

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

Bakalaureusetöö geograafias (12 EAP)

**Amazonase madaliku palmisoomuldade mikrobioloogiline  
lämmastikuringe ning selle seos dilämmastikoksiidi voogudega**

**Liina Hints**

Juhendajad: kaasprofessor Mikk Espenberg  
professor Ülo Mander

Tartu 2022

## **Annotatsioon**

### **Amazonase madaliku palmisoomuldade mikrobioloogiline lämmastikuringe ning selle seos dilämmastikoksiidi voogudega**

Dilämmastikoksiid ( $N_2O$ ) on suure globaalse soojenemise potentsiaaliga kasvuhoonegaas ja peamine osoonikihi lõhkuja. Olulisimaks  $N_2O$ -d emiteerivaks ökosüsteemiks peetakse troopilisi soid – ainuüksi Amazonase madaliku soodest lendub 6,5-7% kõigist  $N_2O$  emissioonidest. Sellele vaatamata on troopiliste soomuldade mikrobioloogilist lämmastikuringet siiani uuritud vähe. Bakalaureusetöö eesmärk oli analüüsida Peruu Iquitose piirkonna soomuldade lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsesside  $N_2O$  potentsiaali seoseid maakasutuse, muldade füüsikalise-keemiliste parameetrite ning sealt lähtuvate  $N_2O$  emissioonidega. Töö tulemustest selgus, et lämmastikuringe markergeene kandvate mikroorganismide arvukust mõjutas enim mullaniiskus.  $N_2O$  emissioonide ja markergeenide arvukuse vahelised seosed olid sesoonsed. Kuival aastaajal mõjutasid  $N_2O$  vooge positiivselt arhede *amoA* ja *nrfA* markergeenidega mikroorganismid. Märjal aastaajal mõjutasid  $N_2O$  vooge negatiivselt *nirS*, *nosZII* ja COMAMMOX *amoA* markergeene kandvad mikroorganismid, positiivselt aga *nir/nosZ* suhe.

Märksõnad: lämmastikuringe,  $N_2O$ , troopiline soomuld, maakasutus, Amazonase madalik

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

## **Abstract**

### **Microbial nitrogen cycle and resulting nitrous oxide fluxes in Amazonian peatland soils**

Nitrous oxide ( $N_2O$ ) is a potent greenhouse gas and the most important ozone-depleting emission. Tropical peatlands are regarded as major hotspots for  $N_2O$  emissions, as Amazonian peatlands alone account for 6.5-7% of the global  $N_2O$  flux. Even so, the microbial nitrogen cycle and resulting  $N_2O$  flows in tropical peatland soils remain largely unstudied. The aim of this bachelor's thesis was to assess the  $N_2O$  potential of microbiological processes in the nitrogen cycle in the Iquitos region of Peru depending on land use, physicochemical parameters and soil  $N_2O$  emissions. The results show that the abundance of microorganisms involved in the soil nitrogen cycle was most affected by soil moisture. Relationships between  $N_2O$  and

marker gene abundance displayed clear seasonality. During the dry season, N<sub>2</sub>O fluxes were positively affected by microorganisms with archaeal *amoA* and *nrfA* genes. During the wet season, N<sub>2</sub>O fluxes were negatively affected by microorganisms with *nirS*, *nosZII* and COMAMMOX *amoA* genes but positively affected by the proportion of *nir/nosZ*.

Keywords: nitrogen cycle, N<sub>2</sub>O, tropical peatland, land use, Amazon basin

CERCS code: P510 – Physical geography, geomorphology, pedology, cartography, climatology; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	8
1.1 Lämmastikuringe .....	8
1.1.1 Õhulämmastiku fikseerimine .....	8
1.1.2 Nitrifikatsioon.....	9
1.1.3 Denitrifikatsioon .....	10
1.1.4 DNRA .....	11
1.1.5 N <sub>2</sub> O kliimamuutuste tegurina.....	12
2.1 Troopiliste soode lämmastikuringe.....	13
2.1.1 Looduslikud palmisood.....	14
2.1.2 Põllumajandusliku kasutuse all olevad sood.....	16
1.3 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon .....	16
2. Metoodika .....	18
2.1 Uurimisala kirjeldus.....	18
2.2 Mullaproovide kogumine.....	20
2.3 DNA eraldamine mullaproovidest .....	20
2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil.....	20
2.5 Andmeanalüüs ja autori osalus .....	21
3. Tulemused.....	23
3.1 Keskkonnaparameetrid .....	23
3.2 Geenikoopiate arvukused.....	25
3.4 Geenikoopiate arvukuste seosed N <sub>2</sub> O emissioonidega .....	33
4. Arutelu .....	35
Kokkuvõte.....	38
Summary .....	39
Tänuavaldused .....	41
Kasutatud kirjandus .....	42
Lisad.....	53

## Kasutatud lühendid

*amoA* – nitrifikatsiooni esimese etapi markergeen ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$ )

AOA – ammoniaaki oksüdeerivad arhed

AOB – ammoniaaki oksüdeerivad bakterid

COMAMMOX (*complete oxidation of ammonia to nitrate*) – täielik ammooniumi oksüdeerimine

DNRA (*dissimilatory nitrate reduction to ammonium*) – dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks

$\text{N}_2$  – molekulaarne lämmastik ehk õhulämmastik

$\text{N}_2\text{O}$  – naerugaas ehk dilämmastikoksiid

$\text{NH}_3$  – ammoniaak

$\text{NH}_4^+$  – ammoonium

*nifH* – lämmastiku fikseerimise markergeen ( $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$ )

*nirK* – denitrifikatsiooni markergeen ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ )

*nirS* – denitrifikatsiooni markergeen ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ )

$\text{NO}_2^-$  – nitritlämmastik

$\text{NO}_3^-$  – nitraatlämmastik

*nosZI* – denitrifikatsiooni markergeen ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ )

*nosZII* – denitrifikatsiooni markergeen ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ )

*nrfA* – DNRA markergeen ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ )

qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) – kvantitatiivne ehk reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon

WFPS (*water-filled pore space*) – mullapooride veesisaldus

## Sissejuhatus

Maailma ökosüsteemide tervise ja tasakaalu säilitamises mängivad suurt rolli mitmekesise fülogeneesi ja funktsiooniga mikroorganismid (Cavicchioli *et al.*, 2019). Bakterid, arhed (koguliigirikkusega  $\sim 10^{30}$ ) (Flemming & Wuertz, 2019) ja ka seened (Hayatsu *et al.*, 2007) moodustavad biosfääris kõrgematel troofilistel tasemetel elu võimaldava tugisüsteemi ning mängivad võtmerolli näiteks süsiniku ja toitainete ringluses ning ülemaailmses toiduvõrgus (Cavicchioli *et al.*, 2019). Mikroobide vahendusel toimuvad muldades ka paljud lämmastikuringe protsessid (Braker & Conrad, 2011). Lämmastik on kõigile organismidele eluks vajalik, ent paljudes süsteemides piiratud kättesaadavusega element ning seetõttu peamine taimekasvu limiteeriv toitaine (Kuypers *et al.*, 2018). Atmosfääris on lämmastikuarvud  $N_2$  kujul küll suured, ent enamik organisme suudavad lämmastikku kasutada ainult lihtsamini omistatavate lämmastikuühendite, näiteks ammooniumi ja nitraatide koosseisus (Kuypers *et al.*, 2018). Looduslikes kooslustes sõltub lämmastikuühendite kättesaadavus metaboolselt mitmekesiste mikroobikoosluste vahendatud keerulistest redoksreaktsioonidest (Kuypers *et al.*, 2018), mille käigus lämmastik liigub oksüdatsiooniastmete -3 kuni 5 vahel (Galloway *et al.*, 2004; Hayatsu *et al.*, 2008). Lämmastikuringe olulisemad mikroobsed protsessid on õhulämmastiku fikseerimine, nitrifikatsioon (sh täielik ammooniumi oksüdeerimine ehk COMAMMOX), denitrifikatsioon ning DNRA ehk dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (Espenberg *et al.*, 2018). Teatud keskkonnatingimustes on kaalukad ka anaeroobse ammooniumi oksüdeerimine (ANAMMOX) (Mulder *et al.*, 1995) ning nitritist sõltuva anaeroobse metaani oksüdeerimine (N-DAMO) (Liu *et al.*, 2020).

Lämmastikuringesse kuulub ka kasvuhooneefekti põhjustav dilämmastikoksiid ehk naerugaas ( $N_2O$ ), mis tuleneb peamiselt nitrifikatsioonist või denitrifikatsioonist.  $N_2O$  emissioonide dünaamika sõltub mitmest tegurist, näiteks mulla  $NO_3^-$  sisaldusest (Groffman *et al.*, 2009; Pärn *et al.*, 2018; van Lent *et al.*, 2019), temperatuurist (Skiba & Smith, 2000), mullaniiskusest (Davidson *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2013; Hergoualc'h *et al.*, 2020) ja piirkonda mõjutavate häiringute iseloomust ning sagedusest (Pärn *et al.*, 2019). Looduslike ja antropogeensete tegurite koosmõjul suurenev kasvuhoonegaaside, sealhulgas  $N_2O$  kontsentratsioon atmosfääris toob endaga kaasa kliima soojenemise (Hergoualc'h *et al.*, 2020), sademete mahu muutuse ja globaalse ümberjaotumise (Collins *et al.*, 2013) ning ekstreemsete ilmastikusündmuste sagenemise (Cavicchioli *et al.*, 2019).  $N_2O$  emissioonid on võrreldes süsihappegaasi ( $CO_2$ ) emissioonidega küll väiksemad, ent  $N_2O$  globaalse soojenemise potentsiaal on  $CO_2$  omast

hinnanguliselt 298 korda kõrgem (Myhre *et al.*, 2013). Lisaks on N<sub>2</sub>O peamine stratosfääri osoonikihi lõhkuja (Ravishankara *et al.*, 2009; Bahram *et al.*, 2022).

Teave N<sub>2</sub>O vooge mõjutavate tegurite kohta on vajalik, modelleerimaks pikaajalisi globaalseid muutusi (Ryan & Law, 2005) ning leidmaks efektiivseid strateegiaid N<sub>2</sub>O heitkoguste vähendamiseks (Hallin *et al.*, 2018). Kui intensiivses põllumajanduslikus kasutuses olevate muldade mikroobseid kooslusi ning neist lähtuvaid N<sub>2</sub>O voogusid on uuritud juba aastakümneid, siis looduslikud mullad – eriti soomullad – on siiani tähelepanu saanud vähe (van Lent *et al.*, 2015). Ehkki nitraatväetiste kasutamine põllumajanduses on mulda sattuvate lämmastikühendite hulka kahekordistanud (Kuypers *et al.*, 2018), lähtub 56% kõigist N<sub>2</sub>O emissioonidest just looduslikelt muldadelt, kusjuures enim N<sub>2</sub>O-d toodavad troopilised soomullad (Werner *et al.*, 2007; Gallaroti *et al.*, 2021). Ligi pooled maailma turbaaladest asuvad Amazonase madalikul (Leifeld & Menichetti, 2018): sealt lähtub hinnanguliselt 6,5-7% (2 kuni 3 Tg N<sub>2</sub>O– N a<sup>-1</sup>) kõigist N<sub>2</sub>O emissioonidest (Figueiredo *et al.*, 2019). Vaatamata Amazonase madaliku mastaapsele rollile globaalses lämmastikuringes ning kliimamuutustes, on N<sub>2</sub>O vooge kirjeldatud sealsetelt erineva maakasutuse ning keskkonnatingimustega aladelt tänaseni vähe (Pärn *et al.*, 2018; Espenberg *et al.*, 2018).

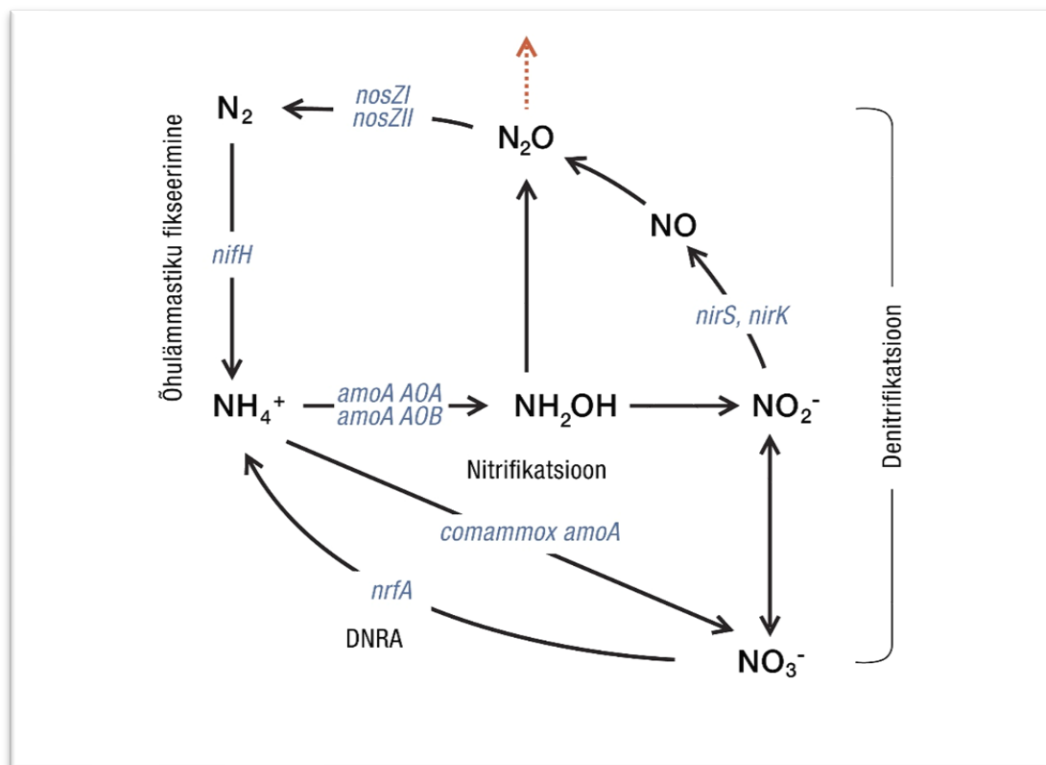
Teadmised lämmastikuringes osalevatest mikroorganismidest ja nende juhitud protsessidest on tänu molekulaarsete uurimismeetodite kasutuselevõtule viimase paarikümne aastaga oluliselt laienenud (Braker & Conrad, 2011): näiteks avastati 2015. aastal täieliku ammooniumi oksüdeerimise rada (COMAMMOX), mis on iseloomulik *Nitrospira* perekonna liikmetele (van Kessel *et al.*, 2015). Molekulaarsed meetodid võimaldavad nitrifitseerijaid ja denitrifitseerijaid uurida otse nende elukeskkonnas, hinnates markergeenide abil lämmastikuringe funktsionaalsete rühmade mitmekesisust, suurust ja rolli N<sub>2</sub>O tootmises (Braker & Conrad, 2011). Üks meetod lämmastikuringe protsesside hindamiseks on kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR), mis aitab tuvastada lämmastikuringe etappe iseloomustavate markergeenide olemasolu ja nende arvukust erinevates keskkondades (Smith & Osborn, 2009).

Bakalaureusetöö eesmärk on analüüsida Peruu Iquitose piirkonna soomuldade lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsesside N<sub>2</sub>O potentsiaali seoseid maakasutuse, muldade füüsikalise-keemiliste parameetrite ning sealt lähtuvate N<sub>2</sub>O emissioonidega.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Lämmastikuringe

Lämmastik on kõigile elusorganismidele vajalik valkude, nukleiinhapete ja orgaaniliste ühendite valmistamiseks (Kuypers *et al.*, 2018). Ehkki molekulaarse lämmastiku ( $N_2$ ) varu atmosfääris on äärmiselt suur, on see bioloogiliselt kättesaadav vaid mõnedele lämmastikku fikseerivatele bakteritele ja arhedele (Broke *et al.*, 2011). Nende mikroobikoosluste suurus ja mitmekesisus mõjutavad lämmastiku kättesaadavust ja seeläbi ka ökosüsteemide võtmeotsesse (Kuypers *et al.*, 2018). Vajadus lihtsamini omistatavate lämmastiku vormide järele käivitab lämmastikuringe, milles lämmastik liigub oksüdatsiooniastmete  $-3$  kuni  $+5$  vahel ning mille sulgeb lämmastiku jõudmine tagasi atmosfääri  $N_2$ , aga teatud juhtudel ka  $N_2O$  või  $NO$ -na (Galloway *et al.*, 2004). Ligi 70% kasvuhooneefekti põhjustavast  $N_2O$ -st tekib kahe lämmastikuringe põhiprotsessi, nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni käigus (Syakila & Kroeze, 2011).



Joonis 1. Lämmastikuringe protsessid ja nende markergeenid (kohandatud Levy-Booth *et al.* (2014) järgi)

### 1.1.1 Õhulämmastiku fikseerimine

Õhulämmastiku sidumine on protsess, mille käigus nitrogeenase ensüümi kandvad bakterid ja arhed viivad molekulaarse lämmastiku selle reaktiivsematesse vormidesse (näiteks  $NH_3$ )

(Kuypers *et al.*, 2018), mida suudavad elutegevuseks kasutada ka taimed ja teised mullaorganismid (Galloway *et al.*, 2004). Hapnik inhibeerib nitrogeenaasi (Kuypers *et al.*, 2018). Samas on ka fototroofide seas lämmastiku sidujaid, näiteks tsüanobakterite hõimkonda kuuluv *Trichodesmium* (Wu *et al.*, 2018): sellistel organismidel on võime fotosünteesi ja lämmastiku fikseerimist ajaliselt või ruumiliselt eraldada (Wu *et al.*, 2018). Lämmastiku sidumist iseloomustavad arvukad sümbioossed suhted (Kuypers *et al.*, 2018). Nitrogeenaasi ensüümi markergeenina kasutatakse *nifH*-d (Ueda *et al.*, 1995; Levy-Booth *et al.*, 2014).

### 1.1.2 Nitrifikatsioon

Nitrifikatsiooni on varasemalt teatud peamiselt kaheetapilise aeroobse protsessina, mille eesmärk on ammooniumiooni ( $\text{NH}_4^+$ ) või ammoniaakiooni ( $\text{NH}_3$ ) koosseisus mulda seotud lämmastik oksüdeerida esmalt nitritiooniks ( $\text{NO}_2^-$ ) ja seejärel nitraatiooniks ( $\text{NO}_3^-$ ), mis on kergemini lahustuv ning taimedele ja paljudele teistele mullaorganismidele elutegevuseks kasutatav (Espenberg *et al.*, 2018). Nitrifikatsiooni esimene etapp jaguneb omakorda kaheks: esmalt oksüdeeritakse ammooniumioon hüdrosüülamiiniks ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), seejärel nitritiooniks (Kuypers *et al.*, 2018).

Nitrifikatsiooni esimest etappi viivad läbi peamiselt *Traumarchaeota* ja *Crenarchaeota* hõimkondadesse kuuluvad arhed (Schleper & Nicol, 2010) ning *Betaproteobacteria* ja *Gammaproteobacteria* hõimkondadesse kuuluvad kemolitoautotroofsed bakterid (Arp & Stein, 2003), kellest olulisimad perekonnad on *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* ja *Nitrosospira* (Koops & Möller, 1992). Kuna arhed on võimelised ammoniaagi oksüdeerimiseks kasutama väiksema hapnikuvajadusega rada, võib nende roll nitrititsemisel olla suurem just väikse hapnikusisaldusega muldades (Schleper & Nicol, 2010). Ammoniaagi või ammooniumi oksüdeerimist hüdrosüülamiiniks katalüüsib ensüüm ammoniaagi monooksügenaas (AMO) (Kuypers *et al.*, 2018), mida kodeerivad veidi erinevad *amoA* markergeenid bakterites ja arhedes (Li *et al.*, 2014). Hüdrosüülamiini keemilisel lagunemisel võib küll tekkida  $\text{N}_2\text{O}$  (Wrage *et al.*, 2005), ent nitriti teke on sellest protsessist alati mitme suurusjärgu võrra suurem (Arp & Stein, 2003). Lisaks on võimalik, et tekkinud nitrit redutseeritakse  $\text{NO}$ -ks ja seejärel  $\text{N}_2\text{O}$ -ks nitrititsemisjate vahendatud denitrifikatsiooni (*nitrifier denitrification*) käigus (Wrage *et al.*, 2001). Nitrititsemisjate vahendatud denitrifikatsiooni viivad läbi mitmed ammoniaaki oksüdeerivad mikroorganismid (Wrage *et al.*, 2018).

Nitrifikatsiooni teises etapis oksüdeeritakse  $\text{NO}_2^-$   $\text{NO}_3^-$ -ks (Kuypers *et al.*, 2018). Selles etapis osalevad peamiselt nitritit oksüdeerivad bakterid hõimkondadest *Alpha-*, *Beta-* ja

*Gammaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Nitrospinae* ja *Nitrospirae* (Levy-Booth *et al.*, 2014; Feng, 2016).

Mõned organismid võivad nitrifikatsiooni ka üksinda läbi viia – sel juhul on tegu täieliku ammooniumi oksüdatsiooni ehk COMAMMOX-iga (Daims *et al.*, 2015). COMAMMOX-i olemasolu üle teoretiseeriti juba 2006. aastal, sest üheetapiline nitrifikatsioon kulutab kaheetapilisest vähem energiat (Costa *et al.*, 2007). 2015. aastal avastatud COMAMMOX-i rada kasutavad *Nitrospira* perekonda kuuluvad bakterid (Koch *et al.*, 2017), kes võivad olenevalt keskkonnatingimustest viia läbi ka ainult nitrifikatsiooni esimese etapi ehk  $\text{NH}_4^+$  või  $\text{NH}_3$  oksüdeerimise  $\text{NO}_2^-$ -ks (Kuypers *et al.*, 2018).

### 1.1.3 Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on enamasti anaeroobne kolme- või neljaetapiline lämmastikuringe protsess, mille käigus lämmastiku oksüdeeritud vormid ( $\text{NO}_3^-$  või  $\text{NO}_2^-$ ) redutseeritakse läbi vaheühendite järk-järgult atmosfääri eralduvaks õhulämmastikuks (Cavicchioli *et al.*, 2019). Denitrifikatsiooni peetakse lämmastikuringe sulgevaks protsessiks, sest selle tagajärjel jõuab eelnevalt seotud  $\text{N}_2$  tagasi atmosfääri (Philippot *et al.*, 2009b). Denitrifitseerijate mikroorganismide hulka kuuluvad mitmekesise fülogeneesi ja kohastumusega valdavalt heterotroofsed bakterid (Philippot *et al.*, 2007) ja arhed (Hallin *et al.*, 2018), aga ka seened, kes kuuluvad peaaesjalikult *Ascomycota* hõimkonda (Mothapo *et al.*, 2015).

Denitrifikatsiooni esimene etapp on nitraadi ( $\text{NO}_3^-$ ) redutseerimine nitritiks ( $\text{NO}_2^-$ ). Sellele järgneb nitriti redutseerimine lämmastikoksiidiks (NO) (Braker *et al.*, 2011). Nitriti redutseerimist kontrollivad ja katalüseerivad heemi sisaldava nitriti reduktaasi (*nirS*) ja vaske sisaldava nitriti reduktaasi (*nirK*) geenid (Espenberg *et al.*, 2019), mis täidavad küll sama funktsiooni, ent on struktuurilt ja fülogeneesilt üsna erinevad (Braker *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2008). *nir* geenid võimaldavad molekulaarsete uurimismeetodite rakendamisel tuvastada ka heterotroofsest nitrifikatsioonist ning nitritifitseerijate vahendatud denitrifikatsioonist lähtuvaid  $\text{N}_2\text{O}$  vooge (Cantera & Stein, 2007), mistõttu sobivad nitriti reduktaasid võrreldes teiste ensüümidega paremini denitrifitseerijate koosluste mitmekesisuse uurimiseks (Braker *et al.*, 2011).

Denitrifikatsiooni kolmas etapp on NO redutseerimine  $\text{N}_2\text{O}$ -ks, ning viimases etapis moodustub  $\text{N}_2\text{O}$ -st  $\text{N}_2$  (Braker *et al.*, 2011). Samas ei pruugi sõltuvalt uuritavast mikroobikooslusest ja valitsevatest keskkonnatingimustest denitrifikatsiooni viimast etappi üldse toimuda. Sel juhul lendub atmosfääri  $\text{N}_2\text{O}$ . Mittetäielik denitrifikatsioon on üks

suurimaid atmosfäärsete N<sub>2</sub>O emissioonide allikaid ning põhjuseid tsükli katkemises on mitmeid (Kuypers *et al.*, 2018). N<sub>2</sub>O redutseerimist õhulämmastikuks juhib N<sub>2</sub>O *nosZ*, mida on tuvastatud kahest, fülogeneetiliselt erinevast klaadist: *nosZ* klaad I ja *nosZ* klaad II (Orellana *et al.*, 2014). Jones *et al.* (2008) leidsid oma töös, et umbes üks kolmandik kõigist uuritud denitrifitseerijatest kandis *nir*-, ent mitte *nos*-geeni, mis tähendab, et suur osa denitrifitseerijatest pole funktsionaalselt võimelised seda etappi läbi viima. Samas on avastatud ka mikroobe, kes kannavad ainult *nos*-geeni ning aitavad N<sub>2</sub>O vooge vähendada (Graf *et al.*, 2014). Denitrifikatsioon võib olla mittetäielik ka siis, kui keskkonna hapnikusisaldus tõuseb ning N<sub>2</sub>O lendub enne, kui mikroorganismid jõuavad selle õhulämmastikuks redutseerida (Broke *et al.*, 2011). Seetõttu on mittetäieliku denitrifikaatsiooni osakaal suur keskmise niiskusesisaldusega muldades (Broke *et al.*, 2011), kus on piisavalt hapnikku nii nitrifikatsiooni toimumiseks kui ka denitrifikatsiooni katkemiseks (Moyano *et al.*, 2013; Pärn & Mander, 2018; Hergoualc'h *et al.*, 2020).

#### 1.1.4 DNRA

DNRA ehk dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks on anaeroobne protsess, mille käigus NO<sub>3</sub><sup>-</sup> redutseeritakse NO<sub>2</sub><sup>-</sup> kaudu ammooniumiks (Tiedje, 1988). Ehkki DNRA-d peetakse lämmastikku mullas hoidvaks protsessiks (Rütting *et al.*, 2011) ning N<sub>2</sub>O pole DNRA peamine produkt, võib see redoksreaktsiooni kõrvalsaadusena siiski eralduda (Silver *et al.*, 2001). DNRA osakaal globaalsetest N<sub>2</sub>O emissioonidest ei ole teada, ent on selge, et DNRA ülekaalu võrreldes teise NO<sub>3</sub><sup>-</sup> redutseerimise raja ehk denitrifikatsiooniga põhjustavad keskkonnatingimused (Tiedje, 1988). DNRA võib olla peamine N<sub>2</sub>O allikas NO<sub>3</sub><sup>-</sup> vaestes süsinikurikastes muldades (Tiedje, 1988; Rütting *et al.*, 2011; Kraft *et al.*, 2014). DNRA olulisust on täheldatud eelkõige troopiliste muldade puhul: Silver *et al.* (2001) leidsid troopilisi mägismaamuldi uurides, et sealsed DNRA määrad on ligi kolm korda kõrgemad denitrifikatsiooni määradest, ning Templer *et al.* (2008) tuvastasid sarnase mustri Puerto Rico troopilistest metsamuldadest. DNRA-d viivad läbi mikroorganismid, kes kannavad nitriti reduktaasi kodeerivat geeni *nrfA*: kõrge *nrfA:nosZ* geenikoopiate suhe viitab DNRA olulisusele uuritavas keskkonnas (Pandey *et al.*, 2020). Kuna paljud DNRA rada kasutavad mikroorganismid võivad olenevalt keskkonnatingimustest N<sub>2</sub>O-d nii siduda kui ka eraldada (Mania *et al.*, 2014), on DNRA üks potentsiaalne protsess, mis võib tulevikus aidata vähendada denitrifikatsioonist põhjustatud N<sub>2</sub>O määrasid (Pandey *et al.*, 2020).

### 1.1.5 N<sub>2</sub>O kliimamuutuste tegurina

N<sub>2</sub>O on stabiilne, inertne ja troposfääris ohutu gaas, mis stratosfääri jõudes päikesekiirguse toimel laguneb ja reageerib osoonikihti moodustavate ühenditega (Ravinshankara *et al.*, 2009). Võrreldes tööstusrevolutsiooni eelse ajaga on N<sub>2</sub>O atmosfäärne kontsentratsioon kasvanud hinnanguliselt 16-20% ning selle osakaal antropogeenselt kasvuhooneefektist on umbes 6% (IPCC, 2007). Inimtegevus, eelkõige maakasutusmuutused ja lämmastikväetiste kasutamine põllumajanduses on ligi kahekordselt tõstnud mulda jõudvate lämmastikuühendite hulka (Kuypers *et al.*, 2018) ning kasvava globaalse rahvaarvu taustal suureneb toiduvajadus ilmselt veelgi. Praegu ületavad globaalsed N<sub>2</sub>O emissioonid N<sub>2</sub>O globaalse sidumisvõime, mistõttu atmosfäärne N<sub>2</sub>O kontsentratsioon kasvab 0,26% aastas (Charpuis-Lardy *et al.*, 2007).

See, kas lämmastik jõuab tagasi atmosfääri lämmastikoksiidi (NO), kasvuhooneefekti tekitava N<sub>2</sub>O või N<sub>2</sub> kujul, sõltub lämmastikuringe protsesse ja nendega seotud mikrobikooslusi mõjutavatest keskkonnateguritest (Firestone & Davidson, 1989). N<sub>2</sub>O lendumine on tugevas positiivses korrelatsioonis mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sisaldusega ning nitraatväetiste kasutamise mõju N<sub>2</sub>O voogude intensiivistumisele on korduvalt tõestatud (Groffman *et al.*, 2009; Pärn *et al.*, 2018). Paraku ei suuda see tegur seletada ei looduslikelt aladelt lähtuvaid N<sub>2</sub>O emissioone ega kirjeldada täielikult ära ka põllumajanduslike alade lämmastikuringe dünaamikat (van Lent *et al.*, 2019). Looduslike alade N<sub>2</sub>O allikaid ja mahte mõjutab tugevalt mulla veesisaldus, mis on seotud mulla hapnikusisaldusega (Pärn *et al.*, 2018; Espenberg *et al.*, 2018). Mulla veesisalduse kirjeldamiseks kasutatakse tihti protsentuaalset näitajat WFPS ehk veega täidetud pooriruum (*water-filled pore space*) (van Lent *et al.*, 2015). Mineraalsetel muldadel soosib denitrifikatsiooni mulla keskmisest kõrgem niiskuseaste (WFPS 50-70%, N<sub>2</sub>O emissioonide maksimum WFPS 60% juures) (Linn & Doran 1984), sest kuivemates muldades muutub piiratud veehulk mikrobioloogilisele tegevusele limiteerivaks ning märgades muldades on hapniku vähesus takistuseks aeroobsetele nitrifikatsiooniprotsessidele (Moyano *et al.*, 2013). Pärn *et al.* (2018) troopiliste orgaanikarikkade muldade uurimistöös paigutus N<sub>2</sub>O maksimum 50% mullaniiskuse juurde. Van Lent *et al.* (2019) mõõtis troopilistest turbamuldadest N<sub>2</sub>O maksimumid aga hoopis 100% ja 84% WFPS juures, mis tähendab, et teatud tüüpi muldades võib aeroobse nitrifikatsiooni kaal olla väga väike ning kogu N<sub>2</sub>O pärineb denitrifikatsioonist. Seda tüüpi muldades võib olulise kaaluga olla ka DNRA (Silver *et al.*, 2001; Templer *et al.*, 2008).

Teised N<sub>2</sub>O lendumist soodustavad tegurid on vahelduv hapnikurežiim (Pärn *et al.*, 2021) (näiteks ajutise üleujutusega alad või intensiivsete saju- ja põuaperioodide vaheldumine), kõrge

mullatemperatuur optimumiga 24°C (Skiba & Smith, 2000; Pärn *et al.*, 2018) ning pH-tase, mis kattub denitriifitseerivate mikroobide optimumiga (Skiba & Smith, 2000; Qian *et al.*, 2019; Saleh-Lakha *et al.*, 2009). Aastaringselt soojade ja niiskete tingimuste ning aina mastaapsema maakasutusmuutuse tõttu panustavad N<sub>2</sub>O emissioonidesse enim just troopilised soometsad (Werner *et al.*, 2007).

## 2.1 Troopiliste soode lämmastikuringe

Sood on ainulaadsed ökosüsteemid, mis akumulatsioonid veega küllastunud tingimustes orgaanilist ainet (Joosten & Clarke, 2002), reguleerivad ulatuslike alade veerežiimi (Bullock & Acreman, 2003) ning mängivad rolli toitainete, sh lämmastiku ringluses (Page *et al.*, 2006). Troopiliste soode ulatust ja mahtu on viimaste aastate uurimuste tagajärjel hinnatud varasemast ligi kolm korda suuremaks (Gumbricht *et al.*, 2017) – kokku katavad troopilised sood umbes 1,7 miljonit km<sup>2</sup> (Gumbricht *et al.*, 2017), mis on ligikaudu 11% kõigist maailma soodaldest (Leifeld & Menichetti, 2018). Umbes pool troopilistest soodest paikneb Lõuna-Ameerikas Amazonase madalikul, ülejäänud koonduvad peamiselt Kongo nõkku ja Kagu-Aasiasse (Leifeld & Menichetti, 2018).

Soomuldi ning sealseid lämmastikuringe protsessides osalevaid mikroobikooslusi on uuritud vähe (Espenberg *et al.*, 2018). Samas erineb turbamuldade lämmastikuringe märkimisväärselt mineraalsete muldade lämmastikuringest, kusjuures võivad soomuldades tavapärasest olulisemat rolli mängida nii DNRA (Silver *et al.*, 2001; Templer *et al.*, 2008; Espenberg *et al.*, 2018) kui ka nitriifitseerijate vahendatud denitrifikatsioon (Hergoualc'h *et al.*, 2020). Oluliseks mõjutajaks peetakse troopiliste soomuldade äärmiselt kõrget veesisaldust, mis mineraalsetel muldadel N<sub>2</sub>O lendumisega seotud protsesse takistab (Moyano *et al.*, 2013; van Lent *et al.*, 2015), ent soomuldades võib neid isegi soodustada (van Lent *et al.*, 2019). Ehkki aastaringselt veega küllastunud soomuldi peetakse suhteliselt stabiilseteks, ähvardavad N<sub>2</sub>O emissioonid tulevikus tõusta nii sood mõjutavate antropogeensete kui ka looduslike häiringute tõttu (Turetsky *et al.*, 2015). Maailma troopilised sooad on mitmesuguse maakasutusega ning kuigi suurem osa neist on endiselt looduslikud, on aina tavalisem ka põllumajanduslikul eesmärgil soode kuivendamine ja põletamine (van Lent *et al.*, 2015). Lisaks juba esinevatele looduslikele häiringutele, nt sesoonsetele üleujutustele (Guilhen *et al.*, 2020), võivad looduslikud häiringud tulevikus sagedana ka kliimamuutuste süvenemisega (Cole *et al.*, 2022).

### 2.1.1 Looduslikud palmisood

Kolmest olulisemast troopiliste soolade piirkonnast võib valdavalt looduslikuks pidada kahte – Amazonase madaliku ja Kongo nõo vihmametsasid (Gumbricht *et al.*, 2017). Kagu-Aasia sood on laialdaselt kuivendatud ja põllumajanduslikus kasutuses (Gaveau *et al.*, 2014), mistõttu nende panust kasvuhoonegaaside voogudesse on uuritud enim (van Lent *et al.*, 2015). Amazonase ja Kongo vihmametsade ekstensiivsed palmisood on aga kehva ligipääsetavusega, mistõttu raadamise ja kuivendamise asemel on seal siiani domineerima jäänud looduslikud protsessid ja nendega seotud häiringud (Pärn *et al.*, 2019).

Ehkki ainuüksi Amazonase vihmametsa muldadest (ja teatud määral puutüvedest (Figueiredo *et al.*, 2019; Soosaar *et al.*, 2022) lendub umbes 6,5%-7% (Figueiredo *et al.*, 2019), mõnedel hinnangutel 12-18% (Saikawa *et al.*, 2014) globaalsest N<sub>2</sub>O-st, on sealseid soomuldaseid ja neis toimuvaid mikroobseid lämmastikuringe protsesse uuritud vähe (van Lent *et al.*, 2015; Teh *et al.*, 2017) ning senisedki uurimused on andnud kohati vastuolulisi tulemusi. Pärn *et al.* (2019) mõõtsid Peruu Iquitose piirkonna N<sub>2</sub>O vooge erineva maakasutusega aladelt ning tuvastasid looduslikust palmisoomullast ligi kümme korda kõrgema N<sub>2</sub>O voo (310 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> *Mauritia flexuosa* palmide ja 130 µg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> *Symphonia globulifera* alt) kui sekundaarsest palmimetsast või põllumajanduseks kuivendatud alalt. Ka Figueiredo *et al.* (2019) looduslikust soometsast mõõdetud emissioonid jäävad samasse suurusjärku. Teh *et al.* (2017) seevastu leidsid, et Iquitose piirkonna soomuldade N<sub>2</sub>O vood on väiksed ja globaalset tasandit arvestades ebaolulised, kusjuures ei leidnud nad statistiliselt olulist vahet ka erineva maakasutusega alade N<sub>2</sub>O voogudes. Kuigi enamik Amazonase vihmametsades tehtud mõõtmisi kinnitavad looduslike ja antropogeensete häiringute (sh maakasutusmuutuse) mõju N<sub>2</sub>O lendumise dünaamikale (van Lent *et al.*, 2015; Espenberg *et al.*, 2018; Guilhen *et al.*, 2020), on siiani selgusetu, millised tegurid mikroobseid lämmastikuringe protsesse troopikas enim mõjutavad.

Vastandlikke tulemusi on andnud ka sesoonsuse mõju uurimine Amazonase N<sub>2</sub>O voogudele. Mulla veesisaldus ja sellega koos muutuvad hapnikutingimused on lämmastikuringe protsesse tugevalt kontrollivad tegurid (Davidson *et al.*, 2000; Moyano *et al.*, 2013; van Lent *et al.*, 2015; Hergoualc'h *et al.*, 2020). Amazonase vihmametsades eristub sajumustrite põhjal kaks aastaaega: märg aastaaeg detsembrist aprillini ning kuiv aastaaeg juunist oktoobrini (van Lent *et al.*, 2019). Vihmahooaeg toob suurel osal Amazonase madalikust kaasa üleujutused, mis muudavad mulla veesisaldust ja hapnikutingimusi ning võivad soodustada denitrifikatsiooni, sh mittetäielikku denitrifikatsiooni (Guilhen *et al.*, 2020). Guilhen *et al.* (2020) modelleerisid

denitrifikatsiooni protsesse ja N<sub>2</sub>O vooge Amazonase madalikul ning leidsid selge hooajalise mustri, kus märja hooajaga seostuva üleujutusperioodi ajal on soomuldades valdav protsess denitrifikatsioon ning kuival hooajal, üleujutuste vahel valdab hapnikurikkamates tingimustes muldi nitraatidega rikastav nitrifikatsioon. Van Lent *et al.* (2019) mõõtsid troopilistest turbamuldadest suurimaid N<sub>2</sub>O emissioone 80-100% pooride veesisalduse juures. Kuna mineraalmuldades peetakse N<sub>2</sub>O lendumiseks soodsaks vahemikku 50-70% WFPS, pakkusid van Lent *et al.* välja, et troopilistes turbamuldades on nitrifikatsiooni määr väike ning sisuliselt kogu N<sub>2</sub>O pärineb denitrifikatsioonist. See ei pruugi olla tõenäoline, sest Inatomi *et al.* (2019) andmetel on nitrifikatsiooni osakaal N<sub>2</sub>O emissioonides Amazonases tavalult kõrge – umbes 10%. See võib viidata nitrifitseerijate vahendatud denitrifikatsiooni aktiivsusele sealsetes soomuldades (Wrage *et al.*, 2018; Hergoualc'h *et al.*, 2020). Samas sobitub van Lenti *et al.* teooria kokku Guilheni *et al.* (2020) mudeliga, kus märjemal aastaajal toimub anaeroobne denitrifikatsioon ning nitrifikatsiooni määr kasvab kuivemal aastaajal. Ka teised viimaste aastate mõõtmised Peruus kinnitavad üleujutuste panust denitrifikatsiooni N<sub>2</sub>O voogude suurenemisse (Figueiredo *et al.*, 2019; Pärn *et al.*, 2021). Van Lenti *et al.* (2019) mõõtmiste näitel on selge, et mineraalsete muldade põhjal koostatud mudeleid ei saa turbasoomuldade uurimiseks rakendada, sest troopilised soomullad võivad olla aastaringselt veega küllastunud – see peaks need häiringute puudumisel muutma suhteliselt stabiilseteks (Turetsky *et al.*, 2015). Eelnimetatud teooria on vastuolus 2018. aasta Peruu soomuldade kasvuhooaegaseid mõõtmistega, kus looduslikest palmisoomuldadest mõõdeti tavalult suured N<sub>2</sub>O lendumise määrad, ent mullanäitajates puudusid viited ükskõik millisele suuremale häiringule (Pärn *et al.*, 2019), mida siiani on peetud N<sub>2</sub>O lendumise eelduseks stabiilsetest veega küllastunud muldadest (Rubol *et al.*, 2012; Pärn *et al.*, 2018). Kuna Amazonase madalikul esineb vaheldumisi nii toitainerikkaid mineraalmuldi kui ka toitainevaeseid turbamuldi (Lähteenoja *et al.*, 2009), võib sealsete mikroobikoosluste käitumine vastavalt mulla veehoiuvõimele ja hooajalisele pealekandele olla kohaspetsiifiline ka väiksel skaalal.

Lisaks veerežiimist tingitud looduslikele häiringutele esineb palmisoodes ka antropogeenne häiringutegur: nimelt kasutatakse palmisoometsade enimlevinud liigi, võnk-buritipalmi (*Mauritia flexuosa*) vilju söögiks (Hergoualc'h *et al.*, 2020). Viljade kättesaamiseks langetatakse tavaliselt terve palm (Hergoualc'h *et al.*, 2020). Ehkki kuivendamist või alepõllundusega seotud põletamist ei toimu, võib ekstensiivne palmide langetamine põhjustada ennustamatuid muutusi metsade struktuuris ja koosseisus, mis omakorda toob kaasa muutused mulla mikroobioomis (van Lent *et al.*, 2019). See, kas ja kuidas võnk-buritipalmide langetamine

tulevikus N<sub>2</sub>O voogude dünaamikat mõjutab, on väheuuritud ja ebaselge (van Lent *et al.*, 2019), ent on kindel, et praegused teadmised troopilistest soomuldadest ja nende mikrobiomist on ebapiisavad, hindamaks nende muldade N<sub>2</sub>O potentsiaali ning seda kontrollivaid keskkonnategureid.

### 2.1.2 Põllumajandusliku kasutuse all olevad sood

Põllumajandus on suurim antropogeense N<sub>2</sub>O allikas (Broke *et al.*, 2011; Kuypers *et al.*, 2018). Põllumajandusega seotud maakasutusmuutuste (sh raadamise, kuivendamise, põletamise) ning lämmastikväetiste kasutamise tõttu paisatakse atmosfääri ligi pool globaalselt N<sub>2</sub>O-st (Cavicchioli *et al.*, 2019). Lämmastik- ja fosforväetiste kasutamine kasvas vahemikus 1960-1995 seitsmekordselt, ning aina jätkuv rahvaarvu tõus toob kaasa suurenenud toiduvajaduse, mille rahuldamiseks jätkub tõenäoliselt nii looduslike alade “põllumaastamine” kui ka intensiivne väetamine (Broke *et al.*, 2011). NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kättesaadavust mullas peetakse üheks olulisimaks denitrifikatsiooni soodustajaks (Groffman *et al.*, 2009; Pärn *et al.*, 2018), mistõttu on selge, et põllumajanduslikelt aladelt suurenevate N<sub>2</sub>O voogude taga on just nitraatväetiste kasutamine.

Espenberg *et al.* (2019) võrdlesid looduslike ja kuivendatud soomuldade N<sub>2</sub>O emissioone troopikas ning leidsid, et inimõjudega aladelt lähtuvad N<sub>2</sub>O vood oli keskmiselt 92,9% suuremad kui N<sub>2</sub>O vood looduslikelt, kuivendamata aladelt. Samas vähenes inimõjudega aladelt kahekordselt N<sub>2</sub> lendumine. Espenberg *et al.* (2019) tuvastasid olulisi erinevusi ka mikroobikoosluste võtmegeenide aktiivsuses: muuhulgas oli põllumajandusliku maa mikroobikooslustes väiksem *nirK*, *nosZI* ja *nifH* esindatus. Pärn *et al.* (2019) Peruu soomuldade kasvuhoonegaaside mõõtmistel mõõdeti maniokipõllult aga kümme korda väiksem N<sub>2</sub>O voog kui looduslikust palmisoometsast. Erinevusi uurimistulemustes võis põhjustada näiteks põhjavee tase: Espenberg *et al.* (2019) töös oli põhjavee tase inimõjuga aladel keskmiselt 23,7 cm madalamal kui looduslikel turbaaladel, aga Pärn *et al.* (2019) mõõtsid põhjavee taseme maniokipõllul 1,5 meetri sügavusele, samas kui looduslikus palmisoomullas oli veetase sisuliselt maapinnal. Lisaks oli maniokipõld väetamata.

### 1.3 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Kvantitatiivne ehk reaallajaline polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) on molekulaarne meetod funktsionaalsete geenimarkerite arvukuse ja ekspressiooni määramiseks keskkonnas (Smith & Osborn, 2009). qPCR on väga tundlik

(Valasek & Repa, 2005) ning võimaldab luua kindlast nukleinhappejärjestusest miljoneid koopiaid (Mullis, 1990; Powledge, 2004), et muuta nende geenide arvukus kvantifitseeritavaks (Heid *et al.*, 1996). qPCR võimaldab mõõta lämmastikuringe markergeenide koopiate arvukust mullaproovidest ekstraheeritud DNA-st (Espenberg *et al.*, 2018). Geenikoopiate arvukus on kvantifitseeritud näitaja, mida saab muuhulgas analüüsida võrdluses erinevate keskkonnaparameetritega (Smith & Osborn, 2009), leidmaks seoseid mikroobsete protsesside ning neid soodustavate või pärssivate tegurite vahel.

qPCR koosneb paljudest tsüklitest, tsüklid ise on identsed ja kolmeetapilised:

- Denaturatsiooni käigus kuumutatakse reaktsioonisegu üldiselt 94-98 °C-ni. Kõrge temperatuuri juures vesiniksidemed lõhutakse ning DNA kaksikahel lahutatakse üksikahelateks (Smith & Osborn, 2009).
- Järgnevalt jahutatakse reaktsioonisegu 45-60 °C-ni. Tekkinud üksikahelate otstele seonduvad päri- ja vastassuunalised praimerid, mille järjestused on lähte-DNA otsa suhtes antikomplementaarsed, aga omavahel komplementaarsed (Smith & Osborn, 2009).
- Viimaks algab 72 °C juures DNA süntees, mille käigus DNA polümeraas seondub ahela otstes praimerikompleksidega ning sünteesib vabu nukleotiide kasutades uue DNA ahela (Valasek & Repa, 2005).

qPCR kasutab fluorestsentsignaale mõõtvat tehnoloogiat, mis võimaldab amplifikatsiooni reaalsajas järgida (Heid *et al.*, 1996). Kuna fluorestsentsignaali tsüklilävemeni jõudmise kiirus on korrelatsioonis algse geenikoopiate arvukusega, saab tulemusi kvantifitseerida (Valasek & Repa, 2005). Fluorestsentsignaali lähtub reaktsioonisegusse lisatud fluorestsentsi andvast ainest, millest enimlevinud on SYBR Green (Smith & Osborn, 2009).

qPCR on kiire (Smith & Osborn, 2009) ja laia dünaamilise skaalaga meetod (Valasek & Repa, 2005) ning võimaldab amplifitseerida funktsionaalseid gene üliväikeste koguste põhjal (Smith & Osborn, 2009). Lisaks lämmastikuringes osalevate mikroorganismide ja nende funktsioonide kvantifitseerimise qPCR-iga, saab mitmekesisuse paremaks mõistmiseks kasutada ka teisi molekulaarseid meetodeid, näiteks DNA sekveneerimist.

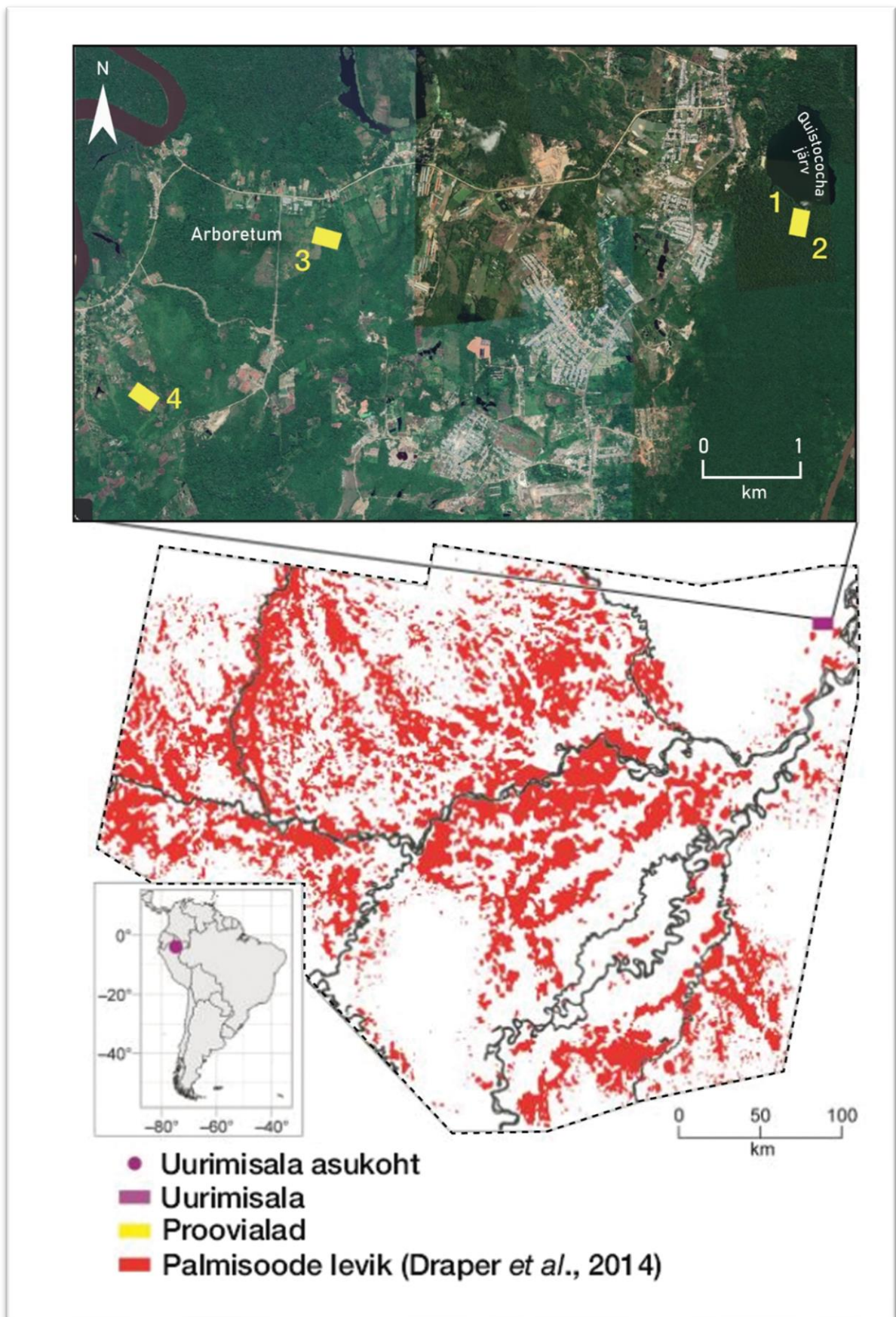
## 2. Metoodika

### 2.1 Uurimisala kirjeldus

Uurimisala asub Peruu Amazonase põhjaosas Loreto provintsis, Iquitose linnast loodes. Piirkonda iseloomustab aastaringselt soe ja niiske kliima (Peel *et al.*, 2007). Aasta keskmine temperatuur on 27,2 °C ning sademete hulk jääb 2500-3000 mm vahele (Marengo, 1998). Sademete hulga järgi eristatakse kaht aastaaega (Yoon & Zeng, 2010) – detsembrist aprillini vältav vihmahooaeg toob kuus keskmiselt 295 mm sademeid, juunist oktoobrini valitsevad seevastu pisut kuivemad tingimused ning kuu keskmine sademetehulk on 163 mm. Õhuniiskus püsib aastaringselt kõrgel, 80-90% tasemel (Peel *et al.*, 2007).

Piirkonnas valdavad looduslikud palmisoometsad, milles domineerib võnk-buritipalm (*Mauritia flexuosa*) (Draper *et al.*, 2014). Palmisoometsade turbakiht on kohati enam kui 6 meetrit paks (Lähteenoja *et al.*, 2009<sup>b</sup>). Soomullad on vihmahooajal tihti üleujutatud ning Amazonase jõest lähtuv pealekanne muudab muldade toitainesaldust (Soosaar *et al.*, 2022). Prooviala vahetus läheduses paikneb Quistococha järv, mis reguleerib ümbritsevate turbaalade põhjavee taset. Sel põhjusel ei lange järvega piirnevatel sooladel põhjavee tase aastaringselt sügavamale 20 cm mullapinnast (Griffis *et al.*, 2020). Prooviala asub üleminekutsoonis, kus esineb nii toitainerikkaid kui ka toitainevaeseid muldi (van Lent *et al.*, 2019; Lähteenoja *et al.*, 2009<sup>a</sup>). Proove koguti kolmelt erineva maakasutusega alalt (Pärn *et al.*, 2019):

- Looduslik hooajaliste üleujutuste ja pinnase pealekandega võnk-buritipalmi (*Mauritia flexuosa*) enamusega soomets, mille turbakiht on mitme meetri paksune (S3.8344°, W73.3189°). Sellel proovialal koguti mullaproove kahest kohast: *Mauritia flexuosa* palmide (joonis 2, number 1) ning *Symphonia globulifera* puude (joonis 2, number 2) alt.
- Sekundaarne 12-aastane nõlval asuv soomets, mis on kujunenud mahajäetud karjamaast ja banaaniistandusest (S3.8362°, W73.3625°; joonis 2, ala number 3). Liigirikka nõlvasoometsa turbakihi paksus on 0-10 cm.
- Kütisega rajatud väetamata maniokipõld turbakihi paksusega 0-10 cm (S3.8504°, W73.3769°; joonis 2, ala number 4).



Joonis 2. Uurimisala ja proovialade paiknemine ning piirkonna palmisooode levik (kohandatud Pärn et al. (2021) järgi).

## 2.2 Mullaproovide kogumine

Mullaproovid koguti kahe ekspeditsiooni käigus Iquitose piirkonda 2019. aasta septembris (kuiv hooaeg) ja 2020. aasta märtsis (märg hooaeg). 2019. aastal koguti mullaproovid kõigilt proovialadelt, 2020. aastal ei kogutud proove nõlvasoo sekundaarsest metsast. Kõigilt proovialadelt määrati kolm üksteisest 15 meetri kaugusel olevat proovilappi, kust võeti mullaproovid ca 3-5 meetri kauguselt. Mullaproovid koguti 0-10 cm sügavuselt gaasikambritest pärast gaasivoogude mõõtmisi. Proove säilitati kuni keemiliste analüüside läbiviimiseni 5 °C juures. Tartu Maaülikooli taimebiokeemia laboratooriumis määrati proovide pH, nitraadi- ( $\text{NO}_3^-$ ), ammooniumi- ( $\text{NH}_4^+$ ), fosfori- (P), kaaliumi- (K), magneesiumi- (Mg), kaltsiumi- (Ca), üldlämmastiku (N%) ja orgaanilise aine (OA) sisaldus. Mikrobioloogiliste analüüside jaoks säilitati proove  $-20\text{ °C}$  juures (Pärn *et al.*, 2021).

Enne mullaproovide kogumist mõõdeti proovialade muldadest pimekambri meetodil  $\text{N}_2\text{O}$  emissioone (Pärn *et al.*, 2019). Iga proovivõtukohta juures asusid vaatluskaevud, millest mõõdeti põhjavee tase. Mullatemperatuur mõõdeti neljalt sügavuselt – 10, 20, 30 ja 40 cm (Pärn *et al.*, 2021). Veel mõõdeti mullaniiskust ( $\text{m}^3\text{ m}^{-3}$ ) ning vee ja 10 cm sügavuse mulla hapnikusisaldust (Pärn *et al.*, 2019). Täpsem ülevaade gaasikambri mõõtmiste ja mullaproovide keemilise analüüsi meetodikast on leitav Pärn *et al.* tööst (2021).

## 2.3 DNA eraldamine mullaproovidest

Mullaproovidest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy® PowerSoil® Pro Kit'i (Qiagen, USA). Ekstraheerimisel järgiti tootja protokoll, aga proovide homogeniseerimiseks kasutati Precellys 24 (Bertin Technologies SAS, Prantsusmaa) homogenisaatorit programmiga 20 sekundit režiimil 5000 pööret minutis. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja DNA kvaliteedi kontrolliseks kasutati spektrofotomeetrit Tecan Infinite M200 (Tecan Trading AG, Šveitsi). DNA-d säilitati kuni qPCR-i läbiviimiseni sügavkülmas  $-20\text{ °C}$  juures.

## 2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil

qPCR meetodil hinnati 16S rRNA abil bakterite ja arhede arvukusi. Olulisemate lämmastikuringe protsesside potentsiaali hindamiseks kasutati järgmisi markergeene: *nifH* (õhulämmastiku sidumine); AOA *amoA*, AOB *amoA* ja COMAMMOX *amoA* (nitrifikatsioon); *nirS*, *nirK*, *nosZ* klad I ja II (denitrifikatsioon); *nrfA* (DNRA). Proovide analüüsimiseks

valmistati 10 µl reaktsioonisegu, milles fluorestsentsi andva ainenä kasutati SYBR Green'i (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Proovid mõõdeti kolmes korduses. Geenikoopiate arvukuse määramiseks kasutati termotsüklerit Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). Esmäne andmetöötlus toimus tarkvaraga Rotor-Gene Series Software v 2.0.2. Geenikoopiate edasiseks arvutamiseks kasutati esmalt Linreg PCR tarkvara, et leida proovide amplifikatsiooniefektiivsused. Proovid jagati üheksaks erineva amplifikatsiooniefektiivsusega amplikoniks vastavalt proovivõtukohtade ja aastale (4+3). Kuna nõlvasoo proovid olid eraldi jagatud kolmeks (jalama, keskosa ja perv), moodustus amplikone kokku üheksa. Seejärel kasutati tabelarvutustarkvara Microsoft Excel, kus markergeenidele vastavate standardkõverate abil leiti geenikoopiate arvukus ühe grammi kuivaine kohta (koopiat/gKA). Markergeenide amplifitseerimiseks kasutatud praimerid, praimerite kontsentratsioonid ja qPCR programmid on esitatud tabelis 1. Põhjalikumalt on qPCR meetodika selgitatud Espenberg *et al.* (2018) töös.

## 2.5 Andmeanalüüs ja autori osalus

Proovialasid iseloomustavate füüsikalise-keemiliste parameetrite jaotuse hindamiseks tehti peakomponentanalüüs. Proovialade lõikes esinevate geenikoopiate arvukuste statistiliselt oluliste erinevuste hindamiseks kasutati ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) koos Tukey testiga ( $p < 0,05$ ). Proovialade geenikoopiate arvukuste ja füüsikalise-keemiliste parameetrite vaheliste seoste olulisuse hindamiseks kasutati Spearmani korrelatsioonanalüüsi. Andmeanalüüs teostati tarkvaraga OriginPro 2022b. Töös esitatud joonised valmistati OriginPro tarkvaraga ja vajadusel viimistleti vektorgraafikatarkvaraga Adobe Illustrator CC 2019.

Bakalaureusetöö autor ekstraheeris mullaproovidest DNA, määras qPCR meetodiga kõigi uuritavate protsesside markergeenide arvukused, arvutas geenikoopiate arvukused ning tegi andmetöötluse ja -analüüsi.

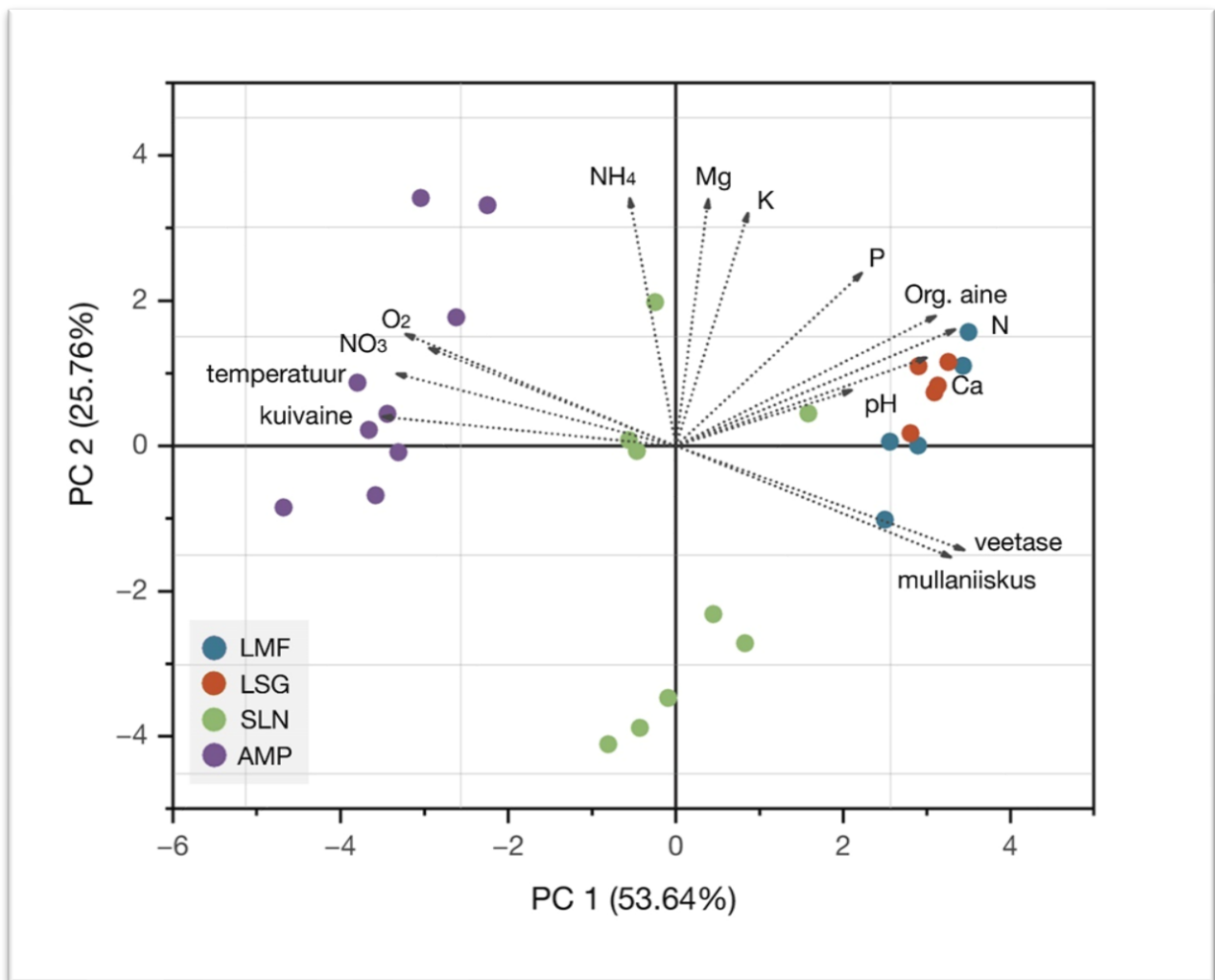
Tabel 1. DNA eraldamisel kasutatud praimerid ja nende qPCR programm

Märklaudgeen	Praimer	Viide	Amplikoni pikkus (bp)	Praimeri kontsentratsioon ( $\mu\text{M}$ )	qPCR programm
Bakterite 16 rRNA	Bact517F	Liu <i>et al.</i> , 2007	530	0,6	95 °C 10 min; 35 tsüklit: 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	393	0,6	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 56 °C 30 s; 72 °C 30 s
	Arch910R				
<i>nirS</i>	nirSC1F	Wei <i>et al.</i> , 2015	431	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 55 °C 30 s; 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	nirSR3cd	Kandeler <i>et al.</i> , 2006			
<i>nirK</i>	nirK876	Hallin & Lindgren, 1999	165	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	nirK1040				
<i>nosZI</i>	nosZ2F	Henry <i>et al.</i> , 2006	267	0,6	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 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	~700	1,2	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 54 °C 45 s, 72 °C 45 s, 80 °C 45 s
	nosZIIR				
<i>nifH</i>	Ueda19F	Ueda <i>et al.</i> , 1995	390	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 53 °C 45 s, 72 °C 45 s
	Ueda407R				
<i>nrfA</i>	6F	Takeuchi, 2006	222	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s
	6R				
Bakterite <i>amoA</i>	amoA-1F	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997	491	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 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	~600	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s
	CrenamoA 616R				
COMAMMOX <i>amoA</i>	comamoA AF	Wang <i>et al.</i> , 2018	436	0,8	95 °C 10 min; 40 tsüklit: 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s
	comamoA SR				

### 3. Tulemused

#### 3.1 Keskkonnaparametrid

Peakomponentanalüüsi (vt joonis 3) põhjal eristuvad keskkonnaparametrite alusel selgelt kolme tüüpi proovialad – inim mõjutusteta looduslikud palmisood, kunagiste inim mõjutustega sekundaarne nõlvasoo ning aktiivse põllumajandustegevusega maniokipõld. Suurimad proovialade vahelised erinevused on veerežiimiga seotud näitajad (mullaniiskus, põhjavee tase ning mullahapnik), mulla  $\text{NO}_3^-$  sisaldus ja temperatuur.



Joonis 3. Prooviala füüsikalise-keemiliste parameetrite peakomponentanalüüs. LMF - looduslik palmisoomets (*Mauritia flexuosa* palmide lähedased kambrid), LSG - looduslik palmisoomets (*Symphonia globulifera* puude lähedased kambrid), SLN - sekundaarne nõlvasoomets, AMP - alepõllundusega rajatud maniokipõld.

Loodusliku palmisoometsa *Mauritia flexuosa* palmide ja *Symphonia globulifera* puude lähedased proovialad olid keskkonnaparametrite suhtes ühtlased: neid iseloomustas kõrge põhjavee tase, kõrge OA ja N% ning kõrgem pH. Loodusliku palmisoometsa põhjavee tase

kõikus kahe mõõtmisperioodi ajal ja vahel vahemikus –3 kuni –12 cm mullapinnast, kusjuures terve märja hooaja vältel püsis veetase –3 cm juures. Mullatemperatuurid püsisid stabiilselt 25,5 ja 26,9 °C vahel. Palmisoometsa muldade  $\text{NO}_3^-$  sisaldus oli 2019. aasta septembris alla mõõtmispiiri. 2020. aasta märtsis oli palmisoomuldade  $\text{NO}_3^-$  sisaldus kõrgem ning jäi vahemikku 1,2 kuni 8,2 mg/kg. Palmisoomuldades oli N% sisaldus võrreldes teiste proovialadega oluliselt suurem, 2,7 kuni 3,4%. Muldade hapnikusisaldus oli *Mauritia flexuosa* palmide ja *Symphonia globulifera* puude proovialade lõikes ühtlaselt väga madal – 0,47-0,65% ehk alla  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Pärn *et al.*, 2021). Muldade OA sisaldus kõikus 75-81% vahel.

Peakomponentanalüüsi põhjal vastandus palmisoometsa muldadele keskkonnatingimustelt alepõllundusega rajatud maniokipõld. Sealsed mullad olid mõõtmisperioodi vältel võrdlemisi kuivad, väikse OA sisaldusega, hästi õhustatud, soojad ja  $\text{NO}_3^-$  rikkad. Põhjavee tase maniokipõllul oli keskmiselt –150 cm. Mullatemperatuurid ulatusid 27,6 °C-st 29,5 °C-ni. Põllumulla  $\text{NO}_3^-$  sisaldus oli võrreldes teiste proovialadega kõrge ja suhteliselt varieeruv, jäädes vahemikku 7,2-28,0 mg/kg. Põllumulla N% näitaja oli võrreldes palmisoomuldadega madal, kõikides proovialal 0,2-1,6% vahel. Põllumulla hapnikusisaldus oli väga kõrge, keskmiselt 87%, ja OA sisaldus oli 12-50%.

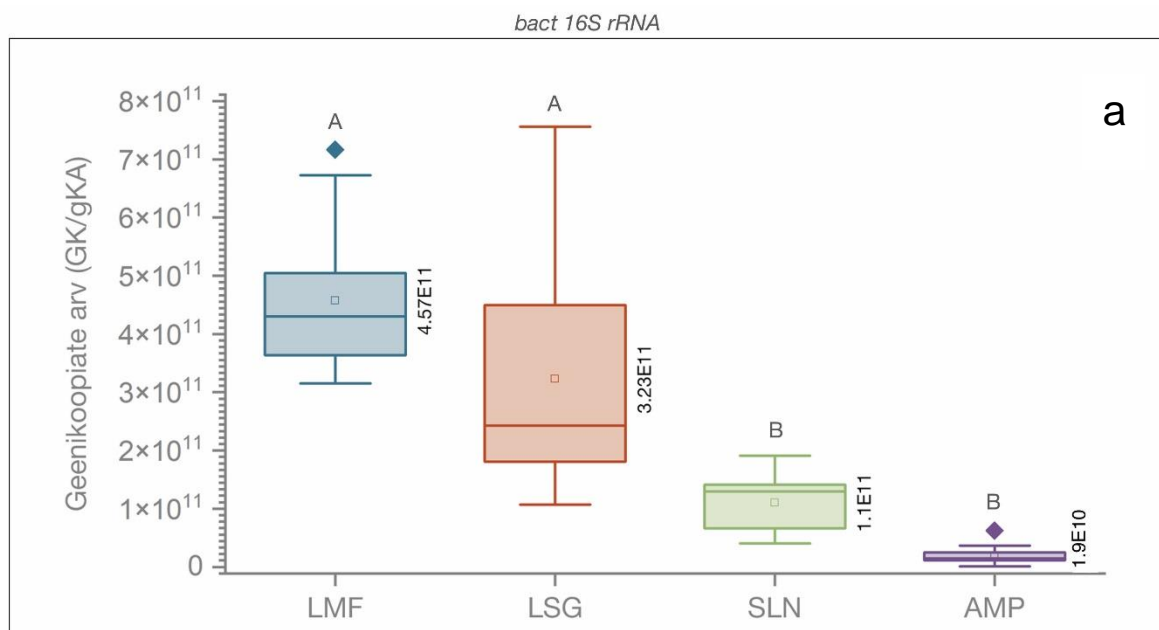
Keskkonnatingimustelt loodusliku ja põllumajandusliku ala vahel paiknevat sekundaarset nõlvasoometsa iseloomustas äärmiselt suur topograafiast tulenev prooviala-sisene varieeruvus, mis väljendus nii põhjavee tasemes ja mullaniiskuses kui ka  $\text{NO}_3^-$  sisalduses. Prooviala jalamil oli põhjavee tase –9 kuni –13 cm, nõlva keskosas –11 kuni –15 cm ning nõlva pervel –70 cm (Pärn *et al.*, 2021). Hapnikusisaldus varieerus prooviala lõikes vahemikus 1,6% (jalamil) kuni 85,4% (pervel).

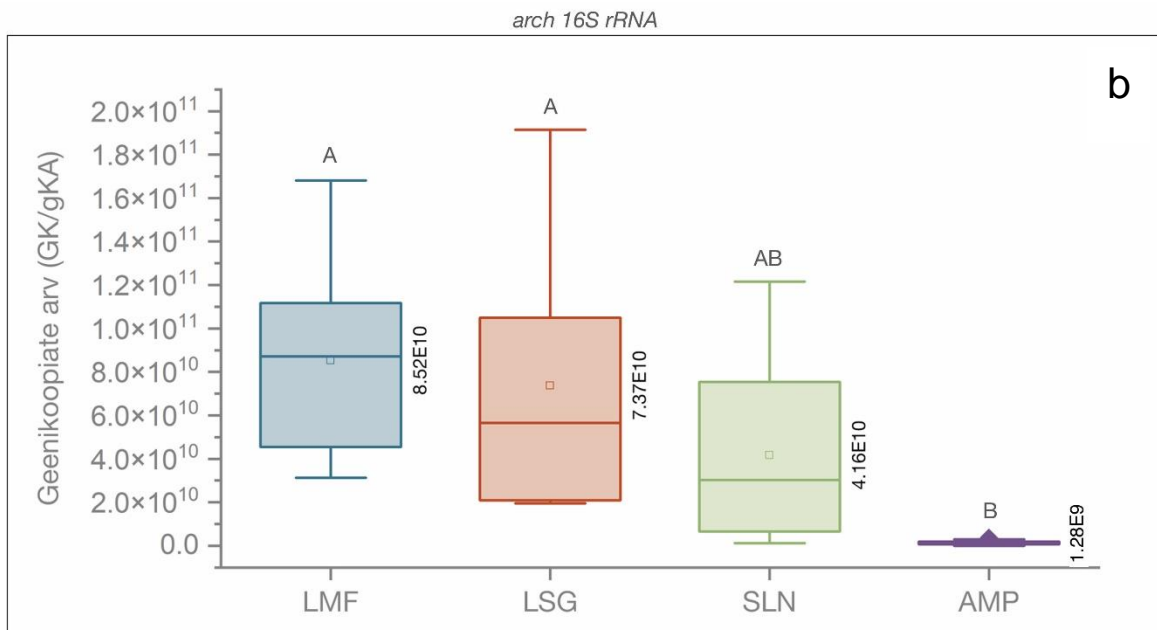
Uuringualalt lähtuvad  $\text{N}_2\text{O-N}$  vood olid selge maakasutus põhise ja sesoonse jaotusega. Palmisoometsa (*Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera*) proovialadelt mõõdetud  $\text{N}_2\text{O}$  vood olid kohati kuni kümme korda suuremad kui inimõjuga aladelt mõõdetud vood. Septembris tehtud gaasikambrimõõtmistega saadud keskmine  $\text{N}_2\text{O}$  emissioon *Mauritia flexuosa* mullast oli  $134,5 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , *Symphonia globulifera* mullast  $263,1 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Märja aastaaja mõõtmised näitasid voogude ligi kümne- kuni kahekümnekordset kahanemist ning keskmised emissioonid olid vastavalt  $13,3 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  ja  $12,0 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Maniokipõllul  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonides tugevat temporaalset varieeruvust ei tuvastatud: kuiva aastaaja keskmine näitaja oli  $31,0 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , märja hooaja keskmine näitaja  $38,8 \mu\text{g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . Niisiis oli sealne sesoonne trend vastupidine ja märja aastaajaga kaasnes kerge

emissioonide tõus. Sekundaarse nõlvasoo emissioonid sarnanesid kuival aastaajal maniokipõllu omadega ning jäid keskmiselt  $28,5 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$  juurde. Märjal aastaajal sekundaarses nõlvasoos mõõtmisi läbi ei viidud.

### 3.2 Geenikoopiate arvukused

Bakterite 16S rRNA arvukuses (vt joonis 4a) esinesid proovialade vahel statistilise olulisusega erinevused. Loodusliku palmisoometsa *Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera* proovialade bakterite 16S rRNA arvukused olid sarnased: vastavalt  $4,6 \times 10^{11} \pm 1,3 \times 10^{11}$  ja  $3,2 \times 10^{11} \pm 2,2 \times 10^{11}$  koopiat/gKA. Loodusliku palmisoometsa proovialad erinesid statistiliselt oluliselt omavahel sarnastest inim mõjuga aladest – nii sekundaarsest nõlvasoometsast ( $1,1 \times 10^{11} \pm 4,9 \times 10^{10}$  koopiat/gKA) kui ka maniokipõllust ( $1,9 \times 10^{10} \pm 1,4 \times 10^{10}$  koopiat/gKA). Bakterite 16S rRNA arvukus maniokipõllu mullas oli ligi 24 korda väiksem kui *Mauritia flexuosa* palmisoomullas.



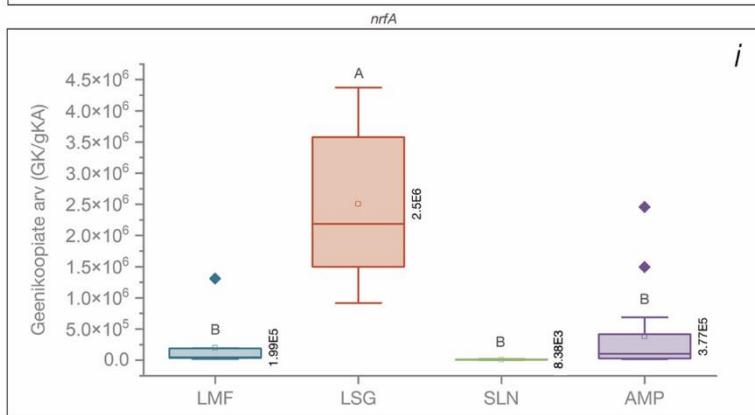
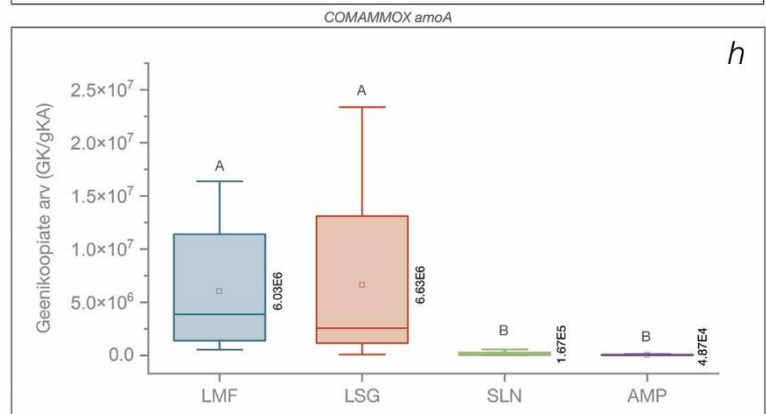
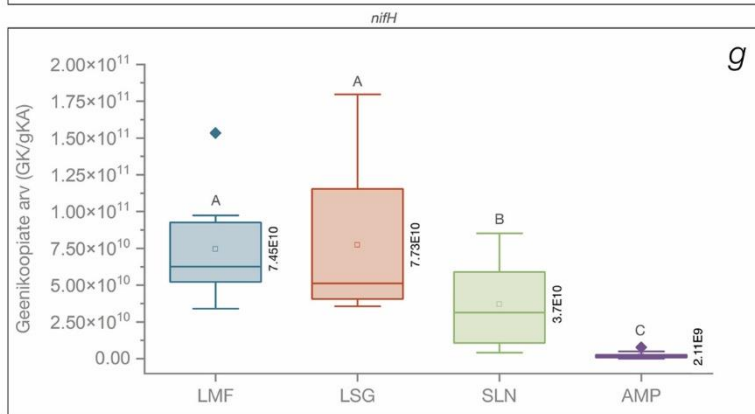
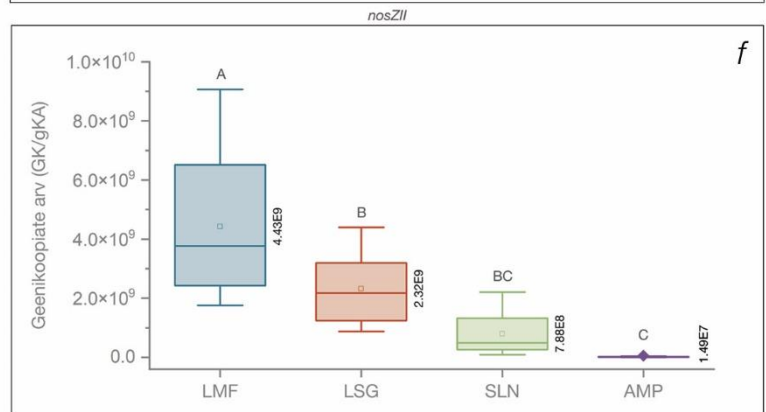
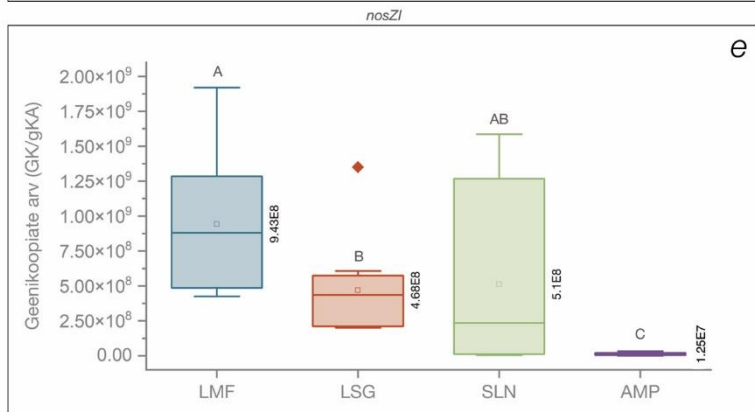
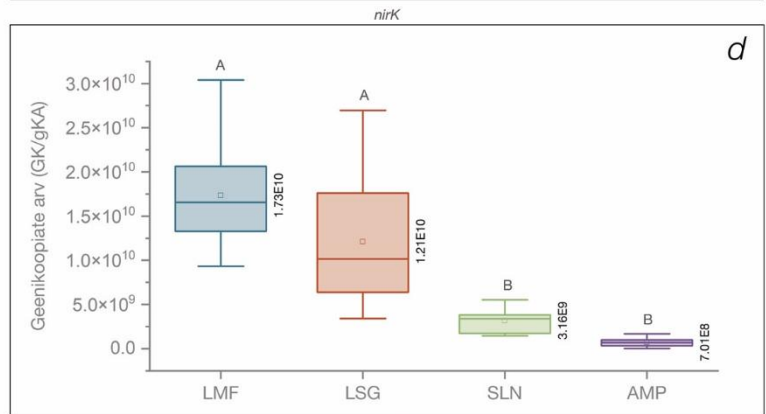
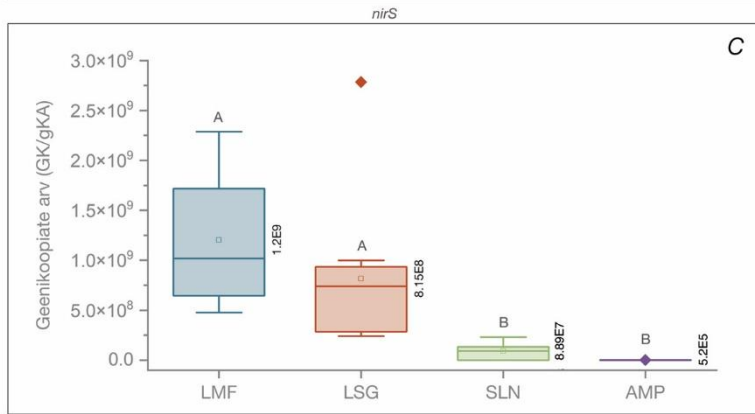
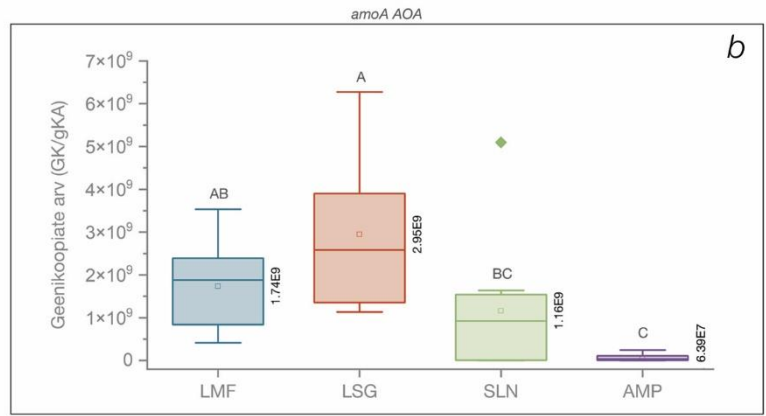
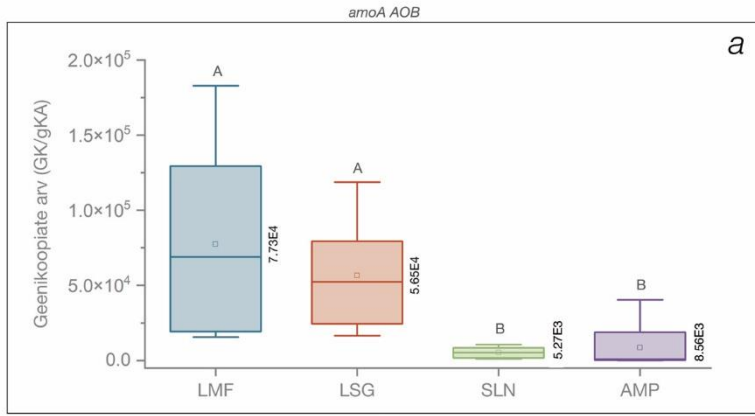


Joonis 4. Bakterite (a) ja arhede (b) 16S rRNA geenikoopiate arvukuse erinevused proovialade kaupa. Karp-vurrud diagramm näitab mediaani (horisontaalne joon), alumist ja ülemist kvartiili (karp), 95% usaldusvahemikkude (vurrud), ning võõrväärtuste väärtusi (teemant). Tukey testiga leitud statistilisi erinevusi ( $p < 0,05$ ) näitab vurrude kohal olev täht või tähekombinatsioon. Proovialad, mis ei oma ühist tähte või tähekombinatsiooni, on geenikoopiate arvukuselt üksteisest statistiliselt erinevad.

Ka arhede 16S rRNA arvukus (vt joonis 4b) varieerus proovialade lõikes palju. Aktiivse põllumajandustegevuseta muldades oli arhede 16S rRNA arvukus sarnane (*Mauritia flexuosa* puhul  $8,5 \times 10^{10} \pm 4,5 \times 10^{10}$ , *Symphonia globulifera* puhul  $7,4 \times 10^{10} \pm 6,4 \times 10^{10}$  koopiat/gKA. Maniokipõllu mullas oli arhede 16S rRNA arvukus oluliselt madalam: keskmiselt  $1,3 \times 10^9 \pm 9,3 \times 10^8$  koopiat/gKA. Statistiline erinevus esines inimõjudeta alade ning maniokipõllu vahel, kusjuures bakterite 16S rRNA arvukus maniokipõllu mullas oli umbes 67 korda väiksem kui *Mauritia flexuosa* palmisoomullas.

Arhede *amoA* geenikoopiate arvukus (vt joonis 5b) aktiivse põllumajandustegevuseta aladel oli vastavalt  $1,7 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^9$  koopiat/gKA (*Mauritia flexuosa*) ja  $2,9 \times 10^9 \pm 1,9 \times 10^9$  koopiat/gKA (*Symphonia globulifera*), maniokipõllul aga kaks suurusjärku madalam –  $6,4 \times 10^7 \pm 7,2 \times 10^7$  koopiat/gKA. Loodusliku palmisoometsa erinesid statistiliselt oluliselt maniokipõllust. *Symphonia globulifera* AOA *amoA* geenikoopiate arvukus erines olulisel määral ka nõlvasoomulla näitajatest. Bakterite *amoA* arvukus (vt joonis 5a) oli kõigil proovialadel arhede omast madalam. Sekundaarse nõlvasoometsa mullas oli bakterite *amoA* arvukus eriti madal – vaid  $5,3 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$  koopiat/gKA. Niisiis oli nõlvasoometsas bakterite *amoA* arvukus arhede *amoA* arvukusest kuus suurusjärku väiksem. Peaaegu sama madal bakterite *amoA* arvukus iseloomustas maniokipõldu. Sarnaselt arhede *amoA*

geenikoopiate arvukusega esinesid ka bakterite *amoA* geenikoopiate arvukuste puhul proovialade vahel statistiliselt olulised erinevused: loodusliku palmisoometsa proovialadel (*Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera*) oli AOB *amoA* arvukus oluliselt kõrgem kui inimõjuga aladel (sekundaarne nõlvasoomets ja maniokipõld). Kõigilt proovialadelt tuvastati ka COMAMMOX *amoA* markergeen (vt joonis 5h), mille arvukuse poolest olid omavahel sarnased *Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera* proovialad (vastavalt  $6,0 \times 10^6 \pm 5,8 \times 10^6$  ja  $6,6 \times 10^6 \pm 8,9 \times 10^6$  koopiat/gKA) ning inimõjuga alad, kus COMAMMOX *amoA* arvukus oli inimõjuga aladest üks kuni kaks suurusjärku madalam. COMAMMOX *amoA* markergeeni arvukus oli suurim *Symphonia globulifera* prooviala mullas, aga kõigis muldades leidis seda rohkem kui bakterite *amoA* geeni.



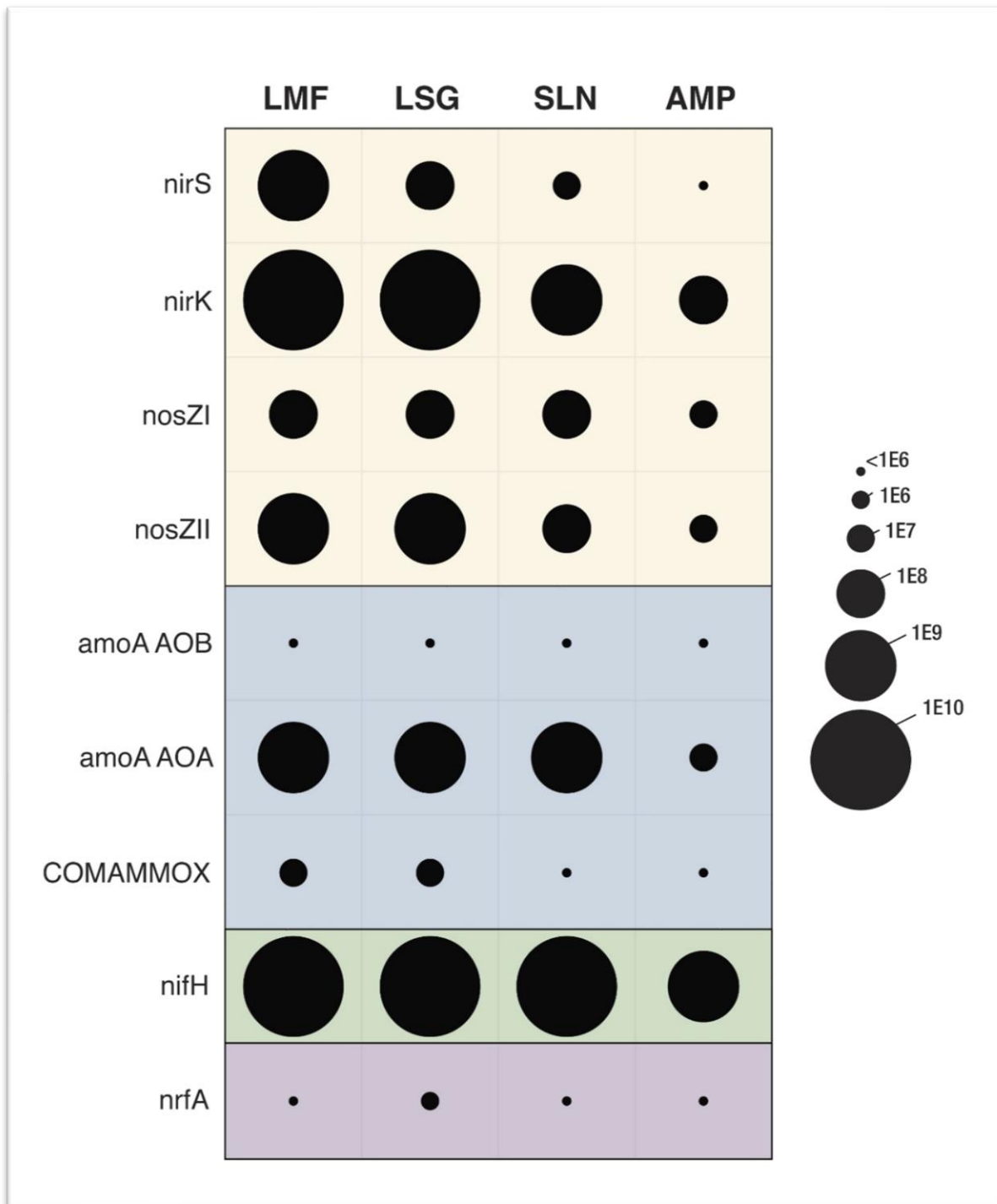
Joonis 5. Bakterite *amoA* (a), arhede *amoA* (b), *nirS* (c), *nirK* (d), *nosZ* klaad I (e), *nosZ* klaad II (f), *nifH* (g), *COMAMMOX amoA* (h) ja *nrfA* (i) markergeenide geenikoopiate arvukuse erinevused proovialade kaupa.

Denitrifikatsiooni nitriti redutseerimise etapi markergeeni *nirS* arvukus (vt joonis 5c) erines statistiliselt oluliselt omavahel sarnaste loodusliku soometsa proovialade (*Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera*) ning inimõjuga alade vahel. Suurim arvukus –  $1,2 \times 10^9 \pm 6,1 \times 10^8$  koopiat/gKA – esines *Mauritia flexuosa* proovialal. Selle näitajaga võrdluses on tähelepanuväärne maniikipõllu *nirS* geenikoopiate vähesus neli suurusjärku madalamal tasemel ( $5,2 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^5$  koopiat/gKA). Teise nitriti redutseerimise markergeeni, *nirK* arvukus (vt joonis 5d) oli kõigil proovialadel võrreldes *nirS*-iga üks kuni kolm suurusjärku kõrgem. Taaskord erinesid statistiliselt loodusliku soometsa proovialad ja inimõjuga alad, kusjuures kõrgeim oli *nirK* arvukus *Mauritia flexuosa* proovialal ( $1,7 \times 10^{10} \pm 6,0 \times 10^9$  koopiat/gKA). Ehkki maniikipõllu *nirK* arvukus oli proovialade lõikes kõige madalam ( $7,0 \times 10^8 \pm 4,5 \times 10^8$  koopiat/gKA), esines just seal võrreldes *nirS* geenikoopiatega kõige rohkem *nirK* geeni.

Denitrifikatsiooni viimase etapi (N<sub>2</sub>O redutseerimise) markergeeni *nosZ* klaad I arvukuse (vt joonis 5e) puhul oli ülejäänud proovialadest statistiliselt erinev maniikipõld, kus vastavate geenikoopiate arvukus oli madalaim – keskmiselt  $1,2 \times 10^7 \pm 9,8 \times 10^6$  koopiat/gKA. Statistiline erinevus esines ka kahe loodusliku palmisoometsa prooviala, *Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera* vahel. Kõrgeima *nosZ* klaad I arvukusega prooviala oli *Mauritia flexuosa* palmisoo ( $9,4 \times 10^8 \pm 5,1 \times 10^8$  koopiat/gKA). Märkimisväärne on *nosZI* arvukuse varieeruvus sekundaarse nõlvasoometsa prooviala lõikes, mis korreleerub kõnealuse prooviala laia amplituuga keskkonnaparameetritega. Denitrifikatsiooni etapi teise markergeeni, *nosZ* klaad II arvukus (vt joonis 5f) oli võrreldes *nosZ* klaad I-ga kõigis muldades suurem, kusjuures looduslikes palmisoomuldades esines *nosZII*-d ligi 5 korda rohkem, inimõjuga aladel seevastu oli kahe geeni arvukuste erinevus väike. Statistiliselt erinesid nii *Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera* proovialad kui ka *Mauritia flexuosa* ja sekundaarse nõlvasoometsa proovialad. Maniikipõllust olid statistiliselt erinevad mõlemad loodusliku palmisoometsa proovialad. Suurim *nosZII* geenikoopiate arvukus ( $4,4 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^9$  koopiat/gKA) esines *Mauritia flexuosa* proovialal.

Lämmastiku fikseerimist reguleeriva *nifH* markergeeni arvukus (vt joonis 5g) oli looduslikel proovialadel kõrgem ning erines statistiliselt inimõjuga aladest. Kuigi maniikipõllu mullas esines *nifH*-d ühe suurusjärgu võrra vähem kui aktiivse põllumajandustegevuseta aladel, oli just see kõige arvukam kõnealusel proovialal tuvastatud markergeen.

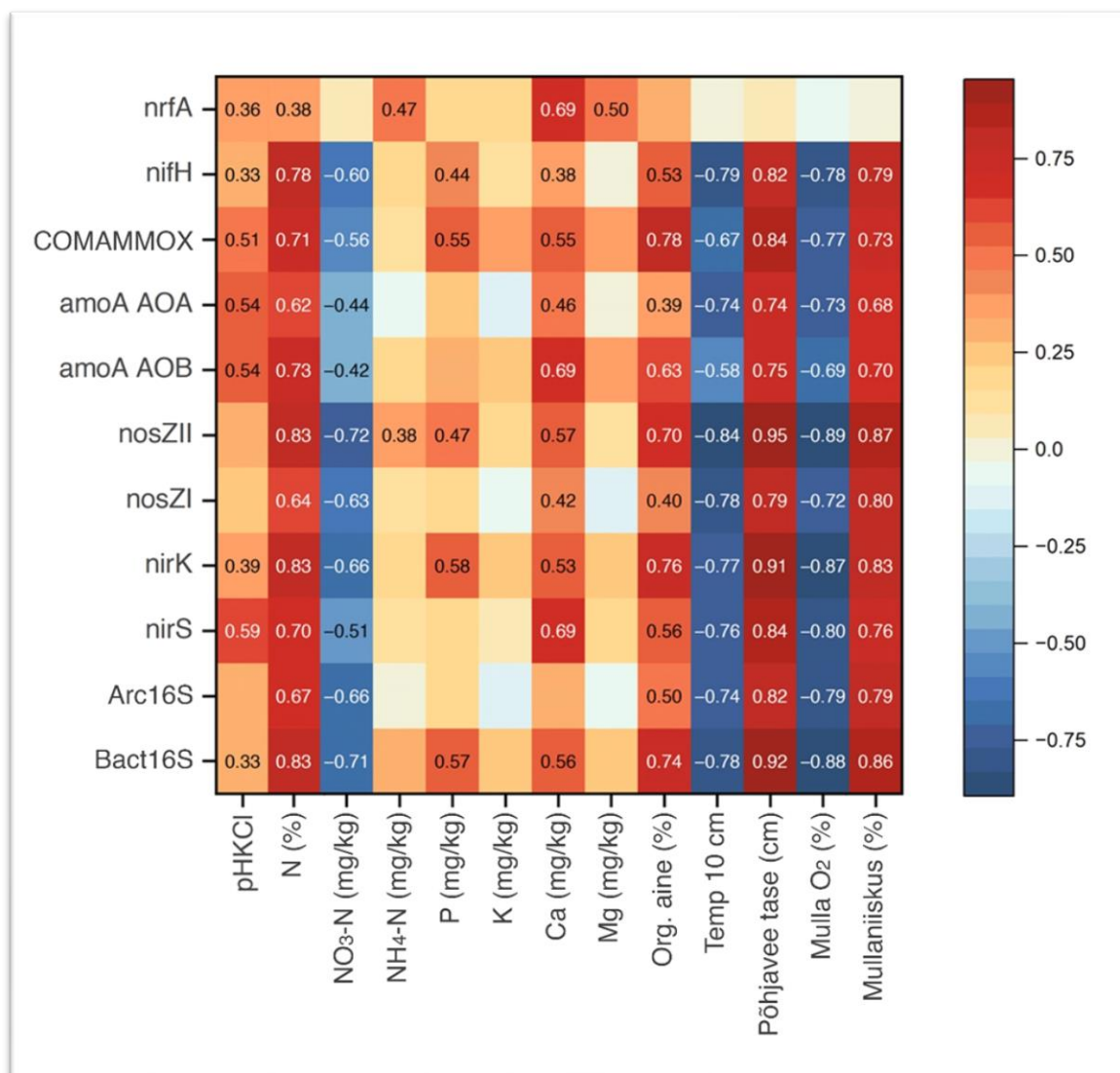
Kõigis prooviala muldades tuvastati ka DNRA markergeen *nrfA*. *nrfA* geenikoopiate arvukus (vt joonis 5i) oli võrreldes teiste proovialadega statistiliselt kõrgem looduslikul *Symphonia globulifera* proovialal ( $2,5 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^5$  koopiat/gKA). Ülejäänud aladel oli *nrfA* arvukus üks kuni kolm suurusjärku madalam. *nrfA* arvukus oli maniokipõllul võrreldes sekundaarse nõlvasoometsa ja *Mauritia flexuosa* palmisoometsaga kõrgem. Kõigi markergeenide keskmine arvukus igal proovialal on logaritmilisel skaalal kujutatud joonisel 6.



Joonis 6. Markergeenide keskmised arvukused proovialade kaupa.

### 3.3 Geenikoopiate arvukuse seosed füüsikalise-keemiliste parameetritega

Statistiliselt olulised geenikoopiate arvukuste ja füüsikalise-keemiliste parameetrite vahelised seosed on kujutatud joonisel 7 (tabel oluliste korrelatsioonikordajate p-väärtustega on lisas 1). Positiivsed seosed keskkonnaparameetrite ja geenikoopiate arvukuse vahel esinesid mulla N%, mulla OA sisalduse (%), põhjavee taseme (cm), mullaniiskuse ( $m^3 m^{-3}$ ), Ca (mg/kg) ning mulla pH puhul. N% mullas korreleerus statistiliselt olulisel tasemel positiivselt kõigi geenide geenikoopiate arvukusega (*nrfA* puhul  $p < 0,05$ , ülejäänud geenidel  $p < 0,001$ ), kuid selle parameetri puhul on mõjutavaks teguriks ilmselt mõlemad muutujad. Sisuliselt sarnaseid muutusi iseloomustavad põhjavee taseme ja mullaniiskuse näitajad korreleerusid statistiliselt olulisel tasemel ( $p < 0,001$ ) kõigi geenide arvukusega peale *nrfA*, mille esinemine oli nende näitajate suhtes neutraalne. Siinkohal on oluline märkida, et suurem mullaniiskus korreleerus positiivselt nii nitrifikatsiooni kui ka denitrifikatsiooni markergeenide arvukusega, ehkki üks protsess on peamiselt aeroobne, teine anaeroobne. Kõige tugevamas korrelatsioonis olid mullaniiskusega *nirS* ja *nosZ* klad II geenid.



Joonis 7. Proovialade füüsikalis-keemiliste parameetrite ja keskmistatud geenikoopiate Spearmani korrelatsioonikordajad. Korrelatsioonikordajate väärtused on ära toodud ainult statistiliselt oluliste ( $p < 0,05$ ) seoste puhul.

Mulla OA sisaldus mõjutas kõiki gene peale *nrfA* statistiliselt oluliselt. Tugevaimas korrelatsioonis ( $p < 0,001$ ) mulla OA sisaldusega olid bakterite 16S rRNA, *nirK*, *nosZ* klaad II, AOB ja COMAMMOX *amoA* geenid. Lisaks korreleerusid mulla OA sisaldusega arhede 16S rRNA, *nirS* ja *nifH* geenid ning *nosZ* klaad I ja AOA *amoA*. Mulla pH ja markergeenide arvukuste vahelistest seostest olid olulisimad *nirS* ja kõik nitrifikatsiooni markergeenid ( $p < 0,001$ ). Mulla pH ei mõjutanud statistiliselt olulisel tasemel ainult arhede 16S rRNA ning *nos*-tüüpi denitritseerijate arvukust.

Kõigi markergeenide (v.a arhede 16S rRNA) arvukused korreleerusid positiivsel statistiliselt olulisel tasemel Ca sisaldusega mullas, kusjuures tugevaim seos ( $p < 0,001$ ) Ca sisaldusega esines *nirS*, AOB *amoA* ja *nrfA* puhul. Umbes poolte markergeenide arvukus korreleerus ka

mulla P sisaldusega ning oli tugevaim ( $p < 0,01$ ) bakterite 16S rRNA, *nirK* ja COMAMMOX *amoA* geenide puhul.  $\text{NH}_4^+$  sisaldus mullas näitas enamike geenidega (v.a arhede 16S rRNA ja arhede *amoA*) küll üldist positiivset korrelatsioonitrendi, ent oli statistiliselt oluline ( $p < 0,01$ ) ainult *nosZII* ja *nrfA* geenide puhul. Mulla Mg sisaldus näitas statistiliselt olulist ( $p < 0,01$ ) seost ainult *nrfA* geenikoopiate arvukusega, K sisaldus polnud statistiliselt oluline parameeter ühegi geeni arvukuse puhul.

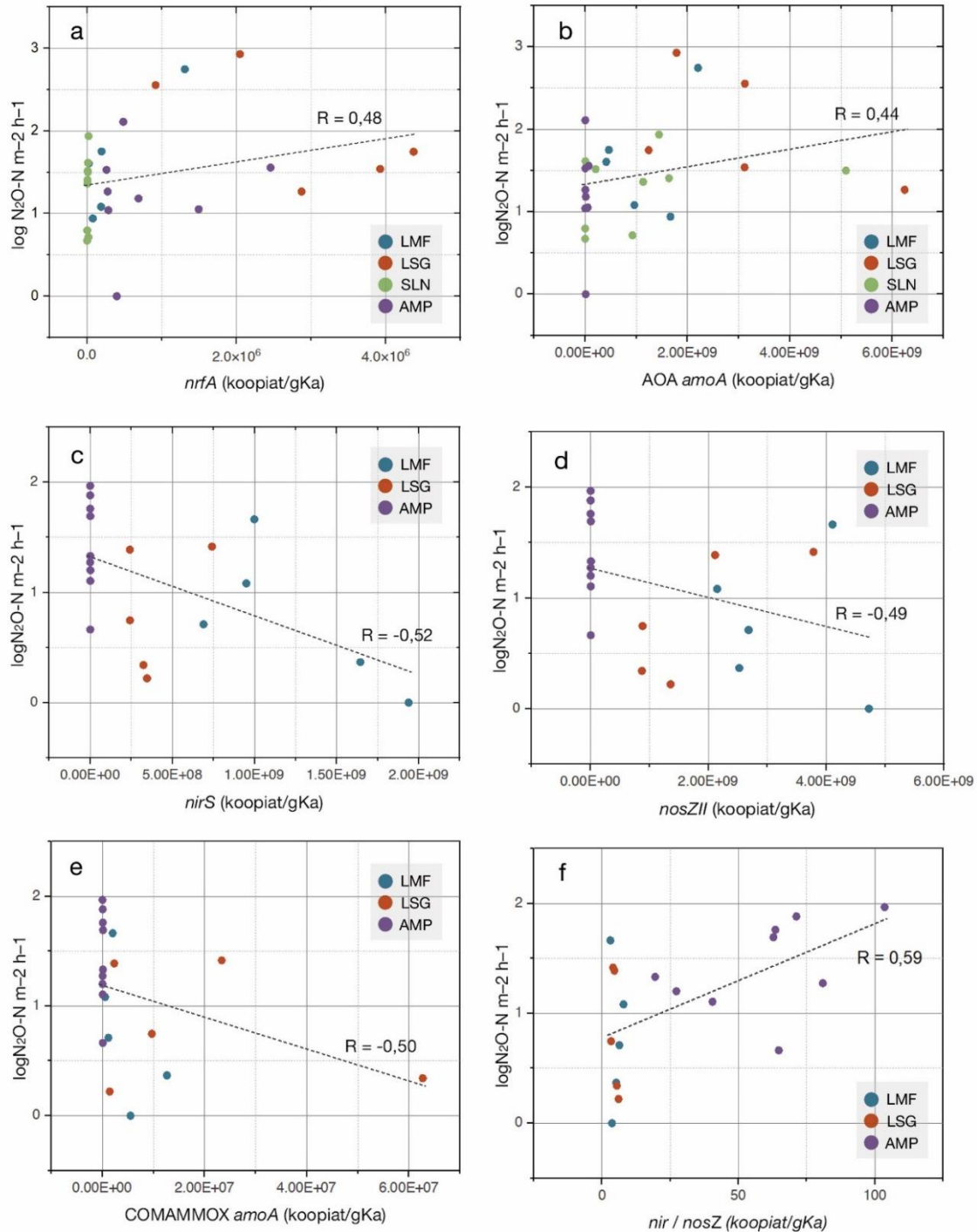
Tugevad negatiivsed seosed keskkonnaparameetrite ja geenikoopiate arvukuse vahel esinesid mulla  $\text{NO}_3^-$  sisalduse (mg/kg), 10 sentimeetri sügavusel mõõdetud mullatemperatuuri ning mulla hapnikusisalduse (%) puhul. Mulla  $\text{NO}_3^-$  sisaldus oli peaaegu kõigi geenidega statistiliselt olulises ( $p < 0,001$ ) negatiivses seoses, seda nii bakterite ja arhede arvukuse, nitrifikatsiooni, denitrifikatsiooni kui ka lämmastiku fikseerimise markergeenide puhul. Vaid *nrfA* ja  $\text{NO}_3^-$  sisalduse vahel puudus negatiivne seos, ning ehkki statistiliselt ebaoluline, esines vastupidiselt teistele geenidele hoopis nõrk positiivne seos. Proovialadel kõikusid mullatemperatuurid 10 sentimeetri sügavusel vahemikus 25,5-29,5 °C ning kõigi geenide (v.a *nrfA*) ja mullatemperatuuri vahel esines statistiliselt oluline negatiivne seos (AOB *amoA* puhul  $p < 0,01$ , ülejäänutel  $p < 0,001$ ). Mulla hapnikusisaldus on oma sisult põhjavee tasemele ja mullaniiskusele vastanduv näitaja, mistõttu kõik geenid, mis korreleerusid positiivselt suurema niiskusesisaldusega, seostusid samal tasemel ( $p < 0,001$ ) negatiivselt mulla hapnikusisaldusega. *nrfA* geenikoopiate arvukuse ja mullahapniku vahel seos puudus.

### 3.4 Geenikoopiate arvukuste seosed $\text{N}_2\text{O}$ emissioonidega

Proovialade kuiva ja märja aastaaja geenikoopiate ning  $\text{N}_2\text{O}$ -N emissioonide koos uurimine ei andnud Spearmani korrelatsioonianalüüsi käigus ühtki statistiliselt olulist seost markergeenide arvukuse ja  $\text{N}_2\text{O}$  voogude dünaamika vahel. Statistiliselt olulisi seoseid ei ilmnunud ka siis, kui proovialasid vaadeldi eraldi, aga kuiva ja märga aastaaega koos.

Lähtudes  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonidele troopikas omasest temporaalsest varieeruvusest, otsustati statistiliselt oluliste seoste leidmiseks analüüsida proovialasid koos, aga kuiva ja märja aastaaja mõõtmistulemusi eraldi. Septembris tehtud mõõtmiste puhul tuvastati statistiliselt oluline ( $p < 0,01$ ) positiivne seos  $\text{N}_2\text{O}$  voogude ja *nrfA* markergeeni arvukuse vahel. Statistiliselt oluline ( $p < 0,05$ ) positiivne korrelatsioon esines ka arhede *amoA* arvukuse ja  $\text{N}_2\text{O}$  voogude vahel. Kevadel olid  $\text{N}_2\text{O}$  voogudega tugevas ( $p < 0,05$ ) negatiivses seoses *nirS*, *nosZ* klad II ja COMAMMOX *amoA* markergeenid. Statistiliselt oluline ( $p < 0,01$ ) positiivne korrelatsioon

leiti N<sub>2</sub>O voogude ja *nir*- ning *nos*-tüüpi denitrifitseerijate omavahelise suhte vahel ( $(nirS+nirK)/(nosZI+nosZII)$ ) – mida suuremas ülekaalus olid keskkonnas *nir*-tüüpi denitrifitseerijad, seda rohkem lähtus sellest keskkonnast ka N<sub>2</sub>O emissioone. Kuival aastaajal esinenud statistiliselt olulised markergeenide ja N<sub>2</sub>O voogude vahelised seosed on kujutatud joonistel 8a ja 8b, märjal aastaajal esinenud seosed joonistel 8c-8f.



Joonis 8. Kuival (a ja b) ning märjal (c-f) aastaajal esinenud statistiliselt olulised seosed markergeenide arvukuse ja N<sub>2</sub>O emissioonide vahel. Trendijoonel on välja toodud korrelatsioonikoefitsent  $R$ .

## 4. Arutelu

Proovialade lõikes oli *nir*-tüüpi denitrifikatsiooni markergeene ligi neli korda rohkem kui *nosZ*-tüüpi markergeene. Märja aastaaja proovides esinenud statistiliselt oluline seos *nir*-tüüpi denitrifitseerijate suurema osakaalu ja kõrgemate N<sub>2</sub>O emissioonide vahel kinnitab, et just see tegur oli uuritud troopilistes muldades üks olulisemaid N<sub>2</sub>O lendumise põhjustajaid. Eelmainitut kinnitab ka *nosZ* klaad II markergeenide arvukuse korreleerumine madalamate N<sub>2</sub>O emissioonidega vihmasel aastaajal. Nitritid redutseerivatest markergeenidest esines kõigil proovialadel rohkem *nirK* markergeeni, kusjuures suurimas ülekaalus oli *nirK nirS*-i suhtes maniokipõllu muldades. *nirS* geeni kandvad mikroorganismid omavad suure tõenäosusega ka *nos*-tüüpi markergeene, mistõttu peetakse neid täieliku denitrifikatsiooni protsessis olulisemaks kui *nirK* geeni kandvaid mikroorganisme (Graf *et al.*, 2014). *nirS* geenide olulisusele troopilistest muldadest N<sub>2</sub>O lendumise vähendamisel viitab muuhulgas märjal aastaajal tuvastatud negatiivne korrelatsiooniseos *nirS* geenikoopiate arvu ja N<sub>2</sub>O emissioonide vahel.

*nosZ*-tüüpi denitrifikatsiooni markergeenidest oli märgades soomuldades oluliselt suurema kaaluga *nosZ* klaad II markergeen, samas kui sekundaarse soometsa ja maniokipõllu kuivemates muldades olid mõlemad *nosZ* geeni klaadid esindatud enam-vähem võrdses arvukuses. Märkimisväärne on, et kui enamike funktsionaalsete geenide arvukus oli kahe loodusliku palmisoometsa proovialadel sarnane, siis nii *nosZ* klaad I kui ka *nosZ* klaad II geenikoopiate arvukus oli *Mauritia flexuosa* ja *Symphonia globulifera* mullaproovides statistiliselt erinev – *Symphonia globulifera* soomullas oli *nosZ* tüüpi denitrifitseerijaid oluliselt vähem. *Symphonia globulifera* muldadest mõõdeti sügisel ka kõige suuremad N<sub>2</sub>O vood – keskmiselt 263,1 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Pole selge, miks *nosZ* tüüpi denitrifitseerijate arvukus kahe loodusliku prooviala lõikes statistiliselt erineb. Stone *et al.* (2015) andmetel on *nirS* ja *nosZ* klaadide geenid üldjuhul positiivses korrelatsioonis mulla N%, P ja OA sisaldusega. Need parameetrid võivad küll seletada *nirS* ja *nosZ* geenide vähest arvukust põllumullas, milles näiteks OA sisaldus ja N% oli looduslikest aladest oluliselt madalam, ent ei anna aimu, miks suhteliselt ühtlaste keskkonnaparameetritega looduslikul alal esinesid nii suured erinevused denitrifikatsiooni kontrollivate geenide arvukuses.

*Symphonia globulifera* proovialal oli suurim ka arhede *amoA* geeni arvukus, arhede *amoA* oli kuival aastaajal aga tugevas positiivses korrelatsioonis N<sub>2</sub>O emissioonidega. On täheldatud, et ammoniaaki oksüdeerivad arhed domineerivad nitrifikatsiooni protsessis keskkondades, kus

on madal hapnikusisaldus või väiksed  $\text{NH}_3$  kontsentratsioonid (Yin *et al.*, 2018).  $\text{NH}_3$  oksüdeerivate arhede positiivne seos  $\text{N}_2\text{O}$  lendumisega looduslikest soomuldadest on loogiliselt seletatav nende mikroorganismide võimega toota toitainevaestes tingimustes nitritit ja nitraati, mis on denitrifikatsiooni eelduseks. Uurimist vajaks nii nitrifitseerijate vahendatud denitrifikatsiooni kui ka heterotroofse nitrifikatsiooni potentsiaal looduslikel turbaaladel. Lisaks oleks  $\text{N}_2\text{O}$  voogude dünaamika mõistmiseks vaja uurida erinevate taimekoosluste mõju lämmastikuringele troopilistes turbamuldades.

Füüsikalise-keemiliste keskkonnaparameetrite ja funktsionaalsete geenide arvukuse korrelatsioonianalüüsi tulemuste tõlgendamisel tuleb arvestada, et töös analüüsitud mullaproovid pärinesid üksteisele keskkonningimustelt vastanduvatelt proovialadelt ning ei peegelda tingimata vastavate geenide optimumi. Näiteks tuvastati peaaegu kõigi funktsionaalsete geenide puhul statistiliselt oluline negatiivne seos mulla  $\text{NO}_3^-$  sisaldusega. Ehkki mõned protsessid, näiteks DNRA, võivad tõepoolest mulla madala  $\text{NO}_3^-$  sisalduse juures intensiivistuda (Kraft *et al.*, 2014; Rütting *et al.*, 2011), on kõrgemat  $\text{NO}_3^-$  sisaldust üldiselt seostatud suurema markergeenide arvukusega mullas (Groffman *et al.*, 2009; Pärn *et al.*, 2018; van Lent *et al.*, 2019). Niisiis ei tähenda esinenud korrelatsioon tingimata põhjuslikku seost  $\text{NO}_3^-$  sisalduse tõusu ja markergeenide arvukuse langemise vahel, vaid viitab mingile teisele keskkonnaparameetrile, mis geenide arvukust mõjutab. Kuna mulla  $\text{NO}_3^-$  sisaldus oli suurem maniokipõllul ning sealsed mullad olid kuivad ja väga hapnikurikkad, võib varasematele hüdroloogilise režiimi mõju käsitlevatele teadustöödele (Davidson & Verchot, 2000; Moyano *et al.*, 2013; Hergoualc'h *et al.*, 2020) tuginedes oletada, et just põhjavee tase, mullaniiskus ja hapnikusisaldus olid tegurid, mis lämmastikuringe protsesse ja intensiivsust enim mõjutasid.

Mullaniiskuse puhul oli tavapäratu, et nii nitrifikatsiooni kui ka denitrifikatsiooni geenide arvukused korreleerusid mullaniiskusega positiivselt ja peaaegu sama tugevusega, ehkki üks on valdavalt aeroobne, teine anaeroobne protsess. Siinkohal on oluline, et maniokipõllu mullaniiskus oli umbes  $0,2 \text{ m}^{-3} \text{ m}^3$ , looduslike soomuldade niiskus aga umbes  $0,8 \text{ m}^{-3} \text{ m}^3$ . Mineraalsetes muldades peetakse  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonide optimumiks  $0,6 \text{ m}^{-3} \text{ m}^3$  (Linn & Doran, 1984): see tähendab, et looduslikud palmisoomullad olid kõnealusele niiskusoptimumile lähemal. Van Lent *et al.* (2019) töös leiti, et troopilistes turbamuldades võib  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonide maksimum esineda veelgi kõrgemal, suisa 0,8 kuni  $1 \text{ m}^{-3} \text{ m}^3$  mullaniiskuse juures. Kuna nitrifikatsiooni potentsiaal oli märgades turbamuldades suurem kui kuivemas põllumullas, võib oletada, et nii nitrifikatsiooni kui ka denitrifikatsiooni optimumid on orgaanikarikastes

muldades kõrgemad ning mineraalsete muldade lämmastikuringe mudelid ei sobi troopiliste turbamuldade kasvuhoonegaaside emissioonide modelleerimiseks.

Kõigist teistest lämmastikuringe markergeenidest käitus keskkonnaparameetrite suhtes erinevalt DNRA markergeen *nrfA*. Selle esinemist keskkonnas ei mõjutanud temperatuur, hapnikusisaldus ega mullaniiskus. Korrelatsiooni puudumine näitab suure tõenäosusega *nrfA*-d kandvate mikroorganismide laia ökoloogilist nišši ja DNRA suurt potentsiaali orgaanikarikastes  $\text{NO}_3^-$  vaestes muldades, aga ka vahelduva niiskusrežiimiga aladel. *nrfA* olulisust troopilistes muldades on oma töödes näidanud Silver *et al.* (2001) ja Templer *et al.* (2008). Ehkki proovialadel oli *nrfA* arvukus võrreldes ülejäänud lämmastikuringe geenidega suhteliselt väike, oli selle potentsiaal sisuliselt võrdne looduslikel ja inimõjudega aladel. Kindlat *nrfA* temperatuurioptimum pole seni leitud, aga Lai *et al.* (2021) näitasid, et DNRA protsess oli intensiivne ka 40 °C juures. See tähendab, et troopilistes soomuldades ja mujalgi võib DNRA osakaal  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonides tõusta kliimamuutuste ja looduslike alade ülesharimise tagajärjel. Kuna *nrfA* ja  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonide vahel esines kuival aastaajal tugev positiivne korrelatsioon ja seega on selge, et DNRA on troopikas tähtis  $\text{N}_2\text{O}$  allikas, on oluline edasine teadustöö selle troopikas võrdlemisi väheuuritud protsessi potentsiaali paremaks mõistmiseks.

## Kokkuvõte

Troopilisi soomuldi peetakse olulisimaks looduslikuks kliimamuutusi põhjustava dilaammastikoksiidi (N<sub>2</sub>O) allikaks. Vaatamata nende rollile kliimamuutuste kujundamises on siiani vähe uuritud troopiliste soomuldade mikrobioloogilist lämmastikuringet ja seda, millised keskkonnategurid mõjutavad lämmastikuringes osalevate mikroobikoosluste arvukust ning N<sub>2</sub>O potentsiaali.

Bakalaureusetöö eesmärk oli analüüsida Peruu Iquitose piirkonna soomuldade lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsesside N<sub>2</sub>O potentsiaali seoseid maakasutuse, muldade füüsikalise-keemiliste parameetrite ning sealt lähtuvate N<sub>2</sub>O emissioonidega.

Lämmastikuringe erinevates etappides osalevate mikroorganismide arvukus oli looduslikel aladel kohati mitu suurusjärku kõrgem kui inimõjuga aladel. Koosluste suurus oli positiivses korrelatsioonis mulla niiskusesisaldusega, kusjuures kõrgeimad N<sub>2</sub>O emissioonid mõõdeti looduslikelt aladelt 80% mullaniiskuse juures. Et mineraalsete muldade puhul peetakse N<sub>2</sub>O lendumise optimumiks 50-60% mullaniiskust, võib see viidata turbamuldades nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside kõrgematele niiskusoptimumidele.

N<sub>2</sub>O emissioonide ja markergeenide arvukuse vahelised seosed olid sesoonsed. Kuival aastaajal mõjutasid N<sub>2</sub>O vooge positiivselt arhede *amoA* ja *nrfA* markergeenidega mikroorganismid. Märjal aastaajal mõjutasid N<sub>2</sub>O vooge negatiivselt *nirS*, *nosZII* ja COMAMMOX *amoA* markergeene kandvad mikroorganismid, positiivselt aga *nir/nosZ* suhe. Kahe loodusliku prooviaala – *Mauritia flexuosa* palmide ja *Symphonia globulifera* puude – keskkonnatingimused olid sarnased, ent *Symphonia globulifera* proovialal oli statistiliselt oluliselt vähem *nosZI* ja *nosZII* markergeenidega mikroorganismide ning oluliselt rohkem *nrfA* markergeenidega mikroorganismide. Just *Symphonia globulifera* proovialalt mõõdeti kuival aastaajal ka suurimad N<sub>2</sub>O vood, mis ületasid inimõjudega alade näitajaid kohati 20-kordselt. Erinevuste allikad kahe loodusliku prooviaala mikroobikooslustes on paraku teadmata.

Tulemustest võib järeldada, et troopiliste soomuldade N<sub>2</sub>O emissioone reguleerib peamiselt hüdroloogiline režiim, mida Amazonase madalikul iseloomustab kuiva ja märja aastaaja vaheldumine ning sesoonsed ülejutused. Teame Amazonase madaliku soomuldade mikrobioloogilisest lämmastikuringest siiani vähe, mistõttu on oluline sealsete koosluste koosseisu ja sesoone dünaamika edasine uurimine.

## Microbial nitrogen cycle and resulting nitrous oxide fluxes in Amazonian peatland soils

Liina Hints

### Summary

Tropical peatland soils are regarded as major emitters of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), a potent greenhouse gas and the most important ozone-depleting emission. Despite their importance in climate change and possible climate control strategies, the microbial nitrogen cycle and resulting N<sub>2</sub>O flows in tropical peatland soils remain largely unstudied.

The aim of this bachelor's thesis was to assess the N<sub>2</sub>O potential of microbiological processes in the nitrogen cycle in the Iquitos region of Peru depending on land use, physicochemical parameters and soil N<sub>2</sub>O emissions.

Soil samples were collected from four sampling sites near Iquitos, Peru. The first set of samples was collected in September 2019, the second one in March 2020. All sites were current or former palm swamps dominated by *Mauritia flexuosa* palms. Quantitative real-time PCR was used to measure the abundance of bacteria and archaea specific 16S rRNA, nitrification (AOA, AOB and COMAMMOX *amoA*), denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosZII*), nitrogen fixation (*nifH*) and DNRA (*nrfA*) marker genes in collected soil samples. Principal component analysis was used to assess variances in physicochemical parameters between sites. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) with Tukey's test was performed to assess variances in gene abundances between sites. Spearman correlation analysis was used to determine significant relationships between gene abundances, physicochemical parameters and N<sub>2</sub>O emissions.

The results show that the abundance of microorganisms involved in the soil nitrogen cycle was most affected by soil moisture, and natural sampling sites with a higher soil moisture content displayed abundances far greater than sampling sites with current or previous anthropogenic disturbances. The highest N<sub>2</sub>O emissions were measured at a moisture content of 80%. As most studies conducted on mineral soils agree on 50-60% soil moisture content as being the optimal range for N<sub>2</sub>O emissions, the results of this study might indicate a higher optimal range for N<sub>2</sub>O emissions in peatland soils.

Relationships between N<sub>2</sub>O and marker gene abundance displayed clear seasonality. During the dry season, N<sub>2</sub>O fluxes were positively affected by microorganisms with archaeal *amoA* and *nrfA* genes. During the wet season, N<sub>2</sub>O fluxes were negatively affected by microorganisms

with *nirS*, *nosZII* and COMAMMOX *amoA* genes but positively affected by the proportion of *nir/nosZ*. The highest N<sub>2</sub>O fluxes were measured from the soils near *Symphonia globulifera* trees. These soils displayed a high abundance of microorganisms capable of DNRA and had a much lower abundance of *nosZ*-type denitrifiers compared with the other natural site. The reasons for that remain unclear.

The results of this thesis suggest that N<sub>2</sub>O emissions from tropical peatland soils are mainly affected by soil moisture and might have a higher optimal moisture range than in mineral soils. Further research, however, is needed to correctly assess the global potential of tropical peatland soils and their N<sub>2</sub>O emissions under various disturbances.

## **Tänuavaldused**

Soovin tänada oma juhendaid Mikk Espenbergi ja Ülo Manderit, kes mind töö tegemise ja kirjutamise käigus igakülgset abistasid. Erilist tänu väärrib Mikk Espenberg, kes leidis ka ajakitsikuses võimalusi minu õpetamiseks ja mu küsimustele põhjalikult vastamiseks. Lisaks olen tänulik Sharvari Sunil Gadegaonkarile, kes panustas minu juhendamisse mitmeid tunde ning kelle järelvalve ja abivalmidus aitasid mul laboritööde käigus omandada õiged töövõtted. Töö poleks saanud sündida ilma mullaproovideta, mille kogus Jaan Pärn – aitäh ka temale ning teistele Tartu Ülikooli teadlastele, kes 2019. ja 2020. aastal Peruu ekspeditsioonidel mõõtmistes osalesid.

## Kasutatud kirjandus

Arp, D. J., Stein, L. Y. (2003). Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 38, 471–495. <https://doi.org/10.1080/10409230390267446>.

Braker, G., Conrad, R. (2011). Diversity, structure, and size of N<sub>2</sub>O-producing microbial communities in soils- what matters for their functioning? *Adv. Appl. Microbiol.*, 75, 33–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387046-9.00002-5>.

Bullock, A., Acreman, M. (2003). The role of wetlands in the hydrological cycle. *Hydrol. Earth Syst. Sc.*, 7, 358–389. <https://doi.org/10.5194/hess-7-358-2003>.

Cantera, J. J. L., Stein, L. Y. (2007). Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria. *Environ. Microbiol.*, 9, 765–776. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01198.x>.

Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M., Behrenfeld, M.J., Boetius, A., Boyd, P.W., Classen, A.T., Crowther, T.W., Danovaro, R., Foreman, C.M., Huisman, J., Hutchins, D.A., Jansson, J.K., Karl, D.M., Koskella, B., Welch, D.B.M., Martiny, J.B.H., Moran, M.A., Orphan, V.J., Reay, D.S., Remais, J.V., Rich, V.I., Singh, B.K., Stein, L.Y., Stewart, F.J., Sullivan, M.B., van Oppen, M.J.H., Weaver, S.C., Webb, E.A., Webster, N.S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.*, 17(9), 569–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>.

Chapuis-Lardy, L., Wrage, N., Metay, A., Chottes, J. L., Bernouxs, M. (2007). Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review *Glob. Change Biol.*, 13, 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01280.x>.

Cole, L.E.S., Åkesson, C.M., Hapsari, K.A, Hawthorne, D., Roucoux, K.H., Girkin, N.T., Cooper, H.V., Ledger, M.J., O'Reilly, P., Thornton, S.A. (2022). Tropical peatlands in the anthropocene: Lessons from the past. *Anthropocene*, 37, 100324. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2022.100324>.

Collins, M. (2013). *Climate Change 2013: The Physical Science: Chapter 12*. IPCC, Cambridge University Press.

Costa, E., Pérez, J., Kreft, J. U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol.*, 14, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.006>.

Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528, 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>.

Davidson, E. A., Verchot, L. V. (2000). Testing the hole in the pipe model of nitric and nitrous oxide emission from soils using the TRAGNET database. *Global Biogeochem. Cy.*, 14, 1035–1042. <https://doi.org/10.1029/1999GB001223>.

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

Saleh-Lakha, S., Shannon, K.E., Henderson, S.L., Goyer, C., Trevors, J.T., Zebarth, B.J., and Burton, D.L. (2009). Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in *Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-09>.

Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J., Mander, Ü. (2016). Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PLoS One* 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163864>.

Espenberg, M., Pärn, J., Kasak, K., Mander, Ü. (2019). Lämmastiku mikrobioloogiline aineriing ning N<sub>2</sub>O ja N<sub>2</sub> emissioonid troopilistel turbaaladel. *Publicationes Instituti Geographici Universitatis Tartuensis*, 113, 308-322. Tartu Ülikooli kirjastus, Tartu.

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. *Sci. Rep.*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23032-y>.

Feng, G., Sun, W., Zhang, F., Karthik, L., Li, Z. (2016) Inhabitancy of active *Nitrosopumilus*-like ammonia-oxidizing archaea and *Nitrospira* nitrite-oxidizing bacteria in the sponge *Theonella swinhoei*. *Sci. Rep.*, 6, 24966. <https://doi.org/10.1038/srep24966>.

Firestone, M.K., Davidson, E.A. (1989). Microbiological basis of NO and N<sub>2</sub>O production and consumption in soil. Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere, 47, 7–21.

Flemming, H.C., Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>.

Gallarotti, N., Barthel, M., Verhoeven, E., Pereira, E., Bauters, M., Baumgartner, S., Drake, T., Boeckx, P., Mohn, J., Longepierre, M., Mugula, J., Makelele, I., Ntaboba, L., Six, J. (2021) In-depth analysis of N<sub>2</sub>O fluxes in tropical forest soils of the Congo Basin combining isotope and functional gene analysis. *ISME J* 15, 3357–3374. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01004-x>.

Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R., Vörosmary, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153-226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>.

Gaveau, D.L.A., Salim, M.A., Hergoualc'h, K., Locatelli, B., Sloan, S., Wooster, M., Marlier, M.E., Molidena, E., Yaen, H., DeFries, R., Verchot, L., Murdiyarso, D., Nasi, R., Holmgren, P., Sheil, D. (2014). Major atmospheric emissions from peat fires in Southeast Asia during non-drought years: evidence from the 2013 Sumatran fires. *Sci. Rep.*, 4, 6112. <https://doi.org/10.1038/srep06112>.

Graf, D. H. R., Jones, C. M., Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PLoS One*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114118>.

Griffis, T.J., Roman, D.T., Wood, J.D., Deventer, J., Fachin, L., Rengifo, J., Del Castillo, D., Lilleskov, E., Kolka, R., Chimner, R.A., del Aguila-Pasquel, J., Wayson, C., Hergoualc'h, K., Baker, J. M., Cadillo-Quiroz, H., Ricciuto, D.M. (2020). Hydrometeorological sensitivities of net ecosystem carbon dioxide and methane exchange of an Amazonian palm swamp peatland. *Agr. Forest Meteorol.*, 295, 108167. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108167>.

Groffman, P.M., Davidson, E.A., Seitzinger, S. (2009). New approaches to modeling denitrification. *Biogeochemistry*, 93, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9285-0>.

- Guilhen, J., Al Bitar, A., Sauvage, S., Parrens, M., Martinez, J.M., Abril, G., Moreira-Turcq, P., Sánchez-Pérez, J. M. (2020). Denitrification and associated nitrous oxide and carbon dioxide emissions from the Amazonian wetlands. *Biogeosciences*, 17, 4297-4311. <https://doi.org/10.5194/bg-17-4297-2020>.
- Gumbrecht, T., Roman-Cuesta, R.M., Verchot, L., Herold, M., Wittmann, F., Householder, E., Herold, N., Murdiyarso, D. (2017). An expert system model for mapping tropical wetlands and peatlands reveals South America as the largest contributor. *Glob. Change Biol.*, 23, 3581–3599. <https://doi.org/10.1111/gcb.13689>.
- Hallin, S., Lindgren, E. (1999). PCR Detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1652–1657. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999>.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R.A, Jones, J.M. (2018). Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends in microbiology*, 26(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.003>.
- 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 Sci. Plant Nutr.*, 54(1), 33-45. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>.
- 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. Microb.*, 72, 5181–5189. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-06>.
- Hergoualc'h, K., Dezzio, N., Verchot, L. V., Martius, C., van Lent, J., del Aguila-Pasquel, J., López Gonzales, M. (2020). Spatial and temporal variability of soil N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes along a degradation gradient in a palm swamp peat forest in the Peruvian Amazon. *Glob. Change Biol.*, 26, 7198-7216. <https://doi.org/10.1111/gcb.15354>.
- Inatomi, M., Hajima, T., Ito, A. (2019). Fraction of nitrous oxide production in nitrification and its effect on total soil emission: A meta-analysis and global-scale sensitivity analysis using

a process-based model. PLoS One, 14(7), e0219159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219159>.

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(2), 417–426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>.

Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Mol. Biol. Evol., 25(9), 1955–1966. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn146>.

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

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. App. Environ. Microbiol., 72, 5957–5962. <https://doi.org/10.1128/AEM.00439-06>.

Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol. Med., 8, 257–260. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02355-9).

Koch, H., van Kessel, M.A., Lüscher, S. (2019). Complete nitrification: Insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira. Appl. Microbiol. Biot., 103(1), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9486-3>.

Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. Nature Reviews Microbiology, 16(5), 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>.

Lai, T.V., Ryder, M.H., Rathjen, J.R. (2021). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium increased with rising temperature. Biol Fertil Soils, 57, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01529-x>.

Leifeld, J., Menichetti, L. (2018). The underappreciated potential of peatlands in global climate change mitigation strategies. Nat. Commun., 9, 1071. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03406-6>.

Levy-Booth, D. J., Prescott, C. E., Grayston, S. J. (2014). Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. Soil Biology and Biochemistry, 75, 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.021>.

- Li, J., Beddow, J., Mckew, B.A., Whitby, C., Nedwell, D.B., Dumbrell, A. J., Thorpe, E.L. (2014). *amoA* Gene Abundances and Nitrification Potential Rates Suggest that Benthic Ammonia-Oxidizing Bacteria and Not Archaea Dominate N Cycling in the Colne Estuary, United Kingdom. *App. Environ. Microbiol.*, 81(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.02654-14>.
- Linn, D.M., Doran, J.W. (1984). Effect of Water Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Non-Tilled Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48, 1267-1272. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800060013x>.
- Liu, Y., Wang, X., Chen, Y., Zhang, L., Xu, K., Du, Y. (2020). Anaerobic methane-oxidizing bacterial communities in sediments of a drinking reservoir, Beijing, China. *Ann. Microbiol.*, 70, 42. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01578-5>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm541>.
- Lähteenoja, O., Ruokolainen, K., Schulman, L., Alvarez, J. (2009a). Amazonian floodplains harbour minerotrophic and ombrotrophic peatlands. *Catena*, 79, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2009.06.006>.
- Lähteenoja, O., Ruokolainen, K., Schulman, L., Oinonen, M. (2009b). Amazonian peatlands: an ignored C sink and potential source. *Glob. Change Biol.*, 15, 2311–2320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01920.x>.
- Mania, D. Heylen, K., van Spanning, R.J., Frostegård, A. (2014). The nitrate-ammonifying and nosZ-carrying bacterium *Bacillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxide under high nitrate conditions. *Environ. Microbiol.*, 2014. 16(10), 3196-210. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12478>.
- Marengo, J. (1998). Climatología de la zona de Iquitos, Perú. *Geoecología y Desarrollo Amazónico: Estudio Integrado en la Zona de Iquitos, Perú. Annales Universitatis Turkuensis, serie A II*, 114, 35–57. Turku Ülikool.
- Moyano, F.E., Manzoni, S., Chenu, C. (2013). Responses of soil heterotrophic respiration to moisture availability: an exploration of processes and models. *Soil Biol. Biochem.*, 59, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.002>.

Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16, 177–183. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(94\)00081-7](https://doi.org/10.1016/0168-6496(94)00081-7).

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 262, 56–61. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.

Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, L.M., Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.*, 33(12–13), 1723–1732. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00096-7).

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 N<sub>2</sub>O production efficacy. *Soil Biol. Biochem.*, 83, 160–175. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.001>.

Wrage-Mönnig, N., Horn, M.A., Well, R., Müller, C., Velthof, G., Oenema, O. (2018). The role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide revisited. *Soil Biol. Biochem.*, 123, A3–A16. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.020>.

Orellana, L.H., Rodriguez, R.L.M., Higgins, S., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., Konstantinidis, K.T. (2014). Detecting nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in soil metagenomes: Method development and implications for the nitrogen cycle. *mBio*, 5, e01193–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01193-14>.

Page, S.E., Rieley, J.O., Wüst, R. (2006). Lowland tropical peatlands of Southeast Asia. *Dev. Earth Surf. Process.*, 9, 145–172. [https://doi.org/10.1016/S0928-2025\(06\)09007-9](https://doi.org/10.1016/S0928-2025(06)09007-9).

Pandey, C.B., Kumar, U., Kaviraj, M., Minick, K.J., Mishra, A.K., Singh, J.S. (2020). DNRA: A short-circuit in biological N-cycling to conserve nitrogen in terrestrial ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 738, 139710. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139710>.

Pärn, J., Mander, Ü. (2018). TÜ teadlaste uuring: soodest immitseb naerugaasi. *Novaator*, 19. märts. Kasutatud 15.05.2022, <https://novaator.err.ee/690593/tu-teadlaste-uuring-soodest-immitseb-naerugaasi>

Pärn, J., Soosaar, K., Schindler, T., Machacova, K., Muñoz, W.A., Fachín, L., Aspajo, J.L.J., Robinson I. Negron-Juarez, R.J., Maddison, M., Rengifo, J., Danika Journeth Garay Dinis, D.J.G., Oversluijs, A.G.A., Fucos, M.C., Vásquez; R.C., Wampuch, R.H., García, E.P., Sohar,

- K., Horna, S.C., Gómez, T.P., Muñoz, J.D.U., Espinoza, R.T., Mander, Ü. (2021). High greenhouse gas fluxes from peatlands under various disturbances in the Peruvian Amazon. *Biogeosciences Discussion*. <https://doi.org/10.5194/bg-2021-46>.
- Pärn, J., Soosaar, K., Schindler, T., Macháčová, K., Mander, Ü. (2019). Kasvuhoonegaaside mõõtmise Amasoonia soodes. *Publicationes Instituti Geographici Universitatis Tartuensis*, 113, 323-329. Tartu, Tartu Ülikooli kirjastus.
- Pärn, J., Verhoeven, J.T.A., Butterbach-Bahl, K., Dise, N.B., Ullah, S., Aasa, A., Egorov, S., Espenberg, M., Järveoja, J., Jauhiainen, J., Kasak, K., Klemedtsson, L., Kull, A., LaggounDéfarge, F., Lapshina, E.D., Lohila, A., Lõhmus, K., Maddison, M., Mitsch, W.J., Müller, C., Niinemets, Ü., Osborne, B., Pae, T., Salm, J-O., Sgouridis, F., Sohar, K., Soosaar, K., Storey, K., Teemusk, A., Tenywa, M.M., Tournebize, J., Truu, J., Veber, G., Villa, J.A., Zaw, S.S., Mander, Ü. (2018). Nitrogen-rich organic soils under warm well-drained conditions are global nitrous oxide emission hotspots. *Nat. Commun.*, 9, 1135. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03540-1>.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A. (2007). Updated world map of the köppen-geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11, 1633–1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>.
- Philippot, L., Hallin, S., Borjesson, G., Baggs, E. (2009). Biochemical cycling in the rhizosphere having an impact on global change. *Plant Soil*, 321, 61–81. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9796-9>.
- Philippot, L., Hallin, S., Schloter, M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Adv. Agron.*, 96, 249–305. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)96003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96003-4).
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Portmann, R.W. (2009). Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science*, 326(5949), 123-125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>.
- Rotthauwe, J.-H., Witzel, K.-P., 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. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>

Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., Klemmedtsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8, 1779–1791. <https://doi.org/10.5194/bg-8-1779-2011>.

Saikawa, E., Prinn, R.G., Dlugokencky, E., Ishijima, K., Dutton, G.S., Hall, B.D., Langenfelds, R., Tohjima, Y., Machida, T., Manizza, M., Rigby, M., O'Doherty, S., Patra, P.K., Harth, C.M., Weiss, R.F., Krummel, P.B., van der Schoot, M., Fraser, P.J., Steele, L.P., Aoki, S., Nakazawa, T., Elkins, J.W. (2014). Global and regional emissions estimates for N<sub>2</sub>O. *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 4617-4641. <https://doi.org/10.5194/acp-14-4617-2014>.

Schleper, C., Nicol, G.W. (2010). Ammonia-Oxidising Archaea – Physiology, Ecology and Evolution. *Adv. Microb. Physiol.*, 57, 1-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381045-8.00001-1>.

Shoun, H., Kim, D-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 94, 277-281. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90643-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90643-3)

Silver, W.L., Herman, D.J., Firestone, M.K. (2001). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in upland tropical forest soils. *Ecology*, 82, 2410–6. <https://doi.org/10.1890/0012-9658>.

Skiba, U., Smith, K.A. (2000). The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. *Chemosph. Glob. Change Sci.*, 2, 379–386. [https://doi.org/10.1016/S1465-9972\(00\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S1465-9972(00)00016-7).

Smith, C.J., Osborn, A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 67(1), 6-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.

Soosaar, K., Schindler, T., Machacova, K., Pärn, J., Fachín-Malaverri, L.M., Rengifo-Marin, J.E., Alegría-Muñoz, W., Jibaja-Aspajo, J.L., Negron-Juarez, R., Zárate-Gómez, R., Garay-Dinis, D.J., Arista-Oversluijs, A.G., Tello-Espinoza, R., Pacheco-Gómez, T., Mander, Ü. (2022). High Methane Emission From Palm Stems and Nitrous Oxide Emission From the Soil in a Peruvian Amazon Peat Swamp Forest. *Front. For. Glob. Change*, 5. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.849186>.

Stratmann, S. A., van Oijen, A. M. (2014). DNA replication at the single-molecule level. *Chem. Soc. Rev.*, 43, 1201-20. <https://doi.org/10.1039/C3CS60391A>.

- Syakila, A., Kroeze, C. (2011). The global nitrogen budget revisited. *Greenhouse Gas Measur. Manage.*, 1(1), 17-26. <https://doi.org/10.3763/ghgmm.2010.0007>.
- Takeuchi, J. (2006). Habitat Segregation of a Functional Gene Encoding Nitrate Ammonification in Estuarine Sediments. *Geomicrobiol. J.*, 23, 75–87. <https://doi.org/10.1080/01490450500533866>.
- Teh, Y.A., Wayne, M., Berrio, J.-C., Boom, A., Page, S.E. (2017). Seasonal variability in methane and nitrous oxide fluxes from tropical peatlands in the western Amazon basin. *Biogeosciences*, 14, 3669–3683. <https://doi.org/10.5194/bg-14-3669-2017>.
- Templer, P.H., Silver, W.L., Pett-Ridge, J., DeAngelis, K.M., Firestone, M.K. (2008). Plant and microbial controls on nitrogen retention and loss in a humid tropical forest. *Ecology*, 89, 3030–3040. <https://doi.org/10.1890/07-1631.1>.
- Tiedje, J.M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biol. Anaerob. Microorg*, 717, 179–244.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x>.
- Turetsky, M.R., Benscoter, B., Page, S., Rein, G., van der Werf, G.R., Watts, A. (2015). Global vulnerability of peatlands to fire and carbon loss. *Nat. Geosci.*, 8, 11-14. <https://doi.org/10.1038/ngeo2325>.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *J. Bacteriol*, 177, 1414–1417. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1414-1417.1995>.
- Valasek, M.A., Repa, J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 29, 151-159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>.
- 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., Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528, 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>.
- van Lent, J., Hergoualc'h, K., Verchot, L., Oenema, O., van Groenigen, J.W. (2019). Greenhouse gas emissions along a peat swamp forest degradation gradient in the Peruvian

Amazon: soil moisture and palm roots effects. *Mitig. Adapt. Strat. Glob. Change*, 24, 625-643. <https://doi.org/10.1007/s11027-018-9796-x>.

van Lent, J., Hergoualc'h, K., Verchot, L.V. (2015). Reviews and syntheses: Soil N<sub>2</sub>O and NO emissions from land use and landuse change in the tropics and subtropics: a meta-analysis. *Biogeosciences*, 12, 7299-7313. <https://doi.org/10.5194/bg-12-7299-2015>.

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. *Biores. Technol.*, 270, 580–587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.089>.

Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N., Koba, K., Otsuka, S., Senoo, K. (2015). Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.*, 9(9), 1954-1965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.9>.

Qian, W., Ma, B., Li, X., Zhang, Q., Peng, Y. (2019). Long-term effect of pH on denitrification: High pH benefits achieving partial-denitrification. *Biores. Technol.*, 278, 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.105>.

Werner, C., Butterbach-Bahl, K., Haas, E., Hickler, T., Kiese, R. (2007). A global inventory of N<sub>2</sub>O emissions from tropical rainforest soils using a detailed biogeochemical model. *Glob. Biogeochem. Cycl.*, 21, GB3010. <https://doi.org/10.1029/2006GB002909>.

Wu, C., Fu, F.X., Sun, J., Thangaraj, S., Pujari, L. (2018). Nitrogen Fixation by *Trichodesmium* and unicellular diazotrophs in the northern South China Sea and the Kuroshio in summer. *Sci. Rep.*, 8, 2415. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20743-0>.

Yin, Z., Bi, X., Xu, C. (2018). Ammonia-Oxidizing Archaea (AOA) Play with Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB) in Nitrogen Removal from Wastewater. *Archaea*. <https://doi.org/10.1155/2018/8429145>.

Yoon, J.-H., Zeng, N. (2010). An Atlantic influence on Amazon rainfall. *Clim. Dyn.*, 34, 249–264. <https://doi.org/10.1007/s00382-009-0551->

## Lisad

Lisa 1. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geenikoopiate arvukuste vahel. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

	<i>bact</i>	<i>arc</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>	AOB <i>amoA</i>	AOA <i>amoA</i>	COMAMMO X <i>amoA</i>	<i>nifH</i>	<i>nrfA</i>
<b>pH<sub>KCl</sub></b>	0,33*		0,59***	0,39**			0,54***	0,54***	0,51***	0,33*	0,36*
<b>N, %</b>	0,83***	0,67***		0,83***	0,64***	0,83***	0,73***	0,62***	0,71***	0,78***	0,38**
<b>NO<sub>3</sub>-N, mg/kg</b>	-0,71***	-0,66***		-0,66***	-0,63***	-0,72***	-0,42**	-0,44**	-0,56***	-0,60***	
<b>NH<sub>4</sub>-N, mg/kg</b>						0,38**					0,47**
<b>P, mg/kg</b>	0,57**			0,58**		0,47*			0,55**	0,44*	
<b>K, mg/kg</b>											
<b>Ca, mg/kg</b>	0,56**		0,69***	0,53**	0,42*	0,57**	0,69***	0,46*	0,55**	0,38*	0,69***
<b>Mg, mg/kg</b>											0,50**
<b>Org,aine, %</b>	0,74***	0,50**	0,56**	0,76***	0,40*	0,70***	0,63***	0,39*	0,78***	0,53**	
<b>Temp 10 cm</b>	-0,78***	-0,74***		-0,77***	-0,78***	-0,84***	-0,58**	-0,74***	-0,67***	-0,79***	
<b>Veetase, cm</b>	0,92***	0,82***	0,84***	0,91***	0,79***	0,95***	0,75***	0,74***	0,84***	0,82***	
<b>Mulla O<sub>2</sub>, %</b>	-0,88***	-0,79***	-0,80***	-0,87***	-0,72***	-0,89***	-0,69***	-0,73***	-0,77***	-0,78***	
<b>Mullaniiskus, %</b>	0,86***	0,79***	0,76***	0,83***	0,80***	0,87***	0,70***	0,68***	0,73***	0,79***	

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

Mina, Liina Hints,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Amazonase madaliku palmisoomuldade mikrobioloogiline lämmastikuringe ning selle seos dilämmastikoksiidi voogudega“, mille juhendajad 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 Commons 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, alates 30.05.2022 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.

Liina Hints

30.05.2022