

Orgaanisten lannoitevalmisteiden vaikutus kasvien kasvuun - testimenetelmät

Tapio Salo, Ansa Palojärvi, Sanna Kukkonen, Mauritz Vestberg, Petri Kapuinen, Tiina Tontti, Kari Ylivainio, Päivi Parikka, Matti Nummila, Liisa Maunuksela, Kristina Lindström, Saila Orasmaa, Lars Paulin



**Orgaanisten lannoitevalmisteiden
vaikutus kasvien kasvuun
- testimenetelmät**

**Tapio Salo, Ansa Palojärvi, Sanna Kukkonen, Mauritz Vestberg, Petri Kapuinen, Tiina
Tontti, Kari Ylivainio, Päivi Parikka, Matti Nummila, Liisa Maunuksela, Kristina Lindström,
Saila Orasmaa, Lars Paulin**

ISBN: 978-952-487-468-7

ISSN 1798-6419

<http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti101.pdf>,

<http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti101liite.pdf>

Copyright: MTT

Kirjoittajat: Tapio Salo, Ansa Palojärvi, Sanna Kukkonen, Mauritz Vestberg, Petri Kapuinen, Tiina Tontti, Kari Ylivainio, Päivi Parikka, Matti Nummila, Liisa Maunuksela, Kristina Lindström, Saira Orasmaa, Lars Paulin

Julkaisija ja kustantaja: MTT Jokioinen

Julkaisuvuosi: 2013

Kannen kuva: Sanna Kukkonen/MTT

Orgaanisten lannoitevalmisteiden vaikutus kasvien kasvuun - testimenetelmät

Tapio Salo¹⁾, Ansa Palojärvi¹⁾, Sanna Kukkonen²⁾, Mauritz Vestberg²⁾, Petri Kapuinen¹⁾, Tiina Tontti³⁾, Kari Ylivainio¹⁾, Päivi Parikka¹⁾, Matti Nummila¹⁾, Liisa Maunuksela⁴⁾, Kristina Lindström⁵⁾, Saila Orasmaa⁵⁾, Lars Paulin⁶⁾

¹⁾ MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Uutetie, 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾ MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Antinmientie, 41330 Vihtavuori, etunimi.sukunimi@mtt.fi

³⁾ MTT, Kasvintuotannon tutkimus, Lönnrotinkatu 3, 50100 Mikkeli, etunimi.sukunimi@mtt.fi

⁴⁾ Evira, Tutkimus- ja laboratorio-osasto, Mustialankatu 3, 00790 Helsinki, etunimi.sukunimi@evira.fi

⁵⁾ Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, PL 65, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

⁶⁾ Biotekniikan instituutti, PL 65, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

Tiivistelmä

Orgaaniset lannoitteet, maanparannusaineet ja kasvien kasvua edistävät lannoitevalmisteet (biostimulantit) ovat kasveille potentiaalisia ravinnelähteitä ja niiden tavoitteena on lisätä kasvien kasvua. Mielenkiinto näihin lannoitevalmisteisiin on kasvanut viime vuosina, koska epäorgaanisten lannoitteiden ja satotuotteiden hintavaihtelut ovat lisääntyneet. Suomen lannoitevalmistelaki velvoittaa lannoitevalmisteelle markkinointilupaa hakevan tahon määrittelemään lannoitevalmisteiden biologisen ja kemiallisen koostumuksen, menetelmät ominaisuuksien mittaamiseen ja antamaan ohjeet turvallisesta käytöstä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli valita ja kehittää menetelmiä, joilla orgaanisten lannoitevalmisteiden typen ja fosforin käyttökelpoisuutta kasveille voidaan arvioida, ja joilla voidaan määrittää kasvin kasvua edistävien lannoitevalmisteiden koostumusta ja kasvuvaiikutusta.

Liukoisen typen käyttökelpoisuus kasville sekä riski huuhtoutua pystytään kuvaamaan riittävän tarkasti vesiuutoilla. 1:5 ja 1:60 vesiuutoista analysoidaan ammonium-, nitraatti- ja orgaaninen tyyppi. Jos liukoisen orgaanisen typen määrä on suuri, orgaanisen typen vapautumisnopeus on syytä määrittää. Orgaanisen typen vapautumisen kuvaamiseen voidaan käyttää ISO 14238-standardin mukaista lannoitevalmisteiden inkubaatiota maan kanssa. Maasta määritetään epäorgaanisen typen pitoisuuden muutokset, jolloin havaitaan lannoitevalmisteiden hajoamisen vaikutus maan epäorgaanisen typen määrään. Fosforimääritysten osalta vesiliukoinen fosfori sekä 1:5 että 1:60 uutoista kuvaa vain helposti käyttökelpoista ja samalla huuhtoutumiselle alttiina olevaa osaa fosforista. Kasveille käyttökelpoisen fosforin arviointiin suosittelemme Hedleyn fraktiointia, joka perustuu perättäisiin uuttoihiin vedellä, natriumbikarbonaatilla, natriumhydroksidilla ja suolahapolla. Astia- ja kenttäkokeet ovat toisinaan välttämättömiä, jotta lannoitevalmisteiden typen ja fosforin käyttökelpoisuus voidaan määrittää.

Orgaanisten lannoitevalmisteiden biologisten vaikutusten selvittämiseen on tarpeen käyttää useita erilaisia testejä. Mikrobivalmisteiden mikrobiologisen laadun ja koostumuksen tutkimiseen soveltuvat useat molekyylibiologiset analyysimenetelmät. Kasvin kasvua yleisesti edistäviä biologisia ominaisuuksia voidaan kartoittaa erilaisilla mikrobien kasvuun tai aktiivisuuteen perustuvilla mikrobitesteillä. Tällaisia ovat esimerkiksi testit, jotka kuvaavat orgaanisen lannoitevalmisteiden stabiilisuutta mikrobiaktiivisuuden mittaamisen avulla tai lannoitevalmisteiden vaikutusta yleiseen tautien tukahduttamiskykyyn eli tautisuppressiivisuuteen. Tuotteiden fytotoksisuutta voidaan selvittää kasvatuhuoneissa toteutettavien noin kuukauden pituisten astiakokeiden eli kasvibiotestien avulla. Biotestien avulla voidaan myös osoittaa kasvien kasvun edistymistä muihin tuotteisiin tai kontrolliin verrattuna. Biologisten vaikutusten testimenetelmiä voidaan hyödyntää myös pidempikestoisissa astia- ja kenttäkokeissa.

Avainsanat:

fosfori, tyyppi, orgaaninen lannoitevalmiste, viljelykasvit, kasvu, ravinnekierto, mikrobiologia, molekyylibiologia, biotesti

Test methods of plant nutrition effect and plant growth promoting for organic fertiliser products

Tapio Salo¹⁾, Ansa Palojarvi¹⁾, Sanna Kukkonen²⁾, Mauritz Vestberg²⁾, Petri Kapuinen¹⁾, Tiina Tontti³⁾, Kari Ylivainio¹⁾, Päivi Parikka¹⁾, Matti Nummila¹⁾, Liisa Maunuksela⁴⁾, Kristina Lindström⁵⁾, Salla Orasmaa⁵⁾, Lars Paulin⁶⁾

¹⁾ MTT, Plant production, Uutetie, 31600 Jokioinen, firstname.lastname@mtt.fi

²⁾ MTT, Plant production, Antinientie, 41330 Vihtavuori, firstname.lastname @mtt.fi

³⁾ MTT, Plant production, Lönnrotinkatu 3, 50100 Mikkeli, firstname.lastname @mtt.fi

⁴⁾ Evira, Research and Laboratory Department, Mustialankatu 3, 00790 Helsinki, firstname.lastname @evira.fi

⁵⁾ Department of Environmental Sciences, PL 65, 00014 University of Helsinki, firstname.lastname @helsinki.fi

⁶⁾ Institute of Biotechnology, PL 56, 00014 University of Helsinki, firstname.lastname @helsinki.fi

Abstract

Organic fertilisers, soil improvers and plant growth promoting substances are a potential source of nutrients and enhanced growth for agricultural crops. Interest for these fertiliser products has increased due to the recent variation in costs of inorganic fertilisers and values of crop products. The Finnish law of fertiliser products orders that the applicant of new fertiliser product must define its chemical and biological composition, methods to analyse the main properties and the instructions for safe use. The objective of this project was to select and develop methods that can estimate nitrogen and phosphorus availability from organic fertiliser products to agricultural crops, and that can determine biological composition and the growth enhancing effect of plant growth promoting fertiliser products. For the determination of biological composition, methods from microbiology and molecular biology were tested with sample products. Growth promoting effect was tested with laboratory and pot experiments.

Water soluble nitrogen estimates reasonably well both plant availability and risk of leaching from organic fertiliser products. When all fractions, ammonium, nitrate and organic nitrogen are determined from the water extract both from 1:5 and 1:60 extraction rates, the nitrogen availability is well evaluated. When proportion of organic nitrogen is high, the nitrogen mineralization test is needed to evaluate the effect of decomposition on soil inorganic nitrogen concentrations. Regarding phosphorus, 1:5 and 1:60 water extraction dissolve little phosphorus and the phosphorus concentration shows only the potential of P leaching. In order to evaluate phosphorus availability for the plant, Hedley fractionation with sequential extractions is recommended. Both pot and field experiments are occasionally necessary to understand nitrogen and phosphorous availability for the plants from the organic fertiliser products.

Several different methods are needed to test biological impacts of organic fertiliser products. Molecular biological methods are suitable for analyzing microbiological quality and composition of microbial products. Biological components of plant growth promotion can be surveyed by different microbiological tests based on growth or activity of microorganisms. Such tests are for example the stability tests based on microbial activity measurements or the impact of fertiliser products on general disease suppressiveness. Phytotoxicity of organic fertiliser products can be studied with one month long plant biotests carried out in greenhouses or growth chambers. Plant biotests can be used to show the growth promotion, as well, compared to some other products or control. It is possible to apply the test methods for biological impacts with longer term pot experiments or field trials.

Keywords:

phosphorus, nitrogen, organic fertiliser, crops, plant growth, nutrient recycling, microbiology, molecular biology, biotest

Alkusanat

Orgaanisten lannoitevalmisteiden hyödyntämiseen kasvintuotannossa on kohdistunut viime vuosina useita tarpeita. Orgaanisen jätteen kaatopaikkasijoitus tullaan lähivuosina kieltämään ja lisäksi ravinteiden kierrätyksen tehostaminen on nostettu tärkeäksi poliittiseksi tavoitteeksi (MMM 2011: Suomesta ravinteiden kierrätyksen mallimaa). Lannoitevalmistesektorin tulevaisuuskatsaus vuosille 2009 – 2013 (MMM 2009) määritteli osaltaan orgaanisten lannoitevalmisteiden turvalliselle käytölle tärkeimpiä tutkimuskohteita. Keskeisessä osassa olivat haitallisten yhdisteiden riskien minimoiminen ja ravinteiden mahdollisimman tehokas hyödyntäminen.

Elintarviketurvallisuusviraston (Evira) tehtävänä on hyväksyä markkinoille saatettava orgaaninen lannoitevalmiste joko olemassa olevan tyyppinimen alle tai hakemuksesta päättää uuden tyyppinimen hyväksymisestä tyyppinimiluetteloon (Evira 2013). Evira pyytää tarvittaessa lausuntoja asiantuntijoilta tyyppinimien hyväksynnässä ja esimerkiksi MTT:n ja HY:n tutkijat ovat kommentoineet omilta asiantuntija-alueiltaan tyyppinimihakemuksia. Tutkijoiden asiantuntemus perustuu useisiin tutkimushankkeisiin, joissa on tutkittu mm. orgaanisten lannoitevalmisteiden käyttökelpoisuutta kasvin ravinteiden lähteenä.

Raportoitavassa hankkeessa, ”Orgaanisten lannoitevalmisteiden testipaketti (LAVITESTI)”, etsittiin MMM:n Maaseudun kehittämisrahaston (Makera), MTT:n ja HY:n rahoituksella käyttökelpoisia menetelmiä orgaanisten lannoitevalmisteiden viljelykasvien kasvuun vaikuttavien tekijöiden määrittämiseen. Keskeisenä ajatuksena oli tarjota sekä lannoitevalmisteen tuotekehittäjille että lannoitevalmisteen markkinoille hyväksyväälle taholle työvälineitä ravinnevaikutuksen ja muiden kasvin kasvua edistävien vaikutusten mittaamiseen. Hankkeeseen osallistui MTT:n ja HY:n tutkijoiden lisäksi Eviran edustajia, jotka välittivät tutkimushankkeen käyttöön omaa kokemustaan hyväksymismenettelyistä ja valvonnasta.

Tutkimushankkeen ohjausryhmässä toimivat Pirjo Salminen (pj., MMM), Veli-Pekka Reskola (MMM), Antti Unnaslahti (Mavi), Arja Vuorinen (Evira), Kirsti Savela (Evira), Ari Seppänen (YM), Mika Virtanen (MTK), Saijariina Toivikko (VVY), Kaisa Suvilampi (Biolaitosyhdistys ry), Eerik Yrjölä (Satakierto Oy), Teija Paavola (Biokaasuyhdistys ry), Markku Järvenpää (MTT), joille välitämme kiitokset aktiivisesta osallistumisesta projektin toteutukseen.

Jokioisilla 24.6.2013

Tekijät.

Sisällysluettelo

1 Johdanto.....	7
2 Orgaaniset lannoitevalmisteet.....	9
3 Ravinnevaikutusten testimenetelmät	12
3.1 Typpi	12
3.1.1 Kasveille käyttökelpoisen typen määrittymenetelmät	12
3.1.2 Suositellut kasveille käyttökelpoisen typen määrittymenetelmät	14
3.2 Fosfori	18
3.2.1 Kasveille käyttökelpoisen fosforin määrittymenetelmät	18
3.2.2 Suositellut käyttökelpoisen fosforin määrittymenetelmät	20
3.3 Muut ravinteet	23
4 Biologisten vaikutusten testimenetelmät	24
4.1 Mikrobiologiset testit	24
4.2 Molekyylibiologinen testaus	26
4.3 Kasvibiotestit.....	28
4.3.1 Lyhytkestoiset	28
4.3.2 Tavanomaiset	28
5 Kasvukauden mittaiset käytännön kokeet	32
5.1 Kasvukauden astiakokeet	32
5.2 Kenttäkokeet	34
6 Yhteenveto.....	35
7 Kirjallisuus	37
Liite 1. Standardisointiryhmät	41
Liite 2. Lannoitevalmisteiden analytiikkaan käytettyjä standardimenetelmiä.....	42

1 Johdanto

Orgaaniset lannoitteet, orgaaniset maanparannusaineet ja kasvien kasvua edistävät aineet (biostimulantit) ovat maatalouden viljelykasvien potentiaalisia ravinnelähteitä ja kasvun tehostajia. Lannoitevalmisteita koskeva lainsäädäntö uudistui vuonna 2006 voimaan tulleen lannoitevalmistelain (539/2006, muutokset 1498/2009 ja 340/2010) ja maaliskuussa 2007 voimaan tulleiden sekä 2011 päivitettyjen asetuksen lannoitevalmisteista (24/11, muutokset 12/12 ja 7/13) ja asetuksen lannoitevalmisteita koskevan toiminnan harjoittamisesta ja sen valvonnasta (11/12) myötä. Lain voimaantulon jälkeen toimintaympäristön muutokset ovat kiihtyneet ja lannoitevalmisteiden markkinoille saattamiseen ja valvontaan kohdistuu uusia vaateita. Perinteisten väkilannoitteiden hintavaihtelut ovat lisänneet mielenkiintoa ja tarjontaa uusiin lannoitevalmisteisiin. Niiden kirjo vaihtelee aikaisemminkin käytetyistä orgaanisista lannoitevalmisteista (kompostit, mädätteet, puhdistamolietteet jne.) innovatiivisiin mikrobipreparaatteihin. Orgaanisten lannoitevalmisteiden ravinteiden käyttökelpoisuus viljelykasville ja vaikutukset maaperän biologiseen toimintaan ovat vaikeasti arvioitavissa ja mitattavissa. Uusien lannoitevalmisteiden ominaisuuksien testaamisen ja hyväksymisen sisältävälle toimintamallille on selkeä tarve. Myös viljelijöiden mielenkiinto ja tiedontarve uusista lannoitevalmisteista on johtanut useisiin ammattilehtikirjoituksiin ja toivomuksiin uusien tuotteiden puolueettomista arvioinneista (esim. Knaapi 2009 ja Reku 2009).

Lannoitevalmistelaki (539/2006) edellyttää, että uuden orgaanisen lannoitevalmisteen markkinoille saattajan tulee myös määrittää tuotteen suositellut käyttömäärät. Orgaaniselta lannoitevalmisteelta edellytetään kasvin kasvua edistävää vaikutusta, joka voi perustua ravinteisiin tai maaperän laadun parantamiseen sekä biologisten prosessien tehostumiseen.

EU:n lainsäädäntö käsittelee tällä hetkellä vain epäorgaanisia lannoitteita, ja orgaanisten lannoitevalmisteiden säädökset ovat kunkin jäsenmaan kansallisessa lainsäädännössä. EU:n yhteinen lainsäädäntö kaikkien lannoitevalmisteiden osalta on tällä hetkellä kehitysvaiheessa ja yhtenä mahdollisuutena on Suomessa käyttöön otetun kaltainen laaja lannoitevalmistelaki, joka sisältää mm. maanparannusaineet ja kasvin kasvua edistävät aineet. EU:n tavoitteena on minimoida lannoitevalmisteista ympäristöön kohdistuvia riskejä (haitalliset yhdisteet, ravinnekuormitus), parantaa tuotekehityksen mahdollisuuksia, helpottaa viranomaisten hyväksyntämenettelyjä ja lisätä taloudellista mielenkiintoa saman lannoitevalmisteen markkinoitiin useassa EU-maassa (Liegeois 2012).

Lannoitevalmistesektorin tulevaisuuskatsaus 2009–2013 (MMM 2009) määritteli ensisijaisia tutkimustarpeita, joihin kuuluivat muun muassa lannoitevalmisteiden vaikutukset maaperän biologiseen toimintaan, eloperäisten lannoitevalmisteiden ravinteiden hyväksikäyttöasteet ja liukoisuudet samoin kuin orgaanisessa muodossa olevien reservien mineralisoituminen. Tulevaisuuskatsauksessa asetettiin myös tavoitteeksi kehittää orgaanisten lannoitevalmisteiden ja maaperän analyysimenetelmiä, ml. viljavuustestit. Tutkimuksessa toivottiin noudatettavan linjaa, jossa lannoitevalmiste- ja lannoitusasioita tutkitaan ensin laboratorioympäristössä ja sen jälkeen aloitetaan kenttäkoevaihe. Laboratoriovaiheessa olisi tärkeää selvittää aineiden käyttäytyminen, reaktiot ja vaikutusmekanismit. Näin tiedeperusta vahvistuisi ja tulokset loisivat samalla pohjaa innovaatioille (MMM 2009).

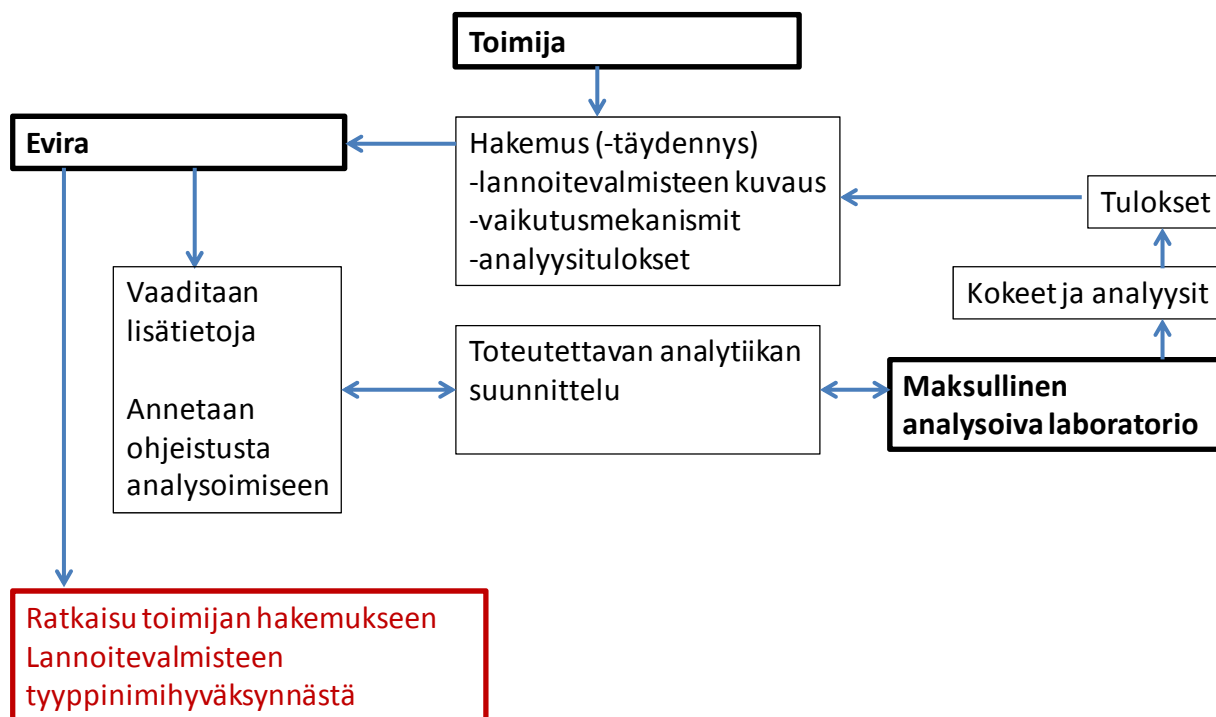
Lannoitevalmisteen uutta tyyppinimeä tai lannoitevalmisteen sisällyttämistä olemassa olevan tyyppinimen alle haetaan Elintarviketurvallisuusvirastolta ja siihen liitetään lannoitevalmistelain (539/2006) 7§:n 1 momentin vaatimat selvitykset. Näistä selvityksistä tässä hankkeessa tuotetaan tietoa seuraaviin kolmeen osaan:

- selvitys keskeisestä kemiallisesta ja biologisesta koostumuksesta sekä fysikaalisista ominaisuuksista
- näytteenotto- ja analyysimenetelmät keskeisten ominaisuuksien mittaamiseksi;
- suositeltava käyttömäärä, käyttöohjeet ja käyttöä rajoittavat tekijät sekä varastointiominaisuudet, ottaen huomioon terveys-, turvallisuus- ja ympäristöhaittojen ehkäiseminen

Lannoitevalmisteiden tyyppinimiluetteloon (Evira 2013) hyväksymisen lisäksi analytiikalla on muitakin tarpeita sekä viranomaisten, käyttäjien että tuotteiden markkinoille saattajien taholta (Taulukko 1).

Taulukko 1. Eri tahojen tarpeet lannoitevalmisteiden hyväksymismenettelyn osalta.

Viranomaiset	
lannoitevalmisteella on valmistajan tai maahantuojan sille ilmoittamat hyödylliset vaikutukset	lannoitevalmisteeseen ominaisuudet ovat riittävän pysyvät ja ominaisuuksia voidaan valvoa sopivilla menetelmillä
lannoitevalmiste on turvallista käyttää ihmisille ja ympäristölle	lannoitevalmisteeseen tuottama ravinnetarjonta voidaan määrittellä mm. ympäristötukea varten
Käyttäjät: (maanviljelijät, viherrakentajat yms.)	
tuote on turvallista käyttää	tuotteen vaikutus (vaikuttava ravinnesisältö ja mahdolliset muut vaikutukset) kasvien kasvuun tiedetään
Valmistajat ja maahantuojat	
lannoitevalmisteiden kehittämistä ja tuotteistamista varten on olemassa sopivat menetelmät ominaisuuksien määrittämiseksi	lannoitevalmistelain hyväksymismenettelyä varten tarvittavat määräykset ovat tiedossa



Kuva 1. Kaaviokuva lannoitevalmisteiden sisällyttämisestä olemassa olevan tyyppinimen alle tai uuden tyyppinimihyväksynnän hakemisesta.

Lavitesti-hankkeen tavoitteena oli kehittää MMM:n ja Eviran tarpeisiin soveltuva testipaketti uusien markkinoille tarjottavien orgaanisten lannoitevalmisteiden ominaisuuksien määrittämiseksi. Orgaanisille lannoitevalmisteille haettiin ensisijaisesti menetelmiä tuotteen ravinteiden (typpi ja fosfori) käyttökelpoisuuden ja kasvien kasvun edistymisen määrittämiseen. Biologisen koostumuksen tutkimukseen käytössä olevia menetelmiä arvioitiin tutkimusryhmän kokemusten perusteella ja molekyylibiologian lisätutkimustarpeita kartoitettiin. Hankkeessa kehitetty testiprotokolla antaa valvontaviranomaiselle (Evira ja MMM) välineen uusien tuotteiden hyväksymismenettelyyn ja esitettyjen ominaisuuksien testaamiseen. Myös viljelijät ja tuotteiden markkinoijat sekä valmistajat voivat hyödyntää orgaanisista lannoitevalmisteista tuotettua tietoa omassa päätöksenteossaan.

2 Orgaaniset lannoitevalmisteet

Lannoitevalmistelain muutoksessa 340/2010 säädetään lannoitevalmisteen tyyppinimen hakemisesta seuraavaa: ”Elintarviketurvallisuusvirasto päättää tyyppinimen hyväksymisestä kansalliseen tyyppinimiluetteloon, hyväksymisen muuttamisesta ja peruuttamisesta. Elintarviketurvallisuusvirasto pitää kansallista luetteloa lannoitevalmisteiden tyyppinimistä. Kansallisessa lannoitevalmisteiden tyyppinimiluettelossa on tyyppinimiryhmäkohtaiset tiedot ja tyyppinimikohtaiset tiedot vaadittavista valmistusmenetelmistä, keskeisistä raaka-aineista, ravinteista ja niiden ilmoitustavasta, ravinteiden muodosta ja liukoisuudesta sekä kasvien kasvua ja rakennetta parantavista tai kasvuolosuhteita edistävästä ominaisuuksista. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksella säädetään lannoitevalmisteiden tyyppinimiryhmistä ja tyyppinimiryhmäkohtaisista vaatimuksista.”

Lannoitevalmisteet on jaettu viiteen tyyppiin: lannoitteisiin, kalkitusaineisiin, maanparannusaineisiin, mikrobivalmisteisiin ja kasvualustoihin. Lannoitteet jaetaan epäorgaanisiin ja orgaanisiin lannoitteisiin (Taulukko 2). Tässä hankkeessa kehitettiin menetelmiä ensisijaisesti orgaanisille lannoitteille (1B), maanparannusaineille (3) ja mikrobivalmisteille (4) (Taulukko 3).

Taulukko 2. Lannoitevalmisteiden tyypit ja lannoitteiden alaryhmät.

Nro	Nimi
1	Lannoitteet
	1A Epäorgaaniset lannoitteet
	1B Orgaaniset lannoitteet
	1C Orgaaniset kivennäislannoitteet
2	Kalkitusaineet
3	Maanparannusaineet
4	Mikrobivalmisteet
5	Kasvualustat

Orgaanisissa lannoitteissa, joiden teho perustuu kasvinravinteisiin, vaaditaan pääravinteiden (N, P, K) kokonaispitoisuudeksi vähintään 3,0 % ja liuoslannoitteissa kunkin tyyppinimessä mainitun pääravinteiden pitoisuuden on oltava vähintään 1,0 %. Tyyppinimiryhmässä 1B3, orgaaniset lannoitteet, joiden teho perustuu pääosin muihin vaikutuksiin kuin kasvinravinteet, lannoitevalmisteen on edistettävä kasvin kasvua. Nämä lannoitevalmisteet muodostaisivat yhdessä mikrobivalmisteiden kanssa Biostimulantit-ryhmän valmisteilla olevassa EU:n lannoitelainsäädännössä. Orgaanisina lannoitteina sellaisenaan käytettävissä sivutuotteissa (1B4), sivutuotteilla on todettava kasvin kasvua edistävä vaikutus, joka pääosin perustuu käyttökelpoisten pääravinteiden määrään. Pääravinnepitoisuudet ovat yhteensä vähintään 1,0 % paitsi perunan solunesteellä 0,8 % tai sivuravinteiden pitoisuus on yhteensä vähintään 8,0 %.

Orgaaniset kivennäislannoitteet (1C) voivat sisältää lisättyjä mikrobivalmisteita (4A1) tai niihin on voitu lisätä rakeistamiseen, stabilisoimiseen, värjäämiseen elintarvikekäytössä hyväksytyjä orgaanisia tai epäorgaanisia aineita. Myös Suomessa kasvinuojeluun hyväksytyjä aineita tai Lannoitevalmistelain asetuksen 24/11 mukaisia kelaatteja ja kompleksin muodostajia voidaan lisätä tämän tyyppinimiryhmän lannoitevalmisteisiin.

Maanparannusaineet (3) edistävät kasvien kasvua parantamalla kasvien kasvuedellytyksiä vaikuttamalla maaperän kemiallisiin, fysikaalisiin ja/tai biologisiin ominaisuuksiin. Useat maanparannusaineet sisältävät merkittäviä määriä pää- ja sivuravinteita.

Mikrobivalmisteet (4) sisältävät luonnosta eristettyjä puhtaita ja elinkykyisiä bakteeri- tai sienikantoja. Mikrobivalmisteiden on myös parannettava kasvien kasvua tai edistettävä mikrobiologia prosesseja ku-

ten kompostointia. Kasvualustat (5) sisältävät usein muita lannoitevalmisteita kuten epäorgaanisia lannoitteita. Lannoitevalmistelain asetuksen menetelmät kuvaavat hyvin kasvualustojen käyttökelpoisuutta.

Taulukko 3. Orgaanisten lannoitevalmisteiden tyyppinimiryhmiä ja esimerkkejä tyyppinimistä.

Nro	Tyyppinimiryhmä	Esimerkki tyyppinimistä
1B	Orgaaniset lannoitteet	
1B1	Orgaaniset eläinperäiset lannoitteet	Lihaluujauho
1B2	Orgaaniset ei eläinperäiset lannoitteet	Sienibiomassa (NP)
1B3	Orgaaniset lannoitteet, joiden teho perustuu pääosin muihin vaikutuksiin kuin kasvinravinteisiin	Humusvalmiste tai –uute
1B4	Orgaanisina lannoitteina sellaisenaan käytettävät sivutuotteet	Perunan soluneste
1C	Orgaaniset kivennäislannoitteet	
1C1	Orgaaniset moniravinteiset kivennäislannoitteet	Lihaluujauho tai käsitelty eläinvalkuainen kaliumsulfaattisillä
1C2	Epäorgaaniset orgaanista ainetta sisältävät moniravinnelannoitteet	Kalkitseva orgaaninen kivennäislannoite
3	Maanparannusaineet	
3A1	Maanparannusturpeet	Kalkittu maanparannusturve
3A2	Orgaaniset maanparannusaineet	Maanparannuskomposti
3A3	Maan rakennetta parantavat aineet	Katemateriaali
3A4	Biologista aktiivisuutta lisäävät aineet	Biodynaaminen ruiskute
3A5	Maanparannusaineena sellaisenaan käytettävät sivutuotteet	Mädätysjäännös
4	Mikrobivalmisteet	
4A1	Mikrobivalmisteet	Typipakteerivalmiste

Orgaaniset lannoitteet, joiden teho perustuu pääosin muihin vaikutuksiin kuin kasvinravinteisiin (1B3), biologista aktiivisuutta lisäävät aineet (3A4) ja lannoitevalmisteina käytetyt mikrobituotteet (4) ovat osa uuteen EU:n lannoitelainsäädäntöön esitettyä Biostimulanttien lannoitevalmisteryhmää. Kasvien biostimulantit ovat määritelmän mukaan tuotteita, jotka sisältävät aineita ja/tai mikrobeja jotka vaikuttavat kasveihin tai juuristoon käsiteltynä kiihdyttämällä luonnollisia prosesseja jotka edistävät ravinteidenottoa, ravinteiden tehokkuutta, abioottisen stressin kestävyyttä ja/tai kasvien laatua riippumatta tuotteiden ravinnesisällöstä.

Orgaanisten lannoitevalmisteiden laadun ja ominaisuuksien testaamiseksi on valmisteltu eurooppalaisia standardeja erityisesti ravinnevaikutusten osoittamiseksi useissa eri standardisointityöryhmissä (CEN/TC 223, CEN/TC 292, CEN/TC 308, CEN/TC 400). Yleisesti ottaen orgaanisten lannoitevalmisteiden vaikutusten testaaminen kasvin kasvuun ei ole yksiselitteistä. Kasvuvaikutuksen selvittäminen edellyttää useita menetelmiä, sekä kemiallisia että biologisia tai testipatteriston käyttöä, joka koostuu useista toisiaan täydentävistä testeistä. On olemassa tarve yhtenäistää ja selkeyttää sekä ottaa käyttöön testimenetelmiä, jotka soveltuvat orgaanisten lannoitevalmisteiden testaamiseen.

Orgaanisilla lannoitevalmisteilla voi olla monia erilaisia kasvien kasvuun vaikuttavia – edistäviä tai haittaavia - biologisia vaikutuksia ja vaikuttavia ainesosia. Orgaaniset lannoitevalmisteet voivat edistää maa-

perän tai kasvualustan yleistä biologista aktiivisuutta siten, että kasvien ravinteiden saanti orgaanisista ravinnelähteistä tehostuu. Orgaanisilla lannoitevalmisteilla voi myös olla kasvien kasvua haittaavaa ns. fytotoksista vaikutusta. Tuotteiden fytotoksisuutta voidaan testata kasvien kasvutesteillä tuntematta tarkemmin haitallisen vaikutuksen syytä tai vaikutusmekanismia.

Mikrobivalmisteissa tuotteen sisältämät mikro-organismit voivat edistää kasvien ravinteidensaantia tai parantaa niiden kestävyyttä kasvipatogeeneja ja abioottista stressiä vastaan. Englanniksi tällaisia mikrobeja kutsutaan yleisnimellä 'Plant growth promoting microorganisms' (PGPM). Kasvien ravinteidensaantia edistävät mikrobit voivat sitoa typpeä, parantaa kasvin fosforinsaantia symbionttisen mykorritsasienen eli ns. sienijuuren avulla tai liuottaa fosfaattia maasta. Mikrobituotteet voivat edistää kasvin kasvua ja hyvinvointia myös tuottamalla kasvihormoneja tai olemalla antagonistisia taudinaiheuttajille. Mikrobivalmisteiden lisäksi muita biostimulantteja ovat lannoitevalmisteet, joiden sisältämät aineet vaikuttavat kasviin tai kasvin juuristoon kiihdyttämällä luonnollisia prosesseja jotka edistävät kasvin ravinteidenottoa, kasvualustan ravinteiden käyttökelpoisuutta kasville, abiottisen stressin kestävyyttä ja/tai parantavat kasvien laatua riippumatta tuotteiden ravinnesisällöstä.

Tuotteilla voi myös olla mikrobien aiheuttamia biologisia hyötyvaikutuksia, joita ei välttämättä voida liittää tiettyihin mikrobilajeihin. Esimerkiksi tautisuppressiivisuus eli 'tautimikrobien tukahduttaminen' on kompostien (ja joidenkin turvelaatuojen) luontainen lisäominaisuus (added value).

3 Ravinnevaikutusten testimenetelmät

Ravinnevaikutusten osalta keskityttiin typpeen ja fosforiin, joiden merkitys on keskeinen sekä kasvinravitsemuksessa että hävikeissä ympäristöön. Typpi on näistä ravinteista dynaamisempi sekä kasvukauden aikaisen kasvuvaikutuksensa että monipuolisten maassa tapahtuvien reaktioidensa ansiosta. Fosforia voidaan ajatella enemmän varastona, josta kasvinotto ja huuhtoutuminen kuluttavat fosforia ja johon lannoitus lisää fosforia.

Euroopan komission Horisontaali-projektissa (<http://horizontal.ecn.nl>) pyrittiin harmonisoimaan maaperän, lietteiden ja käsitellyn biojätteen analyysimenetelmät. Käytössä olevat liukoisten ja kokonaisravinteiden määrittäminen menetelmät arvioitiin kirjallisuuskatsauksissa ja ehdotettiin menetelmiä, jotka soveltuisivat hyvin kaikille em. matriiseille. Koska lietteet ja käsitellyt biojätteet ovat joko suoraan tai käsittelyn jälkeen orgaanisia lannoitevalmisteita, tässä raportissa hyödynnetään Horisontaali-projektin tuloksia ja suosituksia. Horisontaali-projektin suosittamat menetelmät on jo osittain vahvistettu CEN/TC 400 komitean kautta standardeiksi tai esitetty teknisinä spesifikaatioina (esim. CEN/TS 16177).

3.1 Typpi

3.1.1 Kasveille käyttökelpoisen typen määrittäminen menetelmät

Epäorgaaninen typpi

Ammonium ja nitraatti ovat kasvinravitsemuksen kannalta lannoitevalmisteiden tärkeimmät liukoisen typen komponentit. Nitraatti on helppoliukoista ja sitoutuu heikosti maapartikkeleiden rajapintoihin. Ammonium on kationi, joka sitoutuu negatiivisesti varatuille vaihtopinnoille. Ammoniumin vapautumista uuttoluokseen edistää suolaliuos, jonka kationi (esim. kalium tai kalsium) vaihtaa ammoniumin kationinvaihtopinnalta.

Liukoisen typen uuttamiseen käytetään yleensä vettä tai erivahvuisia suolaliuoksia. Suolaliuokset uuttavat vettä tehokkaammin ammoniumia, ja joidenkin matriisien liuoksissa suolapitoisuus edesauttaa nestefaasin ja sakan erottumista. Suolaliuokset vähentävät myös mikrobiaktiivisuutta varastoidussa näytteessä. Uuttosuhteen väljentäminen yleensä tehostaa uuttoa, ja joissain matriiseissa pienen nestemäärän käyttö ei kostuta näytettä riittävästi.

Taulukko 4. Liukoisen typen uuttamiseen käytettyjä kansallisia ja standardimenetelmiä.

Standardi	Uuttoliuos	Uuttosuhte	Matriisit	Käsittely
EN13651	0,01 M CaCl ₂ + 0,002 M DTPA	1:5 (v/v)	maanparannusaineet kasvualusta	tuore
EN13652	vesi	1:5 (v/v)	maanparannusaineet kasvualusta	tuore
ISO 14255	0,01 M CaCl ₂	1:10 (w/w)	maa	kuiva
ISO 14256 1 ja 2	1 M KCl	1:5 (w/w)	maa	tuore
CEN/TS 16177	1 M KCl	1:10 (w/w)	maa	tuore
CEN/TS 16177	1 M KCl	1:20–80 (w/w)	liete, biojäte	tuore
Viljavuuspalvelu	0,1 M K ₂ SO ₄	1:12,5 (w/w)	lanta, liete	tuore
MTT	2 M KCl	1:2,5 (w/w)	maa	tuore
MTT/Kempainen (1989)	0,3–0,6 M CaCl ₂ + 0,2–0,5 M HCl	1:4 (w/w) tai 1:1 (lietelanta)	lanta	tuore

Uuttoliuoksen suodatuksella vaikutetaan suodokseen tulevien orgaanisten yhdisteiden kokoon. Uuttoliuoksesta määritetään nitraatti- ja ammoniumtyppi yleensä fotometrisin menetelmin. Uuttoliuoksen pitäisi olla mahdollisimman kirkas, jotta nitraatti- tai ammoniumspesifinen värireaktio ei häiriintyisi.

Taulukko 5. Kansallisten ja standardimenetelmien ohjeet uuttoliuoksen sekoittamiseen, suodattamiseen ja typen fraktioiden määrittämiseen. (w) = painon mukaan

Standardi	Näytekooko	Sekoitus	Suodatus	Määrittäminen
EN13651	60 ml (w)	1 h, vaakasuora	8 µm / sentrifugointi	tislaus, fotometria
EN13652	60 ml (w)	1 h, vaakasuora	8 µm / sentrifugointi	tislaus, fotometria
ISO 14255				
ISO 14256-1 ja -2	40 g (w)	1 h, ylös-alas	sentrifugointi 10 min 3000g /4h seisotus	fotometria
CEN/TS 16177	1–10 g (w, kuivapaino)	1 h, ylös-alas	8–12 µm/sentrifugointi	tislaus, fotometria
Viljavuuspalvelu	10 g (w)	1 h	8–12 µm	tislaus
MTT	100 g (w)	1 h	8–12 µm	fotometria
MTT/ Kempainen (1989)	50–100 g (w)	1 h	sentrifugointi 10 min 3000r/min ja 4–7 µm	tislaus

Orgaaninen tyyppi

Suodoksen orgaaninen tyyppi hajotetaan Kjeldahl-poltolla (SFS 5055 tai SFS-EN 25663) tai hapetetaan autoklaavissa peroksodihapon kanssa (SFS-EN ISO 11905-1). Kjeldahl-polton jälkeen orgaaninen tyyppi on ammoniummuodossa, ja se määritetään yleensä tislaamalla. Autoklaavihapetuksen jälkeen orgaaninen tyyppi on nitraattina, ja se voidaan määrittää fotometrisin menetelmin.

Rakenteellinen orgaaninen tyyppi määritetään yleensä Kjeldahl-menetelmällä tuoreesta näytteestä (SFS-EN 16169:en 2012), jottei ammoniakkia haihdu määrittämisen tai esikäsittelyn aikana. Kjeldahl-menetelmä ei vapauta täysin rengasrakenteisten (-C-N-C-, N-O- tai N-N -sidokset) yhdisteiden tyyppiä. Nitraatin ja nitriitin määrittäminen vaatii erillisen katalyyttisäilyksen, joka ei sisälly kaikkiin Kjeldahlin standardimenetelmiin. Kuivapolttota käyttävä Dumas'n menetelmä (EN 13654-2 tai EN 16168) on käyttökelpoinen kokonaistypen määrittämiseen, jos näyte voidaan kuivata ilman vaaraa ammoniakkin haihtumisesta.

Orgaanisen typen mineralisaation mittaaminen

Liukoisen tai rakenteellisen orgaanisen typen mineralisoituminen maassa riippuu mikrobien toimintaedellytyksistä (lämpötila ja kosteus) ja lannoitevalmisteen hiilen ja ravinteiden määrästä. Joissain tapauksissa lannoitevalmiste voi sisältää myös haitallisia yhdisteitä, jotka hidastavat typen mineralisaatiota ja nitrifikaatiota. Typen mineralisaation määrittämiseen on ollut jo pitkään käytössä useita tutkimusmenetelmiä (Kokkonen ym. 2006, Keeney 1982, s. 717–722), ja standardeiksi on kehitetty kaksi menetelmää, ISO 14238 ja OECD 216. Näissä menetelmissä tutkittavaa materiaalia sekoitetaan maanäytteeseen (inkubointi) ja seurataan ammonium- ja nitraattitypen pitoisuuksien muutoksia näytteessä.

OECD-testin lähtökohtana ja ISO-standardin vaihtoehtona on potentiaalisesti haitallisten kemikaalien vaikutuksen selvittäminen typen mineralisaatioon ja nitrifikaatioon. Molemmat menetelmät soveltuvat kuitenkin myös lannoitevalmisteista mineralisoituvan typen määrittämiseen. Käytettäväksi testimaaksi suositellaan hietaa, jonka orgaanisen hiilen pitoisuus on alhainen. Molempien ohjeiden suosituksissa maanäytteitä analysoidaan 7 vuorokauden välein vähintään neljän ja mielellään seitsemän viikon ajan. Maanäytteistä analysoidaan typen epäorgaaniset muodot: nitraatti, nitriitti ja ammonium. Testien aikana lämpötila pidetään 20 ± 2 °C ja maan kosteus 40–60 %:ssa maan vedenpidätyskapasiteetista.

3.1.2 Suositellut kasveille käyttökelpoisen typen määritysmenetelmät

Lannoitevalmisteen kasvinravitsemuksessa merkityksellisen typen pitoisuuden selvittämiseksi määritetään helposti veteen liukenevien ja kasveille välittömästi käyttökelpoisten ammonium- ja nitraattitypen pitoisuudet. Samoista vesiuutteista määritetään liukoinen orgaaninen tyyppi, joka edustaa helpoiten epäorgaaniseksi tyyppiä mineralisoituvaa orgaanisen typen osuutta. Vesiuuton käyttöä puoltavat sopivan standardin (EN 13652) olemassaolo, ja sen tulosten kohtuullisen hyvä yhteneväisyys tehokkaampiin typen uuttoihiin sekä soveltuminen kaikille lannoitevalmisteille ilman analyysitekniisiä ongelmia (Kapuinen ym. 2010).

Koska orgaanisen aineksen hajoaminen maassa voi johtaa myös typen sitoutumiseen hajottaviin mikro-
beihin eli typen immobilisaatioon, tehdään typen mineralisaatiotesti, josta nähdään maan epäorgaanisen typen määrän muutokset tutkittavan näytteen hajoessa 48 vrk:n ajan. Testin perusteella arvioidaan, johtaako näytteen orgaanisen aineksen hajoaminen maan epäorgaanisen typen määrän vähenemiseen vai lisääntymiseen. Samalla havaitaan myös näytelisyksen mahdolliset toksiset vaikutukset, jos nitrifikaatio eli ammoniumin hapettuminen nitraatiksi ei johda nitraattitypen määrän lisääntymiseen maassa.

Liukoisen typen määrittäminen

Periaate

Menetelmä kuvaa lannoitevalmisteen liukoisen typen pitoisuuden kahdella eri uuttosuhteella. Nitraatti uutuu yleensä tehokkaasti molemmilla menetelmillä, mutta ammoniumtypen erottuminen on tehokkaampaa 1:60 uuttosuhteella. Menetelmä perustuu 1:5 vesiuuton osalta EN 13652-standardiin, jota voidaan käyttää myös muutamien poikkeuksien 1:60 vesiuuton pohjana.

Näytteen valmistelu

Analysoitava näyte valmistellaan standardin EN 13040 mukaisesti. Näytteen on läpäistävä 20 mm:n seula. Mikäli näytteen partikkelikoko on suurempi, näytettä on varovasti hienonnettava tai käytettävä EN 13652 mukaisia suurempia näytemääriä. Tilavuussuhteella tehtävää 1:5 vesiuuttoa varten tarvitaan tutkittavan näytteen tuore tilavuuspaino standardin EN 13040 mukaisesti. Näytettä voidaan säilyttää muutamia päiviä jääkaappilämpötilassa, mutta pidemmässä varastoinnissa näyte on pakastettava.

1:5 vesiuutto

Uutteen valmistus

Valmistetaan 1 + 5 tilavuussuhteessa (v/v) vesiuute punnitsemalla 60 ml vastaava massa näytettä ravisteluastiaan ja lisätään 300 ml deionisoitua vettä. Näytettä ja uuttonestettä sekoitetaan 1 h ravistelijassa niin, että vesi ja näyte sekoittuvat hyvin. Uute suodatetaan noin 8 µm huokoskoon suodatinpaperin läpi. Sentrifugointia voidaan myös käyttää suodoksen erottamiseen, jos uute ei läpäise suodatinpaperia.

1:60 vesiuutto

Uutteen valmistus

Valmistetaan 1 + 60 massasuhteessa (w/w) vesiuute punnitsemalla 3 g näytettä ravisteluastiaan ja lisätään 180 ml deionisoitua vettä. Näytettä ja uuttonestettä sekoitetaan 1 h ravistelijassa niin, että vesi ja näyte sekoittuvat hyvin. Uute suodatetaan noin 8 µm huokoskoon suodatinpaperin läpi. Sentrifugointia voidaan myös käyttää suodoksen erottamiseen, jos uute ei läpäise suodatinpaperia.

Ammonium- ja nitraattityypin määrittäminen

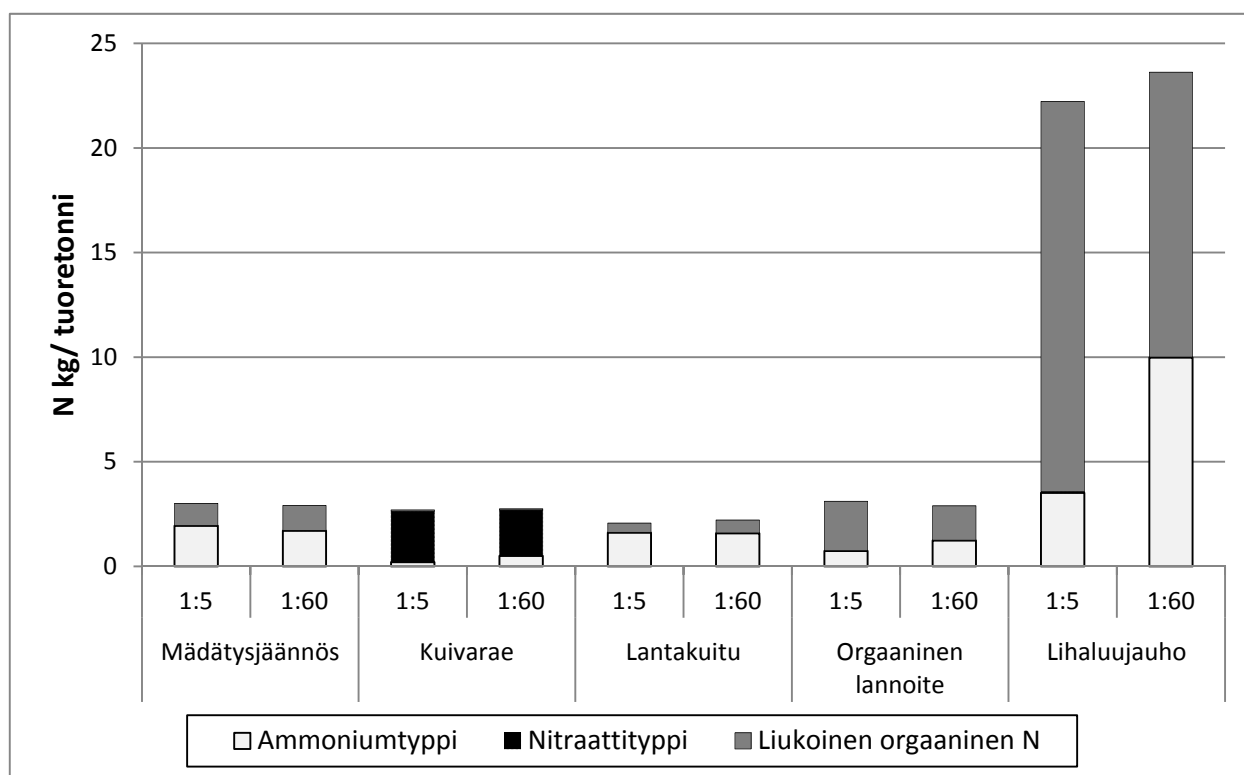
Suodoksen ammonium- ja nitraattityypin pitoisuudet määritetään vesikemian menetelmin, jotta saavutetaan riittävä analyysitarkkuus. Suodosta voidaan säilyttää muutamia päiviä jääkaappilämpötilassa, mutta pidempiaikaista varastointia varten näyte on pakastettava.

Liukoisen orgaanisen typen määrittäminen

Suodoksen sisältämän liukoisen orgaanisen typen hajottaminen voidaan tehdä Kjeldahl-poltton (SFS-EN 25663) tai peroksodisulfaatti-hapetuksen (SFS-EN ISO 11905-1) avulla. Kjeldahl-poltton jälkeen näytteen tyyppi on määritettävä tislamalla, jolloin tarkkuus ei ole kovin hyvä, ja nitraatin pelkistäminen mukaan määrittämiseen saattaa olla haastavaa. Kjeldahl-poltton jälkeisessä tislauksessa saadaan näytteen kokonaistyyppipitoisuus, josta vähennetään ennen polttoa määritetyt ammonium- ja nitraattipitoisuudet. Peroksodisulfaatti-hapetusta käytettäessä on huolehdittava näytteen riittävästä laimennuksesta jo hapetusta varten (Maher et al. 2002). Peroksodihajotuksen jälkeen näytteestä määritettävä nitraatti kertoo koko suodoksen liukoisen typen pitoisuuden. Kun tästä vähennetään ennen hajotusta määritetyt ammonium- ja nitraattipitoisuudet, saadaan liukoisen orgaanisen typen pitoisuus.

Esimerkki liukoisen typen määrittämisen tuloksista:

Kuivarake	NH ₄ -N, kg/t tuoretta	NO ₃ -N, kg/t tuoretta	Liukoinen orgaaninen typpi kg/t tuoretta
1:5 vesiututto	0,2	2,4	0,1
1:60 vesiututto	0,2	2,2	0,4



Kuva 2. Liukoisen typen pitoisuuksia erilaisista orgaanisista lannoitevalmisteista 1:5 ja 1:60 vesiututoilla.

Liukoista orgaanista typpeä oli huomattavan paljon lihaluujauhossa. Orgaanisessa lannoitteessa oli vähän vesiliukoista typpeä, mutta sen kokonaistyyppipitoisuus oli 37 kg/tuorettonni, ja kyseisen lannoitteen orgaanisen typen mineralisaatio olikin suurta (Kuva 3.) Kuivarakeen ja lantakuidun kokonaistyyppipitoisuudet olivat myös korkeat, 24 ja 32 kg/tuorettonni.

Sovellukset

Laboratoriossa voidaan käyttää 1:5 ja 1:60 vesiuutoissa erilaisia näytemääriä, kunhan suhteet säilyvät. Suurissa sarjoissa näytekokoja on usein pienennettävä, mutta tällöin on huolehdittava pienen näytekuon edustavuudesta. Käytettävät näyte- ja uuttonesteen määrät, käytetty suodatusmenetelmä, orgaanisen aineksen hajottamismenetelmä ja määrittymenetelmät ilmoitetaan tulosten raportoinnin yhteydessä. Laimilla suolaliuoksilla tehtävät uutot ovat myös yleensä vertailukelpoisia tehokkaampaan 1:60 vesiuuttoon. Suolaliuosten kationi, esimerkiksi kalium kaliumsulfatissa tai kaliumkloridissa (CEN/TS 16177:2012), tehostaa ammoniumin uuttamista ja käytetyn suolaliuoksen mahdollinen happamuus vähentää analyysien aikaista riskiä ammoniakkin haihtumiselle näytteistä.

Mineralisoituvan typen määrittäminen

Mineralisoituvan typen määrittämiseen on MTT:ssä käytetty pitkäkestoisia, useiden kuukausien, inkubointikokeita, joissa on samalla määritetty myös hiilidioksidin tuottoa (Jensen ym. 2005). Typen lannoitusvaikutuksen määrittämiseen soveltuu kuitenkin lyhyempi testi, ISO 14238 (Salo ym. 2012).

Periaate

Orgaanisesta aineksesta vapautuvan eli mineralisoituvan epäorgaanisen typen määrittämiseksi tehdään ISO 14238-standardin mukainen testi. Tutkittavaa materiaalia inkuboidaan hietamaassa, ja maassa tapahtuvia epäorgaanisen typen määrän muutoksia seurataan ja verrataan pelkän maan epäorgaanisen typen määrän muutoksiin. Mineralisaation määrittämiseksi maahan sekoitetaan tutkittavaa näytettä määrää, joka voi lisätä maan epäorgaanisen typen määrää noin 100 mg N / kg maata. Tutkittavasta näytteestä on ennen kokeen suoritusta tehtävä kokonaistyyppimäärittäminen, jotta lisättävä määrä voidaan arvioida.

Testimaa

Testimaana käytetään karkeata hietaa, jotta maan käsiteltävyys mm. näytteen sekoittamisessa on helppoa. Testimaan orgaanisen aineksen pitoisuus on alle 3 %, jotta maan luontaisen orgaanisen aineksen typen mineralisaatio ei muodosta kohtuutonta vaihtelua. Testimaan epäorgaanisen typen pitoisuuden pitäisi olla 50–100 mg/kg, jotta tutkittavan näytteen mahdollisesti aiheuttama typen immobilisaatio eli sitoutuminen hajottajamikrobeihin ei hidastaisi näytteen orgaanisen aineksen hajoamista. Ennen koetta määritetään testimaan kuiva-ainepitoisuus ja vedenpidätyskyky, jotta maan kosteus osataan pitää hieman kenttäkapasiteettia alempana testin aikana.

Testin suoritus

Muovipurkkeihin punnitaan 100 kuiva-ainegrammaa tuoretta maata. Tähän maamäärään sekoitetaan vähintään 10 mg N vastaava näytemäärä (tavoitetaso 100 N mg/ kg maata). Yleensä sekoitettava määrä on näytteen kokonaistyyppipitoisuuden seurauksena 0,5–5 g. Näyte ja maa sekoitetaan huolellisesti, kostutetaan tarvittavaan vesipitoisuuteen ja palautetaan muovipurkkiin. Testien aikana lämpötila pidetään 20 ± 2 °C ja maan kosteus 40–60 %:ssa maan vedenpidätyskapasiteetista. Näytepurkkeja tehdään neljänä eri ajankohtana tehtävää purkamista varten, 0, 4, 20 ja 48 vrk kokeen aloittamisesta. Kaikki purkit tehdään kolmena toistona, jotta näytteiden luontaisesta vaihtelusta saadaan käsitys. Maanäytteitä voidaan säilyttää muutamia päiviä jääkaappilämpötilassa ennen epäorgaanisen typen uuttoja, ja muutoin maanäytteet on säilytettävä pakastettuina.

Maan epäorgaanisen typen määrittäminen

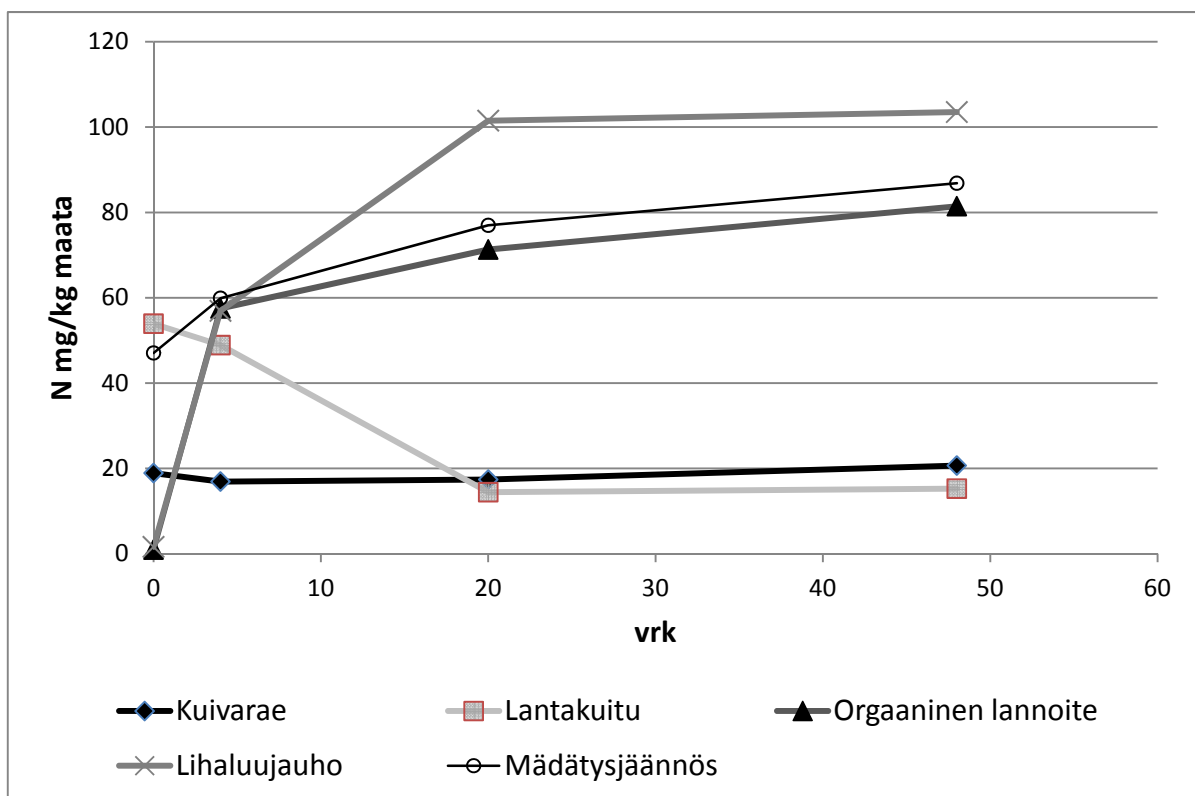
Maanäytteet uutetaan 2 M kaliumkloridilla 1:2,5 (w/w). Näyte kaadetaan uuttoastiaan ja lisätään 250 ml 2 M kaliumkloridia. Uutetta sekoitetaan ravistelijassa 1 h. Uute suodatetaan noin 8 µm huokoskoon suodatinpaperin läpi. Suodoksesta määritetään ammonium- ja nitraattitypen pitoisuudet autoanalysaattorilla käyttäen vesikemian menetelmiä.

Esimerkki inkubaatiokokeesta saatavista tuloksista:

	NH ₄ -N, mg/kg maata	NO ₃ -N, mg/kg maata
Kuivarakeessa lisätty:	1,6	19,5
Erotus näyte-kontrollimaa vrk		
0	2,3	15,6
4	1,5	14,5
20	0,1	16,4
48	0,0	19,5

Sovellukset

Näytepurkkeja voidaan purkaa myös eri aikaväleihin, mutta tärkeintä on saada käsitys maanäytteen epäorgaanisen typen määrän muutoksista ajan suhteen. Epäorgaanisen typen uuttoon voidaan myös käyttää ISO 14256-1 ja -2 standardien 1:5 uuttoa 1 M KCl tai CEN/TS 16177 menetelmän 1:10 uuttosuhdetta 1 M KCl.



Kuva 3. Maan epäorgaanisen typen pitoisuudet viiden orgaanisen materiaalin inkuboinnissa. Kokonaistyyppiä on maahan lisätty kaikilla materiaaleilla 200 mg/kg maata.

Kasviperäisen orgaanisen lannoitteen typen mineralisaatio oli voimakasta, vaikka tuote ei sisältänyt juuri lainkaan vesiliukoista tyyppiä. Lihaluujauho sisälsi hyvin vähän epäorgaanista tyyppiä, mutta sen sijaan vesiliukoista orgaanista tyyppiä lihaluujauhossa oli inkubointikokeen aikana vapautunut määrä. Kuivarakeen orgaaninen tyyppi ei vapautunut. Lantakuitu aiheutti hajoamisprosessissaan maan epäorgaanisen typen immobilisaatiota. Mädätysjäännöksestä vapautui jonkin verran orgaanista tyyppiä.

3.2 Fosfori

3.2.1 Kasveille käyttökelpoisen fosforin määrittäminen

Fosforin käyttökelpoisuuden arviointiin on yleensä käytetty vesiuuttoa, fysikaalis-kemiallisia fraktiointia, perättäisten uuttojen kemiallista fraktiointia, entsyymattista hajotusta, magneettiresonanssikuvausta (NMR) ja röntgenspektroskopiaa. Toor ym. (2006) mukaan vesiuuttojen avulla voidaan määrittää helppoliukoisen fosforin pitoisuus ja arvioida potentiaalista huuhtoutumisriskiä. Vesiuuttainen fosfori voi olla lannoitevalmisteissa muutamista prosenteista 75 %:iin kokonaisfosforista. Fysikaalis-kemialliset fraktiointimenetelmät ovat myös suhteellisen nopeita ja edullisia fosforin biologisen käyttökelpoisuuden arviointiin. Entsyymattinen hajotus, NMR-tekniikat ja röntgenspektroskopia karakterisoivat orgaanisen ja mineraalifosforin esiintymismuotoja. Perättäisten kemiallisten fraktiointiuuttojen ja spektroskopian (NMR ja röntgen) avulla on saavutettu tarkkaa tietoa fosforiyhdisteiden jakautumisesta eri uuttoluoksiin (Toor ym. 2006).

Liukoisuus erilaisiin uuttonesteisiin

Vesiuuton epäorgaaninen fosfori sisältää liuenutun epäorgaanista fosforia ja liuenneita fosforimineraaleja kuten alumiini-, kalsium- ja rautafosfaatteja. Orgaaninen fosfori on puolestaan todennäköisesti peräisin labiileista mono- ja diestereistä. Mitä enemmän uuttoluosta suhteessa näytteeseen käytetään, sitä enemmän fosforia yleensä uutuu. Näytteiden kuivauksen on todettu myös lisäävän vesiliukoisen fosforin määrää. Sidoksissa tapahtuvien muutosten lisäksi mikrobien sisältämää fosforia voi muuttua vesiliukoiseen muotoon. Suodoksen erottaminen uutteesta voi myös vaikuttaa määritettyyn fosforipitoisuuteen. Partikkeleihin sitoutuneen fosforin erottamista varten näytteet olisi suodatettava vähintään 0,45 µm huokoskoon läpi. Mikäli määrittäminen perustuu plasmaemissiospektroskopiaan (ICP-OES), saadaan myös partikkelien sisältämä fosfori mukaan kokonaispitoisuuteen. Vesikemian värireaktiot reagoivat vain fosfaatin kanssa, mutta partikkelit voivat häiritä värireaktion muodostumista ja värin intensiteetin mittausta. Orgaanisen aineksen hajotuksen jälkeen vesikemian tulokset ovat yleensä lähellä ICP-tuloksia.

Taulukko 6. Liukoisen fosforin uuttamiseen käytettyjä kansallisia ja standardimenetelmiä.

Standardi	Uuttoliuos	Uuttosuhde	Matriisit	Käsittely
SFS-EN13651	0,01 M CaCl ₂ + 0,002 M DTPA	1:5 (v/v)	maanparannusaineet kasvualusta	tuore
SFS-EN13652	vesi	1:5 (v/v)	maanparannusaineet kasvualusta	tuore
ISO 11263	0,5 M NaHCO ₃	1:20	Maa	kuiva
ISO 14870	0,1 M TEA, 0,01 M CaCl ₂ , 0,005 M DTPA	1:2 (w/w)	Maa	kuiva
Viljavuuspalvelu/ MTT	0,5 M CH ₃ COONH ₄ , 0,5 M CH ₃ COOH	1:10 (v/v)	Maa	kuiva

Eurooppalaisten kasvualustastandardien, SFS-EN 13651 ja 13652 ongelmana on niiden heikko puskurointikyky. CAT-uutossa (SFS-EN 13651) liuoksen lähtö-pH on 2,65, mutta uutettavan materiaalin pH muuttuu helposti uuton pH:ta ja vaikuttaa liukenevaan fosforiin. Puskuroituja uuttoluoksia edustavat ISO 14870 (pH 7,3) ja Suomessa maa-analyseissä käytettävä hapan ammoniumasetatimenetelmä (pH 4,65). ISO 11263 tunnetaan myös Olsen-P -menetelmänä, jossa uuttonesteinä on 0,5 M NaHCO₃ (pH 8,5). Olsenin menetelmä on lannoitus-suositusten pohjana useissa maissa, joissa peltomaiden pH on lähellä neutraalia. Liukoisen fosforin määrittäminen riippuu suuresti pH:sta ja matriisin sisältämisestä fosforia sitovista yhdisteistä. Tästä syystä maaperän, käsitellyn biojätteen ja lietteen standardeja harmonisoinut horisontaali-projekti (<http://horizontal.ecn.nl>) ei esittänyt matriiseille yhteistä liukoisen fosforin määrittämenetelmää. Vahvinta kannatusta työryhmässä sai muunneltu CAT-uutto (EN 13651), jossa uuttosuhteeksi on valittu väljempi 1:8. Suodoksen fosforipitoisuuden määrittämiseen suositeltiin ICP-OES:a tai fotometristä menetelmää (askorbiinihappo ja stannokloridi). Liukoisen fosforin määrittäminen on perinteisesti ollut vaikeimminkin harmonisoitava ja verrattavissa eri maiden kesken, koska useimmat Euroopan maat ovat kehittäneet ja ottaneet käyttöön omiin maalajeihinsa sopivat menetelmät, joista on kertynyt vuosikymmenien vertailuaineisto.

Uuttoajalla on vaikutusta liukoisen fosforin pitoisuuteen, jos liukenevaa fosforia on materiaalissa runsaasti. Näytteiden kuivaaminen voi lisätä vesiuttoisen fosforin osuutta lähinnä orgaanisen fosforin helpomman liukenevuuden kautta. Uuton jälkeen tapahtuva suodatus tai sentrifugointi vaikuttaa liukoisen fosforin pitoisuuteen. Menetelmiä käytettäessä on päätettävä, minkä kokoluokan epäorgaanisten ja orgaanisten hiukkasten sisältämä fosfori hyväksytään mukaan lopputulokseen. Suodatus esim. 0,45 µm huokoskoon läpi on tuottanut 40 % pienempiä vesiliukoisen fosforin pitoisuuksia kuin sentrifugointi (Sims ym. 2000).

Fysikaalis-kemiallisessa fraktioinnissa vesiututon tai nestemäisen lannoitevalmisteeseen fosfori jaetaan 1) hiukkasten koon ja 2) hajoamisen perusteella. Hiukkaskoko erotellaan yleensä 0,2 tai 0,45 µm:n suodatuksella liukoiseen tai hiukkasmuotoon. Hajoaminen määritetään hapon tai hapetuksen avulla, ja ennen hajotusta määritettävissä oleva ortofosfaatti luokitellaan reaktiiviseksi. Liukoinen ja totaali reaktiivinen fosfori määritetään suodatetusta ja vastaavasti suodattamattomasta näytteestä fotometrisellä menetelmällä (hapon molybdaattisini). Uutteen tai nestemäisen lannoitevalmisteeseen totaalifosfori määritetään hajotetusta suodattamattomasta näytteestä. Liukoinen totaalifosfori määritetään suodatetusta ja hajotetusta näytteestä. Näytteen fosfori voidaan jakaa neljään luokkaan joiden biologinen käyttökelpoisuus lisääntyy liukoisesta reaktiivisesta fosforista liukenemattomaan ei-reaktiiviseen fosforiin (Toor ym. 2006).

Perättäiset uutot

Perättäisiä fosforiuuttoja on käytetty maalle ja muille kiinteille materiaaleille. Nestemäiset näytteet onkin kuivattava, mikä voi osaltaan muuttaa fosforin liukoisuutta. Maassa rauta- ja alumiinioksidit hallitsevat fosforin käyttökelpoisuutta. Lannassa puolestaan kalsium ja magnesium vaikuttavat (Toor ym. 2006) merkittävästi fosforin liukoisuuteen. Puhdistamolietteisä fosforin saostamiseen käytetyt kemikaalit tai menetelmät vähentävät fosforin liukoisuutta.

Hedleyn fraktioinnissa (mm. Sharpley ja Moyer 2000) tutkittavaa näytettä uutetaan emäksisillä ja happamilla liuksilla, ja suodoksesta määritetään epäorgaaninen ja kokonaisfosfori. Uutto aloitetaan vedellä tai ioninvaihtohartsilla. Tässä vaiheessa maasta uuttuvan fosforin oletetaan olevan lähinnä liukoista epäorgaanista fosforia. Seuraavassa vaiheessa tehdään natriumvetykarbonaatti-uutto (Olsen-P), jossa saadaan uutetuksi maasta amorfisista ja kristallisoituneita Al- ja Fe-fosfaatteja sekä kemiallisesti suojattua orgaanista fosforia. Natriumhydroksidi uuttaa sen jälkeen maasta hieman tehokkaammin amorfisista rauta- ja alumiiniyhdisteitä sekä orgaanisen aineksen fosforia. Lopuksi maan suhteellisen stabiilit fosforyyhdisteet uutetaan happoon (suola- tai rikkihappo), jolloin uuttoluokseen vapautuu kalsiumfosfaatteja, fytiinihappoa, ortofosfaatteja ja apatiitin ortofosfaattia. Maan ja orgaanisten lannoitevalmisteiden fosforin uuttuminen on erilaista ja vasta nykyaikaiset spektroskopian menetelmät ovat selvittäneet tarkemmin Hedleyn fraktioinnissa orgaanisesta materiaalista uuttuvia fosforimuotoja.

Kotieläinten lannasta vesi- ja NaHCO₃-uutto vapauttavat liukoisia fosforimuotoja, kuten ortofosfaattia, fosfolipidejä, DNA:ta ja labiileja monoestereitä (Turner and Leytem 2004). NaOH- ja HCl-uutto irrottivat lannasta ortofosfaattia ja fytiinihappoa. Röntgenspektroskopian avulla havaittiin, että vesiutto vapautti siipikarjan lannasta ortofosfaattia, joka oli peräisin kalsiumfosfaatista. Suolahappo puolestaan irrotti fytiinihapon ja apatiitin fosforia. Jos kalsiumin määrä suhteessa fosforiin nousee yli kahden, fosforia alkaa sitoutua kalsiumfosfaatin sijasta apatiitiksi, jonka liukoisuus on kalsiumfosfaatteja heikompi (Toor ym. 2005). Pelkän perättäisen uuttomenetelmän avulla ei voida kuitenkaan varmuudella päätellä uuttuneen fosforin alkuperäistä rakennetta (Toor ym. 2005).

Entsyaattinen hajotus

Orgaanisissa lannoitevalmisteissa voidaan olettaa fosforista yli 40 %:in olevan orgaanisessa muodossa. Tärkeimmät orgaanisen fosforin muodot ovat inositolifosfaatit (mm. fytiinihappo), sokerifosfaatit, nukleinihapot ja fosfolipidit. Orgaanisen fosforin käyttökelpoisuus kasveille ja huuhtoutuminen vesistöihin riippuu fosfataasientsyymien kyvystä hajottaa orgaaniset muodot epäorgaaniseksi. Vesi- tai suolauuttojen sisältämää orgaanista fosforia voidaan inkuboida kaupallisten fosfataasientsyymien kanssa ja määrittää uuttojen epäorgaanisen fosforin pitoisuuksien muutokset. Menetelmän avulla voidaan erottaa lannoitevalmisteiden erilaiset orgaanisen fosforin muodot, mutta yhtenäisiä menetelmiä on vaikea muodostaa (Toor ym. 2005).

Spektroskopia

Magneettiresonanssikuvausta (NMR) ja röntgenspektroskopiaa (XAS) on viime vuosina voitu hyödyntää erilaisten fosforiyhdisteiden määrittämiseen. Näiden menetelmien kustannukset ovat kuitenkin niin korkeat, että niiden käyttökelpoisuus rajoittuu tällä hetkellä tutkimukseen.

Inkubointikokeet

Lannoitevalmisteissa lisätyn fosforin liukoisuutta voidaan seurata myös inkubointikokeessa maan kanssa. Maapurkkeja puretaan liukoisen fosforin tai perättäisten uuttojen analyysiin sopivin aikavälein. Maan kanssa tapahtuvat reaktiot kuvaavat fosforin käyttökelpoisuutta pH:n ja maan muiden ominaisuuksien kuten savespitoisuuden suhteen.

3.2.2 Suositellut käyttökelpoisen fosforin määrittämenetelmät

Fosforin liukoisuus yhdellä uutolla

Fosforin liukoisuus 1:5 vesiuttoon aliarvioi kasville käyttökelpoisen osuuden (mm. Kapuinen ym. 2010), mutta vesiuttojen avulla voidaan kuitenkin määrittää helppoliukoinen osa, joka on alttiina huuhtoumiselle sekä helposti kasvien käytettävissä. Fosforin käyttökelpoisuuden tarkempaan kuvaukseen tarvitaan fraktiointia (Salo ym. 2012), josta voidaan johtaa käyttökelpoinen osuus kokonaisfosforista.

Periaate

Menetelmä kuvaa lannoitevalmisteen helppoliukoisen fosforin pitoisuuden kahdella eri uuttosuhteella. Fosfori uutuu yleensä heikosti pelkkään veteen ellei tutkittava näyte ole valmiiksi nestemäinen. Fosforin vesiliukoisuus kuvaakin ennen kaikkea fosforin riskiä huuhtoutua valumavesien mukana eikä kasville käyttökelpoista fosforia. Menetelmä perustuu 1:5 vesiuton osalta EN 13652-standardiin, jota voidaan käyttää myös muutamien poikkeuksien 1:60 vesiuton pohjana. Fosforimääritykset voidaan tehdä samoista uuttoista kuin liukoisen typen määrityksetkin.

1:5 vesiutto

Uutteen valmistus kuten liukoisen typen määrityksessä (3.1.2).

1:60 vesiutto

Uutteen valmistus kuten liukoisen typen määrityksessä (3.1.2).

Fosfaattifosforin määrittäminen

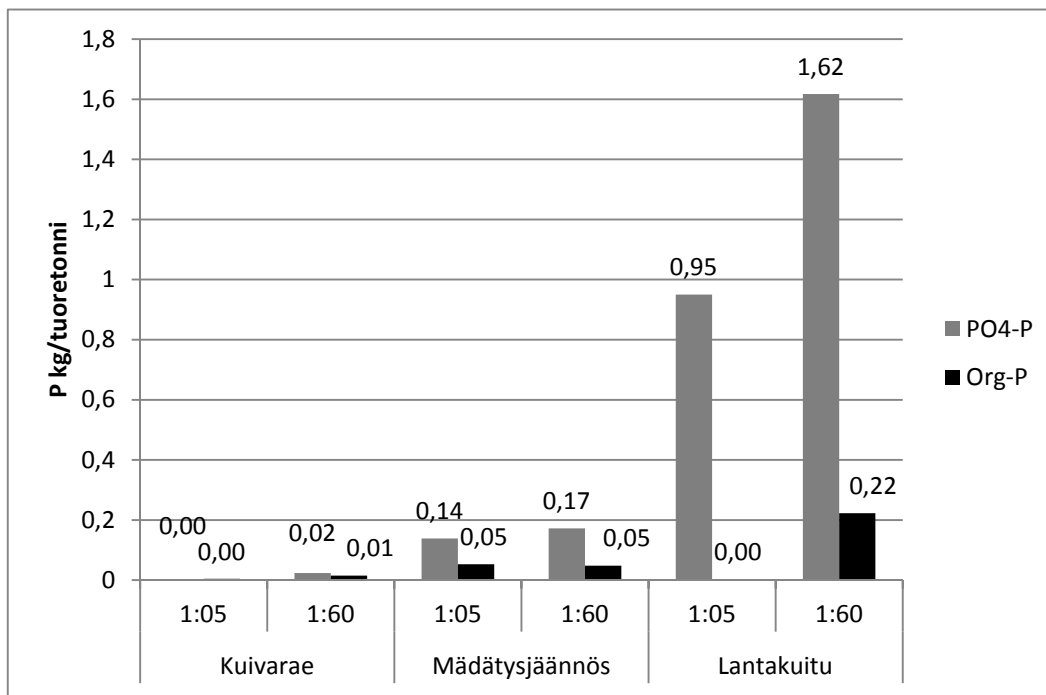
Suodoksen fosfaattifosforin pitoisuus määritetään vesikemian menetelmin, jotta saavutetaan riittävä analyysitarkkuus. Suodosta voidaan säilyttää muutamia päiviä jääkaappilämpötilassa, mutta pidempiaikaista varastointia varten näyte on pakastettava.

Liukoisen orgaanisen fosforin määrittäminen

Suodoksen sisältämän liukoisen orgaanisen fosforin hajottaminen tehdään peroksidisulfaatti-hapetuksen (SFS-EN ISO 11905-1) avulla. Peroksidisulfaattihapetusta käytettäessä on huolehdittava näytteen riittävästä laimennuksesta jo hapetusta varten (Maher et al. 2002). Peroksidihajotuksen jälkeen näytteestä määritettävä fosfaatti kertoo koko suodoksen liukoisen fosforin pitoisuuden. Kun tästä vähennetään ennen hajotusta määritetty fosfaattifosforin pitoisuus, saadaan liukoisen orgaanisen fosforin pitoisuus.

Esimerkki liukoisen fosforin määrityksestä saatavista tuloksista

Kuivarae	PO ₄ -P mg/kg tuoretta	Liukoinen orgaaninen fosfori mg/kg tuoretta
1:5 vesiutto	0,00	0,00
1:60 vesiutto	0,02	0,01



Kuva 4. 1:5 ja 1:60 vesiuuttoisen fosforin pitoisuuksia erilaisissa lannoitevalmisteissa.

Vesiuutto irrotti kuivarakeesta hyvin vähän fosforia, vaikka materiaalin kokonaisfosforipitoisuus oli 18,67 kg/tuoretonni. Nestemäisen mädätysjännöksen kokonaisfosforipitoisuus oli 0,57 kg/tuoretonni, josta vesiuuttoon liukeni alle puolet. Lannasta peräisin olevassa kuidussa kokonaisfosforia oli 4,97 kg/tuoretonni ja tästä materiaalista 1:60 vesiuutto oli selvästi tehokkaampi liuottamaan fosforia kuin 1:5 uutto.

Sovellukset

Tässä ohjeessa suodatuksena käytetään vain suhteellisen karkeaa paperisuodatusta (huokoskoko noin 8 µm). Mittalaitteiden toimivuuden parantamiseksi fosfaattifosforin määrittämisessä imusuodatus vesianalytiikassa yleisten 0,2 tai 0,4 µm membraanisuodattimien läpi on mahdollista.

Hedleyn fraktiointi

Hedleyn fraktioinnista fosforin käyttökelpoisuuden mittarina on Suomessa hyviä kokemuksia erilaisten orgaanisten lannoitevalmisteiden ja kotieläinten lantojen osalta (Ylivainio ym. 2008, Salo ym. 2011, Ylivainio ja Kapuinen 2011, Ylivainio ja Kapuinen 2012).

Periaate

Hedleyn fraktiointi on perättäisten uuttojen sarja, jossa näytettä uutetaan 1:60 uuttosuhteella seuraavilla uuttoliuoksilla: vesi, 0,5 M natriumbikarbonaatti (NaHCO₃), 0,1 M natriumhydroksidi (NaOH) ja 1,0 M suolahappo (HCl). Maan epäorgaanisen ja orgaanisen fosforin liukoisuuteen alun perin kehitettyä fraktiointia on viime vuosina käytetty myös lannoitevalmisteiden fosforin käyttökelpoisuuden arviointiin. Vesi ja NaHCO₃ uuttavat helposti liukenevat fosforyyhdisteet kuten fosfaatin, fosfolipidit, DNA:n ja yksinkertaiset fosfaattimonoesterit, jotka liikkuvat maassa ja ovat kasveille käyttökelpoisia. NaOH ja HCl uuttavat heikkoliukoisia fosforyyhdisteitä kuten fytiinihappoa, jotka sitoutuvat maahan voimakkaasti ja ovat heikosti kasveille käyttökelpoisia (Toor ym. 2005).

Vesiuutto

Sentrifugiputkeen punnitaan 1,0 g:n kuivaa hienoksi jauhettua maata vastaava massa ja lisätään 60 ml vettä. Sekoitetaan 4 h. Sentrifugoidaan 15 min 3000 g. Uutteesta suodatetaan puolet 0,2 µm suodattimen läpi epäorgaanisen fosforin määrittystä varten. Suodattamaton uute käytetään liukoisen kokonaisfosforin määrittämiseen.

Sentrifugiputkeen, jossa sakka on, lisätään 60 ml vettä. Sekoitetaan 16 h ja toistetaan ensimmäisen vesiuuton työvaiheet.

Bikarbonaattiuutto

Vesiuuttojen jälkeen sentrifugiputkeen lisätään 60 ml 0,5 M NaHCO₃ (pH 8,5). Sekoitetaan 16 h, sentrifugoidaan ja suodatetaan kuten vesiuuton kohdalla.

NaOH-uutto

Bikarbonaattiuuton jälkeen sentrifugiputkeen lisätään 60 ml 0,1 M NaOH. Sekoitetaan 16 h, sentrifugoidaan ja suodatetaan kuten edellä.

HCl-uutto

NaOH-uuton jälkeen sentrifugiputkeen lisätään 60 ml 1,0 M HCl. Sekoitetaan 16 h, sentrifugoidaan ja suodatetaan kuten edellä.

Fosfaattifosforin määrittäminen

Suodoksen fosfaattifosforin pitoisuus määritetään vesikemian menetelmin, jotta saavutetaan riittävä analyysitarkkuus. Suodosta voidaan säilyttää muutamia päiviä jääkaappilämpötilassa, mutta pidempiaikaista varastointia varten näyte on pakastettava.

Liukoisen orgaanisen fosforin määrittäminen

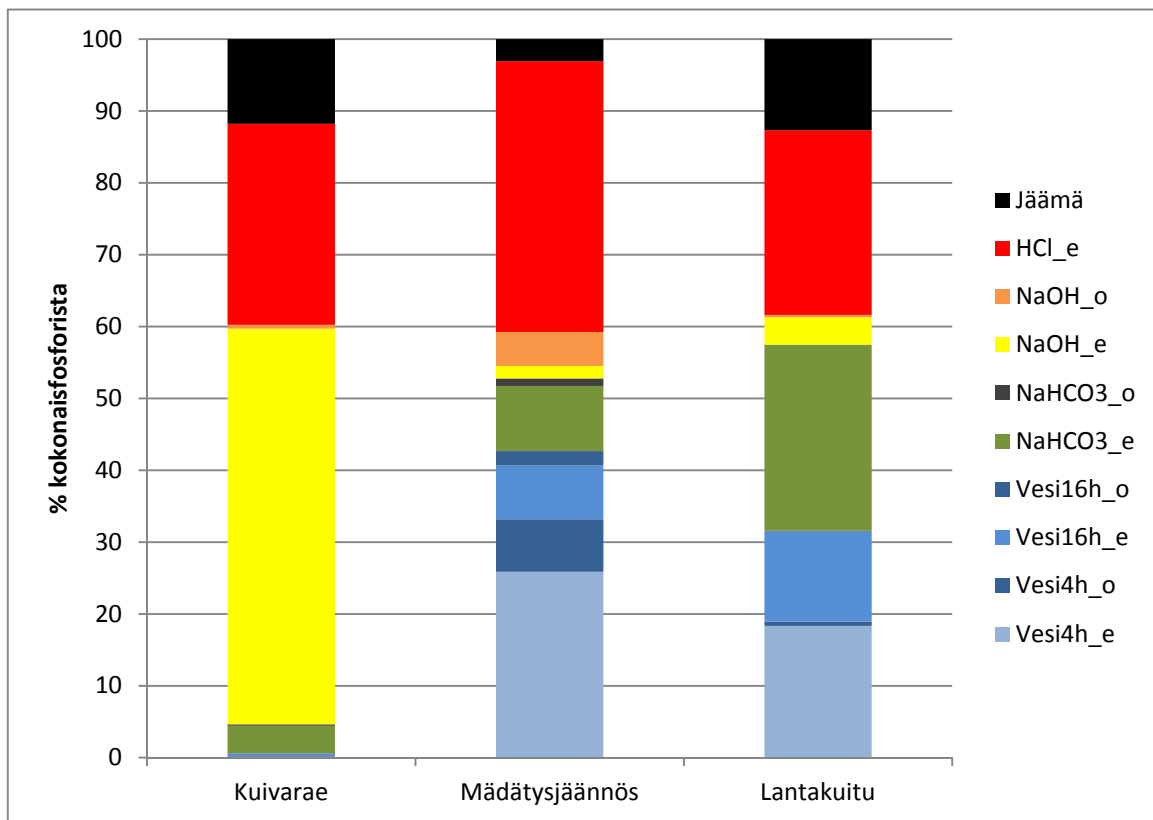
Suodoksen sisältämän liukoisen orgaanisen fosforin hajottaminen tehdään peroksidisulfaatti-hapetuksen (SFS-EN ISO 11905-1) avulla. Peroksidisulfaattihapetusta käytettäessä on huolehdittava näytteen riittävästä laimennuksesta jo hapetusta varten (Maher et al. 2002). Peroksidisulfaattihajotuksen jälkeen näytteestä määritettävä fosfaatti kertoo koko suodoksen liukoisen fosforin pitoisuuden. Kun tästä vähennetään ennen hajotusta määritetty fosfaattifosforin pitoisuus, saadaan liukoisen orgaanisen fosforin pitoisuus.

Esimerkki Hedleyn fraktioinnissa saatavista tuloksista:

Kuivarae	PO ₄ -P (e) mg/kg ka.	Liukoinen orgaaninen fosfori (o) mg/kg ka.
vesiuutto 4 h	29	18
vesiuutto 16 h	76	0
bikarbonaattiuutto	797	40
NaOH-uutto	11285	107
HCl-uutto	5732	-
Jäämä (totaali P-Hedleyn summa P)	2415	-

Sovellukset

Suolahappo-uutosta määritetään usein vain epäorgaaninen fosfori. Kuningasvesiuutolla määritetyn kokonaisfosforin ja Hedleyn fraktioinnissa saadun kokonaisfosforin erotus voidaan myös laskea, jotta havaitaan hyvin vaikealiukoisen fosforin osuus.



Kuva 5. Hedleyn fraktioiden prosentuaaliset osuudet kokonaisfosforista kolmessa lannoitevalmisteessa. Jäämä on laskettu kuningasvesiutolla määritetyn kokonaisfosfori-pitoisuuden ja Hedleyn fraktioiden kertyneen fosforin erotuksena. (e= epäorgaaninen ja o=orgaaninen fosfori)

Kuivaraeessa veteen tai natriumbikarbonaattiin uuttuvaa kasveille nopeasti käyttökelpoista fosforia on vain noin 5 %. Mädätysjäännöksen fosforista noin 50 % on liennut veteen tai natriumbikarbonaattiin. Lantakuidussa yli 50 % fosforista kuuluu kasveille helposti käyttökelpoiseksi arvioituun osuuteen. Orgaanisen fosforin pitoisuudet ovat havaittavissa vain mädätysjäännöksen vesiutoissa.

3.3 Muut ravinteet

Kokonaisravinneanalytiikka kuningasvesiuton tai typpihappouuton kautta määrittää useilla lannoitevalmisteilla muiden ravinteiden määrää ja suhteellista käyttökelpoisuutta. Kalsiumin, magnesiumin ja rikin kokonaispitoisuudet voidaan ilmoittaa maanparannusaineiden tuoteselosteessa, jos niiden pitoisuudet ylittävät MMM:n asetuksen 24/11 vähimmäispitoisuudet. Lannoitteiden osalta voidaan ilmoittaa myös vesiliukoinen sivuravinteiden pitoisuus, jos se on vähintään neljäsosa kokonaispitoisuudesta. Myös hivenravinteille (B, Co, Cu, Fe, Mn, Mo ja Zn) on määritelty vähimmäispitoisuudet, joita ylittävät pitoisuudet voidaan ilmoittaa tuoteselosteessa. Kasvualustoissa liukoisten ravinteiden uuttoon käytetään CAT-uttoa (EN 13652), jota Horisontaali-projektissa pidettiin potentiaalisena yhteisenä menetelmänä maalle, biojätteilte ja lietteille liukoisten ravinteiden määrittämiseen.

4 Biologisten vaikutusten testimenetelmät

Orgaanisten lannoitevalmisteiden mahdollista fytotoksista vaikutusta on testattu kompostien kypsyiden arviointiin kehitettyjen testien avulla (Itävaara ym. 2006, 2010; Maunuksela ym. 2012). Nämä menetelmät antavat varsin hyvän kuvan tuotteen kasvin kasvua heikentävistä vaikutuksista. Kasvun edistymiseen tai yleisen taudinkestävyuden parantumiseen liittyviä testejä on sen sijaan ollut toistaiseksi vähemmän käytettävissä.

Mikrobit voivat edistää kasvien kasvua useilla eri tavoilla. Tyypillisimpiä tapoja ovat typensidonta, ravinteiden liuottaminen, kasvin kasvuhormonien tuottaminen, kasvipatogeenien kasvun tukahduttaminen antagonististen yhdisteiden tai kilpailun avulla tai kasvin oman puolustusreaktion vahvistaminen (Gaskins ym. 1985; Van Loon 2007). Kasvien kasvua edistäviä mikrobivalmisteita tulisi testata sekä mikrobiologisen laadun että kasvien kasvua edistävien ominaisuuksien suhteen. Tuotteen pitäisi sisältää valmistajan ilmoittamat mikrobimäärät ja -lajeja/kantoja mutta ei muita mikrobeja. Tuotteen tulisi myös edistää kasvien kasvua ilmoitetulla tavalla käyttösuosituksen mukaisessa käytössä. Esimerkiksi kaupalliset mykorritsatuotteet saattavat sisältää samanaikaisesti sekä pelto- ja puutarhakasveille tarkoitettuja arbuskelimykorrhizasieniä (AMS) että kasvien kasvua edistäviä riitsosfääribakteereita (PGPR; plant growth promoting rhizobacteria). Tällaisista tuotteista tulisi testata kasvunlisäyksen lisäksi myös kohdekasvien mykorritsasienin juurikolonisaation toteutuminen.

Maanparannusaineen tai mikrobituotteen vaikutusta yleiseen kasvitautien tukahduttamiskykyyn eli tautisuppressiivisuutta voidaan testata keskeisiä maaperän kasvipatogeenia vastaan sekä kasvibiotesteillä että *in vitro*-testeillä petrialjoissa. Myös muiden testimenetelmien käyttökelpoisuutta, kuten molekyylibiologista tunnistamista tai kompostien tiettyihin biokemiallisiin ja kemiallisiin yhdisteisiin perustuvia testejä, on selvitetty. Toistaiseksi ei kuitenkaan ole pystytty tunnistamaan sellaisia avainasemassa olevia mikrobiryhmiä tai kemiallisia yhdisteitä, jotka selvästi korreloivat Suomessa tuotettujen kompostien tautisuppressiivisuuden kanssa. RHIZOCOMPOST-hankkeen (ks. Vestberg ym. 2012) intialaisessa osassa sen sijaan löydettiin osviittaa siitä että tietyt bakteerit korreloivat suppressiivisuuden kanssa.

Lavitesti-hankkeessa tavoitteena oli kartoittaa orgaanisille lannoitevalmisteille sopivia menetelmiä i) mikrobivalmisteiden mikrobiologisen laadun ja koostumuksen tutkimukseen, sekä ii) selvittää käyttökelpoisia laboratorio- ja astiakokeita tuotteiden kasvuvaikutuksen testaamiseksi (PGP-ominaisuudet). Käytössä olevia menetelmiä ja lisätutkimustarpeita arvioitiin kokeellisesti ja tutkimusryhmän asiantuntemuksen perusteella. Raporttiin on kerätty kokoelma suositeltavia ja käyttökelpoisia menetelmiä orgaanisten lannoitevalmisteiden biologisten vaikutusten testaamiseen. Useimmista menetelmistä on vielä varsin vähän käyttökokemuksia ja tuloksia erilaisten orgaanisten lannoitevalmisteiden osalta.

4.1 Mikrobiologiset testit

Orgaanisten lannoitevalmisteiden stabiilisuutta eli aerobista biologista aktiivisuutta voidaan testata hiili-dioksidin tuottoon tai hapenkulutukseen perustuvilla testeillä (Itävaara ym. 2006, 2010; Wood ym. 2009). Rottegrad-testi, joka perustuu mikrobiaktiivisuuden tuottamaan lampöön ja on laajasti käytössä kompostien kypsyystestinä, toimii myös tuotteiden stabiilisuustestinä (EN 16087-2).

Toinen mikrobipohjainen testi, jota käytetään orgaanisten lannoitevalmisteiden laadun tarkkailussa, on akuutti toksisuustesti, joka perustuu *Vibrio fisheri* -bakteerin valontuottoon (ISO 21338; Kapanen 2012).

Kaupallisista mikrobituotteista tai muista orgaanisista lannoitevalmisteista eristetyistä mikrobien puhdasviljelmistä voidaan kartoittaa mahdollisia kasvien kasvua edistäviä fysiologisia ominaisuuksia (PGP-ominaisuudet) erilaisilla malja- ja liemiviljelyihin perustuvilla menetelmillä. Lavitesti-hankkeessa tehdyn opinnäytetyön perusteella (Orasmaa 2012) fysiologisista testeistä kasvien kasvua edistävien mikrobivalmisteiden laadunvalvontaan voisivat sopia erityisesti sideroforintuottokoe (Alexander & Zuberer 1991),

fosfaatinliukoistuskoe (Mehta ja Nautiyal 2001) sekä indoli-3-etikkahapon tuottoa mittaava koe (Gordon & Weber 1951; Bano & Musarrat 2003).

Orasmaan (2012) tutkimuksessa huomattiin, että fysiologisten testien tulokset riippuvat valitusta menetelmästä, bakteerien kantakohtaisista ominaisuuksista sekä olosuhteista. On joka tapauksessa muistettava, ettei fysiologisen ominaisuuden olemassaolo vielä sinänsä takaa mikrobin kykyä edistää kasvien kasvua. Hänen mukaansa kasvikoheet ovat siis lopulta tärkein tapa selvittää bakteerien todellisia vaikutuksia kasveihin.

Mikrobituotteiden mikrobimäärän määrittämisessä voidaan käyttää mikrobiologian perusmenetelmää eli kiinteällä kasvualustalla muodostuvien pesäkkeiden lukumäärää (CFU; colony forming units). Pesäkelaskennassa oletetaan, että jokainen pesäke on lähtöisin yksittäisestä elävästä solusta. Toinen määrittäystapa liuoskasvatuksista on ns. MPN (most probable number) –menetelmä. Sitä voidaan käyttää, jos mikrobi-siirros kasvaa hitaasti tai ei muodosta luotettavasti laskettavissa olevia pesäkkeitä. MPN-menetelmä soveltuu myös esimerkiksi arbuskelimykorrhizojen (AM) elävien lisääntymisyksiköiden (propagules) määrän määrittämiseen mykorrhizasiiirroksista tai maasta (An ym. 1993). Monet mykorrhizasantuottajat ilmoittavat elävän mykorrhizan määrän tuotteessa tällä tavalla, esim. 10 lisääntymisyksikköä/ grammaa tuotetta. Tuotteesta tehdään laimennussarja, jonka laimennukset mykorrhizaa tutkittaessa ovat n. $4^{-2} - 4^{-6}$. Yhden näytteen tutkimiseen menee n. 6 viikkoa ja siihen tarvitaan n. 25-30 kasvatusruukkua, joissa kasvaa mykorrhizan kanssa symbioosin muodostavia testikasveja. Menetelmä vaatii enemmän työtunteja kuin juurikolonisaation tarkistaminen kasveista (ks. 4.3.2.). MPN-menetelmä sopii toteutuksensa puolesta rutiini-menetelmäksi, mutta juurikolonisaatiotieto on yleensä jo riittävä.

Yleisen tautisuppressiivisuuden toteamiseen on kehitetty menetelmiä, joissa varsinaista tutkittavaa maata tai lannoitevalmistetta inkuboidaan testipatogeenin kanssa petrimaljassa. Kaksoisagar-menetelmässä (Rupela ym. 2003) osoitetaan, kuinka paljon tuote sisältää pesäkkeen muodostavia mikrobeja ja kuinka suuri osuus niistä ovat suppressiivisia valitulle patogeenille. Menetelmässä valetaan ohut kerros agariala (PDA), jonka päälle sijoitetaan sopiva patogeenilaimennos (esim. *Fusarium*). Tämän jälkeen annostellaan uusi ohut kerros agariala, jonka pinnalle sijoitetaan sopivaa uutettua tuotelaimennosta. Muutaman päivän jälkeen alkaa näkyä pesäkkeitä ja siitä muutama päivä eteenpäin on *Fusarium*-sieni kasvanut läpi. Alta tuleva *Fusarium* joko kasvaa pinnan pesäkkeen yli tai muodostaa ns. halon eli kirkkaan renkaan pesäkkeen ympärille. Nämä halon muodostavat pesäkkeet ovat siis antagonistisia *in vitro* *Fusarium*-sienelle. Tällä menetelmällä voisi olla potentiaalia tuotteiden tautisuppressiivisuuden testaamiseen, mutta menetelmä vaatii vielä tutkimusta ja optimointia. Esimerkiksi testipatogeenin valinnassa on huomioitava, että vaikka menetelmä toimii *Fusarium*-sienillä, niin paljon nopeammin kasvavilla kasvipatogeenilla *Pythium*-sienillä ja *Phytophthora*-sienillä voi tulla ongelmia.

Eräs tautisuppressiivisuuden muoto on tautisienien itiöiden kehittymisen ja kasvun estyminen (ns. fungistasi) kontaktissa tutkittavaan maaperään tai tuotteeseen (Garbeva ym. 2010) olosuhteissa jotka muutoin olisivat otolliset sienien kasvuun ja itiönkehitykselle. Toinen tapa fungistasiin mittaamiselle on ns. 'Layer and surface-layer method' (De Boer et al. 1998), jossa seurataan tutkittavan tuotteen vaikutusta siirrostetun tautisienien rihmastoon kasvuun. Lisätutkimuksia tarvittaisiin fungistasiin ominaisuuden yhteydestä kasvien kasvuun ja tautitoleranssiin.

Viime vuosikymmeninä molekyylibiologiset menetelmät ovat nopeasti kehittyneet, mutta perinteiset mikrobiologiset menetelmät ovat edelleen käyttökelpoisia. Ne ovat edelleenkin ainoita menetelmiä kuvaamaan mikrobituotteiden sisältämien mikro-organismien elävyyttä tai elinvoimaisuutta. Ne ovat myös yleensä kustannustehokkaita, vaikkakin suurten sarjojen molekyylibiologisten analyysien hinnat laskevat nopeasti. Kaikilla menetelmillä on rajoituksensa ja sekä molekyylibiologisia että perinteisiä mikrobiologisia menetelmiä voidaan käyttää rinnakkain toisiaan täydentäen. Esimerkiksi puhtasviljelmien pesäkkeitä voidaan luotettavasti ja nopeasti tunnistaa DNA-sormenjälkimenetelmillä. Joidenkin mikrobituotteiden, kuten AM-sientien, tunnistamista voidaan tehdä mikroskooppisesti suoraan tuotteesta, mutta se vaatii erikoisosaamista, jota useinkaan ei ole saatavilla.

4.2 Molekyylibiologinen testaus

Molekyylibiologiset menetelmät perustuvat mikrobin nukleiinihappojen (RNA/DNA) eristämiseen ja analysointiin. Menetelmät ovat käyttökelpoisia sellaisten mikrobin tunnistamiseen, joita on vaikea eristää perinteisillä kasvatusmenetelmillä. Tulokset ovat yleensä semikvantitatiivisia osoittaen suhteellisia eroja eri näytteissä, mutta myös kvantitatiivisia menetelmiä on tarjolla. DNA-pohjaiset molekyylibiologiset menetelmät ovat suhteellisen tehokkaita käyttöä ja sopivia varmistamaan siirroksen mikrobituotteessa luvattujen mikrobin esiintymisen näytteessä. Menetelmät perustuvat DNA:n eristämiseen, monistamiseen ja tutkittavan kohdemikrobin merkkigeenien karakterisointiin tuotenäytteestä. Suurin puute DNA-pohjaisilla menetelmillä on se, että ne eivät anna tietoa mikrobin elävyydestä, sillä DNA-molekyylit ovat melko pysyviä. RNA- ja rasvahappo-pohjaiset menetelmät ovat spesifejä eläville soluille. RNA-menetelmien soveltamista rajoittaa tekniset vaatimukset, sillä RNA-molekyylit ovat erittäin epästabileja ja helposti hajoavia analyysiprosessin aikana.

Molekyylimenetelmien käyttöä voi estää muiden kuin kohdemikrobin esiintyminen tutkittavassa lannoitevalmisteissa. Mikrobituotteen 'kantomateriaali' (carrier substances) voi olla epästeriiliä (turve, komposti) ja sisältää laajan kirjon mikrobeja tai ne voivat olla kontaminaatioita tuotantoprosessista. Merkkigeenin käyttö lannoitevalmisteiden analysoinnissa on mielekästä ainoastaan silloin, jos mikrobeja käytetään tuotteen aktiivisena osana. Nukleiinihappoihin pohjautuvien menetelmien käyttöä edistäisi, jos mikrobituotteen valmistaja antaisi tiedon geenien sekvensseistä tai geenipankin tunnistenumeroista (sequences or gene bank accession numbers) siirroksen sisältämille mikrobin yleisimmille merkkigeeneille (16S rRNA-geenibakteereille ja arkeille, ja ITS-alue eukaryooteille). Tätä ei nykyisin vaadita orgaanisten lannoitevalmisteiden lainsäädännössä.

Terminaalinen katkokirjoanalyysi (Terminal restriction fragments length polymorphism (T-RFLP))

Useita mikrobiyhteisöjen analysointiin käytettyjä sormenjälki-menetelmiä on kehitetty (ks. kokoomajulkaisu Nocker ym. 2007). Jokaisella sormenjälkimenetelmällä on etunsa ja haittansa. T-RFLP –menetelmä on laajalti käytössä sen yksinkertaisuuden ja melko suuren analysointikapasiteettinsa vuoksi. T-RFLP perustuu PCR-monistuksessa monistuneen merkkigeenin sekvenssi-spesifille pilkkomiselle ja fragmenttien koon tunnistamiselle kapillaarielektroforeesin avulla. Analyysissä tunnistetaan fluoresoivalla tunnisteella leimatut merkkigeenin terminaaliset eli päätyfragmentit.

T-RFLP-menetelmää tulisi vielä optimoida mikrobituotteiden testaamiseen laboratoriotyössä ja sitä voidaan parhaiten käyttää tuotteille, jotka sisältävät vain muutamia tunnistettavia mikrobilajeja. Kohde-merkkigeenin sekvenssit tulisi olla tiedossa, jotta soveltuvin primereiden ja restriktio- eli pilkkomisentsyymien yhdistelmä voitaisiin valita tunnistamista varten. Menetelmä on semikvantitatiivinen ja antaa jonkin verran tietoa eri mikrobilajien suhteellisesta osuudesta tutkittavassa tuotteessa.

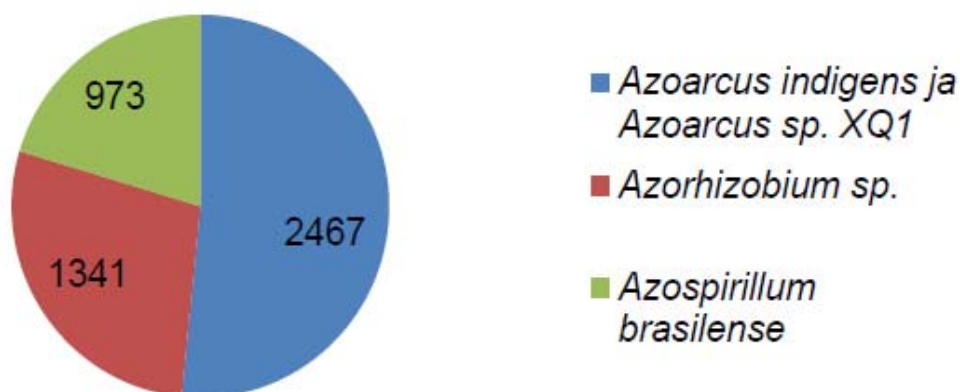
Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio (Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR))

qPCR on menetelmä, jolla voidaan monistaa ja kvantitatiivisesti määrittää mikrobituotteen mikrobeja kuvastavat kohdegeenit tuotteesta (Smith ja Osborn 2009). Kvantifiointi perustuu reaaliaikaiseen tunnistamiseen PCR-monistusreaktiossa monistuvien tuotteiden kertymisestä. Monistustuotteiden kertymisen monitorointiin on kehitetty kaksi menetelmää, joilla on eroja käytön helppouden ja tunnistamisen tarkkuuden suhteen. qPCR:n avulla on mahdollista tunnistaa eri mikrobiryhmien (bakteerit, arkit, sienet) kokonaismäärät tai tietyt kohteena olevat mikrobilajit tai toiminnot. Menetelmän huonona puolena voidaan pitää sitä, että jokaista käyttötarkoitusta tai esim. mikrobilajia varten pitää kehittää erillinen työprotokolla. Tästä syystä menetelmällä ei voida tunnistaa mahdollisia mikrobiepäpuhtauksia tuotteissa. Koska qPCR:n käyttö vaatii menetelmän perusteellista optimointia tiettyyn käyttötarkoitukseen, se soveltuu parhaiten analyysiin, joita tarvitaan usein.

454-pyrosekvensointi

Vuonna 2005 alkoi uusi aikakausi DNA-sekvensoinnissa, kun 454-pyrosekvensointi eli massiivinen samanaikainen sekvensointistrategia otettiin käyttöön (Margulies ym. 2005). Tällä hetkellä menetelmällä saavutetaan noin miljoona sekvenssiä yhden 23-tuntisen ajon aikana ja lukupituus on 800 emäsparia. Marguliesin ym. (2005) kuvaama (ks. myös Koskinen ym. 2011; Orasmaa 2012) Amplicon-sekvensointi on ollut pisimpään käytössä ja käyttötapoja kehitetään edelleen. Tätä sekvensointi-strategiaa voidaan hyödyntää metagenomiikka-tutkimuksissa ja mikrobiyhteisöjen monimuotoisuuden tutkimiseen eri ympäristöissä (ks. Simon ja Daniels 2011). Bakteereihin ja arkkeihin liittyvissä tutkimuksissa ribosomaalinen RNA-geeni (16S rDNA) on monistuksen kohde, sienten kohdalla taas ribosomaalisen operonin ITS-alue.

454-sekvensointi antaa todellisen kuvan mikrobiston monimuotoisuudesta ilman ennakkotietoa näytteen mikrobikoostumuksesta. Bakteerien ja arkkien taksonomiseen tunnistukseen on käytettävissä tietokantoja. 454-Amplicon-sekvensointia voidaan käyttää orgaanisten lannoitevalmisteiden todellisen mikrobikoostumuksen selvittämiseen.



Kuva 6. Orasmaan (2012) opinnäytetyössä TwinN –mikrobiutuotteesta eristettiin totaali-DNA ja tunnistettiin mikrobikoostumus 454 Amplicon-sekvensoinnin perusteella. Sektorit kuvaavat sekvenssien määrää.

Ligaatiotunnistusreaktio (Ligation detection reaction (LDR))

Mikrobien tunnistukseen on kehitetty useita menetelmiä. Nopeaa mikrobittunnistusta varten on ollut käytössä useita erilaisia Microarray-menetelmiä (kokoomajulkaisu ks. Bodrossy ja Sessitsch 2004). Yleensä ribosomaalista geeniä (16S rDNA) on käytetty tunnistamisessa. 16S rRNA-alueen konservatiivinen luonne on kuitenkin ollut ongelmallinen sopivien alueiden löytämiselle riittävän erotuskyvyn saavuttamiseksi. Tämän ongelman ratkaisemiseksi on kehitetty LDR-menetelmä, jota on sovellettu mikrobien tunnistamiseen (Busti ym. 2002, Hultman ym. 2011). Menetelmä mahdollistaa useiden tuhansien mikrobien samanaikaisen tunnistamisen yhden Microarrayn aikana. LDR-menetelmää voidaan käyttää lannoitevalmisteiden mikrobisisältöjen tunnistamiseen, jos tiedetään, mitä mikrobeja ollaan etsimässä.

Sienten molekyylibiologinen tunnistus on myös mahdollista, mutta tunnistusmenetelmiä ei vielä ole kehitetty yhtä pitkälle kuin 16S rRNA:han perustuvia bakteerien ja arkkien tunnistusmenetelmiä. Orgaanisista lannoitevalmisteista mykorritsatuotteiden sisältämiä AM-sienilajeja voidaan tunnistaa ainakin joissakin ulkomaisissa kaupallisissa laboratorioissa (ks. esim. symplanta.com), mutta se on toistaiseksi melko kallista, eikä siten ole suositeltava rutiinimenetelmäksi. Varmimmin AM-sienilajin tunnistus onnistuu ruukkuviljelmästä otetusta näytteestä, jossa on juuren sisäistä kolonisaatiota tai itiöitä.

4.3 Kasvibiotestit

Olemassa olevat kasvibiotesti-standardit ovat keskittyneet tuotteiden haitallisten vaikutusten osoittamiseen. Kasvitoksisuustestit soveltuvat orgaanisten lannoitevalmisteiden mahdollisten yleisten haitallisten vaikutusten monitorointiin tai suositeltujen käyttömäärien haittavaikutusten poissulkemiseen (Baumgarten ja Spiegel 2004). Testattavien tuotteiden toksisia vaikutuksia kasveille voidaan pitää yleisinä indikaattoreina tuotteen haitallisuudesta ilman että välttämättä on tarkemmin tunnistettava siementen itämistä tai kasvien kasvua haittaavaa tekijää. Kasvibiotesteistä on olemassa useita standardeja eri tarkoituksiin ja eri kestoisina. Kasvibiotestit täydentävät hyvin kemiallisten ja biologisten analyysien testikokoelmaa, jolla orgaanisten lannoitevalmisteiden laatua pyritään selvittämään (mm. Maunuksela ym. 2012).

Alla kuvataan keskeisimpiä orgaanisille lannoitevalmisteille yleisesti soveltuvia testimenetelmiä. Standardeja on ennen kaikkea kehitetty fytotoksisuustesteiksi. Orgaanisten lannoitevalmisteiden kasvua edistäviä vaikutuksia todentavia kasvibiotestejä olisi tarpeen kehittää edelleen. Tässä raportissa suosituksissa on tukeuduttu ensisijaisesti hankkeen kuluessa tehtyihin tutkimuksiin (Orasmaa 2012; Liite: Kukkonen ym. 2013), eurooppalaisen horisontaalityöryhmän yhteenvetoon fytotoksisuustestien toteutuksesta (Baumgarten ja Spiegel 2004), sekä olemassa oleviin standardeihin.

4.3.1 Lyhytkestoiset

Lyhytkestoiset muutaman päivän kestävät testit soveltuvat hyvin työkaluiksi tuotteiden eko/fytotoksikologista testausta varten. Kasvualustojen ja maanparannusaineiden, kuten kompostien, laadun varmistamisessa on käytetty krassin juuren pituus –testiä (EN 16086-2). Siinä tarkastellaan testattavan tuotteen vaikutusta krassin itämiseen ja juuriston kehittymiseen kasvun alkuvaiheessa ja tuloksia verrataan vertailunäytteeseen.

Neliönmallisiin petrimaljoihin lisätään tutkittavaa materiaalia tai materiaalin uutetta kontrolliturpeeseen. Krassin siemenet kylvetään maljalle, ja maljoja inkuboidaan ohjeiden mukaisesti 72 tunnin ajan. Sen jälkeen määritetään krassin siementen itämisen prosenttiosuus (itämisprosentti) ja juurtenpituus (mm).

4.3.2 Tavanomaiset

Tyypillisimmillään kasvibiotestit kestävät parista viikosta kuukauteen. Kasvibiotestejä on kehitetty useita, mutta ne kaikki ovat perustoteutukseltaan samankaltaisia: testikasvien siemenet kylvetään kasvatusastiassa olevaan tutkittavaan tuotteeseen tai kasvualustaan johon tuotetta lisätään, kasveja kasvatetaan kontrolloiduissa olosuhteissa määrätyn ajan ja lopuksi kasvutulosta verrataan kontrollikäsittelyyn. Eroja testien välillä on siinä, kuinka tutkittava tuote käsitellään, mitä testikasveja käytetään ja millaisia havaintoja tai mittaustuloksia testin kuluessa ja lopuksi kootaan (ks. Liitteet: Lista standardeista).

Testikasvatuksessa käytettävä kasvualusta

Kiinteässä muodossa olevat orgaaniset lannoitevalmisteet voidaan testata laimennettuna referenssimateriaalin kanssa, tai tuotteista voidaan valmistaa uutteita (laimentamatta testataan lähinnä orgaanisiin lannoitevalmisteisiin kuuluvia kasvualustoja, jotka on jätetty tämän raportin ulkopuolelle). Nestemäisessä muodossa olevia tuotteita ja mikrobituotteita on mahdollista testata nesteviljelyssä. Orasmaan (2012) opinnäytetyössä tutkitun mikrobituotteen bakteerien kykyä edistää kasvien kasvua testattiin kasvikokeessa, joka toteutettiin kasvatuspusseissa vesiviljelyinä. Kasvatuspussit osoittautuivat epäkäytännöllisiksi pienen koksensa, nopean kuivumisen ja työläytensä vuoksi. Kokemusten perusteella pussikasvatusmenetelmää ei suositella käytettäväksi kasvien kasvua edistävien mikrobivalmisteiden laadunvalvonnassa. Nesteviljelyyn verrattuna kiinteän kasvualustan käyttö kasvibiotesteissä on vaativampaa, mutta niistä saatavia tuloksia voidaan pitää relevantimpina sillä ne ovat lähempänä kasvien normaaleja kasvuolosuhteita.

Peltoviljelyyn tarkoitettujen orgaanisten lannoitevalmisteiden kasvutestien kasvualustaksi ja tuotteiden laimennusmateriaaliksi sopivat tietyt kriteerit täyttävä peltomaa (Corg<1,5-2%, hieta), OECD:n ohjeiden mukaan valmistettu keinotekoinen standardimaa (ISO 11269-2) tai kalkittu ja lannoitettu turve (EN 16086-1). Luontaisen peltomaan käyttöä haittaa tasalaatuisen maan saannin turvaaminen sekä ravinne-reservien ja biologisten ominaisuuksien vaihtelu. Standardimaa sekä turve ovat laadultaan toistettavia ja standardimaa osoittautui kotimaisissa kokeissa (Kukkonen ym. 2013; Maunuksela ym. 2012) toimivaksi

kasvualustaksi/ kontrolliksi. Luontaisten ravinnereservien puuttuminen tulee ottaa huomioon testejä suunniteltaessa.

Kasvualustan ravinnepitoisuus vaikuttaa testikasvien kasvuun oleellisesti, joten testattavista lannoitevalmisteista ravinnepitoisuudet on oltava tiedossa etukäteen. Varminta on tehdä määrittäminen ennen koetta, mutta tasalaatuisilla materiaaleilla tuoteselosteeseenkin tulisi voida luottaa. Ravinteista kasveille käyttökelpoisen typen määrä vaikuttaa eniten kasvien kasvuun ja siksi siinä ei pitäisi olla eroja vertailtavien koejäsenten välillä. Orgaaniset lannoitevalmisteet voivat sisältää vaihtelevia määriä orgaanisessa muodossa olevia eri nopeudella kasvien käyttöön vapautuvia typpiyhdisteitä. Kasvibioteistin aikana vapautuvaa typpimäärää voidaan arvioida typen mineralisaatiotestillä (ks. 3.1.2). Toinen vaihtoehto on järjestää koeasetelmaan verranteita eri liukoisen typen määrillä, jotta voidaan sulkea pois pelkkä ravinnevaikutus kasvin kasvussa. Hallitusti liukoinen mineraalilannoite (esim. Osmocote Plus) on todettu erityisen sopivaksi mykorritsan siirrostuskokeissa kevyillä alustoilla, koska ravinteiden hitaan liukenemisen ansiosta mykorritsasymbioosi toimii näissä olosuhteissa optimaalisesti (Williams ym. 1992).

Joillakin suurina määrinä käytettävillä orgaanisilla lannoitevalmisteilla voi olla vaikutusta myös kasvualustan fysikaaliseen rakenteeseen. Myös tällöin ratkaisuna voisi tarvittaessa olla kahden verranteen järjestäminen, jossa toiseen verranteeseen lisätään orgaanista ainesta (/turvetta) enemmän kuin tavanomaisessa standardimaassa.

Testikasvit ja kasveista tehtävät havainnot

Kasvibioteisteihin soveltuvia kasvilajeja on runsaasti saatavilla. Yksittäisessä testissä kasvilajin valinta voidaan tehdä testin tavoitteen, kuten tuotteen käyttökohteen, mukaisesti. Horisontaalityöryhmän yhteenvedossa (Baumgarten ja Spiegel 2004) suositeltiin, että testeissä olisi mukana ainakin yksi yksisirkkainen ja yksi kaksisirkkainen kasvilaji. Testikasvien tulisi olla yleisiä kasveja levinneisyydeltään ja lajiominaisuuksiltaan sekä riittävän herkkiä reagoimaan kasvutavallaan muutoksiin (OECD 2006). Testissä on kuitenkin hyvä olla yksi vakiotestikasvi, jotta testin kelpoisuus voidaan osoittaa sen kasvutulosten perusteella. Lavitesti-hankkeen kokeessa (Kukkonen ym. 2013) testikasveiksi valittiin yleisesti käytetyt ohra ja kiinankaali (ks. myös ISO 11269-2). Odotusten mukaisesti kiinankaali reagoi ohraa herkemmin epäedullisiin kasvuoloihin (ks. Maunuksela ym. 2012).

Testikasveista seurataan yleensä siementen itävyyttä, verson pituuden kehitystä, verson tuore- ja kuivapainoa sekä mahdollisesti juuriston kuntoa ja/tai kuiva-/tuorepainoa. Kaikkia tuloksia verrataan kontrollina eli verranteena olevien koejäsenten vastaaviin tuloksiin. Lisäksi voidaan havainnoida kasvien kehityshäiriöitä, kuten muutoksia lehtien värissä tai kasvien kunnossa. Viikoittaisella kasvin pituusseurannalla saadaan kasvunopeudessa esiintyvät erot riittävän herkästi esiin. Toisaalta pituus kertoo enemmän kasvutavasta kuin kasvin biomassan kasvusta, sillä Kukkonen ym. (2013) tutkimuksessa pituus ei juurikaan korreloinut kasvin kuiva-ainekertymän kanssa. Lehtimäärä ei ole riittävän herkkä mittari tuotteiden vaikutukselle ellei tuote vaikuta itävyyteen tai taimien kuolemiseen. Lehtiala korreloi yleensä hyvin kasvin koon kanssa, mutta lehtialan mittaaminen on ehkä liian työlästä yksinkertaiseen testiin. Lehtien klorofyllipitoisuutta mitattiin Maunukselan ym. (2012) tutkimuksessa. Kiinankaalilla tulokset useimmiten korreloivat hyvin kasvun kanssa; ohralla erot klorofyllipitoisuudessa olivat vähäisiä. Lehtien klorofyllipitoisuuden mittaamenetelmän hyödyntämisestä kasvien tilan seurantaan tulisi selvittää tarkemmin; se on yksinkertainen suorittaa, mutta vaatii asiantuntevan tulosten käsittelijän.

Testeissä on syytä käyttää riittävän suurta kasvimäärää, jotta kasviyksilöiden välinen luontainen kokovaihtelu ei häiritse tuloksia. Yleensä kasvibioteesteissä tulisi käyttää hyvälaatuisia peittaamatonta siementä. Riittävä kasviyksilöiden määrä ratkaistaan yleensä siten, että koeastioihin kylvetään jonkin verran suurempi siemenmäärä ja sirkkataimivaiheessa poistetaan ylimääräiset kasvit. Kasvihuonekokeissa lopullisen testin kasviyksilöiden määräksi on tyypillisimmin esitetty viittä kasvia (Baumgarten ja Spiegel 2004). OECD:n suositusten mukaan toistojen määrän tulisi olla riittävä käytettävälle tilastolliselle menetelmälle (esim. annos-vaste testissä min n=4 ja min siemenmäärä 20 kpl). Suurikokoisille taimille enemmän toistoja kuin pienikokoisille, sillä pieniä voidaan kylvää enemmän ruokkuun, mikä vähentää ruukkujen välistä vaihtelua. EN –standardin mukaan rinnakkaisia ruokkuja on oltava vähintään kolme ja niissä yhteensä 20 kiinankaalin siementä.

Kasvatusolosuhteet

Kasvibiotestit perustuvat testikasvien kasvattamiseen standardoiduissa olosuhteissa. Kasvupaikoiksi soveltuvat kasvihuoneet, kasvatuskaapit tai vastaavat paikat, joissa lämpötila ja valaistus sekä niiden päivä/yö –rytmi voidaan säätää ja monitoroida annettujen arvojen mukaisesti.

Kasvatusastioiden kasvualustojen kosteus pyritään pitämään tasaisena. Kastelu on useimmiten suositeltu tehtäväksi altakasteluna. Kastelun järjestämisessä tulee huomioida tasaisen kosteuden ylläpitäminen, ylikastelun välttäminen (ravinteiden huhtoutuminen) sekä mikrobituotteiden ja tautisuppressiivisuus testien osalta mikrobikontaminaation välttäminen.

Testien pituus vaihtelee testimenetelmän ja kasvien kehitysnopeuden mukaan. Harvaa fytotoksisuutta mitaavaa testiä suositellaan jatkettavaksi kauemmin kuin 21 päivää. Hidasvaikutteisten orgaanisten lannoitevalmisteiden osalta kasvin kasvua edistävä vaikutukset saattavat tulla paremmin esille pidemmässä kasvatuksessa. On kuitenkin huolehdittava, että biologisia vaikutuksia tarkasteltaessa ravinteiden saataavuus ei saa tulla kasvua rajoittavaksi tekijäksi, tai ravinteiden pitoisuudessa tapahtuvat muutokset huomioidaan kontrollikäsitelyjen avulla. Testin kesto liittyy myös testin kokonaiskustannuksiin.

Lannoitevalmisteita testataan ensisijaisesti valmistajan suosittelemassa pitoisuudessa. Testien suhteellisen lyhyen keston ja tuotteiden hidaskaikutteisuuden vuoksi voi kuitenkin olla perusteltua käyttää peltokäyttöön suositeltavia annostuksia korkeampia käyttömääriä tai useampaa pitoisuutta.

Kasvibiotestien räätälöinti testattavan ominaisuuden mukaan

Mikrobituotteet, joissa kasvin kanssa symbioosin muodostavia mikrobeja

Mikrobituotteen kasvin kasvua edistäviä vaikutuksia voidaan testata kasvibiotestillä. Testin toteutuksessa on kuitenkin huomioitava symbioosin muodostavan mikrobin erityisvaatimukset kasviin siirrostamisessa (yleensä siementen peittäminen) ja kyseisen mikrobin kanssa symbioosiin kykenevän testikasvilajin valinnassa. Tyypillisesti tällaisia kaupallisia tuotteita ovat typensidontaan kykeneviä *Rhizobium*-suvun bakteereita, jotka muodostavat juurinystyröitä palkokasvien kanssa, tai AM-mykorrhizasieniä, jotka muodostavat erityisesti kasvin fosforinottoa parantavan sienijuuren useiden kasvilajien kanssa. Jos halutaan testata mikrobituotteen ravinnehyötyä kasville, tulee testi tehdä kyseisen ravinteen osalta niukassa kasvualustassa. Usein on suositeltavaa käyttää muutamaa eri ravinnetasoa. On syytä huomioida, että tällaisilla mikrobituotteilla on usein myös muita kasvin kasvua edistäviä vaikutuksia, jotka myös tulisi huomioida testissä.

AM-mykorrhizatuotteille sopivia menetelmiä rutiinikäyttöön

Juurikolonisaation määritys biotestin kasvista. Käytetään mykorrhizatuotetta tuottajan/toimijan suositella tavalla mykorrhiza-alttiilla kasvulla. Yleisenä testikasvina voisi olla purjo tai maissi, myös ohra on mahdollinen. AM-mykorrhizat eivät kolonisoikiinankaalin tai muiden ristikkukkaisten juuria. Kasvualustan pitää olla steriloitua, esim. höyryttämällä, ja sisältää vain vähän fosforia. Kevyt, hiekkapitoinen kasvualusta on suositeltavaa. Kasvutestin pituus on esim. 6 viikkoa, jonka jälkeen määritetään (juuren valkaisu + värjäys metyyliinisellä sekä stereomikroskopointi) mykorrhizasakolonisaatio juurista. Yhden näytteen tutkimiseen tarvitaan esim. 8 ruukkuja (4 kontrolliruukkuja ja 4 ruukkuja, jossa on tutkittava tuote mukana). Voidaan suositella rutiinimenetelmäksi, koska menetelmä ei vaadi suurta erikoisosaamista eikä kalliita kemikaaleja.

Yleisen tautisuppressiivisuuden testaaminen

Maan yleisen tautisuppressiivisuuden eli tautien tukahduttamiskyvyn testaaminen on monimutkainen asia, on sillä testissä on mukana kolme biologisesti monimuotoista osaa: maa, kasvi ja mallipatogeeni. Orgaanisen lannoitevalmisteen lisääminen testiin muodostaa neljännen ulottuvuuden. Ympäristöolosuhteet tulisi vakioida niin hyvin kuin mahdollista ja niiden tulisi muistuttaa olosuhteita joissa testattavaa tuotetta käytetään. Biotestin yksinkertaistaminen esimerkiksi käyttämällä steriloitua kasvualustaa voi johtaa yliarvioon testattavan lannoitevalmisteen vaikutuksesta tautisuppressiivisuuteen. Steriili biotesti ei huomioi tautisuppressiivisuutta, jota voi esiintyä luontaisesti maatalousmaissa. Maan tautisuppressiivisuus on mo-

nimutkainen ilmiö ja sen voimakkuus saattaa vaihdella eri biotesteissä, jotka edustava erilaisia systeemejä patogeenien osalta (Termorshuizen et al. 2006). Sen vuoksi on tärkeää aina ilmoittaa millä patogeenillä, kasvilajilla ja maalajilla mahdollinen parantunut tautisuppressiivisuustulos on havaittu.

RHIZOCOMPOST-hankkeessa tutkittiin eri tyyppisten suomalaisten kompostien kykyä ehkäistä *Pythium* ja *Phytophthora*-sienten aiheuttamia tyvi- ja juuristotauteja mansikalla ja kurkulla (Vestberg ym. 2012). Kokeissa käytettiin patogeenien puhtasviljelmiä. Komposteja sekoitettiin steriloituun turvekasvualustaan suhteessa 1+4. Verranteina eli kontrolleina oli sekä steriloitua että steriloimatonta turvealustaa. Kompostien ravinnepitoisuudet vaihtelivat suuresti. Koska ravinnepitoisuus vaikuttaa myös tautien infektointikykyyn, yritettiin säätää ruukkujen ravinnemäärät samanlaisiksi. Ravinteiden säädössä ei kuitenkaan aina onnistuttu, sillä testikasveissa esiintyi joissakin komposteissa ravinnepuutosoireita lehdissä. *Pythium*- ja *Phytophthora*-mallitautien hallinnassa (sopiva infektointivoimakkuus) oli myös ongelmia. Menetelmä ei ainakaan tässä vaiheessa sovellu rutiinimenetelmäksi.

Taulukko 7. Biologisten vaikutusten testaamiseen ehdotettujen menetelmien listaus, arvio testiin kuluva ajasta, sekä työmenekistä ja kustannuksista. Testimenetelmiin kuluvan ajan arvioinnissa ei ole huomioitu työaikaa, joka kuuluu menetelmien optimointiin testattaville tuotteille.

Menetelmä	Toteutukseen kuluva aika	Työmenekki ja kustannukset	Huomioita
<u>Mikrobiologiset testit</u>			
<u>Mikrobien aktiivisuus</u>			
CO ₂ -tuotto, O ₂ -kulutus, Rottegrad-testi	Päiviä-viikkoja	Vähäinen	Laitekustannus
Akuutti toksisuustesti ('valobakteeritesti')	Päiviä	Kohtalainen	
PGP-ominaisuudet: testaus malja- tai liemiviljelmä	Päiviä	Kohtalainen	
<u>Mikrobien kokonaismäärä</u>			
Bakteerit (malja- tai liemikasvatus (CFU, MPN))	Päiviä	Kohtalainen	
AM-mykorrhitsa (MPN kasvien avulla)	Viikkoja	Suuri	
<u>Molekyylibiologinen testaus</u>			Kalliit laitteet
T-RFLP (tunnistus: muutaman mikrobin seos)	Päiviä	Kohtalainen	
qPCR (tietyn mikrobin kvantitatiivinen määrittäminen)	Päiviä	Kohtalainen	
Amplicon-sekvensointi (tunnistus: mikrobiston monimuotoisuus (bakteerit, arkit, sienet))	Päiviä	Suuri	Tilausanalyysien hinnat laskussa
LDR (nopea laajan mikrobijoukon tunnistus)	Päiviä	Suuri	
<u>Kasvibiotestit</u>			
<u>Lyhytkestoiset testit</u>			
Juuren pituuskasvu ('krassitesti')	Päiviä	Vähäinen	
<u>Tavanomaiset testit</u>			Paljon työaikaa
Vaikutukset kasvin kasvuun	Viikkoja	Kohtalainen	
Symbionttimikrobien esiintyminen testikasvissa	Viikkoja	Kohtalainen	
Tautisuppressiivisuus	Viikkoja	Suuri	

5 Kasvukauden mittaiset käytännön kokeet

Ravinteiden vaikutusta kasvien kasvuun on perinteisesti tutkittu astia- ja kenttäkokeissa. Vertaamalla lannoitevalmisteella lannoitetun kasvin kasvua ja satoa lannoitettuihin käsittelyihin saadaan selville käytetyn lannoitevalmisteen kasvuvaikutus. Kasvukauden mittaisessa kokeessa voidaan tutkia hyvin myös mikrobivalmisteita kuten tyypibakteeria tai mykorritsivalmistetta.

5.1 Kasvukauden astiakokeet

Astiakokeissa käytetään yleensä 5–10 litran astioita. Astioiden läpi valuva vesi palautetaan kasteluvetenä, jotta ravinteita ei poistu läpivalunnan seurauksena. Koemaaksi valitaan paikallista, tyypillistä peltomaata, jolla on kokeen tutkimuskysymyksiin soveltuvat ominaisuudet. Orgaanisen aineksen alhainen pitoisuus vähentää maan orgaanisen typen ja fosforin vapautumista kasvien käyttöön. Tutkittaessa fosforin käyttökelpoisuutta on maan liukoisen fosforin pitoisuuden oltava mahdollisimman alhainen. Suomalaisissa pelto-omaissa kasville käyttökelpoisen fosforin määrää kuvaa hapan ammoniumasettaattiuutto, jonka tulokset on oltava käytettävissä astiakoemaata valittaessa. Koemaan savespitoisuuden lisääntyessä maan käsiteltävyys vaikeutuu ja siksi hieta- ja hiekkapitoiset maat ovat yleisimpiä astiakokeissa. Peltolohkon viljelyhistoria, lannan ja orgaanisten lannoitevalmisteiden sekä torjunta-aineiden käyttö on syytä selvittää valittaessa paikkaa, josta astiakoemaa kerätään. Mikäli tutkittavan valmisteen vaikutusmekanismi perustuu maan luontaisten ravinnevarojen vapauttamiseen, on varmistettava käyttökelpoisten ravinnevarojen olemassaolo koemaassa.

Koemaa kerätään kyntökerroksesta tasalaatuiselta alueelta. Ennen astiakokeen perustamista koemaa seulotaan halkaisijaltaan 2–3 senttimetrin seulan läpi ja kerätty maa-erä sekoitetaan huolellisesti. Koemaaksi voidaan rakentaa myös standardimaa, jos sen katsotaan antavan etuja koejärjestelyihin.

Astiakokeen suorittaminen kesän aikana sateelta suojatussa hallissa on edullisempaa kuin kasvihuoneessa. Kasvihuoneessa on kiinnitettävä huomiota kasvukautta vastaavien olosuhteiden aikaansaamiseen. Koska astiakoehallissa ilman ja kasvualustan lämpötila ovat pelto-olosuhteita korkeammat ja kastelua annetaan tarpeen mukaan, kasvuolot ovat lähellä optimia. Myös kasvualustassa tapahtuvat biologiset reaktiot ovat selvästi peltomaata nopeammat. Astiakoe kuvaakin tutkittavan lannoitevalmisteen vaikutusta kasvin kasvuun optimaalisissa olosuhteissa.

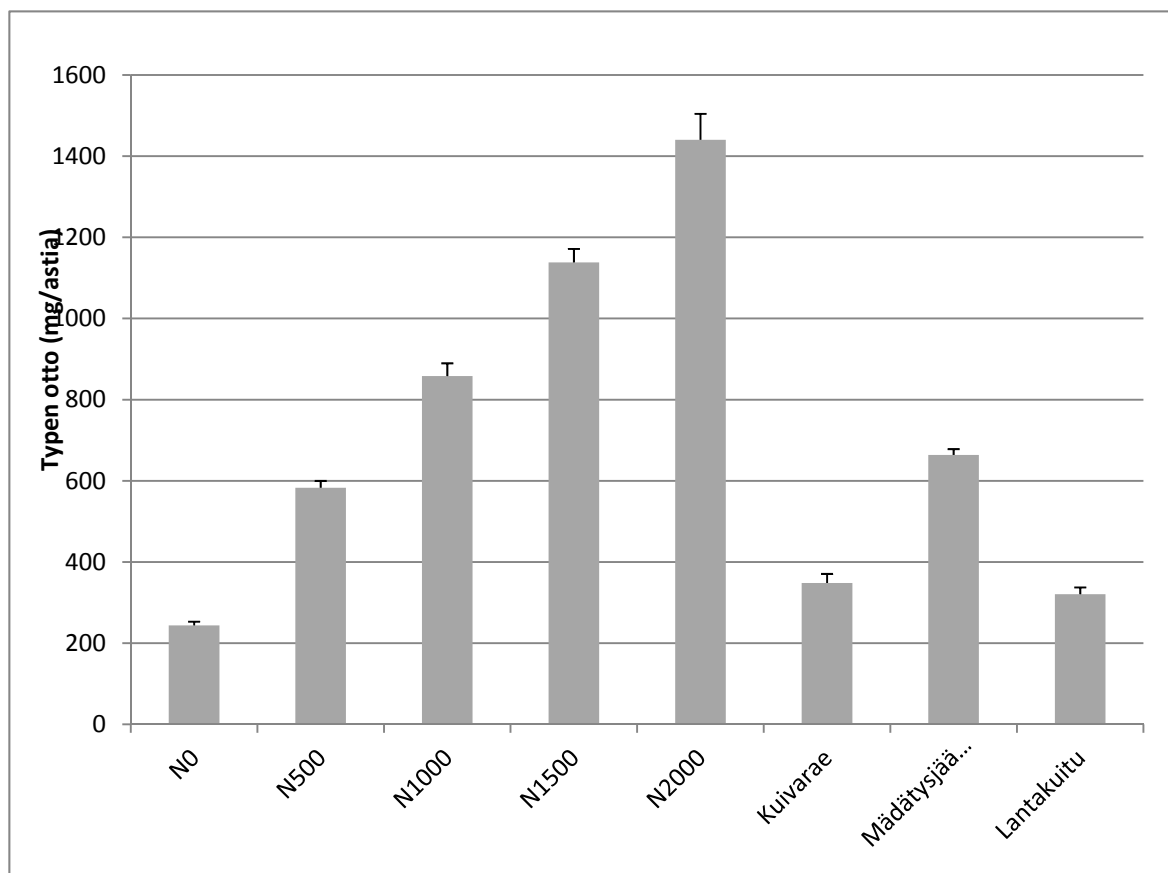
Tutkittavaa lannoitevalmistettä verrataan ravinneliuoksilla tai väkilannoitteilla lannoitettuihin käsittelyihin. Typen tai fosforin osalta laaditaan koekasville sopivat lannoitustasot, verranteet. Esimerkiksi tyypellä voidaan käyttää lannoitustasoja 0, 100, 200, 300 ja 400 mg/kg maata. Tutkittavaa lannoitevalmistettä lisätään joko yhdellä lannoitustasolla, jonka arvioidaan osuvan lannoiteverranteiden keskitasolle tai resurssien riittäessä kolmella eri lannoitustasolla. Lannoituskäsittelyjen toistoja on oltava vähintään kolme kappaletta, mieluummin 4–6 toistoa. Tutkittavien lannoitevalmisteiden ja verrannelannoituksen lisäykset sekoitetaan hyvin kasvualustaan ja samalla lisätään tarvittava määrä kalkkia pH:n säätämiseksi ja muita ravinteita, jotta vain tutkittava ravinne vaikuttaisi kasvuun. Muiden ravinteiden tason säätämistä varten koemaasta tehty viljavuusanalyysi on välttämätön.

Koekasvin kylvö on suositeltavaa tehdä lannoittamattomaan pintakerrokseen, jottei suolaväkevyys haittaa itämistä. Kasvualustat pyritään pitämään kosteina, mutta välttämään läpivaluntaa. Kokeen edetessä pieneksi jääneet koekasvit kuluttavat selvästi reheväkasvuisempia vähemmän vettä, ja kastelua on säädettävä astiakohtaisesti kasvun voimakkuuden mukaisesti.

Nurmikasveilta voidaan kasvukauden aikana korjata 3–4 satoa. Usean sadon korjaaminen kuvaa ravinteiden riittävyyttä, ja ensimmäisten satojen tasaisen tilanteen jälkeen eroja näkyy usein vasta seuraavissa sadonkorjuissa. Viljat, vihannekset ja muut vain yhden sadon tuottavat koekasvit korjataan sadon valmistuttua. Korjatuista sadoista analysoidaan ainakin tutkitun ravinteiden pitoisuudet sillä usein ravinteiden kokonaisotto kuvaa käyttökelpoisuutta paremmin kuin pelkkä satotasot.

Astiakoemaasta voidaan myös ottaa ravinnenäytteet kokeen päätyttyä. Astia täyttyy yleensä koekasvin juurista, joten juurten vaikutus saattaa sekoittaa maan ravinnepitoisuuksien tuloksia.

Tuloksissa verrataan lannoitevalmisteissa lisättyjen liukoisten ja kokonaisravinteiden tulosta liukoisilla lannoitteilla saavutettuun kasvuun ja ravinteenottoon.



Kuva 7. Kahden raiheinäsadon yhteenlaskettu typenotto typpiverranteissa ja kolmessa lannoitevalmisteissa. Lannoitevalmisteiden eri typpifraktioiden vaikutusta raiheinän typenottoon tarkastellaan taulukossa 8.

Taulukko 8. Koeastioihin lisätyt typen eri fraktiot, mitatut typenotot ja lannoitekäsittelyjen avulla lasketut eri typpifraktioiden oletetut vasteet. Typpiverranteissa lisätyn typen aikaansaama typenotto noudatti regressioyhtälöä $0,59 \times \text{Typpi-lannoitus} + 263 = \text{Typenotto}$ ($r^2=0.999$).

	Lannoitevalmisteet		
	Kuivarae	Mädätysjäännös	Lantakuitu
Lisätty mg/astia			
Kokonaistyyppi	1416	1285	1724
Liukoinen typpi	162	581	651
NH ₄ -N ja NO ₃ -N	158	376	512
	raiheinässä typpeä mg/astia		
Mitattu typenotto	348	664	321
Laskennallinen typenotto			
Kokonaistyyppi	1098	1021	1279
Liukoinen N	358	606	647
NH ₄ -N ja NO ₃ -N	356	485	565

Taulukon 8 tuloksista nähdään, että lannoitevalmisteissa lisätyn kokonaistypen avulla laskettu raiheinän typenotto oli selvästi yliarvioitu suhteessa mitattuun typenottoon. Sen sijaan 1:5 vesiuutossa määritetyn liukoisen typen määrän perusteella laskennallinen typenotto oli varsin lähellä mitattuja typenottoja.

5.2 Kenttäkokeet

Kenttäkokeissa voidaan tutkia käytännön olosuhteissa ja lähellä käytäntöä olevalle viljelytekniikalla lannoitevalmisteiden vastetta koekasvin sadonmuodostukseen. Käytännön levitystasaisuus, lannoitevalmisteen tasalaatuisuus suurissa erissä ja levitystekniikan haasteet saadaan selville vasta kenttäkokeiden mitataavassa.

Kenttäkokeiden haasteena ovat ennen kaikkea kasvukauden sää ja peltolohkojen vaihtelevuus. Säätilan poikkeaminen ”keskimääräisestä” kasvukaudesta on haasteellista tulosten tulkinnalle. Toisinaan sääolot voivat suosia lannoitevalmistetta selvästi, ja toisinaan antaa selvästi normaalia huonomman vasteen. Etenkin kasvukauden alun sää vaikuttaa orgaanisten lannoitevalmisteiden ravinteiden käyttökelpoisuuteen nopeasti kehittyvillä viljan orailla. Kenttäkokeen toistaminen vähintään kahtena ja mieluummin kolmena vuonna olisikin tarpeellista säävaihtelujen aiheuttaman tulkintaepävarmuuden vähentämiseksi.

Peltolohkojen maalajivaihtelut vaikuttavat koekasvin käytettävissä olevaan maan luontaisten ravinteiden määrään. Viljavilla lohkoilla maan ravinnevarat voivat minimoida lannoitevalmisteiden vaikutuksen. Myös peltolohkojen viljelykierto ja lannoitushistoria on otettava huomioon, kun arvioidaan peltolohkon soveltuvuutta kenttäkokeeseen.

Kenttäkokeen rakenne toteutetaan yleensä samalla periaatteella kuin astiakokeidenkin. Lannoitevalmisteiden tuottamaa kasvuvastetta verrataan lannoitetasojen tuottamaan kasvuun. Koekentän maalajin ja muidenkin kasvuolojen vaihtelun takia, kokeen jakaminen lohkoihin on yleensä välttämätöntä. Kasvukauden aikana kasvuvastetta voidaan mitata kasvuston korkeuden, lehtialaindeksin tai kasvustonäytteiden avulla. Kasvukauden aikaisista mittauksista voidaan havaita kasvueroja, jotka tasaantuvat varsinaiseen sadonkorjuuseen mennessä. Sadon määrän lisäksi sadon laadun analysointi tuottaa arvokasta tietoa lannoitevalmisteen vaikutuksesta sadon arvoon. Viljoilla hehtolitrainpoinon, valkuaispitoisuuden ja erilaisten lajitteluasteiden analysointi kertoo usein yhtä paljon lannoitevalmisteen käyttökelpoisuudesta kuin pelkkä satotason määrittäminen. Ravinneanalytiikka tutkittavan ravinteen osalta on myös tarpeen, jotta ravinteen kokonaisotto voidaan laskea.

Maanäytteiden avulla voidaan seurata tutkittavan ravinteen liukoista pitoisuutta, ja sen saatavuutta kasville. Sadonkorjuun jälkeen otettavien maanäytteiden avulla voidaan arvioida mahdollisia ympäristöön tapahtuvia ravinnehävikkejä. Maanäytteissä keskitytään usein muokkauskerrokseen (0–25 cm), koska syvempien kerrosten näytteenotto on selvästi hitaampaa. Mikäli liukoisen typen käyttömäärät ovat poikkeavan suuria, syvempien maakerrosten nitraattitypen analysointi kuvaa typen huuhtoutumisriskiä.

6 Yhteenveto

Lannoitevalmisteiden valvonnassa käytettävä 1:5 vesiuutto kuvaa typen osalta yleensä riittävän hyvin sekä ympäristökuormituksen riskiä että kasveille käyttökelpoista typpeä. Typen fraktioiden erottaminen ammonium-, nitraatti- ja liukoiseen orgaaniseen tyypeen antaa valvontamenetelmään nähden tarkemman kuvan vesiliukoisen typen kasvinravitsemusvaikutuksesta. Epäorgaaniset fraktiot (ammonium ja nitraatti) ovat suoraan kasvien käytettävissä, mutta liukoinen orgaaninen tyyppi vapautuu vasta mikrobihajotuksen jälkeen. Määrittämällä typen osuudet 1:5 uuton lisäksi tehokkaammalla 1:60 vesiuutolla havaitaan, onko ammoniumtyppeä runsaasti sitoutuneena kationinvaihtopinnoille.

Lannoitevalmisteilla, jotka sisältävät runsaasti joko liukoista tai liukenematonta orgaanista typpeä, on määritettävä typen mineralisaation vaikutus maan epäorgaaniseen tyypeen inkubaatiokokeessa. Orgaanisen aineksen hajoaminen voi joko sitoa maan epäorgaanista typpeä hajottaviin mikrobeihin tai vapauttaa sitä maahan kasvien käytettäväksi. ISO-standardissa 14238 kuvattu inkubaatio soveltuu hyvin myös lannoitevalmisteiden orgaanisen typen mineralisaation selvittämiseen.

Jos lannoitevalmiste inkubaatiokokeessa tuottaa voimakkaan typen sitoutumisen mikrobeihin tai typen vapautumisen, typen reaktioita olisi selvitettävä käytäntöä vastaavissa olosuhteissa. Astiakokeessa havaitaan, miten typen käyttökelpoisuus maassa välittyy kasvin typenottoon. Kenttäkokeessa saadaan parhaiten selville, miten esimerkiksi typen vapautumisen rytmi soveltuu viljojen nopeaan typen ottorytmiin kasvukauden alussa.

Fosforin osalta valvonnan 1:5 vesiuutto kuvaa vain helppoliukoisen, vesistöihin huuhtoutumiselle alttiin fosforin pitoisuutta. Tehokkaammalla 1:60 vesiuutolla saadaan hieman korkeampia fosforin pitoisuuksia, mutta myös tällä uutolla voidaan määrittää vain helppoliukoista fosforia. Koska fosforin yksittäiset uutot ovat hankalasti tulkittavia etenkin uuttoliuoksen pH:n vuoksi, lannoitevalmisteiden fosforin käyttökelpoisuuden arviointiin suosittelemme Hedleyn fraktiointia. Hedleyn fraktioinnista on käytettävissä jo kohtuullinen tausta-aineisto ja perättäisten uuttojen avulla fosforin liukoisuudesta saadaan parempi kuva kuin yksittäisillä uutoilla. Lannoitevalmisteilla, joilla Hedleyn fraktioinnista on vähän taustatietoa, on suositeltavaa tehdä inkubaatiokoe, jossa nähdään maan reaktioiden vaikutus fosforin liukoisuuteen. Astia- ja kenttäkokeissa lannoitevalmisteen sisältämän fosforin kasvuvaikutusta voidaan myös tutkia, kun fraktioinnin tuloksilla ei ole aikaisempia tulkintoja.

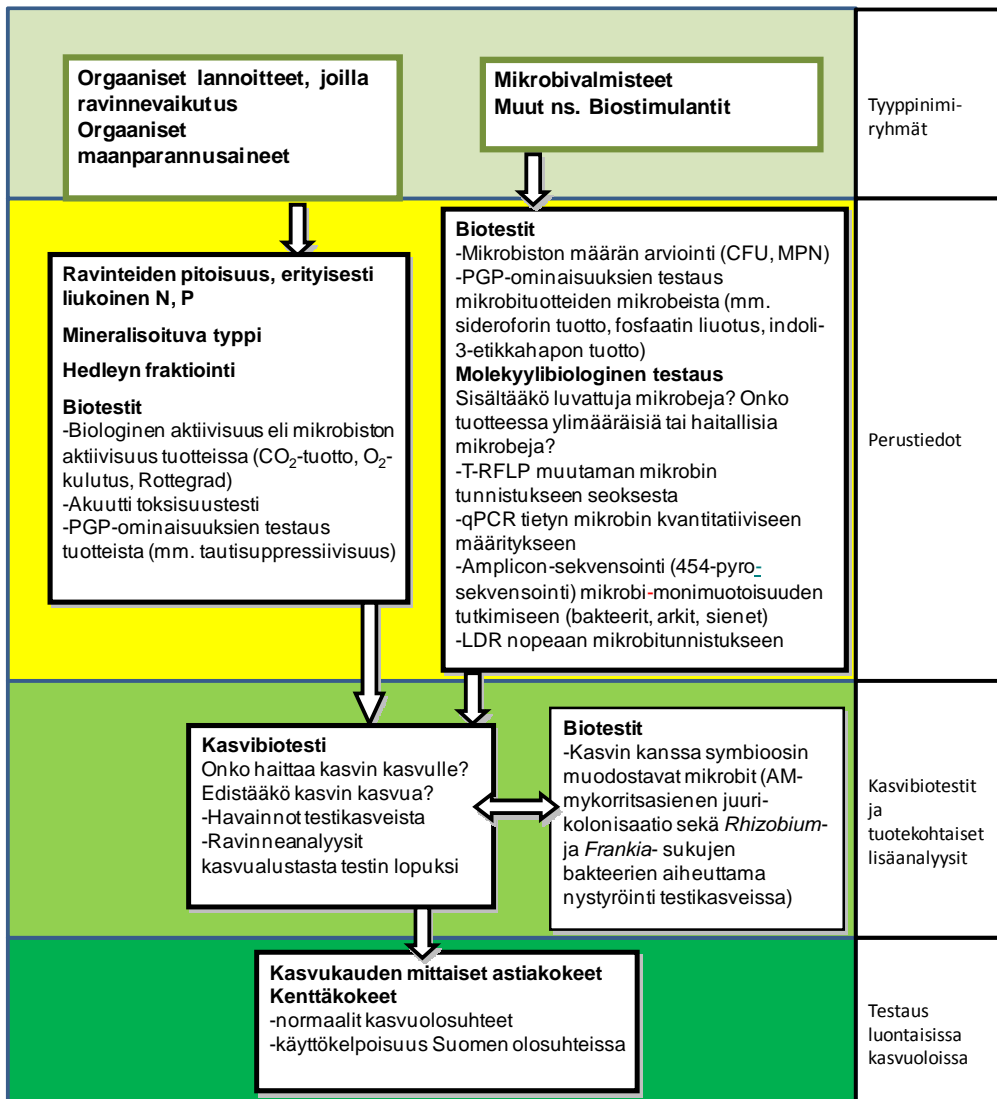
Orgaanisten lannoitevalmisteiden biologisten, erityisesti kasvin kasvua edistävien, vaikutusten testaamiseen on toistaiseksi käytössä vain vähän vakiintuneita menetelmiä tai standardeja. Kompostien stabiilisuuden mittaamiseen käytettyjä menetelmiä voidaan soveltaa myös muiden vastaavien tuotteiden testaamiseen. Tuotteiden akuuttia toksisuutta on testattu ns. valobakteeri-menetelmällä. Myös lannoitevalmisteiden fyto toksisten vaikutusten mittaamiseen on käytössä standardit. Krassin juuren pituuskasvuun perustuva testi on nopea toteuttaa ja se kuvaa hyvin eri tuotteiden fyto toksista vaikutusta. Usean viikon pituinen kasvibiotesti vähintään kahdella eri kasvilajilla kasvihuoneessa tai vastaavassa kasvatuspaikassa tarkentaa tietoa lannoitevalmisteiden fyto toksisista vaikutuksista.

Kasvibiotesti on käyttökelpoinen perustesti myös tuotteiden kasvua edistävän vaikutuksen todentamiseen. Lannoitetuotteiden vaikutusta kasvien kestävyttä lisäävien ominaisuuksien ja kasvitautien tukahduttamiskyvyn edistämiseen voidaan tarkentaa myös erilaisilla mikrobiologisilla testeillä. Fysiologisista testeistä kasvien kasvua edistävien mikrobivalmisteiden laadunvalvontaan sopivat sideroforintuottokoe, fosfaatinliukoistuskoe sekä indoli-3-etikkahapon tuottoa mittaava koe.

Molekyylibiologisia menetelmiä voidaan hyödyntää, kun halutaan selvittää kasvien kasvua edistävien mikrobivalmisteiden sisältämät mikrobimäärät ja -lajit. Sopiva menetelmä voidaan valita sen perusteella, halutaanko selvittää tietyn tai muutamien tiettyjen tunnettujen mikrobien esiintymistä tuotteessa, vai halutaanko tieto kaikista mahdollisista tuotteessa tarkoituksella tai epäpuhtautena esiintyvistä mikrobeista. Tuotteen tulee sisältää valmistajan ilmoittamat mikrobimäärät ja -lajeja/kantoja mutta ei muita mikrobeja.

Terminaalinen katkokirjomenetelmä (T-RFLP) soveltuu muutaman mikrobilajin tunnistamiseen. 454-pyrosekvensointia hyödyntävä Amplicon-sekvensointi soveltuu tuotteen kaikkien mikrobien semikvantitatiiviseen tunnistamiseen. Tietyn mikrobin tarkka kvantitatiivinen mikrobimäärä saadaan selville käyttämällä qPCD-menetelmää.

Orgaanisille lannoitevalmisteille on tarjolla useita erilaisia menetelmiä niiden ravinnevaikutuksen ja biologisen vaikutuksen selvittämiseksi. Usein päästään parhaaseen lopputulokseen yhdistämällä useita menetelmiä testipatteristoksi. Laboratorioanalyysillä selvitetään tuotteiden vaikutusmekanismeja, kasvibiotesitit soveltuvat tuotteen ja kasvin keskinäisen vaikutuksen tarkempaan tarkasteluun. Kasvukauden pituiset astiakokeet tai kenttäkokeet antavat kuvan lannoitevalmisteen käyttökelpoisuudesta luonnollisessa käytöympäristössä.



Kuva 8. Orgaanisten lannoitevalmisteiden testimenetelmät.

7 Kirjallisuus

- An, Z.-Q., Hendrix, J.W., Hershman, D.E., Ferriss, R.S. & Henson, G.T. 1993. The influence of crop rotation and soil fumigation on a mycorrhizal fungal community associated with soybean. *Mycorrhiza* 3: 171–182.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12(1): 39-45.
- Bano, N. & Musarrat, J. 2003. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current Microbiology* 46(5): 324-328.
- Baumgarten, A. & Spiegel, H. 2004. Phytotoxicity (Plant tolerance). Horizontal-8. Agency for Health and Food Safety, Vienna. 36 s. http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor8_phytotoxicity.pdf
- Bodrossy L. & Sessitsch A. 2004. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Current Opinion in Microbiology* 7:245–254.
- de Boer, W., Gunnewiek, P.J. & Woldendorp, J.W. 1998. Suppression of hyphal growth of soil-borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 138: 107-116.
- Busti, E., Bordoni, R., Castiglioni, B., Monciardini, P., Sosio, M., Donadio, S., Consolandi, C., Rossi Bernardi, L., Battaglia, C. & De Bellis, G. 2002. Bacterial discrimination by means of a universal array approach mediated by LDR (ligase detection reaction). *BMC Microbiology* 2: 27. 12 s.
- Evira 2013. Kansallinen lannoitevalmisteiden tyyppinimiluettelo. http://www.evira.fi/portal/fi/kasvit/viljely_ja_tuotanto/lannoitevalmisteet/lainsaadanto/tyyppinimiluettelo/ 14.05.2013.
- Garbeva, P., Hol, W., Termorshuizen, A.J., Kowalchuk, G.A. & de Boer, W. 2010. Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 469-477.
- Gaskins, M.H., Albrecht, S.L. & Hubbell, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 12: 99-116.
- Gordon, S.A. & Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26(1): 192-195.
- Hultman, J., Ritari, J., Romantschuk, M., Paulin, L. & Auvinen, P. 2008. Universal ligation-detection-reaction microarray applied for compost microbes. *BMC Microbiology*. 8: 237. 15 p.
- Itävaara, M., Vikman, M., Kapanen, A., Venelampi, O. & Vuorinen, A. 2006. Kompostin kypsyydestit, Menetelmäohjeet. VTT Research Notes 2351, 38 s.
- Itävaara M., Vikman M., Maunuksela L., Vuorinen, A. 2010. Maturity tests for composts - verification of a test scheme for assessing maturity. *Compost Science and Utilization* 18, 174 – 183.
- Jensen, L.S., Salo, T., Palmason, F., Breland, T.A., Henriksen, T.M., Stenberg, B., Pedersen, A., Lundström, C. & Esala, M. 2005. Influence of biochemical quality on C and N mineralisation from a broad variety of plant materials in soil. *Plant and soil* 273: 307-326.

- Kapanen, A. 2012. Ecotoxicity assessment of biodegradable plastics and sewage sludge in compost and in soil. Doctoral dissertation. VTT Science 9. 92 s.
<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37273/ecotoxic.pdf?sequence=1>
- Kapuinen, P., Salo, T. & Ylivainio, K. 2010. Orgaanisten lannoitevalmisteiden ravinteiden analysointimenetelmät suhteessa ympäristötuen ehtoihin ja ympäristölainsäädäntöön. Maataloustieteen Päivät 2010, 12.-13.1.2010, Viikki, Helsinki: esitelmät, posterit / Toim. Anneli Hopponen. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 26: 7 s. <http://www.smts.fi/jul2010/poste2010/173.pdf>
- Keeney, D.R. 1982. Nitrogen-Availability indices. *Methods of Soil Analysis. Part 2-Chemical and Microbiological Properties*. Second edition. Toim. Page, A.L., Miller, R.H. & Keeney, D.R. Agronomy no: 9: 711-733.
- Kemppainen, E. 1989. Nutrient content and fertilizer value of livestock manure with special reference to cow manure. *Annales Agriculturae Fenniae* 28, 3: *Annales Agriculturae Fenniae. Seria Agrogeologia et -chimica*, University of Helsinki, Helsinki, Diss., pp 163-284.
- Knaapi, J. 2009. Kasvi ei tuota vain kemialla. *Koneviesti* 11: 36-39.
- Kokkonen, A. & Aura, E. 2006. Maan mobilisoituvan typen testit. In: Laura Alakukku (toim.) . *Maaperän prosessit - pellon kunnon ja ympäristönhoidon perusta : MMM:n maaperätutkimusohjelman loppuraportti. Maa- ja elintarviketalous* 82: s. 95-97. .*Verkkojulkaisu päivitetty 9. 8. 2006.*
- Kokkonen, A., Esala, M., & Aura, E. 2006. Acceleration of N mineralization by release of enzymes and substrates from soil mineral particles with phosphates. *Soil biology & biochemistry* 38, 3: 504-508.
- Koskinen, K., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P. & Kankaanpää, H. 2011. Spatially differing bacterial communities in water columns of the northern Baltic Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 75(1): 99-110.
- Kukkonen, S., Vestberg, M., Palojärvi, A., Salo, T. 2013. Orgaanisten lannoitteiden ja mikrobivalmisteiden kasvuvaikutusta kuvaavan biotestin toteuttaminen. 33 s. MTT raportti 101. Liitetiedosto.
- Lannoitevalmistelaki 539/2006. Annettu Naantalissa 29. kesäkuuta 2006.
- Liegeois, E. 2012. A European legislation on biostimulants: where do we stand? The 1st World Congress on the use of Biostimulants in Agriculture. 26-29.11.2012. Presentation.
- Maher, W., Krikowa, F., Wruck, D., Louie, H., Nguyen, T. & Huang, W.Y. 2002. Determination of total phosphorus and nitrogen in turbid waters by oxidation with alkaline potassium peroxodisulfate and low pressure microwave digestion, autoclave heating or the use of closed vessels in a hot water bath: comparison with Kjeldahl digestion. *Analytica Chimica Acta* 463: 283-293.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., & Rothberg, J.M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-80.
- Maunuksela, L., Herranen, M. & Torniainen, M. 2012. Quality Assessment of Biogas Plant End Products by Plant Bioassays. *International Journal of Environmental Science and Development*. Vol. 3 (3): 305-310.
- Mehta, S. & Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43(1): 51-56.

MMM 2009. MMM työryhmämietintö 1/2009. Lannoitevalmistessektorin tulevaisuuskatsaus vuosille 2009-2013. Helsinki 2008. Maa- ja metsätalousministeriö, Työryhmämuistio mmm 2009:1. http://www.mmm.fi/attachments/5DZnbhCti/5DZni0S8G/Files/CurrentFile/trm1_2009.pdf

MMM 2011. Suomesta ravinteiden kierrätyksen mallimaa. Työryhmämuistio mmm 2011:5. http://www.mmm.fi/attachments/mmm/julkaisut/tyoryhmuistioid/newfolder_25/5xN59IPQI/trm2011_5.pdf

Nocker, A., Burr, M. & Camper, A.K. 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54: 276-289.

Orasmaa, S. 2012. Kasvien kasvua edistävien kaupallisten mikrobivalmisteiden laadunvalvontamenettelyn kehittäminen. Maisterintutkielma. Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos. 99 s. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/34874/Saila_Orasmaa_Gradu.pdf?sequence=1

Reku, J. 2009. Ruuan ravinteet eivät päädy takaisin peltoon—kenen on syy? *Maaseudun tulevaisuus* 30.10.2009. s. 13.

Rupela, O.P., Gopalakrishnan, S., Krajewski, M. & Sriveni, M. 2003. A novel method for the identification and enumeration of microorganisms with potential for suppressing fungal plant pathogens. *Biology and Fertility of Soils* 39:131–134.

Salo, T., Ylivainio, K., Partanen, K., Rinne, M. Nousiainen, J., Kapuinen, P., Esala, M., Peltonen, S. & Valaja, J. 2011. Lannan lannoituskäytön kehittäminen ja ravinteiden tehokas käyttö. Julkaisussa: Lannan kestävä hyödyntäminen. Toim: Luostarinen, S., Logren, J., Lehtonen, H., Paavola, T., Rankinen, K., Rintala, J., Salo, T., Ylivainio, K. & Järvenpää, M. MTT Raportti 21: 17–40.

Salo, T., Kapuinen, P. & Tontti, T. 2012. Testimenetelmät uusien orgaanisten lannoitevalmisteiden lannoitusvaikutuksen määrittämiseen. Maataloustieteen Päivät 2012, 10.-11.1.2012 Viikki, Helsinki : esitelmät, posterit / Toim. Nina Schulman ja Heini Kauppinen. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 28: 5 s. http://www.smts.fi/Vaihtoehtoja%20vakilannoitteille/Salo_Testimenetelmat.pdf

Sharpley, A.N. & Moyer, B. 2000. Phosphorus forms in manure and compost and their release during simulated rainfall. *Journal of Environmental Quality* 29:1462–1469.

Simon, C. & Daniels, R. 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied Environmental Microbiology* 77: 1153-61.

Sims, J. T., Saylor, W. W., Malone, G. W., & Lavahun, M. F. 2000. Assessing the Use of Phytase Enzyme Supplements and High Available Phosphorus Corn to Improve Poultry Performance and Environmental Quality. 64 p. Submitted to BASF, Optimum Quality Grains and Townsends Inc., University of Delaware, Newark, DE.

Smith, C.J. & Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q - PCR) - based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 6-20.

Termorshuizen, A., Van Rijn, E., Van DerGaag, D., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A., Paplomatas, E., Rämert, B. & Ryckeboer, J. 2006. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2461-2477.

Toor, G. S., Peak, J. D. & Sims, J. T. 2005. Phosphorus speciation in broiler litter and turkey manure produced from modified diets. *Journal of Environmental Quality* 34: 687–697.

Toor, G.S., Hunger, S., Peak, J.D., Sims, J.T. & Sparks, D.L. 2006. Advances in the characterization of phosphorus in organic wastes: environmental and agronomic applications. *Advances in Agronomy* 89: 1–72.

Turner, B. L. & Leytem, A. B. 2004. Phosphorus compounds in sequential extracts of animal manures: Chemical speciation and a novel fractionation procedure. *Environmental Science and Technology* 38: 6101–6108.

Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119: 243-254.

Vestberg, M., Kukkonen, S., Parikka, P., Yu, D., Kurola, J., Romantschuk, M. & Setälä, H. 2012. Kompostien kyky ehkäistä kasvien maalevintäisiä tauteja – kokemuksia Suomesta. In: *Maataloustieteen Päivät 2012, 10. - 11.1.2012 Viikki, Helsinki: esitelmät, posterit / Toim. Nina Schulman ja Heini Kauppinen. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 28: 7 p.*
http://www.smts.fi/Vaihtoehtoja%20vakilannoitteille/Vestberg_Kompostien%20kyky.pdf

Williams, S.C.K., Vestberg, M., Uosukainen, M. & Dodd, J.C. 1992. Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the *post-vitro* growth of micropropagated strawberry. *Agronomie* 12: 851-857.

Wood, M., Wallace, P., Becvar, A. & Waller, P. 2009. BSI PAS 100 Update - Review of stability testing. 35 s. http://www2.wrap.org.uk/downloads/BSI_PAS_100_Update.5c8de397.6962.pdf

Ylivainio, K., Uusitalo, R. & Turtola, E. 2008. Meat bone meal and fox manure as P sources for ryegrass (*Lolium multiflorum*) grown on a limed soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 81, 3: 267-278.

Ylivainio, K. & Kapuinen, P. 2011. Effect of sewage sludges on phosphorus solubility in soil. NJF Seminar 443: Utilisation of manure and other residues as fertilizers, Falköping, Sweden, 29-30 November 2011. NJF report 7: 89–92.

Ylivainio, K. & Kapuinen, P. 2012. Jätevesilietefosforin liukoisuus maassa. *Maataloustieteen Päivät 2012, 10.-11.1.2012 Viikki, Helsinki : esitelmät, posterit / Toim. Nina Schulman ja Heini Kauppinen. Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote 28. 7 s.*

Liite 1. Standardisointiryhmät

CEN/TC 223 Soil improvers and growing media

CEN/TC 230 Water analysis

CEN/TC 292 Characterization of waste

CEN/TC 308 Characterization of sludges

CEN/TC 345 Characterization of soils

CEN/TC400 Project Committee - Horizontal standards in the fields of sludge, biowaste and soil

ISO/TC 190 Soil quality

Liite 2. Lannoitevalmisteiden analytiikkaan käytettyjä standardimenetelmiä

- EN 13654-1: 2002. Soil improvers and growing media. Determination of nitrogen. Part 1: Modified Kjeldahl method. 11 p.
- EN 13654-2: 2002. Soil improvers and growing media. Determination of nitrogen. Part 2: Dumas method. 9 p.
- EN 16087-2:2011. Soil improvers and growing media. Determination of the aerobic biological activity. Part two: Self heating test for compost.
- EN 16168:2012. Sludge, treated biowaste and soil. Determination of total nitrogen using dry combustion method. 12 p.
- EN 16169: 2012. Sludge, treated biowaste and soil. Determination of Kjeldahl nitrogen. 13 s.
- EPA, 1996. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154.
- ISO 11263: 1994. Soil quality -- Determination of phosphorus -- Spectrometric determination of phosphorus soluble in sodium hydrogen carbonate solution. 5 p.
- ISO 11269-1:2011. Soil quality. Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth.
- ISO 11269-2:2012. Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants.
- ISO 14238:2012. Soil quality -- Biological methods -- Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes. 12 p.
- ISO 14870:2001. Soil quality -- Extraction of trace elements by buffered DTPA solution. 4 p.
- ISO 21338: 2010. Water quality. Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test).
- OECD 2006. OECD guidelines for the testing of chemicals. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. 21 p.
- OECD Test Guideline 207, ISO DIS Standard 11269-2, 2010
- OECD Test Guideline 216. OECD guideline for the testing of chemicals. Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test. Adopted: 21st January 2000. 10 p.
- SFS 5505:1998. Jäteveden epäorgaanisen ja orgaanisen typen määrittäminen. Modifioitu kjeldahlmenetelmä. 4 s.
- SFS-EN ISO 11905-1: 1998. Veden typen määrittäminen. Peroksidisulfaattihapetus. Determination of nitrogen in water. Oxidation with peroxodisulfate. 23 s.
- SFS-EN 13040:2008. Maanparannusaineet ja kasvualustat. Näytteen esikäsittely kemiallisia ja fysikaalisia kokeita varten, kuiva-ainepitoisuuden, kosteuspuiteisuuden ja tiivistetyn laboratoriotilavuuspainon

määrittäminen. (Soil improvers and growing media. Sample preparation for chemical and physical tests, determination of dry matter content, moisture content and laboratory compacted bulk density). 16 s.

SFS-EN 13651:2002. Maanparannusaineet ja kasvualustat. kalsiumkloridin ja DTPA:n liuokseen (CAT) liukenevat ravinteet. (Soil improvers and growing media – Extraction of water soluble nutrients and elements.) 30 s.

SFS-EN 13652:2002. Maanparannusaineet ja kasvualustat. Vesiliukoisten ravinteiden ja alkuaineiden uut-taminen. (Soil improvers and growing media – Extraction of water soluble nutrients and elements.) 30 s.

SFS-EN 16086-1:2012. Maanparannusaineet ja kasvualustat. Kasvivasteen määrittäminen. Osa 1: Kii-nankaalin ruukkukasvatustesti. (Soil improvers and growing media. Determination of plant response. Part 1: Pot growth test with Chinese cabbage.) 46 s.

SFS-EN 16086-2:2012. Maanparannusaineet ja kasvualustat. Kasvivasteen määrittäminen. Osa 2: Krassin idätystesti petrialjalla. (Soil improvers and growing media. Determination of plant response. Part 2: Petri dish test using cress.) 29 s.

SFS-EN 25663:1994. Veden laatu. Kjeldahltypen määrittäminen. Mineralisointi seleenin läsnä ollessa. (Water quality. Determination of Kjeldahl nitrogen. Method after mineralization with selenium (ISO 5663:1984)) 11 s.

MTT TEKEE TIETEESTÄ ELINVOIMAA

MTT RAPORTTI 101

www.mtt.fi/julkaisut

MTT Raportti -verkkójulkaisusarjassa julkaistaan maatalous- ja elintarviketutkimusta sekä maatalouden ympäristötutkimusta käsitteleviä tutkimusraportteja. Lukijoille tarjotaan tietoa MTT:n kaikilta tutkimusaloilta eli biologiasta, teknologiasta ja taloudesta.

MTT, 31600 Jokioinen.

