

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Magistritöö keskkonnatehnoloogia erialal (30 EAP)

**Lämmastikreostuse eemaldamise geneetiline potentsiaal
vabaveelistes tehismärgalades**

Kadri Kuusk

Juhendajad: Mikk Espenberg, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

allkiri, kuupäev

Tartu 2022

Annotatsioon

Põllumajanduses on viimastel aastakümnetel kasutatud üha rohkem lämmastikväetisi, et hoogustada toiduainete tootmist kasvavale maailma elanikkonnale. Reaktiivse lämmastiku kasutamise märkimisväärne suurenemine on põhjustanud tugevat lämmastikureostust ning hakanud mõjutama inimeste ja ökosüsteemide heaolu. Tehismärgalade kasutamine lämmastikreostuse eemaldamiseks on kuluefektiivne viis, kuidas eemaldada üleliigset väetiste kasutamisest tingitud hajusreostust ning leevendada keskkonnaprobleeme. Käesolevas töös uuriti lämmastikreostuse eemaldamise geneetilist potentsiaali kolme vabaveelise märgala vahel (EST, FRA ja USA). Tulemustest selgus, et denitrifikatsioonil on geneetiliselt suurem potentsiaal toimuda Vända (EST) ja Ohio (USA) tehismärgalas ning Rampilloni (FRA) tehismärgalas on suurem potentsiaal nitrifikatsioonil. Lisaks on Vända märgalal geenikoopiate põhjal suurem potentsiaal edukamaks ANAMMOX-i, COMAMMOX-i ja DNRA protsessi toimimiseks ning N₂ fikseerimiseks võrreldes Rampilloni märgalaga.

Märksõnad: tehismärgala, lämmastikreostus, mikrobioloogia

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

Abstract

In recent decades, more and more nitrogen fertilizers have been used in agriculture to boost food production for the world's growing population. The significant increase in the use of reactive nitrogen has led to severe nitrogen pollution and has begun to affect the well-being of people and ecosystems. The use of constructed wetlands to remove nitrogen pollution is a cost-effective way to remove diffuse pollution from excessive fertilizer use and to alleviate environmental problems. The present study investigated the genetic potential for nitrogen removal between three surface flow wetlands (EST, FRA & USA). The results showed that denitrification has a greater genetic potential to occur in the Vända (EST) and Ohio (USA) constructed wetlands and that the Rampillon (FRA) constructed wetland has a higher potential for nitrification. In addition, the Vända wetland has a greater potential for more successful ANAMMOX, COMAMMOX and DNRA processes and N₂ fixation compared to the Rampillon wetland.

Keywords: constructed wetland, nitrogen pollution, microbiology

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

Sisukord

1. Sissejuhatus	6
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1 Looduslähedased lahendused	8
2.1.1 Tehismärgalad	9
2.2 Lämmastik keskkonnas	10
2.2.1 Lämmastikreostus	10
1.2.2 Lämmastikuringe protsessid	11
3. Metoodika	16
3.1 Prooviala ja proovivõtu kirjeldus	16
3.2 DNA eraldamine	17
3.3 Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaja PCR meetodil	17
3.4. Reaalaja PCR andmete analüüs ja geenikoopiate arvutamine	20
3.6 Vabaveelised tehismärgalad geenikoopiate uuringute kontekstis.....	20
3.6 Statistiline analüüs ja autori osalus	21
3. Tulemused.....	22
3.1 Lämmastikuringe protsesside võrdlus vabaveelistes tehismärgalades	22
3.2 Bakterite ja arhede üldarvukused.....	23
3.3 Denitrifikatsiooni geenide üldarvukused (<i>nirK</i> , <i>nirS</i> , <i>nosZI</i> , <i>nosZII</i>).....	25
3.4 Nitrifikatsiooni geenide üldarvukused (bakterite & arhede <i>amoA</i> , COMAMMOX)	27
3.5 DNRA, ANAMMOX, N ₂ fikseerimine (<i>nrfA</i> , ANAMMOX, <i>nifH</i>)	28
3.6 Geenikoopiate omavahelised suhted.....	29
4. Arutelu	32
5. Kokkuvõte.....	35
Summary.....	37

Tänuavaldused	39
Kasutatud kirjandus	40

1. Sissejuhatus

Lämmastik on Maa atmosfääri põhikomponent (Seinfeld & Pandis, 2016), kuid looduses leidub reaktiivses vormis lämmastikku vaid piiratud koguses. Inimene on viimastel sajanditel aina rohkem sekkunud looduslikku lämmastikuringesse, kasutades keemiliselt sünteesitud anorgaanilisi väetisi, kasvatades massiliselt lämmastikku siduvaid taimeliike ning põletades fossiilkütuseid ja biomassi, suurendades seeläbi elustikule kättesaadava lämmastiku hulka. Kuigi antropogeenne lämmastik on toonud palju kasu, nagu näiteks toidu koguse ja kvaliteedi paranemine, on reaktiivse lämmastiku kadu punkt- ja hajusallikatest atmosfääri, pedosfääri ja veekeskonda hakanud põhjustanud keskkonna- ja terviseprobleeme. (Gruber & Galloway, 2008)

Suur osa atmosfääri ja maismaa ökosüsteemidesse paisatud inimtekkelisest lämmastikust jõuab ojadesse, jõgedesse ja järvedesse ning jõuab lõpuks jõesuudmetesse ja ookeanidesse (Hey *et al.*, 2012), kus see koos teiste toitainetega põhjustab vetikate õitsemist ning seetõttu väheneb vee kvaliteet, kaovad elupaigad ja loodusvarad ning ilmneb hüpoksia (Erisman *et al.*, 2013). Veeökosüsteemide kaitsmiseks liigsete lämmastikuühendite eest kasutatakse tehismärgasid, mida peetakse tõhusateks ja piisavalt odavateks lahendusteks toitainete kontsentratsiooni vähendamiseks saastunud vetes rakendades füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi protsesse. Lisaks võimele puhastada erinevat tüüpi punktallikatest pärinevat reovett on tehismärgalad tõhusad süsteemid ka hajusreostuse vastu, kuna neid saab kasutada toitainete kontsentratsiooni vähendamiseks juba ülesvoolu veekogudes ja seega kaitsta suuremaid jõgesid, järvi ja ookeane lämmastiku ülekoormuse negatiivsete tagajärgede eest (Vymazal, 2011). Lisaks toitainete eemaldamisele on jõgede ümbersuunamisel märgaladele mitmeid eeliseid. Sinna hulka kuuluvad elupaikade taastamine, üleujutuste mõju leevendamine, põllumajandusliku toodangu kaitsmine ning rahvatervise ja kohaliku vee kvaliteedi tõstmine (Mitsch & Day, 2006).

Mikroobikooslustel on tehismärgala biogeokeemilistes protsessides võtmeroll ning seetõttu on oluline mõista, kuidas mikroobikoosluste koostis ja mitmekesisus on seotud tehismärgalade keskkonnaparameetritega, et kasutada neid teadmisi tehismärgalade projekteerimisel ja käitamisel. Lämmastikuringe tehismärgalades on äärmiselt keeruline, hõlmates paljusid erinevaid biogeokeemilisi protsesse. Tehismärgalades tuleks luua soodsad tingimused maksimaalse lämmastiku eemaldamise ja minimaalse kasvuhoonegaasi dilämmastikoksiidi (N₂O) emissiooniga protsessideks. N₂O-l on 298 korda suurem globaalset soojenemist põhjustav potentsiaal kui süsinikdioksiidil ja eeldatakse, et sellel on tulevikus valdav mõju

osoonikihi hävimisele 27.05.22 14:41:00; Ravishankara *et al.*, 2009). Mitmed bioloogilised protsessid on N₂O emissiooni allikad (nitrifikatsioon, mittetäielik denitrifikatsioon, nitraadi ammonifikatsioon), aga on teada kaks peamist mikroobide poolt vahendatud rada, mis eemaldavad lämmastikku tehismärgaladest tekitades molekulaarset lämmastikku (N₂) ilma N₂O-d tekitamata: denitrifikatsiooni viimane etapp ja anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon (ANAMMOX) (Thamdrup, 2012).

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on hinnata ja võrrelda lämmastikuringe protsesside geneetilist potentsiaali vabaveelistes tehismärgalades üleliigse lämmastiku eemaldamiseks.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Looduslähedased lahendused

Looduspõhised lahendused on hiljuti kasutusele võetud katustermin, mis on seotud looduse kasutamisega mitmesuguste ülemaailmsete keskkonna- ja sotsiaalsete probleemide lahendamisel, nagu näiteks kliimamuutused ja veesüsteemide saastamine (Thorslund *et al.*, 2017). Looduspõhised lahendused pakuvad samaaegset kasu nii ühiskonnale, majandusele kui ka loodusele ning seda terminit mõistetakse valdkondade üleselt, mis hõlmab kogemusi olemasolevatest mõistetest nagu siniroheline infrastruktuur inseneriteaduses, looduskapital ja ökosüsteemiteenused majanduses ning maastikufunktsioonid keskkonnaplaneerimises (Albert *et al.*, 2017). Seega pole idee ära kasutada looduse omadusi jätkusuutlikkuse nimel uus ja seda on ajalooliselt rakendatud ka eelnevalt nimetatud kontseptsioonide kaudu (Xie *et al.*, 2022). Looduspõhiseid lahendusi võetakse kasutusele järk-järgult, et selguks nende kasulikud ja võimalikud kahjulikud mõjud ning samuti otsitakse pidevalt võimalusi, et kuidas parendada olemasolevaid lahendusi (Albert *et al.*, 2017).

Globaalselt on kasvanud huvi looduspõhiste lahenduste vastu ja peamiselt on see seotud kliimakriisi süvenemisega (IPCC, 2021). Kuigi looduspõhiste lahenduste eeliste kohta on tehtud rohkelt uuringuid (Kabisch *et al.*, 2017), siis on jäänud nende kasutuselevõtt ja rakendamine linnades marginaalseks erinevate barjääride, sh tehniliste, kultuuriliste ja institutsionaalsete probleemide tõttu (Sarabi *et al.*, 2020). Looduspõhiste lahenduste kasutuselevõttu proovitakse parandada näidates nende positiivset mõju (Bush & Doyon, 2019; Faivre *et al.*, 2017) kliimamuutuste (Frantzeskaki, 2019; Kabisch *et al.*, 2017) ja bioloogilise mitmekesisuse küsimustes (Cohen-Shacham *et al.*, 2019). Hoolimata sellest, et looduspõhiste lahenduste vajadus on laialdaselt tunnustatud, on endiselt küsimusi selle kohta, mida see tähendab ja kuidas seda saavutada lahendamaks linnade jätkusuutlikkuse probleeme (Choi *et al.*, 2021). Looduslähedased lahendused on määratud ökosüsteemide looduslike funktsioonide poolt (Scow & Hicks, 2005).

Üleujutused on ülemaailmselt kõige sagedamini esinev loodusohut ning üleujutustest põhjustatud kahjud kasvavad eeldatavasti koos tulevaste kliima ja maakasutuse muutustega (CRED, 2015). Looduslikud ökosüsteemid võivad mängida olulist rolli üleujutusohu vähendamisel või vastupidi, suurendada üleujutusohu, kui nende looduslik tasakaal on häiritud (EEA, 2017; Marchal *et al.*, 2019; van Wesenbeeck *et al.*, 2017; WWF, 2017). Loodusliku infrastruktuuri, nt metsad, pargid või kaldataimestik, kaasamine üleujutusrisiki maandamise kavadesse on endiselt erandlik: üleujutuste leevendamise meetmed on kallutatud

traditsioonilise infrastruktuuri (nn hall infrastruktuur) poole, mille kaitsevõime on kergesti mõõdetav (kuigi võib-olla mitte vähem ebakindel). Selline olukord kujutab endast kasutamata võimalust, kuna hall infrastruktuur on kulukas, energiamahukas ega paku kaashüvesid, mida pakuvad looduslikule infrastruktuurile tuginevad looduspõhised lahendused (nt süsiniku sidumine, bioloogilise mitmekesisuse kaitse ja puhkevõimalused) (Browder *et al.*, 2019). Lisaks takistavad ebapiisavad teadmised loodusliku infrastruktuuri kohta üleujutusohu maandamiseks ökoloogilise kaitsega seotud jõupingutusi, mis põhinevad ökosüsteemi teenuste hindamisel (WWF, 2017). Sellised jõupingutused toovad esile looduslike ökosüsteemide kaitsmise või taastamise eelised, kvantifitseerides looduspõhiste lahenduste, sh üleujutusohu maandamise mitmekülgset kasu. (Browder *et al.*, 2019).

2.1.1 Tehismärgalad

Tehismärgalad on reoveepuhastuse alternatiivina kasutatud arenenud maailmas juba üle neljakümne aasta (Vymazal, 2011). Tehismärgalad sarnanevad looduslikele märgaladele ning on tõhusad alternatiivid tavapärastele reoveepuhastitele, kuna vajavad vähem energiat võrreldes konventsionaalsete puhastitega (Lee *et al.*, 2009). Neid kasutakse kui võimalike alternatiividena lämmastiku eemaldamiseks põllumajanduslikust reoveest ja tööstus- või olmereoveest ning neid on kasutatud sekundaarse või tertsiaarse töötlusena vee taaskasutuse edendamiseks (Reed, 1995). Tehismärgalad liigitatakse peamiselt maa-aluse vooluga ja avaveelisteks märgaladeks, mis erinevad üksteisest vaba veevoolu olemasolust üle settepinna. Veepuhastus tehismärgalades hõlmab protsesse, mis sõltuvad settest, taimestikust ja sellega seotud mikroobikooslustest (US EPA, 2015). Täheldatud on, et tärkavate makrofüütidega istutatud alad mõjutavad positiivselt märgala veehoiuvõimet (Ibekwe *et al.*, 2007). See on tingitud mikroobide kasvu stimuleerimisest juurepinnal, mõjutades hapnikutingimusi ja luues oksiliste ja anoksiliste tsoonidega mikrokeskkondi (Bachand & Horne, 1999; Zhu & Sikora, 1995) või orgaaniliste ühendite eritumisega juurtest (Nguyen, 2009). Samuti põhjustab see muutusi hüdraulilises viibeajas (Kjellin *et al.*, 2007). Kõik need protsessid mõjutavad lämmastiku eemaldamist tehismärgalades, kuna need mõjutavad mikroobe (nt nitrifitseerijaid ja denitrifitseerijaid), mis vastutavad lämmastiku eemaldamise eest (Bachand & Horne, 1999; Zhu & Sikora, 1995).

2.2 Lämmastik keskkonnas

Maa atmosfäär koosneb peamiselt 3 gaasist: N₂ (78%), O₂ (21%) ja Ar (1%) ja sisaldab väiksemates kogustes teisi gaase ja gaasilisi ühendeid. Elanikkonna plahvatuslik kasv sai võimalikuks tööstusliku Haber-Boschi protsessi tõttu, mille käigus toodetakse õhulämmastikust ammoniaaki, mida kasutatakse peamiselt väetisena põllumajanduses. Tänaasel päeval fikseeritakse rohkem õhulämmastikku sünteetiliselt Haber-Boschi protsessi abil kui loodulikult maismaa ökosüsteemide kaudu. (Seinfeld & Pandis, 2016)

2.2.1 Lämmastikreostus

Põllumajanduses on viimastel aastakümnetel kasutatud üha rohkem lämmastikväetisi, et hoogustada toiduainete tootmist kasvavale maailma elanikkonnale. Reaktiivse lämmastiku kasutamise märkimisväärne suurenemine on põhjustanud tugevat lämmastikreostust ning hakanud mõjutama inimeste ja ökosüsteemide heaolu (Steffen *et al.*, 2015). Lämmastik on oluline eelkäija õhusaastele (nt peenosakesed, maapinnalähedane osoon), veereostusele (vetikate õitsemise, nitraadisaaste), bioloogilise mitmekesisuse vähenemisele (lämmastiku ladestumine ja eutrofeerumine), pinnase hapestumisele (ammooniumväetiste kasutamine) ja globaalsele soojenemisele (N₂O) (Erisman *et al.*, 2013). Põllumajandusest põhjustatud lämmastikreostuse ühiskondlikud kulud Euroopa Liidus on hinnanguliselt 35–230 miljardit eurot aastas ja see kulu näib olevat suurem kui põllumajandusettevõtete kasum lämmastikväetiste kasutamisest, mis on 20–80 miljardit eurot aastas (Van Grinsven *et al.*, 2013). Lämmastikreostuse vähendamiseks tuleb kasutusele võtta sotsiaalmajanduslikud kompromissid põllumeeste ja ühiskonna vahel (Gu *et al.*, 2021).

Erinevalt tööstusest ja inimasustustest lähtuvast punktreostusest on põllumajandusest tulenev lämmastikreostus sageli hajus, kuna see tuleneb paljudest eraldiseisvatest põllumajandusettevõtetest, sh nii taimikasvatusest kui ka loomakasvatusest. Põllumajandusliku lämmastikreostuse vähendamise peamised takistused on:

- (1) biofüüsikalised (põllumajandusreostuse raskusaste; varieeruv kliima; pinnas, põlluharimisviiside ja -tavade erinevused);
- (2) majanduslikud (põllumajandustootjatel, nii madala kui ka kõrge sissetulekuga riikides, napib sageli rahalisi vahendeid, stiimuleid ja teadmisi lämmastikreostuse vähendamiseks)
- (3) poliitiline (valitsused ei soovi kehtestada põllumajandusele eeskirju või piiranguid, kuna see on kohaliku ja riikliku toiduga kindlustatuse jaoks hädavajalik ning pakub sissetulekut ja

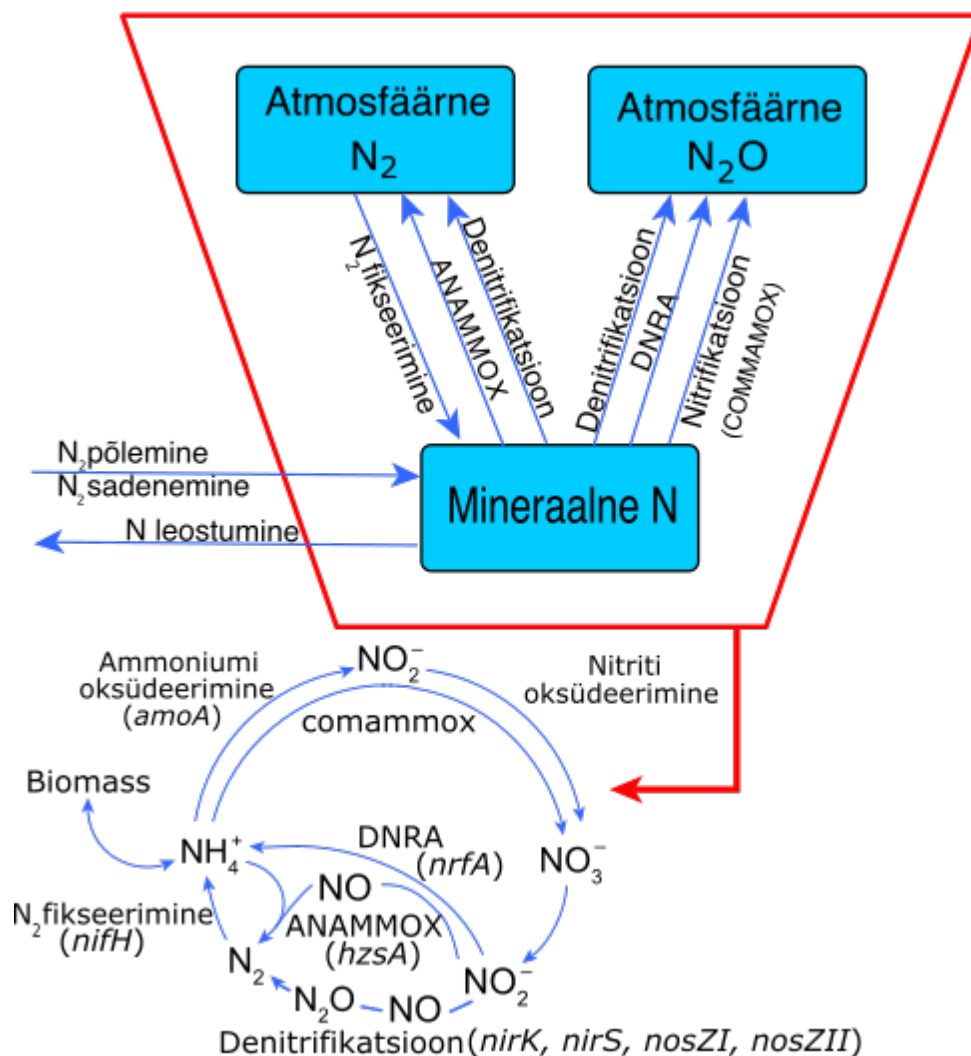
elatist paljudele kogukondadele ja ühiskonnale üldiselt). Seetõttu eelistavad valitsused üldiselt pigem toidu- ja rahalist kindlustatust kui lämmastikureostuse leevendamist. (Wu *et al.*, 2018)

Vastumeelsuse või suutmatuse tõttu hallata lämmastikureostuse allikaid, peavad valitsused investeerima märkimisväärseid riiklikke ressursse lämmastikureostuse leevendamiseks (Gu *et al.*, 2021).

Inimtegevuse kaudu maismaa ökosüsteemidesse sattunud liigne lämmastik halvendab veekvaliteeti piirkondlikus mastaabis. Linnapiirkondi ja asulaid, kus elab üle poole maailma elanikkonnast, piirkondliku veereostuse analüüsis tavaliselt ei arvestata. Uuring Hiina linnas Hangzhous leidis, et ammoniumlämmastiku kontsentratsioonid linnajõgedes olid 3–5 korda suuremad kui piirkondlikes jõgedes ning linnajõed on muutunud reaktiivse lämmastiku basseinideks ja piirkondliku reostuse levialadeks. Samuti ei mööda jõgede reostust praegused pinnavee seirevõrgud, mis on loodud laiemate piirkondlike mustrite jälgimiseks, mille tõttu alahinnatakse piirkondliku reostust. See on linnakeskkonna jaoks ülioluline mitte ainult Hiinas, vaid ka teistes riikides, kus linnajõed on tõsiselt saastatud. (Zhang *et al.*, 2015)

1.2.2 Lämmastikuringe protsessid

Lämmastikuringel on biogeokeemilises tsüklis suur tähtsus ja sõltub suuresti mikroobide juhitud lämmastiku transformatsioonist (Shen *et al.*, 2022). Protsessid, mis mõjutavad lämmastiku eemaldamist märgaladel, on mitmesuguseid ja hõlmavad nitrifikatsiooni, denitrifikatsiooni, lämmastiku fikseerimist, ammonifikatsiooni, nitraatide redutseerimist ammoniumiks (nitraadiammonifikatsioon – DNRA) ja anaeroobset ammoniaagi oksüdatsiooni (ANAMMOX) (Vymazal, 2007) (Joonis 1). Tehismärgalades leidub lämmastik peamiselt nitraadi (NO_3^-), nitriti (NO_2^-) ja ammoniumiooni (NH_4^+) vormis ning kuna mikroobid ja taimed on võimelised neid kergesti omastama, mõjutavad nad suuresti veekeskkonda (Lee *et al.*, 2009). Lisaks leidub lämmastikku ka dilämmastikoksiidi (N_2O), molekulaarse lämmastiku (N_2) ja lämmastikku sisaldavate orgaaniliste ainete kujul (Kadlec & Wallace, 2008).



Joonis 1. Lämmastikuringeprotsessid (kohandatud ja modifitseeritud Espenberg 2017 järgi)
 Jooned näitavad mikroobide poolt läbiviidavaid lämmastikuringe protsesse, mille juures on välja toodud vastava protsessi markergeen. Lühendid: DNRA – nitraadi dissimileeriv redutseerimine ammoniumiks; COMAMMOX – täielik ammoniaagi oksüdeerimine; ANAMMOX – anaeroobne ammoniumi oksüdatsioon

1.2.2.1 Lämmastiku ärastamine

Nitrifikatsiooni esimene etapp on ammoniaagi oksüdatsioon (Joonis 1). Seda etappi katalüüsib ensüüm, mida kutsutakse ammoniaagi monoooksügenaasiks ja mida kodeerib muuhulgas ammoniaagi monoooksügenaasi subühik A (*amoA*). Protsessi läbiviijateks peetakse üldiselt

kahte peamist mikroobirühma: ammoniaaki oksüdeerivad bakterid ja ammoniaaki oksüdeerivad arhed, mis eksisteerivad koos muldades (Pester *et al.*, 2011). On leitud, et ammoniaaki oksüdeerivad bakterid, nagu näiteks *Nitrosomonas* ja *Nitrospira*, on happelistes muldades passiivsed (Li *et al.*, 2018) ja nad domineerivad neutraalses ja aluselises keskkonnas (Meinhardt *et al.*, 2018). Samas vastutavad ammoniaaki oksüdeerivad arhed ammoniaagi oksüdatsiooni eest madala pH keskkonnas (Li *et al.*, 2018).

Lisaks näitavad hiljutised tõendid, et *Nitrospira* perekonna täielik ammoniaagi oksüdeerija (COMMAMOX) on oluline ka põllumajandusmuldade nitrifikatsioonis (Li *et al.*, 2019), mis on võimelised oksüdeerima ammoniaagi (NH₃) nitraadiks (NO₃⁻) ühes organismis (Joonis 1). Senini on varasemad uuringud näidanud, et COMMAMOX organismid levivad peamiselt ammoniaaki piiravate tingimustega keskkonnas. (Daims *et al.*, 2015)

Denitrifikatsioon on nitraadi või nitriti anoksiline redutseerimine gaasiliseks dilämmastikoksiidiks või gaasiliseks lämmastikuks (Joonis 1). Üldiselt on denitrifikatsioon lämmastiku fikseerimise pöördreaktsioon selles mõttes, et see kannab fikseeritud lämmastiku tagasi atmosfääri ja seda peetakse tehismärgalades lämmastiku eemaldamise peamiseks mehhanismiks (Saeed & Sun, 2012; Shoun *et al.*, 2012). Denitrifikatsioon on oluline mikroobne protsess lämmastiku tasakaalu säilitamiseks ökosüsteemides. Üks kriitilisi reaktsioone denitrifikatsiooni protsessis on NO₂⁻- redutseerimine NO-ks, kuna see on esimene samm lahustunud lämmastiku muundamisel gaasiliseks lämmastikuks. Seda reaktsiooni katalüüsivad Cu- (kodeerib geen *nirK*) ja cd1-tüüpi (kodeerib geen *nirS*) nitriti reduktaasid. Mõlemal on sama funktsioon, kuid nende vahe ilmneb erinevates struktuurides. (Maul *et al.*, 2019)

Kuna *nirS* ja *nirK* geenid sisalduvad ainult denitrifitseerivates prokarüootides, kasutatakse neid kahte geeni keskkonna molekulaarsete markeritena uuringutes, mis hindavad denitrifitseerivate mikroorganismide ökoloogilist käitumist (Yoshida *et al.*, 2009). Arvatavasti on enamikul denitrifitseerijatel täielik denitrifikatsioonirada, mis sisaldab ka dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivat geeni (*nosZ*), mis katalüüsib viimast etappi, N₂O redutseerimist N₂-ks. Hiljutine *nosZ* geeni fülogeneetiline analüüs näitas kahte erinevat klaadi, mis erinevad peamiselt dilämmastikoksiidi reduktaasi translokatsiooniraja poolest läbi membraani ja olid peaaegu võrdselt esindatud vabaveepuhastus märgaladel ja soomuldadel (Jones *et al.*, 2013), kuid ligikaudu kolmandikul denitrifitseerivatest bakteritest puudub see geen ja protsess lõpeb NO redutseerimisega kasvuhoonegaasiks N₂O, mis aitab kaasa kliimamuutustele ja toimib

stratosfääri osoonikihi hävitamise katalüsaatorina (Jones *et al.*, 2008; Ravishankara *et al.*, 2009).

DNRA ehk nitraadi dissimileeriv redutseerimine ammooniumiks on üks viis, kuidas siduda lämmastikku ökosüsteemi ja muuta lämmastik taimestikule ja mikroorganismidele kättesaadavaks, kui DNRA käigus muundatakse nitraatioon NO_3^- ammooniumiooniks NH_4^+ , kuigi teatavatel tingimustel võib vaheproduktiks olla ka N_2O (Joonis 1). Antud protsessi eest vastutab geen *nrfA*, mis osaleb pentaheemi nitriti reduktaasi kodeerimises, mis katalüüsib nitriti ammonifikatsiooni etappi DNRA protsessis. (Cannon *et al.*, 2019)

Denitrifikatsioon ja DNRA on konkureerivad protsessid ja seetõttu on oluline hinnata nende funktsionaalset biogeokeemilist rolli (Upreti *et al.*, 2022).

Autotroofidel põhineval anaeroobsel ammooniumi oksüdatsioonil (ANAMMOX) on ainulaadne lämmastiku eemaldamise rada ammooniumi oksüdeerimiseks nitriti kui elektronaktseptori abil anaeroobsetes tingimustes (Choi *et al.*, 2018) (Joonis 1). ANAMMOX-i protsess aitab oluliselt kaasa globaalsele lämmastikuringele (kuni 50% lämmastiku eemaldamine toimub ookeanidest) (Kuypers *et al.*, 2006) ja hõlbustab kogulämmastiku eemaldamist märgalade ökosüsteemidest 20% ulatuses (Gao *et al.*, 2018) ja 33% ulatuses N_2 kadu tehismärgaladel (Zhu *et al.*, 2011). Oma majanduslike ja keskkonnasõbralike eeliste tõttu on anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon kaasa toonud suuri muutusi lämmastiku eemaldamisel reoveest (Kartal *et al.*, 2010). ANAMMOX-i rakendamisel võib väheneda 60% vajaminev hapniku hulk ja 100% süsiniku hulk võrreldes tavapärase bioloogilise lämmastiku eemaldamise tehnoloogiaga (Ma *et al.*, 2016).

1.2.2.2 Lämmastiku sidumine

Kui bioloogiline lämmastiku sidumine maismaaökosüsteemides toimub peamiselt sümbiootiliste prokarüootide poolt koos taimejuurtega, siis vabalt elavad diasotroofid annavad märkimisväärse panuse ka mulla lämmastiku sisenditesse, andes kuni $60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ (Vitousek *et al.*, 2013) (Joonis 1). Vabalt elavate diasotroofide lämmastiku fikseerimisvõime varieerub sõltuvalt mullatingimustest, sh lämmastiku, süsiniku ja hapniku kättesaadavusest, ning seega saab neid kasutada bioindikaatoritena mullas leiduva lämmastiku hindamiseks (Bürgmann *et al.*, 2004). Diasotroofid on väga mitmekesised ning levinud bakterite ja arhede hulgas (Izquierdo & Klaus Nüsslein, 2015). *NifH* geen, mis osaleb ka lämmastiku reduktaasi subühiku kodeerimises, on hästi säilinud kõigis nitrogeenaasi tüüpides ja seda kasutatakse sageli

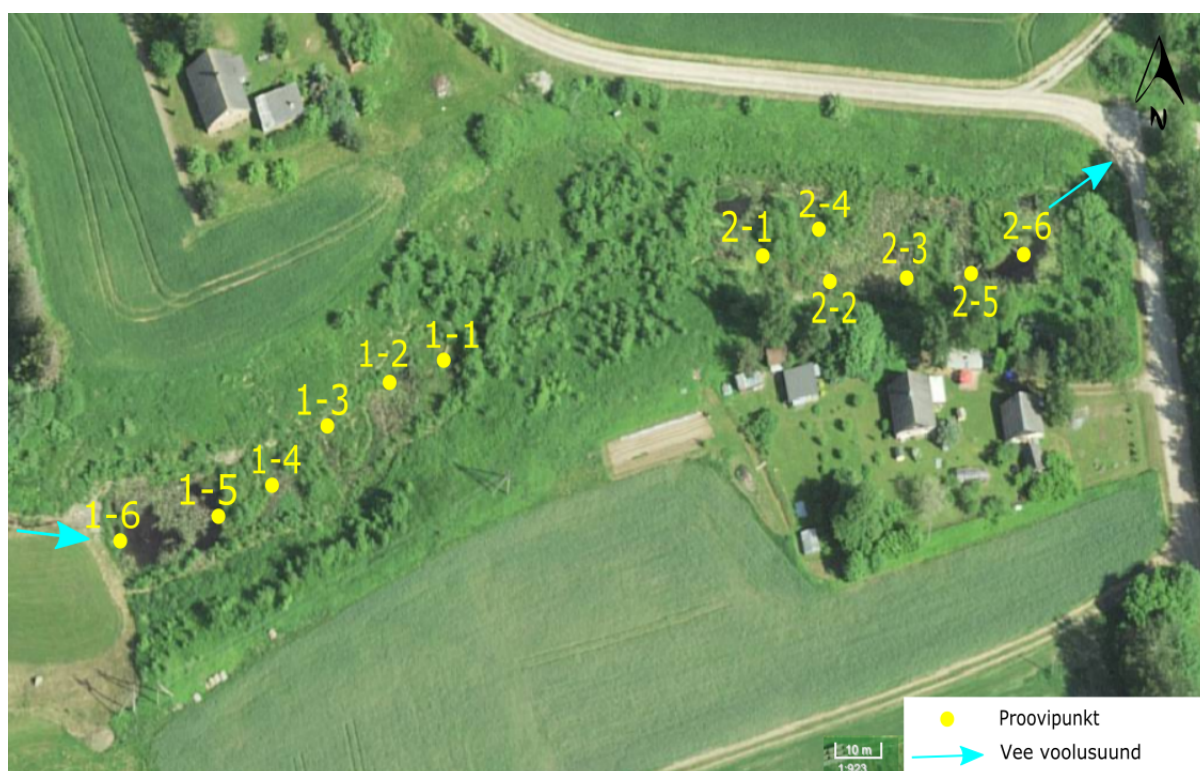
molekulaarse markerina, et analüüsida diasotroofide arvukust, mitmekesisust ja fülogeneesi pinnases (Han *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). Diasotroofse mulla lämmastiku fikseerimisvõimet, mis on bioloogilise lämmastiku sidumise aktiivsuse kaudne indikaator ja üldisemalt lämmastikustaatus muldades, saab seetõttu määrata *nifH* geenianalüüsiga (Bürgmann *et al.*, 2004).

3. Metoodika

3.1 Prooviaala ja proovivõtu kirjeldus

Käesolevas töös uuritud Vända avaveeline tehismärgala asub Tartumaal Uhti külas. Märgala ehitusega seotud tööde ja protseduuriliste küsimustega alustati Eestimaa Looduse fondi (ELF) ja Maailma Looduse fondi (WWF) eestvedamisel 2014. aastal ning lõpetati 2015. aastal (Eestimaa Looduse Fond, 2022). Tehismärgala eesmärk on vähendada põllumajandusest tingitud hajusreostust, mis tekib lähedalasuvate põldude harimisest. Ligikaudu 62% Vända alamvalgalast on pidevalt haritav põllumaa, 32% on looduslikud alad ning 8% aladest on muu kasutusega (Kill, 2018). Antud piirkonnas on põllumajandusel suur osakaal ning sealseid pinnaveekogud ja põhjavesi on aastakümneid olnud mõjutatud toitainete ärakandest ümbritsevatelt põldudelt.

Vända märgala koosneb settetiigist (1800 m²) ja kahest madalaveelisest märgalast (2x2200 m²) (Eestimaa Looduse Fond, 2022). Märgala (geoloogilisest) asukohast tingituna on kaldad ja nõlvad uhtumisohu minimeerimiseks kindlustatud geotekstiili ja maakividega. Orgaanikarikka settekihi all asuvad punased ja hallid savikihid, mistõttu on pinnas hästi vettpidav. Taimedest istutati hundinuia ja pilliroogu.



Joonis 2. Proovipunktid Vända tehismärgalal. Aluskaart: Maa-ameti ortofoto, juuni 2021.

Vända tehismärgalalt koguti 12 setteproovi mikrobioloogilisteks uuringuteks 16.06.2021 ja 01.09.2021. Juunis ehitati ka kahe alammärgala vahele tamm, mis pärssis alumise märgala veetaset ja see võimaldas uurida kuiva perioodi mõju geenide arvukusele. Kokku võeti 24 setteproovi. Proove võeti märgala mõlemast osast (joonis 2). Igas proovipunktis koguti eraldi kilekottidesse kolmest kordusest komposiitproov, mida oli ca 10 g. Võetud proovid pandi külmakehadega termokasti ja transporditi esimesel võimalusel sügavkülmikusse $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juurde.

3.2 DNA eraldamine

Pärast välitöid tehti laboritöö, kus eraldati DNA mikrobioloogilisteks uuringuteks setteproovidest komplekti PowerSoil® DNA Isolation Kit abil (Qiagen, USA). DNA eraldati 0,25 g proovidest ning proovid homogeniseeriti 5000 pööret minutis 20 s jooksul homogenisaatoril Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). DNA kontsentratsiooni suurendamiseks lisati 60 μl C6 lahust filtrile ning tsentrifugiti 30 sekundit 10 000 x g juures. Järgmiseks kanti filtrit läbinud lahus uuesti filtrile ning tsentrifugiti uuesti 30 s 10 000 x g juures. Viimase etapina lisati 40 μl C6 lahust filtrile ning tsentrifugiti taas 30 s. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja kvaliteedi hindamiseks kasutati spektrofotomeetrit Infinite 200 M (Tecan AG, Austria). Eraldatud DNA hoiti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures sügavkülmikus edasiste analüüside jaoks.

3.3 Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaaja PCR meetodil

Geenikoopiate arvukus määrati reaalaaja PCR (qPCR) meetodil. Märklaudgeenideks olid bakterite 16S rRNA ja arhede 16S rRNA, millega saab teada bakterite ja arhede üldarvukust. Funktsionaalsetest geenidest määrati denitrifikatsiooni kodeerivad geenid (*nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII*) ja nitrifikatsiooni kodeerivad geenid (bakterite *amoA*, COMMAMOX *amoA* ja arhede *amoA*). Lisaks määrati veel ka geenide arvukused protsessidest anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon (ANAMMOX 16S rRNA), dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (DNRA, *nrfA*) ja ka lämmastiku fikseerimine (*nifH*). Kõikide qPCR-i reaktsioonide läbi viimiseks kasutati termotsüklerit Rotor-Gene Q (Qiagen, USA).

Proovimaht oli 10 µl, mis sisaldas:

- 1) 1 µl varem eraldatud DNA-d;
- 2) 0,3 kuni 0,6 µl päri- ja vastassuunalist praimerit (iga praimeri täpsed kogused on välja toodud tabelis 1);
- 3) 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., USA);
- 4) destilleeritud vett vastavalt ülejäänud kogusele.

Kõiki proove amplifitseeriti kolmes korduses. Saastumise puudumist kontrolliti negatiivsete kontrollproovidega, millesse DNA-d ei lisatud. Geenispetsiifilised praimerid ning optimeeritud praimerite kontsentratsioonid ja qPCR programmid on kirjeldatud tabelis 1.

Tabel 1. Ülevaade töös kasutatud qPCR-i primeritest ja nende karakteristikutest ning programmidest.

Märklaugeen	Praimer	Praimeri kontsentratsioon (μM)	Amplikoni pikkus (bp)	qPCR programm	Viide
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	0,6	530	95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
	Bact1028R				(Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008)
Arhede 16S rRNA	Arc519F	0,6	393	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30 s	(Espenberg <i>et al.</i> , 2016)
	Arc910R				
<i>nirS</i>	<i>nirSCd3af</i>	0,8	431	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s; 80°C 30	(Kandeler <i>et al.</i> , 2006)
	<i>nirSC3cd</i>				
<i>nirK</i>	<i>nirK876</i>	0,8	165	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 58°C 30 s; 72°C 30 s; 80°C 30	(Hallin & Lindgren, 1999)
	<i>nirK1040</i>				
<i>nosZI</i>	<i>nosZ2F</i>	0,8	267	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 60°C 30 s; 72°C 30 s; 80°C 30	(Henry S. <i>et al.</i> , 2006)
	<i>nosZ2R</i>				
<i>nosZII</i>	<i>nosZIIF</i>	0,8	~700	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 54°C 45 s; 72°C 45 s; 80°C 45	(Jones <i>et al.</i> , 2013)
	<i>nosZIIR</i>				
Bakterite <i>amoA</i>	<i>amoA-1F</i>	0,8	491	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 57°C 45 s; 72°C 45 s	(Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997)
	<i>amoA-2R</i>				
Arhede <i>amoA</i>	<i>CrenamoA 23F</i>	0,8	~600	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 54°C 45 s; 72°C 45 s	(Tourna <i>et al.</i> , 2008)
	<i>CrenamoA 616R</i>				
COMAMMOX <i>amoA</i>	<i>comamoA AF</i>	0,8	436	95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
	<i>comamoA SR</i>				
ANAMMOX 16S rRNA	A438F	0,6	248	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 52°C 30 s; 72°C 30 s	(Humbert <i>et al.</i> , 2012)
	A684R				
<i>nrfA</i>	6F	0,8	222	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s	(Takeuchi, 2006)
	6R				
<i>nifH</i>	Ueda19F	0,8	390	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s; 53°C 45 s; 72°C 45 s	(Ueda <i>et al.</i> , 1995)
	Ueda407R				

3.4. Reaalaja PCR andmete analüüs ja geenikoopiate arvutamine

Reaalaja PCR andmete analüüsiks kasutati tarkvaraprogrammi Rotor-Gene Q Series Software (versioon 2.0.2) (Qiagen, USA). Esmane andmeanalüüs tehti iga proovi kolme paralleeli amplifikatsioonikõverate ühtsuse ning sulamiskõverate paiknemise ja kuju põhjal. Selleks, et hinnata iga proovi geenifragmentide individuaalse amplifikatsiooniefektiivsust, kasutati programmi LinRegPCR (versioon 2021.2) (Ruijter *et al.*, 2009). Proovid jagati neljaks amplikoniks märgala ruumilise liigenduse põhjal, et analüüsida erinevate setteproovide amplifikatsiooniefektiivsuseid eraldi gruppides. Iga geeni geenikoopiate arvukuse arvutamiseks kasutati vastavate kaliiberkõverate vahemikke, mis ühtisid proovide amplifikatsioonikõveratega ning kus oli proovi paralleelide koopiaarvude standardhälbe väärtus väikseim.

Rakendades Ruijter *et al.*, 2009 valemit, kus arvutati proovi märklaudgeeni kontsentratsiooni (A) ja vastava standardi erinevate punktide kontsentratsioonide (B) vaheline kordusaste:

Kordusaste = $N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_A^{Ct,A}) / (N_{t,B} / E_B^{Ct,B})$, kus, $N_{0,A}$ on märklaudgeeni A algkontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes, $N_{0,B}$ on märklaudgeeni kontsentratsioon standardlahjenduses fluorestsentsühikutes, N_t on fluorestsentsi läviväärtus, E on amplikoni keskmine amplifikatsiooni efektiivsus, C_t on fluorestsentsi läviväärtuseni jõudmiseks vajalike tsüklite arv.

Korrutades iga proovi kordusastme väärtust vastava standardilahjenduse geenikoopiate arvuga, leiti geenikoopiate arvukused ja lõplik geenikoopiate arvukus igas proovis saadi kasutades standardi erinevate punktide alusel arvutatud koopiaarvude aritmeetilist keskmist. Geenikoopiate arvukus on esitatud geenide koopiaarvudena ühe grammi sette kuivaaine kohta (GK/g KA). Lisaks arvutati prokarüootide, *amoA*, *nir* ja *nosZ* geenide üldarvukused vastavalt bakterite ja arhede 16S rRNA, bakterite ja arhede *amoA*, *nirS* ja *nirK* ning *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuste summeerimisel. Bakterite ja arhede *amoA*, *nirS* ja *nirK* ning *nosZI* ja *nosZII* geenide omavahelise suhte hindamiseks kasutati vastavate geenide jagatise. Lisaks vaadati veel denitrifikatsioonigeenide omavahelist suhet *nir* ja *nosZ* geenide vahel. Lisaks eelnevalt nimetatud programmidele kasutati programmi MS Excel 2019 andmeanalüüsil.

3.6 Vabaveelised tehismärgalad geenikoopiate uuringute kontekstis

Tehtud uuringu lämmastikreostuse eemaldamise geneetilist potentsiaali uuriti ka teiste vabaveelistes tehismärgalade kontekstis, millest üks oli Ohios asuv tehismärgala Ameerika

Ühendriikides (Ligi *et al.*, 2015; Ligi *et al.*, 2014; Ligi *et al.*, 2014) ja teine Pariisi lähistel Rampilloni tehismärgala Prantsusmaal (Mander *et al.*, 2021).

USA-s asuv tehismärgala asub Ohio osariigis Columbuses ning on 210 000 m² suurune lammirajatis, mis hõlmab kolme erinevat märgalade basseini – kahte eksperimentaalset mageveesood ja vanajõge. Kaks 10 000 m² suurust neerukujulist märgala rajati aastatel 1993–1994 loopealsetele muldadele. Olentangy jõest pumbatakse märgalakompleksi pidevalt põllumajandusliku tegevuse tagajärjel saastunud vett, et seda tehismärgala abil puhastada. (Ligi *et al.*, 2015)

Brie platool asuv Rampillon tehismärgala võeti kasutusele 2010. aastal, et koguda dreanaži- ja äravooluvett põllumajanduslikust valgalast ning lahendada kohalikke keskkonnaprobleeme. 5300 m² suuruses märgalas on tekitatud erinevate omadustega piirkonnad, et pikendada vee viibeaega ja tõhustada puhastusprotsesse. Esimene settebassein on umbes 1 m sügav ja 300 m³ ruumalaga. 5000 m² pindalaga keskmise tsooni maksimaalne sügavus on 0,5 m ja selle maht on 1200 m³. Väljavoolu tsoon on mahult 1000 m³ ja 0,8 m sügav. Tehismärgalal kasvavad tarnad (*Carex* spp.), harilik pilliroog (*Phragmites australis*), laialehine kassikakk (*Typha latifolia*), rästakad (*Juncus* spp.) ja erinevad vetikad. (Mander *et al.*, 2021)

Ohio märgalalt on määratud järgmiste geenide arvukused: bakterite 16S rRNA, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*, ja ANAMMOX 16S rRNA (Ligi, 2015). Rampilloni märgalalt on määratud bakterite 16S rRNA, arhede 16S rRNA, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*, bakterite *amoA*, arhede *amoA*, COMAMMOX *amoA*, *nrfA*, ANAMMOX 16S rRNA ja *nifH* geenid (Šinkejeva, 2019).

3.6 Statistiline analüüs ja autori osalus

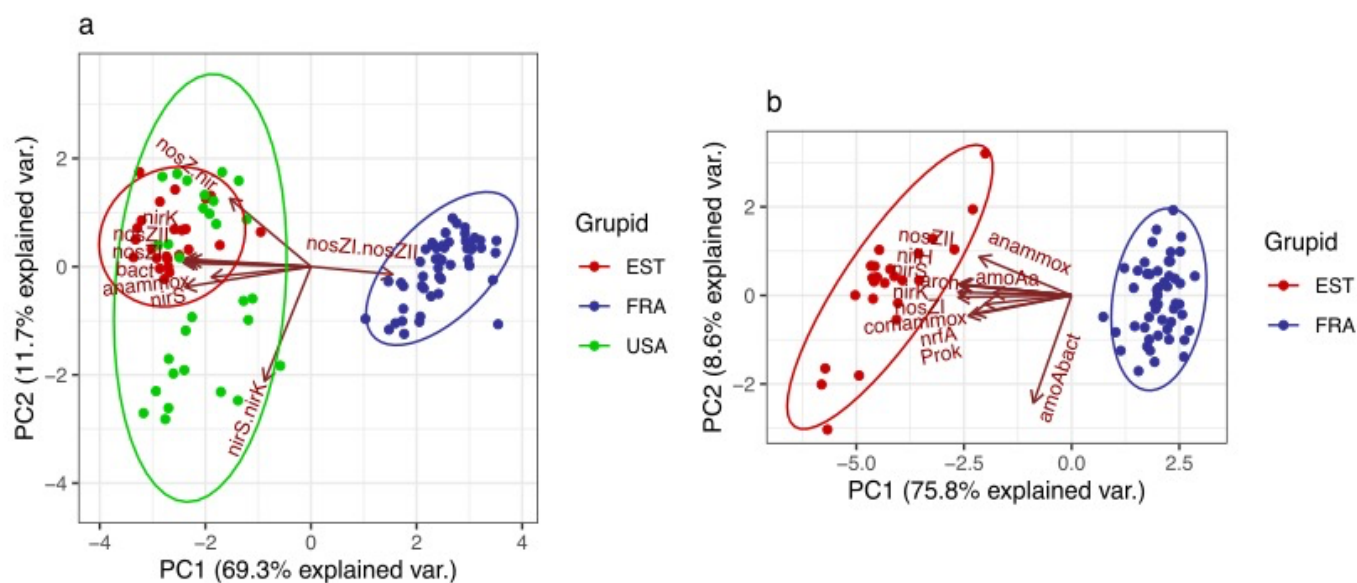
Erinevate tehismärgalade erinevuste visualiseerimiseks kasutati peakomponentanalüüsi (*Principal Component Analysis*, PCA) geeniparameetrite põhjal. Geeniparameetrite erinevusi hinnati erinevate katsealade vahel ühefaktorilise dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) või t-testi abil. Seoste olulisust hinnati geeniparameetrite vahel Spearmani korrelatsioonikoefitsiendi abil. Jooniste tegemiseks ja andmeanalüüsiks kasutati statistikaprogramme R versioon 2022.02.2 ja Statistica versioon 7.1.

Magistritöö autor osales Vända märgala setteproovide kogumisel. Lisaks eraldas autor Vända märgala setteproovidest DNA, määras qPCR meetodi abil geenikoopiate arvukused ning arvutas geeniparameetrite väärtused. Autor tegi andmetötluse ja -analüüsi.

3. Tulemused

3.1 Lämmastikuringe protsesside võrdlus vabaveelistes tehismärjalades

Bakterite 16S rRNA, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII* ja ANAMMOX 16S rRNA geenikoopiate arvukus oli Rampilloni märjalal väiksem võrreldes Vända ja Ohio märjalaga (joonis 3a). *nosZ/nir* suhe oli Vända märjalas ja osades Ohio märjala punktides üsna kõrge võrreldes Rampilloni märjalaga (joonis 3a). Vända märjalas on ka kõrge ANAMMOX geenikoopiate koguarvukus võrreldes muude aladega (joonis 3a).

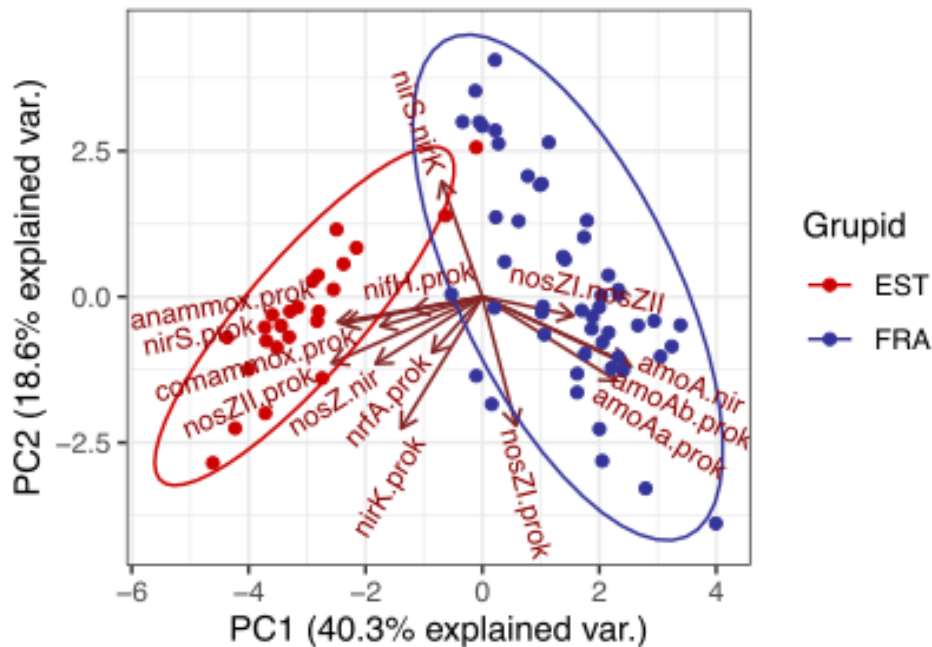


Joonis 3. (a) Peakomponentanalüüs Ohio (USA), Rampilloni (FRA) ja Vända (EST) märjalade geenikoopiate üldarvukuste ning *nosZ/nir*, *nirS/nirK* ja *nosZI/nosZII* suhete erinevuste kohta. (b) Peakomponentanalüüs Rampilloni (FRA) ja Vända (EST) märjalade geenikoopiate üldarvukuste erinevuste kohta.

Ohio märjalas oli oluliselt suurem *nirS/nirK* geenikoopiate suhe, mis tähendab, et *nirS* geenikoopiate arvukus oli seal suurem võrreldes *nirK* geenikoopiate arvukusega (joonis 3a). Samuti on Ohio märjalas geenikoopiate arvukuse põhjal eelistatud denitrifikatsiooniprotsessid.

nosZI geenikoopiate arvukus oli Rampilloni märjalal suurem võrreldes teiste aladega (joonis 3a & 4). Kuigi absoluutarvukused olid kõrgemad Ohio ja Vända märjalal, siis oli *nosZI* geeni osakaal *nosZII* geenist Rampilloni märjalas kõrgem (joonis 3a). Samuti eristuvad kindlad

punktid Ohio märgalas, kus *nirS* geenikoopiate arvukused olid teistest punktidest kõrgemad (joonis 3a).



Joonis 4. Peakomponentanalüüs Vända tehismärgala (EST) ja Rampilloni tehismärgala (FRA) geenikoopiate osakaalud prokarüootidest ja *nirS/nirK*, *nosZ/nir*, *nosZI/nosZII*, *amoA/nir* suhete kohta.

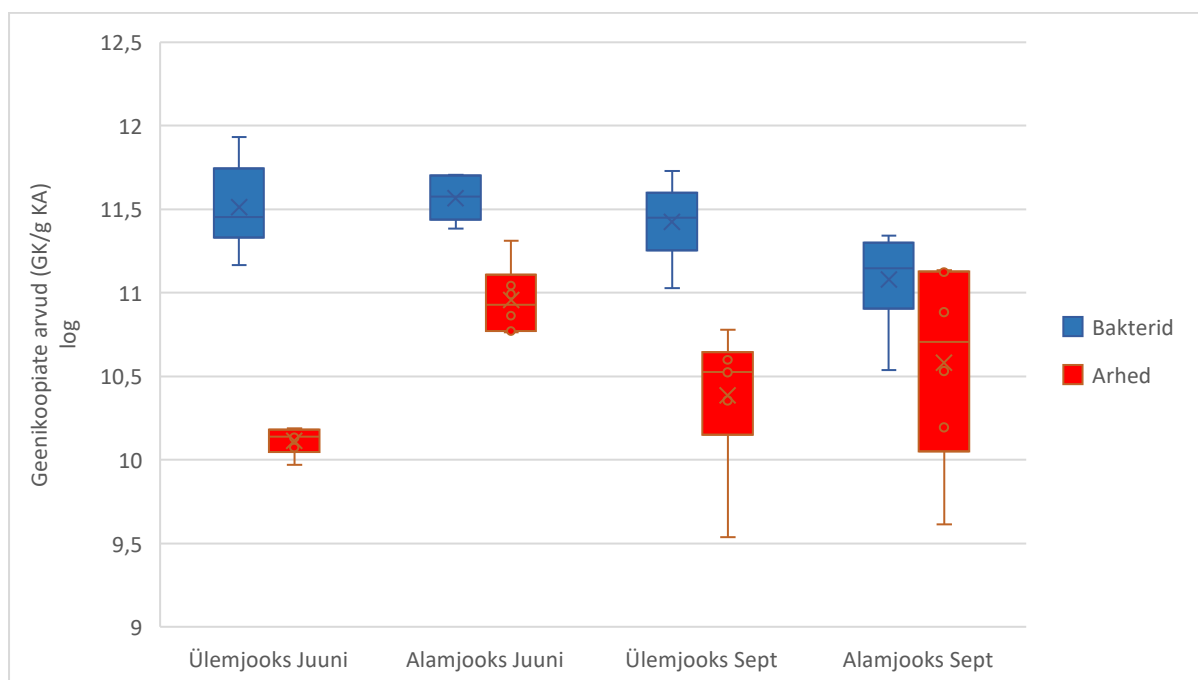
Geenikoopiate osakaalud prokarüootidest põhjal on nitrifikatsiooniprotsessid eelistatumad Rampilloni märgalas ja võiksid seal edukamalt toimuda (joonis 4), kuigi bakterite *amoA* koguarvukuse järgi on nitrifikatsiooniprotsessid nii Vända kui ka Rampilloni märgalas võrdselt eelistatud (joonis 3b). Sarnaselt Ohio tehismärgalale on samuti näha, et Vända tehismärgalas võiksid geenikoopiate üldarvukuse ja geenikoopiate osakaalude prokarüootidest põhjal domineerida denitrifikatsiooniprotsessid, lämmastiku fikseerimine, ANAMMOX ja DNRA. (joonis 4). Nitrifikatsiooniprotsessidest võiks Vända tehismärgalal olla eelistatud COMAMMOX. Kuigi Vända märgalal on kõrge arhede *amoA* geenikoopiate üldarvukus, siis Rampilloni tehismärgalal ilmneb suurem bakterite ja arhede *amoA* osakaal prokarüootidest.

3.2 Bakterite ja arhede üldarvukused

Vända märgala bakterite geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $3,00 \cdot 10^{11} \pm 1,81 \cdot 10^{10}$ GK/g KA. Rampilloni märgala (FRA) pinnaseproovide bakterite geenikoopiate arvukus oli

keskmiselt $3,58 \cdot 10^9 \pm 1,25 \cdot 10^{10}$ GK/g KA. Ohio märgala (USA) pinnaseproovides leidis bakterite geenikoopiad keskmiselt $4,87 \cdot 10^{10} \pm 1,65 \cdot 10^{10}$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Väanda & Prantsusmaa ($p < 0,001$) ning Väanda & Ohio ($p < 0,001$) märgalade bakterite geenikoopiate arvukuses.

Väanda märgala proovides oli arhede geenikoopiate arvukus $5,30 \cdot 10^{10} \pm 5,12 \cdot 10^{10}$ GK/g KA (joonis 5). Rampilloni märgala arhede geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $1,02 \cdot 10^8 \pm 3,73 \cdot 10^8$ GK/g KA. Ohio märgalal arhede geenikoopiate arvukust ei määratud. Ilmnes statistiliselt oluline erinevus Rampilloni ja Väanda tehismärgala pinnaseproovide arhede geenikoopiate arvukuses ($p < 0,001$).



Joonis 5. Bakterite ja arhede üldarvukused Väanda märgalal.

Väanda märgalal kõikusid arhede geenikoopiate arvukused ülemisel märgalal märgatavalt võrreldes juuni ja septembri geenikoopiate arvukust (joonis 5). Bakterite üldarvukused jäid üldiselt samaks ning nii suurt varieeruvust ei leidunud. Statistiliselt olulised erinevused ilmnemid arhede puhul ülemise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuses ($p < 0,01$) ning alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja ülemise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$).

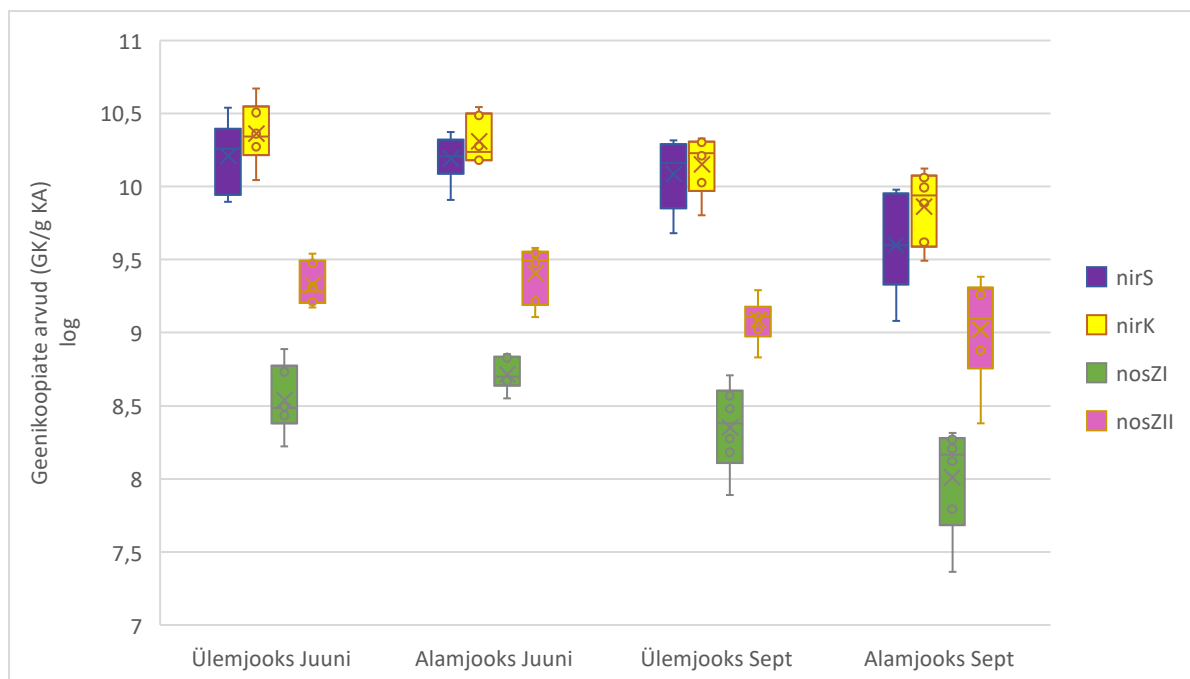
3.3 Denitrifikatsiooni geenide üldarvukused (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*)

Vända märgala pinnaseproovides oli *nirK* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,77 \cdot 10^{10} \pm 1,56 \cdot 10^9$ GK/g KA (joonis 6). Rampilloni märgala proovides oli *nirK* geenikoopiate arvukus keskmiselt $9,78 \cdot 10^8 \pm 8,01 \cdot 10^8$ GK/g KA. Ohio märgala pinnaseproovides oli *nirK* geenikoopiate arvukus keskmiselt $9,12 \cdot 10^9 \pm 1,05 \cdot 10^9$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Vända & Rampilloni ($p < 0,001$), Vända & Ohio ($p < 0,001$) ning Rampilloni & Ohio ($p < 0,001$) märgalade *nirK* geenikoopiate arvukuses.

Vända märgala pinnaseproovides oli *nirS* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,34 \cdot 10^{10} \pm 1,98 \cdot 10^9$ GK/g KA (joonis 6). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli *nirS* geenikoopiate arvukus keskmiselt $7,97 \cdot 10^7 \pm 1,37 \cdot 10^9$ GK/g KA. Ohio märgala proovides oli *nirS* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,71 \cdot 10^{10} \pm 1,80 \cdot 10^9$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Vända & Rampilloni ($p < 0,001$) ning Rampilloni & Ohio ($p < 0,001$) märgalade *nirS* geenikoopiate arvukuses.

Vända märgala pinnaseproovides oli *nosZI* geenikoopiate arvukus keskmiselt $3,31 \cdot 10^8 \pm 3,14 \cdot 10^7$ GK/g KA (joonis 6). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli *nosZI* geenikoopiate arvukus keskmiselt $3,68 \cdot 10^6 \pm 2,17 \cdot 10^7$ GK/g KA. Ohio märgala proovides oli *nosZI* geenikoopiate arvukus keskmiselt $4,20 \cdot 10^8 \pm 2,85 \cdot 10^7$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Vända & Rampilloni ($p < 0,001$) ning Rampilloni & Ohio ($p < 0,001$) märgalade *nosZI* geenikoopiate arvukuses.

Vända märgala pinnaseproovides oli *nosZII* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,90 \cdot 10^9 \pm 1,50 \cdot 10^8$ GK/g KA (joonis 6). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli *nosZII* geenikoopiate arvukus keskmiselt $2,24 \cdot 10^6 \pm 1,04 \cdot 10^8$ GK/g KA. Ohio märgala proovides oli *nosZII* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,67 \cdot 10^9 \pm 1,36 \cdot 10^8$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Vända & Rampilloni ($p < 0,001$) ning Rampilloni & Ohio ($p < 0,001$) märgalade *nosZII* geenikoopiate arvukuses.



Joonis 6. Denitrifikatsiooni kodeerivate geenide üldarvukused Vända märgalal.

Kõik denitrifikatsioonide geenide üldarvukused langesid pärast tammi ehitamist ehk denitrifitseerivad bakterid geenid eelistavad anaeroobset ja märjemat keskkonda (joonis 6).

Ülemise ja alumise märgala vahel esines statistiliselt oluline erinevus *nirK* geeni suhtes ülemise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$), kus ülemise märgala juuni geenikoopiate arvukus on keskmiselt kõrgem.

Statistiliselt olulised erinevused ilmneseid *nirS* geeni suhtes ka ülemise märgala juunis võetud proovide ja alumise märgala septembris võetud proovide vahel ($p < 0,05$) ning alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$), kus juunis võetud proovide keskmine geenikoopiate arvukus on kõrgem ja kõikus vähem.

Statistiliselt olulised erinevused *nosZI* geeni suhtes ilmneseid alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja ülemise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$). Samuti leidis *nosZI* geeni suhtes statistiliselt oluline erinevus ülemise märgala juunis geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala septembris geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$). Statistiliselt oluline erinevus *nosZI* geeni suhtes ilmneseid ka alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala septembri geenikoopiate arvukuses ($p < 0,01$).

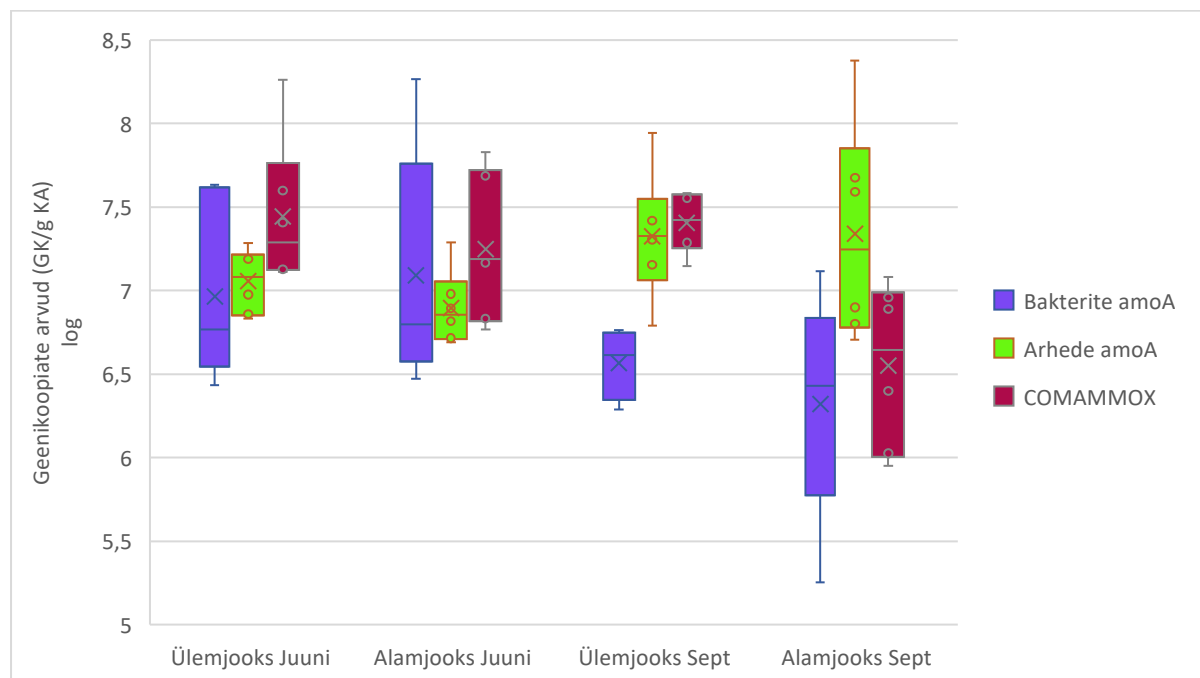
Alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja ülemise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ilmneseid statistiliselt oluline erinevus *nosZII* geeni suhtes ($p < 0,05$). Samuti

ilmnes statistiliselt oluline erinevus *nosZII* geeni suhtes alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ja alumise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$).

3.4 Nitrifikatsiooni geenide üldarvukused (bakterite & arhede *amoA*, COMAMMOX)

Vända tehismärgala pinnaseproovides oli bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,65 \cdot 10^7 \pm 3,78 \cdot 10^7$ GK/g KA ning arhede *amoA* geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $2,69 \cdot 10^7 \pm 4,84 \cdot 10^7$ GK/g KA (joonis 7). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus keskmiselt $4,38 \cdot 10^6 \pm 2,78 \cdot 10^6$ GK/g KA ja arhede *amoA* geenikoopiate arvukus oli keskmiselt $3,48 \cdot 10^7 \pm 1,95 \cdot 10^6$ GK/g KA. Statistiliselt olulised erinevused ilmnesid Eesti ja Prantsusmaa tehismärgala bakterite *amoA* ($p < 0,05$) ja arhede *amoA* geenikoopiate arvukuses ($p < 0,001$).

Rampilloni tehismärgala pinnaseproovides oli COMAMMOX geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,08 \cdot 10^5 \pm 2,12 \cdot 10^5$ GK/g KA (joonis 7). Vända märgala pinnaseproovides oli COMAMMOX geenikoopiate arvukus keskmiselt $2,69 \cdot 10^7 \pm 3,70 \cdot 10^7$ GK/g KA. Vända ja Rampilloni tehismärgala vahel ilmnes statistiliselt oluline erinevus COMAMMOX geenikoopiate arvukuses ($p < 0,001$).



Joonis 7. Nitrifikatsiooni kodeerivate geenide üldarvukused Vända märgalal.

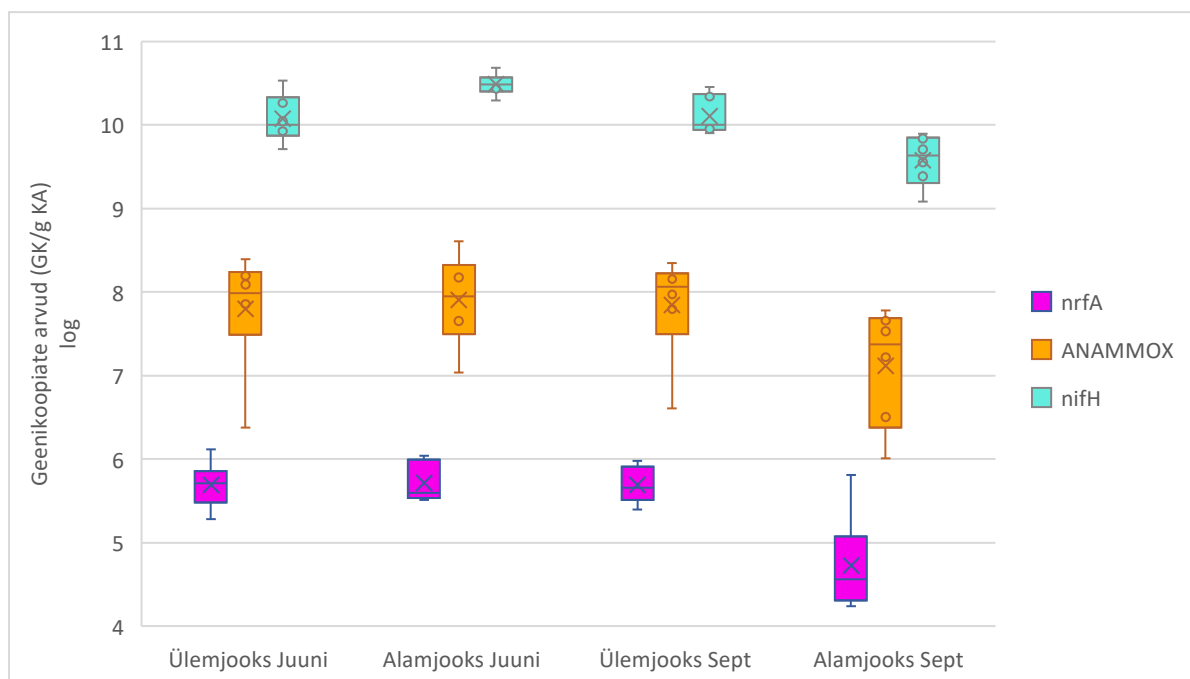
Arhede *amoA* geenikoopiate arvukus on pärast tammi ehitamist tõusnud, mis inditseerib, et eelistatud on kuiv ja aeroobne keskkond. Bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus pigem langes ning samuti langes COMAMMOX geenikoopiate arvukus (joonis 7).

3.5 DNRA, ANAMMOX, N₂ fikseerimine (*nrfA*, ANAMMOX, *nifH*)

Vända märgala pinnaseproovides oli ANAMMOX geenikoopiate arvukus keskmiselt $9,73 \cdot 10^7 \pm 9,41 \cdot 10^6$ GK/g KA (joonis 8). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli ANAMMOX geenikoopiate arvukus keskmiselt $4,61 \cdot 10^5 \pm 6,52 \cdot 10^6$ GK/g KA. Ohio märgala proovides oli ANAMMOX geenikoopiate arvukus keskmiselt $7,64 \cdot 10^5 \pm 8,56 \cdot 10^6$ GK/g KA. Erinevate märgalade vahel ilmnes statistiliselt olulised erinevused Vända & Rampilloni ($p < 0,001$) ning Vända & Ohio ($p < 0,001$) märgalade ANAMMOX geenikoopiate arvukuses.

Vända märgala pinnaseproovides oli *nrfA* geenikoopiate arvukus keskmiselt $4,61 \cdot 10^5 \pm 3,52 \cdot 10^5$ GK/g KA (joonis 8). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli *nrfA* geenikoopiate arvukus keskmiselt $3,84 \cdot 10^3 \pm 9,07 \cdot 10^3$ GK/g KA. Vända ja Rampilloni tehismärgala vahel ilmnes statistiliselt oluline erinevus *nrfA* geenikoopiate arvukuses ($p < 0,001$).

Vända märgala pinnaseproovides oli *nifH* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,62 \cdot 10^{10} \pm 1,27 \cdot 10^{10}$ GK/g KA (joonis 8). Rampilloni märgala pinnaseproovides oli *nifH* geenikoopiate arvukus keskmiselt $1,06 \cdot 10^8 \pm 9,92 \cdot 10^7$ GK/g KA. Vända ja Rampilloni tehismärgala vahel ilmnes statistiliselt oluline erinevus *nrfA* geenikoopiate arvukuses ($p < 0,001$).



Joonis 8. DNRA, ANAMMOX ja lämmastiku fikseerimist kodeerivate geenide üldarvukused.

Statistiliselt oluline erinevus ilmnesid *nifH* geeni suhtes alumise märgala juuni geenikoopiate arvukuse ning ülemise märgala juuni geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,01$), ülemise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,05$) ja alumise märgala septembri geenikoopiate arvukuse vahel ($p < 0,001$) (joonis 8). ANAMMOX, *nrfA* ning *nifH* geenikoopiate arvukused on nähtavalt vähenenud alumise märgala septembri proovides ehk need protsessid on eelistatumad anaeroobses ja pigem märjemas keskkonnas.

3.6 Geenikoopiate omavahelised suhted

Tabelis 2 on esitatud statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikoefitsendid. Denitrifikatsiooniprotsessi kodeerivad *nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII* geenide geenikoopiate arvukused ilmnesid olevat üksteisega positiivses seoses. Korrelatsioon puudus arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukuse ja teiste mõõdetud geenide geenikoopiate arvukuse vahel ($p > 0,05$). Bakterite 16S rRNA geenikoopiate arvukus oli positiivselt seotud kõikide mõõdetud geenikoopiate arvukusega, v.a arhede 16S rRNA ja arhede *amoA*-ga, kus korrelatsioon puudus. Samuti ei olnud nitrifikatsiooniga seotud arhede *amoA* geenikoopiate arvukus korrelatsioonis ühegi teise geenikoopiate arvukusega, ka mitte bakterite *amoA* geenikoopiate arvukusega. Positiivses seoses olid bakterite *amoA* ja COMAMMOX, mis vastutavad nitrifikatsiooniprotsessi eest. ANAMMOX, *nrfA* *nifH* geenide geenikoopiate arvukused on

omavahel positiivselt korreleerunud. Negatiivseid korrelatsioone geenikoopiate üldarvukuste vahel ei esinenud.

Tabel 2. Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikoefitsendid (R) (* – p<0,001; ** – p<0,01; *** – p<0,05) Vända märgala geenikoopiate arvukuste ning osakaalude vahel. Oranž tabeliosa tähistab korrelatsioone geenikoopiate osakaalude prokarüootidest vahel. Sinine tabeliosa tähistab geenikoopiate arvukuste vaheliseid korrelatsioone.

Tunnus	Bakterite 16S rRNA	Arhede 16S rRNA	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>	Bakterite <i>amoA</i>	Arhede <i>amoA</i>	COMAMMOX	<i>nrfA</i>	ANAMMOX	<i>nifH</i>
Bakterite 16S rRNA	1		0,91*	0,93*	0,89*	0,64*	0,59**		0,54**	0,66**	0,57**	0,93*
Arhede 16S rRNA		1										
<i>nirK</i>			1	0,95*	0,85*	0,71*	0,68*		0,66*	0,68*	0,63*	0,93*
<i>nirS</i>			0,75*	1	0,86*	0,68*	0,64*		0,59**	0,67*	0,73*	0,81*
<i>nosZI</i>			0,48***	0,58**	1	0,69*	0,57**		0,46***	0,65*	0,54**	0,86*
<i>nosZII</i>			0,71*	0,52**	0,46***	1	0,64*		0,41***		0,45***	0,59**
Bakterite <i>amoA</i>			0,53**				1		0,58**	0,48***		0,57**
Arhede <i>amoA</i>			0,50***	0,44***		0,45***		1				
COMAMMOX			0,57**				0,54**		1	0,58**	0,49***	0,53**
<i>nrfA</i>									0,44***	1	0,51***	0,68*
ANAMMOX			0,45***	0,70*							1	0,56**
<i>nifH</i>										0,45***		1

4. Arutelu

Bakterite 16S rRNA, *nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII* ja ANAMMOX geenikoopiate arvukused olid Rampilloni märgalal väiksemad võrreldes Vända ja Ohio märgaladega. Seega võiks Vända ja Ohio tehismärgalas olla kõikide nende protsesside (denitrifikatsiooni ja ANAMMOX-i) potentsiaal kõrgem kui Rampilloni märgalas. Varasem uuring on leidnud, et *nir* geenikoopiate arvukused on seotud ammooniumi sisaldusega pinnases ning *nosZ* geenide geenikoopiate arvukus on positiivses seoses pinnase pH-ga ja nii *nosZ* kui *nir* geenide geenikoopiate arvukused on positiivses korrelatsioonis temperatuuriga (Meng et al., 2019). Vända ja Ohio tehismärgala kõrgemat bakterite koguarvukust võis mõjutada kõrgem orgaanilise süsiniku sisaldus setetes. (Bernhard et al., 2021)

Nitrifikatsiooniprotsessid (bakterite *amoA* koguarvukuse järgi) on nii Vända kui Rampilloni märgalas võrdselt eelistatud, kuid Rampilloni märgala kõrge *amoA* osakaal prokarüootidest viitab sellele, et nitrifikatsioon võib seal potentsiaalselt paremini toimida. *nosZ/nir* suhe oli Vända märgalas ja osades Ohio märgala punktides üsna suur. Antud suhet saab kasutada N₂O emissiooni potentsiaali hindamiseks, mistõttu võib öelda, et nendes alades on geenikoopiate põhjal suurem potentsiaal, et tugev kasvuhoonegaas N₂O muundatakse molekulaarseks lämmastikuks. Vända märgalas on ka kõrge ANAMMOX geenikoopiate koguarvukus võrreldes muude aladega, mistõttu on geenikoopiate arvukuse põhjal Vända märgalal suurem potentsiaal lämmastikreostus eemaldada süsteemist molekulaarse lämmastiku kujul. Hiljutised uuringud ennustavad, et ANAMMOX-i integreerimine olemasolevatesse tehismärgaladesse võib osutada üsna paljulubavaks kogulämmastiku eemaldamise olulisel suurendamisel ja seeläbi süsteemi üldise jõudluse toetamisel (Shved et al., 2015; Zhu et al., 2011).

Ohio märgalas oli oluliselt suurem *nirS/nirK* geenikoopiate suhe, mis tähendab, et *nirS* geen oli seal eelistatum, kuigi mõlemad kodeerivad denitrifikatsiooni, siis iseloomustab see teatavat niši erinevust. Varasemad uuringud teistes ökosüsteemides on näidanud, et *nirS* geenikoopiad leidub üldiselt keskkonnas rohkem kui *nirK* ning samuti on denitrifikatsiooni määr positiivses seoses *nirS* geenikoopiate arvukusega (Dai et al., 2020).

Kuigi *nosZII* absoluutarvukused olid üldiselt kõrgemad kui *nosZI* absoluutarvukused Ohio ja Vända märgala punktides, siis oli *nosZI* geeni osakaal *nosZII* geenist Rampilloni märgalas kõrgem. *nosZI* geenikoopiate arv oli Rampilloni märgalal selgelt suurem võrreldes teiste aladega, mistõttu võib öelda, et *nosZI* geen domineerib Rampilloni tüüpi märgalades ja tingimustes. Samuti eristuvad kindlad punktid Ohio märgalas, kus *nirS* geenikoopiate arv oli

teistest punktidest kõrgemad, mis võis tuleneda sellest, et antud punktid asusid orgaanika- ja mineraalirohke pinnase peal. Varasem kirjandus on näidanud, et *nirS* arvukus võib olla positiivses korrelatsioonis lahustunud raua sisaldusega pinnases (Wei *et al.*, 2015).

DNRA ja denitrifikatsioon on konkureerivad protsessid ning *nrfA* geenikoopiate arvukuse põhjal on Vända märgalas DNRA protsessil suurem geneetiline potentsiaal edukamalt toimuda, kuigi *nrfA* geenikoopiate osakaal prokarüootidest on nii Vända märgalal kui ka Rampilloni märgalal üsna võrdne. Varasem uuring on näidanud, et DNRA on eelistatud kõrge C/N suhte korral ning denitrifikatsioon toimib edukamalt madalama C:N suhte puhul (Liu *et al.*, 2021).

Kõik denitrifikatsiooniprotsessi geenide (*nirS*, *nirK*, *nosZI*, *nosZII*) üldarvukused langesid Vända märgalal pärast tammi ehitamist, millest võib järeldada, et denitrifitseerivad mikroobid eelistavad anaeroobset ja märjemat keskkonda (Ding *et al.*, 2022).

Vända ja Rampilloni tehismärgalade geenikoopiate üldarvukused ilmsid statistilised olulised erinevused kõikide määratud geenide geenikoopiate üldarvukustes ning Vända tehismärgalal leidis kõiki geenikoopiad statistiliselt oluliselt rohkem. Erinevus võib olla tingitud taimestikust, mis mõjutab mulla mikrobioloogilist koosseisu ning mikroorganismide üldarvukusi, ning pinnase keemilisest koostisest (Jacoby *et al.*, 2017). Samuti võib oluline olla tehismärgalade veerežiim: Rampilloni tehismärgala asub karstialal ning Vända märgalal leidub orgaanikarikka settekihi all punased ja hallid savikihid, mistõttu on pinnas hästi vettpeetav ning potentsiaalselt pikema hüdraulilise viibeajaga (Ghosh & Gopal, 2010).

Vända tehismärgalal olid bakterite ja arhede *amoA* geenikoopiate arvukus sarnane juunikuus nii ülemisel kui ka alumisel märgalal, kuid peale tammi ehitamist tõusis arhede *amoA* arvukus mõlemas märgalas ning eriti alumises, mis muutus tunduvalt kuivemaks. See annab põhjust järeldada, et kuivemas keskkonnas muutus nitrifikatsioon Vända märgalal domineerivamaks protsessiks. Sarnaselt tõusis ka arhede üldarvukus. Bakterite *amoA* geenikoopiate arvukus sama trendi ei järginud ning kuivemal perioodil langes geenikoopiate arvukus, mis viitab, et nitrifitseerivad bakterid eelistavad teistsugusemaid keskkonnatingimusi kui arhed. Varasem uuring on näidanud, et bakterite ja arhede *amoA* on positiivses korrelatsioonis madala pH ning soolade ja vase sisaldusega mullas (Magalhaes *et al.*, 2014).

Bakterite *amoA*-ga sarnaselt langes septembris COMAMMOX geenikoopiate arvukus. Varasem uuring on leidnud, et COMAMMOX geenikoopiateid võib leida mullas vähem ning ammoniumi oksüdeerimisse panustavad pigem muud nitrifitseerivad bakterid ja arhed (Wang *et al.*, 2020). Vända märgalal leidub COMAMMOX geenikoopiateid palju võrreldes bakterite ja

arhede *amoA* geenikoopiatega. Võrreldes Rampilloni märgalaga on Vända märgalal suurem geneetiline potentsiaal COMAMMOX-i protsessiks, kuna Vända märgalal on nii suurem COMAMMOX geenikoopiate arvukus kui ka COMAMMOX geenikoopiate osakaal prokarüootidest.

Võrreldes Rampilloni märgalaga võiks lämmastiku fikseerimine *nifH* geenikoopiate arvukuse ja osakaalu prokarüootidest põhjal edukamalt toimuda Vända märgalal, kus need näitajad olid kõrgemad. *nifH* geenikoopiate arvukust mõjutab raua ja fosfori sisaldus pinnases (Turk-Kubo *et al.*, 2012).

Vända tehismärgalal ilmnes bakterite *amoA* ja COMMAMOX geenikoopiate arvukuses statistiliselt oluline positiivne seos ning mille sarnast suhet on varem kirjeldanud Bernhard *et al.*, 2021. Samuti leidis statistiliselt olulised positiivsed seosed denitrifikatsiooni geenide *nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII* vahel ($p < 0,001$), millega sarnased seosed on leitud ka ka Rampilloni tehismärgalas (Šinkejeva, 2019).

5. Kokkuvõte

Maailma rahvaarv jätkab kasvamist ning aina suureneva elanikkonna toitmiseks on üha rohkem kasutusele võetud lämmastikväetisi. Tehismärgalade kasutamine lämmastikreostuse eemaldamiseks on kuluefektiivne viis, kuidas eemaldada üleliigsest väetiste kasutamisest tingitud lämmastikreostust ning leevendada keskkonnaprobleeme.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on hinnata ja võrrelda lämmastikuringe protsesside (nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, DNRA, ANAMMOX, COMAMMOX, lämmastiku fikseerimine) geneetilist potentsiaali vabaveelistes tehismärgalades üleliigse lämmastiku eemaldamiseks Vända (Eesti) tehismärgalas, Rampilloni (Prantsusmaa) tehismärgalas ning Ohio (Ameerika Ühendriigid) tehismärgalas.

Vända märgalalt koguti kokku 24 setteproovi kahe välitöö käigus 16.06.2021 ning 01.09.2021 ning setteproovidest eraldati DNA. Reaalaja PCR meetodi abil määrati bakterite ja arhede 16S rRNA, denitrifikatsiooni (*nirS*, *nirK*, *nosZI*, *nosZII*), nitraadi dissimileeriv redutseerimise ammooniumiks e DNRA (*nrfA*), anaeroobse ammooniumi oksüdatsiooni (ANAMMOX 16S rRNA), lämmastiku fikseerimise (*nifH*), täielik ammoniaagi oksüdeerimise (COMAMMOX), nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) markergeenide arvukused. Statistiliselt erinevuste hindamiseks kolme tehismärgala vahel kasutati ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA*) ning Vända märgala geeniparameetrite vaheliste seoste olulisust hinnati Spearmani korrelatsioonikoefitsiendiga. Erinevate tehismärgalade erinevuste visualiseerimiseks kasutati peakomponentanalüüsi (*Principal Component Analysis – PCA*).

Antud magistritöö tulemustest selgus, et Vända tehismärgalas toimub geenikoopiate põhjal edukamalt denitrifikatsioon ning Rampilloni märgalal on geneetiliselt suurem potentsiaal nitrifikatsiooniprotsessidel. *nosZ/nir* suhte järgi on Vända ja Ohio tehismärgalal geenikoopiate põhjal suurem geneetiline potentsiaal, et dilämmastikoksiid muundatakse molekulaarseks lämmastikuks. Neil samadel tehismärgaladel toimub ka ANAMMOX potentsiaalselt edukamalt. Ohio tehismärgalal oli *nirS* geenikoopiate arvukus suurem kui *nirK* geenikoopiate arvukus ning eriti suur oli *nirS* geenikoopiate arvukus orgaanikarohkes pinnases. Vända ja Ohio tehismärgalal leidis üldarvukuselt rohkem *nosZII* geenikoopiaid, kuid *nosZII* osakaal *nosZI* geenist oli suurem Rampilloni tehismärgalal. Nitraadi dissimileeriv redutseerimine ammooniumiks (DNRA), COMAMMOX ning lämmastiku fikseerimine toimivad geneetiliselt potentsiaalselt paremini Vända tehismärgalal võrreldes Rampilloni tehismärgalaga.

Vända tehismärgala geenikoopiate arvukustest selgus, et denitrifikatsiooni geenide (*nir* & *nosZ*) üldarvukused vähenesid pärast tammi ehitamist, mis viitab sellele, et toimub paremini anaeroobses ja märjemas keskkonnas. Nitrifikatsioon võis muutuda domineerivamaks protsessiks peale tammi ehitamist, kuna arhede *amoA* geenikoopiate arvukus tõusis, kuid bakterite *amoA* ja COMAMMOX geenikoopiate arvukus sama trendi ei järginud. Samuti vähenes *nifH* geeni geenikoopiate arvukus, mis kodeerib lämmastiku fikseerimist pinnases ning ANAMMOX ja DNRA geenikoopiate arvukus.

The genetic potential of nitrogen pollution removal in surface flow constructed wetlands

Summary

The aim of this master's thesis is to evaluate and compare the genetic potential of nitrogen cycle processes (nitrification, denitrification, DNRA, ANAMMOX, COMAMMOX, nitrogen fixation) in free water constructed wetlands to remove excess nitrogen in Vända (Estonia) constructed wetland, Rampillon (France) constructed wetland and Ohio constructed wetland (USA). Another purpose of this was to study the abundances and proportions of bacteria and archaea in the Vända constructed wetland and the genes encoding the nitrogen cycle processes.

The main idea was to examine which wetland of the three works best to remove nitrogen pollution from agricultural runoff or which parts of the nitrogen cycle work best based on the abundances of gene copies. The world's population continues to grow, and more and more nitrogen fertilisers have been used to feed its growing population. The use of constructed wetlands to remove nitrogen pollution is a cost-effective way to remove nitrogen pollution from excessive fertiliser use and to alleviate environmental problems.

A total of 24 sediment samples were collected from the Vända wetland and the samples were obtained during two separate occasions, on the 16th of June 2021 and on the 1st of September 2021. DNA was isolated from the sediment samples and qPCR was used to determine the genetic parameters, which were bacterial and archaeal 16S rRNA genes, denitrification genes (*nirS*, *nirK*, *nosZI*, *nosZII*), dissimilatory nitrate reduction to ammonium i.e. DNRA genes (*nrfA*), anaerobic ammonium oxidation genes (ANAMMOX 16S rRNA), complete ammonia oxidation genes (COMAMMOX), nitrification genes (bacterial and archaeal *amoA*). qPCR results were analysed with LinRegPCR (v 2021.2) and STATISTICA (v 7.1) and calculated to dry matter. One-way ANOVA was used to evaluate the differences between the three constructed wetlands, and the significance of the relationships between the gene parameters of the Vända wetland was assessed using the Spearman correlation coefficient. Principal component analysis (PCA) was used to visualise the differences between the different constructed wetlands.

The results of this master's thesis show that denitrification is more successful in the Vända constructed wetland based on gene copies, and the Rampillon wetland has a genetically greater potential for nitrification processes. According to the *nosZ/nir* ratio, the Vända and Ohio constructed wetlands have a greater genetic potential to convert nitrous oxide to molecular nitrogen based on gene copies. ANAMMOX is also potentially more successful in these same

wetlands. In the Ohio constructed wetland, the number of *nirS* gene copies was higher than the *nirK* gene copies, and the number of *nirS* gene copies was particularly high in organic soils. There were more *nosZII* gene copies in the Vända and Ohio constructed wetlands, but the share of *nosZII* to *nosZI* was higher in the Rampillon constructed wetland. The dissimilative reduction of nitrate to ammonium (DNRA), COMAMMOX and nitrogen fixation are potentially genetically superior to the Vända constructed wetland compared to the Rampillon constructed wetland.

The abundance of gene copies in Vända constructed wetland showed that the total abundance of denitrification genes (*nir* and *nosZ*) decreased after the construction of the dam, suggesting better performance in an anaerobic and wetter environment. Nitrification may have become the predominant process after dam construction as the abundance of archaeal *amoA* gene copies increased, but because the number of bacterial *amoA* and COMAMMOX gene copies did not follow the same trend. The abundance of gene copies of the *nifH* gene, which encodes nitrogen fixation in soil, and the abundance of ANAMMOX and DNRA gene copies also decreased after building the dam.

Tänuavaldused

Autor soovib tänada oma juhendajat Mikk Espenbergi, kes aitas selle magistritöö valmimisele kaasa. Autor soovib tänada ka Mariel Teinlumi ja Kadri Margust.

Kasutatud kirjandus

- Albert, C., Spangenberg, J. H. & Schröter, B. (2017). Nature-based solutions: criteria. *Nature*, 543 (7645), 315–315. doi:10.1038/543315b
- Bachand, P. A. M. & Horne, A. J. (1999). Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. *Ecological Engineering*, 14 (1), 17–32. doi:10.1016/S0925-8574(99)00017-8
- Bernhard, A. E., Beltz, J., Giblin, A. E. & Roberts, B. J. (2021). Biogeography of ammonia oxidizers in New England and Gulf of Mexico salt marshes and the potential importance of comammox. *ISME Communications*, 1 (1), 9. doi:10.1038/s43705-021-00008-0
- Browder, G., Ozment, S., Rehberger Bescos, I., Gartner, T. & Lange, G.-M. (2019). *Integrating Green and Gray: Creating Next Generation Infrastructure*. Washington, DC: World Bank. doi:10.1596/978-1-56973-955-6
- Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W. & Zeyer, J. (2004). New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1), 240–247. American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.70.1.240-247.2004
- Bush, J. & Doyon, A. (2019). Building urban resilience with nature-based solutions: How can urban planning contribute? *Cities*, 95, 102483. doi:10.1016/j.cities.2019.102483
- Cannon, J., Sanford, R. A., Connor, L., Yang, W. H. & Chee-Sanford, J. (2019). Sequence alignments and validation of PCR primers used to detect phylogenetically diverse nrfA genes associated with dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). *Data in Brief*, 25, 104016. doi:10.1016/j.dib.2019.104016

- Choi, C., Berry, P. & Smith, A. (2021). The climate benefits, co-benefits, and trade-offs of green infrastructure: A systematic literature review. *Journal of Environmental Management*, 291, 112583. doi:10.1016/j.jenvman.2021.112583
- Cohen-Shacham, E., Andrade, A., Dalton, J., Dudley, N., Jones, M., Kumar, C. et al. (2019). Core principles for successfully implementing and upscaling Nature-based Solutions. *Environmental Science & Policy*, 98, 20–29. doi:10.1016/j.envsci.2019.04.014
- Dai, H.-T., Zhu, R.-B., Sun, B.-W., Che, C.-S. & Hou, L.-J. (2020). Effects of Sea Animal Activities on Tundra Soil Denitrification and nirS- and nirK-Encoding Denitrifier Community in Maritime Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.573302
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M. et al. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528 (7583), 504–509. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature16461
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L. & Relman, D. A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLOS Biology*, 6 (11), e280. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pbio.0060280
- Ding, J., Gao, X., Peng, Yi, Peng, Yongzhen, Zhang, Q., Li, X. et al. (2022). Anaerobic duration optimization improves endogenous denitrification efficiency by glycogen accumulating organisms enhancement. *Bioresource Technology*, 348, 126730. doi:10.1016/j.biortech.2022.126730
- Disaster(CRED), C. for R. on the E. of. (2015). *The Human Cost Of Natural Disasters: A global perspective*. Report. Centre for Research on the Epidemiology of Disaster(CRED). Zugriff am 20.4.2022. Verfügbar unter: <http://repo.floodalliance.net/jspui/handle/44111/1165>

- EEA. (2017). *Green Infrastructure and Flood Management: Promoting cost-efficient flood risk reduction via green infrastructure solutions*. No. 9789292138943. (S. 155–155). doi:10.2800/324289
- Eestimaa Looduse Fond. (2022). Märgalad. *Eestimaa Looduse Fond*. Zugriff am 21.4.2022. Verfügbar unter: <https://elfond.ee/tehtud/margalad/vanda-tehismargala-rajamine>
- Erisman, J. W., Galloway, J. N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N. B., Petrescu, A. M. R. et al. (2013). Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1621), 20130116. Royal Society. doi:10.1098/rstb.2013.0116
- Espenberg, M. (2017). *Impact of management on peatland microbiome and greenhouse gas emissions*. Doktoritöö. Tartu Ülikool.
- Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J. et al. (2016). Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PLOS ONE*, 11 (9), e0163864–e0163864. Public Library of Science.
- Faivre, N., Fritz, M., Freitas, T., de Boissezon, B. & Vandewoestijne, S. (2017). Nature-Based Solutions in the EU: Innovating with nature to address social, economic and environmental challenges. *Environmental Research*, 159, 509–518. doi:10.1016/j.envres.2017.08.032
- Frantzeskaki, N. (2019). Seven lessons for planning nature-based solutions in cities. *Environmental Science & Policy*, 93, 101–111. doi:10.1016/j.envsci.2018.12.033
- Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y. & Li, L. (2018). Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12 (3), 10. doi:10.1007/s11783-018-1035-x

- Ghosh, D. & Gopal, B. (2010). Effect of hydraulic retention time on the treatment of secondary effluent in a subsurface flow constructed wetland. *Ecological Engineering*, 36 (8), 1044–1051. doi:10.1016/j.ecoleng.2010.04.017
- Gruber, N. & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451 (7176), 293–296. doi:10.1038/nature06592
- Gu, B., van Grinsven, H. J. M., Lam, S. K., Oenema, O., Sutton, M. A., Mosier, A. et al. (2021). A Credit System to Solve Agricultural Nitrogen Pollution. *The Innovation*, 2 (1), 100079. doi:10.1016/j.xinn.2021.100079
- Hallin Sara & Lindgren Per-Eric. (1999). PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4), 1652–1657. American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.65.4.1652-1657.1999
- Han, L.-L., Wang, Q., Shen, J.-P., Di, H. J., Wang, J.-T., Wei, W.-X. et al. (2019). Multiple factors drive the abundance and diversity of the diazotrophic community in typical farmland soils of China. *FEMS Microbiology Ecology*, 95 (8), fiz113. doi:10.1093/femsec/fiz113
- 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 (8), 5181–5189. American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.00231-06
- Hey, D. L., Kostel, J. A., Crumpton, W. G., Mitsch, W. J. & Scott, B. (2012). The roles and benefits of wetlands in managing reactive nitrogen. *Journal of Soil and Water Conservation*, 67 (2), 47A. doi:10.2489/jswc.67.2.47A
- Humbert, S., Zopfi, J. & Tarnawski, S.-E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*, 4. doi:10.1111/j.1758-2229.2012.00347.x

- Ibekwe, A. m., Lyon, S. r., Leddy, M. & Jacobson-Meyers, M. (2007). Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (4), 921–936. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03181.x
- IPCC. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Band In Press). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781009157896
- Izquierdo, J. A. & Klaus Nüsslein. (2015). Variation in diazotrophic community structure in forest soils reflects land use history. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 1–8. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.017
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A. & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Jones, C. M., Graf, D. R., Bru, D., Philippot, L. & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7 (2), 417–426. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ismej.2012.125
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M. & Hallin, S. (2008). Phylogenetic Analysis of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide Respiratory Enzymes Reveal a Complex Evolutionary History for Denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (9), 1955–1966. doi:10.1093/molbev/msn146
- Kabisch, N., Korn, H., Stadler, J. & Bonn, A. (Hrsg.). (2017). *Nature-Based Solutions to Climate Change Adaptation in Urban Areas: Linkages between Science, Policy and*

- Practice* (Theory and Practice of Urban Sustainability Transitions). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-56091-5
- Kadlec, R. H. & Wallace, S. (2008). *Treatment Wetlands* (2. Auflage). Boca Raton: CRC Press. doi:10.1201/9781420012514
- 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, 5957–62. doi:10.1128/AEM.00439-06
- Kartal, B., Kuenen, J. G. & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Sewage Treatment with Anammox. *Science*, 328 (5979), 702–703. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.1185941
- Kill, K. (2018). *Avaveelise tehismärgala efektiivsus põllumajandusliku hajukoormuse vähendamiseks*. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Kjellin, J., Hallin, S. & Wörman, A. (2007). Spatial variations in denitrification activity in wetland sediments explained by hydrology and denitrifying community structure. *Water Research*, 41 (20), 4710–4720. doi:10.1016/j.watres.2007.06.053
- Kuypers, M. M. M., Lavik, G. & Thamdrup, B. (2006). ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION IN THE MARINE ENVIRONMENT (Nato Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences). In L.N. Neretin (Hrsg.), *Past and Present Water Column Anoxia* (S. 311–335). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/1-4020-4297-3_13
- Lee, C., Fletcher, T. D. & Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*, 9 (1), 11–22. doi:10.1002/elsc.200800049

- Li, C., Hu, H.-W., Chen, Q.-L., Chen, D. & He, J.-Z. (2019). Comammox Nitrospira play an active role in nitrification of agricultural soils amended with nitrogen fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry*, 138, 107609. doi:10.1016/j.soilbio.2019.107609
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W. & Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 290–301. doi:10.1016/j.soilbio.2017.10.023
- Ligi, T. (2015, Oktober 9). *Bacterial community structure and its genetic potential for nitrogen removal in the soils and sediments of a created riverine wetland complex*. Thesis. Zugriff am 19.4.2022. Verfügbar unter: <https://dspace.ut.ee/handle/10062/48843>
- Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J.-K., Nölvak, H., Mitsch, W. J. et al. (2014). Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing (The Olentangy River Wetland Research Park: Two Decades of Research on Ecosystem Services). *Ecological Engineering*, 72, 56–66. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.09.007
- Ligi, T., Truu, M., Oopkaup, K., Nölvak, H., Mander, Ü., Mitsch, W. J. et al. (2015). The genetic potential of N₂ emission via denitrification and ANAMMOX from the soils and sediments of a created riverine treatment wetland complex (Special Issue: 5th international Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control). *Ecological Engineering*, 80, 181–190. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.072
- Ligi, T., Truu, M., Truu, J., Nölvak, H., Kaasik, A., Mitsch, W. J. et al. (2014). Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (nirS, nirK, and nosZ) abundances in a created riverine wetland complex (The Olentangy River Wetland Research Park: Two Decades of Research on Ecosystem Services). *Ecological Engineering*, 72, 47–55. doi:10.1016/j.ecoleng.2013.07.015
- Liu, S., Dai, J., Wei, H., Li, S., Wang, P., Zhu, T. et al. (2021). Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA) and Denitrification Pathways Are Leveraged by Cyclic AMP

- Receptor Protein (CRP) Paralogues Based on Electron Donor/Acceptor Limitation in *Shewanella loihica* PV-4. *Applied and environmental microbiology*, 87 (2), e01964-20. American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.01964-20
- 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 (18), e120–e120. doi:10.1093/nar/gkm541
- Ma, B., Wang, S., Cao, S., Miao, Y., Jia, F., Du, R. et al. (2016). Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances. *Bioresource Technology*, 200, 981–990. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.074
- Magalhaes, C. M., Machado, A., Frank-Fahle, B., Lee, C. K. & Cary, S. C. (2014). The ecological dichotomy of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the hyper-arid soils of the Antarctic Dry Valleys. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00515
- Mander, Ü., Tournebize, J., Espenberg, M., Chaumont, C., Torga, R., Garnier, J. et al. (2021). High denitrification potential but low nitrous oxide emission in a constructed wetland treating nitrate-polluted agricultural run-off. *Science of The Total Environment*, 779, 146614. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146614
- Marchal, R., Piton, G., Lopez-Gunn, E., Zorrilla-Miras, P., van der Keur, P., Dartée, K. W. J. et al. (2019). The (Re)Insurance Industry’s Roles in the Integration of Nature-Based Solutions for Prevention in Disaster Risk Reduction—Insights from a European Survey. *Sustainability*, 11 (22), 6212. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi:10.3390/su11226212
- Maul, J. E., Cavigelli, M. A., Vinyard, B. & Buyer, J. S. (2019). Cropping system history and crop rotation phase drive the abundance of soil denitrification genes nirK, nirS and

- nosZ in conventional and organic grain agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 273, 95–106. doi:10.1016/j.agee.2018.11.022
- Meinhardt, K. A., Stopnisek, N., Pannu, M. W., Strand, S. E., Fransen, S. C., Casciotti, K. L. et al. (2018). Ammonia-oxidizing bacteria are the primary N₂O producers in an ammonia-oxidizing archaea dominated alkaline agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 20 (6), 2195–2206. doi:10.1111/1462-2920.14246
- Meng, Q., Xu, X., Zhang, W., Cheng, L., Men, M., Xu, B. et al. (2019). Diversity and abundance of denitrifiers during cow manure composting. *Revista Argentina de Microbiología*, 51 (3), 191–200. doi:10.1016/j.ram.2018.08.003
- Mitsch, W. J. & Day, J. W. (2006). Restoration of wetlands in the Mississippi–Ohio–Missouri (MOM) River Basin: Experience and needed research. *Advances in coastal habitat restoration in the northern Gulf of Mexico*, 26 (1), 55–69. doi:10.1016/j.ecoleng.2005.09.005
- Nguyen, C. (2009). Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. In E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique & C. Alberola (Hrsg.), *Sustainable Agriculture* (S. 97–123). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-90-481-2666-8_9
- Pester, M., Schleper, C. & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology (Ecology and industrial microbiology / Special section: Archaea). *Current Opinion in Microbiology*, 14 (3), 300–306. doi:10.1016/j.mib.2011.04.007
- 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. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.1176985

- Reed, S. (1995). Natural systems for waste management and treatment. *Wetland System*. McGraw-Hill.
- 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 (12), 4704–4712. doi:10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. et al. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37 (6), e45–e45. doi:10.1093/nar/gkp045
- Saeed, T. & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112, 429–448. doi:10.1016/j.jenvman.2012.08.011
- Sarabi, S., Han, Q., Romme, A. G. L., de Vries, B., Valkenburg, R. & den Ouden, E. (2020). Uptake and implementation of Nature-Based Solutions: An analysis of barriers using Interpretive Structural Modeling. *Journal of Environmental Management*, 270, 110749. doi:10.1016/j.jenvman.2020.110749
- Scow, K. M. & Hicks, K. A. (2005). Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (3), 246–253. doi:10.1016/j.copbio.2005.03.009
- Seinfeld, J. H. & Pandis, S. N. (2016). *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*.

- Shen, M., Song, B., Zhou, C., Almatrafi, E., Hu, T., Zeng, G. et al. (2022). Recent advances in impacts of microplastics on nitrogen cycling in the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 815, 152740. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152740
- Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S.-W. & Wakagi, T. (2012). Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367 (1593), 1186–1194. doi:10.1098/rstb.2011.0335
- Shved, O., Petrina, R., Chervetsova, V. & Novikov, V. (2015). Enhancing efficiency of nitrogen removal from wastewater in constructed wetlands. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3 (6(75)), 63–68. doi:10.15587/1729-4061.2015.42451
- Šinkejeva, L. (2019). *Lämmastikuringega seotud mikrobioloogiliste protsesside potentsiaal põllumajandusliku reostuse eemaldamisel vabaveelises tehismärgalas*. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M. et al. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347 (6223), 1259855. American Association for the Advancement of Science. doi:10.1126/science.1259855
- Takeuchi, J. (2006). Habitat Segregation of a Functional Gene Encoding Nitrate Ammonification in Estuarine Sediments. *Geomicrobiology Journal*, 23, 75–87. doi:10.1080/01490450500533866
- Thamdrup, B. (2012). New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 43, 407–428. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048
- Thorslund, J., Jarsjo, J., Jaramillo, F., Jawitz, J. W., Manzoni, S., Basu, N. B. et al. (2017). Wetlands as large-scale nature-based solutions: Status and challenges for research,

- engineering and management. *Ecological Engineering*, 108, 489–497.
doi:10.1016/j.ecoleng.2017.07.012
- 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 5, 1357–64.
- Turk-Kubo, K., Achilles, K., Serros, T., Ochiai, M., Montoya, J. & Zehr, J. (2012). Nitrogenase (nifH) gene expression in diazotrophic cyanobacteria in the Tropical North Atlantic in response to nutrient amendments. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N, & Matsuguchi T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 177 (5), 1414–1417. American Society for Microbiology. doi:10.1128/jb.177.5.1414-1417.1995
- Upreti, K., Rivera-Monroy, V. H., Maiti, K., Giblin, A. E. & Castañeda-Moya, E. (2022). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) is marginal relative to denitrification in emerging-eroding wetlands in a subtropical oligohaline and eutrophic coastal delta. *Science of The Total Environment*, 819, 152942. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.152942
- US EPA, O. (2015, September 16). Guiding Principles for Constructed Treatment Wetlands: Providing for Water Quality and Wildlife Habitat. Collections and Lists, . Zugriff am 20.4.2022. Verfügbar unter: <https://www.epa.gov/wetlands/guiding-principles-constructed-treatment-wetlands-providing-water-quality-and-wildlife>
- Van Grinsven, H. J. M., Holland, M., Jacobsen, B. H., Klimont, Z., Sutton, M. a. & Jaap Willems, W. (2013). Costs and Benefits of Nitrogen for Europe and Implications for Mitigation. *Environmental Science & Technology*, 47 (8), 3571–3579. American Chemical Society. doi:10.1021/es303804g

- Vitousek, P. M., Menge, D. N. L., Reed, S. C. & Cleveland, C. C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1621), 20130119. Royal Society. doi:10.1098/rstb.2013.0119
- Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands (Contaminants in Natural and Constructed Wetlands: Pollutant Dynamics and Control). *Science of The Total Environment*, 380 (1), 48–65. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.014
- Vymazal, J. (2011). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. *Hydrobiologia*, 674 (1), 133–156. doi:10.1007/s10750-011-0738-9
- Wang, M., Huang, G., Zhao, Z., Dang, C., Liu, W. & Zheng, M. (2018). Newly designed primer pair revealed dominant and diverse comammox amoA gene in full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 270, 580–587. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.089
- Wang, X., Wang, S., Jiang, Y., Zhou, J., Han, C. & Zhu, G. (2020). Comammox bacterial abundance, activity, and contribution in agricultural rhizosphere soils. *Science of The Total Environment*, 727, 138563. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138563
- Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N. et al. (2015). Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *The ISME Journal*, 9 (9), 1954–1965. doi:10.1038/ismej.2015.9
- van Wesenbeeck, B. K., IJff, S., Jongman, B., Balog, S. A. B., Kaupa, S. M., Bosche, L. V. et al. (2017). Implementing nature based flood protection : principles and implementation guidance. World Bank Group.
- Wu, Y., Xi, X., Tang, X., Luo, D., Gu, B., Lam, S. K. et al. (2018). Policy distortions, farm size, and the overuse of agricultural chemicals in China. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 115 (27), 7010–7015. Proceedings of the National Academy of Sciences. doi:10.1073/pnas.1806645115
- WWF. (2017). Natural and Nature-Based Flood Management: A Green Guide | Publications | WWF. Verfügbar unter: <https://www.worldwildlife.org/publications/natural-and-nature-based-flood-management-a-green-guide>
- Xie, L., Bulkeley, H. & Tozer, L. (2022). Mainstreaming sustainable innovation: unlocking the potential of nature-based solutions for climate change and biodiversity. *Environmental Science & Policy*, 132, 119–130. doi:10.1016/j.envsci.2022.02.017
- Xu, Y., Zhang, W., Zhong, Z., Guo, S., Han, X., Yang, G. et al. (2019). Vegetation Restoration Alters the Diversity and Community Composition of Soil Nitrogen-Fixing Microorganisms in the Loess Hilly Region of China. *Soil Science Society of America Journal*, 83 (5), 1378–1386. doi:10.2136/sssaj2019.03.0066
- Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S. & Senoo, K. (2009). Temporal shifts in diversity and quantity of nirS and nirK in a rice paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (10), 2044–2051. doi:10.1016/j.soilbio.2009.07.012
- Zhang, X., Wu, Y. & Gu, B. (2015). Urban rivers as hotspots of regional nitrogen pollution. *Environmental Pollution*, 205, 139–144. doi:10.1016/j.envpol.2015.05.031
- Zhu, G., Wang, S., Feng, X., Fan, G., Jetten, M. S. M. & Yin, C. (2011). Anammox Bacterial Abundance, Biodiversity and Activity in a Constructed Wetland. *Environmental Science & Technology*, 45 (23), 9951–9958. American Chemical Society. doi:10.1021/es202183w
- Zhu, T. & Sikora, F. J. (1995). Ammonium and nitrate removal in vegetated and unvegetated gravel bed microcosm wetlands (Wetland Systems for Water Pollution Control 1994). *Water Science and Technology*, 32 (3), 219–228. doi:10.1016/0273-1223(95)00623-0

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Kuusk,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Lämmastikreostuse eemaldamise geneetiline potentsiaal vabaveelistes tehismärgalades“, mille juhendaja on Mikk Espenberg, 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 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.

Kadri Kuusk

27.05.2022