

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Ökoloogia ja maateaduste instituut
Geograafia osakond

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias (12 EAP)

**Nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsiooniprotsesside muutused erineva
arbuskulaar-mükoriisete seente mitmekesisusega põllumuldades**

Monika Stjuf

Juhendajad: Mikk Espenberg, PhD

Maarja Öpik, PhD

Tartu 2025

Annotatsioon

Nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsiooniprotsesside muutused erineva arbuskulaar-mükoriisete seente mitmekesisusega põllumuldades

Nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon on lämmastikuringe olulised protsessid, mida viivad läbi mikroorganismid. Laialt levinud arbuskulaarmükoriisne (AM) sümbioos suurendab taimede toitainete kättesaadavust. Bakalaureusetöö eesmärgiks oli määrata denitrifikatsiooni ja nitrifikatsiooni läbi viivate geenide ohtruste muutused erineva AM seente mitmekesisusega põllumuldades. Viidi läbi potikatse kasvuhooes, mis hõlmas nelja mullatöötlust kolme AM seente mitmekesisuse tasemega (kõrge, keskmine ja madal); neljas oli mittemükoriisne kontroll. Tulemused näitasid bakterite ja arhede olemasolu ja markergeenide tuvastamist suurema geenikoopiate arvukusega kõrge mikroorganismide tasemega töötluses (bakterite 16S rRNA, COMAMMOX *amoA*, *nirK*, *nosZII* ja bakterite *amoA*, arhede *amoA*), ning madala tasemega töötluses (16S rRNA, *nirS*, *nosZI* ja seente *nirK*). COMAMMOX *amoA* nitrifikatsiooniprotsessis osalevas geenis leiti madalaim geenikoopiate arvukus (6,4 GK/gKA), suurim *nosZII* puhul.

Märksõnad: lämmastikuringe, põllumuld, arbuskulaarne mükoriisa

CERCS kood: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll; P510 – Füüsiline geograafia, geomorfoloogia, mullateadus, kartograafia, klimatoloogia; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Abstract

Changes in nitrification and denitrification processes in agricultural soils with different arbuscular mycorrhizal fungal diversity

Nitrification and denitrification are essential elements of the nitrogen cycle which is performed by microorganisms. The widespread arbuscular mycorrhiza symbiosis increases nutrient uptake availability in plants. The bachelor's thesis aimed to assess the changes in denitrification and nitrification genes in agricultural soils with different AM fungal diversity. The experiment included 4 types of soil treatments with 3 levels of microorganism diversity (high, medium and low). The results showed the presence of bacterial and archaeal microorganisms. Functional genes with higher gene copy numbers were found in the high-microorganism treatment (bacterial 16S rRNA, COMAMMOX *amoA*, *nirK*, *nosZII* and AOB, AOA), as well as in the low-microorganisms treatment (16S rRNA, *nirS*, *nosZI* and fungal *nirK*). The COMAMMOX *amoA* had the lowest gene copy number whereas the highest value was observed for the *nosZII* clade gene.

Keywords: nitrogen cycle, arable soils, arbuscular mycorrhiza

CERCS code: T270 Environmental technology, pollution control; P510 – Physical geography, geomorphology, pedology, cartography, climatology; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord	3
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.2 Põllumuldade olulisus	5
1.2 Prokarüoodid	5
1.3 Seened	6
1.4 Lämmastikuringe põllumaadel	7
1.4.1 Nitrifikatsioon	7
1.4.2 Prokarüootne denitrifikatsioon	9
1.4.3 Seente denitrifikatsioon	10
1.5 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)	10
2. Metoodika	11
2.1 Katse ülesehitus ja kirjeldus	11
2.2 DNA kontsentratsiooni mõõtmine	14
2.3 Geenikoopiate arvukuse määramine qPCR meetodil	14
2.4 Andmeanalüüs ja autori osalus	15
3. Tulemused	17
3.1 Geenikoopiate arvukused	17
4. Arutelu	23
Kokkuvõte	25
Summary	25
Tänuavaldused	26
Kasutatud kirjandus	27

Sissejuhatus

Nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon on olulised lämmastikuringe protsessid (Stein, Klotz 2016), mida viivad läbi mikroorganismid, sealhulgas bakterid ja arhed (Martínez-Espinosa *et al.* 2011). Lämmastikku on palju Maa atmosfääris ja mõjutab põllumajandust ja agroöüsteeme (Rütting *et al.* 2018).

Maa rahvaarv pidevalt tõuseb ja juba tänapäeval ületab 8 miljardit inimest. Põllumajandusele tähendab see toiduvajaduse suurenemist, intensiivset tootmist, metsaraiumist, maa degradeerumist, mullaviljakuse ja orgaanilise aine langust ehk kokkuvõttes risk loodusvarade mittesäästvale kasutamisele suureneb (Maja, Ayano 2021). Tähtis on säilitada põllumulla kvaliteeti ja pöörata rohkem tähelepanu jätkusuutlikele mulla taastumisvõimalustele. Taimedele aitab tõsta toitainete (enamasti fosfor ja lämmastik) kättesaadavust ja vastupidavust põua, haiguste ja liigse soolsuse ja/või temperatuuri eest laialt levinud arbuskulaarne mükoriisa sümbioos (AM) (Alizadeh 2011) ning 90% põllumajanduses olevates taimedes esineb selline koostoime (Lanfranco *et al.* 2016). Denitrifikatsiooni- ja nitrifikatsiooniprotsessid võivad põhjustada toitainete kadu gaasiliste ühendite nagu N_2O ja N_2 ning leostumise kaudu.

Käesoleva töö eesmärk on uurida nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsiooniprotsesse erinevates arbuskulaarse mükoriisa seente mitmekesisusega muldades kasutades lämmastikuringe funktsionaalseid markergeene.

1. Kirjanduse ülevaade

1.2 Põllumuldade olulisus

Muld on loodusvara, mis asub atmosfääri-litosfääri piirpinnal ning mõjutab järgmisi protsesse: süsiniku sidumine, taimede kasv, toitainete kättesaadavus, saasteainete lagundamine ja kliimamuutuste leevendamine (Lal 2016). Maalima rahvaarv kasvab pidevalt ja vaatamata sellele, et kasv on aeglustunud, jõuab maailma rahvaarv 2050. aastaks 9,7 miljardi inimeseni (Gu *et al.* 2021). Rahvaarvu kasv põhjustab mulla suurenenud kasutusvajadust ning mõjutab energiakasutust, veemajandust, linnastumist ja põllumajandust (Lal 2007). Täpsemini on põllumajandusmuldadele iseloomulik intensiivne põllumajandustegevus ning suur väetisekasutus (Xu *et al.* 2019), kuna põllumajandus on tugevasti seotud toidutootmisega (Devi 2023, Rehman *et al.* 2022). Mulla degradeerumine häirib keskkonnanfunktsioone, nagu veebilanss ja biomassi tootmine (Lal 2007). Sellepärast on tähtis säilitada mulla kvaliteeti, kuna vastasel juhul selle orgaanilise aine sisaldus ja viljakus võib degradeerumise protsessi käigus oluliselt väheneda (Kuczuk 2015). Orgaaniline aine omab olulist rolli ainerings, kuna seob taimede fikseeritud süsinikku ja tagab põllumajanduse tootlikkuse (Lehmann, Johannes 2015). Mulla kvaliteedi parandamiseks pööratakse peamiselt tähelepanu orgaanilise aine taastumise võimalustele, selleks on oluline põllupinna ettevalmistusprotsessis rakendada jätkusuutlikumaid viise (Brevik 2010). Looduses iseseisev ainete taastumine on kohati aeglane ning üks võimalustest on süsinikurikka orgaanilise väetise kasutuselevõtt (Kull, Kütim 2024). Samuti mõjutab koostoime mulla bakteritega positiivselt põllumuldade viljakust ja taimede kasvu (Das *et al.* 2022), mille tulemusel on taimedel suurem võimalus makro- ja mikroelemente omastada (Kaur *et al.* 2021).

1.2 Prokarüoodid

Prokarüoodid koosnevad kahest domeenist: bakteritest ja arhedest (Spang *et al.* 2015). Samas on eukarüoodid suure morfoloogilise mitmekesisusega ja nende evolutsiooniline areng toimub rühmades erineva kiirusega (Lara *et al.* 2022). Prokarüootide ja eukarüootide peamine erinevus on esimese suurus, mille ligikaudne diameeter on 1 μm . Prokarüootsetes rakkudes puudub tuum, kuid selle asemel paikneb tuumapiirkond ehk nukleoid (Schnepf 1983). Prokarüoodid

moodustavad olulise ökosüsteemi osa, soodustavad keemilisi protsesse looduses, panustades atmosfääris komponentide tekkele ja mõjutades eluorganismide mitmekesisust.

Võrreldes eukarüootidega, on prokarüootidel lihtsam rakustruktur (Walsh, Doolittle 2005). Bakterite ja arhede kromosoomid koosnevad tavaliselt ümmargusest kaheaheelalisest DNA molekulist, mis moodustab nukleoidi. Võrreldes bakteritega puudub arhedel välismembraan ja rakukest ei sisalda rakupeptidoglükaani (Paul 2014). Arhed suudavad kohaneda nii mõõdukates kui äärmuslikes keskkondades aeroobse või anaeroobse eluviisiga, osalevad geokeemilistes protsessides ning avaldavad mõju lämmastiku- ja väävelringele (Eme, Doolittle 2015), ja samuti toodavad bioloogilist metaani (CH₄) metanogeneesi käigus (Cavicchioli 2011). Arhede molekulaarbioloogia sarnaneb paljuski rohkem eukarüootide omaga, sellel on näiteks mitu alguspunkti replikatsiooni protsessi käigus ja üldine lähedane replikatsioonimehhanism (Paul 2014). Bakterid moodustavad suure osa mulla bioloogilisest mitmekesisusest, mida leiab erinevates ökoloogilistes keskkondades (Persat *et al.* 2015), kuid olulise panuse annavad ka eukarüootid, eriti seened. (Lara *et al.* 2022). Bakterid paljunevad tavaliselt ennast kopeerides, igast geenist on üks koopia ja replikatsiooni alguspunkt (Levin, Bergstorm 2000). Paljude bakterite rakuseinad on ümbritsetud ekstratsellulaarse materjaliga biokile moodustamiseks, mis on eriti oluline N₂ fikseerivatele bakteritele (Paul 2014).

1.3 Seened

Mükoriisaks nimetatakse sümbioosi taimejuurte ja seente vahel. See sümbioos võimaldab taimedel omastada vajalikke toitaineid ja soodustada enda kasvu (Alizadeh 2011) ning vastupidavust põua ja viiruste suhtes (Gosling *et al.* 2006). Mükoriisat on mitu tüüpi, kuid kõige levinum on arbuskulaarne mükoriisa (AM), mis esineb 74%-l taimeliikidel (Brundrett 2009), sealhulgas ka paljudel põllukultuuridel (Gosling *et al.* 2006). Samuti saab mükoriisadid liigitada funktsionaalse mitmekesisuse ja elupaiga alusel (Dickie *et al.* 2013). Lisaks AM-le, leiduvad ekto-, orhidoidne ja erikoidne mükoriisatüübid, millest viimane on levinud toitainevaeses mullas (Bagyaraj 2014). Orhidoidne mükoriisa on omakorda iseloomulik *Orchidaceae* taimede jaoks (Dearnaley 2007). Ekto- ja erikoised mükoriisaseened on enam

levinud madala anorgaanilise lämmastiksisaldusega muldades, avaldades mõju vähese lämmastiksisaldusega taimedele (Aerts 2003).

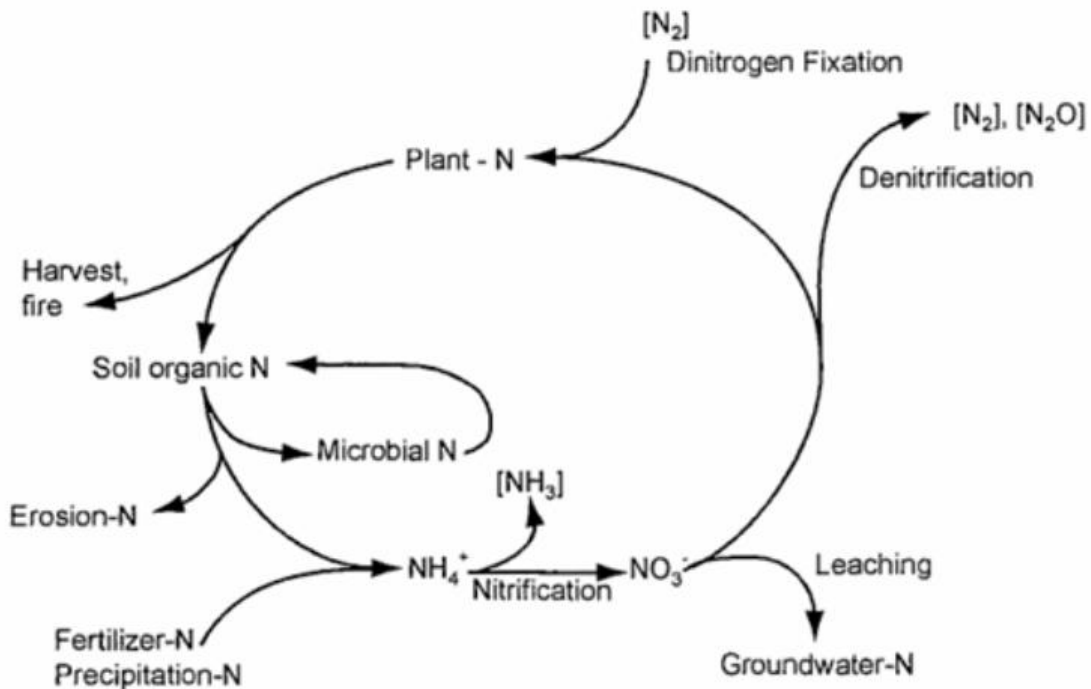
1.4 Lämmastikuringe põllumaadel

Lämmastik (N) on oluline element ökosüsteemides, olles vajalik prokariootidele ja eukariootidele, aga eriti taimedele agroökosüsteemides (Rütting *et al.* 2018). Lämmastikuvarude toetamiseks kasutatakse N-põhiseid väetisi ja samas on vaja minimeerida lämmastiku leostumist põhjavette ja gaasilist emissiooni kadu (Hirel *et al.* 2011) ja tõsta mulla tootlikkust (Hofman, Cleemput 2004). Väetisteks kasutatavad lämmastikuvormid on (NH₄⁺) ja (NO₃⁻) (Beeckman *et al.* 2018), kuna suurim lämmastiku hulk leidub mulla orgaanilises aines, muutub orgaaniline lämmastik kättesaadavaks mineraliseerumise teel (Ohyama 2010). Mineraliseerumine on orgaanilise aine lagunemine, ning N, P (fosfori) ja S (väevli) taimedele kättesaadavuse võimaldamine (Gan *et al.* 2020). N on oluline põllumajanduskultuuride jaoks, kuid võib negatiivselt mõjutada keskkonda, põhjustades leostumist ja selle tulemusel keskkonnareostust (Laine *et al.* 2018). Lämmastiku kadu atmosfääri võib toimuda lämmastikoksiidi (N₂O) ja ammoniaagi (NH₃) kaudu, aga ka nitraat võib akumuleeruda nii põhja- kui pinnavees (Spiertz 2009). Leostumist pinnasesse saab minimeerida kattedekultuuride kasutamisega, mis vähendab lämmastiku leostumist parandades keskkonnasäästlikkust (Abdalla *et al.* 2019). Väetiste liigne kasutamine võib samuti kahjustada saagikuse tootlikkust, sest madala viljakusega muldadel olev taim ei saa piisavalt N, mis põhjustab kolletumist ja aeglustunud kasvu (Ohyama 2010). Teisest küljest põhjustab N liigne kasutamine toitainete üleküllust ja suurendab viiruste tekke võimalust (Torres-Oliver 2014). Nii liigne kui puudulik N sisaldus võib põhjustada põllukultuuride ja põllumajanduse efektiivsuse langust, saaste akumulereerimist ja toitainete kadu pinnasest (Zhang *et al.* 2015).

1.4.1 Nitrifikatsioon

Nitrifikatsioon on osa lämmastikuringest koos denitrifikatsiooniga (Stein, Klotz 2016) ja on oluline N₂O allikas (Spiertz 2009). Nitrifikatsiooni käigus oksüdeerivad mikroorganismid

ammoniaagi (NH_3) nitraadiks (NO_3^-), denitrifikatsiooni käigus aga redutseeritakse nitraat (NO_3^-) N_2O -ks või N_2 -ks (Hirsch, Mauchline 2015) (Joonis 1). Nitrifikatsioon on oksüdatiivne protsess, mille käigus ammoniaak muundub nitriti (NO_2^-) kaudu edasi nitraadiks (Stein, Nicol 2018). Nimetatud protsesse teostavad mikroorganismid: ammoniaaki oksüdeerivad bakterid ja/või arhed ehk bakterite ja arhede *amoA* geenid on olulised vastavalt protsessi läbiviimisel (Fan *et al.* 2015). Kuid ammoniaagi täielikku oksüdatsiooni saab teha COMAMMOX protsessi kaudu, mida suudavad teha osad liigid *Nitrospira* perekonnast (van Kessel *et al.* 2015).



Joonis 1. Lämmastikuringe põllumuldade kontekstis on välja toodud N leostumine ning mikroobselt olulisi protsesse nagu denitrifikatsioon ja nitrifikatsioon (Philip Robertson 1997).

Bakterite *amoA* geenidega mikroorganismid kuuluvad peamiselt sellistesse liikidesse nagu *Nitrosomonas* (Wallace, Nicholas 1969). Ammoniaaki oksüdeerivaid bakterid vähendavad oksüdatsiooni teel ammoniaagi taset keskkonnas, mille tulemusena aitab nitraat kaasa taimede kasvule ja mikroobsetele protsessidele (Şentürk *et al.* 2023). Ammoniaaki oksüdeerivaid baktereid saab leida erinevatest elupaikadest, sealhulgas kõrge ammooniumisisaldusega toitaineterikastest keskkondadest, nagu reoveepuhastid ja muda (Fernández-Guerra,

Casamayor 2012). Ammoniaaki siduvaid arhesid leidub ka erinevates nitrifitseerivates keskkondades, sealhulgas ranniku- ja meresetetes (Biller *et al.* 2012) ja kuumaveeallikates (Fernández-Guerra, Casamayor 2012). Põllumuldadest (Li *et al.* 2020), reoveepuhastitest ja joogiveest võib leida COMAMMOX *amoA* geene omavaid mikroobe, mis viivad läbi nitrifikatsiooni ühe etapina (Zheng *et al.* 2023). Palomo *et al.* (2022) uuringust selgub, et *Nitrospira* leiti reoveepuhastites 147 proovis 177st. Nitrifikatsioon võib põhjustada leostumist, mis omakorda viib veesüsteemide eutrofeerumisele (Beeckman *et al.* 2018). Ammoniaak sattub keskkonda orgaanilisest ainest ja NH₃-põhistest väetistest ning kahjustab põllumuldasisid (Şentürk *et al.* 2023). Lisaks võib nitrifikatsioonil eralduda N₂O kasvuhoonegaasina, mis on globaalset soojenemist põhjustav ühend (Beeckman *et al.* 2018).

1.4.2 Prokariootne denitrifikatsioon

Prokariootne denitrifikatsioon on protsess madala hapnikusisaldusega keskkonnas, mida prokariootid viivad läbi orgaanilise aine lagunemise kaudu ja mis koosneb neljast etapist (Joonis 1) (Zumft 2004). Lämmastikuühendid, nagu lämmastikoksiidid NO₃⁻ ja NO₂, lagundavad gaasiliseid okside NO ja N₂O edasi N₂-ks (Knowles 1982). Lisaks sellele põhjustab mittetäielik denitrifikatsioon kõrvalsaadusena N₂O (Avşar, Aras 2020), põhjustades selle vabanemist atmosfääri, mis viib osoonikihi hõrenemisele (Knowles 1982) ja mis on kasvuhoonegaasina keskkonnaprobleem (Beeckman *et al.* 2018). Denitrifikatsioon sõltub erinevatest teguritest nagu hapnik, süsinik, pH ja temperatuur (Knowles 1982).

Denitrifikatsiooni protsessi käigus eralduvad nitraadid, mis ennetavad leostumist ja kõrget nitraadisaldust mullas (Heinen 2006). Teisest küljest vähendab fikseeritud N eemaldamine agroökosüsteemides mullas toitainete kättesaadavust (Hofstra ja Bouwman 2005). Denitrifikatsioon osaleb lämmastikuringe tasakaalustamises, eemaldades lämmastikku jäätmematerjalidest ja reoveest, mis vähendab eutrofeerumise taset (Knowles 1982). Põllumuldades võivad ka denitrifikatsiooni määrad olla suured, kuna seal on anaeroobsed tingimused ning niisked ja halvasti kuivendatud alad soodustavad seda protsessi (Hofstra ja Bouwman 2005).

Teises denitrifikatsioonietapis (Joonis 1) redutseerivad nitraatreduktaasid (kodeerivad *nirS* ja *nirK* geenid) ensüümid nitriti gaasiliseks NO-ks (Pold *et al.* 2024) ja viimases etapis *nosZ* geene sisaldavad N₂O reduktaasid redutseerivad N₂O N₂-ks (Sanford *et al.* 2012). *NosZI* geen on enimlevinud täielikku denitrifitseerimist tegevates mikroorganismides, kusjuures *nosZII* markergeen esineb ka mittetäielikes denitrifitseerivates mikroobides (Avşar, Aras 2020), mille näiteks on mõned bakterite liigid nagu *Ardenticatenaceae*, *Rhodospirillaceae* ja *Sphingobacteriaceae* (Su *et al.* 2021).

1.4.3 Seente denitrifikatsioon

Mitte ainult bakterid ja arhed, vaid ka seened on võimelised läbi viima denitrifikatsiooni (Shapleigh 2006). Seente osa denitrifikatsiooni koosluses moodustab liigikaudu 1% ja nad on N₂O allikad (Bösch *et al.* 2023). Enamik denitrifikatsiooni seentest kuulub *Fusarium* liiki (Shoun *et al.* 1992). Seened on võimelised N mineraliseeruma ja teostavad nitraadi või nitriti redutseerimist gaasilisteks lämmastikoksiidideks (Aldossari, Ishii 2021). Denitrifitseerivad seened, mis omavad seente *nirK* geene, esinevad erinevates keskkondades ja neid võib leida ka põllumaadelt (Bösch *et al.* 2023). Seente *nirK* geeni ja N₂O emissioonide vahel on näidatud olulist statistiliselt korrelatsiooni (Xu *et al.* 2019) Seente *nirK* geenidega organisme mõjutavad positiivselt mulla orgaaniline süsinik ja mulla niiskus (Bösch *et al.* 2023).

1.5 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) ehk reaalaja PCR-i kasutatakse geeniekspressiooni järjepidevaks ja täpseks kvantitatiivseks analüüsiks (Yuan *et al.* 2006). Mikrobioloogias on qPCR aktiivselt kasutusel, kuna qPCR võimaldab määrata konkreetsete geenide arve (Adams 2020). DNA-d eraldatakse, DNA-praimerid seonduvad komplementaarsete järjestustega, nii et moodustub uus DNA polümeraasi ahel (Postollec *et al.* 2011). Primerid mõjutavad qPCR-i kvantitatiivsete tulemuste täpsust ja edukust (Rodríguez *et al.* 2015). Samuti on oluline etapp proovi eraldamine ja ettevalmistamine, kuna saastatus mõjutab tulemuse täpsust (Adams 2020). qPCR mõõdab fluorestsentsi intensiivsust pärast iga

tsükli ja fluorestsentsvalgus muutub iga tsükli järel tugevamaks (Smith, Osborn 2009). DNA polümeraasi abil amplifitseeritakse DNA-d tavaliselt vahemikus 20 kuni 40 tsükli (Mosolygó 2022). Olenevalt analüüsist võib qPCR anda teavet spetsiifilise mikroobse funktsionaalse aktiivsuse või potentsiaalse toimumise kohta analüüsitavates proovides (Smith, Osborn 2009). Näiteks *nosZ* geeniekspressioon sõltub keskkonnateguritest rohkem kui *nirS* ja *nirK* (Hernández Maqueda *et al.* 2024). qPCR-i meetodid kasutatakse nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni määramiseks ning lämmastikuringe mikroobikoosluste uurimiseks ja neid mõjutavate keskkonnategurite väljaselgitamiseks (Li *et al.* 2022).

2. Metoodika

2.1 Katse ülesehitus ja kirjeldus

Katse korraldati Tartu Ülikooli laboris Liivi 2, Tartus. Katse hõlmas nelja erinevat mulda: kolm erineva AM mikroorganismide mitmekesisuse tasemega (kõrge, keskmine ja madal) ja steriilset kontrollmulda, vastavalt siis koodnimedega ERTO, HAAGE, HIIRE ja CONTROL (Tabel 1 ja 2). Uuritud mullad valiti varem määratud AM-seente aktiivsuse põhjal ja hõlmab 3 põllumulda, mahepõllumajandusest kuni tavaviljeluseni. Katse korraldati viie kordusega, mille tulemuseks oli 20 katsepotti. Katse kestis 95 päeva (19. jaanuarist kuni 23. aprillini 2024). Katsetaimena kasutati *Lolium perenne* ning võeti 50 seemet, mis külvati poti keskele. Potte väetati 50 ml poti kohta madala P long-Ashtoni väetisega.

Tabel 1. Mullad, mida kasutati katseteks: ERTO mullal on suurem AM seente liikide arvukus, millele vastab AMF järjestuste arv. S.HIIRE töötlus näitab kõige väiksemat mitmekesisust.

Töötlus	Liigid	AMF järjestused
ERTO	51	17388
HAAGE	36	10726
S.HIIRE	12	184

Katse eesmärgiks oli uurida lämmastikuringet erinevat tüüpi AM seentega muldades. 30 cm läbimõõduga, 40 cm kõrgusega ja umbes 9 l mahuga potid steriliseeriti ja täideti 5620 g OECD standardmullaga (7% turvast, 13% savi, 75% liiva, 5% inokulummulda), mida oli rikastatud 7% orgaanilise lisandiga. OECD-mullad segati ja autoklaaviti. Kõikidele pottidele lisati turba happesuse neutraliseerimiseks 32,5 g CaCO₃. Kontrollpottidele lisati 5% ERTO farmist pärit autoklaavitud mulda, teistele 5% inokulummulda (Tabel 1). OECD-mullad segati ning 30 g mulda võeti geokeemilisteks ja DNA analüüsideks kohe pärast istutamist. Taimi lõigati 4 korda, et ergutada taimede kasvu. Kastmine toimus regulaarselt.

Tabel 2. Mulla keemilised parameetrid katse alguses (pottide paigaldamise ajal, kuid enne seemnete külvi). Erinevad tähed näitavad olulisi erinevusi töotluste vahel vastavalt Tukey HSD-testile ($\alpha = 0,05$).

Töotlus	C (%)	N (%)	P (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	Mg (mg kg ⁻¹)	C:N
CONTROL	1.65 ± 0.49 a	0.05 ± 0.02 a	6.2 ± 0.86 ab	16.6 ± 1.08 b	1534 ± 121 a	89 ± 3.62 b	32 ± 2.47 a
ERTO	2.24 ± 0.34 a	0.09 ± 0.02 a	2.2 ± 1.11 b	26.2 ± 2.01 a	1501 ± 228 a	96.8 ± 5.25 b	27.2 ± 2.24 a
HAAGE	2.62 ± 0.38 a	0.1 ± 0.02 a	5.2 ± 0.86 ab	22.2 ± 1.24 ab	1583 ± 36 a	103.4 ± 5.87 b	26.4 ± 1.78 a
HIIRE	2.22 ± 0.17 a	0.09 ± 0.01 a	11.8 ± 3.09 a	20.8 ± 2.06 ab	2024 ± 382 a	173.4 ± 18.41 a	26.8 ± 2.06 a



Joonis 2. Katse kestvus ja täpsemad etapid kuupäevadega. Katse algas 19. jaanuaril 2024 ja lõppes 23. aprillil 2024.

2.2 DNA kontsentratsiooni mõõtmine

DNA kontsentratsioon mõõdeti TECAN InfiniteM200 spektrofotomeetriga ja arvutati i-control 1.6 programmiga. Plaati puhastati 2 µL destilleeritud veega. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati 2 µL proovi.

2.3 Geenikoopiate arvukuse määramine qPCR meetodil

Bakterite ja arhede 16S rRNA geenide arvukuse määramiseks kasutati reaalaja kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodit. qPCR abil määrati mullaproovidest ka funktsionaalseid nitrifikatsiooni geene (bakterite *amoA*, arhede *amoA*, COMAMMOX *amoA*), denitrifikatsiooni geene (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) ja seente *nirK*. Kõikide geenikoopiate arvukuste tuvastamiseks ja määramiseks kasutati RotorGene® Q seadmed (Qiagen, USA). 10 µL reaktsioonilahus sisaldas 5 µL Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), vastavas koguses päri- ja vastassuunalisi praimereid (0,3 µL - 1 µL, täpsemad kontsentratsioonid tabelis 3), 1 µL proovi ja destilleeritud vett. Mõõtmistele lisati ka negatiivsed kontrollproovid.

Saadud qPCR kvantitatiivsete andmete analüüsiks kasutati tarkvaraprogramm RotorGene Series Software v. 2.0.2 (Qiagen) ja LinRegPCR program v. 2021.2 (Ruijter *et al.* 2009). Esmase andmete analüüsiga hinnati amplifikatsiooni ja sulamiskõverate sarnasust ja kuju. Proovide amplifikatsiooniefektiivsus leiti tarkvaraga LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) Geenide arvukus määrati lähtudes proovide ja vastavate standardite 10-kordse standardlahjenduse keskmiste kordade (Ct) erinevusena (Ruijter *et al.* 2009). Geenikoopiate arvukus väljendati geenikoopiate arvudena ühe grammi kuivaaine kohta (GK/g KA) Prokarüootide üldarukus leiti bakterite ja arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukuste summeerimisel.

2.4 Andmeanalüüs ja autori osalus

Lisaks eelnevalt nimetatud programmidele tehti andmeanalüüs programmiga MS Excel 2024. Samuti MS Excel 2024 programmiga esitati töös jooniseid ja tabeleid. Käesoleva töö autor mõõtis DNA kontsentratsiooni, määras ja arvutas qPCR meetodiga geenikoopiate arvukused ning tegi saadud andmete põhjal tegi andmeanalüüsi.

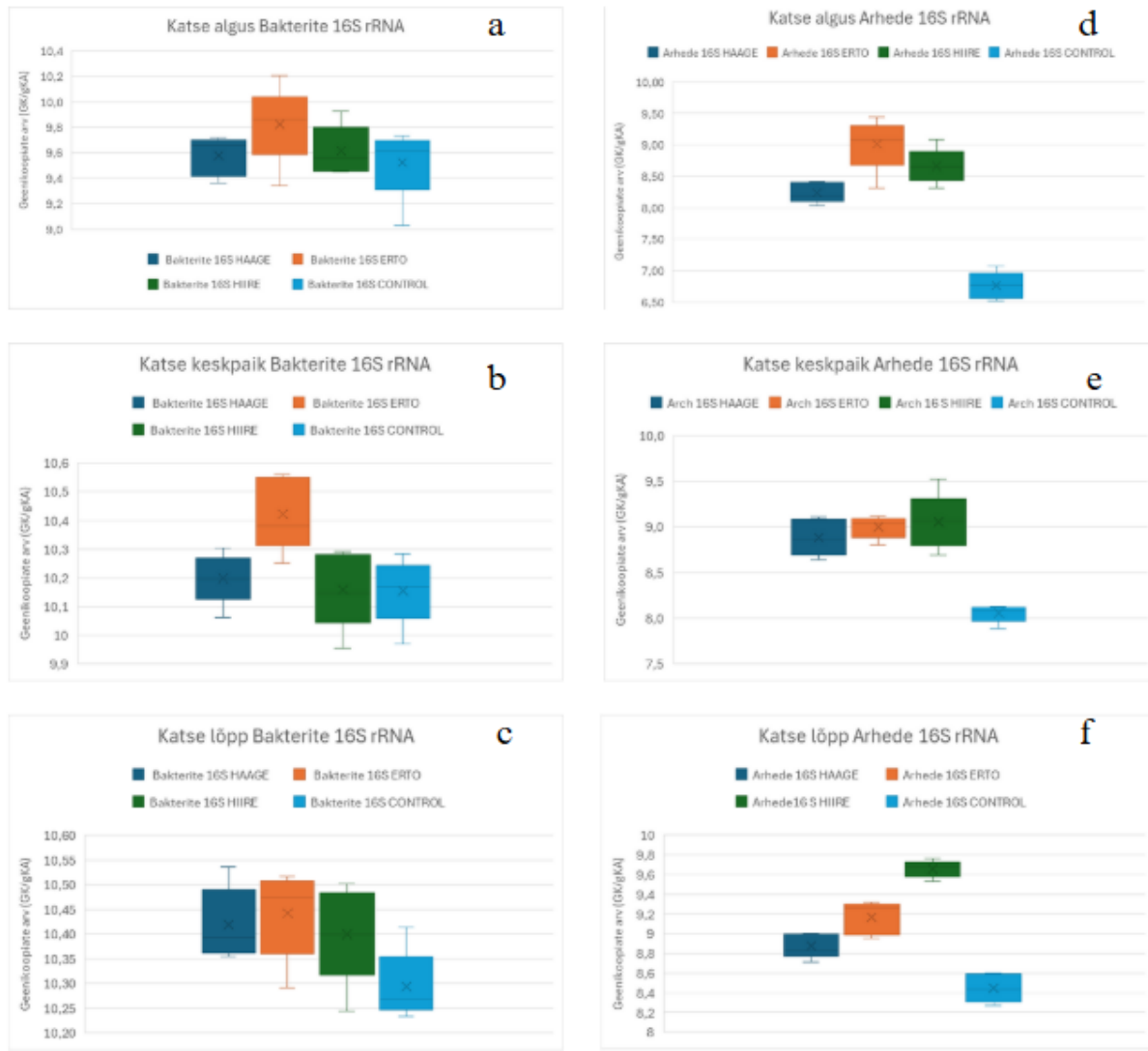
Tabel 3. DNA ekstraheerimise praimerid, nende kontsentratsioonid ja qPCR-I programmi sätted .

Märklaudgeen	Praimer	Viide	Praimeri kontsentratsioon(μ M)	qPCR programm
Bakterite 16 rRNA	Bact517F	Liu <i>et al.</i> (2007)	0,6	95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s
	Bact1028R	Dethlefsen <i>et al.</i> (2008)		
Arhede 16S rRNA	Arc519F	Espenberg <i>et al.</i> (2016)	0,6	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s
	Arch910R			
<i>nirS</i>	nirSCd3af	Kandeler <i>et al.</i> (2006)	0,8	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s
	nirSR3cd			
<i>nirK</i>	nirK876	Henry <i>et al.</i> (2006)	0,8	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 58°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s
	nirK1040			
<i>nosZI</i>	nosZ2F	Henry <i>et al.</i> (2006)	0,6	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s
	nosZ2R			
<i>nosZII</i>	nosZIIF	Jones <i>et al.</i> (2013)	0,6	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s, 80°C 45 s
	nosZIIR			
Bakterite <i>amoA</i>	amoA-1F	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)	0,8	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 57°C 45 s; 72°C 45 s
	amoA-2R			
Arhede <i>amoA</i>	CrenamoA 23F	Tourna <i>et al.</i> (2008)	0,8	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 55°C 45 s; 72°C 45 s
	CrenamoA 616R			
COMAMMOX <i>amoaA</i>	comamoA AF	Wang <i>et al.</i> , (2018)	0,8	95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s
	comamoA SR			
Seente <i>nirK</i>	FnirK-F3	Chen <i>et al.</i> , (2016)	0,8	95 °C 10 min; 45 tsükli: 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s
	FnirK-R2			

3. Tulemused

3.1 Geenikoopiate arvukused

Bakterite ja arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukused olid üldjoontes ühtlaselt jaotunud (Joonis 3). Eraldi tasub esile tuua arhede 16s rRNA geenikoopiate arvukuse muutusi katse lõpus (Joonis 3f), kusjuures mediaanväärtused kaldusid kas kõrgemate (ERTO töötlus) või madalamate (HAAGE) väärtuste poole. Lisaks näitas HIIRE töötlus kõrgemat arhede 16S rRNA arvukust (Joonis 3f). CONTROL proovid nii bakteritel kui arhedel näitavad madalamat arvukust. Erandiks oli bakterite 16S rRNA arvukus katse alguses (Joonis 3a), kusjuures HIIRE näitas kõrgemat arvukust võrreldes HAAGE töötlusega (vt Tabel 1).



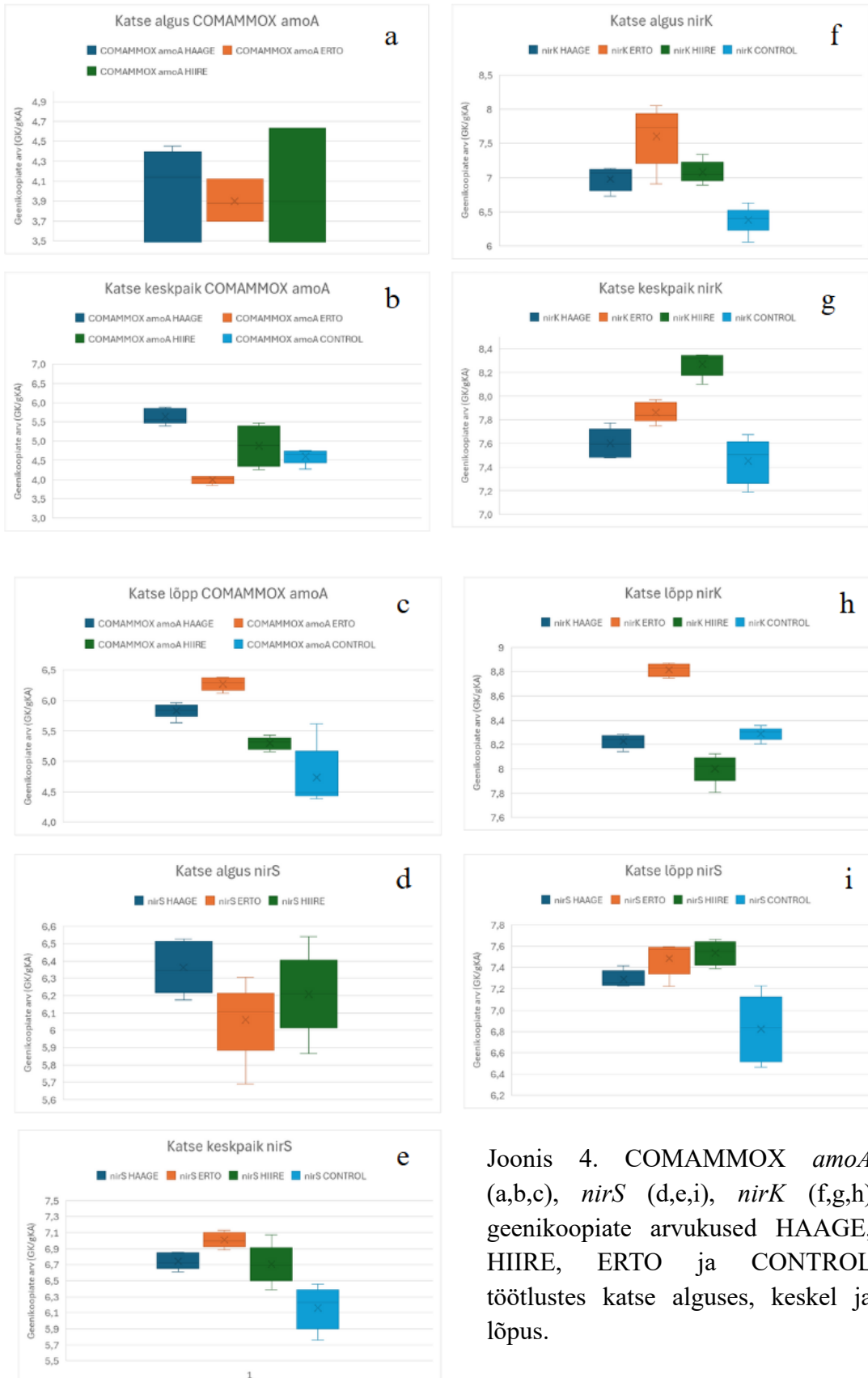
Joonis 3. Bakterite (a,b,c) ja arhede (d, e, f) geenikoopiate arvukuse erinevused töötluste järgi. Karp-vurrud diagrammid näitavad jaotust kvartiilide lõikes, 50% andmeid asub selles 'kabis'. Joon, mis on kvartiilvahemikus näitab mediaani. Vurrud näitavad andmeid, mis on miinimum- ja maksimumväärtused.

COMAMMOX *amoA* geenide arvukus näitas katse alguses suurt varieeruvust (Joonis 4a), kuid hiljem olid madalamad geenikoopiate arvukused. CONTROL proovidest ei tuvastatud COMOMMOX *amoA* gene (Joonis 4a). Töötlustes (HAAGE, ERT0, HIIRE) olid COMAMMOX geenide arvukused madalad, mis on samuti joonisel 4a näha. Katse keskel ja

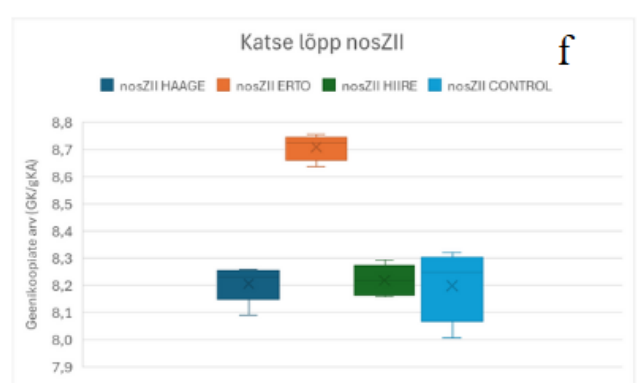
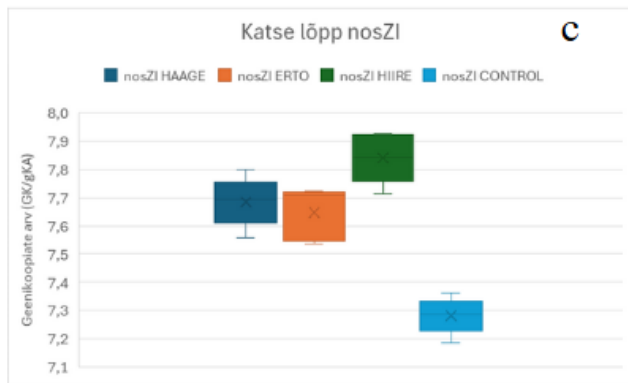
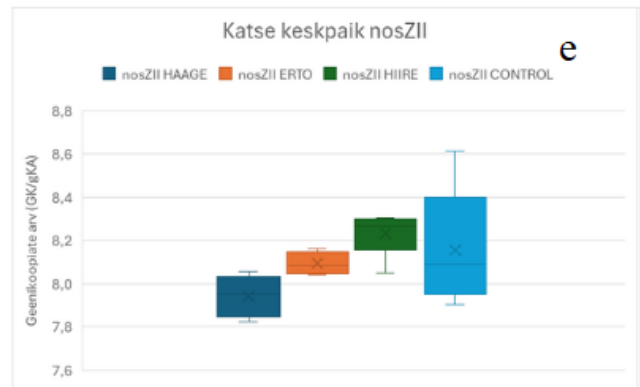
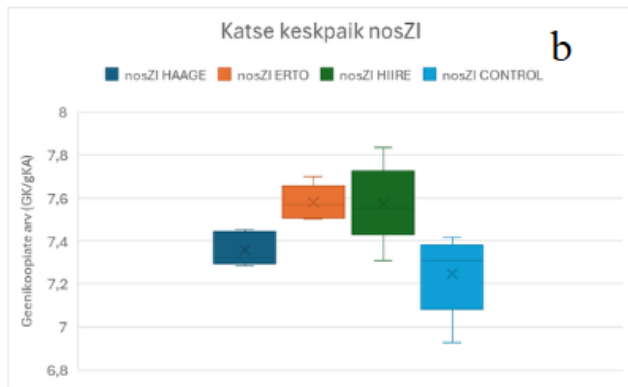
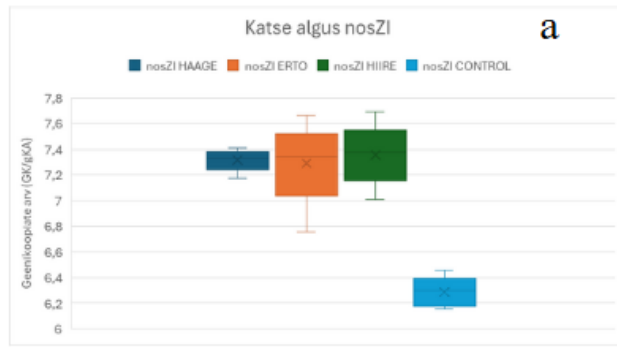
lõpus suurenes COMAMMOX *amoA* geenide arvukus ja ilmnisid erinevused töötluste vahel. Näiteks on joonisel 4b ERTO töötlusel kõige madalam geenikoopiate arvukus.

nirK ja *nirS* geenide arvukused jäävad enamasti madalaks CONTROL proovides. Erandiks oli katse alguses *nirS* geen, mida CONTROL proovidest üldse ei tuvastatud. *nirK* geenide puhul oli katse lõpus (Joonis 4h) geenikoopiate arv CONTROL proovides kõrgem kui HAAGE ja HIIRE töötlustes. Katse lõpuks vähenes geenikoopiate varieeruvus (Joonised 4c, 4h, 4i). *nirK* ja *nirS* geenikoopiate arvukus katsete lõpus oli suurem: *nirK* geenikoopiate arvukus oli ERTO töötlusel suurim ja *nirS* puhul HIIRE töötlusel.

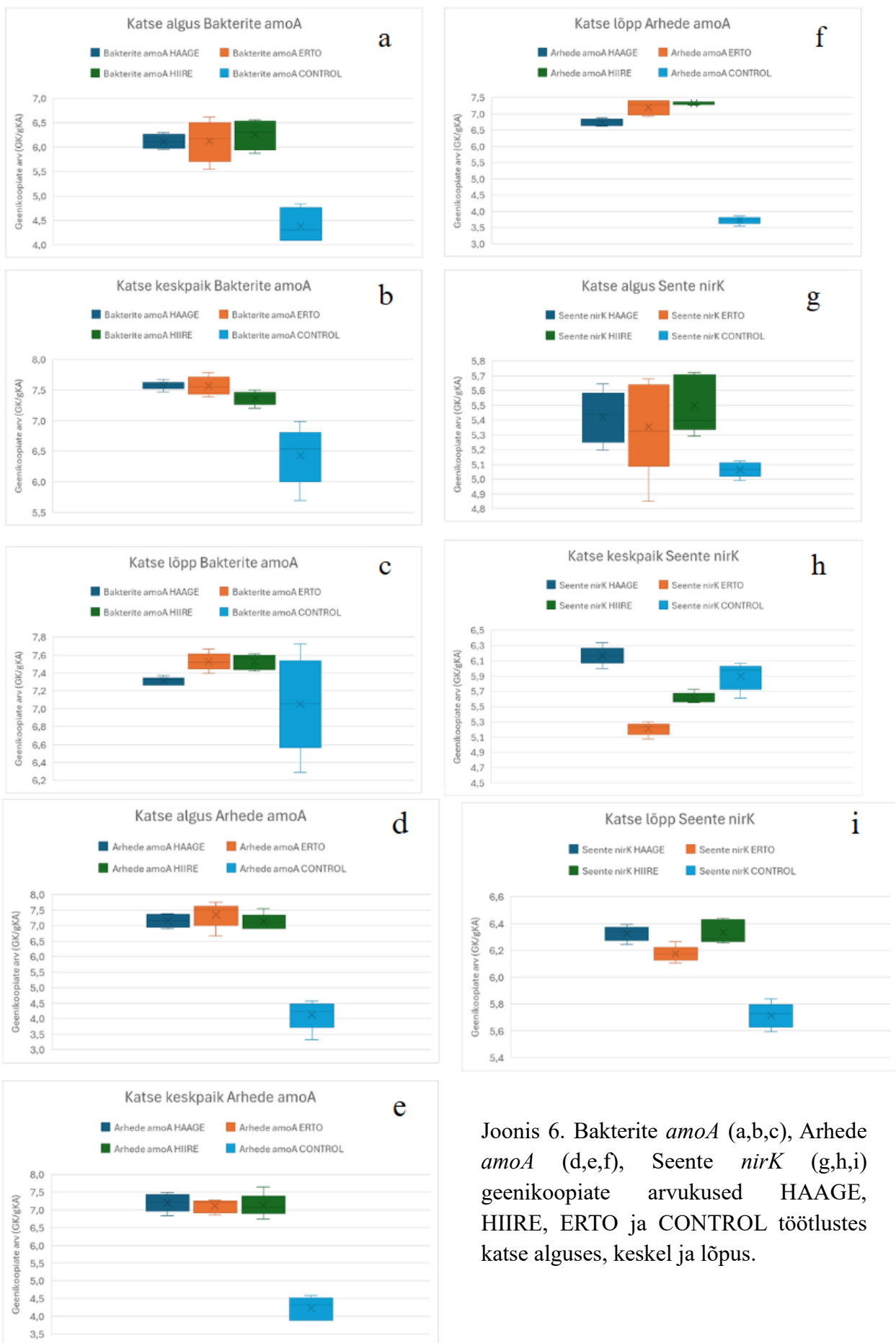
CONTROL proovides püsisid *nosZI* geenide arvukused madalal tasemel (Joonis 5a, 5b, 5c). HIIRE töötlus näitas suuremat geenikoopiate arvu mõlemates katse etappides. Katse keskpaigas oli *nosZII* geeni (Joonis 5e) suur varieeruvus CONTROL proovides. Nagu katse alguses (Joonis 5d) nii ka sarnaselt *nosZII* geenide arvukusega katse lõpus (Joonis 5f) näitas ERTO töötlusel suuremat geenikoopiate arvu.



Joonis 4. COMAMMOX *amoA* (a,b,c), *nirS* (d,e,i), *nirK* (f,g,h) geenikoopiate arvukused HAAGE, HIIRE, ERTO ja CONTROL tööstlustes katse alguses, keskel ja lõpus.



Joonis 5. *nosZI* ja *nosZII* markergeenide arvud HAAGE, HIIRE; ERT0 ja CONTROL tötlustes katse alguses, keskel või lõpus.



Joonis 6. Bakterite *amoA* (a,b,c), Arhede *amoA* (d,e,f), Seente *nirK* (g,h,i) geenikoopiate arvukused HAAGE, HIIRE, EROTO ja CONTROL töötlustes katse alguses, keskel ja lõpus.

Andmete jaotus koopiate arvukuse osas jäi pigem ühtlaseks Joonisel 5 esitatud markergeenide bakterite ja arhede *amoA* ning seente *nirK* puhul. CONTROL proovid näitasid üldiselt väiksemat arvukust võrreldes HAAGE, ERTO ja HIIRE töötlustega. Eraldi tasub esile tuua bakterite *amoA* CONTROL proovid (Joonis 6c), kus andmete hajuvus ja varieeruvus oli ulatuslik. Sarnane olukord tuli välja kõigis kolmes töötlustes joonisel 6g. Katse alguses näitas bakterite *amoA* suuremat arvukust HIIRE töötlustes (Joonised 6g, 6a).

Katse keskel oli olulisel määral madalaim geenikoopiate arv ERTO mullatöötlustes. Andmed muutusid katse lõpuks ühtlasemaks (Joonised 6c, 6f, 6i), mis ilmneb arhede *amoA* kvartiili vahemikkudes (Joonis 6f). Võrreldes katse algusega (Joonis 6a) suurenes bakterite *amoA* koopiate arv katse lõpus (Joonis 6c), kuid arhede *amoA* geenikoopiate arvukus ei näidanud katse lõpus olulist muutust (Joonis 6f). Katse lõpuks (Joonis 6i) kasvas ka seente *nirK* geenikoopiate arv.

4. Arutelu

Katses uuritud muldades olid erinevad AM-seente arvukused, mille järel liigitati kolm mullatöötlust: ERTO, HAAGE ja HIIRE, kusjuures kontrollpottid juba sisaldasid autoklaavitud mulda ERTO päritoluga. ERTO, HAAGE, HIIRE töötlustele lisati 5%-lise inokulumi, mis sisaldas spore ja hüüfe. Lähtudes varasemalt läbi viidud Brundrett *et al.* (2009) uuringust selgub, et sümbioos kõige levinuma mükoriisatüüpiga (AM) leidub 74% taimeliikides, mis omakorda viitab sellele, et koostoime AM-ga ei ole haruldane nähtus. Samuti Gosling *et al.* (2006) uuring toob ka esile, et korrelatsioon AM-ga on levinud ja on oluline põllumuldade jaoks.

Tulemustest nähtub, et kontrollproovide geenikoopiate arvukus jäi võrreldes töötluste omadega tihtipeale madalamaks. Isegi kui ERTO mulda autoklaaviti, sisaldas kasutuses olev OECD muld oma koostises 5% inokulumi. Uurimistulemuste põhjal määrati mikroobseid funktsioone, mis oli CONTROL proovides madal, aga ikkagi oli geenikoopiate arvukus olemas enamus geenide puhul. Seda võib põhjustada DNA mittetäielik lagunemine autoklaavimisel, mida hiljem määrati qPCR analüüsiga. Näiteks mõned markergeenid nagu *nirS* (Joonis 4d) ja

COMAMMOX *amoA* (Joonia 4a) polnud katse alguses CONTROL proovides üldse tuvastatud. On märkamisväärseid erandeid - CONTROL proovide geenikoopiate arv oli võrdne või kõrgem võrreldes teiste töötlustega.

Tulemustest saab tuvastada nii bakterite kui ka arhede olemasolu, mida näitavad vastavad markergeenid. Lisaks olid olemas nitrifitseerijad ja denitrifitseerijad geenikoopiate alusel. Väikseima arvukusega esineb täielikku ammoniaagi oksüdatsiooni markergeen COMAMMOX *amoA*. COMAMMOX geeni sisaldavaid mikroobe leidub reoveepuhastites, joogisüsteemides ja biofiltrites (Zheng *et al.* 2023), aga ka põllumuldades, kuid eelkõige potentsiaalselt kõrge lämmastikusisaldusega põllumajandusmuldades (Li *et al.* 2020). Lisaks katse mulla koostises leidub suhteliselt madal N sisaldus (Tabel 2).

Katse lõpuks osutus ERTO töötlus suurema geenikoopiate arvukusega kümnest viie markgeeni puhul, mis olid bakterite 16S rRNA, COMAMMOX *amoA*, *nirK*, *nosZII* ja bakterite *amoA* geenid. Sarnaselt eelmisele esines HIIRE töötluses suurimad geenikoopiate arvukused neljas kümnest markergeenist ehk arhede 16S rRNA, *nirS*, *nosZI* ja seente *nirK* geenide puhul. Arhede *amoA* geenide arvukus näitab, et ERTO töötluses on neid arvuliselt rohkem, kuid HIIRE töötluste andmed olid madala varieeruvusega. Isegi kui katse alguses näitas ERTO mullatöötlus (Tabel 1) suuremat arvukust, HIIRE töötluses väljendus mõne geeni funktsionaalne erinevus paremini. ERTO töötluses suuremat geenikoopiate arvukust näitasid denitrifikatsiooni geenid, kuhu kuuluvad *nirS*, *nirK*, *nosZI* ja *nosZII* näitavad *nirK* ja *nosZII* kui HIIRE töötluses *nosZI* ja *nirS*.

On uuritud, et AM mõjutab mikroobikooslust (Meng *et al.* 2024) ning eelnevalt mainitud lämmastikuringe geenide jaotamise põhjuseks võib järeldada üldist denitrifikatsiooni sõltuvust järgmistest teguritest: toitainete kättesaadavus, sealhulgas lämmastikust (Knowles 1982), mis soodustab taimede kasvu ja mulla õhustatust (Alizadeh 2011). Märgitakse, et *nirK* ja *nirS* gene omavatel mikroobidel on erinevad nišid keskkondades, näiteks *nirS* geenidega mikroobid on enam levinud merekeskkondades ja sõltuvad soolsusest (Jones, Hallin 2010). *nirS* ja *nosZI* markergeenide olemasolu HIIRE töötlustes võib seotud olla anaeroobse tingimuste eelistamisega (Yang *et al.* 2018). Võrreldes *nosZI*-tüüpi mikroobidega, *nosZII* gene omavad mikroobid viivad pigem läbi mittetäielikku denitrifikatsiooni (Avşar, Aras 2020). Seente *nirK* osa denitrifikatsioonis moodustab liigikaudu 1% (Bösch *et al.* 2023) ja tulemustest selgub

suurem arhede ja bakterite arvukus, millest võib järeldada, et toimub mikroorganismide vaheline konkurents, mille tulemusena seente *nirK* leidub pigem HIIRE töötluses.

Tuleb esile tõsta, et bakterite ja arhede *amoA* geenid tekivad ERTO töötluses suurema geenikoopiate arvukusega, sest P tase (Tabel 2) suurendab AM sümbioosi, mis aitab makro- ja mikrotoitainete saadavusele ja soodustab bakterite kasvu (Meng *et al.* 2024).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida denitrifikatsiooni ja nitrifikatsiooni protsesside muutusi erineva AM seente mitmekesisusega põllumuldades. Katse korraldati Tartu Ülikooli kasvuhoones, mis hõlmas nelja tüüpi mullatöötlust (ERTO, HAAGE, HIIRE ja kontroll) kolme mitmekesisuse tasemega (kõrge, keskmine ja madal) ja kestvusega 95 päeva. Kvantitatiivseks analüüsiks kasutati qPCR meetodid ning andmetöötlemiseks programme LinRegPCR ja MS Excel 2024.

Tulemused näitasid bakterite ja arhede mikroorganismide olemasolu, markergeenide tuvastamist suurema geenikoopiate arvukusega kõrge mikroorganismide tasemega töötluses (bakterite 16S rRNA, COMAMMOX *amoA*, *nirK*, *nosZII* ja bakterite *amoA*, arhede *amoA*), ning madala tasemega töötluses (16S rRNA, *nirS*, *nosZI* ja seente *nirK*). COMAMMOX *amoA* nitrifikatsiooniprotsessis osaleval geenil leiti madalaim geenikoopiate arvukus, suurema sisaldusega *nosZII* puhul. Antud töö andmed aitavad võrrelda lämmastikuringe markergeenide seoseid AM seentega põllumajanduses.

Changes in nitrification and denitrification processes in agricultural soils with different arbuscular mycorrhizal fungal diversity

Monika Stjuf

Summary

The bachelor's thesis aimed to assess the changes in denitrification and nitrification genes in agricultural soils with different AM diversity. Nitrification and denitrification essential elements of the nitrogen cycle which is performed by microorganisms. The increasing

anthropogenic activities in agriculture lead to increased food demand, intensive production, deforestation, and land degradation. The widespread arbuscular mycorrhiza symbiosis increases nutrient uptake availability in plants. The processes of denitrification and nitrification include both advantages and disadvantages which can either cause or stop leaching.

Previous studies had provided an informative overview of processes, functional genes and microorganisms such as bacteria and archaea. The experiment was conducted in a controlled greenhouse at the University of Tartu, which included 4 types of soil treatments (ERTO, HAAGE, HIIRE and CONTROL) with 3 levels of diversity (high, medium and low) and lasted 95 days.

Each experimental condition was repeated 5 times, resulting in twenty experimental pots. Functional nitrification genes (AOB, AOA, COMAMMOX *amoA*), denitrification genes (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) and fungal *nirK* were determined from soil samples by quantitative polymerase chain reaction. RotorGene[®] Q instruments (Qiagen, USA) were used to detect all gene copy numbers. qPCR methods were used for quantitative analysis, and data processing was done with LinRegPCR and MS Excel 2024 programs.

The results showed the presence of bacterial and archaeal microorganisms. Functional genes with higher gene copy numbers were found in the high-microorganism treatment (bacterial 16S rRNA, COMAMMOX *amoA*, *nirK*, *nosZII* and AOB, AOA), as well as in the low-microorganisms treatment (16S rRNA, *nirS*, *nosZI* and fungal *nirK*). The COMAMMOX *amoA* had the lowest gene copy number (6.4 GK/gKA) whereas the highest value was observed for the *nosZII* clade gene. The data presented in this paper is helpful in comparing the dependence of functional genes on AM symbiosis in arable soils.

Tänuavaldused

Soovin tänada juhendajaid Mikk Espenbergi ja Maarja Öpikut kannatlikkuse, abivalminduse ja operatiivse koostöö eest kogu lõputöö vältel. Samuti soovin tänada Kärt Kangerit sujuva laboritöö eest. Lisaks soovin tänada oma perekonda.

Kasutatud kirjandus

- Abdalla, M., Hastings, A., Cheng, K., Yue, Q., Chadwick, D., Espenberg, M., Truu, J., Rees, R. M., & Smith, P. (2019). A critical review of the impacts of cover crops on nitrogen leaching, net greenhouse gas balance and crop productivity. *Global Change Biology*, 25(8), 2530–2543. <https://doi.org/10.1111/gcb.14644>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48–53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Aerts, R. (2003). The Role of Various Types of Mycorrhizal Fungi in Nutrient Cycling and Plant Competition. M. G. A. van der Heijden & I. R. Sanders (Toim), *Mycorrhizal Ecology* (lk 117–133). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_5
- Aldossari, N., and Ishii, S. (2021). Fungal denitrification revisited – Recent advancements and future opportunities. *Soil Biology and Biochemistry*, 157, 108250. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108250>
- Alizadeh, O. (2011). Mycorrhizal symbiosis. *Advanced Studies in Biology*, 3(6), 273-281.
- Avşar, C., and Aras, E. S. (2020). Quantification of denitrifier genes population size and its relationship with environmental factors. *Archives of Microbiology*, 202(5), 1181–1192. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01826-x>
- Bagyaraj, D. J. (2014). Mycorrhizal Fungi. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 415. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55118>
- Beeckman, F., Motte, H., & Beeckman, T. (2018). Nitrification in agricultural soils: Impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.014>
- Biller, S. J., Mosier, A. C., Wells, G. F., & Francis, C. A. (2012). Global Biodiversity of Aquatic

- Ammonia-Oxidizing Archaea is Partitioned by Habitat. *Frontiers in Microbiology*, 3.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00252>
- Bösch, Y., Pold, G., Saghai, A., Karlsson, M., Jones, C. M., and Hallin, S. (2023). Distribution and Environmental Drivers of Fungal Denitrifiers in Global Soils. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e00061-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00061-23>
- Brevik, E. C. (2010). Soil health and productivity. *Soils, plant growth and crop production*, 1, 106.
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1), 37–77.
<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>
- Cavicchioli, R. (2011). Archaea—Timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology*, 9(1), 51–61. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2482>
- Chen, H., Yu, F., & Shi, W. (2016). Detection of N₂O-producing fungi in environment using nitrite reductase gene (*nirK*)-targeting primers. *Fungal Biology*, 120(12), 1479-1492.
- Das, P. P., Singh, K. R., Nagpure, G., Mansoori, A., Singh, R. P., Ghazi, I. A., Kumar, A., and Singh, J. (2022). Plant-soil-microbes: A tripartite interaction for nutrient acquisition and better plant growth for sustainable agricultural practices. *Environmental Research*, 214, 113821. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113821>
- Dearnaley, J. D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0138-1>

- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* 6, e280. doi: 10.1371/journal.pbio.0060280
- Dickie, I. A., Martínez-García, L. B., Koele, N., Grelet, G.-A., Tylianakis, J. M., Peltzer, D. A., & Richardson, S. J. (2013). Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant and Soil*, 367(1), 11–39. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1609-0>
doi: 10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997
- Eme, L., & Doolittle, W. F. (2015). Archaea. *Current Biology*, 25(19), R851–R855.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.025>
- Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J., et al. (2016). Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PLoS One* 11, e0163864. doi: 10.1371/journal.pone.0163864
- Fan, H., Bolhuis, H., & Stal, L. J. (2015). Nitrification and Nitrifying Bacteria in a Coastal Microbial Mat. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01367>
- Fernández-Guerra, A., & Casamayor, E. O. (2012). Habitat-Associated Phylogenetic Community Patterns of Microbial Ammonia Oxidizers. *PLOS ONE*, 7(10), e47330.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047330>
- Gan, H. Y., Schöning, I., Schall, P., Ammer, C., & Schrumpf, M. (2020). Soil Organic Matter Mineralization as Driven by Nutrient Stoichiometry in Soils Under Differently Managed Forest Stands. *Frontiers in Forests and Global Change*, 3.
<https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00099>

- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1), 17–35.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009>
- Gu, D., Andreev, K., and Dupre, M. E. (2021). Major Trends in Population Growth Around the World. *China CDC Weekly*, 3(28), 604–613. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.160>
- Heinen, M. (2006). Simplified denitrification models: Overview and properties. *Geoderma*, 133(3), 444–463. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.06.010>
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5181–5189. doi: 10.1128/AEM.00231-06
- Hernández Maqueda, R., Ballesteros, I., Meca, D., Linacero, R., & del Moral, F. (2024). Insights into the abundance, expression and diversity of key denitrification genes in an ecologically managed greenhouse agricultural soil. *Applied Biological Chemistry*, 67(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00901-x>
- Hirel, B., Tétu, T., Lea, P. J., & Dubois, F. (2011). *Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture*. *Sustainability*, 3(9), 1452-1485.
- Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2015). Chapter Two—The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. S. Sariaslani & G. M. Gadd (Toim), *Advances in Applied Microbiology* (Kd 93, lk 45–71). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.09.001>
- Hofman, G., and Cleemput, O. V. (2004). *Soil and plant nitrogen*. International Fertilizer Industry Association.

- Hofstra, N., and Bouwman, A. F. (2005). Denitrification in Agricultural Soils: Summarizing Published Data and Estimating Global Annual Rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 72(3), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s10705-005-3109-y>
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
<https://doi.org/10.3390/su3091452>
- Jones, C. M., and Hallin, S. (2010). Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *The ISME Journal*, 4(5), 633–641.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.152>
- Jones, C. M., Graf, D. R. H., Bru, D., Philippot, L., Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *ISME J.* 7, 417–426. doi: 10.1038/ismej.2012.125
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., Philippot, L. (2006). Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5957–5962. doi: 10.1128/AEM.00439-06
- Kaur, T., Devi, R., Kour, D., Yadav, A., Yadav, A. N., Dikilitas, M., Abdel-Azeem, A. M., Ahluwalia, A. S., and Saxena, A. K. (2021). Plant growth promoting soil microbiomes and their potential implications for agricultural and environmental sustainability. *Biologia*, 76(9), 2687–2709. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00806-w>
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1), 43–70.
<https://doi.org/10.1128/mr.46.1.43-70.1982>
- Kuczuk, A. (2015). Soil-a valuable environmental resource-quality, health, ecosystem services. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 60(4), 21-29.

- Kull, A., Küttim, M. (2024). Ringmajanduse põhimõtete juurutamine Eestis toodetud aiandusturba toodete kasutamisel ja sellega seotud kasvuhoonegaaside heite vähendamine LULUCF sektoris.
- Devi., A. S., Evaluation of Soil Management Practices for Agriculture using TOPSIS Method. (2023). *Agricultural, Biologicals and Food Science*, 2(1), 47–56.
<https://doi.org/10.46632/abfs/2/1/7>
- Laine, M., Rütting, T., Alakukku, L., Palojärvi, A., and Strömmer, R. (2018). Process rates of nitrogen cycle in uppermost topsoil after harvesting in no-tilled and ploughed agricultural clay soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(1), 39–49.
<https://doi.org/10.1007/s10705-017-9825-2>
- Lal, R. (2007). Carbon Management in Agricultural Soils. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12(2), 303–322. <https://doi.org/10.1007/s11027-006-9036-7>
- Lal, R. (2016). Soil health and carbon management. *Food and Energy Security*, 5(4), 212–222.
<https://doi.org/10.1002/fes3.96>
- Lanfranco, L., Bonfante, P., and Genre, A. (2016). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6), 10.1128/microbiolspec.funk-0012–2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0012-2016>
- Lara, E., Singer, D., and Geisen, S. (2022). Discrepancies between prokaryotes and eukaryotes need to be considered in soil DNA-based studies. *Environmental Microbiology*, 24(9), 3829–3839. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16019>
- Lehmann, J., and Kleber, M. (2015). The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 528(7580), 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>

- Levin, B. R., and Bergstrom, C. T. (2000). Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 6981-6985. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.698>
- Li, C., Hu, H.-W., Chen, Q.-L., Chen, D., and He, J.-Z. (2020). Growth of comammox Nitrospira is inhibited by nitrification inhibitors in agricultural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 20(2), 621–628. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02442-z>
- Li, X., Xia, C., Sun, Y., Ding, W., and Qin, H. (2022). Characteristics of Nitrifying and Denitrifying Microbes in the Bioretention Cell with Submerged Zone during a Dry Period. *Water*, 14(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/w14213503>
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35, e120. doi: 10.1093/nar/gkm541
- Maja, M. M., and Ayano, S. F. (2021). The Impact of Population Growth on Natural Resources and Farmers' Capacity to Adapt to Climate Change in Low-Income Countries. *Earth Systems and Environment*, 5(2), 271–283. <https://doi.org/10.1007/s41748-021-00209-6>
- Martínez-Espinosa, R. M., Cole, J. A., Richardson, D. J., and Watmough, N. J. (2011). Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 175–178. <https://doi.org/10.1042/BST0390175>
- Meng, L., Cheng, Z., and Li, S. (2024). Response of Soil Nitrogen-Cycling Genes to the Coupling Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation and Biochar Application in Maize Rhizosphere. *Sustainability*, 16(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/su16083349>

- Mosolygó, T., Laczi, K., Spengler, G., and Burián, K. (2022). A Practical Approach for Quantitative Polymerase Chain Reaction, the Gold Standard in Microbiological Diagnosis. *Sci*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/sci4010004>
- Ohyama, T. (2010). Nitrogen as a major essential element of plants. T. Ohayama, K. Sueyoshi (toim), *Nitrogen Assimilation in Plants (lk 1-17)*. Reseach Signpost
- Palomo, A., Dechesne, A., Pedersen, A. G., and Smets, B. F. (2022). Genomic profiling of Nitrospira species reveals ecological success of comammox Nitrospira. *Microbiome*, 10(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01411-y>
- Paul, E. (2014). Soil Microbiology, Ecology, and Biochemisty: An Exiting Present and Great Future Built on Basic Konwledge and Unifying Concepts. E. Paul (toim), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (lk 1-13)*. USA: Academic Press
- Persat, A., Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N. S., Bassler, B. L., Gitai, Z., and Stone, H. A. (2015). The Mechanical World of Bacteria. *Cell*, 161(5), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005>
- Philip Robertson, G. (1997). Nitrogen Use Efficiency in Row-Crop Agriculture: Crop Nitrogen Use and Soil Nitrogen Loss. *Ecology in Agriculture (lk 347–365)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012378260-1/50011-7>
- Pold, G., Bonilla-Rosso, G., Saghai, A., Strous, M., Jones, C. M., and Hallin, S. (2024). Phylogenetics and environmental distribution of nitric oxide-forming nitrite reductases reveal their distinct functional and ecological roles. *ISME Communications*, 4(1), ycae020. <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycae020>
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., and Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5),

848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>

- Rehman, A., Farooq, M., Lee, D.-J., and Siddique, K. H. M. (2022). Sustainable agricultural practices for food security and ecosystem services. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(56), 84076–84095. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23635-z>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., and Andrade, M. J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. C. Basu (Toim), *PCR Primer Design* (1k 31–56). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
- Rotthauwe, J., Witzel, K., Liesack, W. (1997). The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Appl Environ Microbiol.* 63, 4704–4712.
- Ruijter J M, Ramakers C, Hoogaars W M H, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff M J B, et al. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37(6): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Rütting, T., Aronsson, H., and Delin, S. (2018). Efficient use of nitrogen in agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10705-017-9900-8>
- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-García, C., Rodríguez, G., Massol-Deyá, A., Krishnani, K. K., Ritalahti, K. M., Nissen, S., Konstantinidis, K. T., and Löffler, F. E. (2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19709–19714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211238109>
- Schnepf, E. (1983). The Structure of Cells (Prokaryotes, Eukaryotes). W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler (Toim), *Biophysics* (1k 1–19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-68877-5_1

- Şentürk, E., Atasoy, G., and Şanlıbaba, P. (2023). Ammonia-Oxidizing Bacteria: Biochemical and Molecular Characteristics. M. P. Shah (Toim), *Anammox Technology in Industrial Wastewater Treatment* (lk 11–33). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3459-1_2
- Shapleigh, J. P. (2006). The Denitrifying Prokaryotes. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (Toim), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* (lk 769–792). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_23
- Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., and Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 94(3), 277–281. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05331.x>
- Smith, C. J., and Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., and Ettema, T. J. G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Spiertz, J. H. J. (2009). Nitrogen, Sustainable Agriculture and Food Security: A Review. E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, and C. Alberola (Toim), *Sustainable Agriculture* (lk 635–651). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_39
- Stein, L. Y., and Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>

- Stein, L. Y., and Nicol, G. W. (2018). Nitrification. *eLS* (1k 1–9). John Wiley and Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021154.pub2>
- Su, R., Huang, R., Zeng, J., Zhao, D., He, R., Yu, Z., and Wu, Q. L. (2021). Rhizosphere-associated nosZII microbial community of *Phragmites australis* and its influence on nitrous oxide emissions in two different regions. *Journal of Soils and Sediments*, 21(10), 3326–3341. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02967-2>
- Torres-Olivar, V., Villegas-Torres, O. G., Domínguez-Patiño, M. L., Sotelo-Nava, H., Rodríguez-Martínez, A., Melgoza-Alemán, R. M., and Valdez-Aguilar, L. A. (s.a.). *Role of Nitrogen and Nutrients in Crop Nutrition*.
- Tourna, M., Freitag, T. E., Nicol, G. W., Prosser, J. I. (2008). Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ. Microbiol.* 10, 1357–1364. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x.
- van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., and Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Wallace, W., and Nicholas, D. J. D. (1969). The Biochemistry of Nitrifying Microorganisms. *Biological Reviews*, 44(3), 359–389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1969.tb01216.x>
- Walsh, D. A., and Doolittle, W. F. (2005). The real ‘domains’ of life. *Current Biology*, 15(7), R237–R240. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.034>
- Wang, M., Huang, G., Zhao, Z., Dang, C., Liu, W., Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresour. Technol.* 270, 580–587. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.089
- Xu, H., Sheng, R., Xing, X., Zhang, W., Hou, H., Liu, Y., Qin, H., Chen, C., and Wei, W.

- (2019). Characterization of Fungal nirK-Containing Communities and N₂O Emission From Fungal Denitrification in Arable Soils. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00117>
- Yang, Y.-D., Hu, Y.-G., Wang, Z.-M., and Zeng, Z.-H. (2018). Variations of the nirS-, nirK-, and nosZ-denitrifying bacterial communities in a northern Chinese soil as affected by different long-term irrigation regimes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(14), 14057–14067. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1548-7>
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
- Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., and Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528(7580), 51–59. <https://doi.org/10.1038/nature15743>
- Zheng, M., Tian, Z., Chai, Z., Zhang, A., Gu, A., Mu, G., Wu, D., and Guo, J. (2023). Ubiquitous occurrence and functional dominance of comammox *Nitrospira* in full-scale wastewater treatment plants. *Water Research*, 236, 119931. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119931>
- Zumft, W. G. (2004). Denitrification by Pseudomonads: Control and Assembly Processes. J.-L. Ramos (Toim), *Pseudomonas: Volume 3 Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism* (1k 193–227). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9088-4_7

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Monika Stjuf,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „, Nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsiooniprotsesside muutused erineva arbuskulaar-mükoriisete seente mitmekesisusega põllumuldades“, mille juhendajad on Mikk Espenberg ja Maarja Öpik, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Monika Stjuf

25.05.2025