

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

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogia erialal (12 EAP)

**Nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside määramine reaalaja PCR-i
ja isotoopanalüüsi meetoditega kuivendatud ja üleujutatud
kõdusoometsades**

Laura Kuusemets

Juhendajad: Mikk Espenberg, PhD

Ülo Mander, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

allkiri, kuupäev

Tartu 2021

Annotatsioon

Nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside määramine reaalaaja PCR-i ja isotoopanalüüsi meetoditega kuivendatud ja üleujutatud kõdusoometsades

Dilämmastikoksiid ehk naerugaas (N_2O) on ohtlik kasvuhoonegaas, mille kõige olulisemad voogude allikad mullast on nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsess. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida kõdusoometsades kuivenduse ja üleujutuse mõju erinevatele lämmastikuringe protsessidele ja N_2O emissioonile kasutades molekulaarseid ja isotoopanalüüsi meetodeid. Käesolevas töös läbiviidud kuivendamise ja üleujutamise eksperiment toimus jänese kapsa-kõdusoo kasvukohatüüpi kõdusoometsas Eestis. Reaal-aja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kasutati mullaproovidest bakterite ja arhede 16S rRNA, nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) ja denitrifikatsiooni (*nirK*, *nirS*, *nosZ I* ja *nosZII*) geenikoopiate arvukuse määramiseks. Lisaks mõõdeti mulla ja gaasi isotoopset koosseisu ning N_2O emissiooni. Töö tulemused näitasid, et erinev hüdroloogiline režiim mõjutab nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesse. Kuivendatud aladel määrab N_2O vooge nitrifikatsiooni protsess ja üleujutatud aladel denitrifikatsiooni protsess. Suurimad N_2O emissioonide kontsentratsioonid tulenesid kuivendatud aladelt nitrifitseerijate denitrifikatsioonil ammoniaaki oksüdeerivate bakterite vahendusel.

Märksõnad: kõdusoomets, lämmastikuringe, naerugaasi emissioon, mikrobioloogia, isotoopanalüüs

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

Abstract

Nitrification and denitrification processes in drained and inundated peatland forest determined by real-time PCR and isotope methods

Nitrous oxide (N₂O) is a harmful greenhouse gas that is mainly produced by nitrification and denitrification processes in soil. This study aimed to investigate the effect of drainage and rewetting on different nitrogen cycle processes and nitrous oxide (N₂O) emissions using real-time PCR and isotope methods. Experimental flooding and drainage experiment was conducted in an Oxalis site-type drained peatland forest in Estonia. Quantitative real-time PCR was used to measure the abundance of bacteria and archaea specific 16S rRNA, nitrification (*amoA* genes) and denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosII* genes) marker genes from the soil samples. In addition, isotope composition of soil and gas samples, and N₂O emissions were measured. Results of this study indicate that different hydrological regimes influence nitrification and denitrification processes. Regarding control of N₂O fluxes, nitrification played a major role on drained sites, and denitrification was the main process in rewetted sites. The results show that nitrifier denitrification via ammonia-oxidizing bacteria is the main controlling mechanism of N₂O fluxes.

Keywords: drained peatland forest, nitrogen cycle, nitrous oxide emission, microbiology, isotope analysis

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

Sisukord

Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Kõdusoometsade ökosüsteemid	6
1.1.1. Kuivenduse mõju.....	6
1.1.2. Üleujutuse mõju.....	6
1.2. Lämmastikuringe protsessid.....	7
1.2.1. Nitrifikatsioon.....	7
1.2.2. Denitrifikatsioon.....	9
1.3. Meetodid lämmastikuringe protsesside uurimiseks	10
1.3.1. Reaalaja PCR.....	11
1.3.2. Isotoopanalüüs	11
2. Metoodika	14
2.1. Prooviala kirjeldus.....	14
2.2. Mulla-, vee- ja gaasiproovide kogumine ja analüüs.....	15
2.3. DNA eraldamine mullaproovidest	16
2.4. Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil.....	16
2.5. Isotoopanalüüsi meetodi kasutamine (mulla- ja gaasiproovid).....	19
2.6. Andmeanalüüs ja autori osalus.....	19
3. Tulemused.....	20
3.1. Vee ja mulla füüsikalise-keemilised parameetrid	20
3.2 Mulla geenikoopiate arvukused	21
3.3. Geenikoopiate arvukuste seosed füüsikalise-keemiliste näitajatega, gaasiemissiooniga ja isotoopanalüüsidega	24
3.3.1. Geenikoopiate arvukuste seosed füüsikalise-keemiliste parameetritega.....	25
3.3.2. Geenikoopiate arvukuste seosed gaasiemissiooniga	25
3.3.3. Geenikoopiate arvukuste seosed isotoopanalüüsidega	26
3.4. Isotoopanalüüsise seosed gaasiemissiooniga.....	27
4. Arutelu	29
Kokkuvõte.....	31
Summary	32
Tänuavaldused	33
Kasutatud kirjandus	34
Lisad.....	44

Sissejuhatus

Ligikaudu 15% globaalsetest turbaaladest on kuivendatud metsanduse, põllumajanduse, karjatamise või turba kaevandamise tõttu (Joosten *et al.*, 2012). Turbamaade kuivendamisel suureneb ohtliku kasvuhoonegaasi diämmastikoksiidi ehk naerugaasi (N₂O) emissioon mullast atmosfääri (Klemedtsson *et al.*, 2005; Pärn *et al.*, 2018), kuid liigniisked tingimused vähendavad diämmastikoksiidi emissioone (Wilson *et al.*, 2016).

N₂O põhjustab kliimamuutusi ja hävitab osoonikihti stratosfääris (Darkwah *et al.*, 2018; IPCC, 2013; Ravishankara *et al.*, 2009). Maailma Meteoroloogiaorganisatsiooni andmeil jõudis 2019. aastal maailma keskmine N₂O kontsentratsioon atmosfääris väärtuseni 332 ppm, mis on 123% kõrgem võrreldes tööstuseelse perioodiga (WMO, 2020).

Kõige olulisemad mulla N₂O voogude allikad on nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsessid, mis toimuvad peamiselt vastavalt aeroobsetes või anaeroobsetes tingimustes (Wrage-Mönning *et al.*, 2018; Yano *et al.*, 2014). Eelnimetatud lämmastikuringe protsesside tulemusel jõuab mullast atmosfääri ligikaudu 70% ülemaailmsest N₂O-st (Syakila ja Kroeze, 2011; Braker ja Conrad, 2011).

Lämmastikuringe protsesside keerukuse ja paljususe tõttu kasutatakse nende uurimiseks erinevaid meetodeid ning nende rakendamine kombineeritult aitab teha kõige täpsemaid hinnanguid toimuvate protsesside kohta. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR - *quantitative Polymerase Chain Reaction*) kasutamine võimaldab hinnata erinevate lämmastikuringe protsesside toimumise potentsiaali ökosüsteemis (Levy-Booth *et al.*, 2014; Smith ja Osborn, 2009; Smith *et al.*, 2006). Isotoopanalüüside abil on võimalik näidata lämmastikühendite tegelikke muundumisi keskkonnas (Fry, 2006a; Fry, 2006b). Lisaks aitavad N₂O emissioonide mõõtmised mullast hinnata mikroobsete protsesside aktiivsust erinevates ökosüsteemides (Truu *et al.*, 2020).

Aina enam muutuvates kliimatingimustes ja ekstreemsete ilmastikusündmuste sagenemisel on täpsem protsesside ning nende võimalike muutuste tagajärgede hindamine väga vajalik, et leevendada negatiivseid kliimamuutuste mõjusid (Cavicchioli *et al.*, 2019 ; Swain *et al.*, 2020). Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida kodusoometsades kuivenduse ja üleujutuse mõju erinevatele lämmastikuringe protsessidele ja N₂O emissioonile kasutades molekulaarseid ja isotoopanalüüsi meetodeid.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Kõdusoometsade ökosüsteemid

Kõdusoometsad on turvas- ehk soomuldadel kasvavad metsad, mis on kujunenud kauaaegse madal- ja siirdesoode kuivendamise mõjul (Laas, 2011). Kõdusoometsade hulka kuuluvad jänesekapsa-kõdusoo ja mustika-kõdusoo kasvukohatüüp (Lõhmus, 2004). Puurindes domineerivad männid, kuused ja kased ning alustaimestiku liigiline koosseis on omane arumetsale (Laas, 2011). Eestis on kõdusoometsade kogupind ca 352 800 ha, mis moodustab 15,1% Eesti metsamaa pindalast (Keskkonnaagentuur, 2020).

1.1.1. Kuivenduse mõju

Soometsa kuivendamine muudab looduslikku veerežiimi ja mulla geneesi, mis parandavad puude kasvutingimusi ja suurendavad biomassi (Paal, 2013; Palo, 2016; Pikk, 2011). Kuivendamine alandab põhjaveetaset ja rikastab mulda hapnikuga (Laas, 2011). Selle tulemusel turba juurdekasv peatub, turbakiht hakkab lagunema ja moodustub kõdusoometsadele iseloomulik viljakas parasniiske kõduturbahorisont (Laas, 2011). Kõdusoometsades väheneb turbakihi tusedus 8-15 mm aastas (Astover, 2012).

Kuivendamise tagajärjel toimuvad muutused metsa aineringetes. Süsinikurikka turba laguprotsessides vabaneb sinna aastatuhandete jooksul talletunud süsinik ja paiskub süsinikdioksiidina (CO₂) atmosfääri (Palo, 2016). Lisaks eraldub dilämmastikoksiidi ehk naerugaasi (N₂O), mille globaalse soojenemise potentsiaal on süsihappegaasist 298 korda suurem (Regina *et al.*, 1996; IPCC, 2013). N₂O sisalduse tõus atmosfääris soodustab osoonikihi hõrenemist, tekitab kasvuhooneefekti ja suurendab ülemaailmset kliima soojenemist (Darkwah *et al.*, 2018; IPCC, 2013; Ravishankara *et al.*, 2009).

1.1.2. Üleujutuse mõju

Maa kliima soojenemine põhjustab muutusi sademete hulgas ja jaotuses (IPCC, 2013; Trenberth, 2011) ning näiteks Põhja-Euroopas on oodata sademete hulga suurenemist (Kjellström *et al.*, 2011). Lisaks muutuvad üha sagedasemaks äärmuslikud ilmastikunähtused, sealhulgas põuad ja üleujutused (IPCC, 2013; Trenberth, 2011).

Üleujutusest tingitud liigniiskus pärsib orgaanilise aine lagunemist ja nitrifikatsiooni toimumist (Minkkinen *et al.*, 2020). See põhjustab üldiselt N₂O ja CO₂ emissioonide vähenemist (Minkkinen *et al.*, 2020; Wilson *et al.*, 2016). Samas selgus Eestis tehtud uuringutest, et kõikuv põhjaveetase (Mander *et al.*, 2015) ja lühiajalised üleujutused (Schindler *et al.*, 2020) võivad N₂O vooge ka tõsta.

1.2. Lämmastikuringe protsessid

Lämmastikuringe on kompleksne biogeokeemiline süsteem, kus toimub lämmastiku (N) ja selle ühendite ringlus ning muundumine elusa ja eluta looduse vahel. Lämmastik on atmosfääri peamine komponent, millel on elusorganismide kasvu limiteeriva elemendina asendamatu roll metsade ökosüsteemides (Cheng *et al.*, 2019). Elusorganismid kasutavad lämmastikku orgaaniliste ühendite, valkude ja nukleiinhapete valmistamiseks (Kuypers *et al.*, 2018).

Lisaks looduslikele protsessidele võib üleliigset lämmastikku jõuda metsadesse näiteks piirnevate põllumaadelt (Law *et al.*, 2013). Metsadest võivad lämmastikühendid liikuda atmosfääri molekulaarse lämmastikuna (N₂), lämmastikoksiidina (NO) või naerugaasina (N₂O) (Matson *et al.*, 2002). Lisaks võib lämmastik liikuda nitraadina põhja- ja pinnavette, mis põhjustab veekogude reostumist ja eutrofeerumist (Galloway *et al.*, 2003; Gundersen *et al.*, 2006).

Olulisemad metsa ökosüsteemides toimuvad mikrobioloogilise lämmastikuringe protsessid on ammonifikatsioon, assimilatsioon, nitrifikatsioon (Cheng *et al.*, 2019), denitrifikatsioon (Fang *et al.*, 2015), bioloogiline lämmastiku (N₂) fikseerimine (Zhu *et al.*, 2015), dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (DNRA) (Zhang *et al.*, 2011), täielik ammooniumi oksüdeerimine (COMAMMOX) (Osburn ja Barrett, 2020) ning anaeroobse ammooniumi oksüdeerimine (ANAMMOX) (Xi *et al.*, 2016). Eelnimetatud protsessidest on nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni osakaal kõige suurem ohtliku kasvuhoonegaasi dilämmastikoksiidi (N₂O) emiteerimises ning nende mikroobsete protsesside tulemusel jõuab mullast atmosfääri ligikaudu 70% ülemaailmsest N₂O-st (Syakila ja Kroeze, 2011; Braker ja Conrad, 2011).

1.2.1. Nitrifikatsioon

Mikroorganismide vahendusel toimub ammoniaagi muundamine nitraadiks ehk nitrifikatsioon, mis on üldiselt kaheastmeline reaktsioon (joonis 1) (Cheng *et al.*, 2019). Esimeses etapis

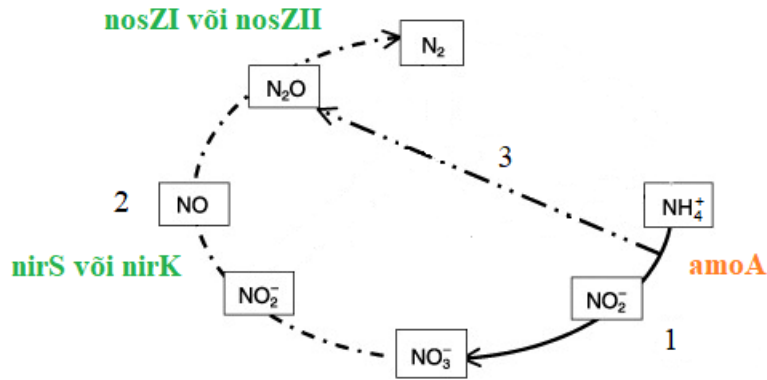
oksüdeerivad bakterid ja arhed ammooniumiooni (NH_4^+) nitritiooniks (NO_2^-) (valem 1) (Cheng *et al.*, 2019; van Kessel *et al.*, 2015). Tuntuimad ammooniumi nitritiks oksüdeerijad on kemolitotroofsed bakterid *Nitrosospira* ja *Nitrosomonas* (Cameron *et al.*, 2013, Levy-Booth *et al.*, 2014). Protsessi teises etapis muudavad mikroobid, peamiselt *Nitrobacter* ja *Nitrospira*, nitritiooni (NO_2^-) nitraatiooniks (NO_3^-) (valem 2) (Cebren ja Garnier, 2005; van Kessel *et al.*, 2015).



Nitrifikatsiooni esimene etapp koosneb omakorda kahest reaktsioonist: ammooniumi oksüdeerimine hüdroksüülamiiniks (NH_2OH) ja viimase edasi oksüdeerimine nitritiks (Kuypers *et al.*, 2018). Ensüüm ammoniaagi monooksügenaas (Amo), mida kodeerib teiste seas *amoA* geen, katalüüsib ammooniumi oksüdeerimist hüdroksüülamiiniks (Kuypers *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014). Eelnimetatud protsessi läbi viivad arhede *amoA* ja bakterite *amoA* geenid ei ole identsed ja on omavahel seotud vaid kaudselt (Stahl ja de la Torre, 2012). Nitrifikatsiooni esimese etapi käigus võib kõrvalproduktina emiteeruda keskkonda ka ohtlikku dilämmastikoksiidi (N_2O) ehk naerugaasi, mis lõhub osoonikihti ja põhjustab kasvuhooneefekti (Hallin *et al.*, 2018).

Nitrifikatsiooni on võimelised lisaks eelpool kirjeldatud mikroorganismidele tegema ka 2015. aastal avastatud ammooniumi oksüdeerivad bakterid, kes on üksinda suutelised läbi viima nii esimese kui ka teise nitrifikatsiooni etapi (valem 3). Perekonda *Nitrospira* kuuluvad bakterid on tuntuimad esindajad COMAMMOX-i (täielik ammooniumi oksüdeerimine) tegevatest organismidest (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015).





Joonis 1. Nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsessid ning neid etappe läbi viivad võtmegeenid. Mikroobsed protsessid: 1) nitrifikatsioon, 2) denitrifikatsioon, 3) ammooniumi oksüdeerimise kõrvalproduktina võib tekkida N_2O (modifitseeritud Hayatsu *et al.*, 2008 järgi).

1.2.2. Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on mikroobne protsess, kus nitraat (NO_3^-) või nitrit (NO_2^-) redutseeritakse fakultatiivsete anaeroobide vahendusel gaasilisteks lämmastikuvormideks, peamiselt dilämmastikoksiidiks (N_2O) ja molekulaarseks lämmastikuks (N_2) (joonis 1) (Wallenstein *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2013; Philippot, 2002). See on peamine mikroobne protsess, mille käigus taimedele kättesaadav reaktiivne lämmastik muundatakse tagasi bioloogiliselt mittereaktiivseks lämmastikuks (N_2) (Galloway *et al.*, 2004). Denitrifitseerivate mikroorganismide seas on nii baktereid, arhesid (Philippot, 2002) kui ka seeni (Shoun *et al.*, 1992).

Protsessi läbi viivad fakultatiivsed anaeroobid kasutavad elektronaktseptorina lämmastikoksiide (NO_x) või hapnikku. Kui keskkond on hapnikuvaene, siis kasutatakse aktseptorina lämmastikoksiide (NO_x) (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013). Piisava hapniku juuresolekul on elektronide aktseptorina eelistatud hapnik, mis on mikroobidele energeetiliselt soodsam (Spanning *et al.*, 2007). Autotroofselt denitrifikatsioonil kasutatakse elektrondonorina anorgaanilisi ühendeid ja heterotroofselt denitrifikatsioonil orgaanilisi süsiniku ühendeid (Vasiliadou *et al.*, 2006).

Täielik denitrifikatsiooni rada jaguneb neljaks järjestikkuseks ensümaatiliseks katalüüsitud etapiks (Cameron *et al.*, 2013; Hallin *et al.*, 2018). Esmalt redutseeritakse nitraat nitritiks (valem 4), mis omakorda redutseeritakse lämmastikoksiidiks (valem 5). Seejärel muundatakse lämmastikoksiid dilämmastikoksiidiks (valem 6) ja lõpuks molekulaarseks lämmastikuks

(valem 7) (Black *et al.*, 2016; Cameron *et al.*, 2013).



Nitraadi muundumist nitritiks teevad membraaniseoselist nitraadi reduktaasi (Nar) või periplasmaatilist nitraadi reduktaasi (Nap) omavad mikroorganismid ning nende ensüümide kodeerimises osalevad vastavalt *nar* ja *nap* geenid (Philippot, 2002). Teine etapp, nitriti reduktsioon lämmastikoksiidiks, on vahendatud mikroorganismide poolt, mis omavad vaske sisaldavat nitriti reduktaasi (kodeerib *nirK* geen) või tsütokroom *cd1-e* sisaldavat nitriti reduktaasi (kodeerib *nirS* geen) (Zumft, 1997). Lämmastikoksiidi redutseerimine dilämmastikoksiidiks toimub lämmastikoksiidi reduktaasi abil, mida kodeerivad *qnorB* või *cnorB* geenid (Graf *et al.*, 2014). Viimases etapis toimuvat dilämmastikoksiidi redutseerimist molekulaarseks lämmastikuks katalüüsib dilämmastikoksiidi reduktaas, mis on kodeeritud kas *nosZI* või *nosZII* geenide poolt (Kuypers *et al.*, 2018; Hallin *et al.*, 2018).

1.3. Meetodid lämmastikuringe protsesside uurimiseks

Lämmastikuringe mikroobsete protsesside mitmeetapilisuse ja paljususe tõttu kasutatakse nende uurimiseks erinevaid meetodeid. Neid rakendades nii üksi kui ka kombineeritult saab uurida mikroobide potentsiaali ja aktiivsust erinevateks protsessideks paljudes keskkondades. Lämmastikuringe uurimiseks saab kasutada molekulaarseid meetodeid (Drenovsky *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015; Smith ja Osborn, 2009), stabiilsete isotoopide jälgimiskatseid (Fry, 2006b; Fry, 2006c) ja gaasiemissioonide mõõtmist (Dacres ja Rapson, 2014; Truu *et al.*, 2020).

Molekulaarsetest meetoditest võimaldab reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR - *quantitative Polymerase Chain Reaction*) täpselt ja kiirelt määrata lämmastikuringe protsesse kontrollivate märklaudgeenide arvukust keskkonnas, mis näitab erinevate protsesside potentsiaali (Levy-Booth *et al.*, 2014; Smith ja Osborn, 2009; Smith *et al.*, 2006). qPCR võimaldab määrata nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesse kontrollivate märklaudgeenide arvukust keskkonnas (joonis 1). Lämmastiku isotoopide analüüsimise abil saab näidata lämmastikühendite muundumisi ökosüsteemis (Baggs *et al.*, 2008; Fry, 2006b; Hu *et al.*, 2015).

Gaaside mõõtmise ja isotoopanalüüsi meetodid aitavad erinevate protsesside aktiivsust hinnata,

kuigi nende seostamine konkreetsete mikroobsete radadega on üsna kaudne ilma mikrobioloogiliste meetoditega võrdluseta (Baggs *et al.*, 2008; Drenovsky *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2015).

1.3.1. Reaalaja PCR

qPCR on molekulaarne meetod uuritava DNA lõigu amplifitseerimiseks ehk kordistamiseks (Valasek ja Repa, 2005). Antud meetodi abil saab ühte DNA fragmenti kordistada miljoneid kordi (Powledge, 2004). qPCR meetodiga on võimalik määrata geene ja nende koguseid (Wallenstein *et al.*, 2006). qPCR-i eelisteks on väike ajakulu, täpsus ning tundlikkus, mis võimaldab reaktsiooni läbi viia väga väikeste nukleiinhappe koguste juures (Powledge, 2004; Valasek ja Repa, 2005).

qPCR põhineb traditsioonilisel polümeraasi ahelreaktsioonil, mis koosneb kolmest järjestikusest protsessist (Powledge, 2004; Valasek ja Repa, 2005). Esmalt toimub DNA kaksikahela kuumutamine kõrgel temperatuuril, mille tulemusel kaksikahel eraldub kaheks üksikahelaks. Seda protsessi nimetatakse denaturatsiooniks. Seejärel liituvad kaks oligonukleotiidset praimerit denaturatsioonil tekkinud DNA üksikahelatele. Viimases etapis sünteesib DNA polümeraas uut DNA-d (Powledge, 2004). qPCR toimub tsükliliselt mitmeid kordi. Reaktsioon lõppeb, kui qPCR-i toimumiseks on mõni vajalik koostisosa reaktsioonisegus ammendunud (Kubista *et al.*, 2006).

qPCR meetodi aluseks on fluorestsentsignaali kasutamine amplifikatsiooni jälgimiseks ja uuritava geneetilise materjali koguse määramiseks (Valasek ja Repa, 2005). Fluorestsentsignaali emiteerijaks on reaktsioonisegule lisatud ja seejärel DNA amplifitseerimisel fluorestsentsi andev aine (nt SYBR Green I). Signaal tugevneb igas tsüklis sünteesitava materjali koguse kasvades (Thornton ja Basu, 2011).

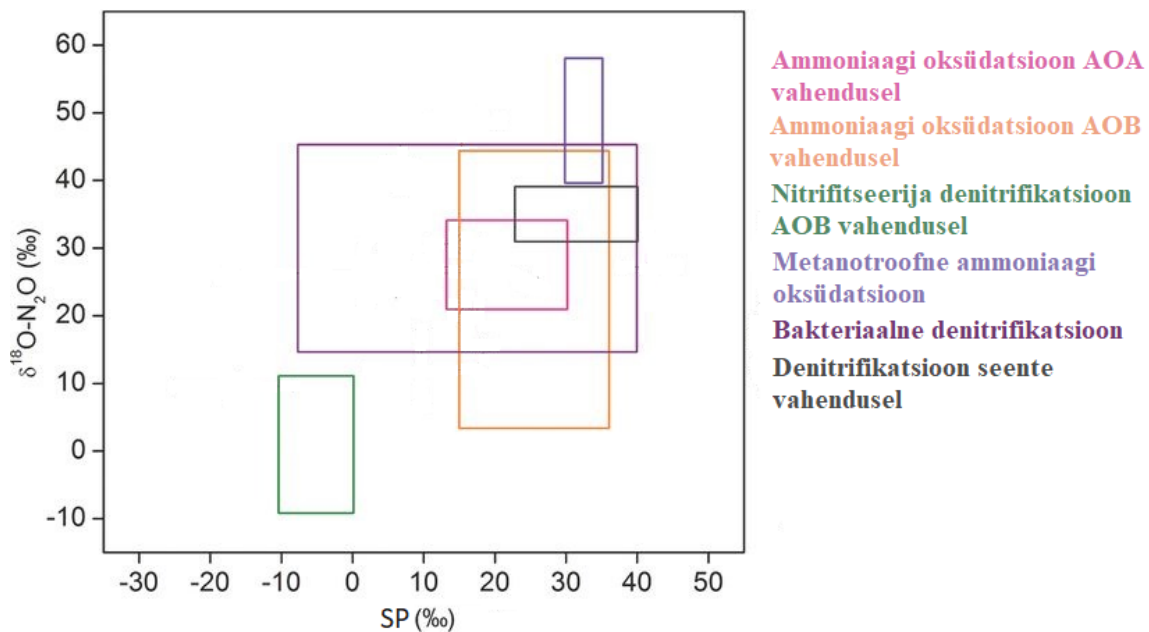
1.3.2. Isotoopanalüüs

Isotoopideks nimetatakse mingi keemilise elemendi aatomeid, mis eristuvad üksteisest aatommassi tõttu ja see on tingitud isotoopide tuumas paiknevate neutronite erinevast hulgast. Lämmastikul on kaks stabiilset isotoopi, ^{14}N ja ^{15}N (Ryabenko, 2013). Eelnimetatud isotoopidel on stabiilne aatomituum, mis ei lagune spontaanselt ega emiteeri radioaktiivset kiirgust (Sulzman, 2007).

Looduses võib N_2O esineda isotopomeeridena ehk molekulidena, mille isotoobid on samad,

kuid nende asetus erineb. N₂O isotopomeerid on näiteks ¹⁴N¹⁵N¹⁶O ja ¹⁵N¹⁴N¹⁶O (Sharp, 2017). Nagu näha, võib N₂O molekulis ¹⁵N olla sisemises (α) või välimises (β) positsioonis (Ryabenko, 2013). Sellise ¹⁵N intramolekulaarse jaotumise järgi saab leida N₂O isotopomeeride *site preference* (SP), mis näitab δ¹⁵N^α ja δ¹⁵N^β vahekorda N₂O molekulis (valem 8) (Toyoda ja Yoshida, 1999). *Site preference* annab aimu N₂O päritolu kohta (joonis 2) (Hu *et al.*, 2015).

$$SP = \delta^{15}N^{\alpha} - \delta^{15}N^{\beta} \quad (8)$$



Joonis 2. Värvilised kastid näitavad hinnanguliselt vahemikke, milles võivad domineerida erinevad lämmastikoksiidi tootvad protsessid (Hu *et al.*, 2015 järgi). AOB – ammoniaaki oksüdeerivad bakterid. AOA – ammoniaaki oksüdeerivad arhed.

Lämmastikku massiarvuga 15 kasutatakse sagedasti lämmastiku uurimisel, sest selle looduslik foon on madal (Yu *et al.*, 2019). Nimelt on kergemat isotoopi massiarvuga 14 looduses ligikaudu 99,634%, kuid raskemat lämmastikku massiarvuga 15 ainult 0,366% (Meija *et al.*, 2016). Lämmastikuringe protsesside uurimisel kasutatakse niinimetatud ¹⁵N-i märgistamise meetodit (*15N labeling method*), millega saab jälgida lämmastikühendite muundumist ja liikumist keskkonnas (Bedard-Haughn *et al.*, 2003).

¹⁵N-i märgistamise meetod põhineb uuritava keskkonna kunstlikul rikastamisel ¹⁵N-ga (Bedard-Haughn *et al.*, 2003). Selleks kasutatakse ¹⁵N-ga rikastatud substraati, mis lisatakse uuritavasse keskkonda, millest seejärel võetakse mulla- ja/või gaasiproovid (Bedard-Haughn *et al.*, 2003; Mathieu *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2013).

Proovidest isotoopmärgiste määramiseks saab kasutada stabiilsete isotoopide suhte mass-spektromeetrit. See põhineb keemilise elemendi isotoopide fraktsioneerumisel vastavalt nende massile. Mass-spektromeeter võimaldab mõõta osakeste masside omavahelist suhet. Esmalt toimub uuritava ühendi ioniseerimine, mille tagajärjel tekivad elektrilaenguga osakesed ehk ioonid. Seejärel liiguvad ioonid läbi magnetvälja, mis sorteerib laetud osakesed nende massi alusel. Siis suunatakse ioonid detektorisse, kus määratakse erineva aatommassiga ionide hulk proovis (Sharp, 2017).

2. Metoodika

2.1. Prooviala kirjeldus

Käesolevas töös läbiviidud välitööd toimusid Järvelja õppe- ja katsemetskonnas Tartu maakonnas Kastre vallas Agali küla lähistel (58°17' N; 27°19' E). Uurimisala asub jänesekapsa-kõdusoo kasvukohatüüpi kõdusoometsas, mille puistus domineerivad kased ja kuused. Uurimisala asukoht ja katsealad on näidatud joonisel 3.



Joonis 3. Uurimisala asukoht ning kuivendatud (A) ja üleujutatud (B) katselapid.

Uurimisalale rajati 2020. aasta juulis kuus kolmnurkset võrdkülgset katselappi ning üleujutuse ja kuivendamise eksperiment algas oktoobris 2020. Katselapid jaotati veerežiimi alusel kaheks: kolm kuivendatud katselappi (joonis 3A) ja kolm üleujutatud katselappi (joonis 3B). Kuivendatud ja üleujutatud katsealad asusid üksteisest ca 10 meetri kaugusel ning mõlema ala katselapid asusid üksteisest paari meetri kaugusel. Üleujutatud katselappidele juhiti perioodiliselt vett, et jäljendada sellega üleujutusi ning tekitada anoksilisi tingimusi. Üleujutuseks vajalikku vett reguleeriti pumbaga ja selleks kasutati läheduses asuva kraavi vett. Kuivendatud katselappidelt juhiti vett välja lapil asuvast tsentraalsest kaevust pumbaga. Iga katselapile paigaldati kolm rõngast, millele paigaldati gaasiproovide kogumise ajal vastavad

kambrid. Lisaks sellele installeeriti igale katselapile vaatluskaev (PVC toru, Ø 5 cm) veeproovide mõõtmiseks.

2.2. Mulla-, vee- ja gaasiproovide kogumine ja analüüs

Välitööd toimusid kuuel korral ajavahemikul oktoober 2020 kuni jaanuar 2021 (06.10.2020-07.01.2021). Kõikidel proovivõtupäevadel koguti mulla-, vee- ja N₂O gaasiproove. ¹⁵N-i märgistamise meetodi tarvis lisati kahel proovivõtupäeval (20.10.20 ja 26.11.20) igasse rõngasse ¹⁵NO₃ ja kahel teisel proovivõtupäeval (27.10.20 ja 30.11.20) ¹⁵NH₄ sisaldavat substraati. Kui lisati ¹⁵N-ga rikastatud substraati, siis toimus mulla- ja gaasiproovide kogumine alati pärast seda.

Pinnaseproovid koguti igal välitööpäeval peale gaasivoogude mõõtmist. Iga rõnga juurest võeti sügavuselt 0-10 cm mullapuuriga pinnaseproov keemilisteks ja mikrobioloogilisteks analüüsideks eraldi kilekottidesse. Kuni keemiliste analüüsideni säilitati proove külmkapis +4 °C juures ja mikrobioloogilisteks analüüsideks säilitati proove sügavkülmikus -20°C juures. Mullaproovide keemiline analüüs tehti EMÜ Taimebiokeemia laboratooriumis, kus määrati standardmeetoditel (APHA, 1989) ammooniumi (NH₄-N), nitraadi (NO₃-N), fosfori (P), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca), magneesiumi (Mg) ja pH väärtused ning üldlämmastiku (N), kuivaine ja orgaanilise aine protsentuaalne sisaldus. Lisaks pinnaseproovidele mõõdeti 10 cm sügavuselt igal välitööpäeval mullatemperatuur (°C).

Multimeetriga YSI Professional Plus mõõdeti vaatluskaevudest veeparameetritest temperatuur (°C), redokspotentsiaal (mV), elektrijuhtivus (µS/cm) ja pH. Vaatluskaevudest mõõdeti ka vee hapnikusisaldus (mg/l; 5 cm sügavuselt).

N₂O gaasiproovide kogumine toimus staatilise pimekambri meetodil. Gaasiproovid koguti katselappidele paigaldatud plastikrõngaste peale õhukindlalt asetatud polüvinüülkloriidist kambritest (Ø 50 cm, kõrgus 40 cm ja ruumala 65 l). Proove koguti ühe tunni jooksul iga 20 minuti tagant. Proovid võeti eelvakumeeritud klaaspudelitesse kõigist rõngastele asetatud kambritest (18), seejuures kasutati N₂O voo määramiseks 50 ml pudeleid ning isotoopide analüüsi tarbeks 100 ml pudeleid.

N₂O kontsentratsioon proovipudelites määrati Tartu Ülikooli geograafia osakonna aineringete uurimislaboris kasutades elektron- ja leekionisatsiooni detektoritega varustatud gaas-

kromatograafi Shimadzu 2014-GC (Kyoto, Jaapan). N₂O voog arvutati ühe tunni jooksul kambrist kogutud proovide kontsentratsioonide alusel (Soosaar *et al.*, 2011)

2.3. DNA eraldamine mullaproovidest

Mullaproovidest eraldati DNA kasutades DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit (Qiagen, USA) ja järgiti tootja poolt esitatud protokoll. DNA eraldati 0,25 g mürjast mullaproovist. Erinevalt tootjapoolsest juhendist kasutati proovide homogeniseerimiseks masinat Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa) programmiga 20 sekundit režiimil 5000 pööret minutis. Spektrofotomeetriga Infinite 200 M (Tecan AG, Austria) mõõdeti DNA kontsentratsiooni ja hinnati DNA kvaliteeti. Järgnevate analüüside tarbeks säilitati eraldatud DNA sügavkülmikus –20 °C juures.

2.4. Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil

Kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kasutati proovidest bakterite ja arhede 16S rRNA geenide arvukuse määramiseks ning samuti nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) ja denitrifikatsiooni (*nirK*, *nirS*, *nosZ* klaad I ja *nosZ* klaad II) geenide arvukuse määramiseks (tabel 1).

qPCR reaktsioonide toimumiseks kasutati termotsüklerit Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). Reaktsioonisegu maht oli 10 µl. See sisaldas päri- ja vastassuunalist praimerit (kontsentratsioonid tabelis 1), 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 1 µl eraldatud DNA-d ning ülejäänud mahus destilleeritud vett. Iga proovi amplifitseeriti kolmes korduses. Kõikidele qPCR-i mõõtmistele lisati kolm negatiivset kontrollproovi, mille reaktsioonisegust puudus DNA. Kasutatud praimerid, kontsentratsioonid ja qPCR programmid on toodud tabelis 1.

qPCR-il saadud tulemuste hindamine viidi läbi programmidega Rotor-Gene Q Series Software v. 2.0.2 (Qiagen, USA) ja LinRegPCR v. 2020.2 (Holland). Programmiga STATISTICA v. 7.1 (TIBCO, USA) kasutatud ühefaktorilise dispersioonianalüüsi (one-way ANOVA) abil selgitati välja proovide amplifikatsiooni-efektiivsuste erinevused ning seetõttu jaotati proovid kaheteistkümneks amplikoniks proovivõtuaja ja töötuse (kuiv/märg) alusel. Geenikoopiate arvukuse arvutamiseks kasutati kaliiberkõvera vahemikke. Geenikoopiate arv esitati geeni

koopiate arv ühe grammi kuivaine (GK/gKA) kohta. Põhjalikumalt on PCR meetoodika selgitatud Espenberg *et al.* 2018.

Tabel 1. qPCR-il kasutatud praimerid ja nende kogused ning qPCR programmid.

Märklaudgeen	Praimer	Praimeri kontsentratsioon (μM)	Amplikoni pikkus (bp)	Viide	qPCR programm
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	0,6	530	Liu <i>et al.</i> , 2007	95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s
	Bact1028R			Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008	
Arhede 16S rRNA	Arc519F	0,6	393	Espenberg <i>et al.</i> , 2016	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s
	Arch910R				
<i>nirK</i>	nirK876	0,8	165	Hallin ja Lindgren, 1999	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 58°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s ^a
	nirK1040				
<i>nirS</i>	nirSCd3af	0,8	431	Kandeler <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s ^a
	nirSR3cd				
<i>nosZI</i>	nosZ2F	0,8	267	Henry <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s ^a
	nosZ2R				
<i>nosZII</i>	nosZIIF	0,6	~700	Jones <i>et al.</i> , 2013	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s, 80°C 45 s ^a
	nosZIIR				
Bakterite <i>amoA</i>	amoA-1F	0,8	491	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 57°C 45 s, 72°C 45 s
	amoA-2R				
Arhede <i>amoA</i>	CrenamoA 23F	0,8	~600	Tourna <i>et al.</i> , 2008	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s
	CrenamoA 616R				

2.5. Isotoopanalüüsi meetodi kasutamine (mulla- ja gaasiproovid)

Isotoopne koosseis ($\delta^{15}\text{N-N}_2\text{O}$; $\delta^{18}\text{O-N}_2\text{O}$, $^{15}\text{N}^\alpha\text{-N}_2\text{O}$, $^{15}\text{N}^\beta\text{-N}_2\text{O}$) ning SP (*site preference* ehk α ja β $^{15}\text{N-N}_2\text{O}$ vahe) määrati TÜ geoloogia osakonna isotoop-mass-spektromeetria laboris.

Mullaproovide isotoopanalüüsiks kuivatati need esmalt 60 °C juures. Seejärel kaaluti 1,1-1,3 mg proovi ja pakendati tinast kapslisse. Pärast pakendamist analüüsiti proove isotoop-suhte mass-spektromeetril Delta V Plus (Thermo Scientific, Bremen, Saksamaa), mis oli kombineeritud element-analüsaatoriga Flash HT (Thermo Scientific). Tulemused kalibreeriti vastavalt Rahvusvahelise Aatomienergia Agentuuri (IAEA) standarditele IAEA-N-1, IAEA-N-2 ja USGS 25. Detailsem ülevaade antud isotoopanalüüsist on esitatud Masta *et al.* 2020.

Gaasiproovide stabiilsete isotoopide koostise analüüs tehti isotoop-mass-spektromeetriga Delta V Advantage, mis oli kombineeritud GasBench II ja ConFlo IV süsteemiga (Thermo Scientific). Tulemused kalibreeriti vastavalt USGS51 ja USGS52 standarditele. Detailsem ülevaade gaasiproovide isotoopanalüüsist on esitatud Masta *et al.* 2020.

2.6. Andmeanalüüs ja autori osalus

Vee ja mulla füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geenikoopiate arvukuste statistiliselt oluliste erinevuste leidmiseks erineva töölusega katselappidel kasutati t-testi. Spearmani korrelatsioonanalüüsiga hinnati seoste olulisust geenikoopiate arvukuse ning gaasiemissiooni, isotoopanalüüsi parameetrite ning mulla ja vee füüsikalise-keemiliste parameetrite vahel kahes grupis (kuivendatud ja üleujutatud katselapid). Andmeanalüüs tehti statistikaprogrammis Statistica v.7.1. Jooniste koostamiseks kasutati tabelarvutustarkvara Microsoft Excel.

Bakalaureuse töö autor osales pinnaseproovide kogumisel. Autor eraldas ka katselappide pinnaseproovidest DNA ning viis läbi qPCR-i mõõtmised ja rehkendas geenikoopiate arvukused. Lisaks tegi autor andmeanalüüsi.

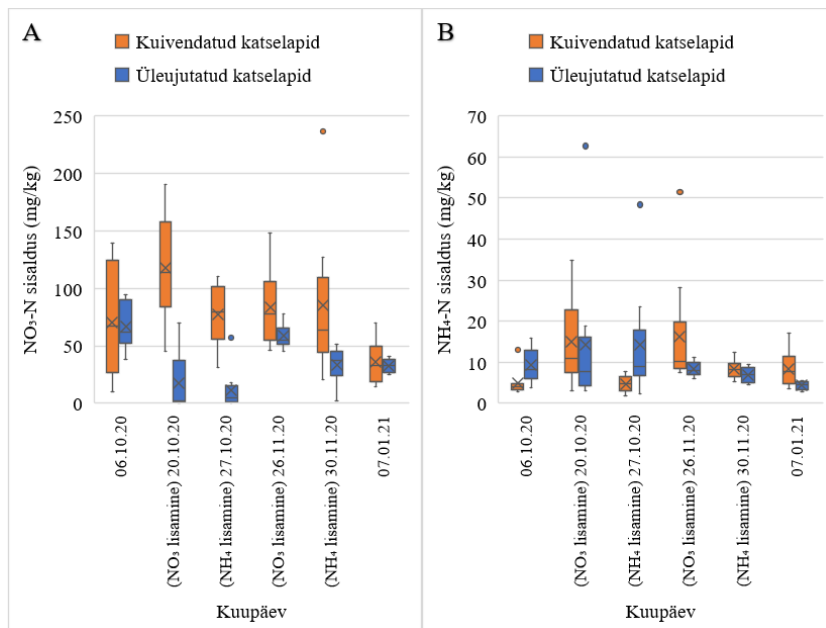
3. Tulemused

3.1. Vee ja mulla füüsikalised-keemilised parameetrid

Kuivendatud ja üleujutatud katselappidel oli keskmine veetemperatuur vaatluskaevudes vastavalt $7,6 \pm 1,4$ °C ja $6,4 \pm 1,4$ °C üle kõigi proovipäevade mõõtmiste. Kuivendatud katselappide vaatluskaevudest mõõdetud redokspotentsiaal jäi vahemikku $281,3 \pm 78,1$ mV ja üleujutatud katselappidel $267,6 \pm 52,2$ mV. Vaatluskaevudest mõõdetud vee pH kuivendatud katselappidel oli $7,4 \pm 0,7$ ja üleujutatud katselappidel $7,5 \pm 0,6$. Kuivendatud ja üleujutatud katselappidel oli elektrijuhtivus vaatluskaevudes vastavalt $158,4 \pm 130,5$ ja $92,5 \pm 80,7$ uS/cm ($p < 0,05$).

Mulla pH oli vahemikus 4,65–4,95 ja 4,93–5,35 vastavalt kuivendatud ja üleujutatud katselappidel üle kõigi mõõtmiste uurimisperioodil ($p < 0,001$). Üldlämmastikku oli kuivendatud katselappide mullas vahemikus 2,15–3,13% ning üleujutatud katselappide mullas vahemikus 2,39–2,88%. Orgaanilist ainet oli kuivendatud katselappide mullas vahemikus 64,54–71,56% ja üleujutatud katselappide mullas vahemikus 59,39–70,33% ($p < 0,01$). Kuivendatud katselappide mulla keskmine P sisaldus oli $37,88 \pm 7,96$ mg/kg, K oli $307,43 \pm 104,58$ mg/kg, Ca oli $4126,45 \pm 322,81$ mg/kg ja Mg oli $888,69 \pm 113,92$ mg/kg. Üleujutatud katselappide mulla keskmine P sisaldus oli $30,71 \pm 8,67$ mg/kg, K oli $344,44 \pm 79,34$ mg/kg, Ca oli $4470,53 \pm 353,62$ mg/kg ja Mg oli $1264,10 \pm 185,36$ mg/kg. Statistiliselt oluliselt erinesid mulla P, ($p < 0,05$), Ca ($p < 0,001$) ja Mg ($p < 0,001$) kontsentratsioon erineva töötlusega katselappidel.

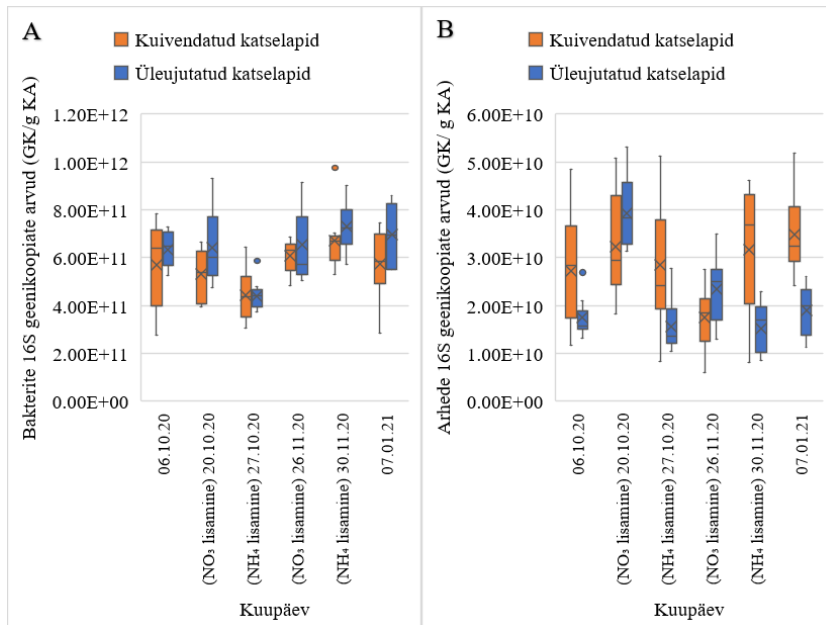
Mulla NO₃-N kontsentratsioon oli üleujutatud katselappidel statistiliselt oluliselt madalam võrreldes kuivendatud katselappidega ($p < 0,001$) ja see oli nähtav ka eraldi NO₃-N ($p < 0,001$) või NH₄-N ($p < 0,01$) lisamisel (joonis 4A). Mulla NH₄-N kontsentratsioonis statistiliselt olulist erinevust ei ilmnenud kuivendatud ja üleujutatud katselappide vahel (joonis 4B).



Joonis 4. NO₃-N (A) ja NH₄-N (B) sisaldus kuivendatud ja üleujutatud katselappidel eksperimendi jooksul.

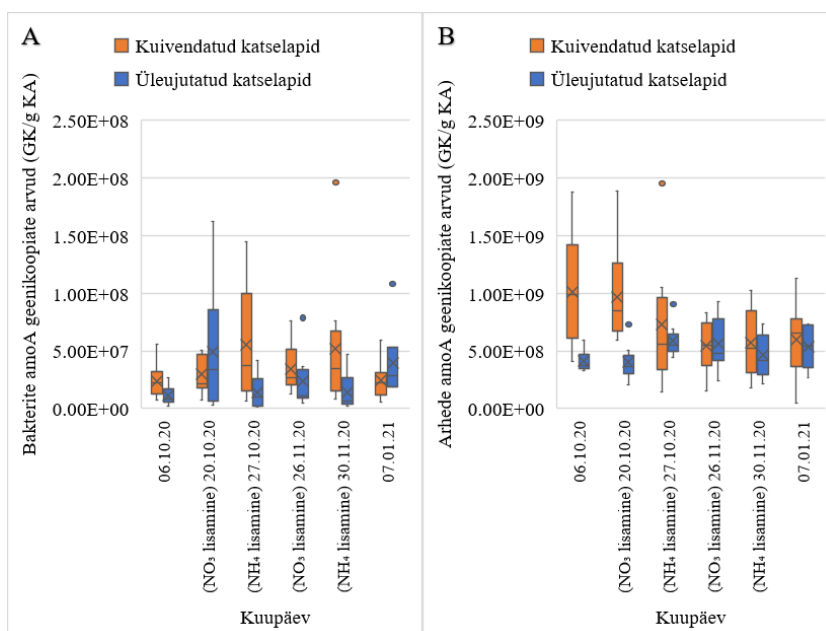
3.2 Mulla geenikoopiate arvukused

Bakterite geenikoopiate arvukustes statistiliselt olulist erinevust ei ilmnenud üleujutatud ja kuivendatud katselappide vahel (joonis 5A). Arhede geenikoopiate arvukused olid kuivendatud katselappidel statistiliselt oluliselt kõrgemad võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,01$) (joonis 5B). NH₄ lisamisel oli arhede geenikoopiate arvukus statistiliselt oluliselt kõrgem kuivendatud lappidel võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,001$), aga NO₃ lisamise puhul nende lappide vahel arhede arvukuses statistiliselt olulist erinevust ei olnud.



Joonis 5. Bakterite (A) ja arhede (B) 16S rRNA geenikoopiate arvukused kuivendatud ja üleujutatud katselappidel eksperimendi jooksul.

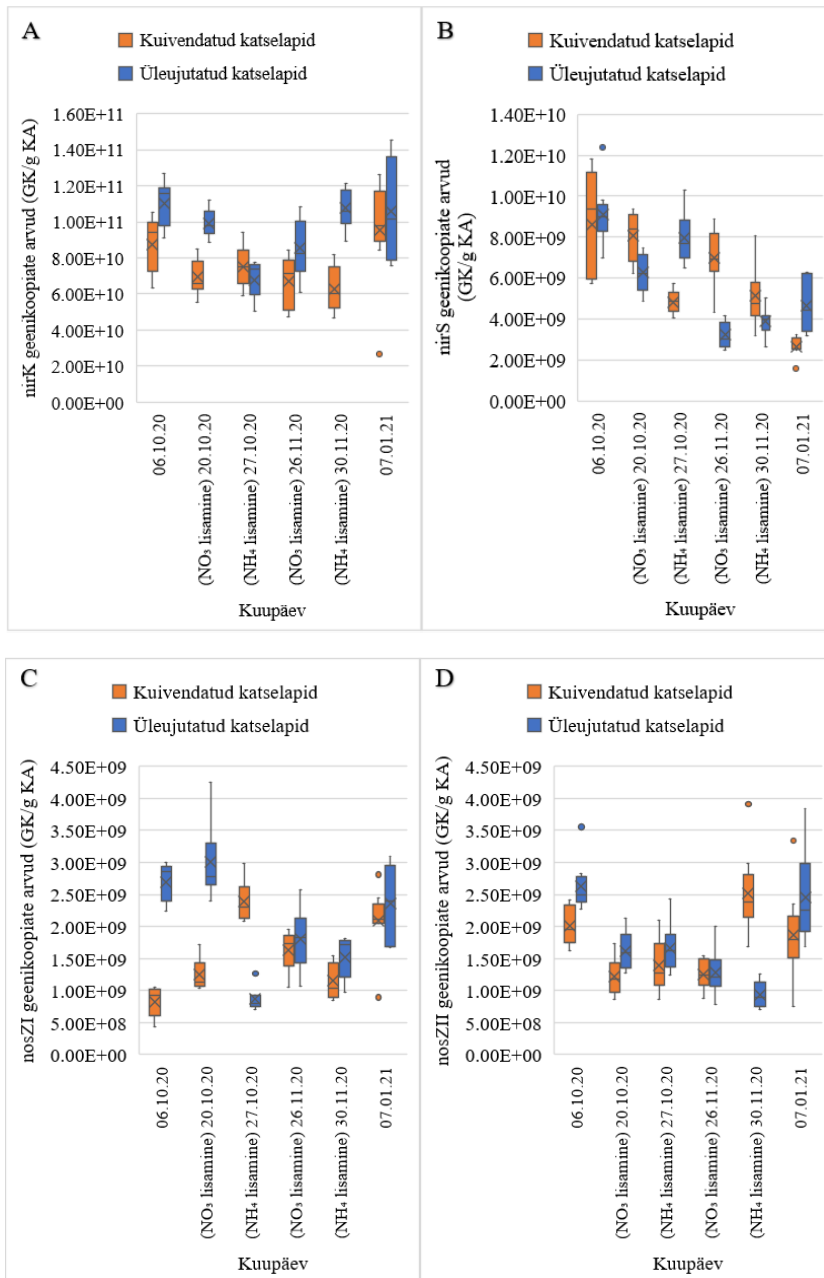
NH₄ lisamisel oli bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus kuivadel katselappidel statistiliselt oluliselt suurem kui üleujutatud katselappidel ($p < 0,01$; joonis 6A). Arhede *amoA* geenikoopiate arvukused olid statistiliselt oluliselt kõrgemad kuivendatud katselappidel võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,001$; joonis 6B) ja samasugune erinevus oli nähtav ka ainult NO₃ lisamisel ($p < 0,05$).



Joonis 6. Bakterite *amoA* (A) ja arhede *amoA* (B) geenikoopiate arvukused kuivendatud ja üleujutatud katselappidel eksperimendi jooksul.

nirK geenikoopiate arvukused olid kuivendatud katselappidel statistiliselt oluliselt madalamad võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,001$) ja see oli nähtav ka eraldi NO_3 ($p < 0,001$) või NH_4 ($p < 0,01$) lisamisel (joonis 7A). NO_3 lisamisel oli statistiliselt oluliselt suurem *nirS* geenikoopiate arvukus kuivadel katselappidel võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,001$; joonis 7B).

nosZI geenikoopiate arvukused olid kuivendatud katselappidel statistiliselt oluliselt madalamad võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,01$) ja sama tendents ilmnes ka, kui võrreldi kuivendatud ja üleujutatud katselappe vastavalt NO_3 ($p < 0,001$) või NH_4 lisamisega ($p < 0,01$) (joonis 7C). NH_4 lisamisel oli suurem *nosZII* geenikoopiate arvukus kuivadel katselappidel võrreldes üleujutatud katselappidega ($p < 0,01$) (joonis 7D).



Joonis 7. *nirK* (A), *nirS* (B), *nosZI* (C) ja *nosZII* (D) geenikoopiate arvukused kuivendatud ja üleujutatud katselappidel eksperimendi jooksul.

3.3. Geenikoopiate arvukuste seosed füüsikalis-keemiliste näitajatega, gaasiemissiooniga ja isotoopanalüüsidega

Geenikoopiate arvukuste statistiliselt olulised seosed mulla füüsikalis-keemiliste parameetrite, gaasiemissiooni ja isotoopanalüüsides vahel on toodud Lisa tabelis 1 ja 2 vastavalt kuivendatud ja üleujutatud ala kohta.

3.3.1. Geenikoopiate arvukuste seosed füüsikalise-keemiliste parameetritega

Kuivendatud kui ka üleujutatud katselappidel oli bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus negatiivselt seotud mulla temperatuuriga. Üleujutatud katselappidel mõjutasid bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukusi positiivselt üldlämmastiku, NO₃-N ja Mg kontsentratsioonid mullas. Nii bakterite kui ka arhede geenikoopiate arvud olid positiivselt seotud mulla pH-ga üleujutatud katselappidel. Arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukus oli negatiivselt seotud mulla NO₃-N sisaldusega kuivendatud katselappidel.

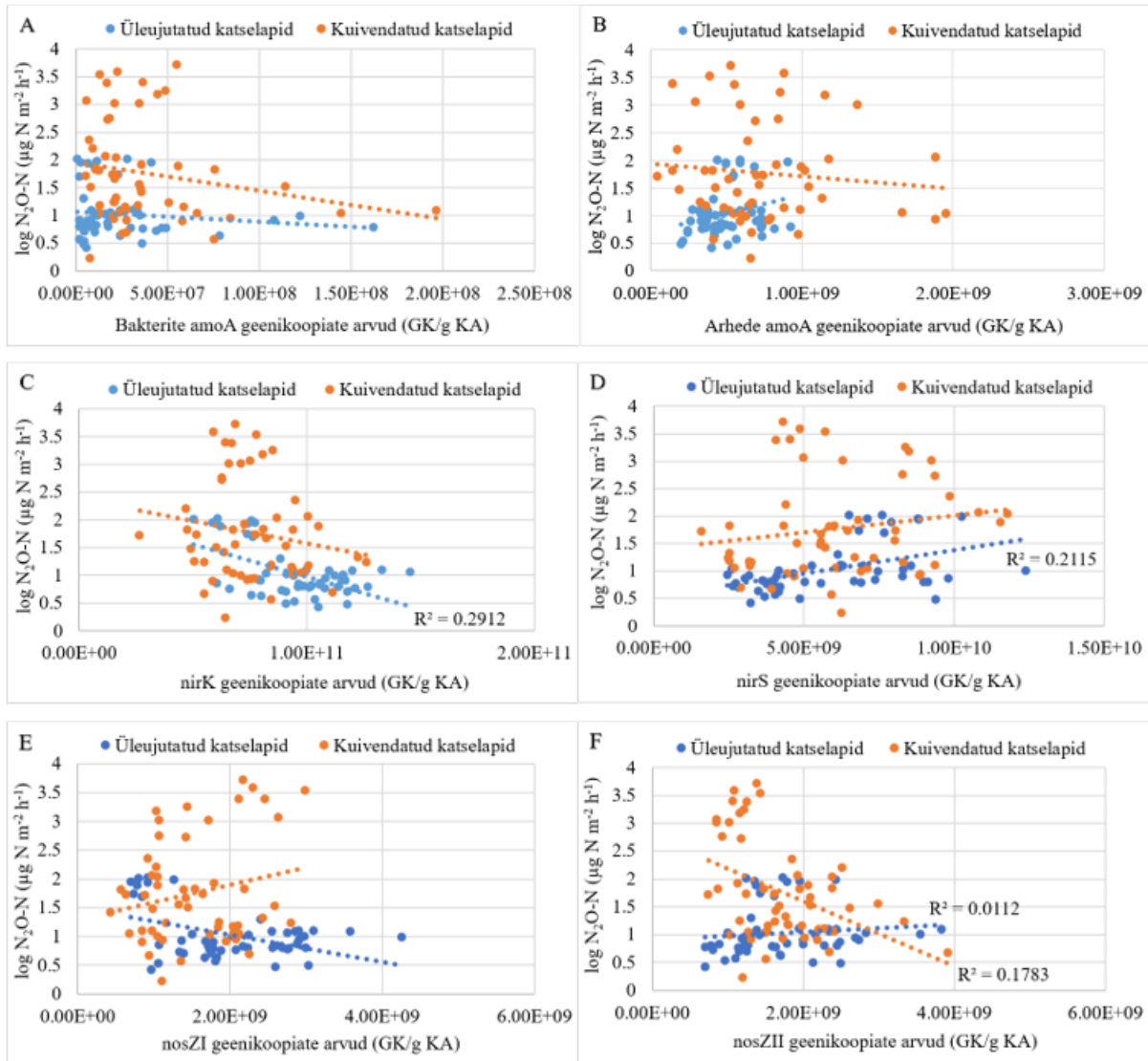
Nitrifikatsiooni läbi viivate arhede *amoA* geenikoopiate arvukus oli positiivses seoses mulla pH ja hapniku sisaldusega 5 cm sügavusel üleujutatud katselappidel.

Kuivendatud katselappidel vähenesid denitrifikatsiooni märklaudgeenide *nirK* ja *nosZI* geenikoopiate arvukused P ja K kontsentratsioonide tõustes, kuid *nirS* geenikoopiate hulka mõjutas nende tõus positiivselt. Üleujutatud katselappidel oli *nosZII* geenikoopiate arvukus negatiivselt seotud K sisaldusega mullas. Kuivendatud katselappidel oli *nirS* geenikoopiate arvukused positiivselt ja *nosZII* geenikoopiate arvukused negatiivselt seotud mulla Ca sisaldusega. Kuivendatud katselappidel NO₃-N kontsentratsiooni tõustes vähenevad *nirK* ja *nosZII* geenikoopiate arvukused, kuid NO₃-N tõus mõjutab *nirS* geenikoopiate arvukust positiivselt. Mulla NO₃-N kontsentratsiooni ja *nirK* geenikoopiate arvukuse vahel oli positiivne korrelatsioon üleujutatud katselappidel. Kuivendatud katselappidel mõjutas *nirK* geenikoopiate arvukust negatiivselt mulla NH₄-N sisaldus. *nosZI* geenikoopiate arvukuse ja mulla orgaanilise aine sisalduse vahel ilmnis negatiivne korrelatsioon kuivendatud katselappidel. Kuivendatud kui ka üleujutatud katselappidel oli *nirS* geenikoopiate arvukus negatiivses korrelatsioonis mulla pH-ga. Kuivendatud katselappidel oli *nosZI* geenikoopiate arvukus positiivselt ja üleujutatud katselappidel oli *nosZII* geenikoopiate arvukus negatiivselt seotud mulla pH-ga. Kuivendatud ja üleujutatud katselappide *nirS* geenikoopiate arvukus korreleerus positiivselt mulla temperatuuriga. Kuivendatud katselappidel mõjutas *nosZII* geenikoopiate arvukusi negatiivselt mullatemperatuur, kuid üleujutatud katselappidel oli seos vastupidine. Üleujutatud katselappidel korreleerusid *nirS* ja *nosZII* geenikoopiate arvukused negatiivselt hapniku sisaldusega 5 cm sügavusel.

3.3.2. Geenikoopiate arvukuste seosed gaasiemissiooniga

Bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus oli negatiivselt seotud N₂O-N emissiooniga üleujutatud katselappidel. Lisaks oli üleujutatud katselappidel *nirK* geenikoopiate arvukus

negatiivselt (joonis 8C) ning *nirS* geenikoopiate arvukus positiivselt (joonis 8D) seotud N₂O-N emissiooniga. Kuivendatud katselappidel oli *nosZII* geenikoopiate arvukus negatiivses korrelatsioonis N₂O-N emissiooniga, kuid üleujutatud katselappidel oli antud seos positiivne (joonis 8F).



Joonis 8. Nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsiooniprotsesside geenikoopiate ja N₂O emissiooni vahelised seosed kuivendatud ja üleujutatud katselappidel eksperimendi jooksul: bakterite *amoA* (A), arhede *amoA* (B), *nirK* (C), *nirS* (D), *nosZI* (E) ja *nosZII* (F). Spearmani korrelatsioonikoefitsendiga R on näidatud statistiliselt olulised seosed.

3.3.3. Geenikoopiate arvukuste seosed isotoopanalüüsidega

Üleujutatud katselappidel oli bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus negatiivselt seotud δ¹⁵N väärtustega. Arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukus korreleerus positiivselt δ¹⁸O

väärtustega üleujutatud katselappidel. Üleujutatud katselappidel oli nitrifikatsiooni läbi viivate bakterite *amoA* geenikoopiate arvukuse ja $\delta^{18}\text{O}$ väärtuste vahel positiivne seos.

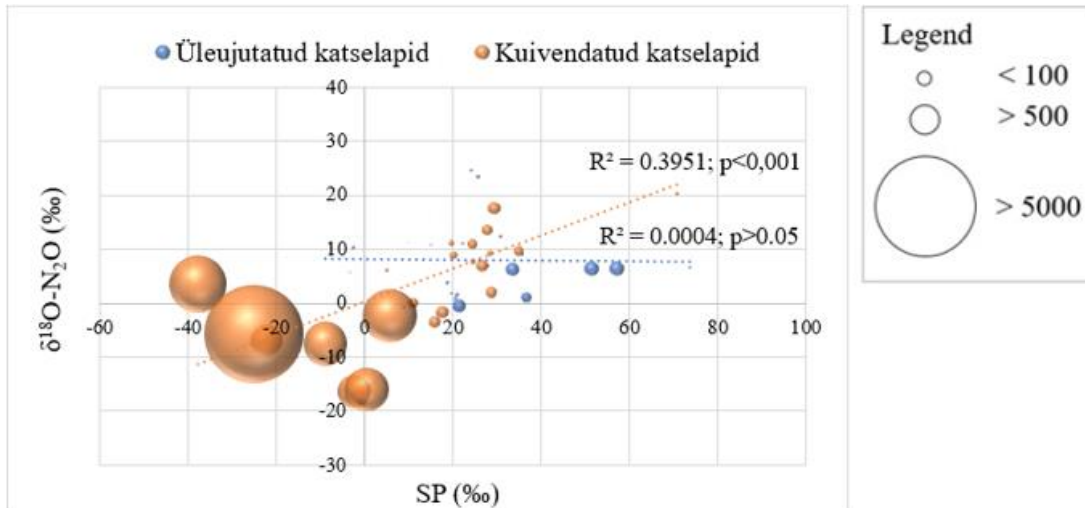
Denitrifikatsiooni märklaudgeeni *nirK* geenikoopiate arvukus oli negatiivses korrelatsioonis $\delta^{15}\text{N}$ väärtustega kuivendatud ja üleujutatud katselappidel. Kuivendatud katselappide *nirS* geenikoopiate arvukus oli positiivselt ja *nosZII* geenikoopiate arvukus negatiivselt seotud $\delta^{15}\text{N}$ väärtustega. *nirS* ja *nosZI* geenikoopiate arvukused olid vastavalt negatiivses ja positiivses korrelatsioonis SP väärtustega kuivendatud katselappidel. Üleujutatud katselappide *nirS* ja *nosZII* geenikoopiate arvukused korreleeruvad negatiivselt $\delta^{18}\text{O}$ väärtustega.

3.4. Isotoopanalüüside seosed gaasiemissiooniga

Kirjanduse ülevaates näidati joonisel 2, et SP ja $\delta^{18}\text{O-N}_2\text{O}$ abil on võimalik hinnata erinevate protsesside toimumist. SP ja $\delta^{18}\text{O-N}_2\text{O}$ vaheline seos koos N_2O emissiooniga joonisel 9 näitas, et kuivendatud ja üleujutatud katselappidel domineerisid erinevad protsessid. Teatud SP ja $\delta^{18}\text{O-N}_2\text{O}$ vahemikes emiteerisid kuivendatud katselapid märgatavalt suuremaid N_2O koguseid.

Nii kuivendatud kui ka üleujutatud katselappidel võis toimuda ammoniaagi oksüdatsioon ammoniaaki oksüdeerivate bakterite poolt ja nitrifitseerijate denitrifikatsioon ammoniaaki oksüdeerivate bakterite poolt (joonised 2 ja 9). Lisaks võis kuivendatud katselappidel toimuda bakteriaalne denitrifikatsioon (joonised 2 ja 9). Suurimad N_2O emissioonide kontsentratsioonid tulenesid kuivendatud katselappidelt nitrifitseerijate denitrifikatsioonil ammoniaaki oksüdeerivate bakterite vahendusel.

Jooniselt 9 jäeti välja erakordselt kõrged SP väärtused, mis tekkisid ^{15}N -ga rikastatud substraadi lisamisel.



Joonis 9. SP ja $\delta^{18}\text{O-N}_2\text{O}$ vaheline seos kuivendatud ja üleujutatud katselappidel ning punktide suurus on vastavuses $\text{N}_2\text{O-N}$ emissiooni ($\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) suurusega.

4. Arutelu

Nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni toimumist mõjutas erinev hüdroloogiline režiim. Mikrobioloogiliste ja isotoopsete meetodite kasutamine näitas, et mulla mikroobikooslus ja N₂O emissioon kuivendatud ja üleujutatud aladel erines üksteisest märkimisväärselt.

Bakterite arvukustes statistiliselt olulist erinevust ei ilmnunud üleujutatud ja kuivendatud alade vahel, kuid arhede arvukused olid kuivendatud alal kõrgemad võrreldes üleujutatud alaga, mis võib viidata arhede eripärale eelistada rohkem aereeritud keskkonda turbaaladel. Espenberg *et al.*, 2018 uuringus leiti samuti suurem arhede arvukus kuivendatud turbamaadel. NH₄ lisamisel oli arhede arvukus kõrgem kuivendatud alal võrreldes üleujutatud alaga, mis viitab arhede nitrifikatsiooni protsessiks vajaliku NH₄ tarbimisele ja nitrifikatsiooni toimumisele. Nitrifikatsioon on üldiselt soodustatud nitrifikatsiooniks vajaliku substraadi NH₄ kättesaadavuse tõustes ja samuti aeroobsetes tingimustes (Barnard *et al.*, 2005).

Nitrifikatsiooni läbi viivate ehk amoA geene omavate mikroorganismide arvukus oli statistiliselt oluliselt madalam üleujutatud aladel võrreldes kuivendatud aladega, mis viitab nitrifikatsiooni toimumise väiksemale geneetilisele potentsiaalile üleujutatud alal. Üleujutatud aladel väheneb nitrifikatsioon liigniiskuse tõttu (Minkinen *et al.*, 2020).

Mulla NH₄-N kontsentratsioon statistiliselt olulist erinevust ei ilmnunud üleujutatud ja kuivendatud alade vahel ehk veerežiim ei mõjuta väga NH₄-N kontsentratsiooni mullas, kuid mulla NO₃-N kontsentratsioon oli kuivendatud alal kõrgem võrreldes üleujutatud alaga. See on indikaator, et denitrifikatsiooni protsessiks vajalikku nitraati ei tarbita kuivendatud alal ära ja seega on denitrifikatsiooni toimumine seal pärsitud. Sama kinnitab ka denitrifikatsiooni märklaudgeenide *nirK* ja *nosZI* statistiliselt oluliselt väiksem arvukus kuivendatud alal võrreldes üleujutatud alaga. Denitrifikatsiooni aktiivsus on suurem anaeroobsetes tingimustes (McKenney *et al.*, 2001).

Denitrifikatsiooni II etappi läbi viivate mikroobide arvukust mõjutas oluliselt mulla temperatuur ja ilmade jahenemine. Kuivendatud ja üleujutatud aladel tuvastati, et *nirS* geeni arvukust pärsib mullatemperatuuri langus, kuid *nirK* geeni arvukuste puhul statistiliselt oluline seos puudub. Selle põhjuseks võib olla *nirS* geene omavate mikroobide suurem tundlikkus temperatuurile võrreldes *nirK* geene omavate mikroorganismidega (Xing *et al.*, 2021). Sellest lähtuvalt võib eeldada *nirK* geeni omavate mikroorganismide suuremat osalust N₂O tootmisel külmemal perioodil ning see näitab *nirS* ja *nirK* erinevaid ökoloogilisi nišše. Temperatuurile vähem tundliku *nirK* geeni omavate mikroorganismidega võib seostada Eesti kodusookaasikus

tehtud uuringu tulemust, milles leiti, et 87% aastasest N₂O voost eraldub talvel (Viru *et al.*, 2020).

Kuivendatud alal oli *nosZII* ja üleujutatud alal *nosZI* geenikoopiate arvukus negatiivses seoses N₂O-N emissiooniga. Selline seos on leitud ka Prantsuse Guajaana troopilises turbarabas kuivendatud ja looduslikel aladel tehtud uuringus (Espenberg *et al.*, 2018). Sellest võib järeldada, et *nosZII* geeni omavad mikroobid viivad kuivendatud turbaalal suurema tõenäosusega läbi N₂O redutseerimist molekulaarseks lämmastikuks ja *nosZI* geeni omavad mikroorganismid viivad eelnimetatud protsessi läbi üleujutatud turbaaladel. Erinevus *nosZI*- ja *nosZII*-klaadi omavate mikroobide vahel on tingitud nende erinevatest ökoloogilistest niššidest (Jones *et al.*, 2013).

Kuivendatud alal tuvastati madalad SP ja δ¹⁸O-N₂O väärtused ning kõrged N₂O-N vood, millest võib joonis 2 (põhineb Hu *et al.*, 2015) põhjal järeldada, et kuivendatud alal domineeris nitrifitseerija denitrifikatsioon ammoniaaki oksüdeerivate bakterite vahendusel. Kuivendatud lammialal Eestis läbi viidud uuringus näidati sarnaseid tulemusi (Masta *et al.*, 2020). N₂O vood üleujutatud aladelt oli märkimisväärselt väiksemad võrreldes kuivendatud aladega, mille põhjuseks võib pidada täieliku denitrifikatsiooni protsessi toimumist (N₂O redutseeritakse N₂-ks), mida soodustab anaeroobne keskkond. Varasemates uuringutes on samuti leitud, et turbamaade kuivendamisel suureneb N₂O emissioon mullast atmosfääri, kuid liigniisked tingimused vähendavad N₂O emissioone (Minkkinen *et al.*, 2020; Wilson *et al.*, 2016).

Kokkuvõte

Turbamaade hüdroloogiline režiim mõjutab sealseid mikrobioloogilisi lämmastikuringe protsesse ja seeläbi ohtliku kasvuhoonegaasi dilämmastikoksiidi ehk naerugaasi (N₂O) emissiooni mullast atmosfääri. Muutuvad kliimatingimused ja äärmuslike ilmastikunähtuste, sealhulgas põudade ja üleujutuste sagenemine nõuavad täpsemat protsesside ja nende muutuste hindamist, et leida võimalusi kliimamuutuste leevendamiseks.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida kõdusoometsades kuivenduse ja üleujutuse mõju erinevatele lämmastikuringe protsessidele ja N₂O emissioonile kasutades molekulaarseid ja isotoopanalüüsi meetodeid.

Töös läbiviidud välitööd toimusid jänsekapsa-kõdusoo kasvukohatüüpi kõdusoometsas, kuhu rajati kuivendamise ja üleujutuse eksperiment. Välitööd toimusid kuuel korral ajavahemikul oktoober 2020 kuni jaanuar 2021 ja kõikidel proovivõtupäevadel koguti mulla-, vee- ja N₂O gaasiproove. Reaal-aja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) kasutati uurimisalalt kogutud pinnaseproovidest bakterite ja arhede 16S rRNA, nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) ja denitrifikatsiooni (*nirK*, *nirS*, *nosZ* klaad I ja *nosZ* klaad II) geenikoopiate arvukuse määramiseks. Mulla- ja gaasiproovide stabiilsete isotoopide koostise analüüsid tehti isotoop-suhte mass-spektromeetril.

Töö tulemustest järeldus, et erinev hüdroloogiline režiim mõjutab nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesse. Kuivendatud aladel domineerib N₂O voogude kujunemisel nitrifikatsiooni protsess ja üleujutatud aladel denitrifikatsiooni protsess. Suurimad N₂O emissioonide kontsentratsioonid tulenesid kuivendatud katsealalt nitrifitseerijate denitrifikatsioonil ammoniaaki oksüdeerivate bakterite vahendusel.

Summary

Nitrous oxide (N₂O) is a harmful greenhouse gas that is mainly produced by nitrification and denitrification processes in soil. A disturbed hydrological system is changing N₂O emissions from peat soils.

The aim of this study was to investigate the effect of drainage and rewetting on different nitrogen cycle processes and nitrous oxide (N₂O) emissions using quantitative real-time PCR (qPCR) and isotope analysis.

Experimental flooding and drainage experiment was conducted in an Oxalis site-type drained peatland forest in Estonia. Gas and soil samples from the study site were collected six times between October 2020 and January 2021. Quantitative real-time PCR was used to measure the abundance of bacteria and archaea specific 16S rRNA, nitrification (*amoA* genes) and denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZI* and *nosII* genes) marker genes from the soil samples. In addition, isotope composition of soil and gas samples, and N₂O emissions were measured.

Results of this study indicate that different hydrological regimes influence nitrification and denitrification processes. Regarding control of N₂O fluxes, nitrification played a major role on drained sites and denitrification was the main process in rewetted sites. The results show that nitrifier denitrification via ammonia-oxidizing bacteria is the main controlling mechanism of N₂O fluxes.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajaid Mikk Espenbergi ja Ülo Mandrit, kes olid käesoleva töö valmimisel suureks abiks. Erilised tänud juhendaja Mikk Espenbergile abivalmiduse, heade nõuannete ja oskusliku juhendamise eest.

Lisaks soovin tänada Mohit Mastat välitöödel osutatud abi ja isotoopanalüüside teostamise eest. Minu tänu läheb ka Jaan Pärnale ja Sandeep Thayamkottule, kes olid välitöödel nõu ja jõuga suureks abiks. Tänan ka Tartu Ülikooli IRMS labori operaatorit Holar Seppa, kes jagas selgitusi kasutatud isotoopanalüüside metoodika kohta.

Kasutatud kirjandus

Astover, A. (2012). Mulla kvaliteet ja kasutussobivus. Rmt. Astover, A (Koost.), Mullateadus. Õpik kõrgkoolidele. Tartu: Eesti Maaülikool, 400-413.

Baggs, E.M. (2008). A review of stable isotope techniques for N₂O source partitioning in soils: recent progress, remaining challenges and future considerations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(11), 1664-1672.

Barnard, R., Leadley, P.W., Hungate, B.A. (2005). Global change, nitrification, and denitrification: A review. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(1).

Bedard-Haughn, A., van Groenigen, J.W., van Kessel, C. (2003). Tracing 15N through landscapes: potential uses and precautions. *Journal of hydrology*, 272, 175-190.

Black, A., Hsu, P-C.L., Hamonts, K.E., Clough, T.J., Condon, L.M. (2016). Influence of copper on expression of nirS , norB and nosZ and the transcription and activity of NIR, NOR and N₂ OR in the denitrifying soil bacteria *Pseudomonas stutzeri*. *Microbial Biotechnology*, 9(3), 381-388.

Braker, G., Conrad, R. (2011). Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils- what matters for their functioning? *Advances in Applied Microbiology*, 75, 33–70.

Butterbach-Bahl, K., Baggs, E. M., Dannenmann, M., Kiese, R., Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the royal society B*, 368(1621).

Cameron, K. C., Di, H. J., Moir, J. L. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology*, 162, 145-173.

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. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569–586.

- Cebron, A., Garnier, J. (2005). Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research*, 39, 4979-4992.
- Cheng, Y., Wang, J., Chang, S.X., Cai, Z., Müller, C., Zhang, J. (2019). Nitrogen deposition affects both net and gross soil nitrogen transformations in forest ecosystems: A review. *Environmental pollution*, 244, 608-616.
- Dacres, H., Rapson, T.D. (2014). Analytical techniques for measuring nitrous oxide. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54, 65-74.
- 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.
- Darkwah, W.K., Odum, B., Addae, M., Koomson, D., Danso, B.K., Oti-Mensah, E., Asenso, T.Q., Buanya, B.A. (2018). Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. *Journal of Scientific Research & Reports*, 17(6), 1-9.
- 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.
- Drenovsky, R., Feris, K.P., Batten, K.M., Hristova, K. (2008). New and Current Microbiological Tools for Ecosystem Ecologists: Towards a Goal of Linking Structure and Function. *The American Midland Naturalist*, 160(1), 140-159.
- Espenberg, M., Truu, M., Mander, Ü., Kasak, K., Nõlvak, H., Ligi, T., Oopkaup, K., Maddison, M. & Truu, J. (2018). Differences in microbial community structure and nitrogen cycling in natural and drained tropical peatland soils. *Scientific Reports*, 8(1).
- 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).
- Fang, Y., Kobab, K., Makabeb, A., Takahashib, C., Zhuc, W., Hayashib, T., Hocarib, A.A., Urakawad, R., Baia, E., Houltone, B.Z., Xia, D., Zhanga, S., Matsushitab, K., Tua, Y., Liua, D., Zhua, F., Wanga, Z., Zhouf, G., Cheng, D., Makitab, T., Todab, H., Liub, X., Chena, Q.,

- Zhangf, D., Lig, Y., Yohb, M. (2015). Microbial denitrification dominates nitrate losses from forest ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), 1470-1474.
- Fry, B. (2006a). Chapter 3. Using Stable Isotope Tracers. Rmt. Fry, B (Koost.), Stable Isotope Ecology. NewYork: Springer, 40-75.
- Fry, B. (2006b). Chapter 5. Mixing. Rmt. Fry, B (Koost.), Stable Isotope Ecology. NewYork: Springer, 119-182.
- Fry, B. (2006c). Chapter 6. Isotope Additions. Rmt. Fry, B (Koost.), Stable Isotope Ecology. NewYork: Springer, 183-193.
- 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.
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. (2003). The nitrogen cascade. *BioScience*, 53(4), 341-356.
- 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 N₂O emissions. *PLoS One*, 9(12).
- Gundersen, P., Schmidt, I.K., Raulund-Rasmussen, K. (2006). Leaching of nitrate from temperate forests – effects of air pollution and forest management. *Environmental Reviews*, 14(1), 1-57.
- Hallin, S., Lindgren, E. (1999). PCR Detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1652–1657.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., Jones, C. M. (2018). Genomics and Ecology of Novel N₂O-Reducing Microorganisms. *Trends in Microbiology*, 26(1), 43-55.
- Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33-45.

Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5181–5189.

Hu, H-W., Chen, D., He, J-Z. (2015). Microbial regulation of terrestrial nitrous oxide formation: understanding the biological pathways for prediction of emission rates. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), 729–749.

IPCC. (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Kasutatud 05.01.21, <https://books.google.ee/books?id=o4gaBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=et#v=onepage&q&f=false>

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 Journal*, 7(2), 417–426.

Joosten, H., Tapio-Biström, M.L., Tol, S. (2012). Peatlands—Guidance for Climate Change Mitigation Through Conservation, Rehabilitation and Sustainable use. 2nd edition. Kasutatud 24.05.2021, <http://www.fao.org/3/an762e/an762e.pdf>

Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., & Philippot, L. (2006). Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5957–5962.

Keskkonnaagentuur (2020). SMI 2019. Kasutatud 15.02.21, https://www.keskkonnaagentuur.ee/sites/default/files/smi_2019_tabelid_graafikud_0.pdf

Kjellström, E., Nikulin, G., Hansson, U.L.F., Strandberg, G., Ullerstig, A. (2011). 21st century changes in the European climate: uncertainties derived from an ensemble of regional climate model simulations. *Tellus*, 63, 24–40.

Klemedtsson, L., Von Arnold, K., Weslien, P., Gundersen, P. (2005). Soil C/N ratio as a scalar parameter to predict nitrous oxide emissions. *Global Change Biology*, 11(7), 1142–1147.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J. Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125.

- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276.
- Laas, E. (2011). Metsatüpoloogia. Rmt. Laas, E., Uri, V., Valgepea, M (Koost.), Metsamajanduse alused. Õpik kõrgkoolidele. Tartu: Tartu Ülikooli kirjastus, 166-205.
- Law, B. (2013). Nitrogen deposition and forest carbon. *Nature*, 496, 307–308.
- 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.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1).
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35.
- Lõhmus, E. (2004). *Eesti metsakasvukohatüübid*. Tartu: Eesti Loodusfoto, 70-72.
- Mander, Ü., Maddison, M., Soosaar, K., Teemusk, A., Kanal, A., Uri, V., Truu, J. (2015). The impact of a pulsing groundwater table on greenhouse gas emissions in riparian grey alder stands. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2360–2371.
- Masta, M., Sepp, H., Pärn, J., Kirsimäe, K., Mander, Ü. (2020). Natural Nitrogen Isotope Ratios as a Potential Indicator of N₂O Production Pathways in a Floodplain Fen. *Water*, 12(2), 409.
- Mathieu, O., Henault, C., Leveque, J., Baujard, E., Milloux, M.J., Andreux, F. (2006). Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using ¹⁵N tracers. *Environmental Pollution*, 144(3), 933-940.
- Matson, P., Lohse, K. A., Hall, S. J. (2002). The Globalization of Nitrogen Deposition: Consequences for Terrestrial Ecosystems. *Ambio*, 31(2) , 113-119.

- McKenney, D.J., Drury, C.F., Wang, S.W. (2001). Effects of Oxygen on Denitrification Inhibition, Repression, and Derepression in Soil Columns. *Soil Science Society of America Journal*, 65(1).
- Meija, J. Coplen, T.B., Berglund, M., Brand, W.A., De Bièvre, P., Gröning, M. Holden, N.E., Irrgeher, J., Loss, R.D., Walczyk, T., Prohaska, T. (2016). Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 88(3), 293–306.
- Minkkinen, K., Ojanen, P., Koskinen, M., Penttilä, T. (2020). Nitrous oxide emissions of undrained, forestry-drained, and rewetted boreal peatlands. *Forest Ecology and Management*, 478.
- Osburn, E. D., Barrett, J. E. (2020). Abundance and functional importance of complete ammonia-oxidizing bacteria (comammox) versus canonical nitrifiers in temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 145.
- Paal, J. (2013). Soode kasutamine ja sellega seotud konfliktid. Rmt. Paal, J., Leibak, E (Toim.), Eesti soode seisund ja kaitstus. Tartu: Eestimaa Looduse Fond, 47-57.
- Palo, A. (2016). *Eesti metsad*. Tallinn: Varrak.
- 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., Laggoun-Défarge, 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. *Nature Communications*, 9.
- Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, 1577(3), 355-376.
- Pikk, J. (2011). Metsakuivendus ja metsateed. Rmt. Laas, E., Uri, V., Valgepea, M (Koost.), Metsamajanduse alused. Õpik kõrgkoolidele. Tartu: Tartu Ülikooli kirjastus, 543-556.
- Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in physiology education*, 28, 44-50.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Portmann, R.W. (2009). Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science*, 326 (5949), 123-125.

- Regina, K., Nykänen, H., Silvola, J., Martikainen, P. J. (1996). Fluxes of nitrous oxide from boreal peatlands as affected by peatland type, water table level and nitrification capacity. *Biogeochemistry*, 35, 401-418.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4704– 4712.
- Ryabenko, E. (2013). Stable Isotope Methods for the Study of the Nitrogen Cycle. Rmt. Zambianchi, E (Ed.), Topics in Oceanography. InTech, 49-88.
- Schindler, T., Mander, Ü., Machacova, K., Espenberg, M., Krasnov, D., Escuer-Gatius, J., Veber, G., Pärn, J., Soosaar, K. (2020). Short-term flooding increases CH₄ and N₂O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum. *Scientific Reports*, 10(1).
- Sharp, Z.D. (2017). Principles of Stable Isotope Geochemistry (2nd Edition). University of New Mexico.
- Shoun, H., Kim, D-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J. (1992). Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology letters*, 94, 277-281.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., Osborn, A.M. (2006). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology*, 8(5), 804-815.
- Smith, C.J., Osborn, A.M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67 (1), 6-20.
- Soosaar, K., Mander, Ü., Maddison, M., Kanal, A., Kull, A., Lõhmus, K., Truu, J., Augustin, J. (2011). Dynamics of gaseous nitrogen and carbon fluxes in riparian alder forests. *Ecological Engineering*, 37(1), 40–53.
- Spanning, R. J. M., Richardson, D. J., Ferguson, S. J. (2007). Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. Rmt. Bothe, H., Ferguson, S. J., Newton, W. E (Ed.), Biology of the Nitrogen Cycle. Amsterdam: Elsevier, 3-20.
- Stahl, D.A., de la Torre, J.R. (2012) Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual review of microbiology*, 66, 83–101.

- Sulzman, E.W. (2007). Stable isotope chemistry and measurement: a primer. Rmt. Michener, R., Lajtha, K (Ed.), Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd, 1-21.
- Swain, D.L., Singh, D., Touma, D., Diffenbaugh, N.S. (2020). Attributing extreme events to climate change: a new frontier in a warming world. *One Earth*, 2(6), 522-527.
- Syakila, A., Kroeze, C. (2011). The global nitrogen budget revisited. *Greenhouse Gas Measurement and Management*, 1(1), 17-26.
- Thornton, B., Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145-154.
- 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. *Environmental Microbiology*, 10, 1357–1364.
- Toyoda, S., Yoshida, N. (1999). Determination of Nitrogen Isotopomers of Nitrous Oxide on a Modified Isotope Ratio Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 71(20), 4711–4718.
- Trenberth, K. E. (2011). Changes in precipitation with climate change. *Climate Research*, 47(1), 123-138.
- Truu, M., Nõlvak, H., Ostonen, I., Oopkaup, K., Maddison, M., Ligi, T., Espenberg, M., Uri, V., Mander, Ü. and Truu, J. (2020). Soil Bacterial and Archaeal Communities and Their Potential to Perform N-Cycling Processes in Soils of Boreal Forests Growing on Well-Drained Peat. *Frontiers in microbiology*, 11, 3112.
- Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29, 151-159.
- 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., Lüscher, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528, 555–559.
- Vasiliadou, I. A., Pavlou, S., Vayenas, D. V. (2006). A kinetic study of hydrogenotrophic denitrification. *Process Biochemistry*, 41(6), 1401-1408.

Viru, B., Veber, G., Jaagus, J., Kull, A., Madisson, M., Muhel, M., Espenberg, M., Teemusk, A., Mander, Ü. (2020). Wintertime Greenhouse Gas Fluxes in Hemiboreal Drained Peatlands. *Atmosphere*, 11(7), 731.

Wallenstein, M. D., Myrold, D. D., Firestone, M., Voytek, M. (2006). Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6), 2143-2152.

Wilson, D., Blain, D., Couwenberg, J., Evans, C., Murdiyarsa, D., Page, S., Renou-Wilson, F., Rieley, J., Sirin, A., Strack, M., Tuittila, E.-S. (2016). Greenhouse gas emission factors associated with rewetting of organic soils. *Mires and Peat*, 17(4), 1-28.

WMO. *astoverses in the Atmosphere Based on Global Observations through 2019*. Kasutatud 24.05.2021, https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=10437

Wrage-Mönnig, N., Horn, M.A., Well, R., Müller, C., Velthof, G., Oenema, O. (2018). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide revisited. *Soil Biology and Biochemistry*, 123, A3–A16.

Xi, D., Bai, R., Zhang, L., Fang, Y. (2016). Contribution of Anammox to Nitrogen Removal in Two Temperate Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 4602–4612.

Xing, X., Tang, Y., Xu, H., Qin, H., Liu, Y., Zhang, W., Chen, A., Zhu, B. (2021). Warming shapes nirS- and nosZ-type denitrifier communities and stimulates N₂O emission in acidic paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*.

Yano, M., Toyoda, S., Tokida, T., Hayashi, K., Hasegawa, T., Makabe, A., Koba, K., Yoshida, N. (2014). Isotopomer analysis of production, consumption and soil-to-atmosphere emission processes of N₂O at the beginning of paddy field irrigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 66–78.

Yu, H., Chaimbault, P., Clarot, I., Chen, Z., Leroy, P. (2019). Labeling nitrogen species with the stable isotope ¹⁵N for their measurement by separative methods coupled with mass spectrometry: A review. *Talanta*, 191, 491-503.

Zhang, J., Zhu, T., Cai, Z., Müller, C. (2011). Nitrogen cycling in forest soils across climate gradients in Eastern China. *Plant Soil*, 342, 419-432.

Zhu, J., Mulder, J., Bakken, L., Dörsch, P. (2013). The importance of denitrification for N₂O emissions from an N-saturated forest in SW China: results from in situ ¹⁵N labeling

experiments. *Biogeochemistry*, 116, 103-117.

Zhu, X., Zhang, W., Chen, H., Mo, J. (2015). Impacts of nitrogen deposition on soil nitrogen cycle in forest ecosystems: A review. *Acta Ecologica Sinica*, 35, 35-43.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 533–616.

Lisad

Tabel 1. Kuivendatud katselappide statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad geenikoopiate arvukuse ning mulla, vee, gaasiemissioonide ja isotoopide näitajate vahel.

Tunnus	Bakterite 16S rRNA	Arhede 16 S rRNA	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>	Bakterite <i>amoA</i>	Arhede <i>amoA</i>
Mulla pH (n=36)				-0,58***	0,41*			
N (%) (n=36)								
NO ₃ -N (mg/kg) (n=54)		-0,32*	-0,30*	0,46***		-0,34*		
NH ₄ -N (mg/kg) (n=54)			-0,32*					
P (mg/kg) (n=27)			-0,39*	0,48*	-0,45*			
K (mg/kg) (n=27)			-0,45*	0,68***	-0,50**			
Ca (mg/kg) (n=27)				0,39*		-0,57**		
Mg (mg/kg) (n=27)								
Orgaaniline aine (%) (n=36)					-0,39*			
Mulla temperatuur 10 cm sügavusel (°C) (n=45)	-0,31*			0,54***		-0,54***		
Hapniku sisaldus 5 cm sügavusel (mg/L) (n=36)								
N ₂ O-N (µg N m ⁻² h ⁻¹) (n=54)						-0,38**		
δ ¹⁵ N (‰) mullast (n=54)			-0,43**	0,30*		-0,49***		
SP (‰) (n=35)				-0,38*	0,37*			
δ ¹⁸ O (n=36) gaasiemissioonist								

* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001

Tabel 2. Üleujutatud katselappide statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikordajad geenikoopiate arvukuse ning mulla, vee, gaasiemissioonide ja isotoopide näitajate vahel.

Tunnus	Bakterite 16S rRNA	Arhede 16 S rRNA	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>	Bakterite <i>amoA</i>	Arhede <i>amoA</i>
Mulla pH (n=33)	0,51**	0,42*		-0,42*		-0,38*		0,55***
Mulla üldlämmastik N (%) (n=33)	0,35*							
NO ₃ -N (mg/kg) (n=51)	0,28*		0,33*					
NH ₄ -N (mg/kg) (n=51)								
P (mg/kg) (n=24)								
K (mg/kg) (n=24)						-0,55**		
Ca (mg/kg) (n=24)								
Mg (mg/kg) (n=24)	0,44*							
Org.aine (%) (n=33)								
Mulla temperatuur 10 cm sügavusel (°C) (n= 43)	-0,37**			0,74***		0,44**		
Hapniku sisaldus 5 cm sügavusel (mg/L) (n=36)				-0,41*		-0,34*		0,44**
N ₂ O-N (µg N m ⁻² h ⁻¹) (n=52)	-0,48***		-0,33*	0,47***		0,34*		
δ ¹⁵ N (‰) mullast (n=51)	-0,33*		-0,33*					
SP (‰) (n=41)								
δ ¹⁸ O (n=40) gaasiemissioonist		0,56***		-0,39*		-0,39*	0,32*	

* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Kuusemets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside määramine reaalaja PCR-i ja isotoopanalüüsi meetoditega kuivendatud ja üleujutatud kõdusoometsades,” 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 Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Kuusemets

01.06.2021