

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Bakalaureusetöö Geograafias (12 EAP)

**Kase (*Betula pendula*) mikrobioloogiline lämmastikuringe muld-risosfäär-
taim-atmosfäär kompleksis**

Lauri Eving

Juhendajad: Mikk Espenberg, PhD

Mohit Masta, PhD

Fahad Ali Kazmi, doktorant

Tartu 2025

Annotatsioon

Kase (*Betula pendula*) mikrobioloogiline lämmastikuringe muld-risosfäär-taim-atmosfäär kompleksis

Kliimamuutuste kontekstis on metsaökosüsteemid ja nende aineringed (ka lämmastikuringe) saamas üha rohkem teadusuuringute tähelepanu. Uurimistöö eesmärgiks oli kirjeldada arukase (*Betula pendula*) mikrobioloogilist lämmastikuringet muld-risosfäär-taim-atmosfäär kompleksis ning uurida ammooniumi ja nitraadi substraatide lisamisega kaasnevaid mõjusid. Tulemused näitasid, et lämmastikuringega seotud geenide arvukus oli suurim mullas ja risosfääris, väiksem lehtedes ja madalaim tüveproovides. *nirK* geeni arvukus oli kõrgem risosfääris võrreldes mullaga. Taimede fülloosfääris tuvastati samuti nitrifikatsiooni- ja denitrifikatsioonigeene, kuigi väiksemas koguses. Ammooniumitöötlus suurendas *amoA* geenide arvukust mullas, mis viitab aktiivsemale nitrifikatsioonile, samas kui *nirK* geenide arvukuse kasv ja *nosZ* geenide arvukuse stabiilsus viitavad mittetäielikule denitrifikatsioonile ning seletab kasvavaid N₂O emissioone mullast. N₂O emissioonid olid suurimad ammooniumitöötlusega mikrokosmides. Kokkuvõttes viitavad tulemused, et arukase mikrobioloogiline lämmastikuringe hõlmab nii risosfääri kui ka taime maapealseid osi ning et nii denitrifikatsioonil kui ka nitrifikatsioonil on panus N₂O voogudesse.

Märksõnad: nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, N₂O, fülloosfäär

CERCS kood: P510 – Füüsiline geograafia, geomorfoloogia, mullateadus, kartograafia, klimatoloogia; B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; B270 Taimeökoloogia

Abstract

Microbial Nitrogen Cycle of Silver Birch (*Betula pendula*) in the Soil–Rhizosphere–Plant–Atmosphere Continuum

In the context of climate change, nutrient, including nitrogen, cycling in forest ecosystems is receiving increasing scientific attention. The aim of this study was to describe the microbial nitrogen cycle of silver birch (*Betula pendula*) within the soil–rhizosphere–plant–atmosphere continuum and to investigate the effects of ammonium and nitrate substrate additions. The results showed that the abundance of nitrogen cycle–related genes was highest in soil and rhizosphere samples, lower in leaves, and lowest in stem samples. Notably, the *nirK* gene was more abundant in the rhizosphere compared to the bulk soil. Nitrification and denitrification genes were also detected in the phyllosphere, although in smaller quantities. Ammonium treatment increased the abundance of *amoA* genes, indicating more active nitrification, while the rise in *nirK* gene abundance and the stable levels of *nosZ* genes suggest incomplete denitrification, which may explain the observed increase in N₂O emissions. N₂O emissions were highest in the ammonium-treated microcosms. Overall, the results indicate that the microbial nitrogen cycle of silver birch involves both the root-associated soil and aboveground plant parts, and that both nitrification and denitrification contribute to N₂O fluxes.

Keywords: nitrification, denitrification, N₂O, phyllosphere

CERCS code: P510 – Physical geography, geomorphology, pedology, cartography, climatology; B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; B270 Plant ecology

Sisukord

Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1. Metsad muutuvast kliimas	5
1.1.1. Rakendus ja kaskede olulisus.....	6
1.1.2. Puude risosfäär.....	7
1.1.3. Puude fülloosfäär	8
1.2. Lämmastikuringe protsessid	8
1.2.1. Nitrifikatsioon.....	9
1.2.2. Denitrifikatsioon	9
1.2.3. N ₂ O vood	10
1.3. Meetodid lämmastikuringe protsesside uurimiseks	10
1.3.1. Reaalaja PCR	10
2. Materjal ja metoodika	11
2.1. Eksperimendi kirjeldus	11
2.2. Mulla-, taime- ja gaasiproovide kogumine ja analüüs	12
3. Tulemused.....	15
3.1. Geenikoopiate arvukus mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovides	15
3.2. Geenikoopiate arvukus mullaproovides päevade lõikes	17
3.3. N ₂ O vood päevade lõikes.....	20
4. Arutelu	22
Kokkuvõte.....	24
Summary.....	25
Tänuavaldused	27
Kasutatud kirjandus	28

Sissejuhatus

Lämmastikuringe on seotud Maa atmosfääri, litosfääri, pedosfääri ja hüdrofääriga ning nende kaudu muudetakse hädavajalik element lämmastik elusorganismidele kättesaadavaks (Galloway et al., 2004). Lämmastikuringe tasakaal on inimtegevuse poolt tugevalt mõjutatud, peamiselt läbi õhulämmastiku sidumise Haber-Boschi meetodil ning läbi lämmastikväetiste rohke kasutamise (Stein & Klotz, 2016). Inimtegevuse poolt lämmastikuringesse lisanduvad reaktiivsed lämmastikuühendid põhjustavad ökosüsteemides toitainete üleküllust ja eutrofeerumist, happevihmasid ning kasvuhoonegaaside heite kasvu, mis omakorda põhjustab osoonikihi hõrenemist ja kliimasoojenemist (Shibata et al., 2015). Peamine lämmastikuringest pärinev kasvuhoonegaas on dilämmastikoksiid (N_2O), mille tugev kasvuhooneefekti tekitamise potentsiaal, pikk viibeaeg atmosfääris ning võime osoonikihti lõhkuda teeb temast ühe problemaatilisema kasvuhoonegaasi (Shibata et al., 2015).

Lämmastikuringes mängivad olulist rolli metsaökosüsteemid ja seal kasvavad taimed (Pan et al., 2011). Eestis on pindalalt kõige levinuimad arukase (*Betula pendula* Roth.) ja sookase (*Betula pubescens*) enamusega metsad (Keskkonnaagentuur, 2023). Kask on oluline liik nii Eestis kui mujal maailmas, omades suurt potentsiaali nii energiamajanduses kui turbamaastike taastamisel (Hytönen et al., 2018). Nii arukask kui sookask on tuntud oma vähenõudlikkuse ja kiire kasvu poolest ning tegu on edukate pioneerliikidega (Laas, 1987).

Lämmastikuringet mõjutavad muld, taimede risosfäär ja ka fülloosfäär. Neist kahest viimasest on oluliselt vähem teada lämmastikuringe kontekstis. Kuigi samas on näidatud, et kase risosfäär on aktiivsem kui kuusel või männil ning mikroobne kooslus on mitmekesisem ja osaleb rohkem lämmastikuringes (Priha et al., 1999). Ka fülloosfääris esineb lämmastikuringe mikroobe, kes elavad nii taimeosade sees kui nende pinnal ning sarnaselt risosfäärile määrab fülloosfääri mikroobikoosluse eelkõige taime liik (Laforest-Lapointe et al., 2016).

Kliimamuutused muudavad metsaökosüsteemis aineringeid ja mõjutavad kasvuhoonegaaside eraldumist (Unep, 2020). Kliimamuutuste mõju metsaökosüsteemidele võib neis esile kutsuda nii positiivset kui negatiivset tagasisidet, mille mõjude osas valitseb veel suure osas teadmatus (Crowther et al., 2016). Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida arukase (*Betula pendula*) mikrobioloogilist lämmastikuringet muld-risosfäär-taim-atmosfäär kompleksis ja uurida selle seost N_2O emissiooniga.

1. Kirjanduse ülevaade

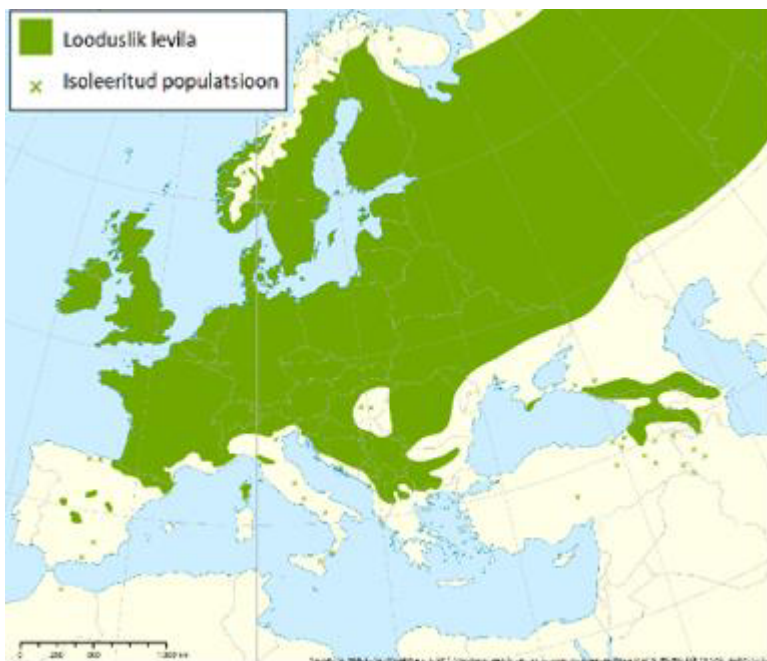
1.1. Metsad muutuvast kliimas

Metsad on ökosüsteemid, mis koosnevad kasvavate puudega maast ja selle elustikust (Masing, 1992). Metsaökosüsteemid on risosfääri ja fülloosfääri kaudu seotud nii pedosfääri kui atmosfääriga ja osalevad olulisel määral globaalsetes aineringetes ning süsiniku talletamises (Waring & Schlesinger, 1985). Metsaökosüsteeme mõjutab nii otsene inimtegevus raie näol kui ka globaalne kliimamuutus. Tänapäeval moodustavad metsad maismaast umbes 31% ja metsade pindala on inimtegevuse tõttu vähenenud viimase 30 aasta jooksul ligikaudu 10% (Unep, 2020). Ülemaailmse metsa pindala vähenemist mõjutab eelkõige rahvastiku kasv ja seetõttu üha suurenev vajadus põllumaa järgi, mida eriti just troopilistes piirkondades luuakse rohkelt juurde metsamaa arvelt (Farrokhi et al., 2009). Käesoleval sajandil on metsamaa hävimine võrreldes eelmise sajandiga siiski mõningal määral aeglustunud (FAO, 2024) ning metsi mõjutab rohkem globaalne kliimasoojenemine – tõusvast temperatuurist tingitud fenoloogilised muutused ning järjest sagedasemad ja äärmused loodusnähtused nagu põuad, metsatulekahjud ning tormid (Romeiro et al., 2022). Kliimavõõtmete nihkumine võimaldab kahjurite levikut uutesse piirkondadesse, eelkõige parasvöötmes (Thom et al., 2017).

Kliimamuutused muudavad metsaökosüsteemis aineringeid ja kasvuhooenergia eraldumist, mida juhivad suuresti mikroobsed protsessid. Metsaökosüsteemid on globaalselt olulised süsiniku talletajad, kus süsinikuvaru paikneb nii metsa biomassis kui ka mullas (Pan et al., 2011). Kliima soojenedes mulla süsinikuvarud vähenevad, sest soojus soodustab mikroobide aktiivsust orgaanilise aine lagundamisel, mille käigus süsinik vabaneb atmosfääri ja toimub positiivne tagasiside kliima soojenemisele (Crowther et al., 2016). Samas võib parasvöötme metsa pinnase soojenemisel hoogustuv lämmastiku mineraliseerumine ning mineraliseerunud lämmastiku edasine nitrifikatsioon muuta lämmastikku taimedele kättesaadavamaks, mis edendab nende kasvu ja biomassi suurenemist (Butler et al., 2012; Dirnböck et al., 2017). Samas võib mikroobse lämmastikuringe aktiveerumine (nt nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon) põhjustada ka kõrgemaid N₂O emissioone, mis on olulise mõjuga kasvuhooenergia.

1.1.1. Rakendus ja kaskede olulisus

Eestis domineerivad kase liigid arukask (*Betula pendula* Roth.) ja sookask (*Betula pubescens*) on levinud Uuralitest Pürenee poolsaareni. Seejuures jääb arukase areaali ulatus Skandinaavia põhjaosas tundravööndis alla jahedalembelisemale sookasele, kuid lõunas ulatub sellest märksa kaugemale Apenniini ja Balkani poolsaartele (Joonis 1). Arukask on Eesti üks levinuimaid puuliike ja arvukaim lehtpuu, Eesti metsa pindalast oli kaasikutel (nii arukased kui sookased) 2023. aasta statistilise metsainventuuri (SMI) järgi suurim osakaal – 29,9% kogu metsamaast, edestades napilt teisel kohal olevat männikut (29,8%) (Keskkonnaagentuur, 2023). Arukask ja sookask on vähenõudlikud liigid nii kliima, niiskustingimuste kui mullastiku suhtes, kuid sookasega võrreldes eelistab arukask märksa kuivemat ja liivasemat pinnast (Beck et al., 2016). Mõlema liigi suutlikus väheviljakal pinnasel kiirelt kasvada, kiire seemnetootlikkus, kerge seemnete levik ja kiire seemnete idanemine teevad neist eduka pioneerliigi, mis esimesena uusi kasvukohti asustab (Laas, 1987). Pioneerliigile iseloomulikult kasutab kask kiireks kasvuks ära avarust ja valgusrohkest, kuid hiljem teiste puude varju jäädes muutuvad kaasikud näiteks kuusikuteks (J. Hynynen, 2010).



Joonis 1. Arukase (*Betula pendula*) levik Euroopas (Caudullo, 2017).

Kiirelt kasvav kask on efektiivne süsiniku siduja ning seega pakub potentsiaali nii energiamajanduses kui looduslike turbamaastike taastamisel. Sookask on sobiv liik mahajäätud turbakaevanduste süsiniku sidujaks muutmisel, moodustades seal kiirelt tiheda puistu, kus juba 10-30 aastaga suureneb oluliselt süsinikusisaldus ning taastub muld (Hytönen et al., 2018). Ka okaspuudega taasmetsastatud endistes turbakaevandustes näitab sookask suurt süsiniku sidumise ja ökoloogilise taastamise potentsiaali (Renou-Wilson et al., 2010). Kask on sobilik biomassi tootmiseks ka endisel põllumaal, kus tema juurdekasvuks on mõõdetud kuni 10 t/ha aastas (Aosaar et al 2016). Taasmetsastataval põllumaal kasvavas arukase istanduses on 15. aastase puu kõrguseks ja rinnasdiameetriks mõõdetud 2 korda suuremad väärtused kui kaskedel Eesti tavalises looduslikus kasemetsas (Lutter et al., 2015).

1.1.2. Puude risosfäär

Risosfäär on kitsas piirkond taime juuri ümbritsevas mullas, kus juured mõjutavad tugevalt mulla keemilisi ja bioloogilisi omadusi ning kus toimub aktiivne suhtlus juurte, mikroobide ja keskkonna vahel (Curl & Truelove, 1986). Juurte kaudu omastab taim vett ja toitaineid ning väljutab erinevaid ühendeid, mis kujundavad risosfääri keemilist ja bioloogilist keskkonda (Walker et al., 2003). Juurte kaudu võib olla taim sümbioosis mulla mikroobide ja seentega, mis muudavad taimele kasvuks vajalikke toitaineid (nt fosfori- ja lämmastikuühendid) kättesaadavaks (Morgan et al., 2005). Risosfääri mikroobikooslust ning funktsionaalset aktiivsust mõjutavad ka mullatüüp, kliima, taime arengustaadium ning taimeliik (Philippot et al., 2013). Taimed mõjutavad juurte kaudu mikroobe ja mullakeemiat pakkudes mikroobidele nende elutegevust soodustavaid süsinikuühendeid (Brzostek et al., 2011). Mikroobide kooslust mõjutavad taimed valikuliselt - arukase puhul on leitud, et tema risosfääris on bakterite elutugevus 1,4–4,7 korda suurem kui risosfääri välises mullas, kuid bakterikoosluse mitmekesisus 6% madalam, mis tähendab, et arukask soodustab just endale kasulike mikroobide elutegevust (Rosensvald et al., 2011). Kase risosfäär on aktiivsem kui kuusel või männil ning mikroobne kooslus on mitmekesisem ja osaleb rohkem lämmastikuringes (Priha et al., 1999).

1.1.3. Puude füllofäär

Füllofäär hõlmab kõiki taime maapealseid osi, sh varsi, lehti ja neid ümbritsevat õhuruumi ning neil elavaid mikroobe ja seeni (Masing, 1992). Füllofäär mõjutab metsa ökosüsteemi ka selle tekitatud varju läbi loodud valgus- ja niiskusoludega. Ka füllofääris esineb lämmastikuringe mikroobe, kes elavad nii taimeosade sees kui nende pinnal ning sarnaselt risofäärile määrab füllofääri bakterikoosluse eelkõige taime liik (Laforest-Lapointe et al., 2016). On leitud, et füllofäär osaleb aktiivselt lämmastikuringes ja võradel võib olla roll atmosfääri jõudva N_2O hulga vähendamisel (Mander et al., 2021). Hiljutised uuringud Euroopa metsade kohta on näidanud füllofääri tähtsust lämmastikuringes. Puuvõrades toimuva nitrifikatsiooni käigus muundavad lehtede pinnal paiknevad mikroobid õhust sadestunud ammoniumi nitraadiks, mis omakorda võib moodustada kuni 80% mullani jõudvast nitraadist (Guerrieri et al., 2024). Füllofääri funktsionaalsete lämmastikuringe geenide arvukus on positiivses seoses juurestiku tihedusega (Shi et al., 2023).

1.2. Lämmastikuringe protsessid

Lämmastik on kõikidele eluvormidele vajalik ja asendamatu element, mida kasutatakse DNA, valkude ja nukleiinhapete sünteesimisel (Kuypers et al., 2018). Maa atmosfääris enimlevinud N_2 ühendi aatomite vaheline kolmikside on tugev ja raskesti lõhutav, mistõttu ei suuda enamik organisme õhulämmastikku omastada ja vajavad seetõttu reaktiivseid lämmastikuühendeid (ammoonium ja nitraat) (Stein & Klotz, 2016). Õhulämmastikku suudavad looduslikult fikseerida ainult vähesed mikroorganismid – teatud bakterid (nt *Frankia*) ja arhed, kes sünteesivad N_2 sidumiseks ensüümi nitrogeenaas ning varustavad ökosüsteeme lämmastikuga (Barney et al., 2006). Looduslik lämmastikuringe pärast õhulämmastiku fikseerimist kujutab endast lämmastiku muundumist eri lämmastiku oksüdatsiooniastmetega (-5 kuni +3) ühendites ning lõpuks N_2 , NO või N_2O kujul atmosfääri naasmist (Galloway et al., 2004). Lämmastikuringe olulisemad protsessid on assimilatsioon, ammonifikatsioon, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, anaeroobne lämmastiku oksüdeerimine ja lämmastiku fikseerimine (Kuypers et al., 2018). Lämmastikuringet mõjutab lisaks temperatuurile oluliselt mullaniiskus (Beier et al., 2008). Lämmastikuringe protsesside uurimiseks on tõhus meetod määrata erinevate protsesside toimumist indikeerivaid markergeene.

1.2.1. Nitrifikatsioon

Nitrifikatsioon on protsess, kus ammoniaak oksüdeeritakse nitritiks ja nitraadiks (Kuypers et al., 2018). Traditsiooniliselt on nitrifikatsiooni peetud kaheosaliseks protsessiks, milles esmalt ühed kemolitotroofsed mikroobid oksüdeerivad ammoniumiooni (NH_4^+) nitritiooniks (NO_2^-) ning seejärel teised mikroobid nitriti nitraadiks (NO_3^-) (Levy-Booth et al., 2014). Ammoniaagi oksüdeerimine nitritiooniks koosneb omakorda kahest osast, millest esimese käigus katalüüsib ensüüm ammoniaagi monooksügenaas (AMO) ammoniaagi hüdroksüülamiiniks (NH_2OH) (Levy-Booth et al., 2014). Seda ensüümi (AMO) kodeerib nitrifikatsiooni võtmegeen *amoA*, mis on mõnevõrra erinev bakteritel ja arhedel. Hiljuti on leitud, et osa *Nitrospira* perekonna bakteritest suudavad läbi viia kogu nitrifikatsiooniprotsessi iseseisvalt, oksüdeerides ammoniaagi nitraadiks (comammox), mida aitab läbi viia funktsionaalne *amoA* geen (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015). Lisaks võib toimuda heterotroofne nitrifikatsioon seente ja bakterite abil, kuid ensüümid ja molekulaarsed mehhanismid ei ole sel protsessil veel hästi teada. (Martikainen, 2022).

1.2.2. Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on peamine mehhanism, mille kaudu reaktiivne lämmastik suunatakse dilämmastikuna tagasi atmosfääri (Galloway et al., 2004). Denitrifikatsioon on anaeroobne protsess ja koosneb neljast redutseerimisetapist järjekorras $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ (Zumft, 1997; Goregues et al., 2005). Nitriti lämmastikoksiidiks (NO) redutseerimise etappi viib läbi ensüüm nitritreduktaas, mille tootmist kontrollivad kaks funktsionaalselt sarnast, kuid struktuurilt erinevat ja harva koos esinevat geeni: *nirK* (kodeerib Cu-tüüpi nitritreduktaasi) ja *nirS* (kodeerib tsütokroom cd_1 tüüpi nitritreduktaasi) (Ming 2024; Zumft 1997). Nitritreduktaasi ensüüm esineb peamiselt bakterites ja arhedes, kuid ka seentes, kus ensüümi sünteesimist kontrollib seente *nirK* geen (Long et al., 2015). Teised olulised markergeenid on *nosZI* ja *nosZII*, mis kodeerivad ensüümi N_2O -reduktaas, mis viib läbi N_2O redutseerimist N_2 -ks. *nosZ* geeni omavad mikroobid on olulised N_2O sidujad (Wu, 2018). Lämmastiku redutseerimiseks on organismidel vaja lisaenergiat, mistõttu on denitrifikatsiooni protsesside toimumiseks oluline süsiniku kättesaadavus (Dlamini et al., 2020).

1.2.3. N₂O vood

N₂O on väga tugev kasvuhoonegaas, mille võime kasvuhooneefekti tekitada on globaalse soojenemise potentsiaali (GWP) indeksi järgi 273 korda tugevam kui kasvuhoonegaas CO₂ (GHG Protocol, 2024). N₂O viibeaeg on atmosfääris umbes 100 aastat erinevalt mõne nädalaga lagunevatest reaktiivsetest lämmastikuühenditest (Fowler et al 2013). N₂O keskmine kontsentratsioon atmosfääris on sarnaselt teistele kasvuhoonegaasidele pärast tööstusrevolutsiooni inimtegevuse mõjul jõudsalt kasvanud, jõudes 2023. aastal 336.69 ppm-ni (Tian, 2024). Aastasest N₂O koguemissioonist moodustasid vahemikus 2007-2016 keskmiselt 43% antropogeensed allikad, millest omakorda ~70% pärineb põllumajandusest ning ülejäänud valdavalt tööstusest, fossiilkütuste kasutamisest ja jäätmemajandusest (Tian, 2020). Põllumajandusest pärineva N₂O koguse kasvu taga on peamiselt lämmastikväetiste rohke kasutamine (Skiba 2014).

1.3. Meetodid lämmastikuringe protsesside uurimiseks

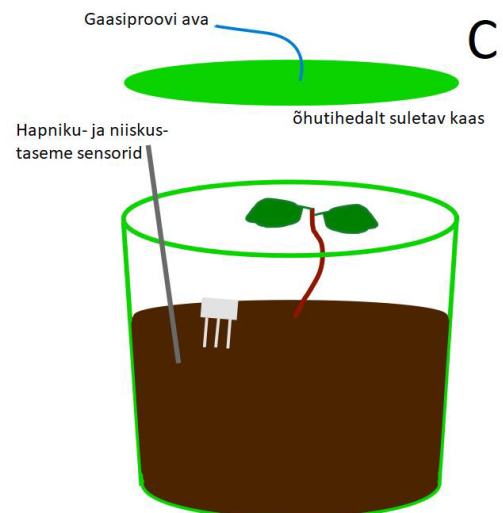
1.3.1. Reaalaja PCR

Reaalaja PCR ehk reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni abil saab määrata spetsiifiliste geenide arvukust (Valasek ja Repa, 2005). DNA amplifikatsiooni jälgitakse reaalajas, ning mõõdetakse kasutades DNA ahelaga seonduvat fluorestsentsseeruvat värvi, näiteks SYBR green (Valasek ja Repa, 2005). qPCR analüüsi protsess koosneb kolmest etapist: kõigepealt lõhutakse kuumutades eelnevalt rakust eraldatud DNA heeliks, seejärel seonduvad eraldunud ahelatega otsitavale geenile vastavas kohas praimerid ning lõpuks sünteesib polümeraas uue DNA (Powledge, 2004). Tsüklit korrates tekitatakse algsest DNA geenimaterjalist miljoneid koopiaid, mille abil on võimalik proovides hinnata bakterite ja arhede kui ka funktsionaalsete geenide arvukust (Powledge, 2004).

2. Materjal ja meetodika

2.1. Eksperimendi kirjeldus

Laborieksperimendis kasvatati kontrollitud tingimustes arukase taimi (*Betula pendula*). Eksperiment viidi läbi Tartu Ülikooli laboris. Kasutati 12 PVC ämbrit - mikrokosmi (Joonis 2). Ämbriid olid täidetud turvasmullaga, mis võeti Emajõe lammialalt Käreverest (Joonis 2). Kasetaimed saadi Riigimetsa Majandamise Keskuse (RMK) puukoolist.



Joonis 2. Turvasmuld pärines Emajõe lammialalt (A), mikrokosmid kliimakambris (B) ja mikrokosmi skeem (C).

Mikrokosmid paiknesid eksperimendi vältel kuue kaupa kahes kliimakambris programmeeritud temperatuuri-, niiskus- ja valgusrežiimiga. Ööpäeva jooksul oli programmil kaks režiimi: päevane režiim sisselülitatud valgustusega ja temperatuuriga 22 °C ning öine valguseta režiim temperatuuril 17 °C. Mõlemas režiimis oli kambri õhuniiskuse seadistus 85%. Kastmiseesmärgil lisati mikrokosmidesse igapäevaselt kraanivett.

Mikrokosmid tähistati numbritega 1-12. Eksperimendiga kaasneva isotoopanalüüsi jaoks lisati 4 mikrokosmile (nr 1, 2, 8, 7) $^{15}\text{NO}_3$ sisaldavat substraati, 4 mikrokosmile (nr 5, 6, 9, 10) lisati $^{15}\text{NH}_4$ sisaldavat substraati ja ülejäänud 4 mikrokosmi (3, 4, 11, 12) olid kontrollid ehk neile ^{15}N märgistatud lämmastikku ei lisatud. Substraati lisati iga mikrokosmi ülemisse 5 cm mullakihti süstla abil 50 ml vette lahustatuna. Käesolevas bakalaureusetöös isotoopanalüüsi ei tehtud ja analüüsiti ainult mikrobioloogilisi parameetreid võrdluses N_2O voogudega. Tulevikus plaanitakse mikrobioloogilisi parameetreid võrrelda ka isotoopanalüüsi tulemustega, mis puuduvad sellest tööst, sest oleks ületanud bakalaureusetöö mahu.

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

Eksperimendi algusele eelnenud 16 päeva vältel toimus mikrokosmide aklimatiseerumine kliimakambrites, mille jooksul niiskus- ja hapnikunäite ning õhuproove ei kogutud. Eksperimendi jooksul mõõdeti mullaniiskust ja hapnikutaset igapäevaselt. Eksperimendi tegevuste ajakava on toodud tabelis 1.

Gaasiproovide kogumiseks suleti mikrokosmid õhutihedalt kaanega (Joonis 2). Proove koguti tunni aja jooksul iga 20 minuti järel (0, 20, 40 ja 60 minutil) eelvakumeeritud klaaspudelitesse. N_2O voogude määramiseks koguti gaas 50 ml pudelitesse ja isotoopanalüüsi jaoks 100 ml pudelitesse (isotoopanalüüsi tulemusi ei ole selles bakalaureusetöös).

Mikrobioloogilisteks analüüsideks koguti mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovid eksperimendi viimasel päeval. Lisaks koguti mullaproove ka esimesel ja kuuendal päeval. Proovid külmutati koheselt kasutades vedelat lämmastikku ning hoiustati edaspidiseks analüüsiks külmkapis -20 °C temperatuuril.

Tabel 1. Eksperimendi tegevuste ajakava.

Kuupäev	Eksperimendi päev	Tegevus
2. oktoober	Enne eksperimendi algust	Mikrokosmide paigutamine kliimakambritesse Veega kastmine
18.-26. ja 28. oktoober	Iga päev eksperimendi vältel	Mullaniiskuse ja hapnikutaseme mõõtmine Veega kastmine Gaasiproovide kogumine
18. oktoober	1.	Mullaproovide võtmine
23. oktoober	6.	Mullaproovide võtmine
28. oktoober	11.	Mulla, risosfääri, tüve ja leheproovide kogumine

2.3. DNA ekstraheerimine ja kontsentratsiooni mõõtmine

DNA eraldati mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovidest. Tüve- ja leheproovid külmutati vedela lämmastikuga ning purustati enne DNA eraldamist uhmriga. DNA eraldati proovidest kasutades DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (Qiagen, USA) vastavalt tootja juhendile. Juhendist erinevalt kasutati homogeniseerimiseks masinat Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa) 20 sekundit režiimil 5000 pööret minutis. Eraldatud DNA kvaliteedi hindamiseks mõõdeti DNA kontsentratsiooni spektrofotomeetriga Infinite 200 M (Tecan AG, Austria). Eraldatud DNA säilitati külmikus –20 °C juures.

2.4. Geenikoopiate arvukuse määramine qPCR meetodil

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodil määrati bakterite ja arhede 16S rRNA geenide arvukus ning nitrifikatsiooni (bakterite, arhede ja comammox *amoA*) ja prokarüootse (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) ja seente denitrifikatsiooni (seente *nirK*) geenide arvukused. qPCR reaktsioonid viidi läbi kasutades termotsüklerit Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). Reaktsioonisegu maht oli 10 µl, mis sisaldas päri- ja vastassuunalist praimerit, 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 1 µl eraldatud DNA-d ning ülejäänud mahus vett. Iga proovi amplifitseeriti kahes või kolmes korduses ning kõikidele qPCR-i mõõtmistele lisati kaks või kolm negatiivset kontrollproovi, mille reaktsioonisegus DNA-d ei olnud. Tulemusi hinnati kasutades tarkvara Rotor-Gene Q Series Software v. 2.0.2 (Qiagen, USA) ja LinRegPCR v. 2021.1 (Holland). Geenikoopiate

arvukus on toodud geenikoopiate arvuna ühe grammi kuivaine kohta (GK/gKA). Detailsem qPCR meetodika on saadaval Espenberg et al. (2024).

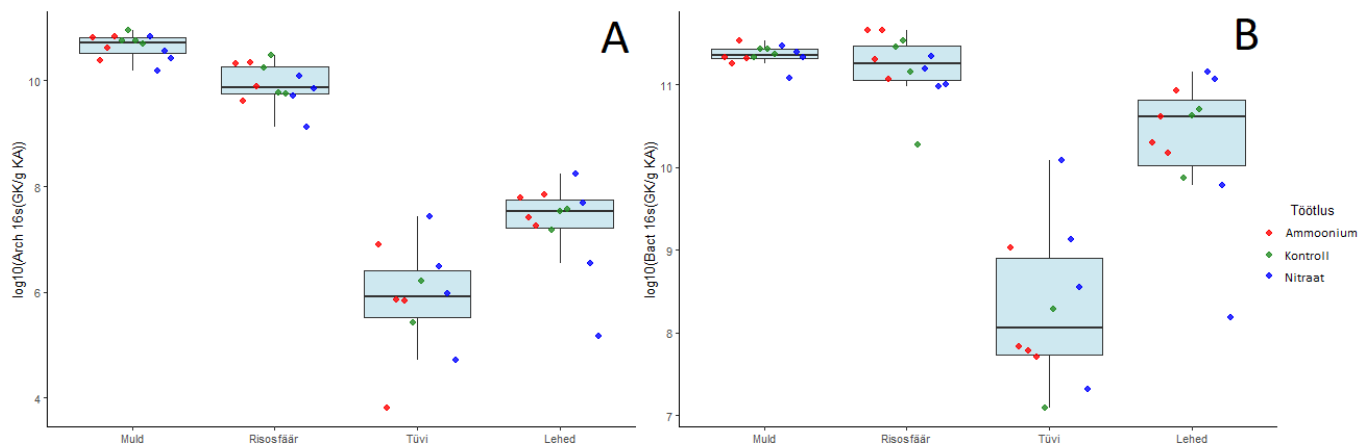
2.5 Andmeanalüüs ja autori osalus

Bakalaureusetöö autor osales eksperimendi väljatöötamisel ja proovivõtmisel, eraldas DNA 72 proovist ja tegi qPCR-i analüüsid kolmele geenile (bakterite 16S rRNA, arhede 16S rRNA, *nirK*) laboris ning teostas andmeanalüüsi. Andmeanalüüsiks kasutati tarkvara R v. 4.5.0, RStudio v. 2025.05.0 ja Microsoft Excel v. 2504.

3. Tulemused

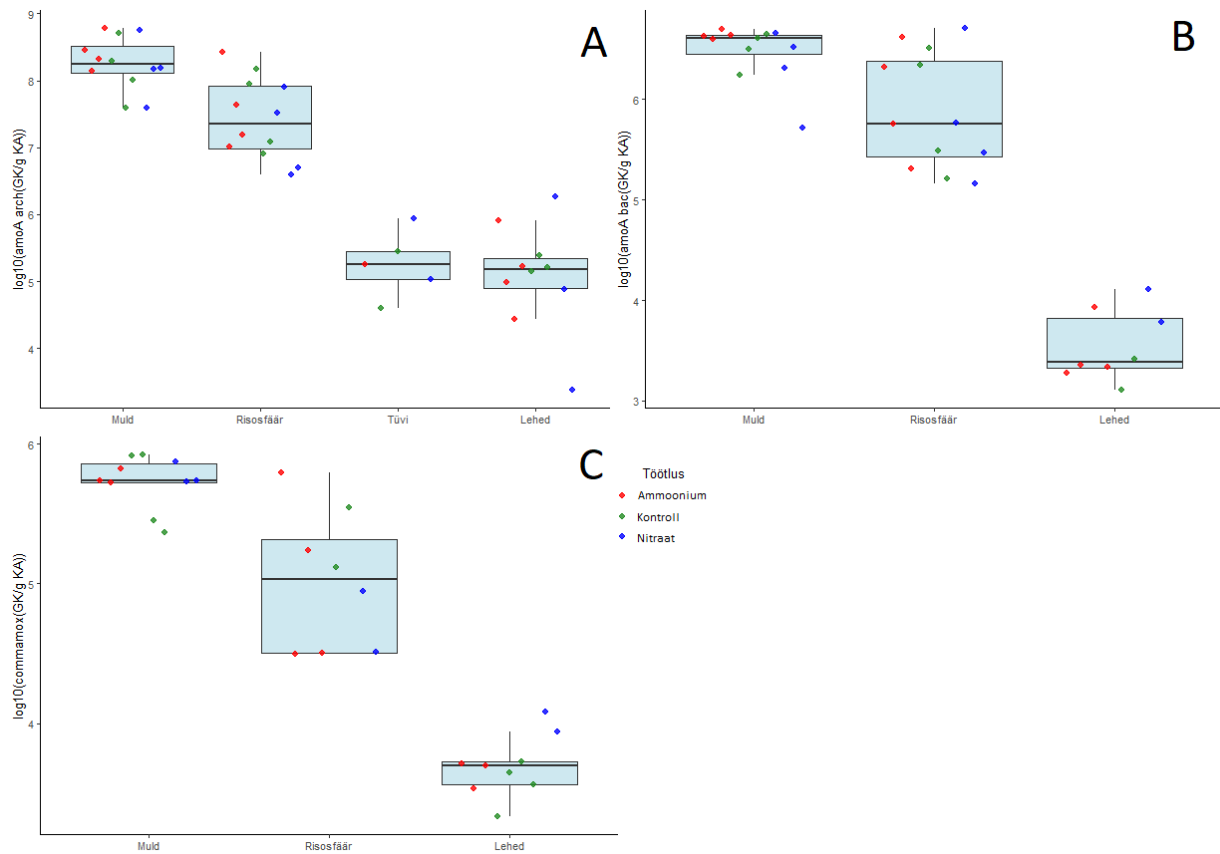
3.1. Geenikoopiate arvukus mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovides

Arhede ja bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus oli kõige väiksem tüveproovides (Joonis 3). Leheproovides oli arhede ja bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus tunduvalt suurem, kuid jäi siiski alla mulla- ja risosfääriproovide arvukustele. Mulla- ja risosfääriproovides on geenikoopiate arvukuse hajuvus väiksem kui tüve- ja leheproovides. Kui arhede arvukus risosfääris on väiksem kui mullaproovides, siis bakterite arvukus mullas ja risosfääris on sarnane. Võrreldes bakteritega on arhede arvukus proovides ühe kuni kahe suurusjärgu võrra väiksem.



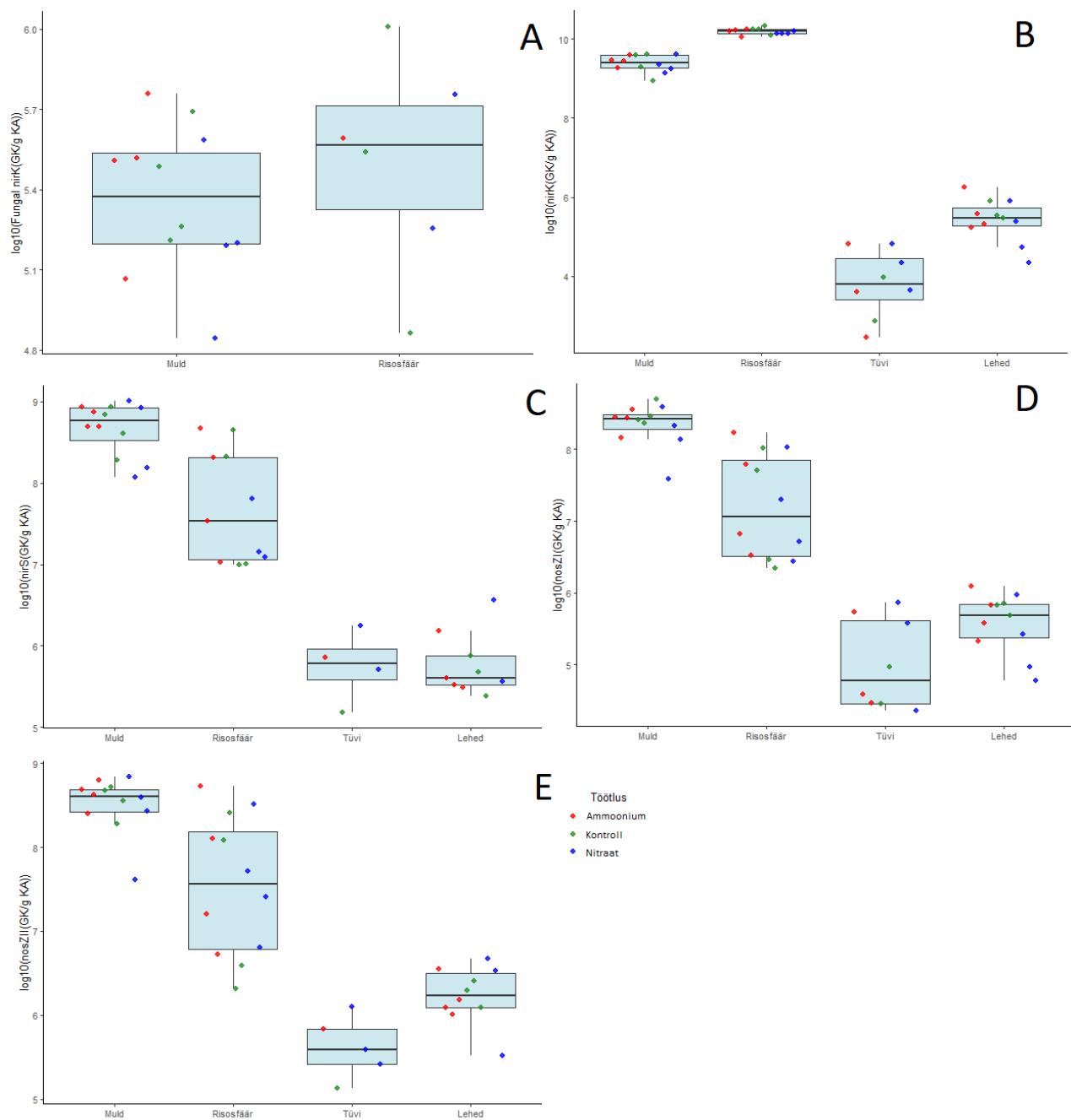
Joonis 3. Arhede 16s rRNA (A) ja bakterite 16s rRNA (B) geenikoopiate arvukused eksperimendi viimase päeva mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovides.

Arhede *amoA* ja bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus oli kõige suurem mullaproovides, mõnevõrra väiksem risosfääris ning tunduvalt madalam leheproovides (Joonis 4). Tüveproovidest õnnestus määrata ainult arhede *amoA* geenikoopiate arvukus, mis oli sarnane arvukusega lehtede proovis. Comammox *amoA* geenikoopiate arvukused olid samuti suurimad mullaproovides ning väiksemad risosfääri ja lehtede proovides.



Joonis 4. Nitrifikatsioonigeenide (arhede *amoA* (A), bakterite *amoA* (B) ja comammox *amoA* (C)) geenikoopiate arvukus eksperimendi viimase päeva mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovides.

Seente *nirK* geenikoopiate arvukus oli alla määramispiiri tüve- ja leheproovides (Joonis 5). Prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukused olid risosfääri proovides kõrgemad kui mullaproovides, seevastu *nirS* geenikoopiate arvukused olid risosfääris mullaproovidest madalamad. Ka leheproovides oli *nirK* geenikoopiate arvukus suurem kui tüveproovides, kuid *nirS* geenikoopiate arvukus tüve- ja leheproovides sarnane. Arvukuste erinevused *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate puhul olid sarnase muustriga – arvukaimad mullas ning seejärel risosfääris, madalamad lehtedes ning madalaimad tüveproovides.

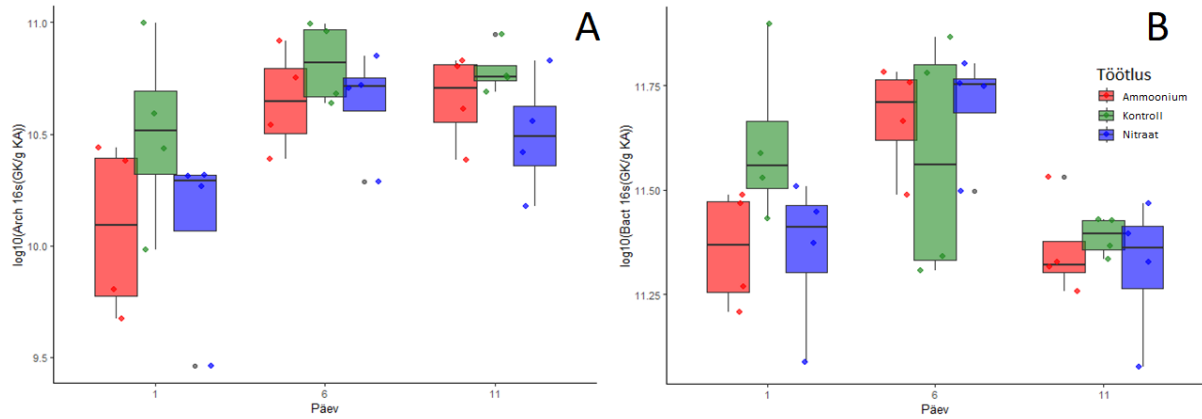


Joonis 5. Denitrifikatsioonigeenide (seente *nirK* (A), *nirK* (B), *nirS* (C), *nosZI* (D), *nosZII* (E)) geenikoopiate arvukused eksperimendi viimase päeva mulla-, risosfääri-, tüve- ja leheproovides.

3.2. Geenikoopiate arvukus mullaproovides päevade lõikes

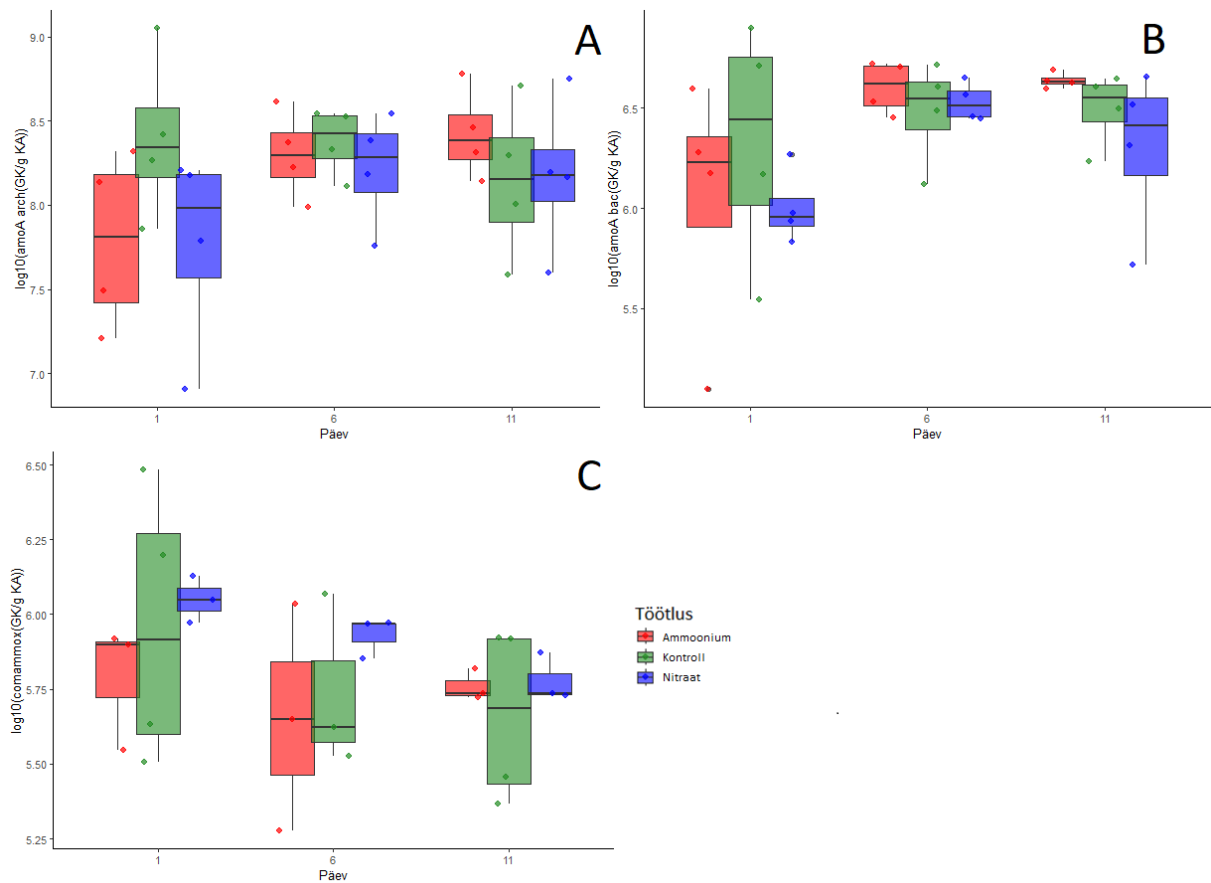
Arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukuse ajaline dünaamika eksperimendi jooksul oli sarnane kõigi tööstustega proovides – arvukaim olles kuendal päeval ning pärast seda viimasel päeval veidi madalam (Joonis 6). Bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukuse muutused olid samuti

sarnased nii nitraadi- kui ammoniumitöötlustega proovides, mis kuuendal päeval oli kõrgem, kui alguses ja lõpus, kuigi kontrollmikrokosmis seevastu oli geenikoopiate arvukus erineva dünaamikaga.



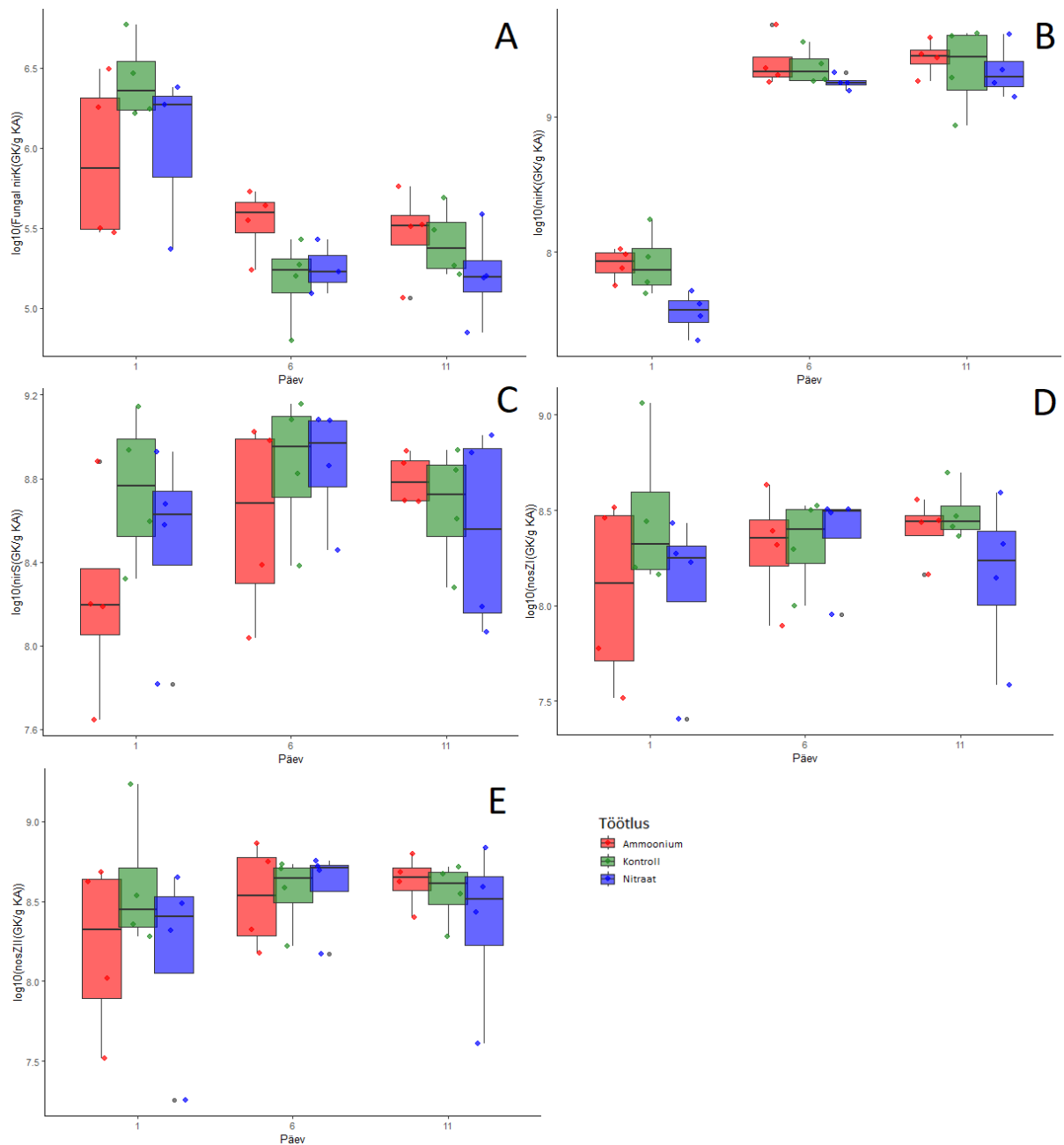
Joonis 6. Arhede 16S rRNA (A) ja bakterite 16S rRNA (B) geenikoopiate arvukused eksperimendi 1., 6. ja 11. päeval.

Nii arhede kui bakterite *amoA* geeni puhul saab täheldada geenikoopiate arvukuse kasvu ammoniumi töötluste korral (Joonis 7). Comammox *amoA* geenikoopiate arvukus langeb kergelt eksperimendi jooksul. Nitraaditöötluste korral nii arhede *amoA* kui bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus kuuendal päeval tõuseb, kuid üheteistkümnendal päeval langeb taas. Töötlusteta proovides jääb keskmine arhede *amoA* ja bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus eri päevade vältel suhteliselt muutumatuks, kuid comammox *amoA* geenikoopiate arvukus muutub sarnaselt ammoniumi töötlustega proovidele.



Joonis 7. Nitrifikatsioonigenide (arhede *amoA* (A), bakterite *amoA* (B) ja *comammox amoA* (C)) geenikoopiate arvukused eksperimendi 1., 6. ja 11. päeval.

Seente denitrifikatsiooni (seente *nirK*) geenikoopiate arvukus langeb pärast esimest päeva mõlema töötuse ja kontrolli puhul, ning on kuuendal ja üheteistkümnendal päeval sarnaselt madal (Joonis 8). Prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukus käitub vastupidiselt ning tõuseb iga töötuse kuuendal päeval ning jääb sarnasele tasemele üheteistkümnendal päeval. *nirS* geenikoopiate arvukus kasvas ammooniumi töötuse puhul ühtlaselt, samuti ka *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukus. Nitraaditöötuse puhul geenikoopiate arvukus kuuendal päeval kasvas ning üheteistkümnendal langes ja seda nii *nirS*, *nosZI* kui *nosZII* geenikoopiate puhul. Töötusetu ehk kontrollproovides käitus *nirS*, *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukus võrreldes ammooniumi ja nitraadi töötusega proovidega vahepealselt, nõrgalt tõustes või viimasel päeval jälle langes.

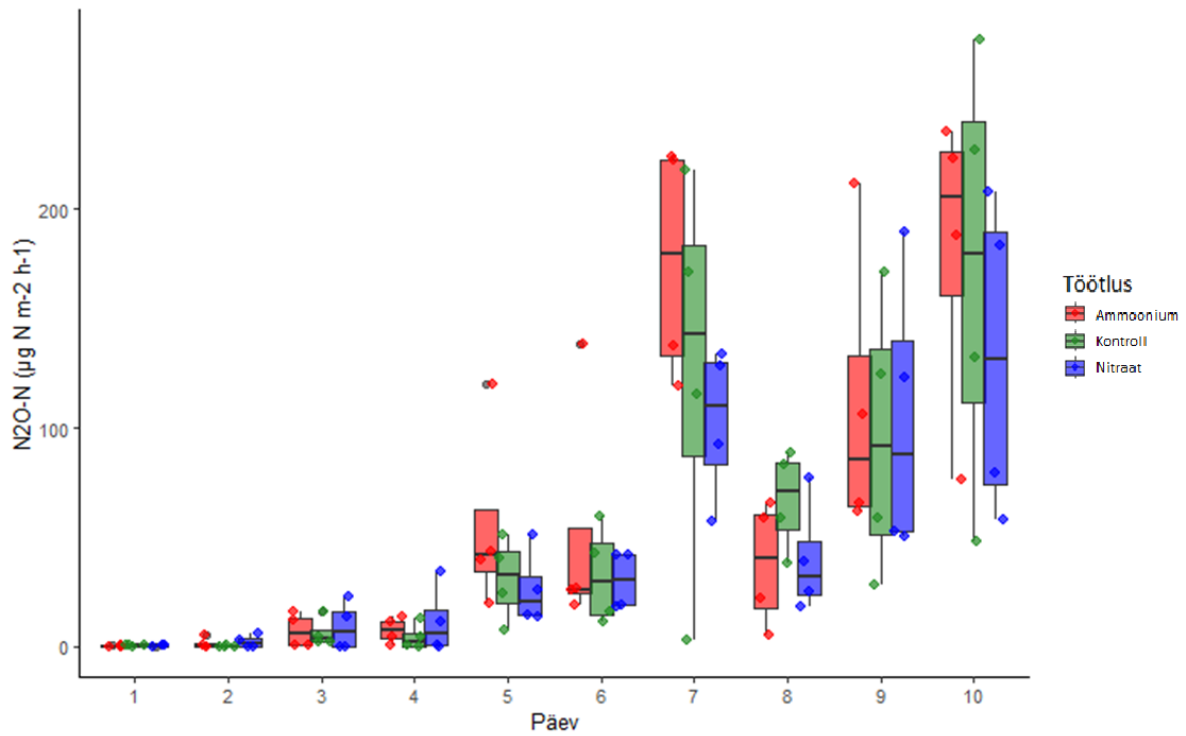


Joonis 8. Denitrifikatsioonigeenide (seente *nirK* (A), *nirK* (B), *nirS* (C), *nosZI* (D), *nosZII* (E)) geenikoopiate arvukused eksperimendi 1., 6. ja 11. päeval.

3.3. N₂O vood päevade lõikes

N₂O emissioonid suurenesid eksperimendi jooksul (Joonis 9). Esimesel päeval olid emissioonid nullilähedased (keskmise 0,09 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$) ning osad mikrokosmid toimisid N₂O neelajatena. Eksperimendi edenedes toimus N₂O emissioonide kasv ja viimasel päeval olid keskmised emissioonid ammoniumitöötusega mikrokosmis 181,04 $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$,

nitraaditöötusega $132,27 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ja kontroll $171,32 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$. Seitsmendal päeval emiteerisid kõik töötused oluliselt rohkem N_2O -d võrreldes varasemate päevadega.



Joonis 9. N_2O vood päevade lõikes eksperimendi jooksul.

4. Arutelu

Mullas ja risosfääris oli kõikide geenide arvukus suurem, kui tüve- ja leheproovides. Mullaproovides oli geenikoopiate arvukus tavaliselt suurem kui risosfääris, eranditeks olid vaid seente *nirK* ning prokarüootide *nirK*, kus risosfääri proovides oli arvukus märksa kõrgem. Varem on täheldatud prokarüootide *nirK* positiivset reaktsiooni juureefektile ja tema geenikoopiate arvukuse kasvule risosfääris (Hussain et al., 2018). Hiina igikeltsa piirkonnas tehtud uuringus täheldati prokarüootide *nirK* geenikoopiate madalamat taset risosfääris võrreldes mullaga, kuid erandina oli risosfääris prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukus suurem kase perekonna liigi *Betula fruticosa* puhul (Gong et al., 2023).

Prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukuse kasv ning *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuse stabiilsus seletab ilmselt N₂O voogude kasvu eksperimendi vältel. Prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukuse kasv näitab, et denitrifikatsiooni esimesed etapid eksperimendi vältel toimusid, kuid *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuse stabiilsus annab alust arvata, et denitrifikatsiooni järgnevad etapid ei toimunud ning lämmastiku lõpuni redutseerumata jäämine väljendus N₂O voogude kasvus. Varem on kirjeldatud turbamullas prokarüootide *nirK* geenikoopiate arvukuse kasvu ja N₂O voo vahelist positiivset seost koos *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuse stabiilsusega pinnase külmumis- ja sulamistsüklites (Kazmi et al., 2023). Ka seente *nirK* geenide arvukus mängib olulist rolli parasvöötme muldade denitrifikatsioonis ja N₂O voogudes (Bösch et al., 2023), kuid selle töö turbamuldades toimus seente *nirK* geenikoopiate arvukuse langus vastupidiselt bakteritest ja arhedest denitrifitseerijate arvukuse kasvule.

Ka nitrifikatsiooniprotsessist võib tulla N₂O emissioone, peamiselt ammooniumi oksüdeerivate bakterite või arhede poolt (Liang ja Robertson, 2021). Käesolevas töös toimus ammooniumitöötusega mikrokosmides nii bakteriaalse *amoA* kui ka arhede *amoA* geenikoopiate arvukuse tõus ning ammooniumi töötusega mikrokosmides olid keskmiselt märksa kõrgemad N₂O emissiooni väärtused kui nitraaditöötusega mikrokosmides, kus nitrifikatsiooni geenide geenikoopiate arvukuse tõusud oli madalamad, millest võib järeldada ka nitrifikatsiooni panust N₂O emissioonidesse.

Puude võrades on näidatud nii N₂O eraldumist kui ka sidumist (Mander et al., 2021; Guerrieri et al., 2024; Machacova et al., 2024). Antud töös tehti lehtedel ja tüvedel kindlaks nii

nitrifikatsiooni- kui denitrifikatsiooni geenide olemasolu, mis tähendab, et ka neil võis olla panus N₂O emissiooni või tarbimisse. Geenikoopiate arvukus oli leheproovides valdavalt suurem kui tüveproovides, kuid arhede *amoA* ja *nirS* geenikoopiate arvukus oli tüveproovides ja leheproovides sarnane, mis näitab, et ka tüvede ja lehtede mikroobikooslused on erinevad. Taimede või puude osade nagu näiteks risosfääri, tüvede või lehtede seostamine kasvuhoonegaaside voogudega ja nende rolli uurimine seal on uudne suund, mis võib tulevikus paljuski parandada ka üleüldisi arusaame kasvuhoonegaaside voogudest metsades (Mander et al., 2025).

Kokkuvõte

Arukase (*Betula pendula*) mullas, risosfääris, tüvedes ja lehtedes tuvastati erinevaid lämmastikuringe geene ning täheldati nende geenikoopiate arvukuste vahel erinevusi. Analüüsiiti 12 kasetaime eksperimendist, mis viidi läbi laboris kontrollitud tingimustes mikrokosmides. Neljale kasetaimetele lisati eksperimendi alguses ammooniumi ja neljale nitraadi substraati, ning ülejäänud neli jäeti töötlust rakendamata kontrolliks. Eksperimendi käigus koguti igapäevaselt gaasiproove N₂O emissiooni hindamiseks ning koguti kolmel korral mullaproove, eksperimendi alguses, keskel ja lõpus. Eksperimendi lõpus võeti lisaks mullaproovile risosfääri, tüve ja leheproovid. qPCR analüüsi kasutades määrati bakterite ja arhede 16S rRNA ja nitrifikatsiooni (arhede *amoA*, bakterite *amoA*, comammox *amoA*) ja denitrifikatsiooni (seente *nirK*, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) geenide arvukused proovides.

Töö tulemused näitavad, et lämmastikuringe protsessid toimuvad nii mullas, kasetaimede risosfääris kui ka fülloosfääris. Antud töös näidati lehtedel ja tüvedel nii nitrifikatsiooni- kui denitrifikatsiooni geenide olemasolu, mis tähendab, et ka neil võis olla panus N₂O emissiooni või tarbimisse. Ammooniumi ja nitraadi substraatide lisamine avaldas mõju erinevatele lämmastikuringe protsessidele ning mõjutas geenikoopiate arvukuse dünaamika mustreid eksperimendi jooksul. Töötluste vahelised erinevused joonistusid välja ka N₂O voogudes. Eksperimendi vältel ühtlaselt kasvanud N₂O voogudesse panustasid nii denitrifikatsiooni- kui ka nitrifikatsiooniprotsessid.

Microbial Nitrogen Cycle of Silver Birch (*Betula pendula*) in the Soil–Rhizosphere–Plant–Atmosphere Continuum

Lauri Eving

Summary

The nitrogen cycle, which is crucial for life on Earth, is significantly affected by human activity. Anthropogenic reactive nitrogen compounds globally contribute to eutrophication, acid rain, and increased greenhouse gas emissions. One hazardous greenhouse gas originating from the nitrogen cycle is N₂O, which contributes to ozone layer depletion and global warming. Forest ecosystems play a key role in the nitrogen cycle. In Estonia, birch trees (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens*), which dominate forest areas, are fast-growing pioneer species with high potential for use in energy production and peatland restoration.

The aim of this study was to investigate the microbiological nitrogen cycle in silver birch (*Betula pendula*) within the soil-rhizosphere-plant-atmosphere complex, as well as the effects of ammonium and nitrate substrate additions. A laboratory experiment was conducted using 12 birch microcosms under controlled conditions. Four trees received ammonium substrate, four received nitrate substrate, and the remaining four served as untreated controls. Daily gas samples were collected to measure N₂O emissions, and soil samples were taken at the beginning, middle, and end of the experiment. At the end of the experiment, rhizosphere, stem, and leaf samples were also collected. Using qPCR analysis, the abundances of bacterial and archaeal 16S rRNA genes and genes related to nitrification (archaeal *amoA*, bacterial *amoA*, comammox *amoA*) and denitrification (fungal *nirK*, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) were determined.

The results show that nitrogen cycle processes occur in the soil, rhizosphere, and phyllosphere of birch trees. Gene abundance was highest in the soil and rhizosphere, lower in leaves, and lowest in stems. The abundance of the *nirK* gene was higher in the rhizosphere than in the soil. Nitrification and denitrification genes were also detected in the phyllosphere, albeit in smaller amounts. Ammonium treatment increased the abundance of *amoA* genes, indicating more active nitrification, while the rise in *nirK* gene abundance and the stable levels of *nosZ* genes suggest incomplete denitrification, explaining the increased N₂O emissions. N₂O emissions were highest in ammonium-treated microcosms.

In conclusion, the results indicate that the microbiological nitrogen cycle of silver birch involves both the rhizosphere and aboveground parts of the plant, and that both denitrification and nitrification contribute to N₂O emissions.

Tänuavaldused

Soovin tähendada oma juhendajaid Mikk Espenbergi, Mohit Mastat, Fahad Ali Kazmi, kes pühendasid aega minu juhendamiseks. Samuti soovin tänada Kärt Kangerit, Laura Kuusemetsa ja Ramita Khanongnuch juhendamise ja nõuannete andmise eest laboris. Tänan eriliselt Mikk Espenbergi oskusliku juhendamise ja vastutulelikkuse eest ning Kärt Kangerit ja Mohit Mastat töövõtete õpetamise eest laboris.

Kasutatud kirjandus

- Aosaar, J., Mander, Ü., Varik, M., Becker, H., Morozov, G., Maddison, M., Uri, V., 2016. Biomass production and nitrogen balance of naturally afforested silver birch (*Betula pendula* Roth.) stand in Estonia. *Silva Fennica* 50.
- Barney, B.M., Lee, H.-I., Santos, P.C.D., Hoffman, B.M., Dean, D.R., Seefeldt, L.C., 2006. Breaking the N₂ triple bond: insights into the nitrogenase mechanism. *Dalton Trans.* 2277–2284. <https://doi.org/10.1039/B517633F>
- Beck, P., Caudullo, G., de Rigo, D., Tinner, W. (2016). *Betula pendula*, *Betula pubescens* and other birches in Europe: distribution, habitat, usage and threats.
- Beier, C., Emmett, B.A., Peñuelas, J., Schmidt, I.K., Tietema, A., Estiarte, M., Gundersen, P., Llorens, L., Riis-Nielsen, T., Sowerby, A., Gorissen, A., 2008. Carbon and nitrogen cycles in European ecosystems respond differently to global warming. *Sci Total Environ* 407, 692–697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.001>
- Brzostek, E.R., Greco, A., Drake, J.E., Finzi, A.C., 2013. Root carbon inputs to the rhizosphere stimulate extracellular enzyme activity and increase nitrogen availability in temperate forest soils. *Biogeochemistry* 115, 65–76. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9818-9>
- Butler, S., Melillo, J., Johnson, J., Mohan, J., Steudler, P., Lux, H., Burrows, E., Smith, R.M., Vario, C., Scott, L., Hill, T.D., Aponte, N., Bowles, F., 2011. Soil warming alters nitrogen cycling in a New England forest: implications for ecosystem function and structure. *Oecologia* 168, 819–828. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2133-7>
- Bösch, Y., Pold, G., Saghäi, A., Karlsson, M., Jones, C.M., Hallin, S., 2023. Distribution and Environmental Drivers of Fungal Denitrifiers in Global Soils. *Microbiology Spectrum* 11, e00061-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00061-23>
- Caudullo, G., Welk, E., San-Miguel-Ayanz, J., 2017. Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief* 12, 662-666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007>
- Crowther, T.W., Todd-Brown, K.E.O., Rowe, C.W., Wieder, W.R., Carey, J.C., Machmuller, M.B., Snoek, B.L., Fang, S., Zhou, G., Allison, S.D., Blair, J.M., Bridgham, S.D., Burton, A.J., Carrillo, Y., Reich, P.B., Clark, J.S., Classen, A.T., Dijkstra, F.A., Elberling, B.,

Emmett, B.A., Estiarte, M., Frey, S.D., Guo, J., Harte, J., Jiang, L., Johnson, B.R., Kröel-Dulay, G., Larsen, K.S., Laudon, H., Lavallee, J.M., Luo, Y., Lupascu, M., Ma, L.N., Marhan, S., Michelsen, A., Mohan, J., Niu, S., Pendall, E., Peñuelas, J., Pfeifer-Meister, L., Poll, C., Reinsch, S., Reynolds, L.L., Schmidt, I.K., Sistla, S., Sokol, N.W., Templer, P.H., Treseder, K.K., Welker, J.M., Bradford, M.A., 2016. Quantifying global soil carbon losses in response to warming. *Nature* 540, 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature20150>

Espenberg, M., Pille, K., Yang, B., Maddison, M., Abdalla, M., Smith, P., Li, X., Chan, P.L. and Mander, Ü., 2024. Towards an integrated view on microbial CH₄, N₂O and N₂ cycles in brackish coastal marsh soils: A comparative analysis of two sites. *Science of the Total Environment*, 918, p.170641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170641>

Curl, P.Dr.E., Truelove, P., 1986. The Rhizosphere. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70722-3>

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>

Dirnböck, T., Foldal, C., Djukic, I., Kobler, J., Haas, E., Kiese, R., Kitzler, B., 2017. Historic nitrogen deposition determines future climate change effects on nitrogen retention in temperate forests. *Climatic Change* 144, 221–235. <https://doi.org/10.1007/s10584-017-2024-y>

Dlamini, J.C., Chadwick, D., Hawkins, J.M.B., Martinez, J., Scholefield, D., Ma, Y., Cárdenas, L.M., 2020. Evaluating the potential of different carbon sources to promote denitrification. *The Journal of Agricultural Science* 158, 194–205. <https://doi.org/10.1017/S0021859620000520>

FAO, 2024. The State of the World's Forests 2024. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd1211en>

Farrokhi, F., Kang, E., Pellegrina, H.S. and Sotelo, S., 2023. Deforestation: A global and dynamic perspective.

Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M., Cape, J., Reis, S., Sheppard, L., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Amann, M., Voss, M., 2013. The Global Nitrogen Cycle in the Twenty-First

Century. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 368, 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>

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., Vöösmary, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>

Gong, C., Ma, X., Song, Y., Zhang, D., Zhu, M., Wang, X., Gao, S., Gao, J., Song, C., 2023. Characteristics of Microbial Abundance in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils of Permafrost Peatland, Northeast China. *Forests* 14, 1794. <https://doi.org/10.3390/f14091794>

Goregues, C.M., Michotey, V.D., Bonin, P.C., 2005. Molecular, Biochemical, and Physiological Approaches for Understanding the Ecology of Denitrification. *Microb Ecol* 49, 198–208. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0256-7>

Guerrieri, R., Templer, P., Magnani, F., 2021. Canopy Exchange and Modification of Nitrogen Fluxes in Forest Ecosystems. *Current Forestry Reports* 7, 115–137. <https://doi.org/10.1007/s40725-021-00141-y>

Hussain, Q., Liu, Y., Jin, Z., Zhang, A., Pan, G., Li, L., Crowley, D., Zhang, X., Song, X., Cui, L., 2011. Temporal dynamics of ammonia oxidizer (*amoA*) and denitrifier (*nirK*) communities in the rhizosphere of a rice ecosystem from Tai Lake region, China. *Applied Soil Ecology* 48, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.03.004>

Hynynen, J., Niemistö, P., Viherä-Aarnio, A., Brunner, A., Hein, S., Velling, P., 2010. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth and *Betula pubescens* Ehrh.) in northern Europe, *Forestry: An International Journal of Forest Research.*, 83(1): 103-119.

Hytönen, J., Aro, L., Jylhä, P., 2018. Biomass production and carbon sequestration of dense downy birch stands on cutaway peatlands. *Scandinavian Journal of Forest Research* 33, 764–771. <https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1500636>

Kazmi, F.A., Espenberg, M., Pärn, J., Masta, M., Ranniku, R., Thayamkottu, S., Mander, Ü., 2025. Meltwater of freeze-thaw cycles drives N₂O-governing microbial communities in a drained peatland forest soil. *Biol Fertil Soils* 61, 667–680. <https://doi.org/10.1007/s00374-023-01790-w>

- Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lüscher, S., 2015. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528, 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal, B., 2018. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* 16, 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Laas, E., 1987. *Dendroloogia*. Valgus, Tallinn
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C., Kembel, S.W., 2016. Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* 4, 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0174-1>
- 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>
- Liang, D., Robertson, G.P., 2021. Nitrification is a minor source of nitrous oxide (N₂O) in an agricultural landscape and declines with increasing management intensity. *Glob Chang Biol* 27, 5599–5613. <https://doi.org/10.1111/gcb.15833>
- Long, A., Song, B., Frیدی, K., Silva, A.M.S., 2015. Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (*nirK*) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils. *FEMS microbiology ecology* 91 2, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu004>
- Lutter, R., Tullus, A., Kanal, A., Tullus, T., Vares, A., Tullus, H., 2015. Growth development and plant–soil relations in midterm silver birch (*Betula pendula* Roth) plantations on previous agricultural lands in hemiboreal Estonia. *Eur J Forest Res* 134, 653–667. <https://doi.org/10.1007/s10342-015-0879-x>
- Machacova, K., Schindler, T., Bréchet, L., Mander, Ü., Grams, T.E.E., 2024. Substantial uptake of nitrous oxide (N₂O) by shoots of mature European beech. *Sci Total Environ* 934, 173122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173122>
- Mander, Ü., Krasnova, A., Escuer-Gatius, J., Espenberg, M., Schindler, T., Machacova, K., Pärn, J., Maddison, M., Megonigal, J.P., Pihlatie, M., Kasak, K., Niinemets, Ü., Junninen, H., Soosaar, K., 2021. Forest canopy mitigates soil N₂O emission during hot moments. *npj Clim Atmos Sci* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41612-021-00194-7>

Mander, Ü., Öpik, M., Espenberg, M., 2025. Global peatland greenhouse gas dynamics: state of the art, processes, and perspectives. *New Phytologist* 246, 94–102.

<https://doi.org/10.1111/nph.20436>

Martikainen, P.J., 2022. Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle. *Soil Biology and Biochemistry* 168, 108611.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108611>

Masing, V., Rauk, H. (Eds.), 1992. *Ökoloogialeksikon: loodusteaduslik oskussõnastik*. Eesti Entsüklopeediakirjastus, Tallinn.

Hongxia, M., Shuaijun, Z., Jiwen, L., Jie, S., Kaijia, R., Jiannan, L., Quanrui, C., Yinyin, S., Tingting, S., Jingfeng, F., 2024. Promoting the denitrification process by heavy metals in Liaohe Estuary sediment. *Mar Pollut Bull* 203, 116408.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116408>

Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56, 1729–1739.

<https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>

Pan, Y., Birdsey, R.A., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P.E., Kurz, W.A., Phillips, O.L., Shvidenko, A., Lewis, S.L., Canadell, J.G., Ciais, P., Jackson, R.B., Pacala, S.W., McGuire, A.D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., Hayes, D., 2011. A Large and Persistent Carbon Sink in the World's Forests. *Science* 333, 988–993. <https://doi.org/10.1126/science.1201609>

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

Powledge, T.M., 2004. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 28, 44–50.

<https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>

Priha, O., Grayston, S.J., Pennanen, T., Smolander, A., 1999. Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00647.x>

Machado Nunes Romeiro, J., Eid, T., Antón-Fernández, C., Kangas, A., Trømborg, E., 2022. Natural disturbances risks in European Boreal and Temperate forests and their links to

climate change – A review of modelling approaches. *Forest Ecology and Management* 509, 120071. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120071>

Renou-Wilson, F., Pöllänen, M., Byrne, K.A., Wilson, D., Farrell, E.P., 2010. The potential of birch afforestation as an after-use option for industrial cutaway peatlands.

Rosenvald, K., Ostonen, I., Truu, M., Truu, J., Uri, V., Vares, A., Lõhmus, K., 2011. Fine-root rhizosphere and morphological adaptations to site conditions in interaction with tree mineral nutrition in young silver birch (*Betula pendula* Roth.) stands. *European Journal of Forest Research* 130, 1055–1066. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0492-6>

Shi, X., Wang, L., Sun, J., Lucas-Borja, M.E., Wang, J., 2023. Nitrogen cycling-related functional genes exhibit higher sensibility in soil than leaf phyllosphere of different tree species in the subtropical forests. *Plant Soil* 493, 173–185. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06223-z>

Shibata, H., Branquinho, C., McDowell, W.H., Mitchell, M.J., Monteith, D.T., Tang, J., Arvola, L., Cruz, C., Cusack, D.F., Halada, L., Kopáček, J., Máguas, C., Sajidu, S., Schubert, H., Tokuchi, N., Záhora, J., 2015. Consequence of altered nitrogen cycles in the coupled human and ecological system under changing climate: The need for long-term and site-based research. *AMBIO* 44, 178–193. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0545-4>

Skiba, U.M., Rees, R.M., 2014. Nitrous oxide, climate change and agriculture. *CABI Reviews* 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20149010>

SMI tulemused 2023. (2023) Keskkonnaagentuur. https://keskkonnaportaal.ee/sites/default/files/Teemad/Mets/SMI%20tulemused%202023/SMI2023_tulemused_graafikud.pdf

Stein, L.Y., Klotz, M.G., 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology* 26, R94–R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>

Zumft, W.G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 533–616. <https://doi.org/10.1128/mnbr.61.4.533-616.1997>

Thom, D., Rammer, W., Seidl, R., 2017. The impact of future forest dynamics on climate: interactive effects of changing vegetation and disturbance regimes. *Ecological Monographs* 87, 665–684. <https://doi.org/10.1002/ecm.1272>

Tian, H., Xu, R., Canadell, J.G., Thompson, R.L., Winiwarter, W., Suntharalingam, P., Davidson, E.A., Ciais, P., Jackson, R.B., Janssens-Maenhout, G., Prather, M.J., Regnier, P., Pan, N., Pan, S., Peters, G.P., Shi, H., Tubiello, F.N., Zaehle, S., Zhou, F., Arneeth, A., Battaglia, G., Berthet, S., Bopp, L., Bouwman, A.F., Buitenhuis, E.T., Chang, J., Chipperfield, M.P., Dangal, S.R.S., Dlugokencky, E., Elkins, J.W., Eyre, B.D., Fu, B., Hall, B., Ito, A., Joos, F., Krummel, P.B., Landolfi, A., Laruelle, G.G., Lauerwald, R., Li, W., Lienert, S., Maavara, T., MacLeod, M., Millet, D.B., Olin, S., Patra, P.K., Prinn, R.G., Raymond, P.A., Ruiz, D.J., van der Werf, G.R., Vuichard, N., Wang, J., Weiss, R.F., Wells, K.C., Wilson, C., Yang, J., Yao, Y., 2020. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature* 586, 248–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2780-0>

Tian, H., Pan, N., Thompson, R.L., Canadell, J.G., Suntharalingam, P., Regnier, P., Davidson, E.A., Prather, M., Ciais, P., Muntean, M., Pan, S., Winiwarter, W., Zaehle, S., Zhou, F., Jackson, R.B., Bange, H.W., Berthet, S., Bian, Z., Bianchi, D., Bouwman, A.F., Buitenhuis, E.T., Dutton, G., Hu, M., Ito, A., Jain, A.K., Jeltsch-Thömmes, A., Joos, F., Kou-Giesbrecht, S., Krummel, P.B., Lan, X., Landolfi, A., Lauerwald, R., Li, Y., Lu, C., Maavara, T., Manizza, M., Millet, D.B., Mühle, J., Patra, P.K., Peters, G.P., Qin, X., Raymond, P., Resplandy, L., Rosentreter, J.A., Shi, H., Sun, Q., Tonina, D., Tubiello, F.N., van der Werf, G.R., Vuichard, N., Wang, J., Wells, K.C., Western, L.M., Wilson, C., Yang, J., Yao, Y., You, Y., Zhu, Q., 2024. Global nitrous oxide budget (1980–2020). *Earth System Science Data* 16, 2543–2604. <https://doi.org/10.5194/essd-16-2543-2024>

Unep, F. , 2020. The State of the World’s Forests 2020. FAO and UNEP

Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29, 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>

Walker, T.S., Bais, H., Grotewold, E., Vivanco, J., 2003. Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology 1.

Waring, R.H., Schlesinger, W.H., 1985. *Forest Ecosystems: Concepts and Management*. Academic Press.

Wu, B., Liu, F., Weiser, M., Ning, D., Okie, J., Shen, L., Li, J., Chai, B., Deng, Y., Feng, K., Wu, L., Chen, S., Zhou, J., He, Z., 2018. Temperature determines the diversity and structure of N₂O-reducing microbial assemblages. *Functional Ecology* 32, 1867–1878. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13091>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lauri Eving,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Kase (*Betula pendula*) mikrobioloogiline lämmastikuringe muld-risosfäär-taim-atmosfäär kompleksis“, mille juhendajad on Mikk Espenberg, Mohit Masta ja Fahad Ali Kazmi, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lauri Eving

23.05.2025