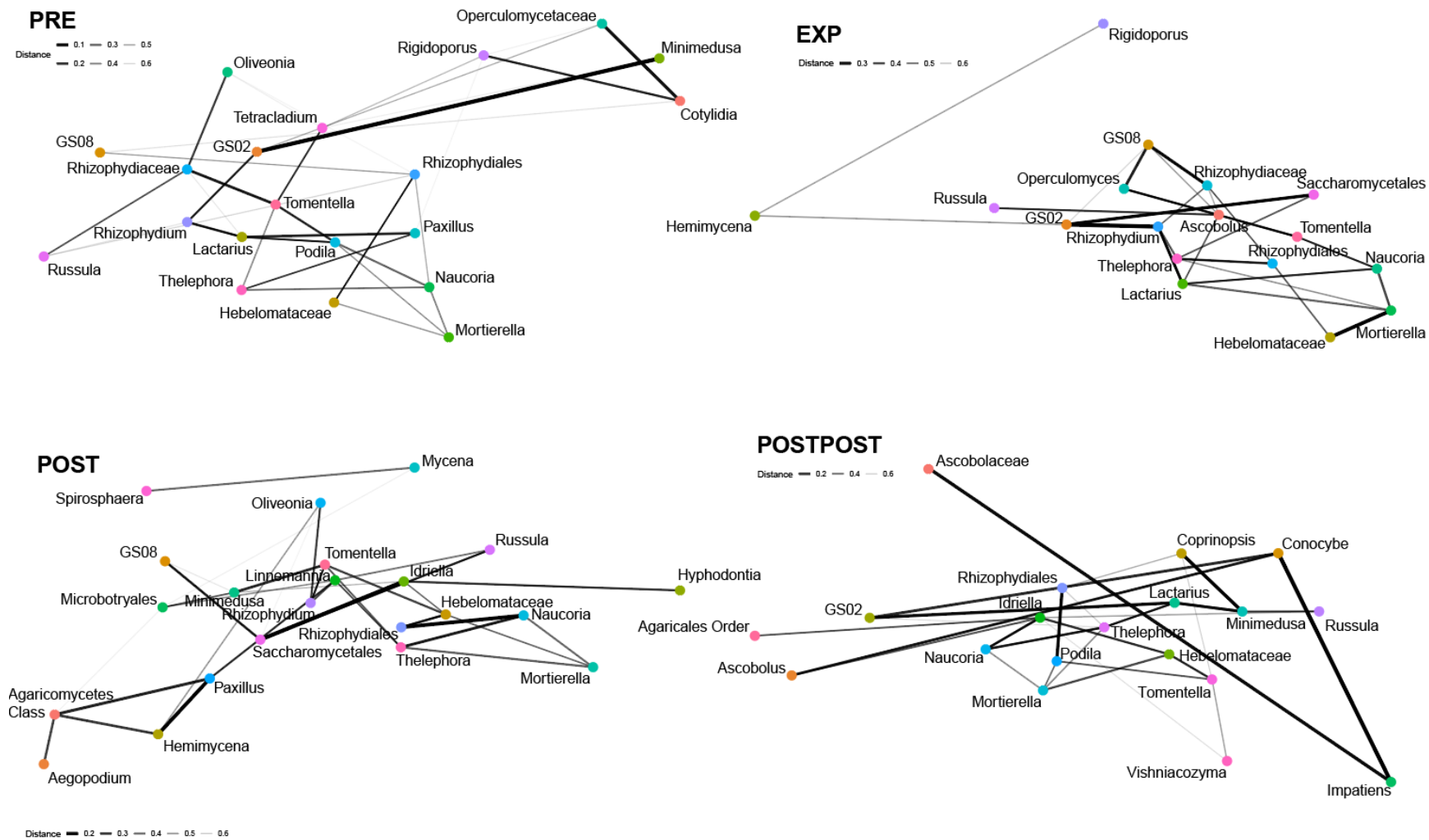


Joonis 10. Üldseente perekondade suhtelise arvukuse osakaal kontrollalal ja üleujutatud alal eksperimendi erinevatel perioodidel. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST).

Üldseente üleujutatud ala võrgustikust on näha, et PRE perioodil oli võrgustik kõige tihedam (joonis 11). EXP perioodil oli võrgustikus vähem perekondi ning POST perioodil veelgi vähem. Kontrollala võrgustikku vaadates ei ole muutused nii suured (joonis 12). EXP perioodil on näha vähem perekondi kui enne üleujutust, aga POST perioodil on võrgustik tihedam kui PRE perioodil. Üleujutatud EXP ja POST võrgustikus puuduvad *Apiotrichum*, *Oliveonia*, *Spirosphaera* ning *Linnemannia* perekonnad, keda oli näha PRE võrgustikus. Üleujutus mõjutas ka *Limnoperdaceae* perekonda, keda on näha üleujutatud ala PRE ja POST võrgustikus, kuid mitte EXP perioodil.

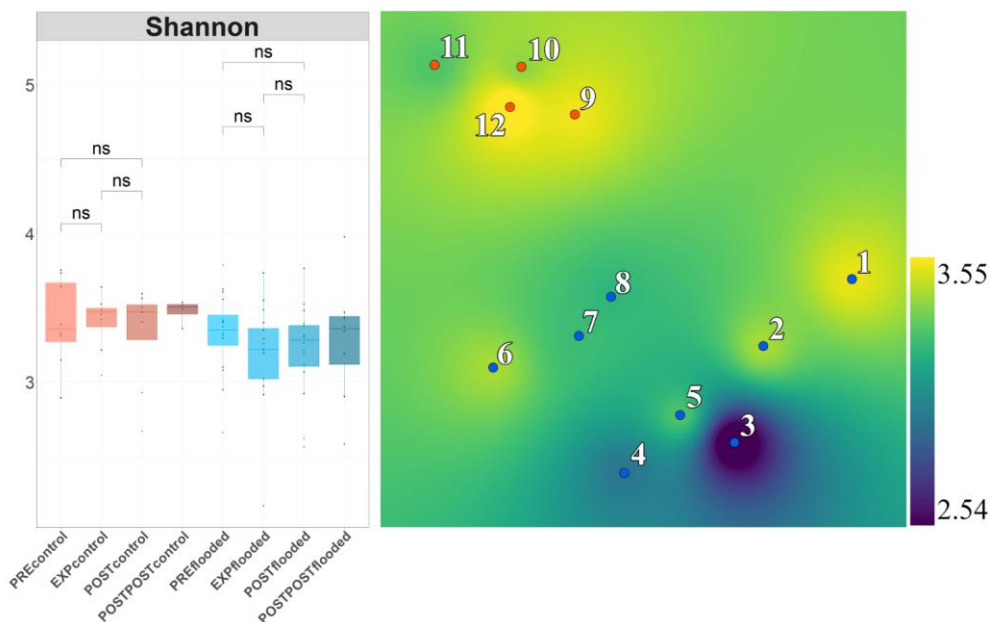


Joonis 11. Üldseente perekondade võrgustik üleujutatud ala neljas proovipunktis (proovipunktides 5, 6, 7 ja 8). Võrgustikud on jaotatud vastavalt eksperimendi perioodidele: PRE, EXP, POST ja POSTPOST. Punktidena on esitatud taksonid perekonna tasemel.



Joonis 12. Üldseente perekondade võrgustik kontrollalal. Võrgustikud on jaotatud vastavalt eksperimendi perioodidele: PRE, EXP, POST ja POSTPOST. Punktidena on esitatud taksonid perekonna tasemel.

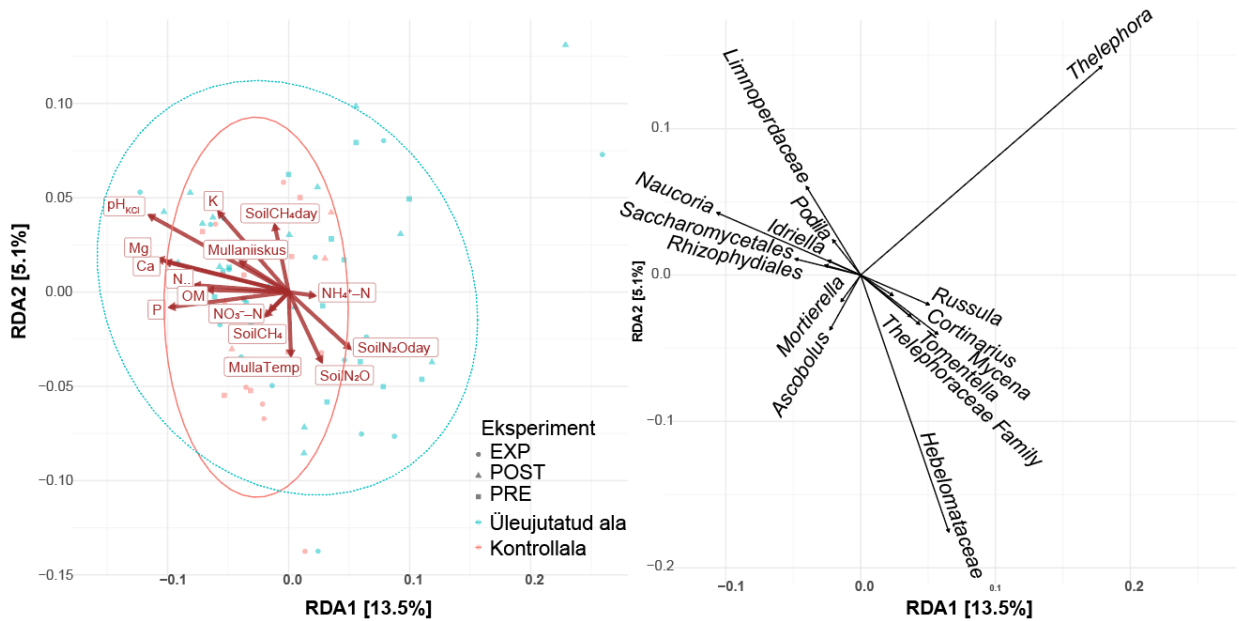
Üleujutus ei mõjutanud seente mitmekesisust statistiliselt oluliselt, kuid üleujutatud alal oli näha negatiivset trendi üleujutuse ajal (joonis 13). Ruumianalüüsi tulemustest on näha, et EXP perioodil olid madalamad keskmised väärtused üleujutatud alal. Kõige madalam oli liigirikkus EXP perioodil punktis 3.



Joonis 13. Üldseente mitmekesisuse muutus proovialal. Siniste toonidega on kujutatud üleujutatud ala ja punakate toonidega kontrollala. Joonisel on näidatud Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeksi muutused eksperimendi erinevatel perioodidel. Ns tähistab seoseid, kus mitmekesisuse indeks oluliselt ei muutunud. Interpoleeritud pinnal on kasutatud keskmist Shannon mitmekesisuse indeksi väärtust EXP perioodil. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), üleujutuse järgne periood (POST) ja aasta pärast eksperimenti (POSTPOST).

RDA tulemused näitasid, et *Rhizophydiales* ja *Saccharomycetales* eelistasid täpselt samasugust elukeskkonda (joonis 14). Antud seened olid positiivselt seotud mulla Mg, Ca, N% ja orgaanilise aine kontsentratsiooniga ning negatiivselt seotud mulla NH_4^+ kontsentratsiooniga. *Naucoria*, *Idriella* ja *Podila* olid positiivselt seotud mullaniiskusega. Lisaks esines neil tugev positiivne seos ka mulla pH_{KCl} ja K kontsentratsiooniga. *Limnoperdaceae* perekond ja mulla CH_4 päevase emissiooni vahel esines tugev positiivne seos. Samas oli positiivne seos ka *Naucoria*, *Idriella* ja *Podila* ning mulla CH_4 emissiooni vahel. *Naucoria*, *Idriella*, *Limnoperdaceae* ja *Podila* olid

negatiivselt seotud mulla N₂O emissioonidega, kuid N₂O emissioonidega olid positiivselt seotud *Tomentella*, *Mycena*, *Mycena*, *Russula* perekonnad ja *Thelephoraceae* sugukonda kuuluvad perekonnad. *Russula* perekonna ja mulla NH₄⁺ vahel esines kõige tugevam positiivne seos. *Mortierella* ja *Ascobolus* eelistasi keskkonda, mis oli kõrge NO₃⁻ kontsentratsiooniga. Lisaks olid nad seotud positiivselt mulla CH₄ emissiooniga. *Mortierella* ja *Ascobolus* perekondadele eelistas vastupidist keskkonda *Thelephora* perekond.

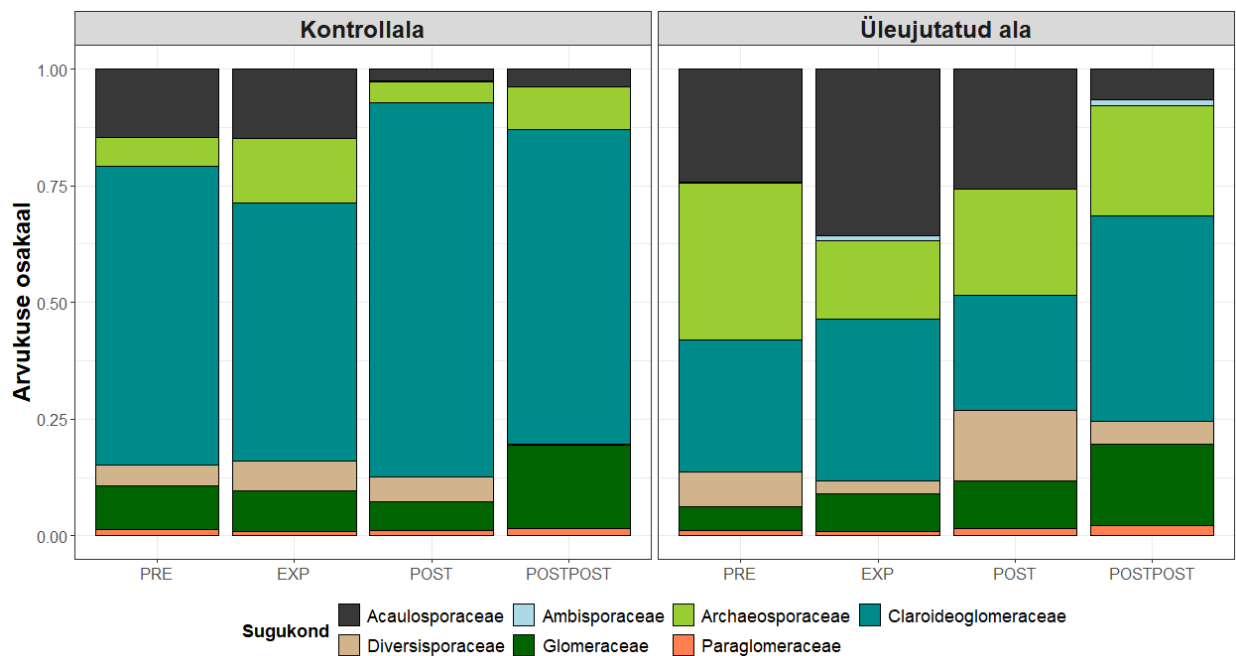


Joonis 14. Üldseente RDA analüüs perekonna tasemel. Vasakpoolne joonis kujutab näidatud perekondade ja keskkonnaparameetrite vahelisi suhteid. Kujunditega on näidatud eksperimendi erinevate perioodide proove ja värviga on eristatud proovialad. Proovialade ja eksperimendiperioodide ümber on kujutatud 95%-ne tõenäosusellips. Parempoolsel on näidatud taksonite vahelisi sarnasusi. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST)

3.3. Arbuskulaarne mükoriisa

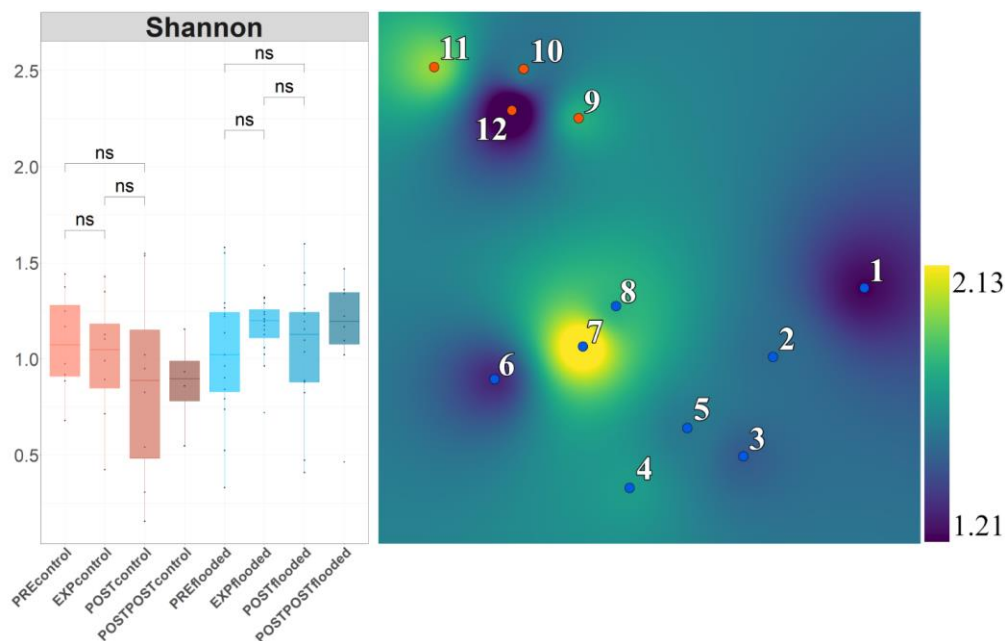
Kontrollalal oli kõige suurema suhtelise arvukusega AM seente sugukond *Claroideoglomeraceae*, kuid üleujutatud alal olid kõige suurema suhtelise arvukusega enne PRE perioodi *Archaeosporaceae* sugukond ning EXP perioodil *Acaulosporaceae* ja *Claroideoglomeraceae* sugukonnad (joonis 15). *Claroideoglomeraceae* sugukonna suhteline arvukus suurenes EXP

perioodil üleujutatud alal (6,23 %), aga vähenes kontrollalal (-8,78 %). Kõige enam muutus *Claroideoglomeraceae* arvukus üleujutatud alal POSTPOST perioodil, kui nende arvukus suurenes 19,44% võrra. Teine suur muutus AM seente koosluse struktuuris oli samuti üleujutatud ala POSTPOST perioodil, kui *Acaulosporaceae* suhteline arvukus vähenes 19,21% võrra. *Acaulosporaceae* ja *Ambisporaceae* suhtelised arvukused suurenesid üleujutatud ala EXP perioodil. Kontrollalal *Acaulosporaceae* suhteline arvukus ei muutunud ja *Ambisporaceae* sugukonda leiti ainult POSTPOST perioodil. *Paraglomeraceae* suhteline arvukus vähenes mõlemal proovialal EXP perioodil ja suurenes peale üleujutust. *Glomeraceae* sugukonna arvukus suurenes EXP perioodil üleujutatud alal ja POST perioodil suurenes veelgi. Kontrollalal oli näha vastupidist trendi, kus arvukus langes ning oli POST perioodil madalaim. *Diversisporaceae* sugukonna suhteline arvukus üleujutatud alal üleujutuse ajal vähenes, kuid suurenes (12,58 % võrra) peale üleujutust. Kontrollalal suuri muutusi *Diversisporaceae* suhtelises arvukuses samal ajavahemikul ei täheldatud. *Diversisporaceae* suhteline arvukus vähenes mõlemal proovialal POTPOST perioodil.



Joonis 15. AM seente sugukondade suhtelise arvukuse osakaal kontrollalal ja üleujutatud alal. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST)

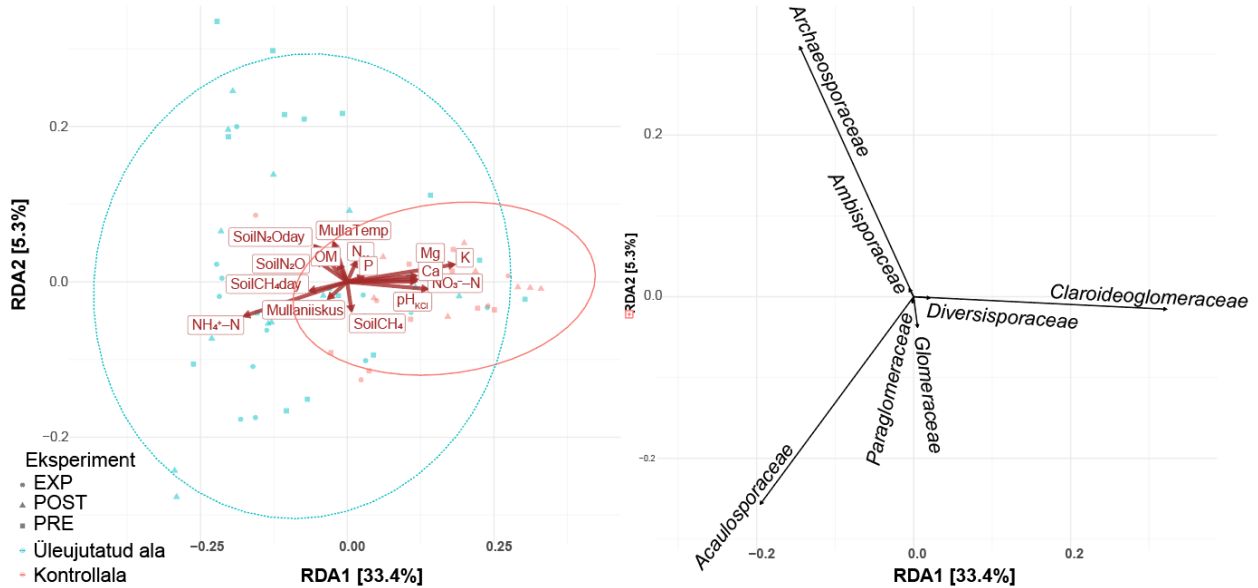
Kummalgi proovialal ei leitud statistiliselt olulisi muutusi AM seente liigirikkuse ja mitmekesisuse indeksites (joonis 16). AM seente mitmekesisus oli kontrollalal ja üleujutatud alal enne EXP perioodi sarnane, kuid EXP perioodil on näha selget erinevust, kus AM seente keskmine Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeks suurenes. Samas ei olnud muutus statistiliselt oluline. Ruumianalüüs ei eristanud EXP perioodil üleujutatud ala kontrollalast. Kõige madalamad keskmised mitmekesisuse väärtused olid punktides 1 ja 12 ning kõige kõrgemad väärtused punktides 7 ja 11.



Joonis 16. AM seente mitmekesisus erinevatel eksperimendiperioodidel. Siniste toonidega on kujutatud üleujutatud ala ja punakate toonidega kontrollalal. Ns tähistab seoseid, kus mitmekesisuse indeks oluliselt ei muutunud. Interpoleeritud pinnal on kasutatud keskmist Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeksi väärtusi. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST)

Claroideoglomeraceae ja *Diversisporaceae* sugukonnad eelistasid sarnast elukeskkonda (joonis 17). RDA tulemused näitasid, et antud sugukonnad olid positiivselt seotud mulla Mg, Ca, K, P, pH_{KCl} ja NO_3^- kontsentratsioonidega. *Archaeosporaceae* ja *Ambisporaceae* eelistasid keskkonda, mis olid orgaanilise aine rikkad. *Archaeosporaceae* ja *Ambisporaceae* olid sugukondades kõige enam positiivselt seotud mulla N_2O emissioonidega. Mulla CH_4 emissiooniga olid positiivselt

seotud *Paraglomeraceae* ja *Glomeraceae*, kuid mulla päevase CH₄ emissiooniga oli kõige enam positiivselt seotud *Acaulosporaceae* sugukond. *Acaulosporaceae* sugukond oli positiivselt seotud ka mullaniiskuse ja mulla NH₄⁺ kontsentratsiooniga.



Joonis 17. AM seente RDA analüüs sugukonna tasemel. Vasakpoolsel joonisel on näidatud sugukondade ja keskkonnaparameetrite vahelisi suhteid. Kujundid näitavad eksperimendi erinevate perioodide proove ja värviga on eristatud proovialad. Proovialade ja eksperimendiperioodide ümber on kujutatud 95%-ne tõenäosusellips. Parempoolsel joonisel on näidatud taksonite vahelisi sarnasusi. Lühendid: üleujutuse eelne periood (PRE), üleujutuskatse (EXP), eksperimendi järgne periood (POST), aasta peale üleujutust (POSTPOST)

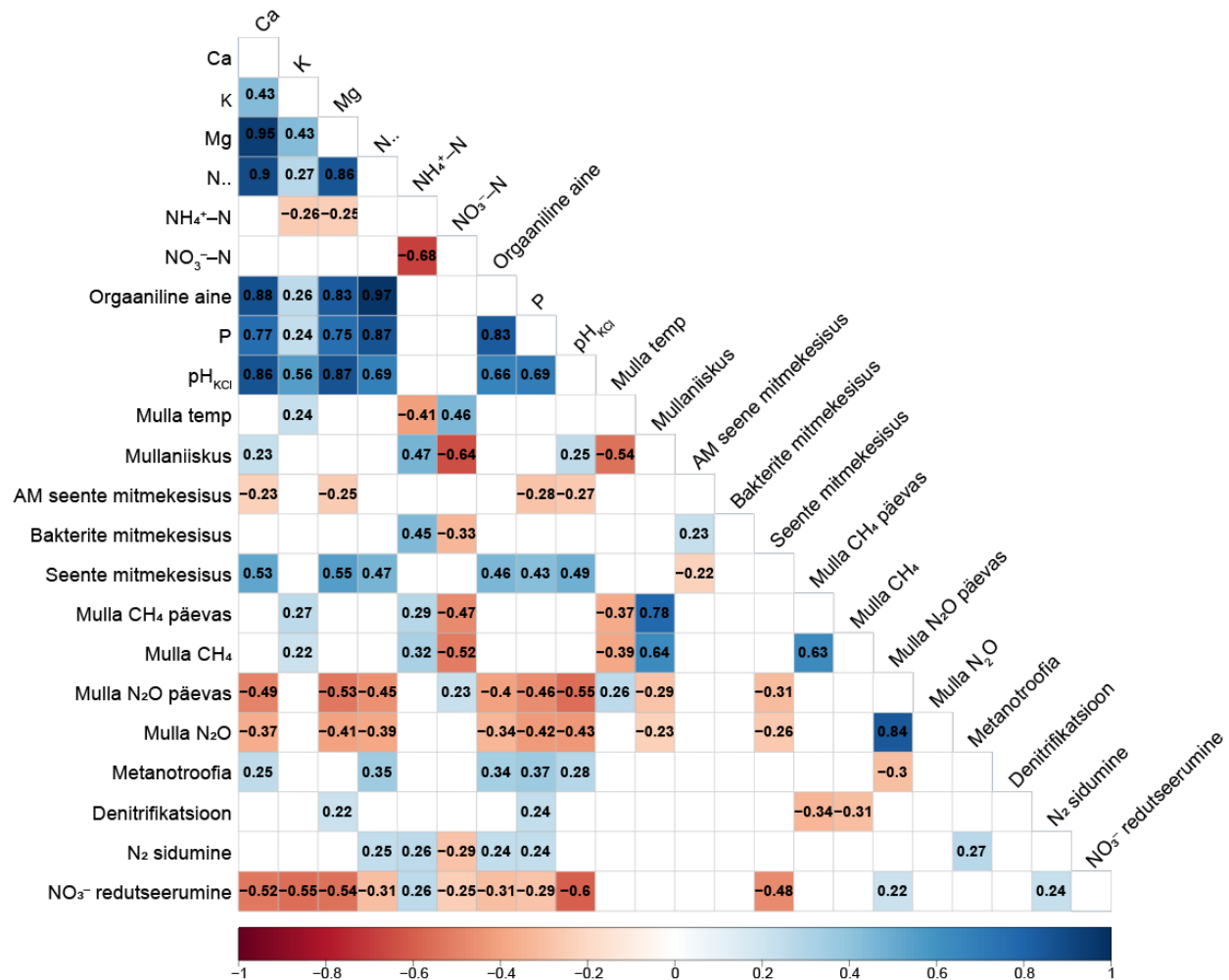
3.4. Seosed mikroobse mitmekesisuse ja protsesside ning keskkonnaparameetrite vahel

Korrelatsioonianalüüsi tulemustest on näha, et bakterite mitmekesisuse ja mulla NH₄⁺ kontsentratsiooni vahel oli oluline positiivne seos (R=0,45) (joonis 18). Proovialal esines statistiliselt oluline negatiivne seos bakterite mitmekesisuse ja mulla NO₃⁻ kontsentratsiooni vahel (R=-0,33).

Seened ei olnud statistiliselt oluliselt seotud mulla NH₄⁺ ja NO₃⁻ kontsentratsioonidega, kuid olid seotud mulla Ca, Mg, P ja pH_{KCl} kontsentratsioonidega. Üldseentel esines Ca, Mg, P ja pH_{KCl}

kontsentratsioonidega positiivne (vastavalt $R=0,53$; $R=0,55$; $R=0,43$ ja $R=0,49$) ja AM seentel negatiivne seos (vastavalt $R=-0,23$; $R=-0,25$; $R=-0,28$ ja $R=-0,27$). Lisaks esines üldseente mitmekesisuse ning N% ja orgaanilise aine vahel statistiliselt oluline positiivne korrelatsioon. Seente mitmekesisus oli negatiivselt seotud mulla N₂O emissioonidega (päeva keskmise N₂O emissiooniga $R=-0,31$ ja enne mõõtmisi võetud N₂O emissiooniga $R=-0,26$). AM seente mitmekesisus oli positiivselt seotud bakterite mitmekesisusega ($R=0,23$) ja negatiivselt seotud üldseente mitmekesisusega ($R=-0,22$).

Vaadates protsesside ja mitmekesisuse vahelisi seoseid, siis oli näha vaid üldseente ja NO₃⁻ redutseerimise vahelist negatiivset seost ($R=-0,48$). Protsessidest oli metanotroofia positiivselt seotud Ca ($R=0,25$), N% ($R=0,35$), orgaanilise aine ($R=0,34$) ja P ($R=0,37$) kontsentratsioonidega ning pH_{KCl}-ga ($R=0,27$). Sarnaselt metanotroofiaga esines denitrifikatsioonil ja N₂ sidumise ja P vahel oluline positiivne seos (mõlemal $R=0,24$). Lisaks oli N₂ fikseerimine seotud mulla N% ($R=0,25$), NH₄⁺ ($R=0,26$) ja NO₃⁻ ($R=-0,29$) kontsentratsioonidega ning orgaanilise ainega ($R=0,24$). Denitrifikatsioon ja NO₃⁻ redutseerimine olid seotud mulla Mg kontsentratsiooniga (vastavalt $R=0,22$ ja $R=-0,54$). Lisaks oli NO₃⁻ redutseerimine seotud mulla Ca ($R=-0,52$), K ($R=-0,55$), N% ($R=-0,31$), NH₄⁺ ($R=0,26$), NO₃⁻ ($R=-0,25$), orgaanilise aine ($R=-0,31$) ja P ($R=-0,29$) kontsentratsioonidega ning pH_{KCl}-ga ($R=-0,6$).

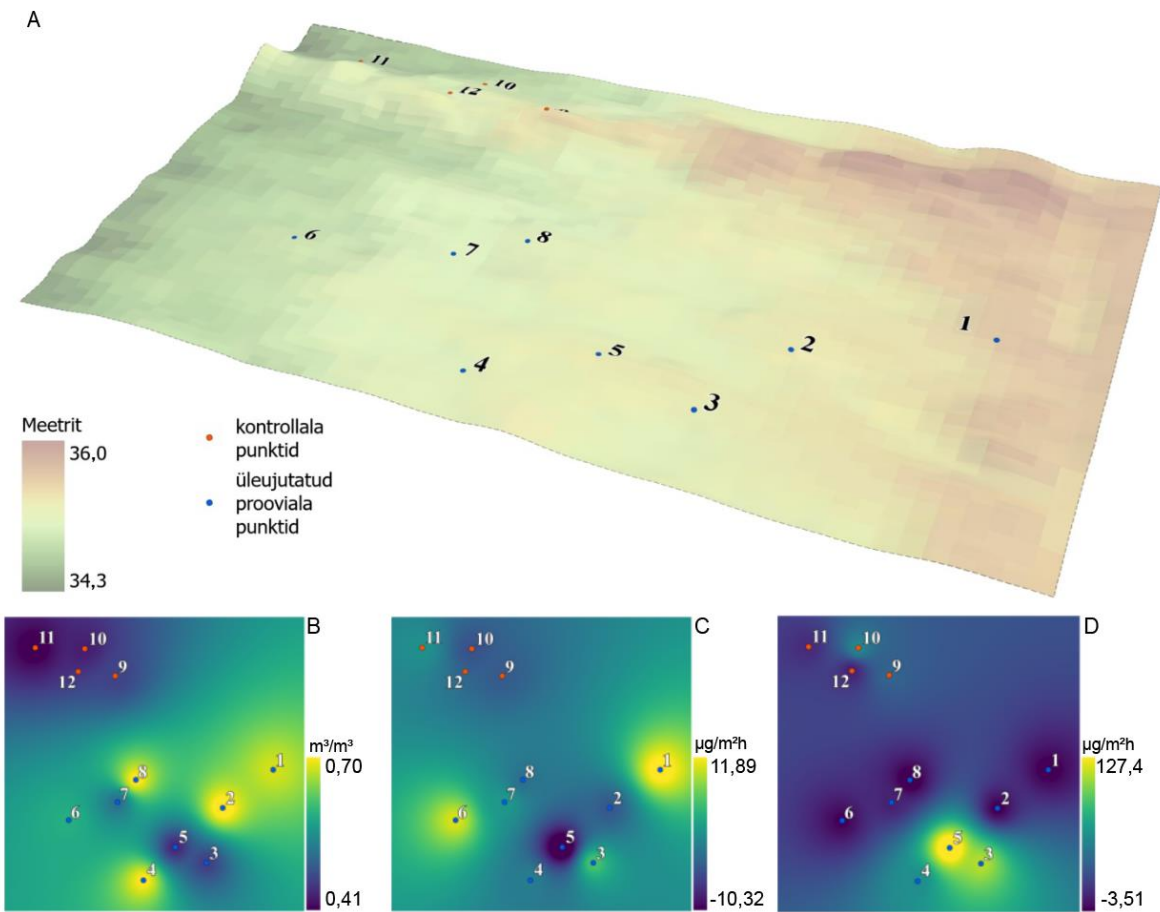


Joonis 18. Mitmekesisuse ja keskkonnaparameetrite Spearmani korrelatsioonimaatriks proovialal. Korrelatsioonimaatriksis on näidatud värvidega statistiliselt olulised seosed ($p < 0,05$). Sinine värv tähistab positiivset ja punane negatiivset seost tunnuste vahel. Numbrid värvitud ruutudes näitavad seose korrelatsioonikordajat R.

3.5 Ruumianalüüs

Proovialal asuvate punktide kõrgused jäävad vahemikku 34,6-35,6 m. Joonisel 19A on kujutatud prooviala maapinna kõrgusmudelit, kus on näha kahte prooviala eraldav looduslik tamm. Vaadates mullaniiskust prooviala EXP perioodil (joonis 19B), on näha, et üleujutatud ala oli EXP perioodil niiskem ja kontrollala kuivem. Üleujutatud ala punktid 3 ja 5 olid EXP perioodil teistest üleujutatud ala punktidest väiksema mullaniiskusega, kuid nimetatud punktid asuvad ka

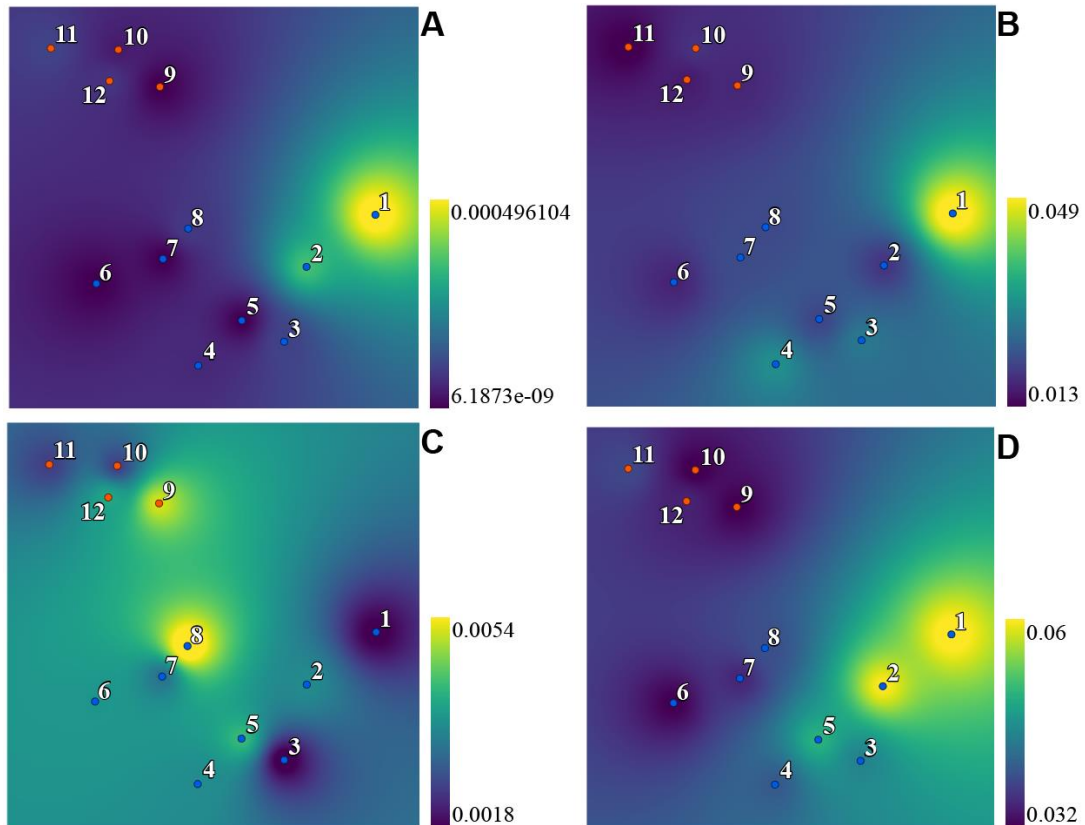
ümbritsevast alast kõrgemal. Lisaks oli näha, et neis punktides oli võrreldes teiste üleujutatud ala proovipunktidega mulla CH_4 emissioon madalam (joonis 19C) ja N_2O emissioon kõrgem (joonis 19D). Selget erinevust üleujutatud ala ja kontrollala CH_4 ja N_2O voogude juures ei ole märgata, kuid on näha, et kõrgemal asuv üleujutatud ala punkt 5 on sarnasem kontrollala punktidega kui üleujutatud ala omadega. Üleujutatud alal on üleujutusega tekkinud punktid, mis tarbivad ja emiteerivad CH_4 ja N_2O .



Joonis 19. Prooviala kõrgusmudel (A), mullaniiskus (B), mulla CH_4 (C) ja N_2O (D) emissioonid EXP perioodil. Kontrollala punktid on kujutatud punasega ja üleujutatud ala punktid sinisega. Keskkonnaparameetrite joonistel on tumesinisega näidatud alad on madala väärtusega ning kollasega kõrgemad väärtused.

Metanotroofia oli suurim üleujutatud alal punktides 1 ja 2 (joonis 20A). Ülejäänud proovialal oli metanotroofia madalam. NO_3^- reduktsiooni suurim väärtus oli samuti punktis 1 (joonis 20B). NO_3^-

reduktsioon oli kõrgem üleujutatud alal ning madalad keskmised väärtused esinesid kontrollalal. Selge erinevus kontrollalala ja üleujutatud ala vahel on näha N₂ fikseerimise interpolatsioonil (joonis 20D). Lämmastiku fikseerimine oli suurem üleujutatud alal ja vähenes kaugenedes veallikast ja oli madalam kontrollalal. Denitrifikatsiooni puhul ei esinenud selget ruumilist trendi (joonis 20C). Denitrifikatsioon toimus rohkem prooviaala keskel ja vähenes prooviaala äärealade suunas.



Joonis 20. Funktsioonid prooviaala EXP perioodil. Joonisel A on kujutatud metanotroofia, joonisel B NO₃⁻ reduktsioon, joonisel C denitrifikatsioon ja joonisel D N₂ fikseerimine. Kontrollalala punktid on kujutatud punasega ja üleujutatud ala punktid sinisega.

4. Arutelu

Magistritöö tulemused näitasid, et mulla mikroobikooslused varieeruvad nii ruumilisel kui ka ajalisel skaalal keskkonnaparameetritele reageerides. Mulla omadused ja taimeistik mõjutavad mikroobide arvukust ja koosluste struktuuri (Yu *et al.*, 2012). Varasemalt on näidatud, et ka üleujutused mõjutavad mulla mikroobikooslusi (Garssen *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2021) ja kaldaäärsete metsade mulla KHG emissioone (Schindler *et al.*, 2020). Üleujutus on mõjutanud kaldaäärsete alade liigirikkust negatiivselt, kuid poolkõrbete ja kõrbete liigirikkust positiivselt (Garssen *et al.*, 2015). Shen ja teised (2021) leidsid, et mulla bakterite α -mitmekesisus oli aastate lõikes madalam üleujutuse kui pöudade ajal. Samas H. Zhang ja teised (2023) leidsid, et pidevalt üleujutatud, fluktueeriva veetasemega ja kuivendatud alade mulla bakterite mitmekesisus ei olnud nende alade vahel oluliselt erinev (H. Zhang *et al.*, 2023).

Agali katsealal ei mõjutanud kõrge veetase bakterite mitmekesisust, aga peale üleujutust oli bakterite mitmekesisus oluliselt suurem kui enne, millel võis olla seos üleujutuskatse lühiajalisusega. Garrissen ja teised (2015) leidsid, et üleujutuse mõju liigirikkusele sõltub üleujutuse kestusest, intensiivsusest ja sagedusest. Unger ja teised (2009) viisid läbi viienädalase üleujutuskatse ja leidsid, et pidev üleujutus vähendas mikroorganismide biomassi ning mõjutas aeroobseid baktereid ja seeni. Samas leidsid nad, et mulla mikroobikoosluste struktuur ei muutunud eksperimendiperioodi järel oluliselt ja järeldasid samuti, et üleujutusperiood võis olla liiga lühike (Unger *et al.*, 2009). Lisaks on muutusi bakterite kooslustes varasemalt seostatud mulla pH, mullaniiskuse, orgaanilise aine sisalduse ja N% kontsentratsiooniga (Ding *et al.*, 2022; Shen *et al.*, 2021). Magistritöö tulemused näitasid, et bakterite mitmekesisus oli seotud mulla NH_4^+ ja NO_3^- kontsentratsiooniga ja olulist korrelatsiooni bakterite mitmekesisuse ning mullaniiskuse, orgaanilise aine ja pH vahel ei leitud.

Metsamulla bakterikooslused olid hõimkondade tasemel sarnased enne ja pärast üleujutust kui ka üleujutuse ajal. Kõige suurema suhtelise arvukusega olid mõlemal proovialal ja igal eksperimendiperioodil *Proteobacteria*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Planctomycetota* ja *Verrucomicrobiota* hõimkonnad. Selgeid erinevusi oli aga näha perekondade tasemel. Perekonna tasemel oli bakterite võrgustik tihedam üleujutuse ajal kui enne või pärast üleujutust. Perekonna tasemel oli proovialal kõige suurema suhtelise arvukusega *Vicinamibacteraceae* sugukonda kuuluvad perekonnad, kes on aeroobsed bakterid ja kasutavad kasvuks suhkruid ja kompleksseid

valgulisi ühendeid (Huber & Overmann, 2018). Tulemusest oli näha, et üleujutus mõjutas antud sugukonda kuuluvaid aeroobseid perekondasid negatiivselt.

Nitrosomonadaceae sugukonda kuuluvad bakterid, kelle hulka kuuluvad näiteks *MND1*, *Ellin6067* ja *Nitrospira* jt, on ammoniaagi oksüdeerijad ja seotud nitrifikatsiooni protsessiga (Prosser *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2023). *Nitrosomonadaceae* sugukonda kuuluvad bakterite perekonnad tulid võrgustikuanalüüsis esile üleujutuse ajal, kuid enne ja pärast üleujutust neid ei tuvastatud. *Nitrosomonadaceae* sugukonna bakteritest mõjutas üleujutus positiivselt ka *Ellin6067* suhtelist arvukust. Erinevalt teistest *Nitrosomonadaceae* sugukonda kuuluvatest bakteritest näitasid uurimistöö tulemused, et nitrifikatsiooniga seotud *Nitrospira* ja *MND1* suhteline arvukus langes. Schindler ja teised (2020) leidsid, et muld oli üleujutuse ajal N₂O allikas, kuid N₂O emissioon ei muutunud mullast statistiliselt oluliselt ja keskmine N₂O emissioon üleujutuse ajal perioodil siiski langes. N₂O emissiooni langust võib seostada nitrifikatsiooni protsessi aeglustumisega, sest mulla NO₃⁻ kontsentratsioon langes (Reiss, 2021). Korrelatsioonianalüüs näitas, et mulla NO₃⁻ kontsentratsioon ja mullaniiskus olid negatiivselt seotud ja on teada, et nitrifikatsiooni käigus akumulereb mulda NO₃⁻ (Pärn *et al.*, 2018).

Interpolatsiooni tulemused näitasid, et muld oli üleujutuse ajal siiski N₂O emissiooniallikaks üleujutatud ala kuivemates punktides. N₂O emissioon mullast võis olla seotud pigem denitrifikatsiooni või DNRA protsessiga. Denitrifikatsiooniga on seotud *Bradyrhizobium* ja *Rhodanobacter*, kelle suhtelised arvukused üleujutusega suurenesid. Uuringud on näidanud, et *Rhodanobacter* on seotud denitrifikatsiooniga happelistes muldades (Van Den Heuvel *et al.*, 2010). Lisaks on näidatud, et *Bradyrhizobium* perekonna mõned liigid on võimelised täielikuks denitrifikatsiooniks, kuid teised *Bradyrhizobium* bakterid on seotud mittetäieliku denitrifikatsiooniga (Saeki *et al.*, 2017). Mittetäieliku denitrifikatsiooni saaduseks võib olla NO₂⁻, lämmastikoksiid (NO) või N₂O (Saeki *et al.*, 2017).

Bradyrhizobium perekonda kuuluvad bakterid on lisaks denitrifikatsioonile võimelised atmosfäärist N₂ siduma (Saeki *et al.*, 2017). Varasemad tulemused näitasid, et üleujutus aitas lämmastiku fikseerijatel erinevaid toitaineid paremini omastada (Reiss, 2021). Magistritöö tulemused näitasid, et N₂ fikseerijate ja mulla NO₃⁻ kontsentratsiooni vahel esines negatiivne suhe, mis langeb kokku sellega, et lämmastikku fikseerivate mikroobide mitmekesisust mõjutab oluliselt mulla NO₃⁻ kontsentratsioon (Espenberg *et al.*, 2018). Üleujutuse ajal muutis NO₃⁻

kontsentratsiooni langus keskkonna lämmastiku sidujatele sobivamaks. Lisaks oli bakterite osakaalude uurimisel näha *Frankia* perekonna osakaalu suurenemist üleujutuse ajal (joonis 4B). *Frankia* bakterid, kes seovad lämmastiku sümbioosis või vabalt elades, eelistavad vähese hapnikusisaldusega keskkondasid (Lechevalier, 1994). Tulemust kinnitab ka lämmastiku fikseerivate geenide interpolatsioon proovialal, kus oli näha selge erinevus kontrollala ja üleujutatud ala vahel.

Üleujutuse ajal ei olnud prooviala pidevalt üleujutatud, sest vett pumbati proovialale vaid päeval. Pulseeriva üleujutusega aladel on suurem tõenäosus CH₄ oksüdatsiooniks kui pidevalt üleujutatud aladel (Chowdhury & Dick, 2013). Lisaks on leitud, et metanotroofid võivad CH₄ oksüdeerida ka anaeroobsetes tingimustes (Caldwell *et al.*, 2008). N-damo on lämmastikuringe protsess, mis on seotud süsinikuringega. Protsessi viib läbi metaani oksüdeeriv ja nitriteid redutseeriv bakteriliik *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (Ettwig *et al.*, 2010). Bakter kasvab anaeroobsetes tingimustes ja redutseerib NO₂ N₂-ks ilma N₂O reduktaasita ning toodab hapnikku CH₄ oksüdeerumiseks (Ettwig *et al.*, 2010).

Candidatus Methyloirabilis oxyfera liik kuulub *Methyloirabilaceae* sugukonda ja uurimuse tulemused näitasid, et *Methyloirabilaceae* sugukonna suhteline arvukus oli suurem üleujutusega mõjutatud alal. Interpolatsiooniga oli näha, et metanotroofia ja NO₂ redutseerimine olid üleujutuse ajal suurimad üleujutatud ala punktis 1, kus oli ka *Methyloirabilaceae* sugukonna suhteline arvukus suurim. Punkt 1 oli üleujutatud alal niiskem kui kontrollala, mis läheb kokku varasemate uuringutega, kus on näidatud, et n-damo protsessi läbi viivad bakterid eelistavad anaeroobseid tingimusi ning nende arvukus suureneb üleujutuse pikenemisega (Y. Wang, Huang, *et al.*, 2016).

Süsinikuringega seotud perekondade *Bryobacter*, *Candidatus Solibacteri* ja *Geobacter* kooslusi mõjutab üleujutus positiivselt. *Bryobacter* on aeroobne bakter, keda võib leida ka anoksilistes tingimustes happelistel märgaladel ja muldades (Dedysh, 2019). *Bryobacter* kasutab erinevaid suhkruid, polüsahhariide ja rasvhappeid ning on võimeline nitraati redutseerima (Dedysh *et al.*, 2017). Sarnaselt *Bryobacter* kooslustele on ka *Candidatus Solibacteri* kooslused fakultatiivselt anaeroobsed ja seotud orgaanilise süsiniku lagundamisega (Dedysh *et al.*, 2017).

Geobacter on seotud mulla KHG emissioonidega anaeroobsetes keskkondades (T. Li & Zhou, 2020). *Geobacter* võib mullas esineda koos metanogeenidega ning nende vahel esineb peamiselt sümbioos ja konkurents DIET (ing keeles *direct interspecies electron transfer* ehk liikide vaheline

elektronide ülekanne) kaudu (T. Li & Zhou, 2020). Kui DIET protsess on organismide vahel toimumas, siis väheneb CH₄ tootvate liikide energiabarjäär ja kiireneb CH₄ tootmine (T. Li & Zhou, 2020). Näiteks on teada, et *Geobacter* varustab *Methanothrix* liike elektronidega ja seeläbi suureneb CH₄ produktsioon (Holmes *et al.*, 2017). Magistritöö tulemused näitasid, et üleujutusega muutus prooviala *Geobacterile* sobilikumaks keskkonnaks. *Geobacteri* suhteline arvukus suurenes koos mullaniiskusega. Võrgustiku analüüsis tuli *Geobacter* esile pärast üleujutust kui CH₄ emisioonid olid proovialal suurimad.

Mullaseened on enamasti vastupidavamad lühiajalisele niisutamisele ja kuivendamisele kui baktereid (X.-B. Wang *et al.*, 2022). Uuringutega on leitud, et mullaniiskus ning lämmastiku ja süsiniku suhe on ühed olulisemaid parameetreid, mis mõjutavad seente ja AM seente koosluste struktuuri ja mitmekesisust mullas (Cao *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020). Magistritöös ei leitud statistiliselt olulist suhet üldseente ja AM seente mitmekesisuse ning mullaniiskuse vahel. Samas oli näha, et üleujutus mõjutas üldseente mitmekesisust negatiivselt, kuid muutus ei olnud statistiliselt oluline. Keskmised Shannoni indeksid olid üleujutuse ajal madalamad üleujutatud proovialal ning üleujutuse ajal olid keskmised indekse väärtused madalamad kui enne või pärast üleujutust. Cheng ja teised (2020) võrdlesid seente koosluste struktuuri ja funktsionaalseid grupe ja leidsid samuti, et Shannon mitmekesisuse indeks oli madalam märgalade muldades kui mahajäetud riisipõldude ja maisipõldude muldades (Cheng *et al.*, 2020).

Üldseente perekondades moodustas kõige suurema osakaalu mõlemal proovialal *Mortierella*. *Mortierella* liigid on saprotroofid, kes kasutavad elutegevuseks tselluloosi, hemitselluloosi ja kitiinis leiduvat süsinikku (Ozimek & Hanaka, 2020). *Mortierella* perekond mõjutab mulla mikrobioomi lahustades fosforit. Lisaks aitab perekond mikroorganisme, sest tõstab nende toitainete omastamise efektiivsust (Ozimek & Hanaka, 2020). Tulemused näitasid, et *Mortierella* perekonda mõjutas lühiajaline üleujutus negatiivselt. Üleujutus mõjutas aga positiivselt *Naucoria* ja *Russula* perekondi, kes moodustavad mükoriisid lepa juurtega (Moreau, 2005). RDA analüüs näitas, et *Naucoria* perekond eelistas ka suurema mullaniiskusega keskkonda. Lisaks oli tulemustest näha positiivset üleujutuse mõju *Tomentella* ja *Thelephoraceae* sugukonda kuuluvatele seente perekondadele, keda on sageli leitud lepa mikrobioomis (Fuller *et al.*, 2023; Schwob *et al.*, 2017). Tulemused kinnitavad, et lepad moodustavad sümbiootilisi suhteid EM või AM seentega, kus sümbioos aitab leppadel omastada toitaineid ja vett ning vastu pidada biootilistele ja abiootilistele keskkonnateguritele (Fuller *et al.*, 2023).

DRNA redutseerimisprotsessi kõrvalsaadusena võib emiteeruda N₂O-d ja on teada, et *Ascomycota* hõimkonda kuuluvad seened on võimelised läbi viima DNRA protsessi (Zhou *et al.*, 2002). Magistritöö tulemused näitasid, et *Ascomycota* suhteline arvukus suurenes üleujutusega. Antud hõimkonda kuuluvad näiteks *Peziza* perekond, kelle arvukust üleujutus samuti positiivselt mõjutas. Reissi (2021) bakalaureusetöös näidati, et N₂O emissioonid üleujutuse ajal korreleerusid positiivselt *nrfA* geenikoopiate arvukusega, mida kasutatakse DRNA protsessi tuvastamiseks (Welsh *et al.*, 2014). Lisaks puudub seentel N₂O reduktaas ja ka denitrifikatsiooni lõpp-produktiks on N₂O (Mothapo *et al.*, 2015). Magistritöö tulemused näitasid aga üldseente ja N₂O emissioonide vahel negatiivset suhet. Seega N₂O emissioon üleujutuse ajal on arvatavasti seotud pigem bakterite kui seentega. Varasemalt on näidatud, et seente N₂O tootmise aktiivsus on umbes 1–5 suurusjärku madalam kui bakterite oma (Mothapo *et al.*, 2015).

Üleujutus ei mõjutanud statistiliselt oluliselt AM seente α -mitmekesisust. Varasemalt on näidatud, et nii kuival kui ka niiskel aastaajal ei ole olulist mõju AM liigirikkusele ja mitmekesisusele (Lovelock *et al.*, 2003). Erinevalt üldseentest oli näha AM seente keskmise mitmekesisuse indeksi suurenemist üleujutuse ajal. Wang ja teised (2011) näitasid, et üleujutus võib olulistelt mõjutada AM seente mitmekesisust, kuid olulisel kohal on üleujutuse kestus. AM seened on aeroobsed mikroorganismid ja intensiivsel üleujutusel on negatiivne mõju nende mitmekesisusele (Y. Wang *et al.*, 2011). Samas võib mõõdukas üleujutus soosida mitmekesisuse suurenemist (Y. Wang *et al.*, 2011). Mitmekesisuse suurenemine võib olla seotud aerenhüümide efektiivsuse suurenemisega (Yamauchi *et al.*, 2013) või AM seente liikide suure kohanemisvõimega hapnikuvaeses keskkonnas (Y. Wang, Li, *et al.*, 2016).

AM kooslusel võib olla oluline mõju mulla omadustele, mis omakorda mõjutavad mulla KHG vooge (Storer, 2013). Shen ja Zhu (2021) leidsid, et AM kooslused võivad alandada mulla N₂O emissiooni, suurendades taimede ja mikroobse lämmastikku biomassi ning vähendades mulla anorgaanilise lämmastiku sisaldust. AM seened võivad muuta ka N₂O emissiooniga seotud mikroobikooslusi, soodustades *nosZ* markergeenide kasvu ja pärssides *nirK* (vastutab N₂O tootmise eest) markergeenidega seotud mikroobikoosluste kasvu. AM seente mitmekesisuse suurenemine proovialal läheb kokku varasemate tulemustega, kus oli näha, et üleujutusega suurenes *nosZII* markergeenide arvukus ja langes *nirK* markergeenide arvukus (Reiss, 2021). *NosZ* markergeenidest on klaad II arvukus negatiivselt seotud N₂O emissiooniga (Samad *et al.*, 2016).

AM seentest domineeris kontrollalal *Claroideoglomeraceae* sugukond terve eksperimendiperioodi vältel. Üleujutatud alal oli suurima suhtelise arvukusega enne üleujutust *Archaeosporaceae* sugukond ja üleujutuse ajal *Acaulosporaceae*. Varasemalt on märgalade ja üleujutustega seostatud peamiselt *Glomeraceae* sugukonda kuuluvaid AM seeni, sest neil on suur ökoloogiline kohanemisvõime (Y. Wang *et al.*, 2011, 2015). Lisaks on leitud, et *Glomeraceae* ja *Acaulosporaceae* sugukonnad domineerivad troopilistes metsades (Leal *et al.*, 2013). Antud uuringus oli näha, et *Glomeraceae* ja *Acaulosporaceae* suhteline arvukus suurenes üleujutuse ajal. *Acaulosporaceae* on stressitaluv AM seente sugukond (Chagnon *et al.*, 2013) ja RDA analüüs näitas, et *Acaulosporaceae* sugukond eelistas kõrgema mullaniiskusega elukeskkonda.

Magistritöö tulemused näitavad, et lühiajaline üleujutus mõjutas mullaniiskust ja mullas toimuvaid mikroobseid protsesse. Interpolatsiooni tulemused näitasid, et üleujutatud alal tekkisid punktid, mis sidusid ja emiteerisid N₂O ning CH₄. Lisaks üleujutusele võib üleujutatud ala reljeefil olla oluline mõju mikroobikooslustele. Uurimistöö tulemustest oli näha, et seened ja AM seened olid üleujutuse mõjule vastupidavamad kui bakterid. Üleujutuse kestusel oli mõju mikroorganismide kooslustele.

Kokkuvõte

Globaalse soojenemisega kaasneb intensiivsete sademete sagenemine, millega võib kaasneda üleujutuste suurenemine kaldaäärsetes piirkondades. Üleujutused mõjutavad oluliselt organismide elukeskkonda ning selle tagajärjel võivad muutuda süsiniku ja lämmastikuringe protsessid mullas (Schindler *et al.*, 2020). Süsinikuringes seovad mikroorganismid atmosfäärist CO₂ või emiteerivad seda hingamise ja lagunemise käigus. CH₄ emissioon sõltub samuti mulla mikroorganismidest, metanogeenide ja metanotroofide vahekorras. Lämmastikuringes on mikroorganismidel oluline roll N₂O emissioonides või N₂ sidumises. Üleujutused mõjutavad mulla bakterite ja seente kooslusi, mis mõjutavad mikroobsed protsesse ja KHG vooge.

Uurimistöo eesmärgiks oli hinnata lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioomile ja mulla süsiniku- ja lämmastikuringele. Mullaproovid koguti 2017. a juulist novembrini ja 2018. a augustis Agali proovialalt. Mikroorganismide mitmekesisust hinnati Shannon–Weaveri mitmekesisuse indeksiga ja muutuste olulisuse tuvastamiseks kasutati Wilcoxon testi. Bakterite ja seente mitmekesisuse ning keskkonnaparameetrite ja KHG emissioonide vahelisi seoseid hinnati Spearmani korrelatsioonikoefitsiendiga. Spearmani korrelatsioonikoefitsienti kasutati lisaks metanotroofia, NO₃⁻ reduktsiooni, denitrifikatsiooni ja N₂ fikseerimise protsesside ning keskkonnaparameetrite ja mitmekesisuste vaheliste seoste leidmiseks. Mikroorganismide perekondade ning keskkonnaparameetrite ja KHG emissioonide vaheliste seoste hindamiseks kasutati RDA analüüsi. Prooviala ruumiliste trendide tuvastamiseks EXP perioodil kasutati IDW interpoleerimismeetodit.

Magistritöö tulemused näitasid, et üleujutus mõjutas mulla mikroorganismide kooslusi ja peamiselt perekonna tasemel. Leiti, et üleujutusel oli statistiliselt oluline positiivne mõju bakterite mitmekesisusele. Positiivne mõju võis tuleneda üleujutuse lühiajalisusest, sest varasemalt on näidatud, et pikematel üleujutustel mõju bakterite mitmekesisusele puudub või on mõju pigem negatiivne. Sarnaselt teistele uuringutele olid üldseente ja AM seente kooslused üleujutusele vastupidavamad ning statistiliselt olulisi muutusi mitmekesisuses ei täheldatud.

Lepa võime moodustada sümbiootilisi suhteid bakterite ja AM seentega on oluline omadus, mis soodustab ellujäämist keeruliste elutingimustega keskkondades. Tulemused näitasid, et üleujutus mõjutas positiivselt lepaga sümbiootilisi suhteid loovate seente *Naucoria*, *Russula* ja *Tomentella* perekondadega ning *Thelephoraceae* sugukonnaga. Lisaks oli näha üleujutuse positiivset mõju N₂

fikseerijatele. Üleujutuse ajal langes mulla NO_3^- kontsentratsioon ja muutis keskkonna lämmastiku fikseerijatele, *Bradyrhizobium* ja *Frankia* perekondadesse kuuluvatele bakteritele sobivamaks. NO_3^- kontsentratsiooni langust on seostatud nitrifikatsiooni protsessi aeglustumisega ning ka antud uuring näitas enamasti nitrifikatsiooniga seotud *Nitrospira* ja *MND1* perekondade suhtelise arvukuse langust.

Prooviala oli üleujutuse ajal N_2O allikaks ja interpolatsiooni tulemused näitasid, et N_2O emissioonid olid suuremad üleujutatud ala kõikuva veetasemega punktides. Üleujutusega suurenesid denitrifikatsiooniga seotud *Bradyrhizobium* ja *Rhodanobacter* perekondade suhtelised arvukused. Lisaks suurenes üleujutusega ka üldseene *Peziza* perekonna arvukus, kes on seotud DRNA protsessiga. Varasemalt on aga näidatud, et seente N_2O tootmise aktiivsus on madalam kui bakteritel ning tulemused näitasid, et seente ja N_2O emissioonide vahel esines negatiivne suhe. Tulemustest võib järeldada, et kõikuva veetasemega punktides oli N_2O emissioon seotud pigem bakterite kooslustega kui seentega.

Veetaseme kiired muutused tekitasid üleujutatud alal punktid, mis tarbisid ja emiteerisid CH_4 . Kõikuva veetasemega alad on eelistatud elupaigaks n-damo protsessi läbiviivatele bakteritele ja nende arvukust võib mõjutada üleujutuse kestus. Magistritöö tulemused näitasid, et n-damo protsessiga seotud *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* sugukonna *Methyloirabilaceae* suhteline arvukus oli suurim üleujutatud ala punktis 1, kus interpolatsiooni tulemused näitasid suuremat metanotroofia ja NO_2 redutseerimise aktiivsust ning võrreldes kontrollalaga ka kõrgemat mullaniiskust. Kõrgem mullaniiskus mõjutas positiivselt ka *Geobacter* perekonda, kes esineb mullas koos metanogeenidega ja abistab CH_4 tootmisega.

Tulemustest võib järeldada, et lühiajaline üleujutus mõjutas mulla mikroorganismide kooslust ning süsiniku- ja lämmastikuringet, sealhulgas KHG vooge. Mulla mikroorganisme ja mikroobseid protsesse mõjutas lisaks üleujutusele prooviala maapind ning üleujutuse pulseeriv iseloom ja kestus.

Microbial community response to short-term flooding in a riparian forest

Kristel Reiss

Summary

Human activity has affected the world's climate now more than ever before which had resulted an increased in concentrations of carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and nitrous oxide (N₂O) in the air. An increase in greenhouse gas emissions (GHG) have been related to extreme climate events. As a result of extreme climate events, intense rainfall has increased, with the risk of flooding in low-lying areas and riparian areas. Riparian ecosystems are diverse, dynamic areas that provide multiple ecological functions (Naiman *et al.*, 2010; Riis *et al.*, 2020). On the other side, they are known to be highly vulnerable to climate change (Capon *et al.*, 2013). Flooding affects the hydrological regime of the ecosystem and alters the biochemical processes that regulate GHG fluxes from the soil (Schindler *et al.*, 2020). Changes in the abundance of microorganisms and their community structure in soil are associated with changes in N₂O (Espenberg *et al.*, 2018) and CH₄ (Yang *et al.*, 2024) fluxes. It has been shown that the species richness of riparian areas will change significantly in the future with the increase of floods, but the exact extent and direction of the impact is unknown.

The aim of the master's thesis was to assess the impact of short-term flooding on the riparian forest soil microbiome and the soil carbon and nitrogen cycle. The experiment was carried out in the riparian alder forest and the sample area was divided into two plots: the control plot and the flooded plot. Soil samples were collected from July to November 2017 and in August 2018 from the Agal sample area. Microbial diversity was assessed with the Shannon–Weaver diversity index. The Wilcoxon test was used to determine the significance of changes in microbial diversity. Relationships between diversity, environmental parameters, GHG emissions and processes were evaluated with the Spearman correlation coefficient. RDA analysis was used to assess the relationships between microbial taxa, environmental parameters and GHG emissions. The Inverse Distance Weighting (IDW) interpolation method was used to find spatial patterns during the flooding experiment.

The research results showed that flooding affected the structures of soil microorganism communities at the family level. In contrast to previous studies, flooding was found to have a

statistically significant positive effect on bacterial diversity. The positive effect may have resulted from the short duration of the flood. It has been shown that longer floods don't have a significant effect or rather have a negative effect on bacterial diversity. Similar to other studies, communities of fungi and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were more resistant to flooding and no statistically significant changes in diversity were observed.

The results showed that flooding had a positive effect on N₂-fixing microorganism. During the flood, the soil NO₃⁻ concentration decreased, making the environment more suitable for N₂-fixing bacteria, *Bradyrhizobium* and *Frankia*. The decrease in NO₃⁻ concentration in the soil has been associated with the slowing down of the nitrification process. In addition to nitrification, N₂O can also be emitted during the denitrification or DRNA process. Flooding had a positive effect on *Bradyrhizobium* and *Rhodanobacter* associated with denitrification and to genus *Peziza*, a fungus associated with the DRNA process. The correlation analysis showed that fungal diversity was negatively related to N₂O emissions. Also it has been shown that the N₂O production activity of fungi is lower than of bacteria. It can be assumed that the N₂O emissions were most likely related to bacterial communities.

Rapid changes in soil water content created spots in the flooded area that consumed and emitted CH₄. Areas with fluctuating water levels are preferred habitats for bacteria undergoing the n-damo process, and their abundance might be affected by the duration of the flood. The results of the master's thesis showed that the relative abundance of *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* family *Methyloirabilaceae* related to the n-damo process was the highest in the flooded area at point 1 which had a higher soil moisture than the control area. Point 1 also had the highest methanotrophic and NO₂ reduction activity. Master thesis results are consistent with previous studies showing that bacteria carrying out the n-damo process prefer anaerobic conditions and their abundance increases with flooding. Higher soil moisture also had a positive effect on the *Geobacter*, which can be found in the soil together with methanogens. Studies have shown that *Geobacter* can help methanogens with CH₄ production.

It can be concluded from the results that the short-term flooding affected the structures of the soil microorganism community and soil emissions, but the changes were mostly not statistically significant. In addition to the flood, the soil microorganisms and processes were affected by the surface of the sample area, the pulsating nature and the duration of the flood.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajaid Mikk Espenbergi ja Ülo Mandrit, kes aitasid mind teema valikuga ja pühendasid aega minu töö juhendamiseks. Samuti soovin tänada ka teisi „Short term flooding increases CH₄ and N₂O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum“ (2020) artikli autoreid Thomas Schindlerit, Katerina Machacovat, Dmitrii Krasnovi, Jordi Escuer-Gatiust, Gert Veberit, Jaan Pärna ja Kaido Soosaart, kelle kogutuid andmeid kasutasin magistritöös. Lisaks soovin tänada Kärt Kangerit, Siim-Kaarel Seppa ja Maarja Öpikut. Kärt Kanger abistas mullaproovide kogumise ja laboritöödega. Siim-Kaarel Sepp pani kokku AM seente ja bakterite OTU tabelid. Maarja Öpik nõustas seente alal ja tegeles sekveneerimisandmete produtseerimisega. Suured tänud ka Ain Kullile interpoleerimisnõuannete eest.

Suurimad tänud minu perekonnale ja sõpradele, kes toetasid ja motiveerisid mind edasi töötama.

Kasutatud kirjandus

- Allen, E. B., Allen, M. F., Helm, D. J., Trappe, J. M., Molina, R., & Rincon, E. (1995). Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, *170*, 47–62.
- Bahram, M., Espenberg, M., Pärn, J., Lehtovirta-Morley, L., Anslan, S., Kasak, K., Kõljalg, U., Liira, J., Maddison, M., Moora, M., & others. (2022). Structure and function of the soil microbiome underlying N₂O emissions from global wetlands. *Nature communications*, *13*(1), 1430.
- Bardgett, R. D., Freeman, C., & Ostle, N. J. (2008). Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *The ISME journal*, *2*(8), 805–814.
- Barnett, D. (i.a). *Fixing your tax_table*. <https://github.com/david-barnett/microViz/blob/HEAD/vignettes/web-only/tax-fixing.Rmd>
- Baskerville, M., Bazrgar, A., Reddy, N., Oforu, E., Thevathasan, N., Gordon, A. M., & Oelbermann, M. (2021). *Greenhouse gas emissions from riparian zones are related to vegetation type and environmental factors*. Wiley Online Library.
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, *98*(6), 236–238.
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*, *98*(3), 426–438.
- Bonan, G. B. (2008). Forests and climate change: Forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *science*, *320*(5882), 1444–1449.
- Bond-Lamberty, B., Bailey, V. L., Chen, M., Gough, C. M., & Vargas, R. (2018). Globally rising soil heterotrophic respiration over recent decades. *Nature*, *560*(7716), 80–83.
- Breshears, D. D., & Allen, C. D. (2002). The importance of rapid, disturbance-induced losses in carbon management and sequestration. *Global Ecology and Biogeography*, *11*(1), 1–5.
- Caldwell, S. L., Laidler, J. R., Brewer, E. A., Eberly, J. O., Sandborgh, S. C., & Colwell, F. S. (2008). Anaerobic oxidation of methane: Mechanisms, bioenergetics, and the ecology of associated microorganisms. *Environmental science & technology*, *42*(18), 6791–6799.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *science*, *330*(6001), 192–196.
- Cao, J., Lin, T.-C., Yang, Z., Zheng, Y., Xie, L., Xiong, D., & Yang, Y. (2020). Warming exerts a stronger effect than nitrogen addition on the soil arbuscular mycorrhizal fungal

- community in a young subtropical *Cunninghamia lanceolata* plantation. *Geoderma*, 367, 114273.
- Capon, S. J., Chambers, L. E., Mac Nally, R., Naiman, R. J., Davies, P., Marshall, N., Pittock, J., Reid, M., Capon, T., Douglas, M., & others. (2013). Riparian ecosystems in the 21st century: Hotspots for climate change adaptation? *Ecosystems*, 16, 359–381.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(supplement_1), 4516–4522.
- Chagnon, P.-L., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in plant science*, 18(9), 484–491.
- Cheng, Y.-Y., Jin, Z.-J., Wang, X.-T., Jia, Y.-H., Yuan, W., & Zhou, J.-B. (2020). Effect of land-use on soil fungal community structure and associated functional group in Huixian Karst wetland. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*, 41(9), 4294–4304.
- Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., & Niklińska, M. (2015). Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Annals of microbiology*, 65, 1627–1637.
- Chowdhury, T. R., & Dick, R. P. (2013). Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Applied soil ecology*, 65, 8–22.
- Clerici, N., Weissteiner, C. J., Paracchini, M. L., Boschetti, L., Baraldi, A., & Strobl, P. (2013). Pan-European distribution modelling of stream riparian zones based on multi-source Earth Observation data. *Ecological indicators*, 24, 211–223.
- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A., & Totterdell, I. J. (2000). Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408(6809), 184–187.
- Crowther, T. W., Todd-Brown, K. E., Rowe, C. W., Wieder, W. R., Carey, J. C., Machmuller, M. B., Snoek, B., Fang, S., Zhou, G., Allison, S. D., & others. (2016). Quantifying global soil carbon losses in response to warming. *Nature*, 540(7631), 104–108.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., & others. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.

- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., & Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC genomics*, *17*(1), 1–20.
- Dedysh, S. N. (2019). Bryobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1k 1–5). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01667>
- Dedysh, S. N., Kulichevskaya, I. S., Huber, K. J., & Overmann, J. (2017). Defining the taxonomic status of described subdivision 3 Acidobacteria: Proposal of Bryobacteraceae fam. Nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(2), 498–501.
- Dedysh, S. N., & Yilmaz, P. (2018). Refining the taxonomic structure of the phylum Acidobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *68*(12), 3796–3806.
- Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hocher, V., & Svistoonoff, S. (2020). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, *12*(10), 370.
- Ding, L., Zhou, J., Li, Q., Tang, J., & Chen, X. (2022). Effects of land-use type and flooding on the soil microbial community and functional genes in reservoir riparian zones. *Microbial ecology*, *83*(2), 393–407.
- Dumbrell, A. J., Ashton, P. D., Aziz, N., Feng, G., Nelson, M., Dytham, C., Fitter, A. H., & Helgason, T. (2011). Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *New Phytologist*, *190*(3), 794–804.
- Eichorst, S. A., & Kuske, C. R. (2012). Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Applied and environmental microbiology*, *78*(7), 2316–2327.
- Espenberg, M., Pille, K., Yang, B., Maddison, M., Abdalla, M., Smith, P., Li, X., Chan, P.-L., & Mander, Ü. (2024). Towards an integrated view on microbial CH₄, N₂O and N₂ cycles in brackish coastal marsh soils: A comparative analysis of two sites. *Science of the Total Environment*, 170641.
- 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), 4742.

- esri. (i.aa). *Compare Geostatistical Layers (Geostatistical Analyst)*. Vaadatud 26.05.2024, <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/3.1/tool-reference/geostatistical-analyst/compare-geostatistical-layers.htm>
- esri. (i.ab). *How Kriging works*. Vaadatud 26.05.2024, <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/3.1/tool-reference/3d-analyst/how-kriging-works.htm>
- esri. (i.ac). *How Spline works*. Vaadatud 26.05.2024, <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/latest/tool-reference/3d-analyst/how-spline-works.htm>
- esri. (i.ad). *IDW (Geostatistical Analyst)*. Vaadatud 26.05.2024, <https://pro.arcgis.com/en/pro-app/latest/tool-reference/geostatistical-analyst/idw.htm>
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., & others. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, *464*(7288), 543–548.
- Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., & others. (2000). The global carbon cycle: A test of our knowledge of earth as a system. *science*, *290*(5490), 291–296.
- Farnelid, H., Andersson, A. F., Bertilsson, S., Al-Soud, W. A., Hansen, L. H., Sørensen, S., Steward, G. F., Hagström, Å., & Riemann, L. (2011). Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS one*, *6*(4), e19223.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., & others. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1621), 20130164.
- Fricke, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of advanced research*, *19*, 105–112.
- Fuller, E., Germaine, K. J., & Rathore, D. S. (2023). The Good, the Bad, and the Useable Microbes within the Common Alder (*Alnus glutinosa*) Microbiome—Potential Bio-Agents to Combat Alder Dieback. *Microorganisms*, *11*(9), 2187.
- Garssen, A. G., Baattrup-Pedersen, A., Voeselek, L. A., Verhoeven, J. T., & Soons, M. B. (2015). Riparian plant community responses to increased flooding: A meta-analysis. *Global Change Biology*, *21*(8), 2881–2890.

- Gios, E., Audet, J., Burns, R., Butterbach-Bahl, K., Espenberg, M., Fritz, C., Jurasinski, G., Larmola, T., Mander, Ü., Nielsen, C., Rodriguez, A., Zak, D., & M. Silvennoinen, H. (2024). *Unravelling biogeochemical processes in restored peatlands by molecular biology*.
- Gower, S. T. (2003). Patterns and mechanisms of the forest carbon cycle. *Annual Review of Environment and Resources*, 28(1), 169–204.
- Graf, D. R., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PloS one*, 9(12), e114118.
- Gui, H., Gao, Y., Wang, Z., Shi, L., Yan, K., & Xu, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi potentially regulate N₂O emissions from agricultural soils via altered expression of denitrification genes. *Science of the Total Environment*, 774, 145133.
- Guo, J., Feng, H., Peng, C., Chen, H., Xu, X., Ma, X., Li, L., Kneeshaw, D., Ruan, H., Yang, H., & others. (2023). Global climate change increases terrestrial soil CH₄ emissions. *Global Biogeochemical Cycles*, 37(1), e2021GB007255.
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1081–1084.
- Harrell Jr, F. E. (2019). Package ‘hmisc’. *CRAN2018, 2019*, 235–236.
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33–45.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M., & Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental microbiology*, 9(9), 2364–2374.
- Hefting, M., Clement, J.-C., Dowrick, D., Cosandey, A.-C., Bernal, S., Cimpian, C., Tatur, A., Burt, T., & Pinay, G. (2004). Water table elevation controls on soil nitrogen cycling in riparian wetlands along a European climatic gradient. *Biogeochemistry*, 67(1), 113–134.
- Hinrichs, K.-U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G., & DeLong, E. F. (1999). Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, 398(6730), 802–805.
- Hiorns, W. D., Hastings, R. C., Head, I. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R., Pickup, R. W., & Hall, G. H. (1995). Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-

- oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiology*, 141(11), 2793–2800.
- Holmes, D. E., Shrestha, P. M., Walker, D. J., Dang, Y., Nevin, K. P., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2017). Metatranscriptomic evidence for direct interspecies electron transfer between *Geobacter* and *Methanotrix* species in methanogenic rice paddy soils. *Applied and environmental microbiology*, 83(9), e00223-17.
- Hoorman, J. J. (2011). The role of soil bacteria. *Ohio State University Extension, Columbus*, 1–4.
- Huaisong, W., Rui, G., Yibo, T., Nan, C., Xinxin, W., Lei, W., Zhongbao, Y., Shuying, L., Jixun, G., Lianxuan, S., & others. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce ammonia emissions under different land-use types in agro-pastoral areas. *Pedosphere*, 34(2), 497–507.
- Huber, K. J., & Overmann, J. (2018). Vicinamibacteraceae fam. Nov., the first described family within the subdivision 6 Acidobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(7), 2331–2334.
- Husson, F., Josse, J., Husson, M. F., & FactoMineR, I. (2023). Package ‘missMDA’. *gene*, 9, 1.
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & others. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS microbiology ecology*, 82(3), 666–677.
- Islam, W., Noman, A., Naveed, H., Huang, Z., & Chen, H. Y. (2020). Role of environmental factors in shaping the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 41225–41247.
- Ivanova, A., & Dedysh, S. (2023). Phylogenetic Diversity of Verrucomicrobiota in Fens of Northern Russia. *Microbiology*, 92(Suppl 1), S7–S11.
- Jacinthe, P. (2015). Carbon dioxide and methane fluxes in variably-flooded riparian forests. *Geoderma*, 241, 41–50.
- Jacinthe, P., Bills, J., Tedesco, L., & Barr, R. (2012). Nitrous oxide emission from riparian buffers in relation to vegetation and flood frequency. *Journal of Environmental Quality*, 41(1), 95–105.
- Jansa, J., & Treseder, K. K. (2017). Introduction: Mycorrhizas and the carbon cycle. *Mycorrhizal mediation of soil* (1k 343–355). Elsevier.

- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 35–46.
- Janzen, H. (2004). Carbon cycling in earth systems—A soil science perspective. *Agriculture, ecosystems & environment*, *104*(3), 399–417.
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., & Zhang, H. (2015). Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *20*, 643–651.
- Kaiser, K., Wemheuer, B., Korolkow, V., Wemheuer, F., Nacke, H., Schöning, I., Schrumpf, M., & Daniel, R. (2016). Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Scientific Reports*, *6*(1), 33696.
- Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1346.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L.-I., McDonald, D., & others. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 410–422.
- Knittel, K., & Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: Progress with an unknown process. *Annual review of microbiology*, *63*, 311–334.
- Kobayashi, M., Matsuo, Y., Takimoto, A., Suzuki, S., Maruo, F., & Shoun, H. (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(27), 16263–16267.
- Koepfel, A. F., & Wu, M. (2013). Surprisingly extensive mixed phylogenetic and ecological signals among bacterial Operational Taxonomic Units. *Nucleic acids research*, *41*(10), 5175–5188.
- Kohout, P., Sudová, R., Janoušková, M., Čtvrtlíková, M., Hejda, M., Pánková, H., Slavíková, R., Štajerová, K., Vosátka, M., & Sýkorová, Z. (2014). Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry*, *68*, 482–493.
- Kolb, S., Knief, C., Dunfield, P. F., & Conrad, R. (2005). Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils. *Environmental Microbiology*, *7*(8), 1150–1161.

- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391.
- Kozłowski, T. T. (2002). Physiological-ecological impacts of flooding on riparian forest ecosystems. *Wetlands*, 22(3), 550–561.
- Krivoruchko, K. (2012). Empirical Bayesian Kriging. *ArcUser Fall*, 6(10), 1145.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., & others. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2–3), 95–125.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276.
- Köljalg, U., Nilsson, H. R., Schigel, D., Tedersoo, L., Larsson, K.-H., May, T. W., Taylor, A. F., Jeppesen, T. S., Frøslev, T. G., Lindahl, B. D., & others. (2020). The taxon hypothesis paradigm—On the unambiguous detection and communication of taxa. *Microorganisms*, 8(12), 1910.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C. A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R. I., Mellado-Vázquez, P. G., Malik, A. A., Roy, J., Scheu, S., & others. (2015). Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature communications*, 6(1), 6707.
- Laughlin, R. J., & Stevens, R. J. (2002). Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Science Society of America Journal*, 66(5), 1540–1548.
- Le Mer, J., & Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European journal of soil biology*, 37(1), 25–50.
- Leal, P. L., Siqueira, J. O., & Stuermer, S. L. (2013). Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community. *Applied Soil Ecology*, 71, 72–80.
- Lechevalier, M. P. (1994). Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1), 1–8.
- Lee, B.-I., Kang, H., Kim, H., Joung, Y., & Joh, K. (2014). *Ferruginibacter yonginensis* sp. Nov., isolated from a mesotrophic artificial lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_3), 846–850.

- Lee, H., Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barret, K., & others. (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report, Summary for Policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.*
- Lee, J., Lee, S., & Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology ecology*, 65(2), 339–349.
- Li, J., Pei, J., Fang, C., Li, B., & Nie, M. (2023). Opposing seasonal temperature dependencies of CO₂ and CH₄ emissions from wetlands. *Global Change Biology*, 29(4), 1133–1143.
- Li, T., & Zhou, Q. (2020). The key role of *Geobacter* in regulating emissions and biogeochemical cycling of soil-derived greenhouse gases. *Environmental Pollution*, 266, 115135.
- Lin, L., Wang, F., & Cao, W. (2022). *Nitrate-dependent anaerobic methane oxidation in subtropical mangrove soils and the environmental and ecological implication.*
- Liu, H., Chen, Z., Guan, Y., & Xu, S. (2018). Role and application of iron in water treatment for nitrogen removal: A review. *Chemosphere*, 204, 51–62.
- Lladó Fernández, S., Větrovský, T., & Baldrian, P. (2019). The concept of operational taxonomic units revisited: Genomes of bacteria that are regarded as closely related are often highly dissimilar. *Folia microbiologica*, 64, 19–23.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017). Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2), e00063-16.
- Lopez, O. (2001). Seed flotation and postflooding germination in tropical terra firme and seasonally flooded forest species. *Functional Ecology*, 763–771.
- Lovelock, C. E., Andersen, K., & Morton, J. B. (2003). Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, 135, 268–279.
- Lv, Y., Gao, Z., Xia, F., Chen, M., & Qiu, L. (2017). *Puia dinghuensis* gen. Nov., sp. Nov., isolated from monsoon evergreen broad-leaved forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4639–4645.

- Lyu, C., Li, X., Yuan, P., Song, Y., Gao, H., Liu, X., Liu, R., & Yu, H. (2021). Nitrogen retention effect of riparian zones in agricultural areas: A meta-analysis. *Journal of Cleaner Production*, 315, 128143.
- Maa-ameti kodulehekülg. (2020). *Kõrgusandmed*. Geoportaal. Vaadatud 26.05.2024, <https://geoportaal.maaamet.ee/est/Ruumiandmed/Korgusandmed/Laadi-korgusandmed-alla-p614.html>
- Maa-ameti kodulehekülg. (2023a). *1:400 000 geoloogilised kaardid*. Geoportaal. Vaadatud 26.05.2024, <https://xgis.maaamet.ee/xgis2/page/app/geoloogia400k>
- Maa-ameti kodulehekülg. (2023b). *Mullakaart*. Geoportaal. Vaadatud 26.05.2024, <https://xgis.maaamet.ee/xgis2/page/app/mullakaart>
- Mander, Ü., Kuusemets, V., Lõhmus, K., & Muring, T. (1997). Efficiency and dimensioning of riparian buffer zones in agricultural catchments. *Ecological Engineering*, 8(4), 299–324.
- Mania, D., Heylen, K., van Spanning, R. J., & Frostegård, Å. (2014). The nitrate-ammonifying and nosZ-carrying bacterium *Bacillus acillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxide under high nitrate conditions. *Environmental microbiology*, 16(10), 3196–3210.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10–12.
- Mayer, P. M., Reynolds Jr, S. K., McCutchen, M. D., & Canfield, T. J. (2007). Meta-analysis of nitrogen removal in riparian buffers. *Journal of environmental quality*, 36(4), 1172–1180.
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(11).
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2024). Package ‘phyloseq’. <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/manuals/phyloseq/man/phyloseq.pdf>
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). Nitrogen. *Principles of plant nutrition*, 397–434.
- Moreau, P.-A. (2005). A nomenclatural revision of the genus *Alnicola* (Cortinariaceae). *Fungal diversity*, 20, 121–155.

- Morris, R., Schauer-Gimenez, A., Bhattad, U., Kearney, C., Struble, C. A., Zitomer, D., & Maki, J. S. (2014). Methyl coenzyme M reductase (*mcrA*) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H₂/CO₂-enriched anaerobic biomass. *Microbial biotechnology*, 7(1), 77–84.
- Mothapo, N., Chen, H., Cubeta, M. A., Grossman, J. M., Fuller, F., & Shi, W. (2015). Phylogenetic, taxonomic and functional diversity of fungal denitrifiers and associated N₂O production efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 160–175.
- Nabuurs, G.-J., Thürig, E., Heidema, N., Armolaitis, K., Biber, P., Cienciala, E., Kaufmann, E., Mäkipää, R., Nilsen, P., Petritsch, R., & others. (2008). Hotspots of the European forests carbon cycle. *Forest Ecology and Management*, 256(3), 194–200.
- Naiman, R. J., Decamps, H., & McClain, M. E. (2010). *Riparia: Ecology, conservation, and management of streamside communities*. Elsevier.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O’Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., & others. (2022). *vegan: Community Ecology Package (Version R package version 2.6-4)[Computer software]*.
- Ozimek, E., & Hanaka, A. (2020). Mortierella species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. *Agriculture*, 11(1), 7.
- Petersen, C. R., Jovanovic, N., & Grenfell, M. (2020). The effectiveness of riparian zones in mitigating water quality impacts in an agriculturally dominated river system in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, 45(3), 336–349.
- Prosser, J. I., Head, I. M., & Stein, L. Y. (2014). The family nitrosomonadaceae. *The prokaryotes: Alphaproteobacteria and betaproteobacteria* (1k 901–918). Springer Berlin/Heidelberg.
- Pärn, J., Verhoeven, J. T., Butterbach-Bahl, K., Dise, N. B., Ullah, S., Aasa, A., Egorov, S., Espenberg, M., Järveoja, J., Jauhiainen, J., & others. (2018). Nitrogen-rich organic soils under warm well-drained conditions are global nitrous oxide emission hotspots. *Nature communications*, 9(1), 1–8.
- Read, D. J., Leake, J. R., & Perez-Moreno, J. (2004). Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1243–1263.

- Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2011). Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 42, 489–512.
- Reiss, K. (2021). *Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioloogilisele lämmastikuringele kaldaäärses lepikus*. Tartu Ülikool.
- Riis, T., Kelly-Quinn, M., Aguiar, F. C., Manolaki, P., Bruno, D., Bejarano, M. D., Clerici, N., Fernandes, M. R., Franco, J. C., Pettit, N., & others. (2020). Global overview of ecosystem services provided by riparian vegetation. *BioScience*, 70(6), 501–514.
- Roy, S., Khasa, D. P., & Greer, C. W. (2007). Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Botany*, 85(3), 237–251.
- Saeki, Y., Nakamura, M., Mason, M. L. T., Yano, T., Shiro, S., Sameshima-Saito, R., Itakura, M., Minamisawa, K., & Yamamoto, A. (2017). Effect of flooding and the nosZ gene in bradyrhizobia on bradyrhizobial community structure in the soil. *Microbes and environments*, 32(2), 154–163.
- Saini, R., Kapoor, R., Kumar, R., Siddiqi, T., & Kumar, A. (2011). CO₂ utilizing microbes—A comprehensive review. *Biotechnology advances*, 29(6), 949–960.
- Samad, M. S., Biswas, A., Bakken, L. R., Clough, T. J., de Klein, C. A., Richards, K. G., Lanigan, G. J., & Morales, S. E. (2016). Phylogenetic and functional potential links pH and N₂O emissions in pasture soils. *Scientific Reports*, 6(1), 35990.
- Schade, Jd., Fisher, S., Grimm, N., & Seddon, J. (2001). The influence of a riparian shrub on nitrogen cycling in a Sonoran Desert stream. *Ecology*, 82(12), 3363–3376.
- Schimel, J. P., & Schaeffer, S. M. (2012). Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in microbiology*, 3, 348.
- Schindler, T., Mander, Ü., Machacova, K., Espenberg, M., Krasnov, D., Escuer-Gatius, J., Veber, G., Pärn, J., & Soosaar, K. (2020). Short-term flooding increases CH₄ and N₂O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum. *Scientific reports*, 10(1), 3204.
- Schmidt, T. S., Matias Rodrigues, J. F., & von Mering, C. (2014). Ecological consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003594.

- Schwob, G., Roy, M., Manzi, S., Pommier, T., & Fernandez, M. (2017). Green alder (*Alnus viridis*) encroachment shapes microbial communities in subalpine soils and impacts its bacterial or fungal symbionts differently. *Environmental Microbiology*, *19*(8), 3235–3250.
- Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. *FEMS Microbiology Letters*, *342*(2), 179–186.
- Shen, R., Lan, Z., Rinklebe, J., Nie, M., Hu, Q., Yan, Z., Fang, C., Jin, B., & Chen, J. (2021). Flooding variations affect soil bacterial communities at the spatial and inter-annual scales. *Science of the Total Environment*, *759*, 143471.
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., & Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, *94*(3), 277–281.
- Shukla, P. R., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H. O., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., Van Diemen, R., & others. (2019). *IPCC, 2019: Climate Change and Land: An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.
- Singh, A. (2022, veebruar 8). *Basic Microbiology Techniques* [MICROBIOLOGY, SCIENCE]. <https://conductscience.com/microbiology-techniques/>
- Singh, P., & Verma, V. (2019). A comparative study of spatial interpolation technique (IDW and Kriging) for determining groundwater quality. *GIS and geostatistical techniques for groundwater science*, 43–56.
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, *26*(3), R94–R98.
- Stein, L. Y., & Nicol, G. W. (2011). Nitrification. *eLS*, 1–9.
- Storer, K. E. (2013). *Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil greenhouse gas fluxes* [PhD Thesis]. University of York.
- Sutfin, N. A., Wohl, E. E., & Dwire, K. A. (2016). Banking carbon: A review of organic carbon storage and physical factors influencing retention in floodplains and riparian ecosystems. *Earth Surface Processes and Landforms*, *41*(1), 38–60.
- Zahran, H. H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, *63*(4), 968–989.

- Zhang, H., Zhang, M., Hou, X., Li, Y., Zhang, W., Wang, L., & Niu, L. (2023). Responses of bacterial community and N-cycling functions stability to different wetting-drying alternation frequencies in a riparian zone. *Environmental Research*, 228, 115778.
- Zhang, W., Kang, X., Kang, E., Audet, J., Davidson, T. A., Zhang, X., Yan, L., Li, Y., Yan, Z., Zhang, K., & others. (2022). Soil water content, carbon, and nitrogen determine the abundances of methanogens, methanotrophs, and methane emission in the Zoige alpine wetland. *Journal of Soils and Sediments*, 1–12.
- Zhu, T., Meng, T., Zhang, J., Zhong, W., Müller, C., & Cai, Z. (2015). Fungi-dominant heterotrophic nitrification in a subtropical forest soil of China. *Journal of Soils and Sediments*, 15, 705–709.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., & others. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *science*, 346(6213), 1256688.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2, 1–12.
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1).
- Tolkkinen, M. J., Heino, J., Ahonen, S. H., Lehosmaa, K., & Mykrä, H. (2020). Streams and riparian forests depend on each other: A review with a special focus on microbes. *Forest Ecology and Management*, 462, 117962.
- Unger, I. M., Kennedy, A. C., & Muzika, R.-M. (2009). Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 1–8.
- Vahter, T., Sepp, S.-K., Astover, A., Helm, A., Kikas, T., Liu, S., Oja, J., Öpik, M., Penu, P., Vasar, M., & others. (2022). Landscapes, management practices and their interactions shape soil fungal diversity in arable fields—Evidence from a nationwide farmers’ network. *Soil Biology and Biochemistry*, 168, 108652.
- Van Den Heuvel, R., Van Der Biezen, E., Jetten, M., Hefting, M., & Kartal, B. (2010). Denitrification at pH 4 by a soil-derived Rhodanobacter-dominated community. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3264–3271.

- van Der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New phytologist*, *205*(4), 1406–1423.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, *30*(9), 418–426.
- Van Elsas, J., & Boersma, F. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology*, *47*(2), 77–87.
- Van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M. S., & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, *528*(7583), 555–559.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, *44*(5), 619–626.
- Wang, B., & Qiu, Y.-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, *16*, 299–363.
- Wang, J., Wang, D., & Wang, B. (2019). Soil bacterial diversity and its determinants in the riparian zone of the Lijiang River, China. *Current Science*, *117*(8), 1324–1332.
- Wang, X.-B., Azarbad, H., Leclerc, L., Dozois, J., Mukula, E., & Yergeau, É. (2022). A drying-Rewetting cycle imposes more important shifts on soil microbial communities than does reduced precipitation. *Msystems*, *7*(4), e00247-22.
- Wang, Y., Huang, P., Ye, F., Jiang, Y., Song, L., Op den Camp, H. J., Zhu, G., & Wu, S. (2016). Nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria along the water level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*, 1977–1986.
- Wang, Y., Huang, Y., Qiu, Q., Xin, G., Yang, Z., & Shi, S. (2011). Flooding greatly affects the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi communities in the roots of wetland plants. *PLoS one*, *6*(9), e24512.
- Wang, Y., Li, T., Li, Y., Qiu, Q., Li, S., & Xin, G. (2015). Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in four semi-mangrove plant communities. *Annals of Microbiology*, *65*, 603–610.
- Wang, Y., Li, Y., Bao, X., Björn, L. O., Li, S., & Olsson, P. A. (2016). Response differences of arbuscular mycorrhizal fungi communities in the roots of an aquatic and a semiaquatic species to various flooding regimes. *Plant and Soil*, *403*, 361–373.

- Waring, R. H., & Schlesinger, W. (1985). Forest ecosystems. *Analysis at multiples scales*, 55.
- Welsh, A., Chee-Sanford, J. C., Connor, L. M., Löffler, F. E., & Sanford, R. A. (2014). Refined NrfA phylogeny improves PCR-based nrfA gene detection. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), 2110–2119.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., & others. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315–322.
- Willis, A., Rodrigues, B., & Harris, P. J. (2013). The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(1), 1–20.
- Xia, Y., & Sun, J. (2023). Alpha Diversity. *Bioinformatic and Statistical Analysis of Microbiome Data: From Raw Sequences to Advanced Modeling with QIIME 2 and R* (1k 289–333). Springer.
- Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M., & Mochizuki, T. (2013). Aerenchyma formation in crop species: A review. *Field Crops Research*, 152, 8–16.
- Yan, B., Jiang, L., Zhou, H., Atakpa, E. O., Bo, K., Li, P., Xie, Q., Li, Y., & Zhang, C. (2023). Performance and microbial community analysis of combined bioreactors in treating high-salinity hydraulic fracturing flowback and produced water. *Bioresource Technology*, 386, 129469.
- Yang, R., Ji, M., Zhang, X., He, F., Yu, Z., Zeng, J., & Zhao, D. (2024). Methane emissions and microbial communities under differing flooding conditions and seasons in littoral wetlands of urban lake. *Environmental Research*, 118390.
- Yu, Y., Wang, H., Liu, J., Wang, Q., Shen, T., Guo, W., & Wang, R. (2012). Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary. *European Journal of Soil Biology*, 49, 12–21.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristel Reiss,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobiomile kaldaäärses lepikus“, mille juhendajateks on Mikk Espenberg ja Ülo Mander, 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 Commonsi 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.

Kristel Reiss

27.05.2024