

Celine Jackson Koop

# Jorrdamping og dens effekt på jordøkosystemet



**Universitetet i Sørøst-Norge**

Fakultet for teknologi, naturvitenskap og maritime fag

Institutt for natur, helse og miljø

Postboks 4

3199 Borre

<http://www.usn.no>

© 2024 Celine Jackson Koop

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

## Sammendrag

Denne oppgaven tar for seg jordøkosystemet og effekten av å dampe jorda. Jordet har tidligere fått påvist *Phytophthora fragariae* og har ligget brakk siden. Soilsteam International har dampa 9 ruter på 1,43 x 2,27 m og latt 9 tilsvarende ruter være ikke-dampa. Fra disse rutene har det blitt tatt 5 jordprøver fire ganger over tre måneder. Totalt 320 prøver har gjennomgått DNA-metastrekkoding for å finne ut hvordan denne behandlingen påvirker jordøkosystemet. Det ble funnet at selv om både DNA konsentrasjon og diversitet bygges opp igjen, ble det ikke likt over tre måneder. Den taksonomiske sammensetningen var forskjellig over hele perioden, noen familier så ut til å forsvinne i dampa jord og andre gjorde ikke det. Familier i klassen *Bacilli* var de som klarer seg best, og de var enten like i dampa og ikke-dampa jord eller så var de mer tallrike i dampa enn ikke-dampa. Til slutt er det konkludert med at videre studier over lengre tidsperioder bør utføres for å finne et større bilde på hvilken effekt behandlingen har.

Nøkkelord: DNA-metastrekkoding, jordøkosystem, jorddamping

## Abstract

This paper investigates the soil ecosystem and the effects of steaming the soil. The field has been infected by *Phytophthora fragariae* and has lied fallow since. Soilsteam International had steamed nine 1,43 x 2,27 m squares and left nine equal squares unsteamed. Over the course of three months five samples have been collected from each square four times. In total 320 soil samples have gone through DNA-metabarcoding to figure out how this treatment affects the soil ecosystem. It's been found that even though the DNA concentration and the diversity builds up again over time, they didn't become equal over three months. The taxonomic composition was different throughout the project, some families seemed to disappear in steamed soil, and others don't. Families in the *Bacilli* class were the ones that have either been unaffected, or that thrived in the steamed soil. Finally, it is concluded that further studies over longer time periods should be done to get a bigger picture of the effects of the treatment.

Keywords: DNA-metabarcoding, soil ecosystem, soil steaming

Innhold	
Sammendrag .....	3
Abstract .....	4
Forord.....	6
Innledning .....	7
Metode .....	11
Testområde .....	11
Prøvetakning.....	13
Lab.....	14
Dataanalyse .....	17
Resultater .....	20
DNA konsentrasjon .....	20
Alfaversitet .....	21
Betaversitet.....	25
Sammensetning .....	27
Diskusjon .....	37
Konklusjon.....	41
Bibliografi.....	43

## Forord

Jeg ønsker å takke alle som har bidratt til at denne masteroppgaven har kunnet blitt skrevet, først og fremst veileder Jørn Henrik Sønstebø.

Jeg vil også takke Erlend Stokka Aarlott for godt samarbeid i felt, på lab og utførelse av analyser og Melanie Schreier som har stått for opplæring i alle ledd utenom sekvenseringen. Hun har i tillegg utført library preparation på plate nummer fire, og den siste fortynningen før sekvenseringen for brett 1 sammen med Jørn Henrik Sønstebø. Han har også stått for sekvensering, dada2, og vi har samarbeidet på flere av datanalysene.

I tillegg vil jeg takke venner og familie for støtte og hjelp gjennom denne prosessen.

14.05.2024 Bø

Celine Jackson Koop

## Innledning

Jordøkosystemet er alt som lever i jorda; bakterier, sopp og andre mikroorganismer, samt planter og mindre dyr. Jordøkosystemet omhandler også de forskjellige komponentenes samhandling. Jordøkosystemet, og dermed den biologiske aktiviteten i jorda, er veldig viktig for vekster, inklusiv matproduksjon og annen vekstproduksjon (Pulleman et al., 2012). I denne oppgaven skal jeg fokusere på mikroorganismene, mer spesifikt bakterier.

Bakteriesamfunnet i jorda har mye å si for den biologiske aktiviteten. Dette er fordi bakteriene resirkulerer organisk materiale og tilfører næringsstoffer til jorda (Pulleman et al., 2012). De er viktige medlemmer av flere kretsløp, som karbon og nitrogen (Nielsen et al., 2011; Philippot et al., 2013), og de bryter ned både plante- og dyrerester (Wagg et al., 2014). For levende planters del er noe av det viktigste bakteriene gjør å tilgjengeliggjøre næringsstoffer (East, 2013). De viktigste næringsstoffene er nitrogen og fosfor, og bakterier kan bidra til å tilgjengeliggjøre begge (Timofeeva et al., 2023). En annen viktig funksjon bakterier har er fjerning av hemmende stoffer som tungmetaller (Al-Maliki & Al-Shamary, 2022). Enda et resultat av å ha en god sammensetning av bakterier og andre mikroorganismer kan være økt sykdomsresistens (Liu et al., 2021). Eksempler på dette er bakterier som produserer antimikrobielle stoffer som kan bekjempe sykdommer, og bakterier som produserer enzymer som kan bryte ned celleveggen til sopp (Carrión et al., 2019; Martín et al., 2007).

Sporedannende bakterier er bakterier som kan danne en endo- eller eksospore. Sporene gir bakteriene en mulighet til å overleve under vanskelige forhold (Brown, 2000). Sporene er resistente mot utvendige påvirkninger, og er derfor vanskelige å fjerne eller ødelegge og bakterier som kan lage sporer overlever flere typer behandlinger (Maclean et al., 2013), blant annet høye temperaturer. Det har blitt funnet sporer som overlever 140 °C i 15 minutter (O'Sullivan et al., 2014), samt at ved sjokkvarme kan sporer overleve inntil 382 °C (Zhou et al., 2015). To bakterie klasser som danner endosporer er *Bacilli* og *Clostridia* (Reineke et al., 2013).

Patogener, eller sykdommer, er alle organismer som lever av å skade en vertsorganisme. De er en viktig del av jordøkosystemet ettersom de kan hemme vekst og andre funksjoner i jordsmonnet (Hannula et al., 2020; Jones & Dangl, 2006). Patogener som går utover planter er ofte sopp eller sopplignende organismer (Domínguez-Begines et al., 2021). En

sopplignende rekke som inneholder mange plante patogener er oomyceter, eller eggsporesopper (Qiao et al., 2013). Innenfor denne rekken er slekten *Phytophthora* som inneholder velkjente plantepatogener, og *Phytophthora fragariae*, også kalt rød marg, er en av disse. Denne sykdommen tar livet av jordbærplanter (Newton et al., 2010). Dersom en bonde i Norge får påvist *Phytophthora fragariae* i jorda, må det jordet være i karantene i 15 år. Tilsvarende tiltak kan settes inn for andre planteskadegjørende etter paragraf 6 i Forskrift om planter og tiltak mot planteskadegjørere (Landbruks- og Matdepartementet, 2022).

Bekjempelse av patogener i jord kan være vanskelig. Det er mulig å bruke kjemikalier, men dette kan være skadelig for andre enn bare den spesifikke sykdommen (Ueki et al., 2018). Andre metoder har derfor blitt utviklet. Damping er en av disse og kan være et godt alternativ (van Loenen et al., 2003). Damping kan også bidra til å minske ugress og risikoen for å ta inn nye invaderende arter ved import av jord (Bitarafan et al., 2021; Melander & Kristensen, 2011). En annen metode kalles biologisk jorddesinfeksjon og bruker diverse organiske materialer for å bekjempe patogener ved å benytte det naturlige mikrobefunnet (Ueki et al., 2018).

DNA er arvestoffet i alle celler og inneholder koden for oppbygningen av alle levende organismer. Det består av mange nukleotider som igjen består av sukker, fosfat og en av fire nukleinsyrer. Miljø-DNA er DNA i jord, vann og luft, og kan være helt fritt eller i celler (Taberlet et al., 2012). I jord er det mikroorganismer, plante- og dyrerester, samt levende planter og dyr som både inneholder og/eller frigir DNA (Pietramellara et al., 2009). Dersom DNA-et i jorda er helt fritt er det avhengig av å adsorbere til blant annet jordpartikler (Levy-Booth et al., 2007). Miljø-DNA kan brukes til å undersøke hvilke organismer som er i det aktuelle miljøet, og til å estimere mengden av de forskjellige organismene (Andres et al., 2023). Bruk av miljø-DNA for å se på artssammensetning, har vist seg å fungere bedre enn i tradisjonelle studier (Leempoel et al., 2020). Dette er fordi det blant annet mulig å finne og klassifisere organismer man fysisk ikke kan se (Kestel et al., 2022).

Metastrekkoding er identifiseringen av DNAet i en prøve ved hjelp av sekvensering. Det første trinnet man må gjennom er ekstrahering av DNAet i prøven, deretter følger PCR, library preparation og selve sekvenseringen før man kan gå videre til analysering (Valentini et al., 2009).

Ekstrahering består overordnet av å ødelegge celler, utfelling av DNAet fra resten av prøvematerialet og til slutt vasking av DNAet. Sluttresultatet skal være rent DNA i en



bufferløsning man kan bruke videre i analysen (Gupta, 2019). Når man har ekstrahert DNAet må man gå gjennom en polymerasekjedereaksjon (PCR). Dette gjøres for å øke mengden, eller amplifisere, DNA i prøven (Schrader et al., 2012).

Før man kjører en PCR så må man tilsette primere, nukleotider og enzymer til prøven (Project, 2018). Primere er korte DNA tråder som skal passe til en spesifikk region på DNA tråden man ønsker å amplifisere (Sharma & Kobayashi, 2014). Her kan man også feste tags, eller merkelapper, til hver individuell prøve, dette er en kort DNA-sekvens som sier hvilken prøve produktet kommer fra (Binladen et al., 2007). Når det kommer til valg av primere, må man vurdere om man vil treffe mange organismer eller en spesifikk. Dersom man vil treffe mange, bør primeren være generell og treffe en seksjon av genomet som er veldig godt bevart på tvers av mange arter. For bakterier bruker man gjerne en generell primer som retter seg mot 16S rRNA som koder for ribosomet i bakterier og arker. (Sambo et al., 2018).

Det siste steget i metastrekkoding er sekvenseringen. Her blir DNA-et lest av slik at man kan se hvilke organismer som er tilstede i prøvene (Metzker, 2010).

Bruk av DNA-metastrekkoding er ikke problemfritt, og har sine ulemper. Miljø-DNA har i vært dårligere enn tradisjonelle studier i et vannøkosystem (Rose et al., 2019). Andre problemer kan oppstå etter prøvene er tatt, for eksempel primer bias, altså at primeren som brukes til PCR ikke er generell nok (Sharma & Kobayashi, 2014). Dessuten er det ikke den perfekte metoden for å estimere mengde, ettersom det kan forskyves under prøvetakning, ekstrahering, PCR eller sekvensering. Ukomplette referansedatabaser er et annet problem (Beng & Corlett, 2020).

I denne oppgaven skal jeg undersøke effekten av damping på samfunnet av bakterier og arker i jord. Jeg har fulgt mikrobefundet i fire måneder etter damping ved hjelp av DNA-metastrekkoding. Dette gjøres for å få en bredere forståelse på hvordan denne behandlingen påvirker mikrobefundet, både kort- og langsiktig. Det er også viktig å se på og sjekke at skaden dampingen gjør ikke er irreversibel, ettersom denne prosessen ikke er selektiv.

Mye tyder på at damping kan ha gode effekter når det kommer til matproduksjon. En studie av Guerra et. al. (2022) fant blant annet ut at både gulerøtter og salathoder ble minst 10% større etter damping, og at både ugress og sykdommer ble kraftig redusert.

Mikrobefundet har blitt undersøkt tidligere på en planteskole i California, USA. De fant blant annet ut at i den dampede jorda var det sporedannende bakterier som dominerte etter damping (Crandall et al., 2023).

Denne oppgaven skal se på hvilken effekt jorddamping har på jordøkosystemet. Dette gjelder både kort- og langsiktige effekter, og leder til følgende hovedmål, teste den umiddelbare og langsiktige effekten av jorddamping på jordøkosystemet.

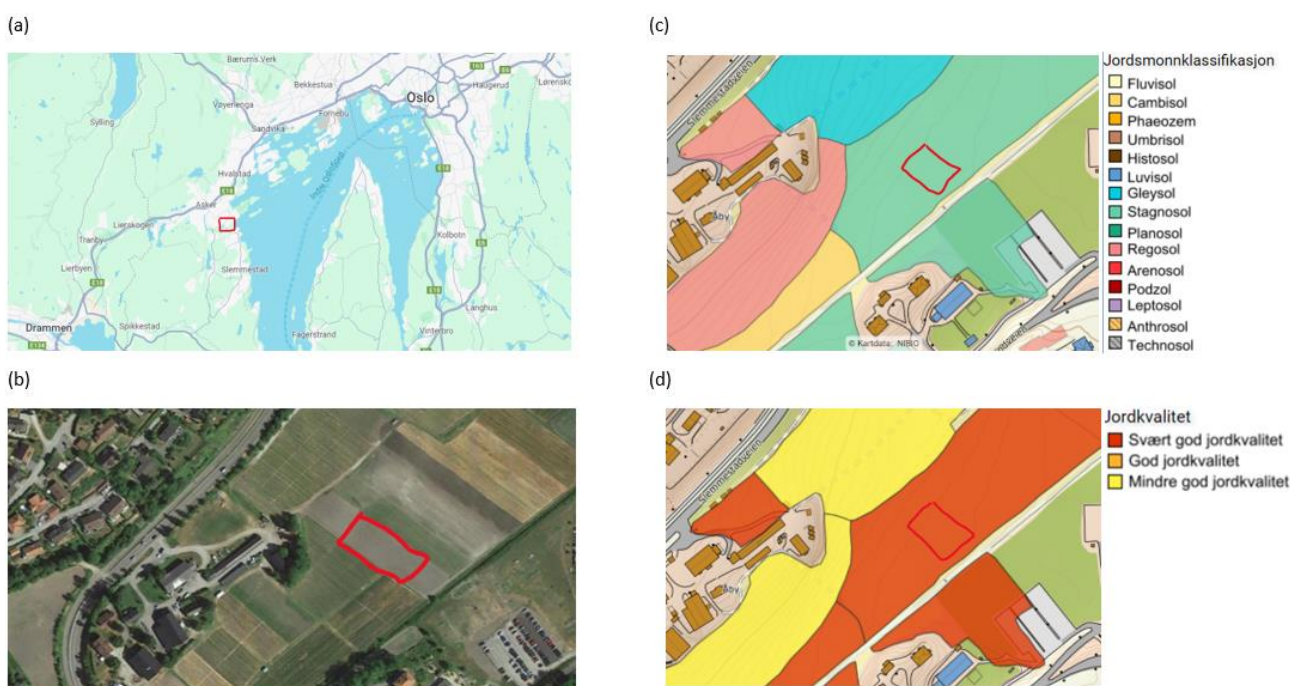
Videre skal jeg også se på (1) forskjellen i DNA konsentrasjon i dampa og ikke-dampa jord over tid, (2) jordøkosystemet og dets sammensetning, og (3) forskjellen i diversitet og sammensetningen i dampa og ikke-dampa jord over tid.

Disse målene leder igjen til hypotesene for denne oppgava, og hypotesene er som følger. (1) DNA konsentrasjonen vil være høyere i ikke-dampa jord, og vil stige med tiden i den dampa jorda. (2) Jorddamping vil ha en stor effekt på jordøkosystemet, men jordøkosystemet vil klare å “bygge” seg opp igjen. (3) Det vil være stor forskjell i diversitet og sammensetning mellom dampa og ikke-dampa jord, men den vil minske over tid.

# Metode

## Testområde

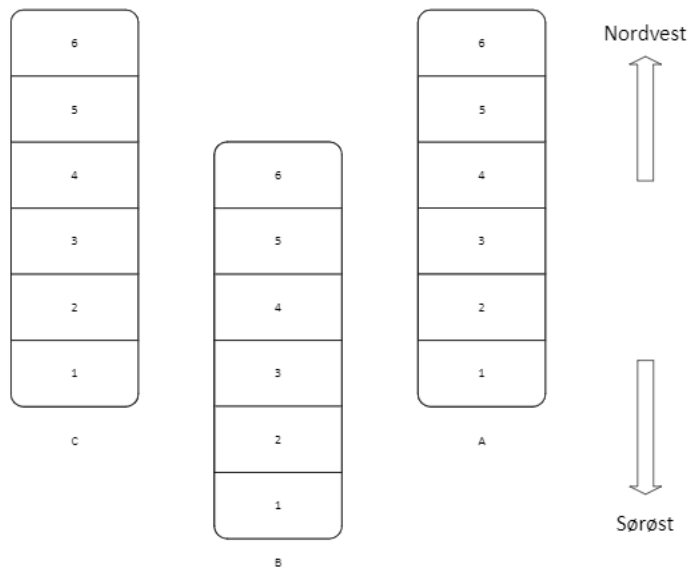
Testområdet for forsøket ligger på Aaby gård i Asker (figur 1). Produksjonen på gården er jordbær som dyrkes på friland. Forsøket med damping av jord ble gjennomført på et jorde der det tidligere har blitt påvist rød marg (*Phytophthora fragariae*). Før damping ble alle jordbærplanter fjernet og jorda harvet. Jorda er stagnosol jord og har svært god kvalitet (figur 1). Stagnosol jord er en jordtype som ikke drenerer spesielt godt, og er ofte næringsrik (Nibio, 2024b).



Figur 1: Kart over området. (a) Viser hvor testområdet ligger i forhold til større byer som Oslo og Drammen (Google Maps, 2024a). (b) Viser et nærbilde av Aaby gård og testfeltet (Google Maps, 2024b). (c) Viser jordsmonnklassifiseringen på jordene til bonden, på testfeltet er det Stagnosol jord (Nibio, 2024a). (d) Viser jordkvaliteten på jordene til bonden, og på testfeltet er det svært god jord (Nibio, 2024a). Kartene er vendt slik at nord er oppover, feltområdet ligger derfor omtrentlig nordvest-sørøst, og alle boksene viser til testområdet.

Tre striper (A-C) med 6 ruter på 1,43 x 2,27 m ble merket opp. Annenhver rute ble behandlet med damp og de andre rutene forble ubehandlet og har fungert som kontroll. Totalt ble 9 ruter dampa og 9 forble ikke-dampa. Dampingen foregikk den 19.06.2023. Vi ekskluderte to ruter, og har derfor til slutt 8 dampa og 8 ikke-dampa. Maskinen kjørte A1-A6 så B6-B1 og til slutt C1-C6. Stripene er derfor litt forskjøvet i forhold til hverandre. På stripe A og C ble

oddetallene dampa, og på stripe B ble partallene dampa. Etter behandlingen ble ikke jordet dekket til. Oppsettet kan sees på figur 2.



Figur 2: Oppsettet på testområdet. A5 og A6 har blitt ekskludert. Pilene indikerer den omtrentlige himmelretningen til testområdet. Fieldsaver har kjørt fra A1 til A6 til B6 til B1 til C1 til C6 og dampa annenhver rute. Det vil si at A1, A3, A5, B2, B4, B6, C1, C3 og C5 har blitt dampa, og resten ble ikke dampa.

Dampingen gjøres ved å fukte jorda og varme vannet som er i den. Dette skal fjerne bakterier og andre uønskede organismer i jordsmonnet. Teorien er dermed å sterilisere med varme og fuktighet, og skal fungere som et alternativ til kjemisk behandling og karantene. Dette er ikke en selektiv prosess, og skal i teorien påvirke alle organismer i jordsmonnet. Soilsteam har to maskiner, Soilsaver, som er stasjonær og Fieldsaver, som er selvkjørende. Den selvkjørende er den som har blitt brukt i dette prosjektet og kan sees på figur 3. For denne behandlingen lå snittemperaturen på omtrentlig 75°C, på overflaten lå den mellom 95 og 100°C, mens ved 15 cm dyp lå temperaturen nede i 70°C.



Figur 3: Bilde over testområdet dagen etter dampingen. Fieldsaver står til venstre i bildet. De røde pinnene markerer feltene hvor prøvene skal tas, og de er annenhver dampa og ikke-dampa, 18 ruter fordelt på 3 striper. Til høyre i bildet står Erlend Stokka Aarlott (f.v.) og Celine Jackson Koop som foretar prøvetakning. Bildet er tatt 20.06.2023.

### Prøvetakning

Testområdet ble besøkt fire ganger etter dampingen. Dagen etter dampingen (20.06.2023), en uke etter dampingen (28.06.2023) og to ganger senere (25.08.2023 og 27.09.2023). På hver prøvetakningsdato er det tatt en prøve i hvert hjørne, pluss en i midten fra hver rute (figur 4). Det er dermed tatt 80 prøver ved hver dato og 320 totalt. Prøvene ble tatt ved at 50ml sterile falconrør med skrulokk ble presset ned i jorda på ett av punktene. Alle prøvene ble merket med rutenummer, hvor i ruta det ble tatt og dato. Prøvetakningsdatoene, dager siden behandling og hvem som har tatt prøvene kan sees i tabell 1. Prøvene ble fryst ved  $-20^{\circ}\text{C}$  så fort som mulig og ble oppbevart i fryser frem til DNA ekstrahering.



Figur 4: Oppsettet innenfor hver rute. I alle rutene utenom A5 og A6 er disse prøvene tatt på hver prøvetakningsdato. Pilene indikerer den omtrentlige himmelretningen til testområdet.

Tabell 1: Oversikt over når prøvene er tatt, hvor lenge etter behandlingen prøvetakningen er, og hvem som har tatt prøvene.

	<b>DATO</b>	<b>DAGER SIDEN BEHANDLING</b>	<b>UTFØRT AV</b>
PRØVETAKNING 1	20. Juni 2023	1 dag	Celine Jackson Koop og Erlend Stokka Aarlott
PRØVETAKNING 2	28. Juni 2023	9 dager	Jørn Henrik Sønstebo
PRØVETAKNING 3	25. August 2023	67 dager	Celine Jackson Koop og Erlend Stokka Aarlott
PRØVETAKNING 4	27. September 2023	101 dager	Celine Jackson Koop og Erlend Stokka Aarlott

## Lab

Labarbeidet for denne oppgaven startet opp den 11.09.2023 og avsluttet 31.1.2024. DNA ekstrahering, og etterfølgende fortykning er gjort i samarbeid med Erlend Stokka Aarlott. DNA ble ekstrahert fra jordprøvene ved hjelp av Dneasy powersoil pro kit (Quiagen, 2023).

Vi fulgte standard protokoll for dette kitet. Normalt sett ble tjuefire prøver ekstrahert av gangen og inneholdt 23 jordprøver og en negativ kontroll. Ved oppveiningen av prøven ble utstyret sterilisert ved å brenne av eventuell kontaminering og det ble i tillegg vasket med 70% alkohol. Heretter ble prøvene nummerert fra 1219 til 1538. Konsentrasjonen til det ferdig ekstraherte DNAet ble målt med en Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher). Deretter ble også disse prøvene fryst ved -20°C. Prøvenummer og konsentrasjon kan sees i vedlegg 1.

For å standardisere mengden DNA ble prøvene fortynnet til rundt 15ng/μL. De som allerede hadde omtrentlig denne verdien eller mindre ble ikke fortynnet. Alle prøvene ble fordelt på en av fire 96 brønns (200 μL) plater, og for de tre første platene ble tre negative kontroller fra ekstraheringen inkludert. På plate nummer fire ble to negative kontroller inkludert ettersom det var et halvfullt brett. Alle platene inneholder en PCR-negativ. Vi brukte nucleasfritt vann til fortynningen av DNA og som PCR-negativ. Vi brukte målingene vi gjorde etter DNA ekstraheringen som utgangspunkt, og satte det opp i et excel ark som regnet ut fortynningsforholdet, og for å forsikre oss om at prøven var innenfor så målte vi konsentrasjonen igjen med Nanodrop Lite Spectrophotometer. Oppsettet og fortynningene kan sees i vedlegg 2.

DNA-metastrekkoding ble brukt til å undersøke den taksonomiske sammensetningen av bakterier og arker i jordprøvene. Først ble en variabel del av 16S rRNA (V3) PCR amplifisert ved hjelp av primerne 515F (Parada et al., 2016) og 806R (Apprill et al., 2015). En polymerasekjedereaksjon består av tre trinn, det første er denaturering, hvor en dobbel DNA tråd deles i to. Trinn nummer to er hybridisering, hvor primere fester seg til en komplementær sekvens på DNAet. Til slutt kommer dannelsen av den nye DNA tråden. PCR ble gjort med 30 sykluser, se tabell 2 for PCR program, i 25ml volum som inneholder 12.5ml Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR 2X Master Mix, 200nM av hver primer og rundt 15ng DNA. 515F er merket med DNA tagger som er 10-12 bp lange og brukes til å skille mellom sekvenser fra de ulike prøvene.

Tabell 2: PCR programmet alle brettene har vært gjennom og viser temperaturene, tidene og antall sykluser.

<b>TRINN</b>	<b>TEMPERATUR</b>	<b>TID</b>	<b>SYKLUS(ER)</b>
--------------	-------------------	------------	-------------------

---

INNLEDENDE DENATURERING	98°C	30 sek	1
DENATURERING PRIMERE	98°C	10 sek	
TILFESTES FORLENGELSE	50°C	10 sek	30
AV DNA	72°C	15 sek	
ENDELIG FORLENGELSE	72°C	5 min	1
AV DNA			

Kvaliteten på PCR produktet ble testet ved hjelp av gel elektroforese. Her ble Agarose 2% plater med 11 brønner brukt (eGel system). Den første brønner er tiltenkt en referanse, her er E-Gel 1Kb Plus Express DNA Ladder (Thermo Fisher) brukt ettersom den er kompatibel med 2% Agarose plater. I referansen er blandingsforholdet 2  $\mu$ L express DNA og 18  $\mu$ L nucleasefritt vann, mens i prøvene er blandingsforholdet 5  $\mu$ L prøve og 15  $\mu$ L nucleasefritt vann. Alle blandinger overføres til sine respektive brønner og deretter settes maskinen på i 15 minutter.

DNA bibliotekene ble preparert ved hjelp av Ion torrent plus fragment library kit (Thermo Fisher), tilhørende protokoll ble brukt (Thermo Fisher, 2016). De ulike bibliotekene ble merket ved hjelp av Ion Xpress Barcode Adapters 1-24 Kit (Thermo Fisher). Det første steget er at alle prøvene på ett Brett samles i et 2mL eppendorfrør. Her er det tatt 2  $\mu$ L av hver prøve, utenom de negative kontrollene som det kun er tatt 1  $\mu$ L av. Denne samlede prøven ble deretter analysert med Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher). Her har vi brukt programmet Ds DNA high sensitivity. Prøven analyseres opp mot to standarder som består av 190  $\mu$ L Qubit 1X dsDNA HS working solution (Thermo Fisher) og enten 10  $\mu$ L Qubit 1X dsDNA HS Standard #1 (Thermo Fisher) eller 10  $\mu$ L Qubit 1X dsDNA HS Standard #2 (Thermo Fisher). For å teste selve prøven brukes 199  $\mu$ L Qubit 1X dsDNA HS working solution og 1  $\mu$ L prøve.

Deretter ble endene på DNA trådene “fikset”, også kalt end-repair. Da begynner man med å fortynne prøven med resultatet av qubit analysen som grunnlag. Nucleasefritt vann er brukt til fortynningen. Protokollen ber om 10-100ng i 79  $\mu$ L. Derfor fortynnet vi til et totalvolum på 80  $\mu$ L slik at 1  $\mu$ L kunne testes med qubit for å være sikker på at konsentrasjonen er riktig. Deretter tilsettes buffer og enzym etter protokoll. Etter end-repair skal prøven vaskes før man kan gå videre til å feste på adaptere. Dette gjøres med en PCR etter protokollen og her er



blandingsforholdet under “barcoded libraries” i protokollen brukt. Deretter skal prøven vaskes igjen, og her er det brukt 120  $\mu\text{L}$  Agencourt AMPure XP Reagent som tilsvarer bibliotekstrørrelse på 200-300 basepar. Til forskjell fra protokollen tok vi ut 18  $\mu\text{L}$  og ikke 20  $\mu\text{L}$  i trinn 8 under “Purify the adapter-ligated and nick-repaired DNA”. Dette er gjort fordi det er vanskelig å ikke ta med noen AMPure beads hvis man pipetterer opp hele volumet.

Til slutt ble Ion library TagMan quantitation kit (Thermo Fisher, 2022) brukt til å bestemme konsentrasjonen i picomolar (pM) fordi det trengs 25-60 pM i 25  $\mu\text{L}$  til sekvensering. Det er gjort ved å sammenligne en fortynningsrekke av et DNA biblioteket av e.coli med kjent konsentrasjon med ulike fortynninger av prøvene. Det ble også inkludert en negativ kontroll i form av nucleasfritt vann. Fortynningsrekka av e.coli inneholder 5 prøver og fortynningsrekka av prøven inneholder 3 prøver, men den første av disse tas ikke med på qPCR brettet. Standardene, prøvene og negativ kontroll fordeles på en 48-brønns plate. Resultatet av qPCR må deretter ganges opp med fortynninga for å få pM i den originale prøven. Dette resultatet brukes videre til sekvenseringen.

Til selve sekvenseringen er maskinene Ion Chef, Ion S5 Chef Supplies og Ion Gene Studio (Thermo Fisher) brukt, samt tilhørende protokoller (Thermo Fisher, 2023a; Thermo Fisher, 2023b). Sekvenseringen består av to overordnede trinn; amplifisering og avlesning. Denne sekvenseringsmetoden gjør at man kan få mange avlesninger med høy nøyaktighet. På hver chip har 25  $\mu\text{L}$  blitt tilsatt og de skal inneholde 25-60pM med DNA. Her har vi siktet mot 50pM ved hver sekvensering.

## Dataanalyse

Når sekvenseringen er ferdig, må resultatene identifiseres og senere analyseres. Dette starter med demultiplexing, altså at sekvensene blir sortert etter hvilken prøve de kom fra (Guenay-Greunke et al., 2021). Deretter brukes DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm), som filtrerer sekvenseringsresultatene (Callahan et al., 2016). Tax\_glom funksjonen er brukt til å slå sammen ASVer på slektsnivå, dette er en funksjon som er en del av phyloseq pakken (McMurdie & Holmes, 2021).

For å gjennomføre dataanalyse har jeg brukt RStudio 2023.12.1+402 (Posit). Pakker som ble brukt er phyloseq, vegan (Oksanen et al., 2022), data.table (Barrett et al., 2024), tidyr (Vaughan et al., 2024), ggplot2 (Wickham, Chang, et al., 2023), dplyr (Wickham, François, et al., 2023), randomForest (Breiman et al., 2022). Scriptet er lagt ved som vedlegg 6.

Boxplotet over DNA konsentrasjonen laget vi for å visualisere denne utviklingen i både de dampa og ikke-dampa prøvene over tid. Det er gjort med funksjonen `boxplot` fra pakken `graphics`.

Lineær regresjon brukes for å teste sammenhengen mellom to eller flere variabler, der en av variablene er resultatvariabelen, mens de andre er forklaringsvariabler. Her har jeg testet behandling og dato mot DNA konsentrasjonen, behandling og dato mot diversitet og posisjonen til prøven, behandling og dato mot diversitet. Dette er for å se om dato, behandling eller posisjon har noe å si for diversiteten i prøven. Faktorene som testes mot konsentrasjon eller diversitet er satt opp slik at resultatet også viser interaksjonen mellom variablene der det er to forklaringsvariabler.

Jeg har brukt en Mann-Whitney-U test for å se på om det er signifikant forskjell mellom dampa og ikke-dampa jord ved hver prøvetakningsdato. Denne testen brukes for å se om det er statistisk forskjell på to sett med verdier (Mann & Whitney, 1947). Dette er gjort ved å lage subset for hver dato som deretter testes. Jeg har brukt den til å se på DNA konsentrasjonen og diversiteten.

Alfa diversitet ser på diversiteten i hver enkelt prøve, og funksjonen `plot_richness` fra pakken `phyloseq` visualiserer denne diversiteten innenfor kategoriene observert, ACE og Shannon. ACE (abundance-based coverage estimator) ser på de artene det er få av og estimerer diversiteten inkludert uoppdagede arter (Chao et al., 2006). Shannon indeksen tar hensyn til mengden av de forskjellige artene i tillegg til antall arter (Konopiński, 2020).

Jeg har laget boxplot som illustrerer diversiteten til både de dampa og ikke-dampa over tid. I tillegg har jeg laget boxplot som ser på forskjellen i diversiteten hos prøvene som er tatt i midten kontra på kanten. Alle disse er laget med funksjonen `geom_boxplot` fra `ggplot2` pakken.

For å teste og visualisere forskjellen mellom de dampa og de ikke-dampa prøvene brukes PCoA sqrt Bray Curtis plot. `Transform_sample_counts` og `bray` metoden er brukt som grunnlag for plotet. Deretter er funksjonenn `plot_ordination` brukt for å lage plotet. Her er `phyloseq` og `vegan` pakkene brukt.

En adonis test (PERMANOVA) brukes for å se hvilken faktor som har mest innflytelse på betadiversiteten. Den ser på forskjellene i sammensetninger av slekter mellom prøvene. Først bruker man funksjonen `phyloseq::distance` og `bray` metoden for å få et distanseobjekt som

kan brukes i selve testen. Deretter har jeg kjørt distanseobjektet mot dato og behandling. For å gjennomføre en adonis test brukes phyloseq og vegan pakkene.

Et heatmap visualiserer hvilke slekter som var i hvilke prøver, og hvor mye det var. Her har jeg laget et heatmap for hver dato og prøvene er sortert etter behandling, slektene er sortert etter familie. Jeg har brukt plot\_heatmap funksjonen som er en del av phyloseq pakken og bruker ggplot2 grafikk.

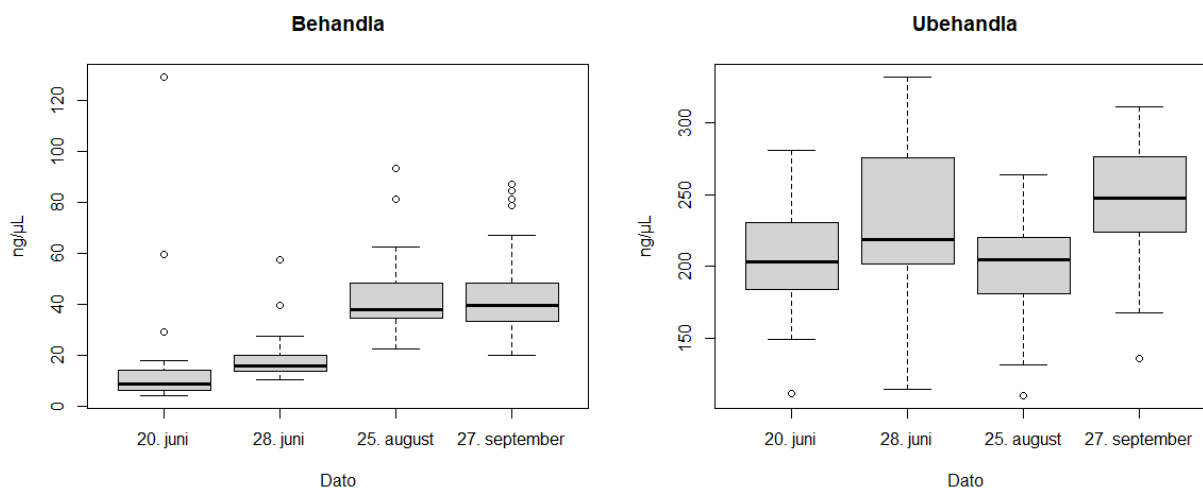
Random forest (Breiman, 2001) er en metode jeg har brukt til å finne slektene i datasettet som skiller mellom dampa og ikke-dampa prøver, og pakken randomForest er brukt. Dette har gitt en rf-modell der slekten som er høyest og lengst til høyre i diagrammet er den det er det vanligste utfallet av rf trærne. Ved hjelp av dette diagrammet og en taksonomisk tabell har jeg tatt de 9 øverste familiene (vedlegg 4 og 5). Disse 9 familiene er igjen plottet inn i hvert sitt boxplot. Boxplotet tar ikke hensyn til dato, men kun om prøvene er dampa eller ikke, derfor har jeg gjentatt prosessen for hver prøvetakningsdato.

Jeg har også gjort Mann-Whitney-U tester på de 9 familiene som var øverst i random forest modellene. Da har jeg brukt funksjonen psmelt til å lage tabeller med mengden til de forskjellige slektene også brukt subset funksjonen til å teste en og en familie. Psmelt er en del av phyloseq pakken og subset er en del av data.table pakken.

## Resultater

### DNA konsentrasjon

DNA konsentrasjonen økte over tid (fra juni til september) i både de dampa og ikke-dampa prøvene. Medianen til de dampa prøvene økte med omtrent 30 ng/μL, fra rundt 10 ng/μL til rundt 40 ng/μL, mens medianen til de ikke-dampa prøvene økte med omtrent 40 ng/μL, fra rundt 200 ng/μL til rundt 240 ng/μL. Økningen fremstår mer konsekvent i de dampa prøvene, mens i de ikke-dampa var det litt større variasjon, med en nedgang på nest siste prøvetakningsdato (figur 5). En lineær regresjon viser at økningen var signifikant for alle faktorer utenom Dato28.06.2023 og Dato27.09.2023:DampaNei (tabell 3). Videre viser Mann-Whitney-U test at forskjellen ved hver dato var signifikant (tabell 4).



Figur 5: Figuren viser DNA konsentrasjonen i testfeltet over tid, delt inn i om de er dampa eller ikke. Måleenheten er ng/μL og konsentrasjonene er målt med Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher). Den sorte streken indikerer medianen, og den grå boksen er de midterste 50% av målingene. De stiplede linjene med avsluttende vertikal strek er øvre og nedre 25% av målingene og sirklene representerer uteliggere. Laget i samarbeid med Erlend Stokka Aarlott.

Tabell 3: Lineær regresjon på DNA konsentrasjon, dato og behandling. Analysert i samarbeid med Erlen Stokka Aarlott. Denne viser at for alle utenom 28.06.2023 og interaksjonen Dato27.06.2023:DampaNei var signifikante.

	<b>T-verdi</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
(Intercept)	2.894	0.004079
Dato25.08.2023	3.886	0.000124

Dato27.09.2023	4.118	4.91e-05
Dato28.06.2023	0.496	0.620452
DampaNei	26.761	<2e-16
Dato25.08.2023:DampaNei	-3.155	0.001721
Dato27.09.2023:DampaNei	1.307	0.192248
Dato28.06.2023:DampaNei	2.275	0.023560

Tabell 4: Resultatene av Mann-Whitney-U testene for DNA konsentrasjon. Analysert i samarbeid med Erlen Stokka Aarlott. Denne viser at det var signifikant forskjell på DNA konsentrasjonen i de dampa og ikke-dampa ved hver prøvetakning.

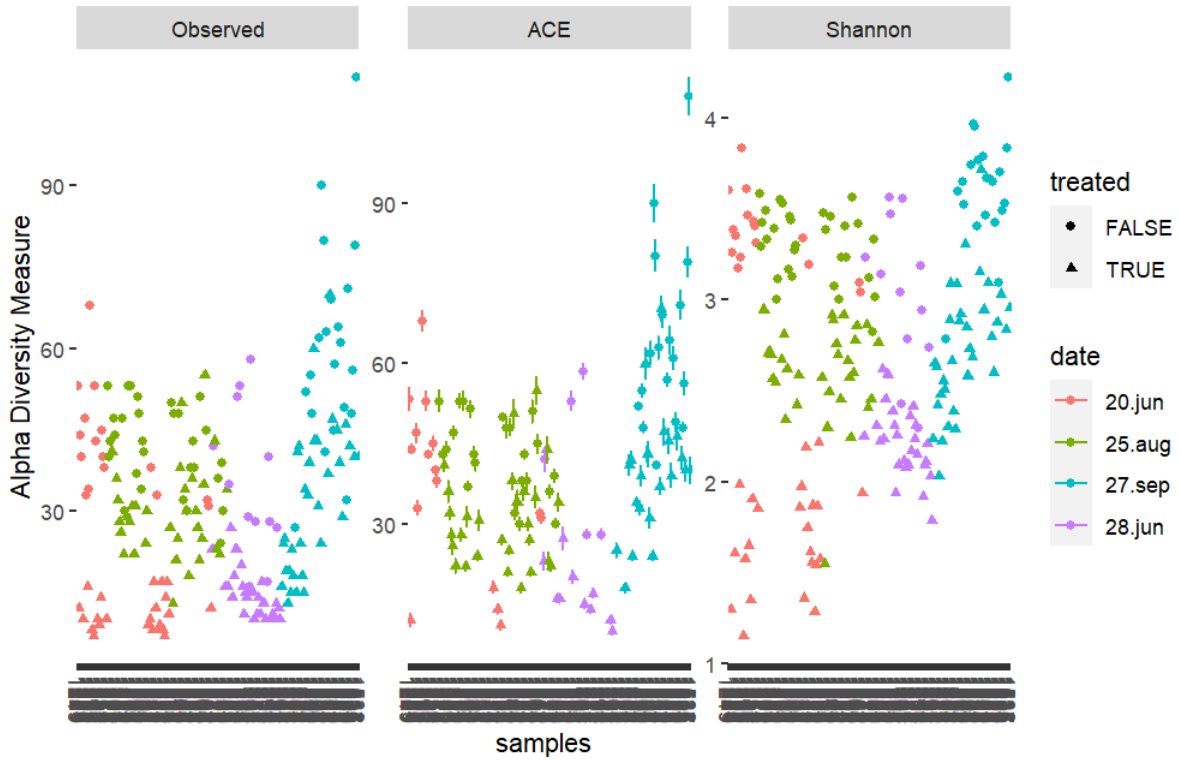
Dato	P-verdi
20.06.2023	3.373e-14
28.02.2023	1.433e-14
25.08.2023	1.432e-14
27.09.2023	1.434e-14

Under sekvensering var det totalt 83 av 318 prøver som falt ut. Falt ut er her definert som de prøvene som hadde mindre enn 1000 sekvenser etter filtrering. Av disse var 27 dampa, 41 ikke-dampa og 15 negative kontroller. Det vil si at alle de negative kontrollene falt ut, både de fra ekstraheringsprosessen og PCR-negative. Fra plate 1 var det 42 som falt ut, fra plate 2 var det 20, fra plate 3 var det 13, og fra plate 4 var det 8. Fra 20.06.2023 var det 33 som falt ut, fra 28.06.2023 var det 13 som falt ut, fra 25.08.2023 var det 16 som falt ut, og fra 27.09.2023 var det 6 som falt ut. Antall sekvenser i prøvene og hvilke som falt ut kan sees i vedlegg 3.

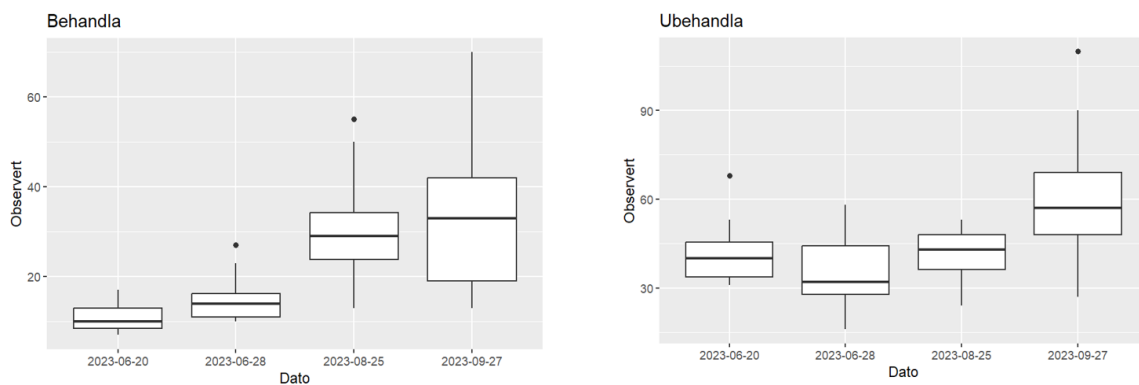
### Alfaversitet

Alfa diversiteten i hver prøve beskrives her med observert verdi, ACE og Shannon. Figur 6 viser diversiteten for de individuelle prøvene. I alle tre måleenheter hadde de ubehandlede prøvene høyere verdi enn de behandlede, selv om det er en viss overlapp mellom prøver fra dampa og ikke-dampa jord. For alle tre kategorier var det tydeligst forskjell mellom dampa og ikke-dampa for den første datoen, 20.06.2023, mens forskjellen mellom dampa og ikke-

dampa jord ble mindre i senere innsamlinger. Forskjellen i alfadiversitet kommer tydeligere fram i boxplottene i figur 7. Her ser man tydelig at diversiteten totalt økte i både den dampa og ikke-dampa jorda. Medianen til observert diversitet i de dampa prøvene økte fra rundt 5 til 35, mens i de ikke-dampa økte fra rundt 40 til 55.



Figur 6: Viser diversiteten etter observert verdi, ACE og Shannon. Fargene indikerer prøvetakningsdato og formen indikerer om prøven er dampa eller ikke-dampa. Her er det tydelig at det var forskjell i diversiteten i de dampa kontra de ikke-dampa.



Figur 7: Boxplot som viser diversiteten i de ikke-dampa og dampa. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer uteliggere.

For å teste om diversiteten endres over tid, brukes lineær regresjon. Her er diversitetsverdien resultatvariabel og dato og behandling er forklaringsvariabler. Tabell 5 viser resultatene av denne analysen og der er det mulig å se at Dato28.jun og DampaNEI:dato27sept er de eneste som ikke var signifikante. Tabell 6 viser resultatene av Mann-Whitney-U testene, den viser at forskjellen var signifikant for alle datoene.

Tabell 5: Resultatet av lineær regresjon som er satt opp med diversitet, dato og damping. Denne viser at det var signifikant forskjell på alle med unntak av Dato28.jun og interaksjonen DampaNEI:dato27sep.

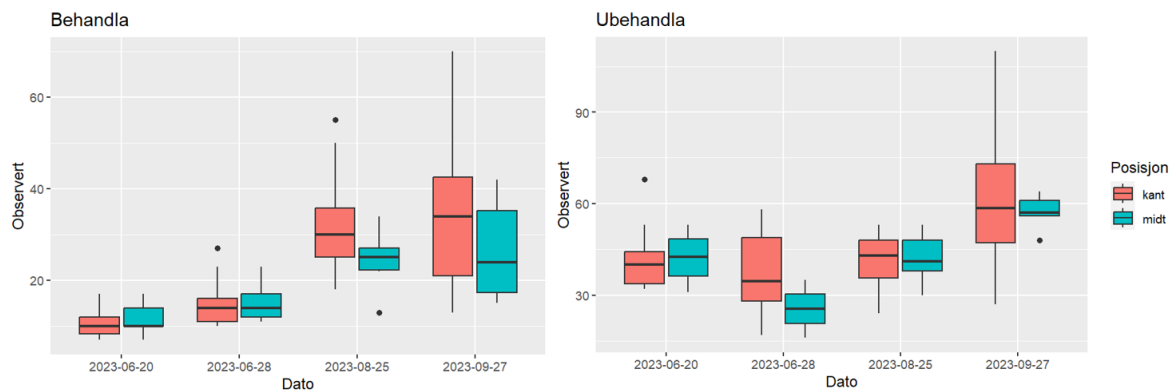
	<b>T-verdi</b>	<b>Pr(&gt;  t )</b>
(Intercept)	4.871	2.35e-06
DampaNEI	8.700	1.70e-15
Dato25.aug	6.318	1.89e-09
Dato27.sept	7.187	1.54e-11
Dato28.jun	1.227	0.2212
DampaNEI:dato25aug	-4.293	2.83e-05
DampaNEI:dato27sep	-0.717	0.4745
DampaNEI:dato28.jun	-2.016	0.0453

Tabell 6: Resultatene av Mann-Whitney-U testene der hver dato er satt opp mot hverandre. Denne viser at det var signifikant forskjell på alle.

<b>Dato</b>	<b>P-verdi</b>
20.06.2023	4.212e-07
28.06.2023	0.0001906
25.08.2023	7.19e-06
27.09.2023	8.764e-07

Forskjellen i diversitet mellom prøvene som ble tatt på kanten og midten av hver rute er også testet. I figur 8 kan man se at selv om diversiteten i kantprøvene tilsynelatende økte fortere enn midtprøvene i de dampa rutene så var det ikke stor forskjell. De to første prøvetakningsdatoene, 20.06.2023 og 28.06.2023 viser lite forskjell mellom kant- og

midtprøver, men de to siste prøvetakningsdatoene, 25.08.2023 og 27.09.2023 hadde en litt større forskjell. Medianen viser en forskjell på rundt 5 og 10 observert henholdsvis, og det var kantprøvene som hadde høyest diversitet. Diversiteten i de ikke-dampa prøvene ser ikke ut til å være påvirket av hvor i ruta prøvene er tatt. Her var diversiteten høyest i midtprøvene ved første prøvetakning, 20.06.2023, men den var høyere i kantprøvene ved andre prøvetakning, 28.06.2023. Ved de to siste var diversiteten veldig lik, men medianen var litt høyere i kantprøvene. Ved hjelp av lineær regresjon er det mulig å se om posisjonen hadde signifikant påvirkning på diversiteten, og det hadde den ikke (tabell 7).



Figur 8: Viser diversiteten i prøvene delt inn etter om de er tatt i kanten eller midten, de er også delt inn etter om de er dampa eller ikke. Den sorte streken indikerer medianen. Boksen er de midterste 50% av målingene, de røde representerer kantprøvene, og de turkise indikerer midtprøvene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer uteliggere.

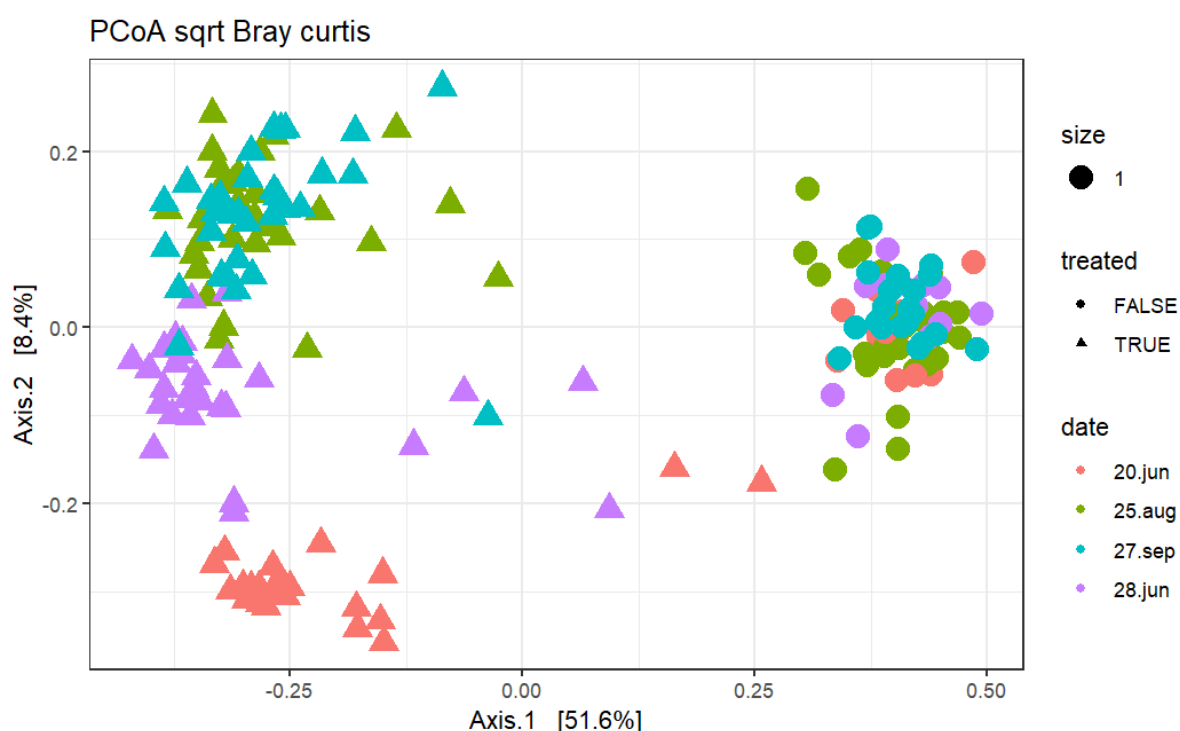
Tabell 7: Resultatet av lineær regresjon som ser på om posisjonen til prøvene hadde noe å si for diversiteten. Her er det mulig å se at posisjonen ikke var signifikant.

	<b>T-verdi</b>	<b>Pr(&gt;  t )</b>
(Intercept)	-7.873	2.72e-13
Posisjonmidt	1.348	0.179
DampaNEI	1.237	0.218
Dato	7.915	2.12e-13
Posisjonmidt:DampaNEI	-0.919	0.359
Posisjonmidt:Dato	-1.351	0.178
DampaNEI:Dato	-1.215	0.226
Posisjonmidt:DampaNEI:Dato	0.920	0.359



## Betadiversitet

Figur 9 viser de to første aksene av en PCoA analyse. Dette er en visuell representasjon av forskjellen i sammensetning av slekter mellom prøvene, der fargen representerer prøvetakningsdatoen til prøven, og formen viser om prøven kommer fra dampet eller ikke-dampet jord. Prøvene fra dampa og ikke-dampa jord skiller på x-aksen som forklarer 51.6% av forskjellen. På y-aksen, som representerer 8.4% av forskjellen varierer i størst grad prøver fra ulike datoer og da spesielt prøvene fra dampa jord. Dette plotet viser at det var en stor forskjell mellom de dampa og ikke-dampa prøvene. De ikke-dampa var veldig like og ligger som en klynge til høyre i figuren. De dampa endret seg over tid og ligger mer spredt, men de to siste datoene ligger mer samla, altså 25.08.2023 og 27.09.2023. Det er noen dampa som ligger lengre mot de ikke-dampa prøvene, men totalt så var det en tydelig forskjell.



Figur 9: PCoA sqrt Bray curtis plot som viser forskjellen mellom de forskjellige prøvene. X-aksen forklarer 51.6% av forskjellen, mens y-aksen forklarer 8.4% av forskjellen. Fargene viser til prøvetakningsdatoen og formen viser om prøven er dampa eller ikke.

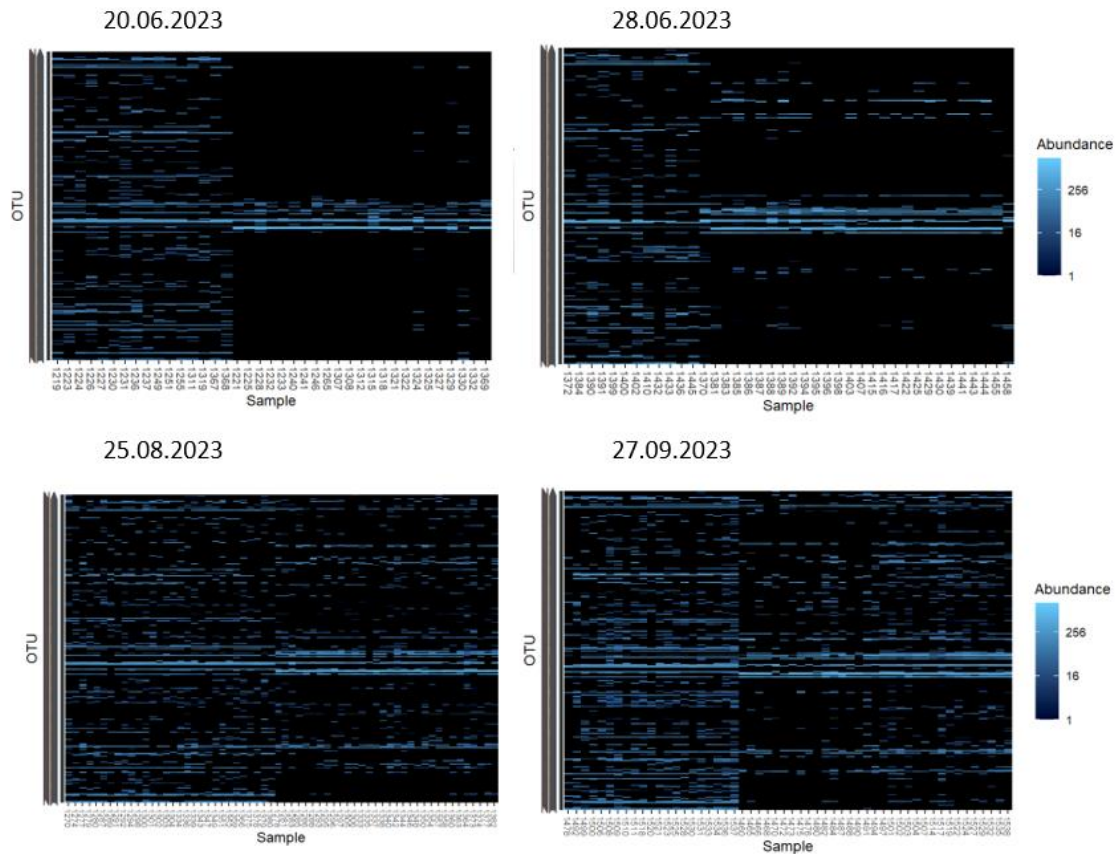
Adonis testen viser at dampbehandlingen forklarer over 50% av forskjellen mellom prøvene, og at dato forklarer nesten 3% (tabell 8). Dette samsvarer godt med figur 9, og det bekrefter at det er behandlingen som hadde mest å si for forskjellen mellom prøvene. Det bekrefter

også at tiden hadde noe å si, men på langt nær like mye. Interaksjonen mellom de to hadde også noe å si, litt under 2%.

Tabell 8: Resultatet av adonis testen som ser på forskjellen mellom de forskjellige prøvene. R2 viser hvor stor andel av forskjellen hver faktor representerer.

	<b>R2</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
Dampa	0.51007	0.001
Dato	0.02910	0.001
Dampa:Dato	0.01699	0.001
Residual	0.44384	

Figur 10 viser fire heatmap, et for hver innsamlingsdato, som visualiserer hvilke slekter som finnes i hvilke prøver, altså kan man se hvilke slekter som var mest fremtredende blant prøvene, mengden av hver slekt i prøvene og antallet i hver prøve. Her er det tydelige fremtredende slekter som strekker seg over de fleste prøvene, men også en del slekter som ikke finnes i mange prøver. Hvert heatmap viser tydelig at det var en forskjell mellom hvilke slekter som dominerer de dampa og ikke-dampa prøvene. Figur 10 viser tydelig at det var få slekter i dampa prøver rett etter damping og at flere slekter kom inn ved senere innsamla prøver. Disse nye slektene som kommer inn i de dampa prøvene samsvarer derimot i liten grad med slektene i ikke-dampa prøver.

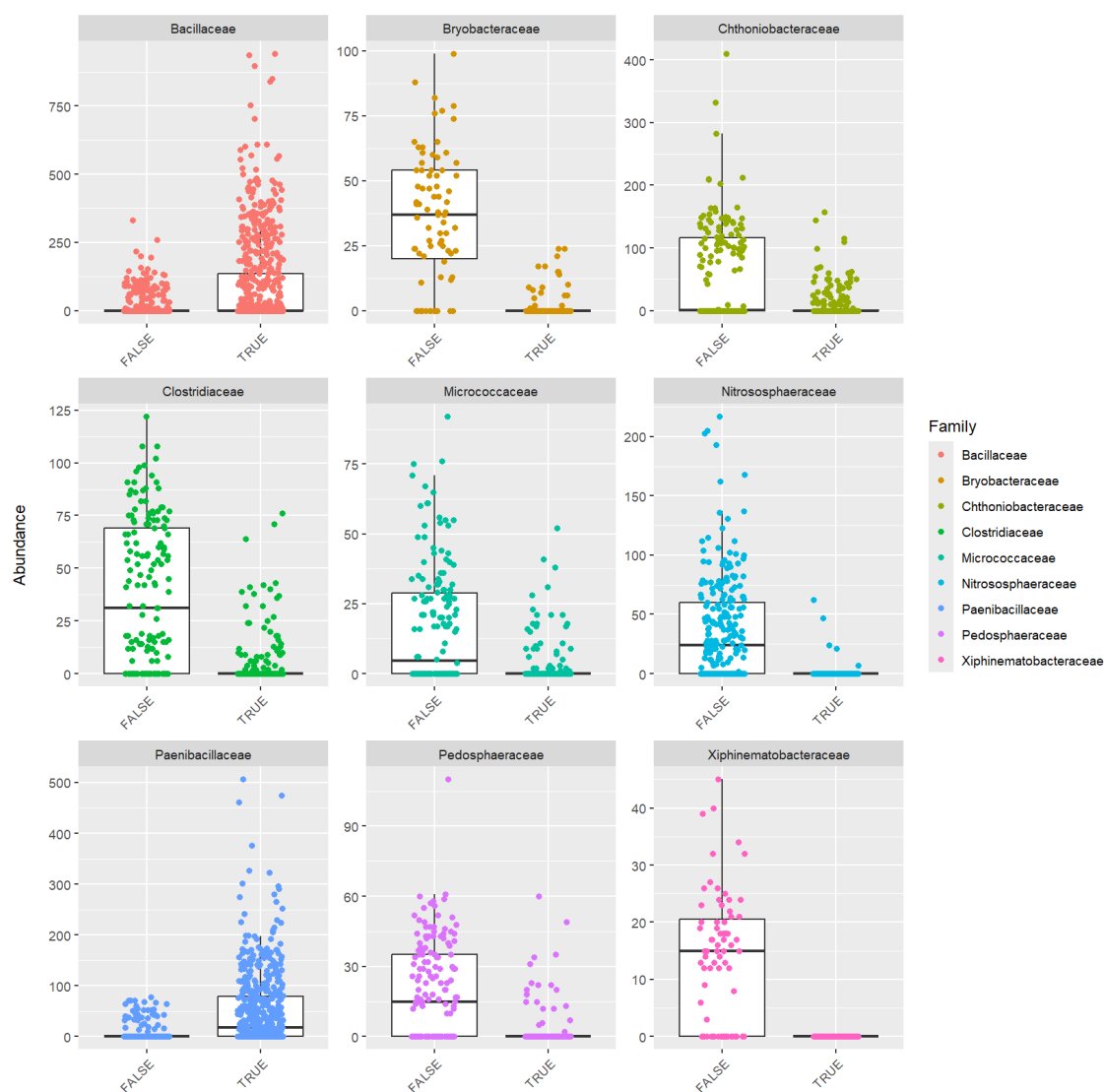


Figur 10: Et heatmap for hver dato over hvilke slekter som finnes i hver prøve, de er sortert etter behandling. De ikke-dampa prøvene er først, så de dampa. Det var en tydelig forskjell for alle fire datoene.

## Sammensetning

Random forest modellene ble brukt sammen med en taksonomisk tabell og er vedlagt som vedlegg 4 og 5 henholdsvis.

Random forest modellen for alle datoene viste at det var familiene *Nitrososphaeraceae*, *Bacillaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pedosphaeraceae*, *Xiphinematobacteraceae* og *Bryobacteraceae* som i sterkest grad skilte dampa og ikke-dampa prøver. *Bacillaceae* og *Paenibacillaceae* var de som dominerte i de dampa prøvene, mens de resterende 7 familiene var det mest av i de ikke-dampa prøvene (figur 11). I tabell 9 er resultatene av Mann-Whitney-U testene som viser at det var signifikant forskjell på dampa og ikke-dampa for alle familiene.



Figur 11: Viser mengden av 9 vanlige familier i prøvene. De er delt inn etter om de er dampa eller ikke, og det tas ikke hensyn til dato. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer prøvene.

Tabell 9: Resultatene av Mann-Whitney-U test. Her kan man se at det var signifikant forskjell i mengden i dampa og ikke-dampa jord for alle 9 familier.

<i>Familie</i>	<i>P-verdi</i>
<i>Nitrososphaeraceae</i>	< 2.2e-16
<i>Bacillaceae</i>	< 2.2e-16
<i>Chthoniobacteraceae</i>	1.951e-12
<i>Micrococcaceae</i>	< 2.2e-16
<i>Bryobacteraceae</i>	< 2.2e-16

<i>Clostridiaceae</i>	< 2.2e-16
<i>Paenibacillaceae</i>	< 2.2e-16
<i>Pedospaeraceae</i>	< 2.2e-16
<i>Xiphinematobacteraceae</i>	< 2.2e-16

Som figurene 12-15 viser var det større mengde av familiene *Planococcaceae*, *Paenibacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Brevibacillaceae*, *Thermoactinomyetaceae* og *Bacillaceae*, som alle er en del av klassen *Bacilli*, i dampa jord enn i ikke-dampa jord. Forskjellen er ikke like stor for alle, men det ser ut til å være en forskjell. Mann-Whitney-U testene bekrefter at det var en forskjell i mengden mellom dampa og ikke-dampa jord for familiene *Paenibacillaceae*, *Brevibacillaceae* og *Bacillaceae* ved alle datoene hvor de er vanlige. *Planococcaceae*, er blant de vanligste for alle fire datoer, og selv om det i figurene 12-15 ser ut til at det var en forskjell, sier Mann-Whitney-U testene at det ikke var det. Forskjellen var ikke signifikant for noen av datoene. *Alicyclobacillaceae* ser ut det ut til å være mer av i dampa enn i ikke-dampa jord. Mann-Whitney-U testen viste derimot at forskjellen i dampa og ikke-dampa jord ikke var signifikant for 28.06.2023, og at den var det for 27.09.2023 (tabell 11 og 13). *Thermoactinomyetaceae* ser veldig lik ut i dampa og ikke-dampa jord (figur 12) og Mann-Whitney-U testen bekreftet at forskjellen ikke var signifikant (tabell 10).

*Symbiobacteraceae* og *Gemmatimonadaceae* er to av familiene som det så ut til å være mer av i dampa enn i ikke-dampa jord som ikke er en del av *Bacilli* klassen (figur 13 og 15). Mann-Whitney-U testen bekrefter at *Symbiobacteraceae* familien hadde en signifikant forskjell (tabell 11). For *Gemmatimonadaceae* familien derimot var det ikke signifikant forskjell (tabell 12).

*Chitinophagaceae*, *Methylophilaceae*, *Weeksellaceae* og *Comamonadaceae* var veldig like i dampa og ikke-dampa jord, selv om alle hadde noen høyere verdier i dampa jord. Familien *Chitinophagaceae* var vanlig ved den siste prøvetakningsdatoen. Mann-Whitney-U testene viser at forskjellen var signifikant i prøvene tatt 25.08.2023 (tabell 12). *Comamonadaceae* var kun blant de vanligste i prøvene tatt 28.06.2023, og forskjellen var signifikant (tabell 11). *Weeksellaceae* var det lite av i både dampa og ikke-dampa prøver tatt 28.06.2023, men det var ikke signifikant forskjell (tabell 11). For *Methylophilaceae* var heller ikke forskjellen signifikant i dampa og ikke-dampa prøver tatt 25.08.2023 (tabell 12).

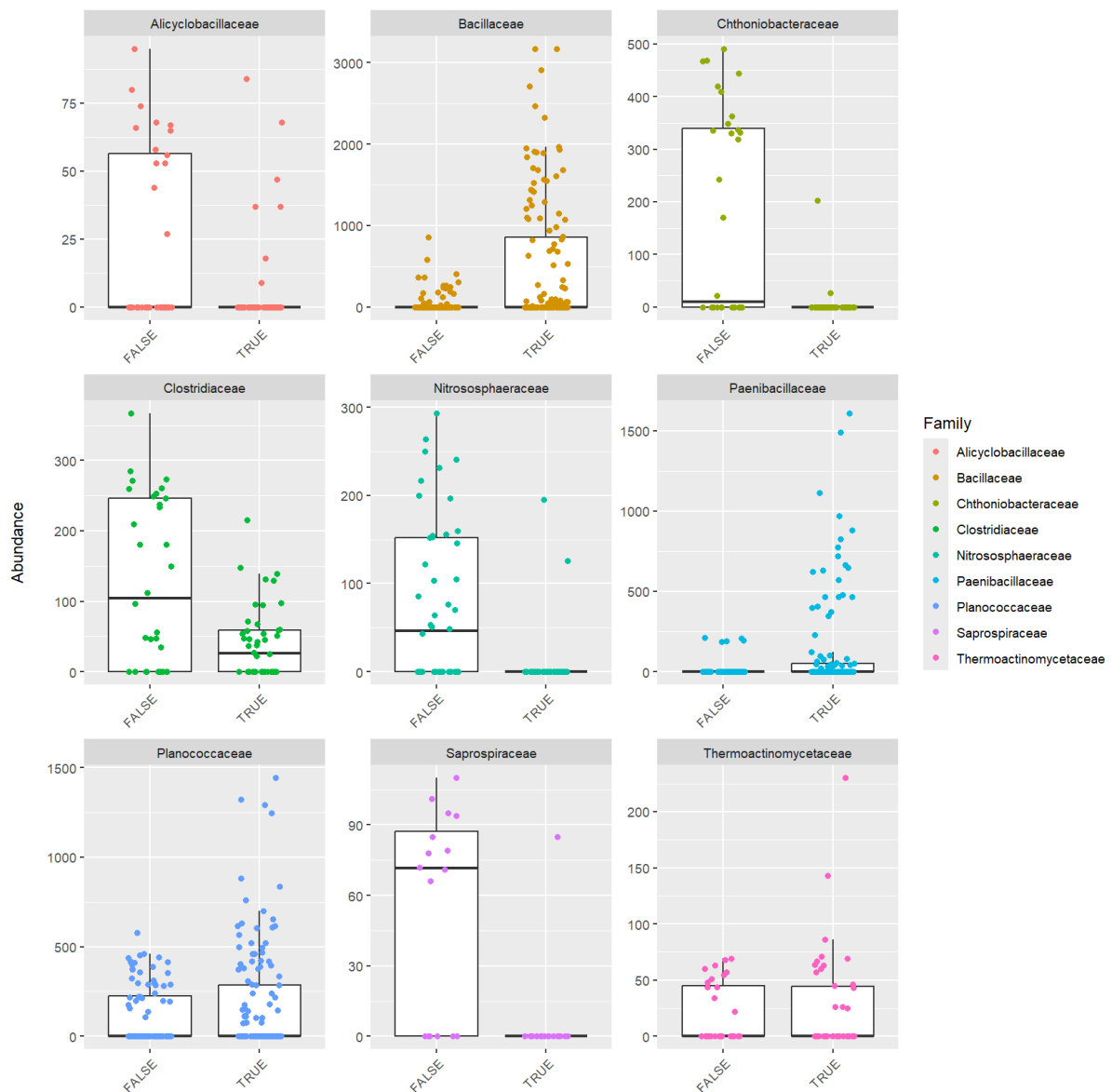
Familien *Intrasporangiaceae* er den eneste familien som ser veldig lik ut i dampa og ikke-dampa jord, men som har noen høyere verdier i ikke-dampa jord (figur 14). Mann-Whitney-U testen viste at forskjellen var signifikant (tabell 12).

*Clostridiaceae* var det mindre av i dampa jord enn i ikke-dampa, men det var noe igjen ved første prøvetakningsdato. Ved prøvetakning 2 var den så å si ikke til stede i dampa jord (figur 12). Mann-Whitney-U testene bekrefter at forskjellen er signifikant og at det var større forskjell i prøvene tatt 28.06.2023 enn i prøvene tatt 20.06.2023 (tabell 10 og 11).

*Nitrososphaeraceae* var det lite av i dampa jord i prøvene tatt 20.06.2023 og 27.09.2023, og forskjellen var signifikant for begge datoene (tabell 10 og 13). *Saprosiraceae* og *Chthoniobacteraceae* var det så å si ingenting av i dampa jord og familiene var ikke blant de vanligste ved noen andre prøvetakningsdatoer enn den første. Mann-Whitney-U testene bekrefter at forskjellen var signifikant for begge familiene (tabell 10).

Familiene *Micrococcaceae* og *Oxalobacteraceae* var bare blant de vanligste i prøvene tatt 25.08.2023. *Micrococcaceae* så det ut til å være mest av i ikke-dampa jord, mens *Oxalobacteraceae* så det ut til å være mest av i dampa jord (figur 14). Mann-Whitney-U testene bekrefter at det er en signifikant forskjell i dampa og ikke-dampa jord for begge familiene.

For 27.09.2023 var familiene *Micromonosporaceae*, *Anaerolineaceae*, *Pedosphaeraceae* og *Xanthobacteraceae* vanlige. I figur 15 ser det ut til at det var mer i ikke-dampa jord enn i dampa jord for alle familiene utenom *Micromonosporaceae*. Mann-Whitney-U testene bekrefter at alle familiene hadde signifikant forskjell (tabell 13).

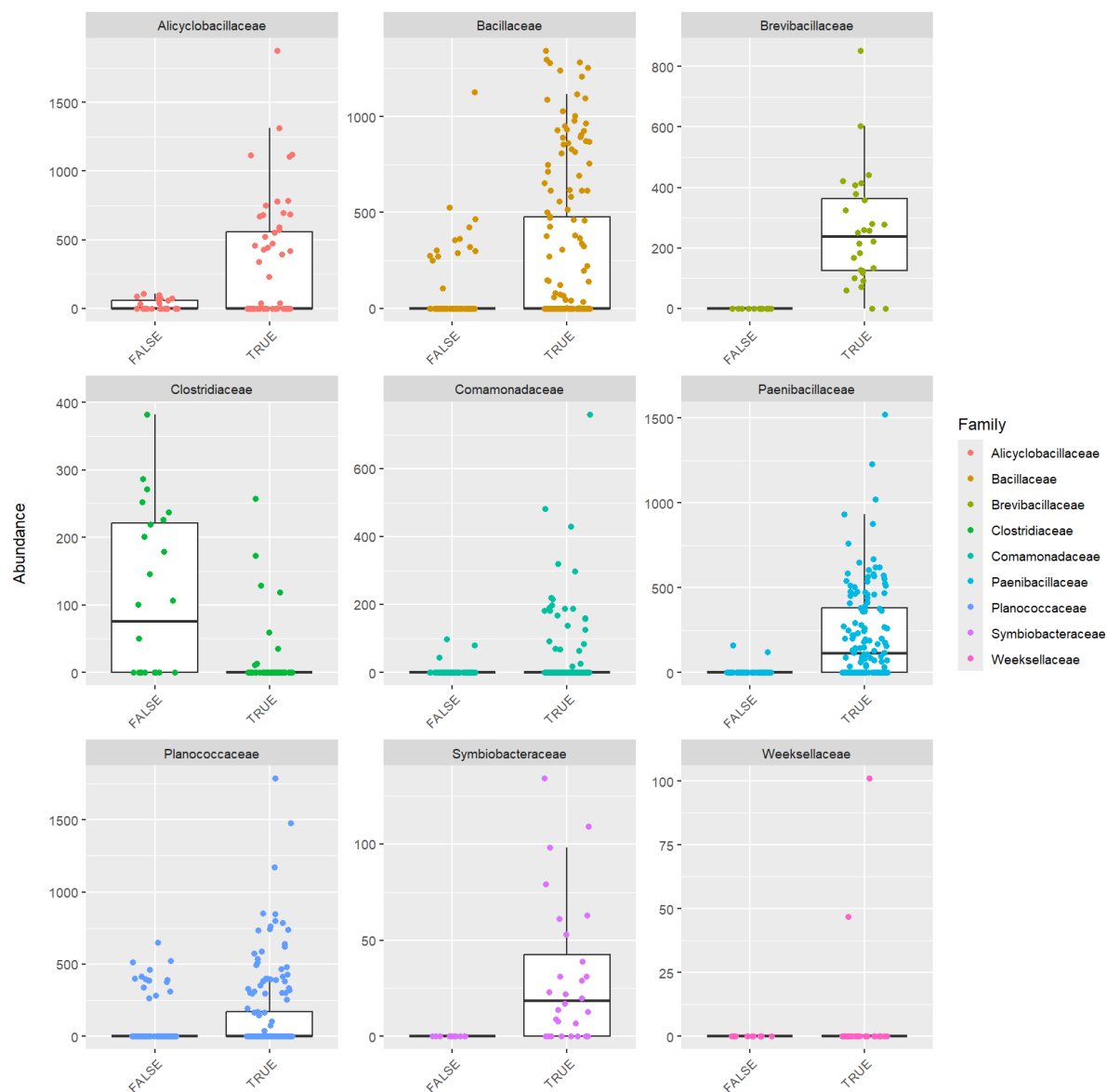


Figur 12: Viser ni vanlige familiene i jordprøvene som ble tatt den 20.06.2023, delt etter familie og damping. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer prøvene.

Tabell 10: Resultatene av Mann-Whitney-U testene gjort på familiene som var vanligst i prøvene tatt 20.06.2023. Her var det signifikant forskjell i mengden i dampa og ikke-dampa jord for alle familiene utenom *Planococcaceae* og *Thermoactinomycetaceae*.

Familie	P-verdi
<i>Planococcaceae</i>	0.4477
<i>Paenibacillaceae</i>	9.256e-06
<i>Clostridiaceae</i>	0.003247

<i>Bacillaceae</i>	4.713e-06
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	0.9858
<i>Alicyclobacillaceae</i>	0.006265
<i>Chthoniobacteraceae</i>	1.619e-06
<i>Nitrososphaeraceae</i>	1.142e-09
<i>Micrococcaceae</i>	1.084e-06

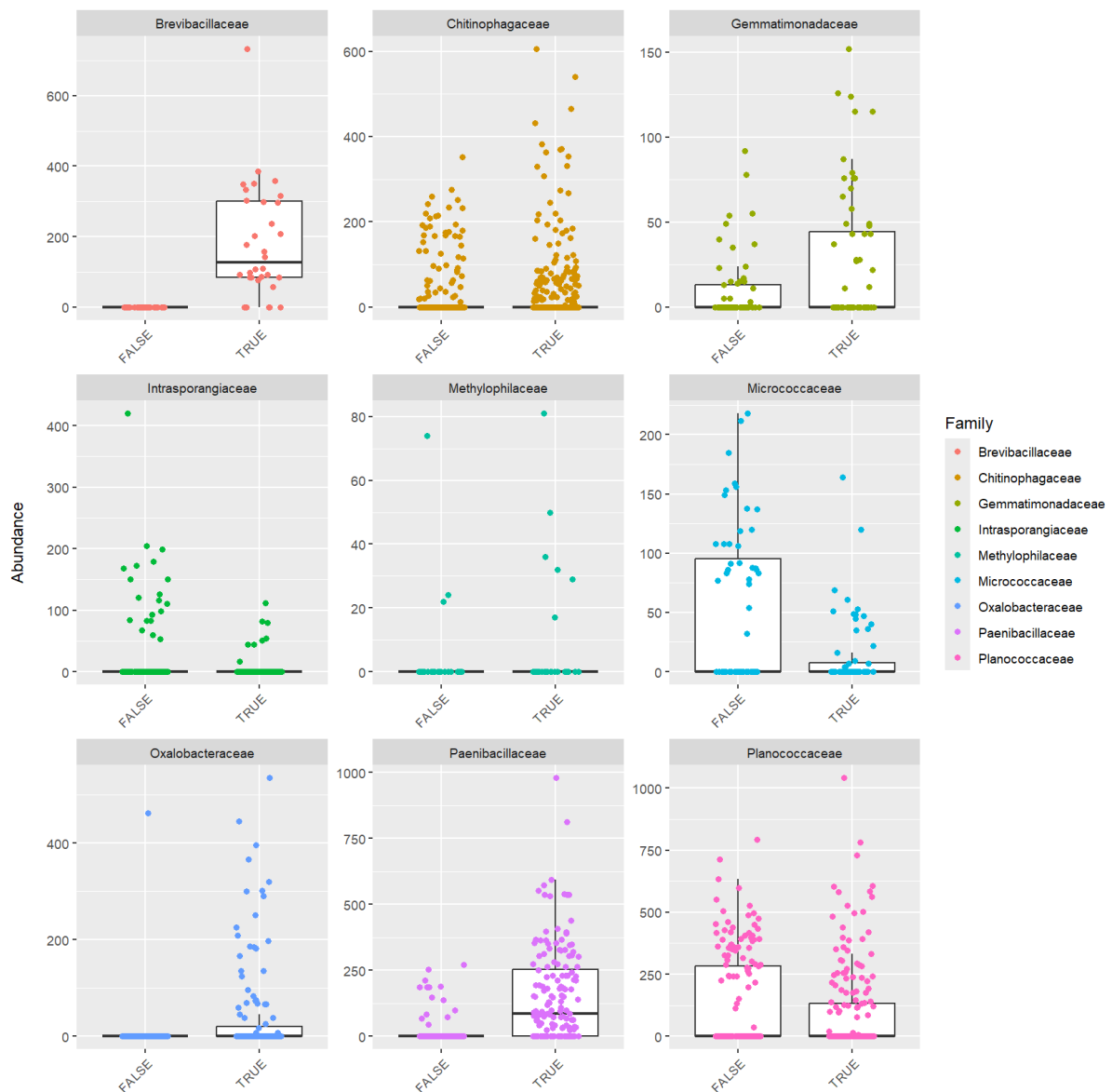


Figur 13: Viser de ni vanlige familiene funnet i jordprøvene tatt den 28.06.2023, delt etter familie og damping. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer prøvene.



Tabell 11: Resultatene av Mann-Whitney-U testene gjort på familiene som var vanligst i prøvene tatt 28.06.2023. Her var det signifikant forskjell i mengden i dampa og ikke-dampa jord for alle familiene utenom *Alicyclobacillaceae*, *Weeksellaceae* og *Planococcaceae*.

<i>Familie</i>	<i>P-verdi</i>
<i>Alicyclobacillaceae</i>	0.06067
<i>Bacillaceae</i>	0.0004948
<i>Paenibacillaceae</i>	3.119e-13
<i>Brevibacillaceae</i>	2.724e-06
<i>Clostridiaceae</i>	5.131e-05
<i>Symbiobacteraceae</i>	0.0001632
<i>Planococcaceae</i>	0.1172
<i>Weeksellaceae</i>	0.3689
<i>Comamonadaceae</i>	0.0146

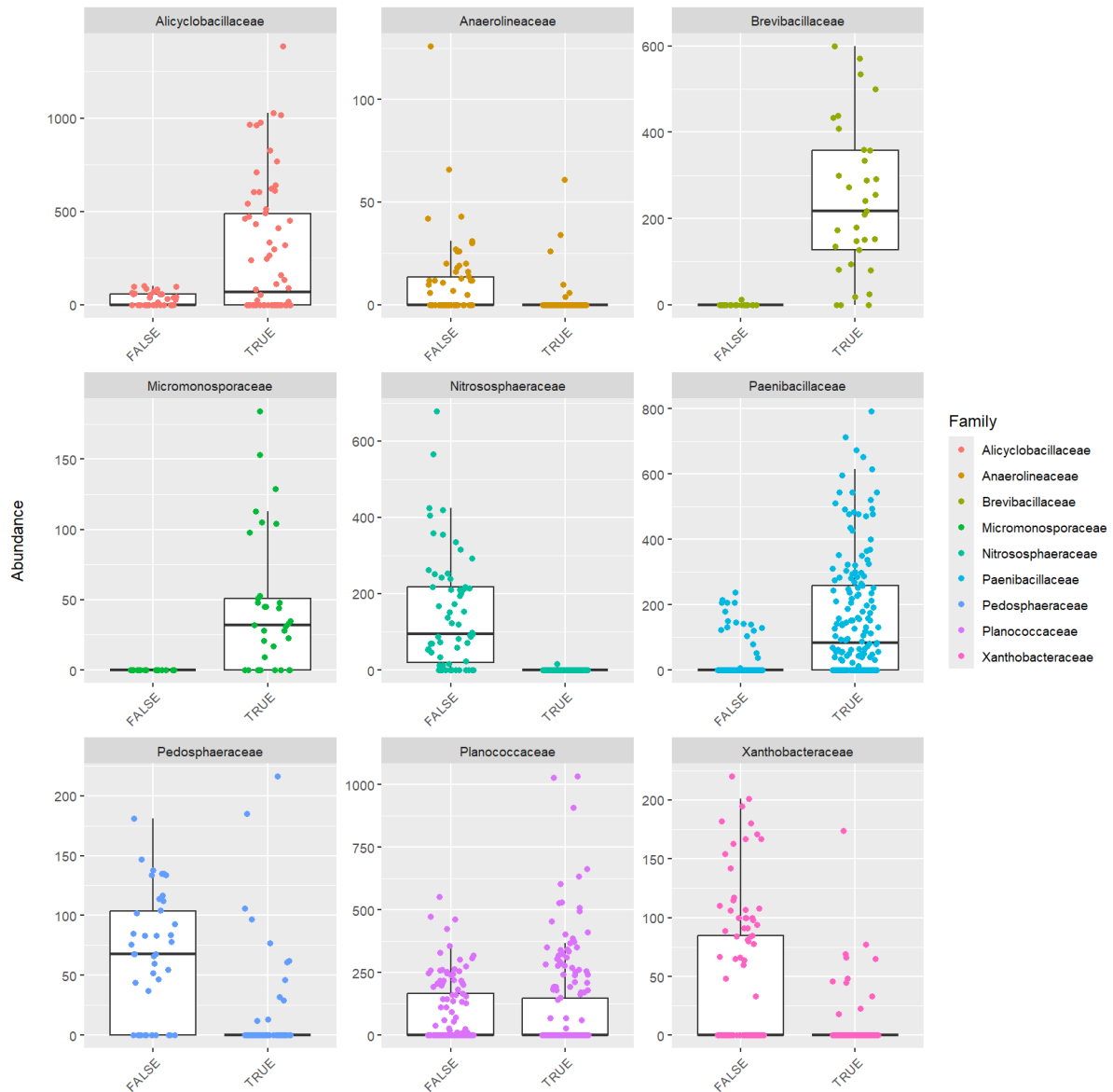


Figur 14: Viser de ni vanlige familiene i prøvene tatt den 25.08.2023, delt etter familie og damping. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer prøvene.

Tabell 12: Resultatene av Mann-Whitney-U testene gjort på familiene som var vanligst i prøvene tatt 25.08.2023. Her var det signifikant forskjell i mengden i dampa og ikke-dampa jord for alle familiene utenom *Planococcaceae*, *Gemmatimonadaceae* og *Methylophilaceae*

<i>Familie</i>	<i>P-verdi</i>
<i>Brevibacillaceae</i>	7.415e-09
<i>Intrasporangiaceae</i>	0.005375
<i>Methylophilaceae</i>	0.3173
<i>Planococcaceae</i>	0.3223

<i>Gemmatimonadaceae</i>	0.1019
<i>Chitinophagaceae</i>	0.0009501
<i>Oxalobacteraceae</i>	5.3e-09
<i>Micrococcaceae</i>	0.003099
<i>Paenibacillaceae</i>	< 2.2e-16



Figur 15: Viser de ni vanlige familiene i prøvene tatt den 27.09.2023, delt etter familie og damping. Den sorte streken indikerer medianen, og den hvite boksen er de midterste 50% av målingene. Linjene over og under boksene er øvre og nedre 25% av målingene og prikkene representerer prøvene.

Tabell 13: Resultatene av Mann-Whitney-U testene gjort på familiene som var vanligst i prøvene tatt 27.09.2023. Her var det signifikant forskjell i mengden i dampa og ikke-dampa jord for alle familiene utenom *Planococcaceae*.

<i>Familie</i>	<i>P-verdi</i>
<i>Micromonosporaceae</i>	9.46e-07
<i>Paenibacillaceae</i>	2.363e-15
<i>Brevibacillaceae</i>	7.415e-09
<i>Alicyclobacillaceae</i>	0.005352
<i>Planococcaceae</i>	0.09098
<i>Nitrososphaeraceae</i>	< 2.2e-16
<i>Anaerolineaceae</i>	4.534e-08
<i>Pedosphaeraceae</i>	4.114e-08
<i>Xanthobacteraceae</i>	4.452e-11

## Diskusjon

I denne studien fant jeg at jorddamping førte til en kraftig og signifikant reduksjon av mengden DNA i jordprøvene.. Dagen etter dampingen var medianen til DNA konsentrasjonene i de dampa prøvene ca 10 ng/ $\mu$ L, mens i ikke-dampa prøver var medianen ca 200 ng/ $\mu$ L. DNA mengden i dampa jord økte over tid, men den var fortsatt signifikant lavere enn i ikke-dampa jord etter tre måneder. DNA mengden kan brukes som et mål på mengden organismer i jorda. Damping har da sannsynligvis ført til en kraftig reduksjon av organismer noe som også var forventet.

Dette er det motsatte av det som tidligere er funnet, Crandall et al. (2023) fant at dampingen de gjorde ikke fjernet DNA-et i jorda. Dette støttes av tidligere forskning som viser at fritt DNA kan holde seg stabilt i jord lenge dersom det binder seg til jordpartikler (Levy-Booth et al., 2007). I gjennomsnitt kan 40% av DNA-et i en jordprøve være fritt DNA (Carini et al., 2016).

Diversiteten i dampa og ikke-dampa var det også tydelig forskjell på. Når det gjelder alfadiversiteten så økte den signifikant i både prøver fra dampa og ikke-dampa jord for alle datoene utenom 28.06.2023. Interaksjonen var også signifikant, foruten om DampaNEI:dato27sept, noe som tyder på at økningen generelt var større i dampa jord. Alfadiversiteten var også signifikant forskjellig i dampa og ikke-dampa jord for alle datoene. Posisjonen hadde ikke noe å si for diversiteten, dette indikerer at organismer i liten grad migrerte fra den ikke-dampa jorda til den dampa jorda.

At alfadiversiteten er lavere i dampa jord støttes av tidligere forskning (Tanaka et al., 2003). Forskjellen her ligger i at Tanaka et al. (2003) fant at diversiteten i dampa jord spratt opp igjen relativt raskt etter dampingen. Tidligere forskning har også funnet det samme som jeg, at diversiteten faktisk ikke kommer seg opp på samme nivå i dampa jord som i ikke-dampa jord (Roux-Michollet et al., 2008).

Økningen i ikke-dampa jord kommer muligens fra en naturlig økning i diversitet gjennom vekstsesongen og det sammenfaller også med økt mengde planter i de ikke-dampa rutene. Vi observerte ved prøvetakningene at plantelivet var annerledes på de dampa rutene kontra de ikke-dampa rutene, dette var veldig tydelig ved de to siste prøvetakningsdatoene, altså 25.08.2023 og 27.09.2023. De ikke-dampa rutene hadde mye vekst, mens de dampa hadde lite (figur 16). Dette kan være en faktor som bidrar til forskjellene når det kommer til DNA

konsentrasjon, diversitet og sammensetning. Tidligere forskning har sett at dersom det plantes i dampa jord så øker diversiteten i jorda (Li et al., 2022). De fant at diversiteten gikk ned etter damping, men at etter de plantet i den dampa jorda gikk diversiteten opp til samme nivå som ikke-dampa jord. Om plantedekket har vært en faktor her kan ikke testes innenfor dette prosjektet, men det kan være noe som kan være interessant å se på for et annet prosjekt.



Figur 16: Forskjellen på jorda som har blitt dampa og jorda rundt som ikke er dampa. Den dampa jorda har lite vekster i forhold til jorda rundt. Bildet er tatt 25.08.2023

Damping førte også til en kraftig endring i betadiversiteten eller sammensetningen av slekter i jorda. Jeg observerte at antallet slekter økte utover i sesongen i de dampa prøvene, men det ser ikke ut som det er de samme slektene som dominerte i ikke-dampa jord som kom inn i den dampa jorda.

Random forest ga grunnlaget for figurene 11-15 og der er det mulig å se at noen av de som tålte dampingen best var familier som er en del av klassen *Bacilli*. Dette er sporedannende bakterier og det er derfor forventet at disse skulle klare seg bedre enn familier som ikke kan danne sporer (Jonsmoen et al., 2023). Det som er mer overaskende er at familien *Clostridiaceae* ikke tålte dampingen, og hadde en nedgang som kan sees i figurene. Denne familien er en del av klassen *Clostridia* som også er sporedannende (Paredes-Sabja et al., 2011). Derfor hadde det vært lett å anta at de også ville klare seg i den dampa jorda, men det har de ikke.

Andre familier som det er signifikant mer av i ikke-dampa jord er *Nitrososphaeraceae*, *Intrasporangiaceae*, *Saprospiraceae*, *Bryobacteraceae*, *Xiphinematobacteraceae*, *Xanthobacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Chthoniobacteraceae*, *Pedosphaeraceae* og *Anaerolineaceae*.

*Nitrososphaeraceae* er en familie som oksiderer ammoniakk (Yang et al., 2021), og *Intrasporangiaceae* familien inneholder arter som kan fjerne fosfor fra miljøet (Stackebrandt et al., 2014). Disse familiene kan derfor være bra å få fjernet.

*Saprosiraceae* er en familie som kan bryte ned komplekse organiske forbindelser (Kondrotaitė et al., 2022). *Bryobacteraceae* er en familie som bryter ned polymerere, som sukker og polysakkarider (Xiao et al., 2024). Familien *Xiphinematobacteraceae* bryter muligens ned organisk karbon, og resirkulerer næringsstoffer (Lee et al., 2022; Zhang et al., 2020). *Xanthobacteraceae* er en familie som kan bryte ned pyren og fiksere nitrogen (Ge et al., 2024; Zhu et al., 2018). *Micrococcaceae* er en familie som blant annet inneholder arter som kan produsere antimikrobielle stoffer (Martín et al., 2007). Familien har i tillegg blitt koblet til økte mengder næringsstoffer i jord (Jin et al., 2022). *Chthoniobacteraceae* familien kan være koblet til å tilgjengeliggjøre nitrogen i jordsmonnet og noen arter kan bidra til nedbrytningen av organisk karbon (Duan & Bau, 2021; Ren et al., 2023). *Pedosphaeraceae* familien er koblet til bioremediering av kadmium og økt plantevekst (Yuan et al., 2022). *Anaerolineaceae* er en annen familie som kan bidra i fjerningen av kadmium fra jord (Meng et al., 2019). Alle disse familiene kan være positive å ha i jorda, men alle blir signifikant påvirket av damping. Flere er til stede i noen dampa prøver, mens noen er ikke det.

Familier som ikke ble signifikant påvirket av dampingen er *Gemmatimonadaceae*, *Methylophilaceae* og *Weeksellaceae*. *Gemmatimonadaceae* er en vanlig familie i jordsmonn og er en del av en fylum som har mange polyphosphate-accumulating bakterier, altså bakterier som kan fjerne fosfor fra jordsmonnet (Ding et al., 2018; Wang et al., 2020). Dette kan være en familie det kan være gunstig å fjerne. De to andre familiene derimot kan være positive i jorda. *Methylophilaceae* er en familie som kan bryte ned dimetylsulfid, og som inneholder arter som er vekstfremmende (Eyice et al., 2015; Macey et al., 2020).

*Weeksellaceae* er også en vekstfremmende familie, og som kan bidra til blant annet økt biomasse hos planter (Zhao et al., 2024).

Familier som det var signifikant mer av i dampa jord og som ikke er en del av *Bacilli* familien er *Symbiobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Micromonosporaceae* og *Chitinophagaceae*.

*Symbiobacteraceae* er en familie som nylig har blitt koblet til denitrifisering og utslipp av N<sub>2</sub>O (D.-C. Hao et al., 2021), og er derfor enda en familie som er gunstig å få fjernet. Den har

også blitt koblet til syntrophic acetate-oxidizing, altså oksidering av acetat, som slipper ut CO<sub>2</sub> (L. Hao et al., 2021).

*Comamonadaceae* familien er koblet til arsenittoksidering, altså at den bryter ned arsenitt til arsenate som er et mindre farlig stoff (Huang et al., 2024). *Oxalobacteraceae* er en familie som kan bidra til økt nitrogenopptak hos planter (Yu et al., 2021). *Micromonosporaceae* er en familie som har blitt koblet til blant annet resirkulering av næringsstoffer (Trujillo et al., 2014). Familien kan også danne sporer og tidligere forskning har også funnet at den tåler varmebehandling (Khan et al., 2020). Den siste familien er *Chitinophagaceae*. Dette er en familie som har blitt koblet til økt sykdomsresistens hos planter fordi de produserer enzymer som kan bryte ned kitin i celleveggen til sopp (Carrión et al., 2019). Disse familiene kan være gunstige å ha i jord.

Fra behandling til siste prøvetakning er det 101 dager, litt over tre måneder. Dette er en relativt kort tidsramme som kan gjøre at hele bildet ikke syns. Det er mulig at de dampa rutene har blitt likere de ikke-dampa nå, men det motsatte er også mulig, at de har bevegde seg endra lengre unna de ikke-dampa. Dette kan ikke testes innenfor denne oppgaven, men det noe som kunne vært interessant å se på i et annet prosjekt.



## Konklusjon

Denne oppgaven har sett på hvilken effekt jorddamping har på jordøkosystemet. Den har sett på den umiddelbare og langsiktige effekten av jorddamping på jordøkosystemet, som var hovedmålet med oppgaven. Den umiddelbare effekten er at DNA konsentrasjonen og diversiteten er mye lavere i dampa enn i ikke-dampa jord. I tillegg er det en del bakteriefamilier som ikke tåler dampingen, og noen som dominerer i den dampa jorda. Langsiktig så økte DNA konsentrasjonen og diversiteten over de tre månedene. Dessuten blir både familier som er gunstige å ha i jord og bakterier som ikke er gunstige i jord påvirket, det motsatte er også sant.

Det første delmålet var å se på forskjellen i DNA konsentrasjon i dampa og ikke-dampa jord over tid. Den tilhørende hypotesen var at DNA konsentrasjonen vil være høyere i ikke-dampa jord, og vil stige med tiden i den dampa jorda. Det stemte at DNA konsentrasjonen var høyere i ikke-dampa jord og at den økte med tiden i dampa jord, men DNA konsentrasjonen steg også i den ikke-dampa jorda. DNA konsentrasjonen i dampa jord tok aldri igjen konsentrasjonen i ikke-dampa jord.

Delmål to var å se på jordøkosystemet og dets sammensetning. Jordøkosystemet består av både gunstige og ugunstige bakteriefamilier, både før og etter damping. Mange av familiene var viktige i å tilgjengeliggjøre næringsstoffer, fjerne hemmende stoffer eller sykdomsresistens, men det er også familier som fjerner næringsstoffer i jorda. Den tilhørende hypotesen sa at jorddamping vil ha en stor effekt på jordøkosystemet, men jordøkosystemet vil klare å "bygge" seg opp igjen. Jordøkosystemet ble påvirket av dampingen og den bygde seg opp igjen med tiden, men ikke så den ble lik til jordøkosystemet i den ikke-dampa jorda.

Det siste delmålet var å se på forskjellen i diversitet og sammensetningen i dampa og ikke dampa jord over tid. Diversiteten ble aldri lik over de tre månedene, ettersom den steg i både dampa og ikke-dampa jord, men den steg mer i dampa jord. Sammensetningen ble heller ikke lik, det var noen familier som var relativt like i dampa og ikke-dampa jord, men de fleste var det enden mest av i dampa eller ikke-dampa jord. Hypotesen sa at det vil være stor forskjell i diversitet og sammensetning mellom dampa og ikke-dampa jord, men den vil minske over tid. Det stemte at alfadiversiteten var forskjellig og at den minsket over tid, men denne ble heller ikke lik. Betadiversiteten viste at prøvene fra dampa og ikke-dampa jord ikke ble like, og viste heller ikke tendenser til det, dette ble videre bekreftet ved å se på sammensetningen.

Et lignende prosjekt bør gjøres over en lengre tidsperiode, hvor man får et innblikk etter mer enn tre måneder. Da vil man kunne få et bilde over hvordan økosystemet er etter for eksempel endt vekstperiode eller etter en frostperiode. En annen studie som bør gjøres er å se på hvordan plantelivet påvirker diversiteten og sammensetningen i dampa jord over tid.

## Bibliografi

- Al-Maliki, S., & Al-Shamary, A. (2022). Vital evidence for arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and cattail plant to remove Pb-Cd heavy metals from contaminated soils. *Acta Ecologica Sinica*, 42(4), 392-397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.05.008>
- Andres, K. J., Lodge, D. M., Sethi, S. A., & Andrés, J. (2023). Detecting and analysing intraspecific genetic variation with eDNA: From population genetics to species abundance. *Molecular Ecology*, 32(15), 4118-4132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.17031>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129-137. <https://www.int-res.com/abstracts/ame/v75/n2/p129-137/>
- Barrett, T., Dowle, M., Srinivasan, A., Gorecki, J., Chirico, M., & Hocking, T. (2024). Data.table pakke. In.
- Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 29(7), 2089-2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R., & Willerslev, E. (2007). The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. *PLOS ONE*, 2(2), e197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000197>
- Bitarafan, Z., Kaczmarek-Derda, W., Brandsæter, L. O., & Fløistad, I. S. (2021). Stationary soil steaming to combat invasive plant species for soil relocation. *Invasive Plant Science and Management*, 14(3), 164-171. <https://doi.org/10.1017/inp.2021.25>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning*, 45(1), 5-32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Breiman, L., Cutler, A., Liaw, A., & Wiener, M. (2022). randomForest pakke. In.
- Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*, 56(1), 158-171. <https://doi.org/10.1258/0007142001902860>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carini, P., Marsden, P. J., Leff, J. W., Morgan, E. E., Strickland, M. S., & Fierer, N. (2016). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology*, 2(3), 16242. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.242>
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., de Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, 366(6465), 606-612. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaw9285>
- Chao, A., C. Li, P., Agatha, S., & Foissner, W. (2006). A statistical approach to estimate soil ciliate diversity and distribution based on data from five continents. *Oikos*,

- 114(3), 479-493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14814.x>
- Crandall, S. G., Miles, A. M., Chung, T., Cloutier, M. L., García-Rodríguez, R., Schweigkofler, W., & Couradeau, E. (2023). Temporal and Spatial Dynamics of Bacterial and Fungal Microbiomes in Nursery Soils Post-Steam. *PhytoFrontiers™*, 3(2), 355-368. <https://doi.org/10.1094/phytofr-07-22-0071-r>
- Ding, P., Chu, L., & Wang, J. (2018). Advanced treatment of petrochemical wastewater by combined ozonation and biological aerated filter. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9673-9682. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1272-3>
- Domínguez-Begines, J., Ávila, J. M., García, L. V., & Gómez-Aparicio, L. (2021). Disentangling the role of oomycete soil pathogens as drivers of plant–soil feedbacks. *Ecology*, 102(8), e03430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ecy.3430>
- Duan, M., & Bau, T. (2021). Initial sample processing can influence the soil microbial metabarcoding surveys, revealed by *Leucocalocybe mongolica* fairy ring ecosystem. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1427-1438. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1996272>
- East, R. (2013). Microbiome: Soil science comes to life. *Nature*, 501(7468), S18-S19. <https://doi.org/10.1038/501S18a>
- Eyice, Ö., Namura, M., Chen, Y., Mead, A., Samavedam, S., & Schäfer, H. (2015). SIP metagenomics identifies uncultivated Methylophilaceae as dimethylsulphide degrading bacteria in soil and lake sediment. *Isme j*, 9(11), 2336-2348. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.37>
- Fisher, T. (2016). Prepare Amplicon Libraries without Fragmentation Using the Ion Plus Fragment Library Kit. In.
- Fisher, T. (2022). Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit USER GUIDE. In.
- Fisher, T. (2023a). Ion Chef™ Instrument USER GUIDE. In.
- Fisher, T. (2023b). Ion GeneStudio™ S5 Instrument USER GUIDE. In.
- Ge, H., Liu, X., Lu, D., Yang, Z., & Li, H. (2024). Degradation of pyrene by *Xanthobacteraceae* bacterium strain S3 isolated from the rhizosphere sediment of *Vallisneria natans*: active conditions, metabolite identification, and proposed pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(17), 25659-25670. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32724-0>
- Guenay-Greunke, Y., Bohan, D. A., Traugott, M., & Wallinger, C. (2021). Handling of targeted amplicon sequencing data focusing on index hopping and demultiplexing using a nested metabarcoding approach in ecology. *Sci Rep*, 11(1), 19510. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98018-4>
- Guerra, N., Fennimore, S. A., Siemens, M. C., & Goodhue, R. E. (2022). Band Steaming for Weed and Disease Control in Leafy Greens and Carrots. *HortScience*, 57(11), 1453-1459. <https://doi.org/10.21273/hortsci16728-22>
- Gupta, N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol*, 36(2), 116-117. [https://doi.org/10.4103/joc.Joc\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/joc.Joc_110_18)
- Hannula, S. E., Ma, H.-k., Pérez-Jaramillo, J. E., Pineda, A., & Bezemer, T. M. (2020). Structure and ecological function of the soil microbiome affecting plant–soil feedbacks in the presence of a soil-borne pathogen. *Environmental*

- Microbiology*, 22(2), 660-676. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.14882>
- Hao, D.-C., Wang, L., Gao, W., Xie, H., Bao, X., Jia, Z., & Wang, L. (2021). Disentangling Effects of Moisture/gas Regimes on Microbial Community, Network Configuration and Nitrogen Turnover of Black Soil. *Eurasian Soil Science*, 54(1), S42-S61. <https://doi.org/10.1134/S1064229322030073>
- Hao, L., Fan, L., Chapleur, O., Guenne, A., Bize, A., Bureau, C., Lü, F., He, P., Bouchez, T., & Mazéas, L. (2021). Gradual development of ammonia-induced syntrophic acetate-oxidizing activities under mesophilic and thermophilic conditions quantitatively tracked using multiple isotopic approaches. *Water Research*, 204, 117586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117586>
- Huang, D., Sun, X., Ghani, M. U., Li, B., Yang, J., Chen, Z., Kong, T., Xiao, E., Liu, H., Wang, Q., & Sun, W. (2024). Bacteria associated with Comamonadaceae are key arsenite oxidizer associated with *Pteris vittata* root. *Environmental Pollution*, 349, 123909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123909>
- Jin, Q., Zhang, Y., Wang, Q., Li, M., Sun, H., Liu, N., Zhang, L., Zhang, Y., & Liu, Z. (2022). Effects of potassium fulvic acid and potassium humate on microbial biodiversity in bulk soil and rhizosphere soil of *Panax ginseng*. *Microbiological Research*, 254, 126914. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126914>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jonsmoen, U. L., Malyshev, D., Öberg, R., Dahlberg, T., Aspholm, M. E., & Andersson, M. (2023). Endospore pili: Flexible, stiff, and sticky nanofibers. *Biophysical Journal*, 122(13), 2696-2706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.05.024>
- Kestel, J. H., Field, D. L., Bateman, P. W., White, N. E., Allentoft, M. E., Hopkins, A. J. M., Gibberd, M., & Nevill, P. (2022). Applications of environmental DNA (eDNA) in agricultural systems: Current uses, limitations and future prospects. *Science of The Total Environment*, 847, 157556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157556>
- Khan, M. J., Jurburg, S. D., He, J., Brodie, G., & Gupta, D. (2020). Impact of microwave disinfection treatments on the bacterial communities of no-till agricultural soils. *European Journal of Soil Science*, 71(6), 1006-1017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ejss.12867>
- Kondrotaitė, Z., Valk, L. C., Petriglieri, F., Singleton, C., Nierychlo, M., Dueholm, M. K. D., & Nielsen, P. H. (2022). Diversity and Ecophysiology of the Genus OLB8 and Other Abundant Uncultured Saprospiraceae Genera in Global Wastewater Treatment Systems. *Front Microbiol*, 13, 917553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.917553>
- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391. <https://doi.org/10.7717/peerj.9391>
- Lee, R. M., Griffin, N., Jones, E., Abbott, B. W., Frei, R. J., Bratsman, S., Proteau, M., Errigo, I. M., Shogren, A., Bowden, W. B., Zarnetske, J. P., & Aanderud, Z. T. (2022). Bacterioplankton dispersal and biogeochemical function across Alaskan Arctic catchments. *Environmental Microbiology*, 24(12), 5690-5706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.16259>

- Leempoel, K., Hebert, T., & Hadly, E. A. (2020). A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proc Biol Sci*, 287(1918), 20192353. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2353>
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977-2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Li, Y. B., Zhang, Z. P., Yuan, Y., Huang, H. C., Mei, X. Y., Du, F., Yang, M., Liu, Y. X., & Zhu, S. S. (2022). Appropriate Soil Heat Treatment Promotes Growth and Disease Suppression of *Panax notoginseng* by Interfering with the Bacterial Community. *J Microbiol Biotechnol*, 32(3), 294-301. <https://doi.org/10.4014/jmb.2112.12005>
- Liu, H., Li, J., Carvalhais, L. C., Percy, C. D., Prakash Verma, J., Schenk, P. M., & Singh, B. K. (2021). Evidence for the plant recruitment of beneficial microbes to suppress soil-borne pathogens. *New Phytologist*, 229(5), 2873-2885. <https://doi.org/10.1111/nph.17057>
- Macey, M. C., Pratscher, J., Crombie, A. T., & Murrell, J. C. (2020). Impact of plants on the diversity and activity of methylotrophs in soil. *Microbiome*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00801-4>
- Maclean, M., Murdoch, L. E., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2013). Sporicidal Effects of High-Intensity 405 nm Visible Light on Endospore-Forming Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 89(1), 120-126. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01202.x>
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50-60. <http://www.jstor.org/stable/2236101>
- Maps, G. (2024a). <https://www.google.com/maps/@59.8302487,10.4960563,10.57z?authuser=0&entry=ttu>
- Maps, G. (2024b). *Aaby gård*. <https://www.google.com/maps/@59.8207609,10.4641828,330m/data=!3m1!1e3?authuser=0&entry=ttu>
- Martín, A., Colín, B., Aranda, E., Benito, M. J., & Córdoba, M. G. (2007). Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science*, 75(4), 696-708. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.001>
- Forskrift om planter og tiltak mot planteskadegjørere, (2022). <https://lovdata.no/forskrift/2000-12-01-1333/§6>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2021). Phyloseq pakke. In.
- Melander, B., & Kristensen, J. K. (2011). Soil steaming effects on weed seedling emergence under the influence of soil type, soil moisture, soil structure and heat duration. *Annals of Applied Biology*, 158(2), 194-203. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00453.x>
- Meng, D., Li, J., Liu, T., Liu, Y., Yan, M., Hu, J., Li, X., Liu, X., Liang, Y., Liu, H., & Yin, H. (2019). Effects of redox potential on soil cadmium solubility: Insight into microbial community. *Journal of Environmental Sciences*, 75, 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.032>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

- Newton, A. C., Duncan, J. M., Augustin, N. H., Guy, D. C., & Cooke, D. E. L. (2010). Survival, distribution and genetic variability of inoculum of the strawberry red core pathogen, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, in soil. *Plant Pathology*, 59(3), 472-479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02273.x>
- Nibio. (2024a). [https://kilden.nibio.no/?topic=jordsmonn&zoom=11.4&x=6632401.6&y=582292.59&bgLayer=farger&epsg=25832&layers=jm\\_harm\\_klassifikasjon,jordkvalitet&ayers\\_opacity=0.75,0.56&layers\\_visibility=true,true](https://kilden.nibio.no/?topic=jordsmonn&zoom=11.4&x=6632401.6&y=582292.59&bgLayer=farger&epsg=25832&layers=jm_harm_klassifikasjon,jordkvalitet&ayers_opacity=0.75,0.56&layers_visibility=true,true)
- Nibio. (2024b). *Stagnosol*. <https://www.nibio.no/tema/jord/jordkartlegging/jordsmonnkart/jordsmonnklassifikasjon/stagnosol>
- Nielsen, U. N., Ayres, E., Wall, D. H., & Bardgett, R. D. (2011). Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. *European Journal of Soil Science*, 62(1), 105-116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x>
- O’Sullivan, L. A., Roussel, E. G., Weightman, A. J., Webster, G., Hubert, C. R. J., Bell, E., Head, I., Sass, H., & Parkes, R. J. (2014). Survival of *Desulfotomaculum* spores from estuarine sediments after serial autoclaving and high-temperature exposure. *The ISME Journal*, 9(4), 922-933. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.190>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., & Wagner, H. (2022). Vegan pakke. In.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, 19(2), 85-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.004>
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C. M., Sarr, A., & Maron, P.-A. (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal*, 7(8), 1609-1619. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.34>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G., & Nannipieri, P. (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3), 219-235. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Project, E. M. (2018). 16S Illumina Amplicon Protocol. In.
- Pulleman, M., Creamer, R., Hamer, U., Helder, J., Pelosi, C., Pérès, G., & Rutgers, M. (2012). Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services—an overview of European approaches. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 4(5), 529-538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.10.009>
- Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., Wang, X., Liu, X., Xiang, Q., Jiang, S., Zhang, F., Wang, Y., Judelson, H. S., Chen, X., & Ma, W. (2013). Oomycete

- pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature Genetics*, 45(3), 330-333. <https://doi.org/10.1038/ng.2525>
- Quiagen. (2023). DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook. In.
- Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2013). Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. *Trends in Microbiology*, 21(6), 296-304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.001>
- Ren, W., Zhang, L., Maness, N., Wang, X., Tang, M., & Xu, T. (2023). Changes in the diversity of pecan (*Carya illinoensis*) rhizosphere microbial community with different nitrogen fertilization, a case study in Oklahoma pecan orchard. *Scientia Horticulturae*, 321, 112365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112365>
- Rose, J. P., Wademan, C., Weir, S., Wood, J. S., & Todd, B. D. (2019). Traditional trapping methods outperform eDNA sampling for introduced semi-aquatic snakes. *PLOS ONE*, 14(7), e0219244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219244>
- Roux-Michollet, D., Czarnes, S., Adam, B., Berry, D., Commeaux, C., Guillaumaud, N., Le Roux, X., & Clays-Josserand, A. (2008). Effects of steam disinfection on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1836-1845. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.007>
- Sambo, F., Finotello, F., Lavezzo, E., Baruzzo, G., Masi, G., Peta, E., Falda, M., Toppo, S., Barzon, L., & Di Camillo, B. (2018). Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2360-6>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Sharma, P., & Kobayashi, T. (2014). Are “universal” DNA primers really universal? *Journal of Applied Genetics*, 55(4), 485-496. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0218-9>
- Stackebrandt, E., Scheuner, C., Göker, M., & Schumann, P. (2014). The Family Intrasporangiaceae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 397-424). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4\\_176](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_176)
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Iwasaki, K., Yamane, S., Maeda, K., & Sakurai, K. (2003). Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(4), 603-610. <https://doi.org/10.1080/00380768.2003.10410050>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant Growth-Promoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants*, 12(24), 4074. <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/24/4074>



- Trujillo, M. E., Hong, K., & Genilloud, O. (2014). The Family Micromonosporaceae. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria* (pp. 499-569). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4\\_196](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_196)
- Ueki, A., Kaku, N., & Ueki, K. (2018). Role of anaerobic bacteria in biological soil disinfection for elimination of soil-borne plant pathogens in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(15), 6309-6318.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9119-x>
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(2), 110-117.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- van Loenen, M. C. A., Turbett, Y., Mullins, C. E., Feilden, N. E. H., Wilson, M. J., Leifert, C., & Seel, W. E. (2003). Low Temperature–Short Duration Steaming of Soil Kills Soil-Borne Pathogens, Nematode Pests and Weeds. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(9), 993-1002.  
<https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003830.49949.34>
- Vaughan, D., Girlich, M., Wickham, H., & Ushey, K. (2024). Tidyr pakke. In.
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., & van der Heijden, M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(14), 5266-5270.  
<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1320054111>
- Wang, X., He, T., Gen, S., Zhang, X.-Q., Wang, X., Jiang, D., Li, C., Li, C., Wang, J., Zhang, W., & Li, C. (2020). Soil properties and agricultural practices shape microbial communities in flooded and rainfed croplands. *Applied Soil Ecology*, *147*, 103449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103449>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., & Dunnington, D. (2023). ggplot2 pakke. In.
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). Dplyr pakke. In.
- Xiao, K., Abbt-Braun, G., Pleitner, R., & Horn, H. (2024). Effect of ciprofloxacin on the one-stage partial nitrification and anammox biofilm system: A multivariate analysis focusing on size-fractionated organic components. *Chemosphere*, *355*, 141731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141731>
- Yang, Y., Herbold, C. W., Jung, M.-Y., Qin, W., Cai, M., Du, H., Lin, J.-G., Li, X., Li, M., & Gu, J.-D. (2021). Survival strategies of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in a full-scale WWTP treating mixed landfill leachate containing copper ions and operating at low-intensity of aeration. *Water Research*, *191*, 116798.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116798>
- Yu, P., He, X., Baer, M., Beirinckx, S., Tian, T., Moya, Y. A. T., Zhang, X., Deichmann, M., Frey, F. P., Bresgen, V., Li, C., Razavi, B. S., Schaaf, G., von Wirén, N., Su, Z., Bucher, M., Tsuda, K., Goormachtig, S., Chen, X., & Hochholdinger, F. (2021). Plant flavones enrich rhizosphere Oxalobacteraceae to improve maize performance under nitrogen deprivation. *Nature Plants*, *7*(4), 481-499.  
<https://doi.org/10.1038/s41477-021-00897-y>
- Yuan, Q., Wang, P., Wang, X., Hu, B., & Tao, L. (2022). Phytoremediation of cadmium-contaminated sediment using *Hydrilla verticillata* and *Elodea canadensis* harbor two same keystone rhizobacteria Pedosphaeraceae and Parasegetibacter.

- Chemosphere*, 286, 131648.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131648>
- Zhang, X., Gao, G., Wu, Z., Wen, X., Zhong, H., Zhong, Z., Yang, C., Bian, F., & Gai, X. (2020). Responses of soil nutrients and microbial communities to intercropping medicinal plants in moso bamboo plantations in subtropical China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 2301-2310.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06750-2>
- Zhao, B., Yan, Y., Cao, D., & Xia, Y. (2024). Germinating rice seeds shape rhizospheric bacteria via releasing benzaldehyde. *Plant Physiology and Biochemistry*, 210, 108632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108632>
- Zhou, W., Orr, M. W., Jian, G., Watt, S. K., Lee, V. T., & Zachariah, M. R. (2015). Inactivation of bacterial spores subjected to sub-second thermal stress. *Chemical Engineering Journal*, 279, 578-588.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.021>
- Zhu, B.-K., Fang, Y.-M., Zhu, D., Christie, P., Ke, X., & Zhu, Y.-G. (2018). Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution*, 239, 408-415.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.017>