

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Magistritöö keskkonnatehnoloogias (30 EAP)

**Lämmastikuringega seotud mikrobioloogiliste protsesside potentsiaal  
põllumajandusliku reostuse eemaldamisel vabaveelises tehismärgalas**

Laurina Šinkejeva

Juhendaja: PhD Teele Ligi

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2019

## **Lämmastikuringega seotud mikrobioloogiliste protsesside potentsiaal põllumajandusliku reostuse eemaldamisel vabaveelises tehismärgalas**

Intensiivse põllumajandusliku tegevuse tõttu on kasvanud väetiste kasutamine, mille tulemusena on suurenenud pinna- ja põhjaveekogude saastumine liigsete toitainetega. Reostuse vähendamiseks on hakatud ehitatama tehismärgalasid, mis pakuvad tõhusat ja odavat lahendust toitainete vähendamiseks saastunud veekogudes. Mikrobioloogilistel protsessidel on suur tähtsus saasteainete eemaldamisel ning seetõttu on väga oluline mõista tegureid, mis mõjutavad neid mikroobikooslusi ja nende poolt läbiviidavaid protsesse.

Käesoleva magistritöö uurimiselaks oli 2010. aastal intensiivse põllumajanduslikku piirkonda ehitatud Rampilloni vabaveeline tehismärgala (Prantsusmaa). Kogutud setteproovidest määrati kvantitatiivse reaal-aja PCR meetodi abil mikrobioloogiliste lämmastikuringe protsesside (nitrifikatsioon, dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks, denitrifikatsioon, anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine) geneetiline potentsiaal ja tuvastati neid protsesse mõjutavad keskkonnaparametrid.

Märgalal tuvastati nii bakterite kui arhede poolne nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal ning kui arhede *amoA* geenide arvukus oli märgala lõikes ühtlane, siis bakterite *amoA* geenide arvukus oli kõrgem märgala madalama veetasemega aladel.

Tuvastatud lämmastikuringe protsesside geneetilise potentsiaali alusel järeldada, et lämmastikühendite eemaldamisel on peamine roll denitrifikatsioonil, kuid teatud kõrgema veetasemega piirkondades võivad sellesse panustada ka suhteliselt hiljuti avastatud anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv metaani oksüdeerimine.

Denitrifikatsiooniga seotud nitriti redutseerimise geneetiline potentsiaal oli suhteliselt ühtlane kogu tehismärgala ulatuses, samas dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaal oli kõrgem madalamate märgala osade setetes.

Märksõnad: *lämmastikuringe protsessid, põllumajanduslik hajureostus, mikrobioloogia*

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

## **The potential of microbiological processes related to nitrogen cycle to remove agricultural pollution in a surface flow constructed wetland**

Due to the intensive agricultural activity, the use of fertilizers has increased, resulting in increased surface and groundwater contamination by excess nutrients. In order to reduce the pollution, constructed wetlands have been proposed as efficient and cheap solution for reducing nutrients from contaminated waterbodies. Microbiological processes have a major role in the removal of pollutants from wastewater; therefore it is very important to study the composition of microbial communities and factors affecting the processes they conduct.

The current study was conducted at the Rampillon surface flow treatment wetland built in the intensive agricultural area in 2010 (France). Quantitative real-time PCR was used to measure the genetic potential of microbiological nitrogen cycle processes (nitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, denitrification, anaerobic ammonium oxidation and nitrite-dependent anaerobic methane oxidation) and environmental factors affecting those processes were determined.

In the studied wetland, the genetic potential of nitrification was confirmed based on the bacterial and archaeal *amoA* genes.

Results of this study indicate that denitrification play a major role in the removal of nitrogen compounds in the Rampillon's artificial wetland, but in some regions, especially with higher water levels, anaerobic ammonium oxidation and nitrite-dependent methane oxidation may also have certain contribution.

The genetic potential of denitrification-related nitrite reduction was relatively uniform across the treatment wetland, while the reduction potential of nitrous oxide was higher in the wetland section with lower water level.

*Keywords: nitrogen cycle, agricultural diffuse pollution, microbiology*

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

# Sisukord

<b>Lühendid</b> .....	6
<b>Sissejuhatus</b> .....	8
<b>1. Kirjanduse ülevaade</b> .....	10
<b>1.1. Tehismärgalad ja nendes toimuvad protsessid</b> .....	10
<b>1.2. Nitrifikatsioon ja seda mõjutavad tegurid</b> .....	13
<b>1.3. Denitrifikatsioon ja seda mõjutavad tegurid</b> .....	15
<b>1.4. Anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon ja seda mõjutavad tegurid</b> .....	17
<b>1.5. Dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks ja seda mõjutavad tegurid</b> 19	
<b>1.6. Nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine ja seda mõjutavad tegurid</b> ....	20
<b>2. Materjal ja metoodika</b> .....	21
<b>2.1. Prooviala kirjeldus</b> .....	21
<b>2.2. Gaasiemissioonide mõõtmine</b> .....	23
<b>2.3. Setteproovide kogumine</b> .....	24
<b>2.4. Setteproovide keemiline analüüs</b> .....	25
<b>2.5. DNA eraldamine setteproovidest</b> .....	25
<b>2.6. Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaja PCR meetodil</b> .....	26
<b>2.7. N-DAMO spetsiifilise 16S rRNA kaliiberkõvera valmistamine</b> .....	26
<b>2.8. Reaalaja PCR andmete analüüs ja märklaud geenikoopiate arvutamine</b> .....	28
<b>2.9. Andmeanalüüs</b> .....	29
<b>3. Tulemused</b> .....	30
<b>3.1. Prooviala keemilised parameetrid</b> .....	30
<b>3.2. Prooviala N<sub>2</sub>O gaasiemissioonid ja N<sub>2</sub> potentsiaalsed emissioonid</b> .....	31

<b>3.3. Prooviala arhede ja bakterite arvukused .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Lämmastikuringega seotud protsesside geneetiline potentsiaal uuritud proovialal</b>	<b>34</b>
<b>3.4.1. Nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal uuritud proovialal .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.2. Denitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal uuritud proovialal.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.3. DNRA, ANAMMOX-i ja N-DAMO geneetiline potentsiaal uuritud proovialal</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Lämmastikuringega seotud geeniparameetrite seosed keemiliste näitajatega ja gaasivoogudega uuritud proovialal.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6. Lämmastikuringega seotud geenikoopiate omavahelised suhted.....</b>	<b>45</b>
<b>4. Arutelu .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Kokkuvõte.....</b>	<b>53</b>
<b>Summary .....</b>	<b>55</b>
<b>Tänuavaldused .....</b>	<b>58</b>
<b>Kasutatud materjalid .....</b>	<b>59</b>

## Lühendid

16S rRNA – prokariotide ribosoomi väikeses alaühikus sisalduv ribosomaalne RNA

Amo – ammoniaagi monooksügenaas

*amoA* – ammoniaagi monooksügenaasi kodeeriv geen

*amoA*<sub>bak</sub>/*amoA*<sub>arh</sub> – bakterite ja arhede spetsiifiliste *amoA* geenikoopiate arvukuste suhe

*amoA*<sub>üld</sub> – bakterite ja arhede spetsiifiliste *amoA* geenikoopiate arvukuste summa

ANAMMOX – anaeroobne ammooniumiooni oksüdeerimine (*ANaerobic AMMonium Oxidation*)

ANOVA – dispersioonianalüüs (*Analysis Of Variance*)

*amx* – anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise spetsiifiline 16S RNA geen

*Ca* – *Candidatus*

*C*<sub>üld</sub> – üldsüsinik (*Total Carbon*)

DNRA – dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (*Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium*)

K – tehismärgala keskosa

KA – kuivaine

KL – tehismärgala keskosa lõunakallas

KP – tehismärgala keskosa põhjakallas

Nap – periplasmaatiline nitraadi reduktaas

Nar – membraanseoseline nitraadi reduktaas

N-DAMO – nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine (*Nitrite - Dependent Anaerobic Methane Oxidation*)

Nir – nitriti reduktaas

*nir* – nitriti reduktaasi kodeeriv geen

*nirK* – vaske sisaldavat nitriti reduktaasi (Cu-Nir) kodeeriv geen

*nirS* – tsütokroom cd-1 sisaldavat nitriti reduktaasi (cd1-Nir) kodeeriv geen

*nirS/nirK* – *nirS* ja *nirK* geenikoopiate arvukuste suhe

*nir*<sub>üld</sub> – *nirS* ja *nirK* geenikoopiate arvukuste summa

*nir*<sub>üld</sub>/*nosZ*<sub>üld</sub> – *nirS* ja *nirK* ning *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuste summade suhe

Nor – lämmastikoksiidi reduktaas

Nos – dilämmastikoksiidi reduktaas

*nosZI* – klaad I dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriv geen

*nosZI/nosZII* – *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuste suhe

*nosZII* – klaad II dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriv geen

*nosZ*<sub>üld</sub> – *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuste summa

*nrfA* – tsütokroom c nitriti reduktaasi kodeeriv geen

OA – orgaaniline aine

OC<sub>üld</sub> – kogu orgaaniline süsinik (*Total Organic Carbon*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

S – märgala sissevool

V – märgala väljavool

## Sissejuhatus

Kasvava rahvastiku tõttu on maailmas suurenenud intensiivse põllumajanduse osakaal ning selle tootlikkus, mis on saanud võimalikuks eelkõige tänu tööstuslikule lämmastiku fikseerimisele Haber-Boschi meetodil (Gruber ja Galloway 2008), aga lisaks ka fosforväetiste kasutamise suurenemisele (Dal Ferro *et al.*, 2018). Industrialiseerimisest alates on inimtegevus tugevalt mõjutanud lämmastikuringe tasakaalu: põllumajanduses kasutatavate väetiste tootmise käigus fikseeritakse tööstuslikult aastas 160 TgN, samas looduslikud N<sub>2</sub> fikseerimise protsessid seovad maismaal 110 TgN ja ookeanis 140 TgN (Gruber ja Galloway 2008; Canfield *et al.*, 2010). Inimtegevus suurendab õhulämmastiku fikseerimist ka fossiilsete kütuste põletamisega ning ulatusliku liblikõieliste taimede kasvatamisega tänu viimaste sümbioosile lämmastikku fikseerivate bakteritega (nt mügarbakterid perekonnast *Rhizobium*) (Thamdrup 2012; Canfield *et al.*, 2010). Kõik need protsessid on drastiliselt suurendanud looduslikesse ökosüsteemidesse sisenevate reaktiivsete lämmastikühendite hulka põhjustades ulatuslikke negatiivseid muutusi.

Intensiivsest põllumajanduslikust tegevusest tingitud toitainete leostumine ja ärakanne põhjustavad üleliigsete toitainete jõudmist veekeskkondadesse. Toitainete hulk sõltub suuresti nende kontsentratsioonist mullas ja äravoolus, mis omakorda on mõjutatud reostusallika tüübist, sesoonsusest, kliimast ja keskkonnatingimustest. Sellest tingituna uuritakse aina rohkem vabaveeliste tehismärgalade rakendamise võimalusi lämmastikureostuse eemaldamiseks ja nendes toimuvaid lämmastikuringe protsesse. Vabaveelised tehismärgalad on looduse suhtes väheinvasiivsed, säilitades looduslike elupaiku ning on madala energiatarve, hooldus- ja rajamiskuludega, eriti kui võrrelda klassikliste aktiivmudal põhinevate reoveepuhastusjaamadega või teist tüüpi tehismärgaladega (Lee *et al.*, 2009; Dal Ferro *et al.*, 2018).

Tehismärgalades toimub liigsete lämmastikühendite eemaldamine põhiliselt mikrobioloogiliste protsesside abil, kuid lisaks toimuvad ka erinevad füüsikalised ja keemilised protsessid nagu sadenemine, settimine ja filtreerimine, mis ühes bioloogiliste tegurite koosmõjul vähendavad veekeskkondada jõudvate saasteainete hulka (Vymazal ja Březinová 2018). Paljud lämmastikuringe protsessid avastati juba 19. sajandi lõpus, kuid 21. sajandil on arusaam nendest protsessidest muutunud ning on avastatud ka mitmeid uusi protsesse (Thamdrup 2012).



Kesk-Euroopas kasutatakse põllumajanduses väga palju väetiseid, et tagada võimalikult suur saagikus võimalikult väikesel maa-alal. Prantsusmaal Pariisi lähistel asuv Île-de-France piirkond on intensiivne põllumajanduslik ala, kus toimub laialdane väetiste kasutamine ning maakasutuse muutuste tõttu on vähenenud ka looduslikud biogeokeemilised reguleerimisprotsessid ning seetõttu on ohustatud sealse piirkonna põhjavee varud.

Käesoleva magistritöö uuritavaks objektiks oli Prantsusmaal Rampillonis asuv põllumajandusliku hajureostuse vähendamiseks ehitatud vabaveeline tehismärgala, millest kogutud proove kasutati erinevates mikrobioloogilistes, keemilistes ja füüsikalistes uuringutes. Magistritöö eesmärgiks oli määrata molekulaarsete meetodite abil erinevate lämmastikuringe protsesside (nitrifikatsioon, dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks, denitrifikatsioon, anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine) geneetiline potentsiaal ja hinnata nende protsesside omavahelist seost ja sõltuvust keskkonnaparameetritest vabavoolulises tehismärgalas Prantsusmaal Rampilloni piirkonnas.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Tehismärgalad ja nendes toimuvad protsessid

Suurenev vajadus toidu järgi on toonud endaga kaasa ulatusliku tööstuslikult toodetud väetiste tootmise ja kasutamise, mis omakorda on põhjustanud bioloogiliselt kättesaadava lämmastiku hulga suurenemise kõikides Maa ökosüsteemides (Gruber ja Galloway 2008). Suurenenud lämmastiku kogused põhjustavad veekogude eutrofeerumist, millega kaasnevad probleemid nagu näiteks ülemäärane veetaimestiku ja tsüanobakterite kasvamine (Ge *et al.*, 2015).

Üheks võimaluseks looduslike veekogude kaitsmiseks on tehismärgalade rajamine. Tehismärgalad sarnanevad looduslikele märgaladele ning on tõhusad alternatiivid tavapärastele reoveepuhastitele, kuna vajavad vähem ressursse (Lee *et al.*, 2009). Tänapäeval on tehismärgalade disainimise põhiliseks eesmärgiks luua selline kontrollitud keskkond, mis oleks sobilik eelkõige looduslikele puhastusprotsessidele.

Esimene reovee puhastamise eesmärgil disainitud tehismärgala rajati 1950ndatel aastatel Saksamaal ning see toimis edukalt 20 aastat (Wu *et al.*, 2015). Kui algselt uuriti tehismärgalade võimekust vaid olmereovee puhastamisel, siis tänapäeval on tehismärgalade kasutusvaldkond palju laiem. Nad leiavad kasutust nii põllumajandusliku ja tööstusliku reovee, kaevanduste äravoolu, prügilate heitvee, reostunud jõe- ja järvevee, kuid ka linnade ja maanteed äravoolu puhastamisel ning neid on välja töötatud väga erinevate kliimatingimuste jaoks (Wu *et al.*, 2015). Alates 1990ndatest on tehismärgalade arv hüppeliselt kasvanud (Lee *et al.*, 2009). Tänapäeval on tehismärgalaid Euroopas juba üle 50 000 ja Põhja-Ameerikas üle 10 000, samuti on neid rajatud päris palju ka Hiinas (Kadlec ja Wallace 2009; Wu *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018).

Tehislikud märgalad jagunevad kolme kategooriasse: 1) taastatud märgalad; 2) tehislikud märgalad, mille rajamise eesmärk ei ole seotud vee kvaliteedi parandamisega; 3) tehismärgalad, mille põhieesmärgiks on puhastada reostunud vett. Tehismärgalades toimub saastunud vee puhastamine taimede, keemilise sadenemise, settimise ja seal toimuvate mikrobioloogiliste protsesside koostoime kaudu (Vymazal 2007; Vymazal ja Březinová 2018). Kuna tehismärgalades on lämmastik jaotunud setete, vee ja biomassi vahel ning seal on ka bioloogiliste protsesside

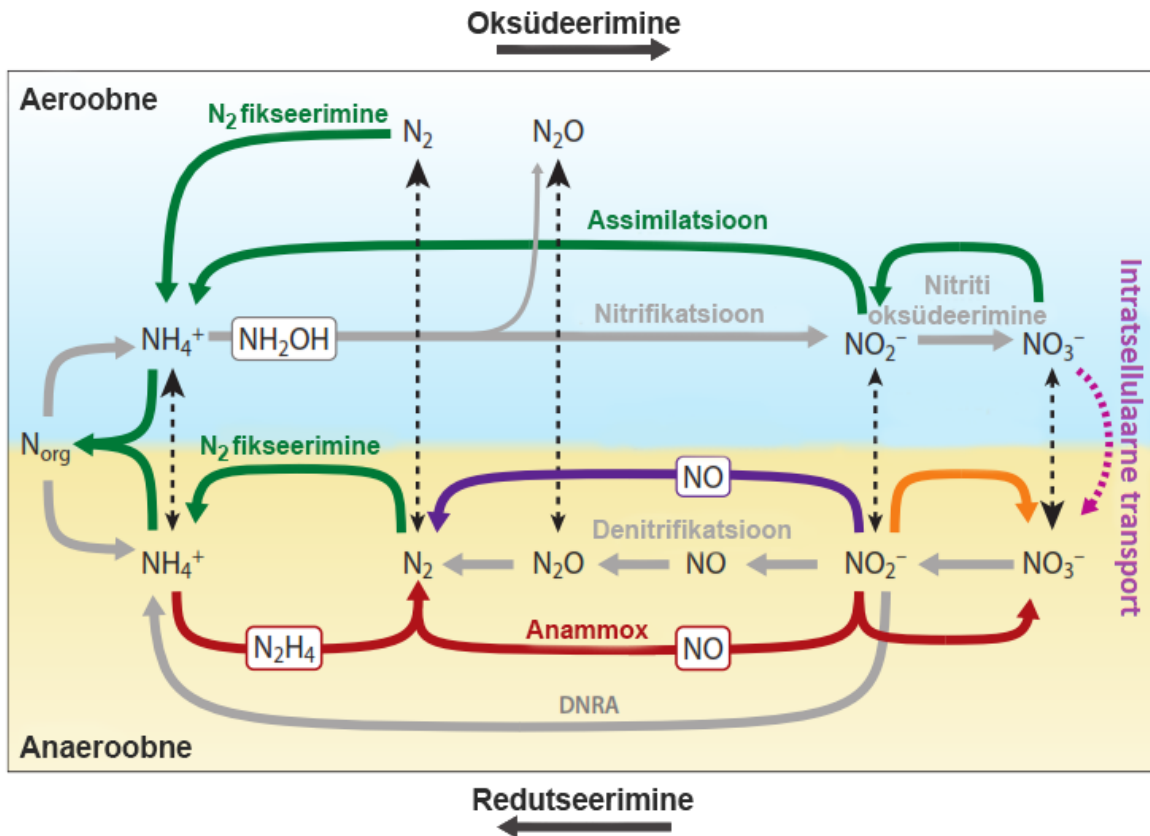
osakaal palju suurem kui tüüpilistes ökosüsteemides, muudetakse erinevad saasteained lihtsamateks toitaineteks ja enamasti keskkonnale ohututeks kõrvalsaadusteks ilma ulatuslikke ressursse (nt inimtööjõudu, fossiilseid kütuseid või kemikaale) vajamata (Kadlec ja Wallace 2009).

Tehismärgalad jagunevad hüdroloogia alusel vabaveelisteks ehk pinnavoolulisteks (*free water surface; surface flow*) ja läbivoolulisteks (*subsurface flow*) tehismärgaladeks (Kadlec and Wallace 2009; Lee *et al.*, 2009; Fonder and Headley 2013). Läbivoolulised tehismärgalad jagunevad omakorda horisontaalse veevooluga (*horizontal subsurface flow*) ja vertikaalse veevooluga (*vertical flow*) märgaladeks (Vymazal 2007; Lee *et al.*, 2009). Ehituslike iseärasuste tõttu liigub vabaveeliste tehismärgalade puhul vesi valdavalt horisontaalselt maapinna kohal ning need sarnanevad rohkem looduslikele märgaladele, samas läbivooluliste märgalade puhul liigub vesi sagedamini vertikaalselt või horisontaalselt läbi poorse vett läbilaskva filtermaterjali nagu näiteks liiv või kruus (Scholz *et al.*, 2005; Fonder ja Headley 2013).

Vabaveelised tehismärgalad sarnanevad kõige rohkem looduslikele märgaladele, kuna seal vahelduvad taimestatud alad taimestamata aladega ja vee sügavus märgala lõikes on varieeruv (tavaliselt 10–50 cm) ning sõltub tihti aastaajast (Fonder ja Headley 2013). Kõige levinumad taimeliigid vabaveelistes märgalades on hundinui (*Typha*) ja pilliroog (*Phragmites*) (Scholz *et al.*, 2005; Kadlec ja Wallace 2009; Vymazal 2013). Taimede puhul on tähtis nende märgalast eemaldamine, et neisse kogunenud toitained hilisema lagunemise käigus uuesti vette ei satuks, kuid samas vajavad neid toitaineid osaliselt ka mikroorganismid oma elutegevuseks (Kadlec ja Wallace 2009; Vymazal 2013). Vabaveeliste tehismärgalade puhul on tähtis kontrollida vee sügavust, et säilitada soovitud taimeliikidele sobilikud hüdroloogilised tingimused. Lisaks on vabaveeliste tehismärgalade korral probleemiks ka keeruline hüdrauliline juhitavus, sest veepinnale ulatuv taimestik mõjutab veevoolu suunda (Kadlec ja Wallace 2009). Vabaveelised märgalad on sobilikuks elukeskkonnaks väga paljudele looduslikes märgalades elutsevatele liikidele (Scholz *et al.*, 2005). Vältimaks inimeste kokkupuudet olemreovees esinevate patogeenidega, kasutatakse vabaveelisi märgalaid valdavalt esmaste puhastusetaappide järgselt (nt aktiivmudal põhinevad süsteemid) (Kadlec ja Wallace 2009). Vabaveelised tehismärgalad sobivad peaaegu kõikides kliimavöötmetes, kuigi külmemates piirkondades ja jahedamatel perioodidel on puhastusprotsessid aeglasemad (Kadlec ja Wallace 2009).

Tehismärgalade üheks peamiseks rakendusvaldkonnaks on põllumajanduses kasutatavate väetiste poolt põhjustatud hajureostuse vähendamine. Tehismärgalades toimub fosfori eemaldamine adsorptsiooni, kompleksühendite moodustamise ja sadestamise kaudu ning lisaks toimuvad ka settimine ja taimede poolne toitainete omastamine. Süsiniku ühendite vähenemine märgalasse sisenevas vees toimub mikroobse tarbimise (nt mineralisatsioon, fermentatsioon ja metanogenees), filtratsiooni ja sedimentatsiooni kaudu. Samuti toimuvad mitmesugused mikroobsed protsessid, millel on oluline koht lämmastikuühendite ja lämmastikuväetistest tingitud reostuse eemaldamisel (Gorgoglione ja Torretta 2018). Lämmastikuringe on märgalades seotud ka süsinikuringe protsessidega, kuna bioloogiliselt kättesaadav süsiniku hulk on tähtis lämmastiku eemaldamisega seotud mikroorganismidele nende elutegevuseks (Gruber ja Galloway 2008). Seega on nende protsesside reguleerimine ökosüsteemides väga oluline, kuna see võib viib globaalsete kliimamuutusteni.

Lämmastikuringe on osa keerulisest biogeokeemilisest tsüklist, hõlmates väga erinevaid orgaanilisi ja anorgaanilisi lämmastiku vorme (Vymazal 2007). Lämmastiku kättesaadavus on kontrollitud lämmastiku fikseerimise ja fikseeritud lämmastiku ringlusse võtu vahel dissimilatsiooni protsesside kaudu (Thamdrup 2012). Põhilised lämmastikuvormid tehismärgalades on lahustunud nitraat ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ja ammooniumioon ( $\text{NH}_4^+$ ). Eelnimetatud ühendid omavad suurt mõju just veeökosüsteemides, kuna on taimede ja mikroorganismide poolt kergesti omastatavad (Lee *et al.*, 2009). Gaasiline lämmastik võib märgalades esineda dilämmastiku ( $\text{N}_2$ ), dilämmastikoksiidi ( $\text{N}_2\text{O}$ ), lämmastikdioksiididi ( $\text{NO}_2$ ), dilämmastiktetraoksiidi ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) ja ammoniaagi ( $\text{NH}_3$ ) kujul (Vymazal 2007). Peamised tehismärgalades toimuvad mikrobioloogilised lämmastikuringe protsessid on assimilatsioon, ammonifikatsioon, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, lämmastiku fikseerimine ja dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (DNRA), kuid üha rohkem on hakatud uurima märgalades ka hiljuti avastatud anaeroobset ammooniumi oksüdeerimist (ANAMMOX) (Vymazal 2007; Kadlec ja Wallace 2009) ning nitritist sõltuvat anaeroobset metaani oksüdeerimist (N-DAMO) (Hu *et al.*, 2014). Kaks viimati mainitud protsessi koos denitrifikatsiooniga on teadaolevalt ainukesed protsessid, mille lõpp-produktiks on molekulaarne lämmastik.. Lämmastikuringe protsessid tehismärgalal on kujutatud joonisel 1.



**Joonis 1.** Lämmastikuringe protsessid. Metaboolsed protsessid on märgitud mustade, assimilatsiooni protsessid roheliste ja dissimilatsiooni protsessid hallide nooltega. Katkendlikud nooled viitavad protsesside vahelisele ainete vahetustele ja transpordile (Thamdrup 2012 järgi).

## 1.2. Nitrifikatsioon ja seda mõjutavad tegurid

Nitrifikatsiooni käigus muundavad mikroorganismid ammooniuminitraadiks, kasutades elektronide doonorina anorgaanilisi süsiniku ühendeid ja aktseptorina hapnikku ning protsessis ülejäävat energiat kasutatakse elutegevuseks (Ge *et al.*, 2015). Nitrifikatsioon on kaheastmeline aeroobne oksüdatsiooni protsess, mis avastati 19. sajandi teises pooles, kui isoleeriti ammooniumit nitritiks oksüdeeriv bakter *Nitrosomonas* ja nitritit nitraadiks oksüdeeriv bakter *Nitrobacter*. (Smil, 2004) Enamikes keskkondades toimubki nitrifikatsioon erinevatest mikroorganismidest koosnevate kogumite koostoimel, mis konkureerivad üksteisega energia saamise nimel ja nitriti eest, vastavalt siis ammooniumi oksüdeerivad (valem 1) ja nitritit oksüdeerivad (valem 2) organismid (Kuypers *et al.*, 2018).



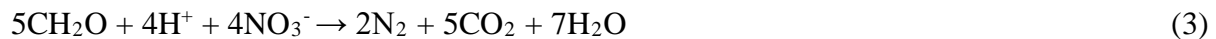
Nitrifikatsiooni esimeses etapis oksüdeerivad kõik teadaolevad aeroobsed ammooniumi oksüdeerivad bakterid ja arhed ammooniumi ammoniaagi monooksügenaasi (Amo) vahendusel hüdroksüülamiiniks ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) ja seejärel viiakse see üle lämmastikoksiidi nitritiks, kuid raja viimaseid etappe kodeerivad ensüümid on veel täpselt teadmata (Kuypers *et al.*, 2018). Amo on membraaniseoseline vaske sisaldav ensüüm, mida kodeerivad *amoC*, *amoA* ja *amoB* geenid (Ge *et al.*, 2015), milledest nitrifikatsiooni markergeenina kasutatakse *amoA* geeni (Ge *et al.*, 2015; B. Li *et al.*, 2018). Teatud tingimustel võib nitrifikatsiooni esimese etapi kõrvalproduktina emitteerida keskkonda ka kasvuhoonegaas  $\text{N}_2\text{O}$ . Nitrifikatsiooni teiseks etapiks on nitriti oksüdeerimine nitraadiks ning selle protsessi võtmeensüümiks on nitriti oksidoreduktaas (Nxr) (Ge *et al.*, 2015). Enamasti kuuluvad nitrifitseerijad *Proteobacteria* hõimkonna erinevatesse klassidesse, mille esindajaid võib leida paljudest keskkondadest nagu väetatud pinnasest ja reoveepuhastitest (Kuypers *et al.*, 2018).

Märgalades soodustavad madalama veega alad nitrifikatsiooni toimumist, kuna nitrifikatsiooni mõlemas etapis on vaja aeroobset keskkonda ja lahustunud hapniku kontsentratsioon keskkonnas on üks põhilisi nitrifikatsiooni kontrollivaid tegureid (Kadlec ja Wallace 2009). Lisaks lahustunud hapniku kontsentratsioonile mõjutavad nitrifikatsiooni positiivselt keskkonna kõrgem temperatuur, fosfori sisaldus üle 0,2 mg/L ning madal C/N suhe.

Nagu denitrifikatsiooni korral esineb mittetäielikku denitrifikatsiooni (Graf *et al.*, 2014), viivad nitrifikatsiooni läbi enamasti mittetäielikud nitrifitseerijad (Kuypers *et al.*, 2018), kuid on ka erandeid. Hiljuti muutus arusaam nitrifikatsioonist kui vaid kahe erineva organismide grupi koostoimel läbiviidavast protsessist, sest avastati täielikult ammooniuminitraadiks oksüdeerivad bakterid, mille esindaja on näiteks "*Candidatus (Ca) Nitrospira inopinata*". Antud bakterid suudavad hästi konkureerida ka teiste ammooniumit oksüdeerivate bakteritega, kuid uuringud on näidanud, et nad oksüdeerivad ammooniumit efektiivsemalt kui nitritit (Stein ja Klotz 2016; Kuypers *et al.*, 2018).

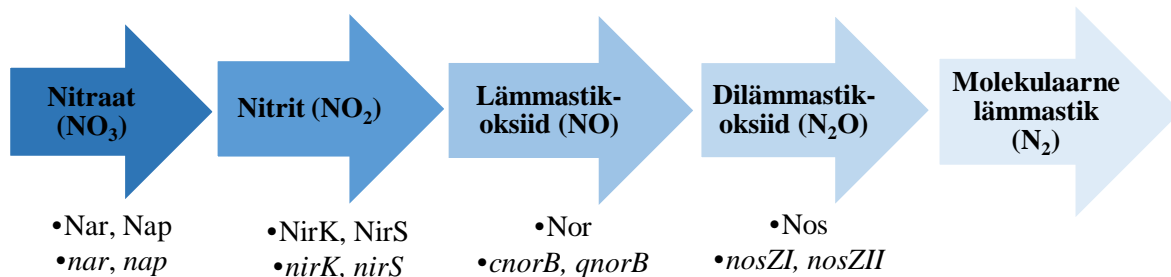
### 1.3. Denitrifikatsioon ja seda mõjutavad tegurid

Denitrifikatsioon on fakultatiivne anaeroobne protsess, mille käigus mikroorganismid redutseerivad nitraadi või nitriti läbi mitmete vaheetappide dilämmastikoksiidiks või molekulaarseks lämmastikuks kasutades elektronide doonorina orgaanilisi ühendeid (valem 3). Kui keskkonnas leidub piisavalt hapnikku, siis eelistavad denitrifitseerijad kasutada lämmastikühendite asemel elektronide aktseptorina hapnikku (Zumft 1997; Kadlec ja Wallace 2009; García-Lledó *et al.*, 2011).



Denitrifikatsiooni käsitletakse tihti ka lämmastiku fikseerimise vastandprotsessina (Zumft 1997) ning see võime on leitud nii bakterite, arhede (Graf *et al.*, 2014; Zumft 1997) kui ka seente esindajate hulgas (Maeda *et al.*, 2015). Kõige levinumad keskkonnas denitrifikatsiooni läbi viivad bakteriperekonnad on *Pseudomonas*, *Bacillus* ja *Alcaligenes* (Vymazal 2007).

Täielik denitrifikatsiooni rada koosneb neljast eraldiseisvast intratsellulaarsest ensüümist (mööda metabolismimirada nitraadist molekulaarse lämmastiku suunas liikudes): nitraadi reduktaas (Nar ja/või Nap), nitriti reduktaas (Nir), lämmastikoksiidi reduktaas (Nor) ja dilämmastikoksiidi reduktaas (Nos) (Zumft 1997). Denitrifikatsiooni rada koos vaheühendite redutseerimisel osalevate ensüümidega ning neid kodeerivate geenidega on toodud joonisel 2 (Thamdrup 2012).



**Joonis 2.** Denitrifikatsiooni rada koos iga vaheühendi redutseerimisel osalevate ensüümidega ning neid kodeerivad geenid (kursiivis) (Thamdrup 2012 alusel).

Esimest denitrifikatsiooniraja protsessi, nitraadi redutseerimist nitritiks võivad katalüüsida kaks erinevat nitraadi reduktaasi: periplasmaatiline nitraadi reduktaas, (kodeeritud *nap* geeni poolt) või membraaniseoseline nitraadi reduktaas (kodeeritud *nar* geeni poolt) (Zumft 1997). *Nar* ja *nap*

geenid võivad esineda lisaks denitrifikatsiooni rajas ka DNRA protsessis, mistõttu ei kasutata neid markergeenidena denitrifikatsiooni uurimisel (Saggar *et al.*, 2013).

Nitriti redutseerimist lämmastikoksiidiks viivad läbi mikroorganismid, mis omavad *nirS* või *nirK* geeni poolt kodeeritud nitriti reduktaasi. Kaks nitriti reduktaasi erinevad oma struktuuri poolest: *nirS* geeni poolt kodeeritud nitriti reduktaas sisaldab tsütokroom  $cd_1$  ning *nirK* geeni poolt kodeeritud nitriti reduktaas vaske (Cu) (Zumft 1997). Mõlemad Nir ensüümid on periplasmaatilised ning asuvad mitokondri sise- ja välismembraani vahelises alas (Saggar *et al.*, 2013). Nitriti redutseerimist läbiviivatel mikroorganismidel on enamasti kas *nirS* või *nirK* geen, kuid mõned organismid omavad mõlemat tüüpi nitriti reduktaasi kodeerivat geeni. Nir geenid on laialdaselt kasutusel denitrifikatsiooni hindamise markergeenina (Graf *et al.*, 2014).

Lämmastikoksiidi reduktsiooni dilämmastikoksiidiks katalüüsivad kaks erinevat membraaniseoselist heem-vaske oksüdaasi tüüpi lämmastikoksiidi reduktaasi, mis on kodeeritud kas *cnorB* või *qnorB* geeni poolt. *NorB* geenide homolooge on leitud ka patogeenidest, mis ei ole võimelised denitrifikatsiooni läbi viima, aga ka anaeroobsetest denitrifitseerivatest metanotroofidest, seetõttu pole need ensüümid suure metaboolse varieeruvuse tõttu denitrifikatsiooni uurimiseks kõige sobilikumad (Graf *et al.*, 2014).

Teadaolevalt suudavad  $N_2O$  redutseerimist  $N_2$ -ks läbi viia ainult mikroobid, mis omavad kas *nosZ* klaad I või *nosZ* klaad II geeni poolt kodeeritud dilämmastikoksiidi reduktaasi (Jones *et al.*, 2013). Nos ensüümid asuvad mitokondri periplasmaatilise ruumi sise- ja välismembraani vahelises alas (Saggar *et al.*, 2013). Enamasti kuuluvad *nosZI* geeni omavad organismid *Proteobacteria* hõimkonda ja ka arhede hulka, kuid genoomsed uuringud on näidanud, et *nosZII* geeni omavad organismid on väga varieeruva fülogeneetilise taustaga ning kuuluvad väga erinevatesse hõimkondadesse (Jones *et al.*, 2013). Osad denitrifitseerivad mikroorganismid ei oma *nosZ* gene ning nende elutegevuse tõttu emiteerub keskkonda  $N_2O$  (Stein ja Klotz 2016). Denitrifitseerijate genoomsete järjestuste uuringud on näidanud, et *nirS* geeni omavatel organismidel on genoomis suurema tõenäosusega ka *nosZ* geen võrreldes *nirK* geeni omavate organismidega, mis näitab, et *nirS* geeniga denitrifitseerijad on tõenäolisemalt võimelised kogu denitrifikatsiooni protsessi ise läbi viima ja seega tootma vähem kasvuhoonegaasi  $N_2O$ . Samas paljud denitrifitseerijad osalevad denitrifikatsioonis vaid osaliselt, kas ühes või enamas, aga mitte igas denitrifikatsiooni raja etapis, viies seega läbi mittetäielikku denitrifikatsiooni (Graf *et al.*, 2014). Osad *nosZ* geeni omavad



organismid kasutavad heterotroofse kasvu jaoks vajaliku energia saamiseks elektronaktseptorina rakuvälist N<sub>2</sub>O-d, kuid enamasti need organismid ei suuda redutseerida kogu keskkonnas tekkivat diämmastikoksiidi (Zumft 1997; Saggar *et al.*, 2013).

Denitrifikatsiooni mõjutavad erinevad keskkonnaparaameetrid, mida võib jaotada kaudseteks ja otsesteks regulaatoriteks. Kaudsed regulaatorid nagu vegetatsioon, mulla pH ja tekstuur ning vee sisaldusreguleerivad kooslust pikema aja vältel, samas otsesed regulaatorid nagu nitraadi ja hapniku kontsentratsioon, süsiniku kättesaadavus ja temperatuur mõjutavad koosluseid koheselt, kuid nende paraameetrite seosed denitrifikatsiooniga pole päris selged ning nõuavad edasist uurimist (Kadlec ja Wallace 2009; Saggar *et al.*, 2013). Kui denitrifikatsioon toimub anoksilistes tingimustes, näiteks märjas pinnases, siis enamasti on valdavaks lõpp-produktiks N<sub>2</sub>, kuid tekib ka teatud hulgal ohtlikku kasvuhoonegaasi N<sub>2</sub>O (Canfield *et al.*, 2010). N<sub>2</sub>O ja N<sub>2</sub> suhet mõjutab ka pinnase happelisus: mida happelisem on keskkond, seda rohkem emiteerub lämmastikdioksiidi, kuid neutraalse või veidi aluselise pH korral on N<sub>2</sub>O osakaal väiksem. Täielikku denitrifikatsiooni soodustavad ka kõrgem mulla temperatuur, madalam hapniku sisaldus ning kättesaadava orgaanilise süsiniku ning mineraalse lämmastiku olemasolu (Saggar *et al.*, 2013).

#### 1.4. Anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon ja seda mõjutavad tegurid

Anaeroobse ammooniumi oksüdatsiooni (*ANAerobic AMMonium OXidation* – ANAMMOX) käigus muundatakse ammoonium ja nitrit veeks ja diämmastikgaasiks (valem 4) (Mulder *et al.*, 1995).



ANAMMOX bakterid on autotroofid, mis kasutavad erinevalt denitrifitseerijatest anorgaanilist süsiniku allikat (Lee *et al.*, 2009). Protsess avastati 1990ndatel aastatel (Mulder *et al.*, 1995), mil leiti unikaalset "anammosoom" organelli omavate bakterite klaad. See muutis arusaama lämmastikuringest, kuna varasemalt teati, et ammoonium on vaid anaeroobse lagundamise lõpp-produkt ning edasised muundamisprotsessid toimuvad vaid hapniku ning ammooniumi oksüdeerivate bakterite abil (Thamdrup 2012). Tänapäeval kuuluvad kõik ANAMMOX-i protsessi läbiviivad bakterid *Planctomyces* hõimkonda kuuluvasse *Brocadiales* seltsi (Strous *et al.*, 1999;

Stein ja Klotz 2016). Seni on tuvastatud viis ANAMMOX bakterite perekonda ("*Ca Brocadia*", "*Ca Kuenenia*", "*Ca Scalindua*", "*Ca Anammoxoglobus*" ja "*Ca Jettenia*") ning erinevatel perekondadel on erinevad keskkonnatingimuste eelistused (Zhao *et al.*, 2018). Need on ka ainukesed teadaolevad bakterid, mis omavad *hzsA* ja *hzsB* geenide poolt kodeeritud Hzs ensüümi, mis aktiveerib ammoniumiooni anaeroobselt (Kuypers *et al.*, 2018). Hzs on ka ainus teadaolev ensüüm, mis tekitab N-N sidemeid kahest eraldiseisvast lämmastikühendist ning mille tulemusena tekib vaheühendina hüdrasiini (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Kuypers *et al.*, 2018). Teiseks ANAMMOX-i protsessi vaheühendiks on lämmastikoksiid (Stein ja Klotz 2016). Hüdrasiin oksüdeeritakse edasi dilämmastikgaasiks hüdrasiin dehüdrogenaasi (Hdh) poolt (Kuypers *et al.*, 2018). ANAMMOX bakterites leiduv "anammoxosoom" on teadaolevalt ainus prokariootidel leiduv membraaniseoselise struktuuriga organell, milles asuvad kõik anaeroobse ammoniumi oksüdatsiooni läbiviivad ensüümid (Kuypers *et al.*, 2018). Lisaks sisaldavad ANAMMOX bakterite membraanid unikaalseid "ladderane" lipiide, mis omavad vedelikulaadseid omadusi ja võimaldavad membraanide tihedat pakkimist kaitstes rakku toksiliste vaheühendite eest (Boumann *et al.*, 2009).

ANAMMOX protsess sõltub ammoniumi vabanemisest orgaanilise aine mineralisatsiooni käigus ja nitriti kättesaadavusest keskkonnas (Thamdrup 2012). Võrreldes tavapärastelt reoveepuhastuses kasutatavate nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsessidega on ANAMMOX-i eelisteks madalam hapniku vajadus, energiasäästlikkus ning protsess ei vaja orgaanilist süsiniku allikat, samas nõuab kõrgemat temperatuuri ning erinevate substraatide nagu sulfiid ja nitrit esinemine reovees mõjub inhibeerivalt. Lisaks sõltub ANAMMOX protsess keskkonna tingimustest ning täielikuks ammoniumi eemaldamiseks peab ammoniumi ja nitraadi suhe olema 1/1,32 (Saeed ja Sun 2012). Waki ja teised (2015) leidsid, et ANAMMOX protsessi aktiivsus oli kõrgem vabaveelise tehismärgala taimestatud ja pidevalt veega kaetud aladel ja kõrgema NO<sub>2</sub> kontsentratsiooni korral keskkonnas.

Hapnikuvaestes ookeanide piirkondades on ANAMMOX-i protsessil suur tähtsus, sest üle 1000 meetri sügavustes piirkondades moodustab ANAMMOX-i protsessi käigus tekkinud N<sub>2</sub> kuni 70% kogu tekkivast N<sub>2</sub>-st (Thamdrup 2012) toimides seega lämmastikureostuse eemaldajana (Stein ja Klotz 2016). ANAMMOX protsessi on tuvastatud ka väga erinevates maismaa ja magevee ökosüsteemides, näiteks mägitundras (Zhao *et al.* 2018), väetatud riisipõllul (Zhu *et al.*, 2011), jõgedes, märgalades ja järvedes (Humbert *et al.*, 2012; Thamdrup 2012). Märgalades ja

mageveelistes veekogudes moodustab ANAMMOX protsessis tekkinud  $N_2$  < 1–28% kogu tekkinud diämmastikgaasi emissioonist (Thamdrup 2012). ANAMMOX-il on tähtis koht ka tehismärgalades toimuvates protsessides (Canfield *et al.*, 2010; Kadlec and Wallace 2009; Waki *et al.*, 2015), kuna selle protsessi käigus eemaldatakse nitriti ja ammooniumi korruga, aga samal ajal ei teki juurde ohtlikku kasvuhoonegaasi  $N_2O$  ning lisaks kasutatakse ANAMMOX-i protsessi tööstuslikult lämmastikreostuse eemaldamisel (Stein ja Klotz 2016). Kui keskkonnas vahelduvad oksilised ja anoksilised tingimused, siis on võimalik osalise nitrifikatsiooni ja ANAMMOX-i sümbioos, mis ei vaja orgaanilise süsiniku olemasolu ning sellisel puhul on võimalik puhastada kõrge ammooniumi kontsentratsiooniga reovett (Kuypers *et al.*, 2018).

### **1.5. Dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks ja seda mõjutavad tegurid**

Dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks (*Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium* – DNRA) on heterotroofne protsess, mis toimub anaeroobsetes tingimustes (Scott *et al.*, 2008). Mõnedes bakterites on DNRA fermentatsiooni protsess, kuid enamikes looduslikes keskkondades toimub see energiasäästlikuma hingamisprotsessina. DNRA protsessis kasutatakse elektrondonorina orgaanilist ainet, vesinikku, rauda, sulfiidi või metaani ja protsessi võtmeensüümiks on *nrfAH* geenide poolt kodeeritud periplasmaatiline tsütokroom c nitriti reduktaas (Kuypers *et al.*, 2018). Kõrvalproduktina võib DNRA käigus keskkonda emiteeruda ka  $N_2O$ -d (Simon *et al.*, 2012). Antud protsessi võivad läbi viia väga erinevat tüüpi organismid nagu bakterid, arhed, seened ja vetikad (Thamdrup 2012; Kuypers *et al.*, 2018). DNRA võib olla seotud ka nitraadi redutseerimisega nitritiks, kas ühe raku tasandil või koosluses olevate organismide vahel (Stein ja Klotz 2016).

Kuigi DNRA olulisuse kohta keskkonnas on suhteliselt vähe teada, siis antud protsessil on täheldatud olulist tähtsust nitraadi eemaldamisel veekogude setetes, kus on piisaval hulgal kättesaadavat süsinikku (Scott *et al.*, 2008). Lisaks leidsid Scott ja teised (2008) tehismärgala hõlmanud uuringus, et DNRA toimumine oli kõige aktiivsem suvel, kui veetemperatuur oli üle 30°C.

## 1.6. Nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine ja seda mõjutavad tegurid

Looduslikes ja tehismärgalades tekib  $N_2$  lisaks denitrifikatsioonile ja ANAMMOX-ile ka nitritist sõltuva anaeroobse metaani oksüdeerimise (*Nitrite-dependent anaerobic methane oxidation – N-DAMO*) teel (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2018). N-DAMO protsessi käigus redutseeritakse nitrit lämmastikoksiidiks, mis seejärel muudetakse arvatavasti lämmastikoksiidi dismutaasi kaudu molekulaarseks lämmastikuks ja hapnikuks ning tekkinud hapnikku kasutatakse aeroobseks metaani oksüdeerimiseks. Varasemalt arvati, et  $N_2$  tekib vaid dilämmastikoksiidi reduktaasi vahendusel denitrifikatsiooni protsessi käigus (Hu *et al.*, 2014). N-DAMO protsessi kirjeldatakse ka kui intra-aeroobset denitrifikatsiooni, kuna see toimub nii oksilises kui ka anoksilises keskkonnas ning lisaks eelistavad bakterid nitraadi asemel nitritit metaani oksüdeerimisel (Ettwig *et al.*, 2010). Esimesena seostati selle protsessiga vaid hõimkonda *NC10* kuuluvat anaeroobset metanotroofset bakteriliiki "*Ca Methylomirabilis oxyfera*-t". "*Ca M. oxyfera*" isoleeriti ühe Hollandi kraavi setetest ning seetõttu võib arvata, et ta võib osaleb ka märgalades toimuvates protsessides (Ettwig *et al.*, 2010). Lisaks on "*Ca M. oxyfera*" sarnaseid 16S rRNA geene tuvastatud ka teistest mikroorganismidest mis omavad *pmoA* geeni poolt kodeeritud metaani monookügenaasi ning neid kutsutakse "*Ca M. oxyfera*" sarnasteks bakteriteks (Hu *et al.*, 2014).

N-DAMO protsess on väga oluline ja unikaalne avastus, kuna see seob omavahel süsiniku- ja lämmastikuringe ning aitab vähendada ka metaani emissiooni atmosfääri (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2014). Veel ei ole teada, kui suur osakaal on "*Ca M. oxyfera*" ja temaga sarnastel bakteritel keskkonnas toimuvates protsessides, kuna nende kohta on veel vähe informatsiooni ja olemasolevad arvukuste andmed on kohati vastuolulised (Xu *et al.*, 2018).

## 2. Materjal ja metoodika

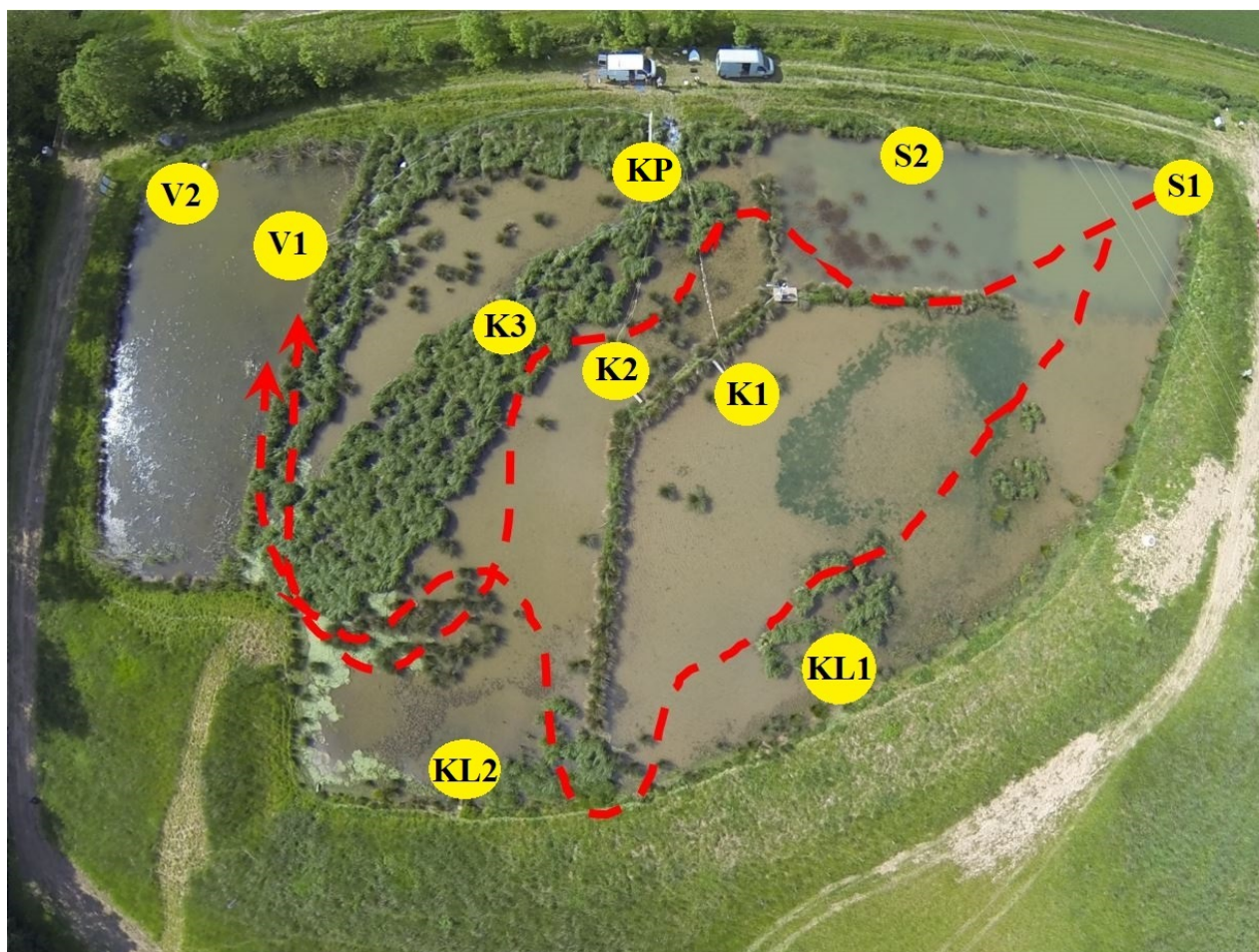
### 2.1. Prooviaala kirjeldus

Käesoleva magistritöö prooviaala asub Prantsusmaa põhjaosas Île-de-France piirkonnas Rampilloni külas (48°32'160N, 03°03'37E) Pariisist 80 km kaugusel kagu suunas. 2010. aastal ehitatud vabaveelise tehismärgala rajamise eesmärgiks oli välja töötada täiendavaid meetodeid, et vähendada Seine ja Marne valgla suudmes intensiivse põllumajandustegevuse tagajärgedel tekkinud hajureostust Champigny'i põhjaveekihis (Seine et Marne, Prantsusmaa). Champigny põhjaveekiht on peamine Pariisi äärelinnade põhjaveevaru, millest saab joogivee üle 1,5 miljoni elaniku 1700 km<sup>2</sup> suurusel alal. Selle piirkonna põhjavesi on suurel määral mõjutatud karstilistest pinnavormidest, mille kaudu jõuab reostus põhjavette: ligikaudu 70% igal-aastal juurde tekkivast põhjaveest imbub looduslike karstilehtrite kaudu otseselt pinnaveest või vooluveekogudest põhjavette (Tournebize *et al.*, 2012).

Rampilloni tehismärgala pindala on 5270 m<sup>2</sup> ja maht 2500 m<sup>3</sup> ning keskmine veesügavus on 38 cm. Põllumajanduslik reovesi pärineb 355 ha suuruselt valgalalt. Tehismärgala asub osaliselt eraldatud sissevooluga kuivenduskraavi kõrval. Vegetatsiooniperioodil juhitakse kuivenduskraavi vesi tehismärgalase ning väljaspool seda perioodi ei ole kraavis voolav vesi otseselt märgalaga seotud (joonis 3). Märgalasse siseneva vee kogust reguleeritakse sissevoolus asuva lüüsi kaudu (eriti oluline veerohkel perioodil) ning veevool märgalasse varieerub vahemikus 0–120 L/s. Piirkonna keskmine aastane õhtutemperatuur on 10,5 °C, keskmine sademete hulk 689 mm ning potentsiaalne aurustumine 679 mm. Märgala vees sisalduvad nitraadi kogused märgala sissevoolus, kahes keskosa punktis ja väljavoolus mais ja novembris 2014 ning märtsis ja oktoobris 2015 on toodud tabelis 1.

Tehismärgala on jaotatud kolmeks: sissevoolus asuv settetiik, keskosas asuv muutuva veetasemega tsoon ning väljavoolu osas asuv kõrgema veetasemega ala. Märgalal kasvavateks põhilisteks taimeliikideks on pilliroog (*Phragmites australis*), sinihall-luga (*Juncus inflexus*), kallastarn (*Carex riparia*), keraluga (*Juncus conglomeratus*), kevadtarn (*Carex caryophyllea*), laialeheline hundinui (*Typha latifolia*) ja soo-vesitähk (*Callitriche palustris*), mis kõik kokku

katavad ligikaudu 20% kogu märgala pinnast. Üle kogu märgala on levinud ka filamentsed mikrovetikad.



**Joonis 3.** Rampilloni tehismärgala koos proovivõtukohtadega. Nooled näitavad veevoolu suunda märgalas. Proovipunktide tähistused: S – sissevool (punktid S1 ja S2), väljavool – V (punktid V1 ja V2), keskosa lõunakallas – KL (punktid KL1 ja KL2), keskosa – K (punktid K1, K2 ja K3) ning keskosa põhjakallas – KP.

**Tabel 1.** Vee nitraadi kogused (mg/L) erinevatel ajahetkedel neljast märgala mõõtmiskohast.

Aeg	Sissevool	Keskosa 1	Keskosa 2	Väljavool
Mai 2014	30	15	10	7
November 2014	51	49	45	39
Märts 2015	52	48	45	44
Oktoober 2015	45	40	35	30

## 2.2. Gaasiemissioonide mõõtmine

N<sub>2</sub>O emissioonide mõõtmised proovialal toimusid vahetult enne setteproovide kogumist dünaamilise suletud kambri meetodil (Rochette *et al.*, 1997). Mõõtekampaaniad viidi läbi järgmistel perioodidel: 16.–21. mai (keskmine õhutemperatuur 25 °C) ja 18.–23. november 2014 (keskmine õhutemperatuur 9 °C), 11.–16. märts (keskmine õhutemperatuur 7 °C) ja 19.–26. oktoober 2015 (keskmine õhutemperatuur 12 °C) ning 4.–11. mai 2017. Gaasiproovid koguti 12 ujuva mõõtesüsteemiga, kus oli kasutusel 12 automaatkambrit (30 x 40 x 40 cm) (Foto 1). Kambreid kasutati paarikaupa, mis tähendab, et igas proovivõtukohas (S2, K1, K2, K3, PK, V2), oli kasutusel kaks kambrit (ühe proovivõtukoha gaasivoo hindamiseks keskmistati mõlemast kambrist mõõdetud lõppväärtused). Mõõtesüsteemi oli ühendatud N<sub>2</sub>O analüsaator (Quantum Cascade Laser, Aerodyne, USA), millega mõõdeti 1Hz (1 mõõtmine sekundis) sagedusega gaasi kontsentratsiooni muutust kambri. Automaatset kambrite sulgumist ja avanemist juhtis mõõtesüsteemis ajareelega multiplekser. Korruga oli suletud üks kamber ning mõõteaeg oli kõikide kambrite puhul 6 minutit, millest esimene minut kulus süsteemi läbi puhastamisele värskes õhuga.



**Foto 1.** Paarikaupa ujuv automaatkambersüsteem (Foto: Kaido Soosaar).

Gaasivoogude mõõtmiseks üle terve märgala, viidi lisaks läbi kohtades kust automaatkambritega polnud võimalik mõõta (KL1, KL2, V1, S1), , gaasiproovide kogumine manuaalse staatilise pimekambri meetodil (Hutchinson ja Livingston 1993). Mõõtmistel kasutati valgeid (vältimaks

kambri õhu soojenemist) vees hõljuvaid PVC-kambreid mahuga 65 L, diameetriga 50 cm ja kõrgusega 40 cm. Gaasiproovid koguti kõikidel mõõtekampaaniatel kolmel päeval kaks korda päevas (hommikul ja õhtul). Gaasiproovid koguti kambri tunni aja jooksul 20 minutiliste intervallidega eelnevalt laboris vakumeeritud 50 ml klaaspudelitesse. Proovitsükli alguses võeti kambri esimene alproov, et fikseerida kambri oleva gaasi algkontsentratsioon ja seejärel 20 minutiliste intervallidega järgmised kolm proovi. Gaasiproovid analüüsiti gaaskromatograafia (elektron-detektori (ECD) ja leekionisatsiooni detektoriga (FID) varustatud gaaskromatograaf Shimadzu 2014 GC) Tartu Ülikooli geograafia osakonna aineringete uurimislaboris. Mõlemal meetodil saadud kontsentratsiooni muutustest arvutati N<sub>2</sub>O vood lineaarse seose põhjal ning korrigeeriti vastavalt kambri pindalale ja mahule.

Setteproovide N<sub>2</sub> potentsiaalne voog mõõdeti kambrimeetodil Tartu Ülikooli Geograafia osakonna laboris. Mullapuuriga koguti iga proovivõtu ajal terassilindritesse mullakehad (Ø9cm) viielt sügavuselt (0–6; 6–12; 12–18; 18–24; 24–30 cm) ning hoiustati jahutis +4 °C juures. Terassilindrid asetati ühest otsast avatuna õhukindlatesse silindritesse ning proove voolutati läbi kunstliku gaasiseguga (0,3 ppb N<sub>2</sub>O, 1,8 ppm CH<sub>4</sub>, 6 ppm N<sub>2</sub>, 350 ppm CO<sub>2</sub> ja He) samal temperatuuril, mis esines iga sügavuse välistingimustes. Tagamaks kogu õhu vahetumine gaasisegu, kestis läbipesu 36h. Silindrite väljavoolus mõõdeti voolutamise ajal gaasikontsentratsiooni gaaskromatograafiaga ning N<sub>2</sub> mõõtmiseks suleti silindri väljavool kaheks tunniks ja mõõdeti kontsentratsioonis toimunud muutused iga 40 minuti tagant kahe tunni jooksul (kokku neli mõõtmist). Seejärel analüüsiti saadud proovid samuti gaaskromatograafiaga. N<sub>2</sub> potentsiaalne gaasivoog arvutati lineaarse kontsentratsiooni muutuse alusel.

Gaasiproovide mõõtmise ja analüüsi viisid läbi Tartu Ülikooli Geograafia osakonna töötajad ja antud magistritöö autor selles ei osalenud.

### **2.3. Setteproovide kogumine**

Proovide kogumine tehismärgalast toimus vahetult enne gaasimõõtmisi. Proovivõtukohtad (joonis 3) valiti vastavalt hüdroloogilistele parameetritele ja püsivatele gaasimõõtmispunktide asukohtadele. Iga kampaania käigus koguti kümme setteproovi (kokku 50 proovi). Setteproovid



koguti ülemisest 0–10 cm mullakihist kasutades proovivõtu puuri (Eijkelkamp, Holland). Proove säilitati keemiliste analüüside jaoks +4°C ja DNA eraldamiseni -20°C juures.

Setteproovid koguti Tartu Ülikooli Geograafia osakonna töötajate poolt ja antud magistritöö autor setteproovide kogumises ei osalenud.

#### **2.4. Setteproovide keemiline analüüs**

Proovide  $pH_{KCl}$ , üldlämmastiku ( $N_{\text{üld}}$ ), nitraatlämmastiku ( $NO_3-N$ ), ammooniumlämmastiku ( $NH_4-N$ ), kaaliumi (K), fosfori (P), kaltsiumi (Ca), magneesiumi (Mg) ja orgaaniline aine (OA) väärtused määrati Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia laboris vastavalt standardmeetoditele. Setteproovide üldsüsiniku ( $C_{\text{üld}}$ ) ja kogu orgaaniline süsiniku ( $OC_{\text{üld}}$ ), väärtused määrati Tartu Ülikooli Geograafia osakonna biogeokeemia laboris kasutades Vario TOC aparati (Elementar GmbH, Saksamaa).

#### **2.5. DNA eraldamine setteproovidest**

Setteproovidest DNA eraldamiseks kasutati komplekti PowerSoil® DNA Isolation Kit (Qiagen, USA) lähtudes tootjapoolsest juhendist. DNA eraldati 0,25 g eelnevalt läbisegatud setteproovist. Erinevalt tootja juhendist kasutati homogeniseerimiseks ja rakkude lüüsimiseks homogenisaatorit Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa), millega töödeldi proove 20 sekundi jooksul 5000 pööret minutis. DNA kogusaagise suurendamiseks pesti DNA filtrilt välja kahes etapis: 1) filtrile lisati 80 µl C6 lahust ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 sekundit 10000 x g juures; 2) filtrile lisati 20 µl C6 lahust ning tsentrifuugiti 30 sekundit 10000 x g juures. Eraldatud DNA proove säilitati edasiste analüüside jaoks -20 °C juures.

## 2.6. Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaaja PCR meetodil

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni abil (*quantitative Polymerase Chain Reaction* – qPCR) määrati setteproovide bakterite ja arhede 16S rRNA, nitrifitseerivate bakterite ja arhede *amoA*, denitrifikatsiooniga seotud *nirS*, *nirK*, *nosZI* ja *nosZII*, ANAMMOX ja N-DAMO bakterite spetsiifilise 16S rRNA ning DNRA-ga seotud *nrfA* geenide arvukused.

Kõigi qPCR reaktsioonide läbiviimiseks kasutati Rotor-Gene Q masinat (Qiagen, USA). Reaktsioone viidi läbi kasutades 10 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), päri ja vastasuunalist geenispetsiifilist praimerit, 1 µl eraldatud DNA-d ja ülejäänud mahus steriliseeritud destilleeritud vett. Kõiki proove amplifitseeriti kolmes korduses ning igale mõõtmisele lisati kolm negatiivset kontrollproovi, mis sisaldasid kõiki reaktsioonisegu komponente välja arvatud DNA. Geenispetsiifilised praimerid ja nende kontsentratsioonid, geenifragmentide pikkused ja qPCR programmid on esitatud tabelis 2. Kontrollimaks amplifitseeritud geeniproductide spetsiifilisust, viidi vahetult peale amplifikatsiooni lõppu läbi qPCR productide sulamiskõverate analüüs (60–95 °C, samm; 0,35 °C/3 s).

## 2.7. N-DAMO spetsiifilise 16S rRNA kaliiberkõvera valmistamine

N-DAMO spetsiifilise 16S rRNA geeni kvantifitseerimise standardina kasutati vektorit pEX-A128 (kontsentratsioon  $10^9$  geenikoopiat/µl), kuhu oli eelnevalt kloonitud antud geeni vastav sünteetiline fragment (Eurofins MWG, Saksamaa). Sellest tehti 10-kordsete lahjenduste rida vahemikus  $10^8$ – $25$  geenikoopiat 10 µl reaktsioonisegu kohta ning optimeeritud reaktsioonitingimusi kasutades määrati vastavad fluorestsentsi väärtused.

**Tabel 2.** Töös kasutatud qPCR praimerid, optimaalsed praimerite kontsentratsioonid, qPCR programmid ning kasutatud standardite vahemikud.

Märklaud-geen	Praimer	Amplikoni pikkus (bp)	Praimeri kontsentratsioon ( $\mu\text{M}$ )	Viide	qPCR programm	Kasutatud standardi vahemik
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	530	0,6	Liu <i>et al.</i> , 2007	95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45s	10 <sup>8</sup> -10 <sup>6</sup>
	Bact1028R			Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008		
Arhede 16S rRNA	Arc519F	393	0,6	Espenberg <i>et al.</i> , 2016	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30s	10 <sup>7</sup> -10 <sup>5</sup>
	Arch910R					
<i>nirS</i>	<i>nirSC1F</i>	431	0,8	Wei <i>et al.</i> , 2015; Kandeler <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s; 58°C 30 s; 72°C 30s, 80°C 30 s <sup>a</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>3</sup>
	<i>nirSR3cd</i>					
<i>nirK</i>	FlaCu	473	0,8	Hallin ja Lindgren 1999	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 15 s <sup>a</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>4</sup>
	R3Cu					
<i>nosZI</i>	<i>nosZ2F</i>	267	0,6	Henry <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 61°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 15 s <sup>a</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>3</sup>
	<i>nosZ2R</i>					
<i>nosZII</i>	<i>nosZIIF</i>	~700	0,6	Jones <i>et al.</i> , 2013	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s, 80°C 30 s <sup>a</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>6</sup>
	<i>nosZIIR</i>					
Bakterite <i>amoA</i>	<i>amoA-1F</i>	491	0,8	Rotthauwe ja Witzel 1997	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 57°C 45 s, 72°C 45 s	10 <sup>4</sup> -50
	<i>amoA-2R</i>					
Arhede <i>amoA</i>	CrenamoA 23F	~600	0,8	Tourna <i>et al.</i> , 2008	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s	10 <sup>5</sup> -10 <sup>2</sup>
	CrenamoA 616R					
ANAMMOX spetsiifiline 16S rRNA	A438F	248	0,6	Humbert <i>et al.</i> , 2012	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 51°C 30 s, 72°C 30 s	10 <sup>4</sup> -12
	A684R					
<i>nrfA</i>	6F	222	0,8	Takeuchi 2007	95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s	100-25
	6R					
N-DAMO spetsiifiline 16S rRNA	pq2F	292	0,8	Ettwig <i>et al.</i> , 2009	95 °C 10 min, 45 tsükli: 95 °C 15 s, 60°C 30 s, 72 °C 30 s, 80 °C 30 s <sup>a</sup>	1000-25
	pq2R					

<sup>a</sup> – Fluoresents signaali mõõtmine

## 2.8. Reaalaja PCR andmete analüüs ja märklaud geenikoopiate arvutamine

Rotor-Gene Q masina andmeid analüüsiti vastava tarkvaraprogrammiga Rotor-Gene Q Series Software (v 2.0.2) (Qiagen, USA). Analüüsil võeti arvesse iga proovi kolme paralleeli amplifikatsioonikõverate ühtsust ning sulamiskõverate paiknemist ja kuju.

Iga proovi geenifragmentide individuaalse paljundamise efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR (v 2018.0) (Holland) (Ruijter *et al.*, 2009). Kõikide geenide puhul kontrolliti proovide grupeerumist amplifikatsiooni efektiivsuste alusel kasutades ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (*one-way* ANOVA) kasutades programmi STATISTICA (v 7.1). Statistiliselt olulised erinevused esinesid bakterite 16S rRNA ja *nirS* ( $p < 0.05$ ), *nirK* ( $p < 0.01$ ) ja arhede 16S rRNA, *nosZII* ja bakterite *amoA* ( $p < 0.001$ ) geenide amplifikatsioonide efektiivsuses erinevate proovivõtu aegade vahel ning selle alusel jagati setteproovid viieks amplikoniks proovivõtu aja alusel.

Geenikoopiate arvukuse leidmiseks (välja arvatud N-DAMO spetsiifiline 16S rRNA geen) kasutati kaliiberkõvera vahemikke, mis kattusid proovide amplifikatsioonikõverate asukohtadega ning mille puhul oli proovi paralleelide koopiaarvude standardhälbe väärtus kõige väiksem.

Rakendades Ruijter *et al.*, (2009) väljatoodud valemit (5), arvutati proovi märklaudgeeni kontsentratsiooni (A) ja vastava standardi erinevate punktide kontsentratsioonide (B) vaheline kordusaste:

$$\text{Kordusaste} = N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_A^{\text{Ct},A}) / (N_{t,B} / E_B^{\text{Ct},B}) \quad (5)$$

kus,

- $N_{0,A}$  - märklaudgeeni A algkontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes
- $N_{0,B}$  - märklaudgeeni kontsentratsioon standardlahjenduses fluorestsentsühikutes
- $N_t$  - fluorestsentsi läviväärtus
- $E$  - amplikoni keskmine amplifikatsiooni efektiivsus
- $C_t$  - fluorestsentsi läviväärtuseni jõudmiseks vajalike tsüklite arv

Geenikoopiate arvukuste leidmiseks korrutati iga proovi kordusaste väärtus vastava standardilahjenduse geenikoopiate arvuga. Lõplik geenikoopiate arvukus igas proovis leiti kasutades standardi erinevate punktide alusel arvutatud koopiaarvude aritmeetilist keskmist. Märklaudgeenide koopiaarvud on esitatud ühe grammi sette kuivaaine kohta (koopiat/gKA).

Lisaks arvutati vastavalt bakterite ja arhede 16S rRNA, bakterite ja arhede *amoA*, *nirS* ja *nirK* ning *nosZI* ja *nosZII* geenikoopiate arvukuste summeerimisel prokarüootide, *amoA* (*amoA*<sub>üld</sub>), *nir* (*nir*<sub>üld</sub>) ja *nosZ* (*nosZ*<sub>üld</sub>) geenide üldarvkused. Erinevate *amoA*, *nir*, ja *nosZ* geenide omavahelise suhte hindamiseks kasutati vastavate geenide jagatise (vastavalt *amoA*<sub>bak</sub>/*amoA*<sub>arth</sub>, *nirS*/*nirK* ja *nosZI*/*nosZII*). Dilämmastikgaasi ja nitriti reduktaasi omavahelise suhte hindamiseks kasutati *nir*<sub>üld</sub> ja *nosZ*<sub>üld</sub> väärtuste jagatist (*nir*<sub>üld</sub>/*nosZ*<sub>üld</sub>). Eelnevate programmide tulemuste süstematiseerimiseks, koondamiseks ning koopiaarvude arvutamiseks kasutati programmi MS Excel 2016.

## 2.9. Andmeanalüüs

Kogutud setteproovid grupeeriti vastavalt: 1) märgala piirkondadele sissevoolust väljavoolu suunas: sissevoolu (S1, S2), keskosa (KL1, KL2, K1, K2, K3, KP) ja väljavoolu (V1, V2) piirkond; 2) märgala osadele põhja ja lõuna suunas: põhjapoolne osa (S1, S2, KP, V1, V2) ja lõunapoolne osa (KL1, KL2, K1, K2, K3). Lisaks grupeeriti vastavalt proovivõtu aegadele (mai ja november 2014, märts ja oktoober 2015 ning mai 2017) ning hooajaliselt ehk kevadine (mai 2014, märts 2015 ja mai 2017) ja sügisene (november 2014 ja oktoober 2015) periood .

Keemiliste, geeniparameetrite ning gaasiemissioonide gruppidevaheliste erinevuste leidmiseks kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallis dispersioonanalüüsi ja keskmiste astakute mitmest võrdlust. Erinevate uuritud parameetrite omavaheliste seoste testimiseks rakendati Spearman'i korrelatsioonikoefitsienti. Statistilised analüüsid viidi läbi kasutades programmi Statistica v 7.1 (StatSoft. Inc., USA).

### 3. Tulemused

#### 3.1. Prooviala keemilised parameetrid

Rampilloni tehismärgala setteproovide keemiline koostis varieerus nii ajaliselt kui ruumiliselt uurimisala lõikes ning keemiliste parameetrite keskväärtused ja standardhälved on toodud tabelis 3.

Setteproovide  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  väärtused olid vahemikus 6,98–7,82 ning madalamad väärtused tuvastati mais 2017 ja oktoobris 2015 võrreldes ülejäänud uuritud ajahetkedega ( $p < 0,001$ ).

Üldlämmastiku, nitraadi ja ammooniumi kontsentratsioonid varieerusid setteproovides vastavalt vahemikus 0,10–0,36%, 0,02–8,49 mg/kg ning 0,11–135,78 mg/kg. Kui  $\text{NH}_4\text{-N}$  kontsentratsioonides ei leitud olulist muutust ajas, siis  $\text{N}_{\text{üld}}$  väärtused olid kõrgemad ja  $\text{NO}_3\text{-N}$  väärtused madalamad mais 2017 ( $p < 0,001$ ). Nitraadi väärtused olid märgala lõikes väga erinevad nii ajas kui ruumis: kui oktoobris varieerusid analüüsitud setteproovide nitraadi väärtused vahemikus 0,04–8,49 mg/kg (variatsioonikoefitsient 160%), siis mais 2017 olid  $\text{NO}_3\text{-N}$  väärtused enamikes setteproovides allpool määramispiiri.  $\text{NH}_4\text{-N}$  puhul esinesid madalamad väärtused märgala keskosas ( $13,23 \pm 20,60$  mg/kg) võrreldes sisse- ja väljavoolu osadega (vastavalt  $58,21 \pm 33,44$  ja  $58,81 \pm 27,61$  mg/kg) ning lõunaosas ( $14,38 \pm 22,07$ ) võrreldes põhjaosaga ( $48,30 \pm 34,01$ ) (mõlema puhul  $p < 0,001$ ).

Kui kaaliumi kontsentratsioon erines uuritud märgala settes uurimisperioodi lõikes ligi kaks korda ( $120,10\text{--}247,10$  mg/kg), siis fosfori kontsentratsioonid varieerusid rohkem, erinedes 5,5 korda ( $41,40\text{--}229,11$  mg/kg). Kui proovide K ja P väärtuste puhul ei tuvastatud ajalist muutust uurimisperioodi jooksul, siis märgala lõikes tuvastati madalamad P kontsentratsioonid sissevoolu alal (vastavalt  $127,06 \pm 40,62$  mg/kg) võrreldes keskosaga (vastavalt  $185,10 \pm 27,22$  mg/kg) ( $p < 0,001$ ), samas K väärtused olid kõrgemad väljavoolu piirkonnas ( $209,65 \pm 25,53$ ) võrreldes märgala sissevoolu ja keskosaga (vastavalt  $176,16 \pm 30,59$  ja  $179,43 \pm 26,70$  mg/kg) ( $p < 0,05$ ). Lisaks esinesid kõrgemad P väärtused märgala põhjaosas ( $184,88 \pm 29,07$  mg/kg) ja K väärtused lõunaosas ( $196,20 \pm 31,46$  mg/kg) võrreldes vastasosadega (vastavalt  $157,86 \pm 37,69$  mg/kg ja  $173,43 \pm 22,83$  mg/kg) (mõlemal korral  $p < 0,05$ ).

Analüüsitud setteproovides olid magneesiumi ja kaltsiumi kontsentratsioonid vastavalt vahemikus 52,00–161,80 mg/kg ja 1084,60-4348,50 mg/kg. Kui Mg väärtused olid madalamad 2014. aastal võrreldes ülejäänud proovikordadega, siis Ca korral tuvastati madalamad väärtused oktoobris 2015 (mõlemal korral  $p < 0,001$ ).

Üldsüsiniku, kogu orgaanilise süsiniku ja orgaanilise aine väärtused varieerusid prooviala lõikes vastavalt vahemikus 1,20–5,70%, 0,69–3,20% ja 1,30–5,22%. Kui  $C_{\text{üld}}$  ja orgaanilise aine väärtused olid madalamad esimestel proovikordadel võrreldes viimastega, siis  $OC_{\text{üld}}$  väärtused olid madalamad märtsis 2015 võrreldes prooviperioodi alguse ja lõpuga ( $p < 0,001$ ). Testitud märgala proovigruppide lõikes statistiliselt olulist erinevust antud parameetrite väärtustes ei tuvastatud.

### **3.2. Prooviala N<sub>2</sub>O gaasiemissioonid ja N<sub>2</sub> potentsiaalsed emissioonid**

Proovialalt kogutud N<sub>2</sub>O gaasiemissioonide ja setete N<sub>2</sub> potentsiaalsete emissioonide keskvaartused ja standardhälved on toodud tabelis 3.

N<sub>2</sub>O gaasiemissioonid varieerusid prooviala ja proovivõtu perioodide lõikes vahemikus -1,01–17,10 µgN/m<sup>2</sup>h. Võrreldes teiste proovikordadega mõõdeti kõrgemad N<sub>2</sub>O emissioonid novembris 2014, samas kõige rohkem negatiivseid N<sub>2</sub>O emissioone esines mais 2017 (seitsmes proovipunktis). N<sub>2</sub>O puhul olid erinevused hooajalisel jagunemisel, kus sügise proovivõtu kordadel olid väärtused kõrgemad ( $p < 0,01$ ).

Setteproovide N<sub>2</sub> potentsiaalsed emissioonid olid väga varieeruvad prooviala lõikes jäädes vahemikku 0,03–19,77 mgN/m<sup>2</sup>h. Madalamad potentsiaalse N<sub>2</sub> emissiooni väärtused esinesid proovialal oktoobris 2015 võrreldes kahe varasama proovivõtu korraga, samas kõrgemad väärtused esinesid märgala põhjaosas (4,46±4,10 mgN/m<sup>2</sup>h) võrreldes lõunaosaga (2,34±1,93 mgN/m<sup>2</sup>h) ( $p < 0,01$ ).

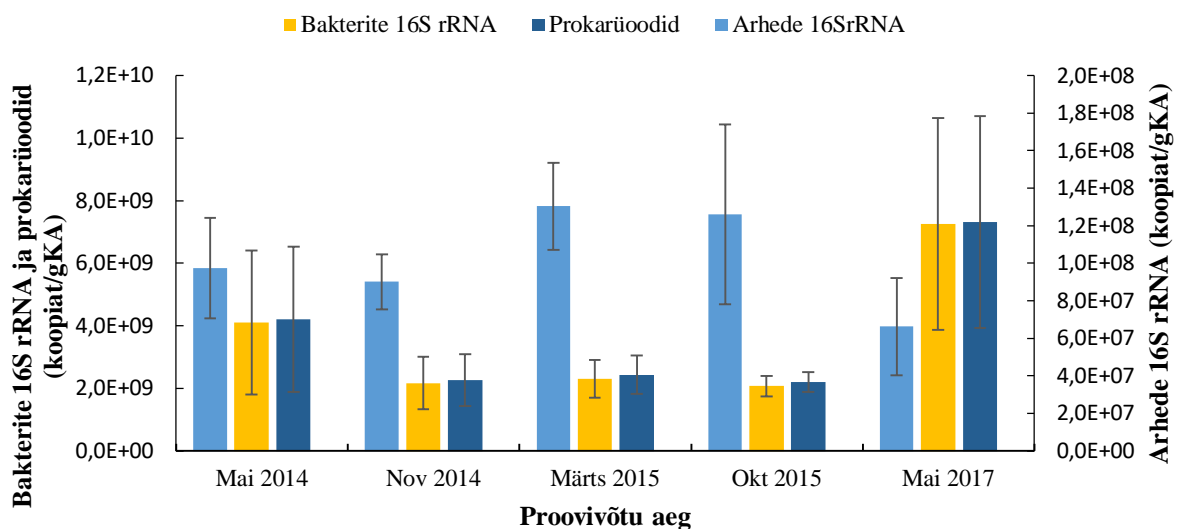
**Tabel 3.** Setteproovide keemiliste parameetrite keskväärtused koos standardhälvetega kogu prooviala lõikes vastavalt proovivõtu ajale.

<b>Proovivõtu aeg</b>	<b>pH<sub>KCl</sub></b>	<b>N (%)</b>	<b>NO<sub>3</sub>-N (mg/kg)</b>	<b>NH<sub>4</sub>-N (mg/kg)</b>	<b>P (mg/kg)</b>	<b>K (mg/kg)</b>	<b>Ca (mg/kg)</b>	<b>Mg (mg/kg)</b>	<b>OM (%)</b>	<b>C<sub>üld</sub> (%)</b>	<b>OC<sub>üld</sub> (%)</b>	<b>N<sub>2</sub>-N (mgN/m<sup>2</sup>h)</b>	<b>N<sub>2</sub>O (µgN/m<sup>2</sup>h)</b>
<b>Mai 2014</b>	7,61 ± 0,12	0,13 ± 0,02	0,53 ± 0,48	14,84 ± 16,09	187,76 ± 36,52	189,06 ± 28,88	3759,94 ± 270,74	66,88 ± 5,58	2,41 ± 0,35	1,96 ± 0,40	1,55 ± 0,41	4,16 ± 5,92	0,81 ± 1,21
<b>November 2014</b>	7,55 ± 0,11	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,21	26,26 ± 26,90	170,18 ± 35,01	189,21 ± 23,77	3567,43 ± 248,39	66,73 ± 8,30	2,20 ± 0,27	2,22 ± 0,44	1,32 ± 0,12	5,46 ± 2,22	9,72 ± 4,42
<b>Märts 2015</b>	7,55 ± 0,13	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,26	31,83 ± 29,81	164,83 ± 46,47	200,33 ± 32,75	3629,92 ± 222,49	83,44 ± 10,84	2,52 ± 0,32	2,37 ± 1,04	1,15 ± 0,12	3,61 ± 1,27	3,24 ± 1,50
<b>Oktoober 2015</b>	7,31 ± 0,12	0,16 ± 0,03	1,72 ± 2,75	39,02 ± 52,47	175,23 ± 29,42	167,72 ± 33,21	1459,38 ± 261,32	83,84 ± 8,63	3,05 ± 0,61	3,06 ± 1,07	1,67 ± 0,45	1,44 ± 2,68	1,60 ± 1,51
<b>Mai 2017</b>	7,18 ± 0,14	0,23 ± 0,07	0,02 ± 0,07	44,75 ± 27,58	158,86 ± 30,55	177,78 ± 22,05	3587,08 ± 105,74	108,82 ± 24,89	3,67 ± 1,21	3,44 ± 1,15	2,12 ± 0,60	2,34 ± 1,15	2,34 ± 1,15

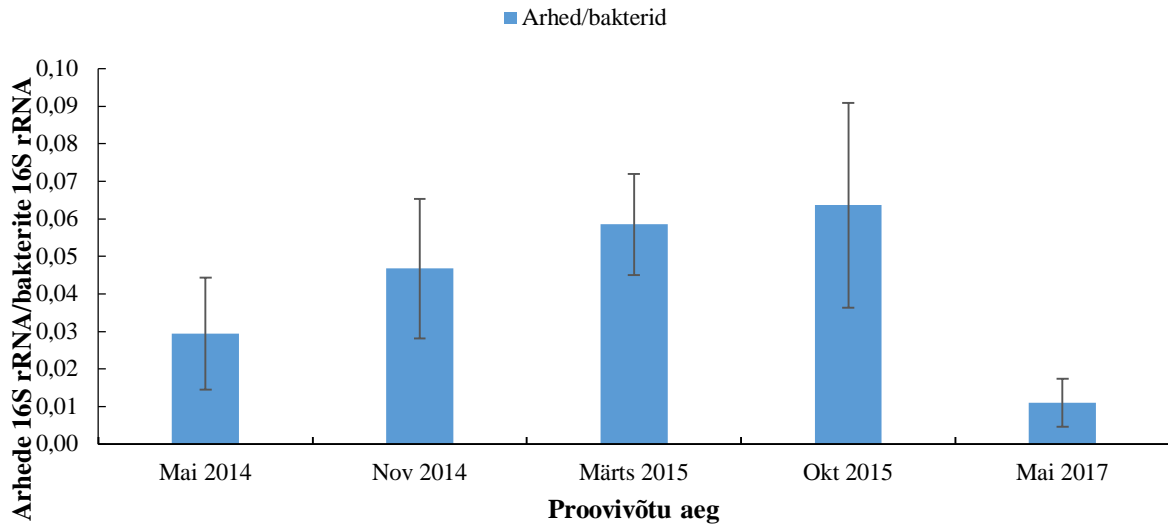


### 3.3. Prooviala arhede ja bakterite arvukused

Uuritud setteproovide bakterite ja arhede 16S rRNA geenikoopiate arvukuste keskväärtused proovivõtu aja alusel on toodud joonisel 4. Bakterite 16S rRNA arvukus setteproovides jäi vahemikku  $1,03 \cdot 10^9$ – $1,43 \cdot 10^{10}$  koopiat/gKA, arhede oma  $3,94 \cdot 10^7$ – $2,19 \cdot 10^8$  ning kogu prokarüootide arvukus oli  $1,12 \cdot 10^9$ – $1,43 \cdot 10^{10}$  koopiat/gKA. Bakterite ja arhede omavaheline suhe varieerus proovide lõikes 0,003–0,098%. Arhede ja bakterite 16S rRNA geenide omavahelise suhte keskväärtused proovivõtu perioodide alusel on näha joonisel 5. Kui bakterite 16S rRNA geenide ja prokarüootide üldarvukus märgala proovides oli kõige kõrgem ja *arh/bak* väärtused kõige madalamad viimasel proovivõtu korral võrreldes kolme eelnenuga, siis arhede oma oli kõige madalam viimasel proovivõtul võrreldes kahe eelnenuga ( $p < 0,001$ ). Kui arhede 16S rRNA geeniarvukuse ega *arh/bak* väärtuste puhul statistiliselt olulisi erinevusi teistes uuritud gruppides ei esinenud, siis bakterite ja prokarüootide arvukus 16S rRNA geenide alusel oli märgalas kõrgem kevade proovivõtu kordadel ( $p < 0,001$ ).



**Joonis 4.** Arhede, bakterite ja prokarüootide 16S rRNA geenikoopiate arvukuste keskväärtused koos standardhälvetega proovivõtu perioodide alusel.



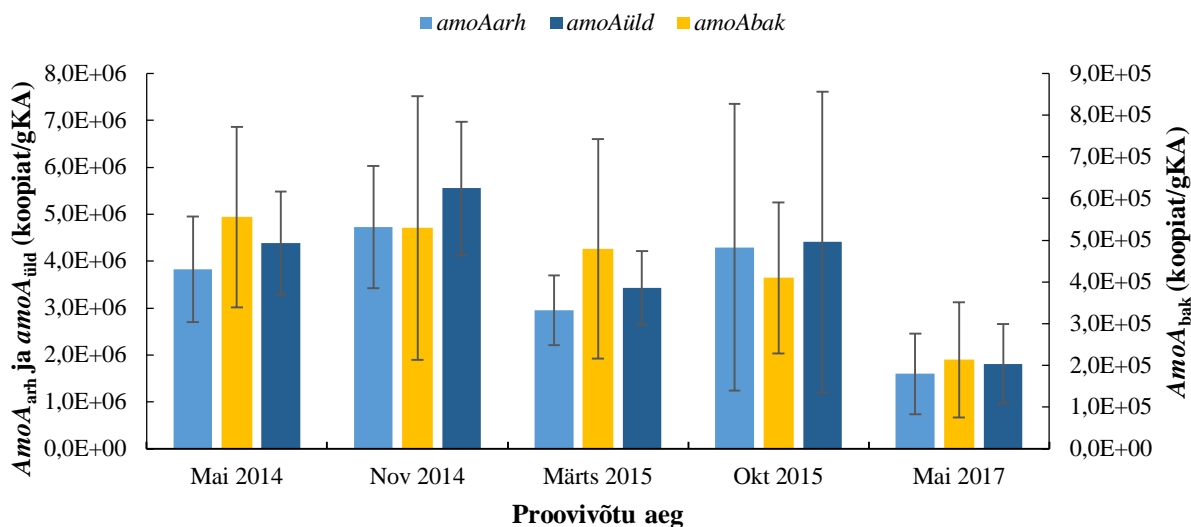
**Joonis 5.** Arhede ja bakterite 16S rRNA geenide omavahelise suhte keskvärtused koos standardhätetega proovivõtu perioodide alusel.

### 3.4. Lämmastikuringega seotud protsesside geneetiline potentsiaal uuritud proovialal

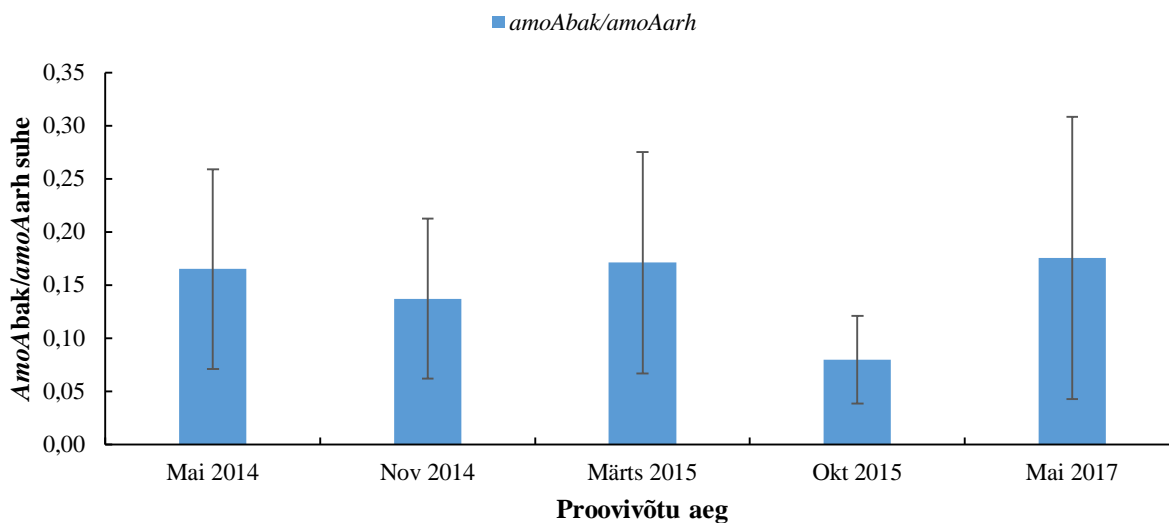
#### 3.4.1. Nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal uuritud proovialal

Arhede ja bakterite *amoA* geenide ning *amoA*<sub>üld</sub> geenikoopiate arvukuste keskvärtused proovivõtu alusel on näha joonisel 6. Bakterite ja arhede *amoA* geenikoopiate arvukused jäid vastavalt vahemikku  $5,53 \cdot 10^4$ – $1,15 \cdot 10^6$  ja  $5,21 \cdot 10^5$ – $1,07 \cdot 10^7$  koopiat/gKA ning nende summa  $7,43 \cdot 10^5$ – $1,14 \cdot 10^7$  koopiat/gKA. Kõigi kolme geeniparameetri puhul olid kõige kõrgemad arvukused kahel esimesel proovivõtu korral võrreldes viimasega ( $p < 0,001$ ) ning arhede *amoA* ja *amoA*<sub>üld</sub> korral esinesid kõrgemad väärtused ka sügisestel proovivõttudel võrreldes kevadetega ( $p < 0,01$ ). Lisaks tuvastati kõrgemad bakterite *amoA* geenikoopiate arvukused märgala lõunakaldal ( $5,30 \cdot 10^5 \pm 2,80 \cdot 10^5$  koopiat/gKA) võrreldes põhjakaldaga ( $3,46 \cdot 10^5 \pm 2,48 \cdot 10^5$  koopiat/gKA) ( $p < 0,01$ ). Bakterite ja arhede *amoA* geenide suhe varieerus vahemikus 0,04–0,43 ning kuigi antud väärtused ei erinenud proovikordade lõikes, leiti teatud määral kõrgemad *amo*<sub>bak</sub>/*amo*<sub>arh</sub> väärtused kevadisel perioodil ( $p < 0,05$ ) (joonis 7). Lisaks tuvastati kõrgemad bakterite *amoA*

geenide osakaalud võrreldes arhede *amoA* geenidega märgala keskosas ( $0,187 \pm 0,104$  koopiat/gKA) võrreldes sissevooluga ( $0,089 \pm 0,033$  koopiat/gKA) ja väljavoolu ( $0,079 \pm 0,046$  koopiat/gKA) aladega ( $p < 0,001$ ) ning märgala lõunaosas ( $0,204 \pm 0,104$  koopiat/gKA) võrreldes põhjaosaga ( $0,088 \pm 0,041$  koopiat/gKA) ( $p < 0,001$ ).



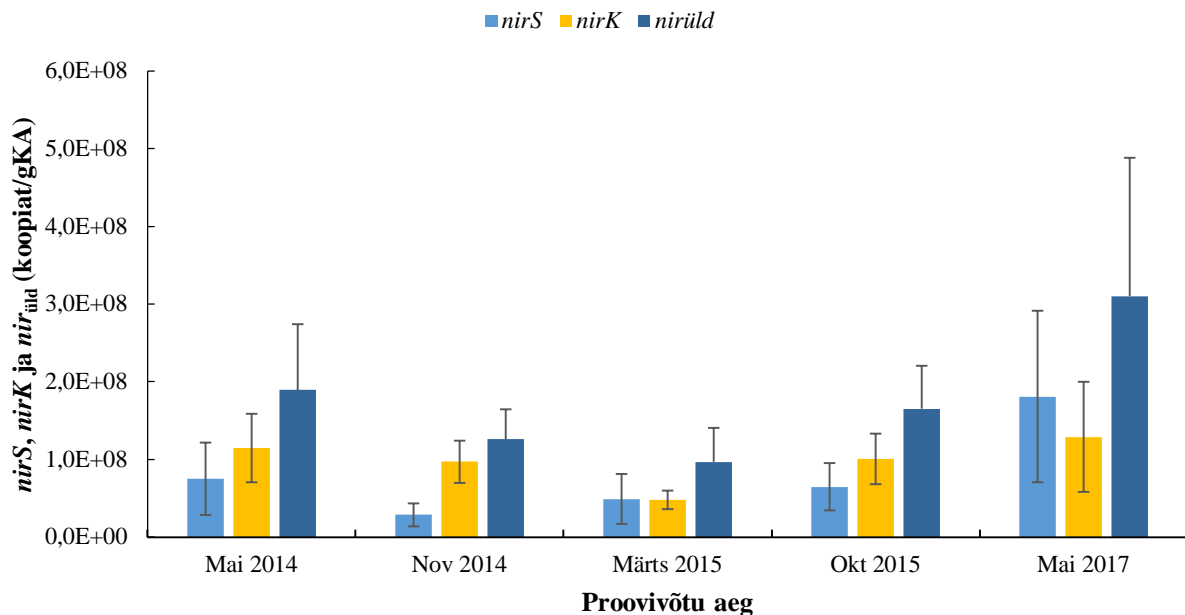
**Joonis 6.** Arhede ja bakterite *amoA* geenide ning *amoA*<sub>üld</sub> geenide summa keskvaartused koos standardhätetega proovivõtu perioodide alusel.



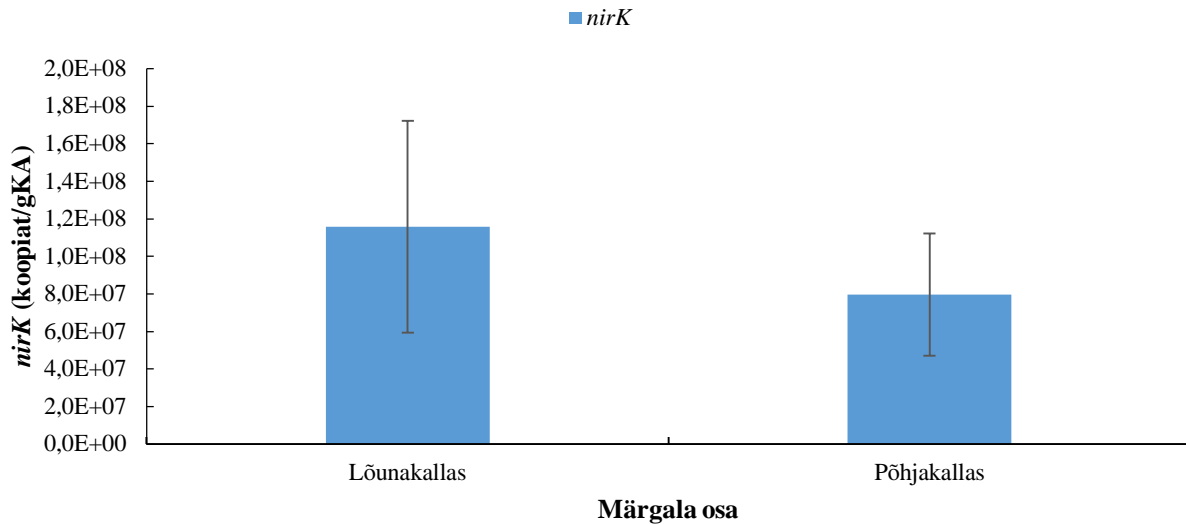
**Joonis 7.** Arhede ja bakterite *amoA* geenide omavahelise suhte keskvaartused koos standardhätetega proovivõtu perioodide alusel.

### 3.4.2. Denitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal uuritud proovialal

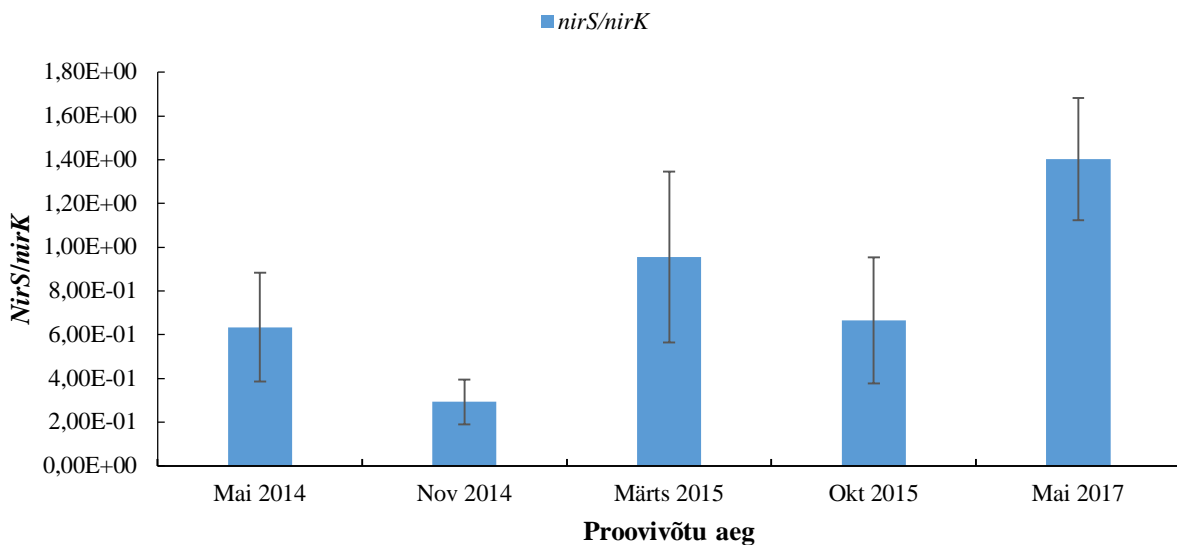
Nitriti reduktaasi kodeerivate *nirS* ja *nirK* geenide arvukused varieerusid prooviala lõikes  $1,26 \cdot 10^7$ – $4,35 \cdot 10^8$  ja  $3,77 \cdot 10^7$ – $2,82 \cdot 10^8$  koopiat/gKA ning *nir* geenide summa oli  $5,54 \cdot 10^7$ – $7,17 \cdot 10^8$  koopiat/gKA (joonis 8). Kui *nirK* arvukused olid madalad 2015. märtsi proovivõtul võrreldes teiste proovikordadega, siis *nirS* ja *nir* väärtused olid kõrgemad viimasel proovivõtul võrreldes teise ja kolmandaga ( $p < 0,001$ ). *nirK* geeni puhul leiti ka statistiliselt kõrgemad geenikoopiate arvukused märgala lõunaosas võrreldes põhjaosaga ( $p < 0,05$ ) (joonis 9). *NirS/nirK* väärtused jäid proovialal vahemikku 0,20–1,79 (joonis 10) ning *nirS* geeni osakaal *nirK* geeni suhtes oli kõrgem mais 2017 võrreldes kahe esimese ja neljanda proovivõtu korraga ning märtsis 2015 võrreldes teise proovivõtu korraga ja seega näidates kõrgemaid *nirS/nirK* väärtusi kevadisel perioodil ( $p < 0,001$ ).



**Joonis 8.** *NirS* ja *nirK* geenide ning ning *nir* geenide summa keskvaartused koos standardhäveteiga proovivõtu perioodide alusel.



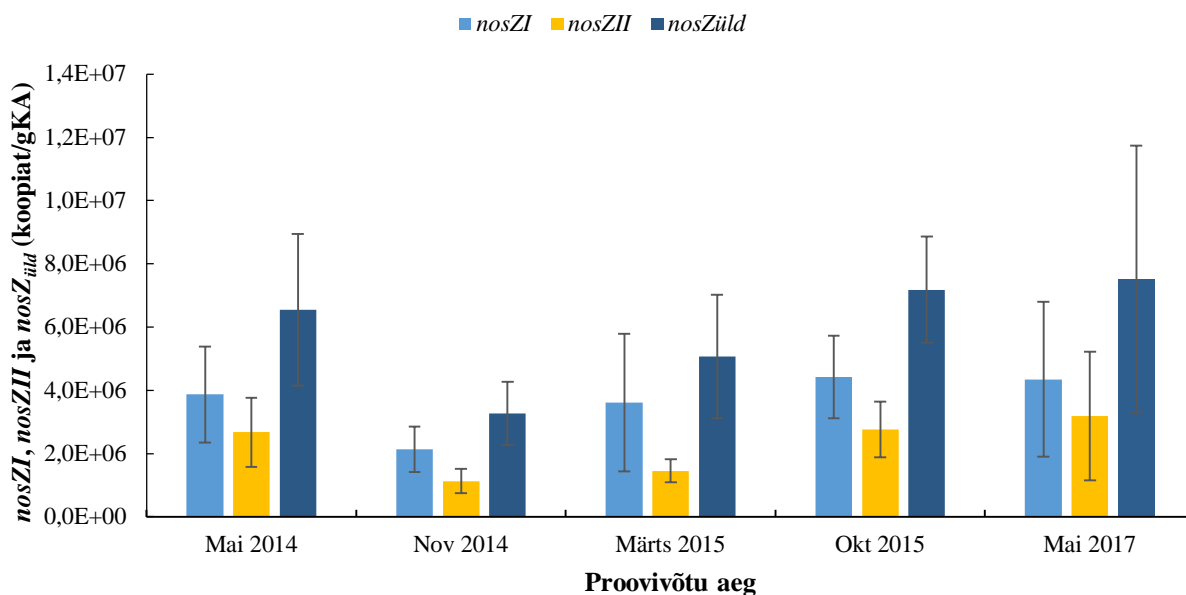
**Joonis 9.** *NirK* geeni keskvärtused koos standardhäveteiga proovivõtu perioomärgala osa alusel.



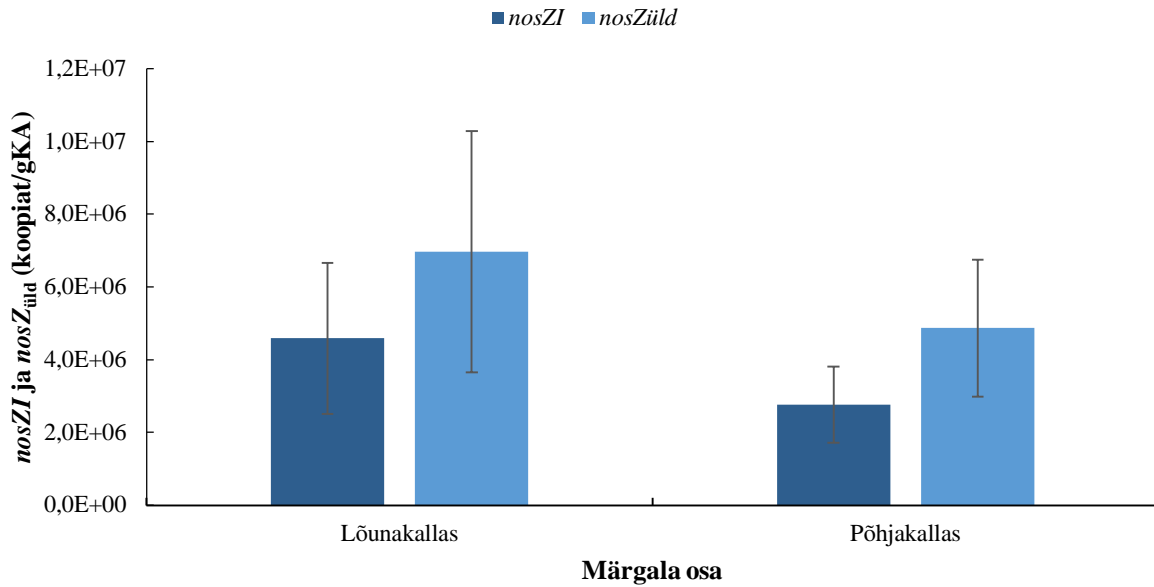
**Joonis 10.** *NirS* ja *nirK* geenide omavahelise suhte keskvärtused koos standardhäveteiga proovivõtu perioodide alusel.

*NosZI*, *nosZII* ja *nosZ*<sub>üld</sub> geenikoopiate arvukused jäid vastavalt vahemikku  $9,00 \cdot 10^5$ – $9,46 \cdot 10^6$ ,  $6,39 \cdot 10^5$ – $8,48 \cdot 10^6$  ja  $1,58 \cdot 10^6$ – $1,75 \cdot 10^7$  koopiat/gKA (joonis 11). Kõige madalamad kvantifitseeritud *nosZ* geenikoopiate arvukused olid novembris 2014 võrreldes esimese ja kahe

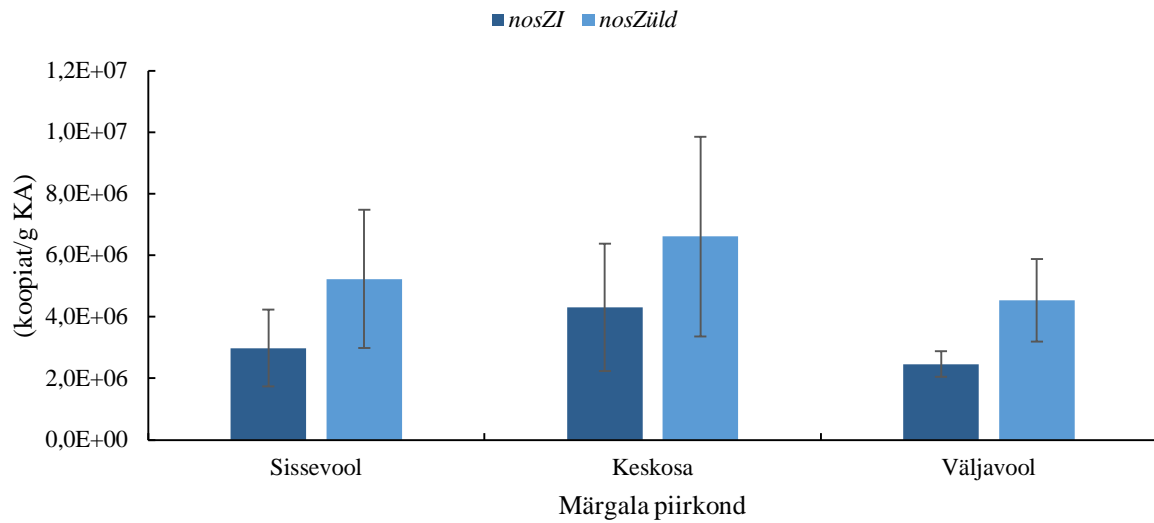
viimase proovivõtu korraga (va *nosZI* geen, mille puhul esimene proovivõtt ei erinenud viimasest), lisaks oli *nosZII* arvukus madalam ka märtsis 2015 võrreldes kahe viimase proovivõtu korraga ( $p < 0,001$ ). *nosZI* ( $p < 0,01$ ) ja *nosZ*<sub>üld</sub> ( $p < 0,05$ ) korral esinesid kõrgemad geenikoopiate arvukused märgala lõunaosas võrreldes põhjaosaga (joonis 12) ning *nosZI* puhul tuvastati kõrgemad arvukused ( $p < 0,01$ ) märgala keskosas võrreldes väljavooluga (joonis 13). *NosZI* ja *nosZII* omavaheline suhe (joonis 14), mis varieerus vahemikus 0,73-12,03, oli kõrgem ( $p < 0,001$ ) märgala lõunaosas võrreldes põhjaosaga ning märgala keskosas võrreldes väljavoolu ja sissevoolu aladega ( $p < 0,01$ ), kuid erinevus puudus proovikordade lõikes.



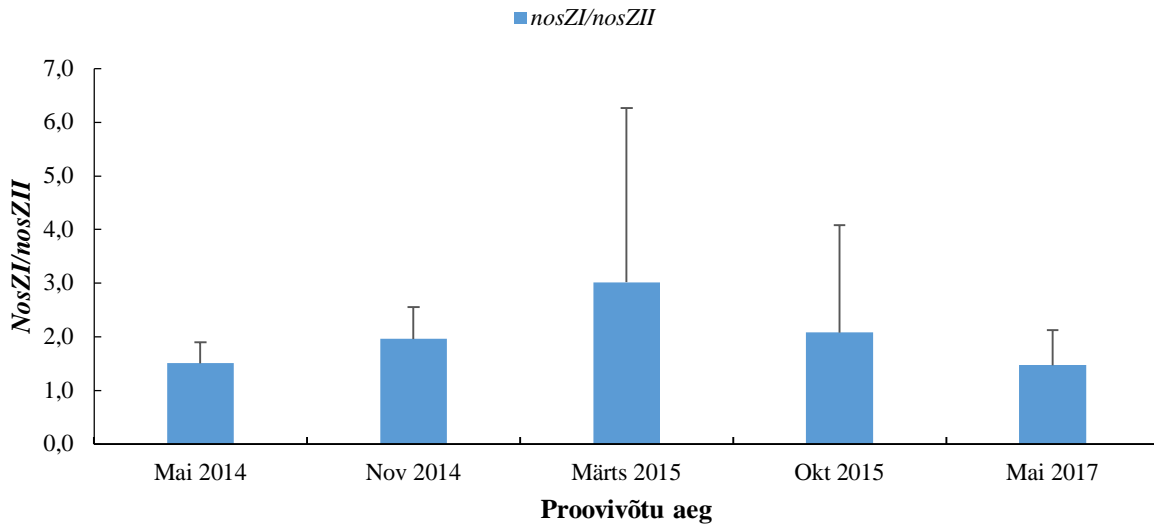
**Joonis 11.** *NosZI* ja *nosZII* geenide ning ning *nosZ*<sub>üld</sub> geenide summa keskvaartused koos standardhäveteaga proovivõtu perioodide alusel.



**Joonis 12.** *NosZI* geeni ja *nosZüld* geenide summa keskväärtused koos standardhävetelega märgala osa alusel.

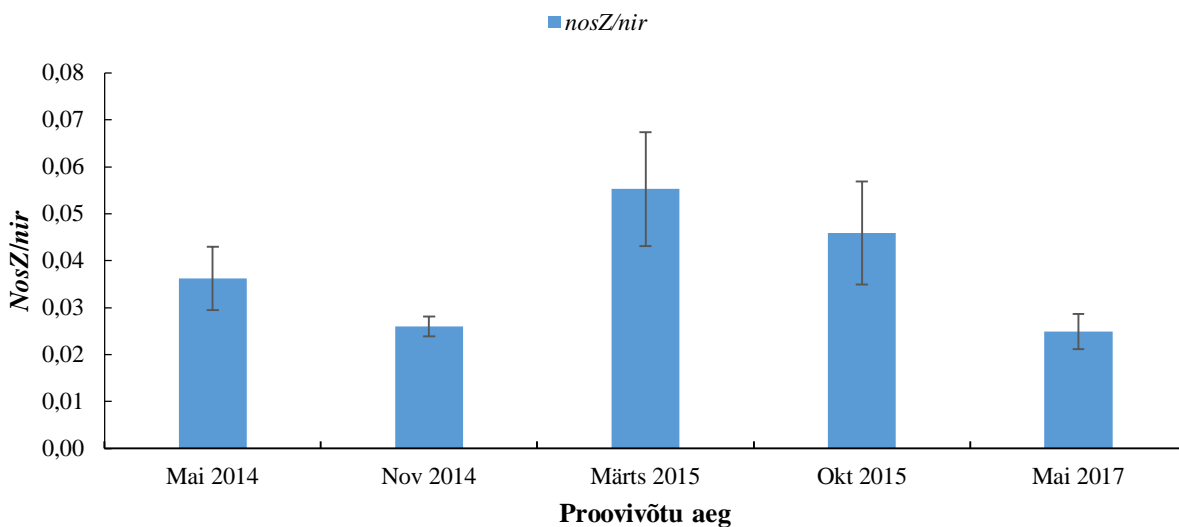


**Joonis 13.** *NosZI* geeni ja *nosZüld* geenide summa keskväärtused koos standardhävetelega märgala piirkonna alusel.



**Joonis 14.** *NosZI* ja *nosZII* geenide omavahelise suhte keskvärtused koos standardhävetege proovivõtu perioodide alusel.

Dilämmastikoksiidi ja nitriti reduktaase kodeerivate geenide omavaheline suhe jäi proovialal vahemikku 0,02–0,08 (joonis 15). Kuigi märgala lõikes *nosZ/nir* väärtustes erinevusi ei tuvastatud, siis oli antud geeniparameetri väärtused kõrgemad 2015. aastal võrreldes novembriga 2014 ja mai 2017 ( $p < 0,001$ ) (joonis 11).



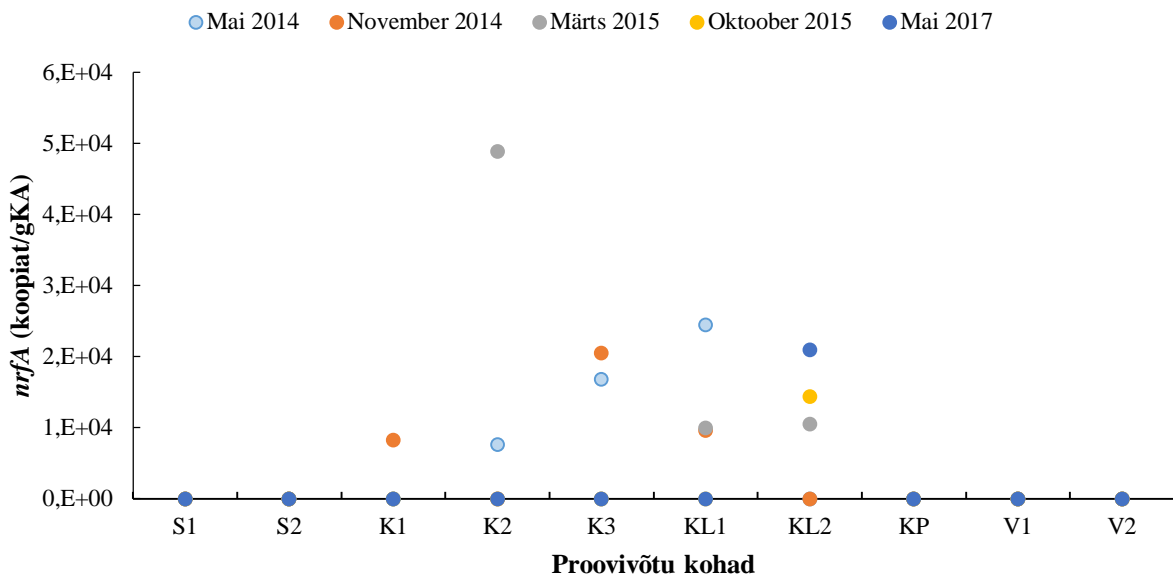
**Joonis 15.** *NosZ* ja *nir* geenide omavahelise suhte keskvärtused koos standardhävetege proovivõtu perioodide alusel.



### 3.4.3. DNRA, ANAMMOX-i ja N-DAMO geneetiline potentsiaal uuritud proovialal

Prooviala setteproovidest uuritud DNRA, ANAMMOX ja N-DAMO protsessiga seotud geenikoopiate arvukused olid mitmetes proovivõtu kohtades alla määramispiiri (vastavalt < 25, 12 ja 25 geenikoopiat reaktsiooni kohta).

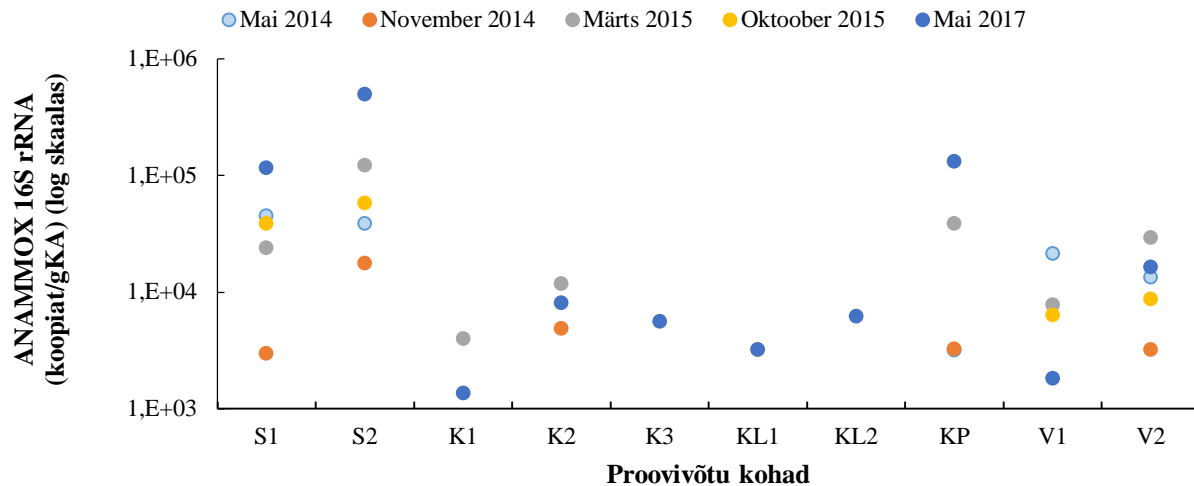
Setteproovides, kus DNRA spetsiifilise *nrfA* geenide arvukused ületasid määramispiiri, varieerusid geenikoopiate arvukused vahemikus  $7,60 \cdot 10^3$ – $4,89 \cdot 10^4$  koopiat/gKA. Märgala sisse- ja väljavoolu piirkonnas ning keskosa põhjakaldal olid *nrfA* geenid allpool määramispiiri (joonis 16). Uuritud proovigruppides *nrfA* geenide arvukuse alusel statistiliselt olulisi seoseid ei tuvastatud.



**Joonis 16.** *NrfA* geeni esinemine märgala ja proovivõtukohtade lõikes. Null väärtusega geenikoopiate arvukused jäid allpool määramispiiri. Proovivõtukohtade tähistused: S – sissevool (punktid S1 ja S2), väljavool – V (punktid V2 ja V1), keskosa lõunakallas – KL (punktid KL1 ja KL2), keskosa – K (punktid K1, K2 ja K3) ning keskosa põhjakallas – KP.

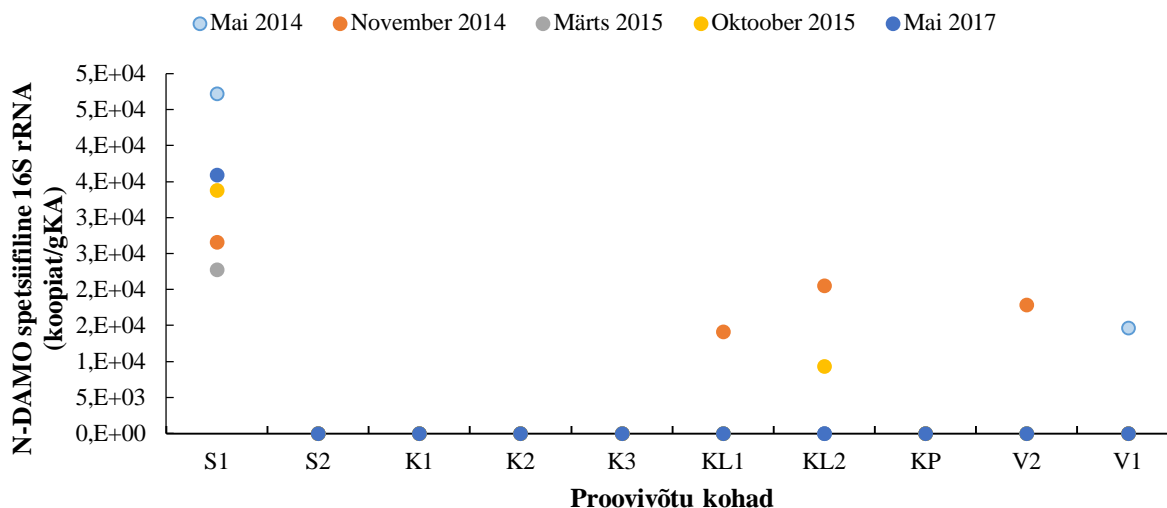
Määramispiiri ületanud ANAMMOX-i protsessi spetsiifilise 16S rRNA geenide arvukused jäid prooviala setteproovides vahemikku  $1,38 \cdot 10^3$ – $5,04 \cdot 10^5$  geeni/gKA (joonis 17). Kuigi proovivõtu kohtade vahel *amx* geeniparameetrites erinevused puudusid, siis kõrgemad ANAMMOX-iga seotud 16S rRNA geenikoopiate arvukused esinesid märgala sissevoolus ( $9,73 \cdot 10^4 \pm 1,48 \cdot 10^5$  geeni/gKA) võrreldes keskosaga ( $1,63 \cdot 10^4 \pm 3,52 \cdot 10^4$  geeni/gKA) ning põhjakaldal

( $5,49 \cdot 10^4 \pm 1,06 \cdot 10^5$  geeni/gKA) võrreldes lõunakaldaga ( $4,89 \cdot 10^3 \pm 3,41 \cdot 10^3$  geeni/gKA) (mõlemal korral  $p < 0,01$ ).



**Joonis 17.** ANAMMOX-i protsessi spetsiifilise 16S rRNA geeni esinemine märgala ja proovivõtukordade lõikes. Null väärtusega geenikoopiate arvukused jäid allpool määramispiiri. Proovivõtukohtade tähistused: S – sissevool (punktid S1 ja S2), väljavool – V (punktid V2 ja V1), keskosa lõunakallas – KL (punktid KL1 ja KL2), keskosa – K (punktid K1, K2 ja K3) ning keskosa põhjakallas – KP.

N-DAMO protsessile spetsiifilise 16S rRNA geenikoopiate arvukused, mis ületasid määramispiiri, jäid vahemikku  $1,45 \cdot 10^4 - 7,38 \cdot 10^4$  geeni/gKA ning nende esinemine proovialal ja proovivõtu kordade lõikes on esitatud joonisel 18. Kõikidel proovivõtukordadel tuvastati N-DAMO protsessi spetsiifilisi geenikoopiaid sissevoolus esinevas proovipunktis S1, samas teises märgala sissevoolule lähedal olnud proovipunktis (S2), keskosas (K1, K2, K3) ja keskosa põhjakaldal (KP) olid nende arvukused allpool määramispiiri. Proovivõtu kordade lõikes esines N-DAMO spetsiifilisi geene kõige rohkem novembris 2014, kui neid määrati nelja erineva proovipunkti setteproovides.



**Joonis 18.** N-DAMO protsessi spetsiifilise 16S rRNA geeni esinemine märgala ja proovivõtukohtade lõikes. Null väärtusega geenikoopiate arvukused jäid allpool määramispiiri. Proovivõtukohtade tähistused: S –sissevool (punktid S1 ja S2), väljavool – V (punktid V2 ja V1), keskosa lõunakallas – KL (punktid KL1 ja KL2), keskosa – K (punktid K1, K2 ja K3) ning keskosa põhjakallas – KP.

### 3.5. Lämmastikuringega seotud geeniparameetrite seosed keemiliste näitajatega ja gaasivoogudega uuritud proovialal

Statistiliselt olulised korrelatsioonid määratud geeniparameetrite ja keemia vahel on toodud tabelis 4. Spearmani korrelatsioonikoefitsendi järgi olid bakterite 16S rRNA geenikoopiad positiivselt seotud N ja OC<sub>üld</sub> ning negatiivselt NO<sub>3</sub>-N väärtustega, samas arhede 16S rRNA arvukused olid seotud samade parameetritega, aga seose suund oli vastupidine. Lisaks olid bakterite 16S rRNA geenikoopiad seotud positiivselt veel Mg, OA ja negatiivselt N<sub>2</sub>O emissiooniga.

Nitrifikatsiooniga seotud bakterite ja arhede *amoA* geenide arvukused ja nende summa oli positiivselt seotud pH<sub>KCl</sub> ja negatiivselt N, Mg, OA, C<sub>üld</sub> ja OC<sub>üld</sub> väärtustega. Samas oli kahest *amoA* geenist vaid arhede *amoA* geenide arvukus positiivselt korreleerunud NO<sub>3</sub>-N, potentsiaalse N<sub>2</sub> ja N<sub>2</sub>O emissiooniga ning bakterite *amoA* geen NH<sub>4</sub>-N ja P väärtustega. *AmoA*<sub>bak</sub>/*amoA*<sub>arh</sub> korral esines positiivne seos pH<sub>KCl</sub>-ga, mis oli ka ainuke seos antud geeniparameetri ja analüüsitud keemia väärtuste vahel.

**Tabel 4.** Statistiliselt olulised Spearmani korrelatsioonikoefitsendid prooviaala geenikoopiate absoluutväärtuste ja suhete ning proovide keemiliste parameetrite vahel.

Tunnus	pH <sub>KCl</sub>	N (%)	NO <sub>3</sub> -N (mg/kg)	NH <sub>4</sub> -N (mg/kg)	P (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	OA (%)	C <sub>üld</sub> (%)	OC <sub>üld</sub> (%)	N <sub>2</sub> -N (mgN/m <sup>2</sup> h)	N <sub>2</sub> O (µgN/m <sup>2</sup> h)
<b>Bakterite 16S rRNA</b>		0,36*	-0,35*				0,30*	0,30*		0,48***		- 0,59***
<b>Arhede 16S rRNA</b>		-0,31*	0,32*						-0,30*	-0,44**		
<b>Prokarüoodid</b>		0,36**	-0,34*				0,31*	0,30*		0,48***		- 0,58***
<b>Arhed/bakterid</b>		-0,35*	0,38**							-0,53***		0,52***
<i>amoA</i> <sub>arh</sub>	0,37**	-0,44**	0,34*				-0,67***	-0,52***	-0,37**	-0,46***	0,31*	0,50***
<i>amoA</i> <sub>bak</sub>	0,65***	-0,60***		-0,29*	0,34*		-0,57***	-0,54***	-0,28*	-0,38**		
<i>amoA</i> <sub>üld</sub>	0,42**	-0,49***	0,34*				-0,68***	-0,54***	-0,39**	-0,46***	0,30*	0,49***
<i>amoA</i> <sub>bak/amoA</sub> <sub>arh</sub>	0,32*											
<i>nirK</i>		0,29*		-0,31*						0,50***		-0,37**
<i>nirS</i>	-0,43**	0,57***	-0,30*				0,47***	0,59***	0,30*	0,55***	-0,31*	- 0,68***
<i>nir</i> <sub>üld</sub>	-0,36*	0,47***						0,44**	0,31*	0,57***	-0,30*	- 0,58***
<i>nirS/nirK</i>	-0,42**	0,51***	-0,36**	0,30*			0,66***	0,55***		0,30*		- 0,55***
<i>nosZI</i>				-0,35*		-0,28*		0,36**	0,29*	0,32*	-0,46***	- 0,57***
<i>nosZII</i>	-0,40**	0,41**						0,45***		0,46***	-0,30*	- 0,63***
<i>nosZ</i> <sub>üld</sub>	-0,31*	0,31*				-0,31*	0,32*	0,48***		0,42**	-0,47***	- 0,66***
<i>nosZI/nosZII</i>	0,31*			-0,33*								
<i>nosZ/nir</i>		-0,40**	0,54***							-0,36*		
<b>DNRA</b>											-0,35*	
<b>N-DAMO</b>	-0,77***			0,78***	-0,85***		0,59*					

\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001

Nitriti reduktaasi kodeerivad *nir* geenid ja nende suhe olid positiivselt seotud N, OC<sub>üld</sub> ja negatiivselt N<sub>2</sub>O emissiooniga. Erinevalt *nirK* geeni arvukusest, olid *nirS* geeni väärtused setetes seotud ka pH<sub>KCl</sub>, NO<sub>3</sub>-N, Mg, OA ja C<sub>üld</sub> väärtustega, samas *nirK* geeni puhul esines seos NH<sub>4</sub>-N kontsentratsiooniga settes.

Testitud keemilistest parameetritest olid mõlemat tüüpi *nosZ* geenid mõjutatud positiivselt OA ja OC<sub>üld</sub> poolt, samas kui *nosZI* geeni arvukused olid positiivselt seotud C<sub>üld</sub> ja negatiivselt NH<sub>4</sub>-N ja Ca väärtustega ning *nosZII* geeni arvukused positiivselt N ja negatiivselt pH<sub>KCl</sub> väärtustega settes. Erinevalt *nosZI* ja *nosZII* geenidest, oli *nosZ* geenide summa seotud Mg kontsentratsiooniga. Kõik uuritud *nosZ* geenide parameetrid (va *nosZI/nosZII*) olid negatiivselt seotud potentsiaalse N<sub>2</sub> voo ja N<sub>2</sub>O emissioonidega.

Kui ANAMMOXi spetsiifiliste 16S rRNA geenidega ei tuvastatud ühtegi korrelatsiooni uuritud keemiliste parameetrite ega gaasiemissioonidega, siis DNRA markergeen *nrfA* oli negatiivselt seotud sette N<sub>2</sub> potentsiaalse emissiooniga.

### **3.6. Lämmastikuringega seotud geenikoopiate omavahelised suhted**

Statistiliselt olulised korrelatsioonid geeniparameetrite vahel on esitatud tabelis 5.

Bakterite ja arhede 16S rRNA geenide arvukused olid omavahel seotud negatiivselt. Kui bakterite üldarvukus 16S rRNA geeni alusel oli nitrifikatsiooniga seotud *amoA*<sub>arh</sub> ja *amoA*<sub>üld</sub> geeniparameetritega korreleerunud negatiivselt, siis arhed olid korreleerunud antud parameetritega positiivselt. Bakterite 16S rRNA geeni arvukused olid positiivselt seotud kõikide uuritud denitrifikatsiooniga seotud geeniparameetritega, samas arhede 16S rRNA korral esines vaid negatiivne seos *nirK* ja *nir*<sub>üld</sub> väärtustega.

Erinevad *amoA* geenid olid omavahel seotud positiivselt. Mõlemad *amoA* geenid olid *nirS* geenigaseotud negatiivselt, kuid vaid bakterite *amoA* oli seotud negatiivselt *nosZII* geeni väärtustega.

Denitrifikatsiooniga seotud *nirK*, *nirS*, *nir*<sub>üld</sub>, *nosZI*, *nosZII* ja *nosZ*<sub>üld</sub> geeniparameetrite arvukused olid kõik omavahel positiivselt seotud.

**Tabel 5.** Statistiliselt olulised (\*) Spearmani korrelatsioonikoefitsendid prooviala geenikoopiate vahel.

Tunnus	Bakterite 16S rRNA	Arhede 16S rRNA	Prokarüoodid	Arhed/bakterid	<i>amoA</i> <sub>arh</sub>	<i>amoA</i> <sub>bak</sub>	<i>amoA</i> <sub>üld</sub>	<i>nirK</i>	<i>nirS</i>	<i>nir</i> <sub>üld</sub>	<i>nosZI</i>	<i>nosZII</i>	<i>nosZ</i> <sub>üld</sub>	amx	N-DAMO
Bakterite 16S rRNA	1,00														
Arhede 16S rRNA	-0,36**	1,00													
Prokarüoodid	1,00***	-0,32*	1,00												
Arhed/bakterid	-0,88***	0,71** *	-0,85***	1,00											
<i>amoA</i> <sub>arh</sub>	-0,42**	0,55** *	-0,40**	0,53***	1,00										
<i>amoA</i> <sub>bak</sub>					0,50** **	1,00									
<i>amoA</i> <sub>üld</sub>	-0,41**	0,56** *	-0,39**	0,52***	0,99** **	0,59** **	1,00								
<i>nirK</i>	0,55***	-0,31*	0,54***	-0,56***				1,00							
<i>nirS</i>	0,79***		0,78***	-0,70***	-0,54* **	-0,34*	-0,53* **	0,52** *	1,00						
<i>nir</i> <sub>üld</sub>	0,78***	-0,34*	0,77***	-0,74***				0,85** *	0,87** *	1,00					
<i>nosZI</i>	0,39**		0,40**					0,55** *	0,55** *	0,58** *	1,00				
<i>nosZII</i>	0,51***		0,51***	-0,40**		-0,33*		0,57** *	0,68** *	0,69** *	0,54* **	1,00			
<i>nosZ</i> <sub>üld</sub>	0,51***		0,52***	-0,33*				0,61** *	0,71** *	0,73** *	0,91* **	0,78** *	1,00		
amx														1,00	
N-DAMO														0,74*	1,00

\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001

Spearman-i korrelatsioonikoefitsendi alusel ei tuvastatud ühtegi seost DNRA protsessi geneetilist potentsiaali iseloomustavad *nrfA* geeni ja prooviala teiste määratud geeniparameetrite vahel ( $p > 0,05$ ).

N-DAMO-ga ja ANAMMOX-i seotud 16S rRNA geeni arvukused olid seotud vaid üksteisega ning nende vahel tuvastati positiivne korrelatsioon ( $p < 0,05$ ).

## 4. Arutelu

Käesoleva magistritöö uurimisalaks oli Rampilloni vabaveeline tehismärgala, mille setteproovidest hinnati lämmastikuringe erinevate protsesside geneetilist potentsiaali kasutades qPCR meetodit ning uuriti nende seoseid märgala setete keemiliste parameetrite ja potentsiaalse  $N_2$  ning  $N_2O$  emissiooniga.

Uuritud tehismärgala setetes ületas bakterite üldarvukus selgelt arhede arvukust. See tulemus kattub eelnevalt avaldatud andmetega tehismärgaladest, kus on näidatud, et tehismärgalade kooslustes domineerivad eelkõige bakterid (Zhou *et al.*, 2017) ning viitav sellele, et enamus toitainete sh lämmastikuühendite eemaldamisega seotud protsesse viivad põhiliselt läbi bakterid. Kui 2014. ja 2015. aasta proovikordadel oli bakterite ja arhede arvukus suhteliselt stabiilne, siis 2017. aastal oli bakterite oma kõrgem ja arhede oma madalam, mis võib olla tingitud keskkonna muutustest, sest sel perioodil tuvastati ka setetes kõrgemad üldlämmastiku ja -süsiniku ning orgaanilise aine väärtused. Sellised muutused võisid soodustada bakterite arvukuse tõusu, mida võib seostada bakterite 16S rRNA geenikoopiate positiivse seosega sette üldlämmastiku ja orgaanilise aineväärtustega ning samas arhede arvukuse langust, mida võib seostada arhede 16S rRNA geenikoopiate negatiivse seosega üldlämmastiku ja -süsiniku väärtustega.

Nitrifikatsiooni võtmeprotsessi läbiviiva ammoniaagi monooksügenaasi kodeerivate *amoA* geenide alusel oli nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal märgala lõikes suhteliselt ühtlane ning märgala setted olid sobilikumad pigem nitrifitseerivatele arhedele kui bakteritele.

Nii üldsüsiniku kui orgaanilise süsiniku korral esines negatiivne seos *amoA* gene omavate mikroorganismidega, mis võib viidata sellele, et kõrgema üldsüsiniku ja orgaanilise süsiniku väärtustega keskkond oli sobilik pigem orgaanilisi süsiniku ühendeid tarbivatele organismidele (näiteks denitrifitseerijad) kuna nitrifitseerijad kasutavad elektronide doonorina anorgaanilisi süsiniku ühendeid.

Samas oli bakterite poolne nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal oli kõrgem märgala lõunaosas võrreldes põhjaosaga, kus oli ka madalam veetase ning arvatavasti aeroobsem keskkond ning *amoA* geenide arvukused olid seotud ka erinevate keskkonnaparameetritega, mis võib viidata sellele, et *amoA* bakterid on eelistavad teatud määral teistsuguseid keskkonnatingimusi kui *amoA*



geeni omavad arhed. Nitrifitseerivate *amoA* gene omavate bakterite ja arhede erinevaid seoseid keskkonnaparameetritega on näidatud ka reostunud jõevett puhastavas vabaveelises märgalas (Li *et al.*, 2018).

Dissimilatoorse nitraadi redutseerimise ammooniumiks protsessi spetsiifilist *nrfA* geeni esines ainult märgala kesk- ja lõunapoolsemate osade setetes. DNRA protsessi vähest esinemist märgalas võib põhjendada näiteks mitte piisaval hulgal elektrondonorite esinemisega keskkonnas (Kuypers *et al.*, 2018). Scott ja teised (2008) leidsid Texase Waco järve märgala uurimisel, et DNRA protsess esines eelkõige kõrgemate temperatuuride juures suvisel perioodil. Kuna setteproovide kogumine toimus sügisel ja kevadel, siis võis juhtuda, et keskkonna temperatuur oli liiga madal DNRA protsessi läbiviivate mikroorganismide jaoks ning selletõttu oli ka antud protsessi geneetiline potentsiaal setetes madal.

Kui nitrifikatsioon ja DNRA protsessid viivad lämmastikuühendeid ühest vormist teise, siis lämmastiku lõplik eemaldamine märgalasse sisenevast veest gaasiliste lõpp-produktide kaudu toimub läbi denitrifikatsiooni, ANAMMOX-i või N-DAMO protsesside.

Rampilloni tehismärgalas tulemused näitasid, et eelpool nimetatud protsessidest oli märgala setetes kõige kõrgem eelkõige denitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal, mis on kattuvad varasemate tehismärgala alaste uuringute andmetega (Hu *et al.*, 2014; Ligi *et al.*, 2015). Nitriti redutseerimise geneetiline potentsiaal *nir* geenide alusel oli suhteliselt ühtlane kogu märgala ulatuses, vaid *nirK* geeni arvukused olid kõrgemad märgala lõunapoolsemas osas, kus võisid esineda ka aeroobsemad tingimused ning mis on kooskõlas ka varasema tehismärgala uuringu tulemusega (Ligi *et al.*, 2013). Samas selget *nirS* või *nirK* geeni omavate organismide domineerimist märgala settekooslustes ei esinenud, mis viitab sellele, et keskkond oli sobilik mõlemat tüüpi denitrifitseerijate esinemiseks.

Kasvuhoonegaasina tuntud diämmastikoksiidi redutseerimist läbi viivat ensüümi kodeerivate *nosZ* geenide arvukus oli teatud määral kõrgem märgala lõunaosas. Erinevat klaadi *nosZ* geeni omavate organismide omavaheline suhe näitas, et tehismärgala setetes domineerisid valdavalt *nosZI* geeni omavad organismid. *NosZI* geeniklaadi domineerimist enamikes keskkondades ja sealhulgas märgalades on näidatud näiteks mitmetes uuringutes (Jones *et al.*, 2013; Ligi *et al.*, 2015; Hallin *et al.*, 2018). Sarnaselt *nirK* geenidega oli ka *nosZI* ja üldine *nosZ* geenide arvukus

kõrgem märgala lõunapoolsemas osas võrreldes põhjapoolse osaga, kus on madalam vesi ning teatud perioodil aastas võib see märgala osa ka kuivaks muutuda ning setetes võivad tekkida aeroobsed tingimused ning *nosZI* geeni puhul oli arvukus madalam ka sügavamates sisse- ja väljavoolu piirkondades võrreldes madalama keskosaga. Samas kirjanduses on toodud ka väga vastakaid näiteid: näiteks järvevett puhastava tehismärgala uuringus olid *nosZ* klaad I geenide arvukused olid kõrgemad tehismärgala väljavoolu osas (Li *et al.*, 2019), samas reostunud jõevett puhastavas tehismärgalas olid *nosZI* geeni arvukused kõrgemad ajutiselt üleujutatud märgala osades (Ligi *et al.*, 2013). Nos ensüümi peetakse kõige hapniku tundlikumaks ensüümiks denitrifikatsiooni rajajaks (Thomson *et al.*, 2012), seetõttu on kõrgem dilämmastikoksiidi redutseerimise geneetiline potentsiaal antud märgala osas teatud määral üllatav.

Kuigi uuritud märgalas olid mõlemat tüüpi *nir* geenid seotud üldlämmastiku ja orgaanilise süsiniku väärtustega ning mõlemat klaadi *nosZ* geenid orgaanilise aine ja orgaanilise süsiniku väärtustega, tuvastati sarnaselt erinevate nitrifikatsiooniga seotud *amoA* geenidega ikkagi teatud erinevad seosed keskkonna keemiliste parameetritega. Näiteks erinevalt *nirK* geenist oli *nirS* geenide arvukus seotud pH, magneesiumi, orgaanilise aine ja orgaanilise süsiniku väärtustega ning kui *nosZI* geenide väärtused oli seotud ammoniumi, kaltsiumi, orgaanilise süsiniku väärtustega siis *nosZII* geen arvukused pH ja üldlämmastiku väärtustega. Lisaks tuvastati *nirK* ja *nosZI* klaadi kõrgemad väärtused pigem aeroobsemas märgala lõunapoolsemas osas. Erinevaid *nir* ja *nosZ* gene omavate organismide teatud erinevat keskkonna eelistamist on toonud välja ka varasemad keskkonna alased uuringud (Henry *et al.*, 2006; Graf *et al.*, 2014), sealhulgas vabaveelistes tehismärgalades (Ligi *et al.*, 2015). Antud töö tulemused näitasid, et setetest mõõdetud dilämmastikgaasi potentsiaalne emissioon oli seotud negatiivselt dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaaliga dilämmastigaasiks. Selline teatud määral vastuoluline tulemus võib olla seotud sellega, et N<sub>2</sub> allikas märgalas ei ole vaid denitrifikatsioon (mida kinnitab ka ANAMMOX ja N-DAMO geneetilise potentsiaali esinemine) ning et potentsiaalne N<sub>2</sub> emissioon on mõõdetud kuni 30 cm settekihi ulatuses, samas geneetiline potentsiaal määrati ülemisest 10 cm settekihist.

Nitriti reduktaasi ja lämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivate *nir* ja *nosZ* geenide suhet kasutatakse tihti ka hindamiseks keskkonna denitrifikatsioonist tulenevat N<sub>2</sub>O emissiooni potentsiaali. Uuritud

Rampilloni tehismärgalas ületas nitriti redutseerimise geneetiline potentsiaal dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaali, mis viitab sellele, et märgala on N<sub>2</sub>O allikas ning mida kinnitavad ka N<sub>2</sub>O emissiooni mõõtmise tulemused. Samas ei tuleb arvestada, et Rampilloni tehismärgalal mõõdetud N<sub>2</sub>O emissioonid on väga väiksed võrreldes mõne teise sarnases kliimaatilistes piirkonnas asuva tehismärgalaga (Hernandez ja Mitsch 2006). Kuigi antud uuringus ei leitud seoseid *nosZ/nir* väärtuste ja N<sub>2</sub>O emissiooni vahel, siis dilämmastikoksiidi redutseerimise geneetiline potentsiaal oli seotud negatiivselt ja nitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal positiivselt N<sub>2</sub>O emissiooniga, mis on kooskõlas varasemate teadmistega, et denitrifikatsiooni viimane etapp on N<sub>2</sub>O emissiooni vähendaja ja nitrifikatsioon on N<sub>2</sub>O allikas. Samas tuleb arvestada, et mõõdetud N<sub>2</sub>O emissioon on erinevate N<sub>2</sub>O tarbivate ja tootvate protsesside samaaegselt toimumise tulemus ning uuritud proovid koguti ülemisest 10 cm settekihist, samas N<sub>2</sub>O emissioon mõõdeti kogu setteprofiilist.

Käesoleva töö tulemused näitasid, et Rampilloni tehismärgalas esines anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise protsessi geneetiline potentsiaal vaid teatud märgala osades ning see oli ajas muutuv. Eriti soodsad tingimused olid ANAMMOX bakteritele 2017. aasta mais, kui neid tuvastati kogu märgala ulatuses. Sarnaselt antud töö tulemustele, tuvastasid ka Zhao ja teised (2018) mägitundra ökosüsteemi märgala uuringutel, et ANAMMOX baktereid esines 50st proovikohast vaid üheksas. Antud tööst selgus, et ANAMMOX-i geneetiline potentsiaal oli kõrgem tehismärgala sisse- ja väljavoolus ning põhjapoolses osas, kus oli kõrgem veetase ning märgala setted oli aastaringelt veega küllastunud. Varasemalt on leidnud ka Waki ja teised (2015) kõrgemat ANAMMOX protsessi esinemist samuti märgala sügavamas sissevoolu alas ja seetõttu võib järeldada, et kõrgem veetase tagab tõenäoliselt ANAMMOX bakterite poolt nõutavad anaeroobsed tingimused. Samuti tuvastati kõrgemad ANAMMOX geenide väärtused sigalast pärineva reovett puhastava tehismärgala sissevoolus (Chen *et al.*, 2017).

Nitritist sõltuva anaeroobse metaani oksüdeerimise geneetiline potentsiaal esines valdavalt tehismärgala sissevoolus, mida võib põhjendada püsivalt anaeroobse keskkonnaga, kus on pidev orgaanilise aine ja lämmastikühendite pealevool. Ruumiliselt väga varieeruvat N-DAMO protsessi esinemist jõeveett puhastavas vabaveelises märgalas on näidanud ka Xu ja teised (2018). Lisaks

esines N-DAMO ja ANNAMOX protsesside geneetilise potentsiaali vahel positiivne seos, mis viitab antud protsesside teatud sarnaste keskkonnatingimuste vajadusele.

Käesoleva magistritöö tulemuste võrdlemisel teiste avaldatud andmetega on oluline arvestada, et qPCR meetodi puhul sõltub märklaudgeeni koopiate arvukuse määramise lõpptulemus ka DNA eraldamise meetodist ning kasutatavatest praimeritest (Nõlvak *et al.*, 2012).

## 5. Kokkuvõte

Väetiste kasutamise suurenemine põllumajanduses avaldab ulatuslikku negatiivset mõju veekogudele, põhjaveele ning sellega seoses ka joogiveele. Üleliigsete toitainete jõudmist veekeskkondadesse on võimalik takistada või vähendada kasutades tehismärgalasid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli määrata erinevate lämmastikuringe protsesside (nitrifikatsioon, dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks, denitrifikatsioon, anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine) geneetiline potentsiaal ja hinnata nende protsesside omavahelist seost ning sõltuvust keskkonnaparameetritest vabavoolulises tehismärgalas Prantsusmaal Rampilloni piirkonnas.

Kümnest proovivõtukohest üle tehismärgala koguti proove viiel ajahetkel vahemikus mai 2014 kuni mai 2017. Setteproovidest eraldatud DNA-st määrati reaalaja PCR meetodil arhede ja bakterite spetsiifiliste 16S rRNA ja nitrifikatsiooni (*amoA* geenid), dissimilatoorse nitraadi redutseerimise ammooniumiks (*nrfA* geen), denitrifikatsiooni (*nir* ja *nosZ* geenid), anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise (spetsiifiline 16S rRNA geen) ja nitritist sõltuva anaeroobse metaani oksüdeerimise (spetsiifiline 16S rRNA geen) markergeenide arvukused. Geenikoopiate arvude ja nende omavaheliste suhete puhul testiti statistiliselt oluliste seoste esinemist märgala setteproovide keemiliste ja gaasiparameetritega ning analüüsiti erinevusi märgala erinevate osade ja hooajaliste muutuste alusel.

Töö tulemustest võib järeldada, et tehismärgala settekoosluses oli kõrgem bakterite 16S rRNA geenide osakaal võrreldes arhede 16S rRNA geenidega. Mõlemate geenide arvukus setetes oli ajas muutuv ning bakterite arvukuse tõus ja arhede arvukuse langus võis olla mõjutatud kõrgemate lämmastiku ja orgaanilise süsiniku sisaldustest samal perioodil.

Märgalal tuvastati nii bakterite kui arhede poolne nitrifikatsiooni potentsiaal ning kui arhede *amoA* geenide arvukus oli märgala lõikes ühtlane, siis bakterite *amoA* geenide arvukus oli kõrgem märgala madalamatel aladel.

Dissimilatoorse nitraadi redutseerimise ammooniumiks geneetilise potentsiaali esinemist tuvastati vaid märgala kesk- ja lõunaosa setetes ning selle protsessi osakaal märgala lämmastikuringe protsessides ei olnud väga kõrge.

Rampilloni tehismärgalas võib uuritud lämmastikuringe protsesside geneetilise potentsiaali alusel järeldada, et lämmastikühendite eemaldamisel on peamine roll denitrifikatsioonil, kuid teatud kõrgema veetasemega piirkondades võivad sellesse panustada ka suhteliselt hiljuti avastatud anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv metaani oksüdeerimine.

Nitriti redutseerimise geneetiline potentsiaal ületas dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaali, mis viitab sellele, et Rampilloni tehismärgala on N<sub>2</sub>O allikas ning mida kinnitavad ka N<sub>2</sub>O emissiooni mõõtmise tulemused.

Denitrifikatsiooniga seotud nitriti redutseerimise geneetiline potentsiaal *nir* geenide alusel oli suhteliselt ühtlane kogu tehismärgala ulatuses, samas dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaal *nosZ* geenide arvukuse alusel oli kõrgem madalamate märgala osade setetes. Mõlemat tüüpi *nir* geenid olid seotud üldlämmastiku ja orgaanilise süsiniku väärtustega ning mõlemat klaadi *nosZ* geenid olid seotud orgaanilise aine ja orgaanilise süsiniku väärtustega, samas erinevat tüüpi *nir* ja *nosZ* geenid olid seotud ka erinevalt keemiliste parameetritega ning *nosZI* ja *nirK* geenide arvukused olid kõrgemad madalama veetasemega märgala osas. Seega üldises plaanis ei tuvastatud suuri erinevusi erinevaid *nir* ja *nosZ* geene omavate organismide keskkonna eelistamisel, aga teatud erinevused esinevad siiski.

Põllumajandusliku hajureostuse eemaldamisega seotud lämmastikuringe protsesse on tehismärgalades uuritud juba varasemalt, eriti nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni, kuid mitte nii paljude protsesside koos esinemist ja seetõttu aitavad antud magistr töö tulemused kaasa vabaveeliste tehismärgalades toimuvate lämmastikuringe protsesside ja neid mõjutavate tegurite mõistmisele.

# **The potential of microbiological processes related to nitrogen cycle to remove agricultural pollution in a surface flow constructed wetland**

Laurina Šinkejeva

## **Summary**

Due to the growing Earth population the use of fertilizers in agriculture has increased drastically in the past century. Industrial nitrogen fixation has increased the input of nitrogen compounds in different natural ecosystems causing negative impact on water bodies, groundwater and consequently on drinking water.

Treatment wetlands are effective solution to reduce the amount of excessive nutrients entering in the aquatic environment. The removal of nitrogen compounds from the polluted water flowing through the wetland has been associated mainly to microbiological processes and therefore it is crucial to understand the factors affecting those processes.

The aim of the thesis was to determine the genetic potential of different nitrogen cycle processes (nitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, denitrification, anaerobic ammonium oxidation and nitrite-dependent anaerobic methane oxidation) and determine the environmental factors affecting those processes in the surface flow constructed wetland in the Rampillon area of France.

Samples from ten sampling points across the constructed wetland basin were collected at five time points between May 2014 and May 2017 from the 0-10 cm top sediment layer. Quantitative real-time PCR was used to determine the abundance of bacteria and archaea specific 16S rRNA, nitrification (*amoA* genes), dissimilatory nitrate to ammonium (*nrfA* gene), denitrification (*nirS*, *nirK*, *nosZI* and *nosII* genes), anaerobic ammonium oxidation (a specific 16S rRNA gene) and nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (a specific 16S rRNA gene) genes from the microbial communities of sediment samples. In the case of gene copy numbers and their relationships, statistically significant correlations with chemical and gas parameters of wetland

sediment samples were tested and differences were analyzed based on different parts of the wetland and seasonal variations.

The results of the study suggest that the proportion of bacterial 16S rRNA genes in the constructed wetland sediment community was higher than archaeal 16S rRNA genes. The abundance of both genes was variable over time and the increase in bacterial abundance and the decline in archaea abundance may have been influenced by higher nitrogen and organic carbon levels at the same time period.

In the studied wetland, the genetic potential of nitrification was based on the bacterial and archaeal *amoA* genes. The abundance of *amoA* genes was relatively even across the wetland, however, the abundance of bacterial specific *amoA* genes was higher in the areas with lower water level.

The genetic potential for reducing ammonium nitrate to ammonium was found only in the middle and southern sections of the wetland and the proportion of this process in the wetland nitrogen cycle was not very high.

Results of this study indicate that denitrification play a major role in the removal of nitrogen compounds in the Rampillon's artificial wetland, but in some regions, especially with higher water levels, anaerobic ammonium oxidation and nitrite-dependent methane oxidation may also have certain contribution.

The ratio of nitrous oxidation and nitrite reduction genetic potentials indicate that Rampillon wetland is the source of greenhouse gas N<sub>2</sub>O and this was also confirmed by the gas measurements.

The genetic potential of denitrification-related nitrite reduction based on the abundance *nir* genes was relatively uniform across the treatment wetland, while the reduction potential of nitrous oxide based on the number of *nosZ* genes was higher in the wetland section with lower water level. Both types of *nir* genes were associated with the values of total nitrogen and organic carbon, and *nosZ* genes from clade I and II were associated with the values of organic matter and organic carbon. Results demonstrated also that different types of *nir* and *nosZ* genes were also linked differently to the chemical parameters, and the only the abundances of *nosZI* and *nirK* genes were higher in the shallow part of the wetland. Thus, in general, there were no major differences in the preference



for the environment of organisms with different *nir* and *nosZ* genes, but some differences still exist.

Nitrogen cycle processes related to the removal of diffuse nitrogen pollution have been studied previously; especially the co-existence of nitrification and denitrification processes, but not so many processes together as in the current study, consequently the results of this Master's thesis contribute to the understanding of the nitrogen cycle processes and factors influencing these processes in surface flow treatment wetlands.

## Tänuavaldused

Käesoleva magistriröö autor soovib avaldada suurt tänu oma juhendajale, Teele Ligile, kannatlikkuse ja abivalmiduse eest. Autor soovib tänada ka Kaido Soosaart ja Hanna Vahterit ning oma peret ja sõpru igakülgse toe ning nõu eest, mis aitasid kaasa magistriröö valmimisele.

Käesolev magistriröö valmis projektide "Puhastus-tehismärgalade protsessipõhine uurimine ja innovatiivsete tehnoloogiate tõhustamine" (PUT1125), "Gloaalne soojenemine ja maastike aineringe. Maastike struktuuri ja funktsioonide muutused seoses globaalse kliima soojenemise ja inimtegevusega ning aineringe modelleerimine ja ökotehnoloogiline reguleerimine" (IUT2-16), "Kasvuhooonegaaside vood märgalades lokaalsest globaalseni – kliima soojenemise ja maakasutuse mõju" (PRG358) ja Teaduse tippkeskus EcolChange raames.

## Kasutatud materjalid

- Boumann, H. A., Longo, M. L., Stroeve, P., Poolman, B., Hopmans, E. C., Stuart, M. C., ... & Schouten, S. (2009). Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: I. Ladderane phospholipids form highly organized fluid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(7), 1444-1451.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001), 192-196.
- Chen, L., Liu, F., Jia, F., Hu, Y. J., Lai, C., Li, X., ... & Wu, J. S. (2017). Anaerobic ammonium oxidation in sediments of surface flow constructed wetlands treating swine wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(3), 1301-1311.
- Dal Ferro, N., Ibrahim, H. M. S., & Borin, M. (2018). Newly-established free water-surface constructed wetland to treat agricultural waters in the low-lying Venetian plain: Performance on nitrogen and phosphorus removal. *Science of the Total Environment*, 639, 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.193>
- 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.
- Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J., & Mander, Ü. (2016). Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PloS one*, 11(9), e0163864.
- Ettwig, K. F., Van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K. T., Jetten, M. S., & Strous, M. (2009). Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11), 3656-3662.
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., ... & Gloerich, J. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543.

- Fonder, N., & Headley, T. (2013). The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering*, 51, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.011>
- García-Lledó, A., Vilar-Sanz, A., Trias, R., Hallin, S., & Bañeras, L. (2011). Genetic potential for N<sub>2</sub>O emissions from the sediment of a free water surface constructed wetland. *Water Research*, 45(17), 5621–5632. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.025>
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., & Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004>
- Gorgoglione, A., & Torretta, V. (2018). Sustainable management and successful application of constructed wetlands: a critical review. *Sustainability*, 10(11), 3910.
- Graf, D. R., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PloS one*, 9(12), e114118.
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293.
- Hallin, S., & Lindgren, P. E. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(4), 1652-1657.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Jones, C. M. (2018). Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends in microbiology*, 26(1), 43-55.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), 5181-5189.
- Hernandez, M. E., & Mitsch, W. J. (2006). Influence of hydrologic pulses, flooding frequency, and vegetation on nitrous oxide emissions from created riparian marshes. *Wetlands*, 26(3), 862-877.
- Hu, B. L., Shen, L. D., Lian, X., Zhu, Q., Liu, S., Huang, Q., ... & Xu, X. Y. (2014). Evidence for

- nitrite-dependent anaerobic methane oxidation as a previously overlooked microbial methane sink in wetlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(12), 4495-4500.
- Humbert, S., Zopfi, J., & Tarnawski, S. E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*, *4*(5), 484-490.
- Hutchinson, G. L., & Livingston, G. P. (1993). Use of chamber systems to measure trace gas fluxes. *Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change*, (agriculturaleco), 63-78.
- Jones, C. M., Graf, D. R. H., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: A potential nitrous oxide sink. *ISME Journal*, *7*(2), 417–426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Kadlec, R., & Wallace, S. (2009). *Treatment Wetlands*, Second Edition. *CRC press*. <https://doi.org/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. *Appl. Environ. Microbiol.*, *72*(9), 5957-5962.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 263.
- Lee, C. G., Fletcher, T. D., & Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*, *9*(1), 11-22. 11–22. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800049>
- Li, B., Yang, Y., Chen, J., Wu, Z., Liu, Y., & Xie, S. (2018). Nitrifying activity and ammonia-oxidizing microorganisms in a constructed wetland treating polluted surface water. *Science of the Total Environment*, *628–629*, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.041>
- Li, J., Wang, J. T., Hu, H. W., Cai, Z. J., Lei, Y. R., Li, W., ... Cui, L. J. (2019). Changes of the denitrifying communities in a multi-stage free water surface constructed wetland. *Science of the Total Environment*, *650*, 1419–1425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.123>
- Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J., Nõlvak, H., Mitsch, W. J., ... Truu, J. (2013).

- Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 72, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.09.007>
- Ligi, T., Truu, M., Oopkaup, K., Nõlvak, H., Mander, Ü., Mitsch, W. J., & Truu, J. (2015). The genetic potential of N<sub>2</sub> emission via denitrification and ANAMMOX from the soils and sediments of a created riverine treatment wetland complex. *Ecological Engineering*, 80, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.072>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm541>
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., Heraud, C., Breuil, M. C., Bizouard, F., ... & Philippot, L. (2015). N<sub>2</sub>O production, a widespread trait in fungi. *Scientific reports*, 5, 9697. <https://doi.org/10.1038/srep09697>
- Mulder, A., Van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS microbiology ecology*, 16(3), 177-183.
- Nõlvak, H., Truu, M., & Truu, J. (2012). Evaluation of quantitative real-time PCR workflow modifications on 16S rRNA and tetA gene quantification in environmental samples. *Science of the Total Environment*, 426, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.054>
- Picek, T., Čížková, H., & Dušek, J. (2007). Greenhouse gas emissions from a constructed wetland—plants as important sources of carbon. *Ecological engineering*, 31(2), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.06.008>
- Raghoebarsing, A. A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., ... & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440(7086), 918. <https://doi.org/10.1038/nature04617>
- Rochette, P., Ellert, B., Gregorich, E. G., Desjardins, R. L., Pattey, E., Lessard, R., & Johnson, B. G. (1997). Description of a dynamic closed chamber for measuring soil respiration and its comparison with other techniques. *Canadian Journal of Soil Science*, 77(2), 195-203.

- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, *63*(12), 4704-4712.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, *37*(6), e45-e45. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.011>
- Saggar, S., Jha, N., Deslippe, J., Bolan, N. S., Luo, J., Giltrap, D. L., ... & Tillman, R. W. (2013). Denitrification and N<sub>2</sub>O: N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment*, *465*, 173-195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.050>
- Scholz, M., & Lee, B. H. (2005). Constructed wetlands: a review. *International journal of environmental studies*, *62*(4), 421-447. <https://doi.org/10.1080/00207230500119783>
- Scott, J. T., McCarthy, M. J., Gardner, W. S., & Doyle, R. D. (2008). Denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and nitrogen fixation along a nitrate concentration gradient in a created freshwater wetland. *Biogeochemistry*, *87*(1), 99-111. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9171-6>
- Simon, J., & Klotz, M. G. (2013). Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1827*(2), 114-135. <https://doi.org/10.1016/j.bbatio.2012.07.005>
- Smil, V. (2004). Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. *MIT press*.
- Song, S., Wang, P., Liu, Y., Zhao, D., & An, S. (2019). Effects of *Oenanthe javanica* on Nitrogen Removal in Free-Water Surface Constructed Wetlands under Low-Temperature

- Conditions. *International journal of environmental research and public health*, 16(8), 1420.
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*, 26(3), 205–214. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_22)
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, Evelien H. M. Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., ... Jetten, M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(July), 446–449.
- Takeuchi, J. (2006). Habitat segregation of a functional gene encoding nitrate ammonification in estuarine sediments. *Geomicrobiology Journal*, 23(2), 75-87. 0451. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048>
- Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E. M., & Richardson, D. J. (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. 1157–1168. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0415>
- 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), 1357-1364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01563.x>
- Tournebize, J., Gramaglia, C., Birmant, F., Bouarfa, S., Chaumont, C., & Vincent, B. (2012). Co-design of constructed wetlands to mitigate pesticide pollution in a drained catch-basin: a solution to improve groundwater quality. *Irrigation and Drainage*, 61, 75-86.
- Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380(1–3), 48–65. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.014>
- Vymazal, J. (2013). Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 61, 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.023>
- Vymazal, J., & Březinová, T. D. (2018). Removal of nutrients, organics and suspended solids in



- vegetated agricultural drainage ditch. *Ecological Engineering*, 118, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.013>
- Waki, M., Yasuda, T., Suzuki, K., Komada, M., & Abe, K. (2015). Distribution of anammox bacteria in a free-water-surface constructed wetland with wild rice (*Zizania latifolia*). *Ecological Engineering*, 81, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.005>
- Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N., ... Senoo, K. (2015). Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *The ISME Journal*, 9(9), 1954–1965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.9>
- Wu, H., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., ... Liu, H. (2015). A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>
- Xu, Y., Tong, T., Chen, J., Li, B., & Xie, S. (2018). Nitrite-dependent methane-oxidizing bacteria seasonally and spatially shift in a constructed wetland used for treating river water. *Ecological Engineering*, 110(July 2017), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.005>
- Zhao, S., Zhuang, L., Wang, C., Li, Y., Wang, S., & Zhu, G. (2018). High-throughput analysis of anammox bacteria in wetland and dryland soils along the altitudinal gradient in Qinghai–Tibet Plateau. *MicrobiologyOpen*, 7(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.556>
- Zhou, Z., Meng, H., Liu, Y., Gu, J. D., & Li, M. (2017). Stratified bacterial and archaeal community in mangrove and intertidal wetland mudflats revealed by high throughput 16S rRNA gene sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, 2148.
- Zhu, G., Wang, S., Wang, Y., Wang, C., Risgaard-Petersen, N., Jetten, M. S., & Yin, C. (2011). Anaerobic ammonia oxidation in a fertilized paddy soil. *The ISME journal*, 5(12), 1905. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.63>
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(4), 533-616.

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

Mina, Laurina Šinkejeva,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Lämmastikuringega seotud mikrobioloogiliste protsesside potentsiaal põllumajandusliku reostuse eemaldamisel vabaveelises tehismärgalas“, mille juhendaja on Teele Ligi, 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.

Laurina Šinkejeva

03.06.2019