

u.02.04

# **Mineraali- ja bioöljypohjaisten hydrauliikkaöljyjen vaikutukset hajottajaravintoverkkoon**

Enni Flykt, Tytti Sarjala, Rauni Strömmer ja  
Risto Lauhanen

PARKANON TUTKIMUSASEMA



**METSÄNTUTKIMUSLAITOKSEN TIEDONANTOJA 909, 2003**

# Mineraali- ja bioöljypohjaisten hydrauliikkaöljyjen vaikutukset hajottajaravintoverkkoon

Enni Flykt, Tytti Sarjala, Rauni Strömmer ja  
Risto Lauhanen

PARKANON TUTKIMUSASEMA

**Enni Flykt, Tytti Sarjala, Rauni Strömmer ja Risto Lauhanen.** 2003. Mineraali- ja bioöljypohjaisten hydraulikkaöljyjen vaikutukset hajottajaravintoverkkoon. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 909. 29 s. ISBN 951-40-1903-2. ISSN 0358-4283.

Metsäluonnon suojelemiseksi on kehitetty mänty- ja rypsiöljypohjaisia metsäkoneissa käytettäviä hydraulikkaöljyjä. Koska käytännön metsätyössä hydraulikkaöljyjä joutuu maaperään pieniä määriä terälaitteesta sekä suurempia määriä laitevikojen yhteydessä, ns. bioöljyjen ympäristöystävällisyys vaati lisäselvitystä. Hydraulikkaöljyjen vaikutukset voivat olla toksisia tai öljyt voivat toimia energian lähteenä riippuen eliöryhmästä. Tutkimuksessa selvitettiin annosvastekekeen avulla, lisäävätkö mineraali- ja bioöljypohjainen hydraulikkaöljy maaperän ensimmäisen asteen hajottajia eli bakteerien ja sienten biomassaa ja aktiivisuutta lisääntyneen energian kautta ja vaikuttaako muuttunut mikrobibiomassan määrä ylempiin trofiatasoihin eli sukkulamatojen, änkirimatojen, hyppyhäntäisten sekä peto- ja kuoripunkkien määriin maanäytteissä. Tavoitteena oli myös selvittää, johtavatko muutokset mikrobien toiminnassa mineralisaation vähenemiseen, joka vähentää kasveille käyttökelpoisten määrää maassa, vai lisääkö energialisäyksellä kiihdytetty mikrobiaktiivisuus typen mineralisaatiota, mikä edelleen voi parantaa puiden typpitaloutta. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin mikrobisyhteisön toiminnallisten ryhmien rakennemuutosta hiilenkäyttöprofiilia tarkastelemalla. Bioöljykäsittely lisäsi hajottajien biomassaa ja aktiivisuutta. Mineralisaation tehostuminen näkyi liukoisten typpiyhdisteiden pitoisuuden lisääntymisenä maanäytteissä. Mikrobibiomassan ja aktiivisuuden kasvu sekä liukoisten typpiyhdisteiden pitoisuuden lisääntyminen hidastui suurimmissa bioöljypitoisuuksissa. Mineraaliöljykäsittelyssä mikrobibiomassa ja aktiivisuus lisääntyivät kuten bioöljykäsittelyssä, mutta liukoisten typpiyhdisteiden määrä väheni verrattuna kontrolliin. Hiilenkäyttöprofiilin tarkastelu ei selittänyt eroja öljykäsittelyjen välillä. Sen sijaan mikrobeja laiduntavat maaperän eläimet säilyivät hengissä pienimmissä bioöljykäsittelyissä paremmin kuin mineraaliöljykäsittelyssä, jolloin energian lisäyksestä seurauksena kasvaneeseen mikrobibiomassaan sitoutuneet typpiyhdisteet vapautuivat laidunnuksen ansiosta kasveillekin saatavilla olevaan muotoon. Molemmista öljykäsittelyissä punkkien ja hyppyhäntäisten määrä väheni romahdusmaisesti riippumatta lisätyn öljyn määrästä. Erot liukoisten typpiyhdisteiden pitoisuuksissa eri öljykäsittelyjen välillä eivät näkyneet männyn taimien kasvussa. Mineraaliöljykäsittelyssä taimien neulaset kuitenkin kuivuivat, mikä saattaa johtua siitä, että mineraaliöljy peitti juuren vedenottopintaa.

**Avainsanat:** bioöljy, hajottajaravintoverkko, mikrobiaktiivisuus, mineraaliöljy, typen mineralisaatio

**Kuvat:** Enni Flykt      **Taitto:** Tuire Kilponen

**Julkaisija:** Metsäntutkimuslaitos, Parkanon tutkimusasema. Hanke 3321: Bio- ja mineraaliöljyjen ympäristö- ja terveysvaikutukset puunkorjuutyössä.

**Hyväksynyt:** vs. tutkimusjohtaja Jari Hynynen 2.12.2003

**Painopaikka:** Vammalan Kirjapaino Oy, 2003

**Tilaukset:** Metsäntutkimuslaitos, Kirjasto, PL 18, 01301 Vantaa.

Puh. 010 211 2200, faksi 010 211 2210, sähköposti: kirjasto@metla.fi

**Kirjoittajien yhteystiedot:** Enni Flykt, Metsäntutkimuslaitos, Vantaan tutkimuskeskus, PL 18, 01301 Vantaa

Tytti Sarjala, Metsäntutkimuslaitos, Parkanon tutkimusasema, Kaironientie 54, 39700 Parkano

Rauni Strömmer, Helsingin yliopisto, Ympäristöekologian laitos, Niemenkatu 73, 15140 Lahti  
Risto Lauhanen, Tuomarniemen metsäoppilaitos, Tuomarnientie 55, 63700 Ähtäri

# Sisällys

1	Johdanto .....	5
1.1	Tausta .....	5
1.2	Maaperän ravintoverkon dynamiikka .....	5
1.3	Hypoteesit .....	6
2	Aineisto ja menetelmät .....	8
2.1	Annosvastekoe .....	8
2.2	Maan fysikaalis-kemialliset muuttujat .....	9
2.3	Mikrobit .....	10
2.4	Mikrobien yhteisötason muutokset .....	10
2.5	Maaperän sienibiomassa ja juurten mykorritsasienet .....	11
2.6	Maaperäeläimet ja taimet .....	12
2.7	Tilastolliset analyysit.....	13
3	Tulokset .....	13
3.1	Alkutilanne ja kokeen suoritus .....	13
3.2	Maan fysikaalis-kemialliset muutokset .....	13
3.3	Mikrobit .....	16
3.4	Maan sienibiomassa ja juurten mykorritsasienet .....	17
3.5	Maaperäeläimet .....	18
3.6	Taimet .....	20
4	Tulosten tarkastelu .....	22
4.1	Öljyt vaikuttivat eri lailla maan typpipitoisuuteen .....	22
4.2	Tuottavuus ei kasvanut kaikissa trofiaryhmissä .....	24
5	Kirjallisuus .....	25

# Alkusanat

Tutkimus liittyy Metlan hankkeeseen “Bio- ja mineraaliöljyjen ympäristö- ja terveysvaikutukset puunkorjuutyössä”. Hankkeen vetäjänä toimi Risto Lauhanen. Tutkimus tehtiin Parkanon tutkimusasemalla Pro gradu-työnä yhteistyössä Helsingin yliopiston Ympäristöekologian laitoksen kanssa. Ohjaajina toimivat dos. Tytti Sarjala Metsäntutkimuslaitoksen Parkanon tutkimusasemalta sekä prof. Rauni Strömmer Helsingin yliopiston Ympäristöekologian laitokselta. Kokeen perustamisessa avusti Reetta Kolppanen Kannuksen tutkimusasemalta ja näytteiden analysoinnissa Eeva Pihlajaviita ja Juha Puranen Parkanon tutkimusasemalta.

Parkanossa, marraskuussa 2003

Enni Flykt

# 1 Johdanto

## 1.1 Tausta

Voimassa olevat kansainväliset sopimukset edellyttävät, että myös metsätaloudessa huomioidaan ympäristön ja luonnon monimuotoisuuden suojeleminen. Metsäluonnon suojelemiseksi on kehitetty mänty- ja rypsiöljypohjaisia metsäkoneissa käytettäviä hydraulikkaöljyjä. Metsäntutkimuslaitoksen vuonna 2000 suorittamaan kyselytutkimukseen vastanneista metsäkoneyrittäjistä noin 40 % käytti bioöljyä (Lauhanen ym. 2000).

Koska hydraulikkaöljyjä joutuu toimintahäiriöiden, kuten metsätyökoneen hydraulikkaletkun katkeamisen seurauksena usein maaperään, Metsäntutkimuslaitos aloitti vuonna 2000 yhteistyöprojektin (YRT) yhdessä Metsähallituksen, Koneyrittäjien liitto ry:n, Stora Enso Oyj:n, Timberjack Oy:n sekä Oulun yliopiston kemian laitoksen kanssa. Tutkimushanke oli jatkoa vuonna 1996 aloitetulle tutkimustoiminnalle. Tarkoituksena oli tutkia mineraali- ja bioöljypohjaisten hydraulikkaöljyjen biohajoavuutta (Lauhanen ym. 1999a), vaikutuksia metsäpuiden taimiin (Lauhanen ym. 1999b) sekä metsämaan hajotusravintoverkkoon (Lehtinen ym. 1999). Lehtisen ym. (1999) tutkimukset keskittyivät mineraaliöljypohjaisten hydraulikkaöljyjen vaikutuksiin, joten bioöljyjen vaikutuksista maaperän ravintoverkkoon tarvittiin lisää tietoa.

## 1.2 Maaperän ravintoverkon dynamiikka

Boreaalisen havumetsän maaperässä mikrosienet ovat bakteerejakin merkittävämpi hajottajaryhmä (Kimmins 1997, Huhta 1997). Mykorritsasienten merkitys kasvien veden ja ravinteiden saannille on hyvin suuri. Ne ovat merkittäviä myös maaperän eläinten energian lähteenä (Kjøller & Struwe 1994, Kimmins 1997). Detritusta hajottavista saprofyyttisistä mikrobeista sekä autotrofeista bakteereista, levistä ja kasvien juurista alkaa ravintoverkko, joka jatkuu aina ylimmän kuluttajatason petoihin asti (Moore ym. 1996).

Maaperän eläimet vaikuttavat hajotusprosesseihin ja ravinteiden kiertoon suoraan hienontamalla kariketta ja erittämällä ravinteita, sekoittamalla ja ilmastamalla maaperää sekä epäsuoraan vaikuttamalla mikrobisyhteisöjen rakentamiseen ja aktiivisuuteen. Vaikutukset kasveihin syntyvät ravinteiden mineralisaation ja maaperän rakenteen muutosten sekä mykorritsasienten ja kasvipatoogeenien laidunnuksen kautta (Setälä & Huhta 1991, Coûteaux & Bottner 1994, Kandeler ym. 1994, Wolters 2000, Scheu ym. 1999). Hajotustoiminnan seurauksena vapautuvat ravinteet ovat mikrobien lisäksi kasveille saatavilla. Näin ollen

maaperän eläimet vaikuttavat mikrobien kautta epäsuorasti ja usein voimakkaasti kasvien kasvuun ja kehitykseen (Setälä & Huhta 1991, Setälä 1995, Moore ym. 1996, Mikola 1998, Scheu ym. 1999).

Trofiatasojen dynamiikkaa käsittelevien mallien mukaan eri trofiatasoilla olevien organismien biomassaa säätelee ravintoverkkoon tulevan energian määrä. Kun trofiatason biomassa ja monimuotoisuus riippuu alempien trofiatasojen biomassasta, puhutaan resurssilähtöisestä säätelystä. Saalistuksen säätelössä systeemissä trofiatasoja säätelee merkittävämmiin saalistus kuin saatavilla olevan ravinnon määrä. Vaikka kokeellisesti näin on voitu osoittaa (Oksanen 1981, Hunter & Price 1992), luonnossa säätelyvoimat vaikuttavat yhdessä eikä niiden vaikutuksia voi aina erottaa toisistaan. Maaperän ravintoverkkojen säätelyn kuitenkin yleisesti katsotaan olevan resurssilähtöistä (Bengtsson ym. 1996, Jürgens & Sala 2000).

### 1.3 Hypoteesit

Antropogeenisistä lähteistä maahan joutunut öljy voi toimia ravinteiden ja energian lähteenä mikrobeille. Kaikki mikrobit eivät kykene hyödyntämään öljyjen sisältämiä energiapitoisia yhdisteitä tai ravinteita, minkä vuoksi mikrobien lajistollinen rakenne ja monimuotoisuus yleensä vähenee. Selvinneiden mikrobipopulaatioiden vastustuskyky on voimistunut ja ne pystyvät hyödyntämään erilaisia substraatteja kuin aikaisemmin (Lindstrom ym. 1999, Nyman 1999).

Muutokset mikrobien toiminnallisissa ryhmissä voivat johtaa mineralisaation vähenemiseen, mikä vähentää kasveille käyttökelpoisen tyypin määrää maassa, tai energialisäyksellä kiihdytetty mikrobiaktiivisuus voi kiihdyttää tyypin mineralisaatiota, mikä edelleen voi parantaa puiden typpitaloutta. Tutkimusten mukaan tavanomaisen öljyvahingon bioöljymäärillä ei ole vaikutusta männyn ja koivuntaimien kasvuun ja kehitykseen riippumatta siitä, tapahtuuko altistus juurien vai verson kautta (Lauhanen ym. 1999b).

Hajotustoiminnan, maapartikkeleihin adsorboitumisen, syvemmälle hapetomampiin maakerrokseen kulkeutumisen sekä haihtumisen seurauksena maan öljypitoisuus yleensä pienenee öljyonnettomuuden jälkeen (Pirhonen & Huhta 1984). Maaperän fysikaalis-kemialliset olosuhteet sekä öljyjen ominaisuudet vaikuttavat mikrobiaktiivisuuden kautta öljyjen hajotusnopeuteen. Mikrobien toimintaa hidastavia tekijöitä maaperässä ovat öljyjen sitoutuminen humusaineisiin, kylmyys sekä hapen, tyypin, fosforin tai raudan puute (Zibilske 1999, Jørgensen ym. 2000, Beeby 1993) sekä öljyjen korkea rikki- ja aromaattisten yhdisteiden pitoisuus, korkea molekyylipaino, hiilivetyjen huono liukoisuus ja surfaktanttisten aineiden pitoisuus (Beeby 1993, Faulkner & Lochmiller



2000). Hydrauliiikkaöljyt eroavat kemiallisesti raakaöljystä siten, että niiden viskositeetti on suurempi, niissä on vähemmän aromaattisia ja alisyklisiä hiilivetyjä sekä enemmän naftaleenisia ja parafiinisia hiilivetyjä (Pirhonen & Huhta 1984). Surfaktanttisten aineiden vuoksi öljyt imeytyvät humukseen paremmin kuin vesi (Faulkner & Lochmiller 2000). Mineraaliöljyjen hajoaminen maaperässä kestää 0,4–10 vuotta. Bioöljyt hajoavat nopeammin kuin mineraaliöljyt (Lauhanen ym. 1999a, Lauhanen ym. 2000, Salminen ym. 2001).

Mikäli detritusravintoverkkoihin vaikuttaa voimakkaammin resurssit kuin saastus ja resurssiperäinen energia lisääntyy, ravintoverkon eliöiden biomassa todennäköisesti kasvaa (Mikola 1998). Vaikka öljyt voisivat toimia substraattina, ne sisältävät eliöille myrkyllisiä yhdisteitä, kuten raskasmetalleja sekä pintajännitystä pienentäviä yhdisteitä, jotka vapauttavat suurimolekyylisiä lipofiilisiä saasteita kuten polykloorattuja bifenyylejä (PCB:t) ja polyaromaattisia hiilivetyjä (PAH-yhdisteet) (Laine ym. 1997). Epätäydellisessä hajoamisessa syntyvien myrkyllisten hajoamisen sivutuotteiden lisäksi mänty- tai rypsiöljypohjaisten hydrauliiikkaöljyjen lisäaineet, jotka alentavat jähmettymispistettä, estävät korroosiota, syöpymistä tai vaahtoaamista (Lämsä 1995) voivat olla eliöille myrkyllisiä.

Aikaisempien tutkimusten mukaan raskasmetalli- ja raakaöljykontaminaatiolle herkkiä eläinryhmiä ovat änkyrimadot ja mikroniveljalkaiset (Faulkner & Lochmiller 2000, Filimonova & Pokarzhevskii 2000). Mikroniveljalkaisten öljytoleranssi on hyvin matala, minkä vuoksi niitä voidaan käyttää herkkänä vaste-eliöryhmänä. Sen sijaan ympäristövaikutusten arvioimiseen niiden vaste on liian kapea eli niiden määrä ei riipu öljyaltistuksen voimakkuudesta. Hydrauliiikkaöljyillä ei ole kuitenkaan havaittu haitallisia vaikutuksia änkyrimatoihin (Pirhonen & Huhta 1984, Lehtinen ym. 1999).

Öljyt voivat kuitenkin estää eläinten kaasujenvaihtoa tukkimalla hengitystiehyen tai muodostamalla kalvon eliön pinnalle. Sukkulamadot ovat osoittaneet erinomaiseksi ryhmäksi mittaamaan öljyn vaikutuksia maaperässä, sillä kapillaarivesi suojaa sukkulamatoja öljyn välittömältä vaikutukselta, joka tuhoaa punkit ja hyppyhäntäiset (Pirhonen & Huhta 1984, Lehtinen ym. 1999).

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, lisäävätkö mineraali- ja bioöljypohjainen hydrauliiikkaöljy maaperän ensimmäisen asteen hajottajia eli bakteerien ja sienten biomassaa ja aktiivisuutta lisääntyneen energian kautta. Mittaamalla sukkulamatojen, änkyrimatojen, hyppyhäntäisten sekä peto- ja kuoripunkkien määrät maanäytteissä haettiin vastausta kysymykseen, vaikuttaako muuttunut mikrobibiomassan määrä ylempiin trofiatasoihin. Tavoitteena oli myös selvittää, johtavatko muutokset mikrobien toiminnassa mineralisaation vähenemiseen, joka vähentää kasveille käyttökelpoisten määrää maassa, vai lisääkö energialisäyksellä kiihdytetty mikrobiaktiivisuus typen mineralisaatiota, mikä edelleen voi parantaa puiden typpitaloutta. Lisäksi tavoitteena oli tutkia

mikrobisynteettisten toiminnallisten ryhmien rakennemuutosta hiilenkäyttöprofiilia tarkastelemalla.

Tutkimuksen hypoteesit olivat seuraavat:

1. Molemmat hydraulikkaöljyt lisäävät maaperän ensimmäisen asteen hajotajien biomassaa ja aktiivisuutta.
2. Sukkulamatojen määrä kasvaa ja änkyrimatojen, hyppyhäntäisten sekä peto- ja kuoripunkkien yksilömäärä vähenee molemmissa öljykäsittelyissä.
3. Kasveille käyttökelpoisen typen määrä maassa muuttuu verrattuna öljyttömiin käsittelyihin.
4. Öljyisistä maanäytteistä eristetyt mikrobit kykenevät hyödyntämään erilaisia substraatteja kuin kontrolliruukkujen mikrobit.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Annosvastekoe

Puolukkatyyppin kangasmetsästä (VT; Metsäntutkimuslaitoksen koalue, Häädetjärvi, 68°87'76''N, 32°77'20''E, 151 m mpy) kairattiin noin aarin kokoiselta alueelta 45 kpl läpimitaltaan noin 20 cm:n ja syvyydeltään noin 30 cm:n kokoista maanäytettä, 0,5–1 metrin päästä toisistaan. Maanäytteistä poistettiin sammalkerros ja varvut, jonka jälkeen maanäytteet laitettiin välittömästi ruukkuihin. Kunkin näytteenottokohdan vierestä otettiin neljästä kohdasta yhteensä noin 20 g:n painoinen rinnakkainen näyte, joka homogenoitiin ja säilöttiin tiiviisiin muovipusseihin kylmiöön (+8 °C) lähtötilanne-analyysyä varten. Kahden viikon tasaantumisaajan jälkeen jokaiseen ruukkuun istutettiin yksi yksivuotias männyn paakutaimi. Ruukut kasteltiin istutuspäivänä 200 ml:lla tislattua vettä. Taimien annettiin sopeutua ruukkuihin viikon ajan ennen kuin ne käsiteltiin koesuunnitelman mukaisilla öljymäärillä.

Öljyjä oli kahdenlaisia, bioöljy- (rypsiöljypohjainen Teboil Hydraulic ECO 46) ja mineraaliöljypohjainen (Teboil Hydraulic oil 32 S) hydraulikkaöljy. Öljyt oli otettu hakkuukoneista, joten öljyissä voi olla jäämiä koneissa olleista raskasmetalleista. Ruukut jaettiin satunnaisesti öljykäsittelyihin. Kummassakin öljykäsittelyssä oli neljä eri pitoisuutta, joissa kussakin oli viisi toistoa. Lisäksi oli viisi kontrolliruukkua. Öljyjä ruiskutettiin ruukkujen pinnalle 50 ml:n injektoriruiskulla 0 ml, 20 ml, 40 ml, 60 ml tai 80 ml öljyä, mikä vastaa 0, 1, 2, 3 ja 4 litraa neliometriä kohti. Öljypitoisuudet valittiin vastaamaan käytännössä todettuja öljyvahinkoja. Öljyastian kaatuminen vastaa kokeen pitoisuutta 2 l/m<sup>2</sup>.

Koneen hydraulikkaletkun katkeamisen seurauksena maahan joutuva öljyn määrä voi olla 100 l/ha, mikä vastaa pitoisuutta 3 l/m<sup>2</sup> (Lauhanen ym. 1999b). Muut pitoisuudet valittiin siten, että pitoisuudet kasvaisivat lineaarisesti (annosvastekoe). Ruukut laitettiin Metsäntutkimuslaitoksen Parkanon tutkimusaseman kasvihuoneeseen satunnaiseen järjestykseen arpomalla eikä järjestystä muutettu kokeen aikana.

Taimia kasteltiin 100 ml:lla tislattua vettä kolme kertaa viikossa kokeen lopettamispäivään saakka. Taimien pituudet mitattiin kerran viikossa ja niiden kuntoa seurattiin jatkuvasti. Kasvihuoneeseen asetettiin kosteusmittari kasvuolosuhteiden mittaamiseksi. Koe kesti öljyn lisäyksestä kokeen purkamiseen 56 vuorokautta.

Annosvastekokeen päätyttyä taimet irrotettiin ja ruukuissa olleet maat homogenisoitiin. Maanäytteet olivat sitä irtonaisempia, mitä enemmän niissä oli öljyä. Myös juuret olivat öljyisempiä ja irrallaan, eivätkä sidoksissa maahan. Homogenoidut maanäytteet säilöttiin muovipusseihin ja pusseja säilytettiin kylmiössä (+5 °C) kunnes niistä punnittiin kuhunkin mittaukseen tarvittava määrä näytettä.

Tutkimuksen kasvihuone- ja laboratoriotyöt sekä mikroniveljalkaisten erottelu tehtiin Metsäntutkimuslaitoksen Parkanon tutkimusasemalla. Sukkulamatojen ja änkyrimatojen erottelu, eläinten laskeminen sekä maaperähengityksen ja mikrobibiomassan mittaaminen tapahtui Helsingin yliopiston Ympäristöekologian laitoksella.

## 2.2 Maan fysikaalis-kemialliset muuttujat

Lähtötilanteen määrittämiseksi maanäytteistä mitattiin totaali P-, K- ja N-pitoisuus kuivapolttamalla ensin maat ja mittaamalla K-pitoisuudet atomiabsorptiospektrometrillä (AAS) (Varian SpectrAA-30), P-pitoisuudet spektrofotometrisesti ja kokonaistyyppi CHN-analysaattorilla. Maanäytteistä mitattiin myös pH. Maanäytteiden pH:n määrittäminen tehtiin Metsäntutkimuslaitoksen menetelmäohjeen mukaisesti vesisuspensiosta potentiometrisesti pH-mittarilla. Vesisuspensiossa maan suhde veteen oli 20 ml maata/100 ml tislattua vettä. Maan määrä mitattiin 20 ml:n mitta-astialla.

Kokeen jälkeen maasta mitattiin liukoinen NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- ja kokonaistyyppi-pitoisuus sekä pH. Noin 10 g:n näytteet uutettiin 100 ml:lla 0,5 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uutosta ravisteltiin 2 h, jonka jälkeen uutoksia suodatettiin suodatinpaperin (S&S 589<sup>3</sup>) läpi kylmiössä 12 h, jotta maanäytteistä saataisiin mahdollisimman suuri osa nesteestä talteen. Lopulta suodos imusuodatettiin 0,45 µm membraanikalvon läpi. Suodokset pakastettiin ennen FIA-analysaattoriin (FOSS) injektointia. Maanäytteistä tehtyjen suodosten analysointi tapahtui Metsäntutki-

muslaitoksen menetelmäohjeita noudattaen kolorimetrisellä menetelmällä (FIA l. Flow Injection Analysis) (Lima ym. 1999).  $K_2SO_4$ -uutteeseen liukenevan orgaanisen tyypin (DON) osuus laskettiin vähentämällä maaperän liukoisesta kokonaistyyppipitoisuudesta liukoisen ammoniumtyypin osuus.

## 2.3 Mikrobit

Mikrobibiomassan mittaamiseksi käytettiin mikrobien fysiologiaan perustuvaa SIR- tekniikkaa (substrate induced respiration) (Anderson & Domsch 1978). SIR- tekniikalla analysoidaan koko mikrobiyhteisön vaste helposti hajotettavan substraatin lisäykseen.

Hiiliyhdisteet ovat tärkein metsämaassa mikrobitoimintaa rajoittava tekijä. Maaperän mikrobeista noin 10 %:lle on saatavilla ravintoa, jolloin ne ovat aktiivisia. Kun maahan lisätään helposti käytettävää hiiltä, lepotilassa olevat mikrobit aktivoituvat ja alkavat hengittää eli niiden metabolian käynnistymisen seurauksena ilmaan vapautuu runsaasti  $CO_2$ :a (Anderson & Domsch 1978).

Maahengitys ja mikrobibiomassan määrittäminen tehtiin respirometrillä (Nordgren 1988). Mittaus perustuu alkaliabsorbtiioon eli näytteestä vapautuva  $CO_2$  absorboituu 0,6 M KOH-liuokseen, jonka sähkövastus pienenee. Laitteisto mittaa sähkövastuksen muutoksen, jonka tietokoneohjelma muuntaa  $CO_2$  määräksi tuntia kohti (Nordgren 1988).

Maanäytettä punnittiin mittauskammioon noin 5 g. Maahengitysmittauksen jälkeen (noin 48 h) maanäytteisiin lisättiin 1 ml tislattuun veteen tehtyä glukoosiliuosta (0,1 g glukoosia eli 2 % maanäytteen painosta). 4–8 h substraatin lisäyksen jälkeen kaikki mikrobisolut ovat aktivoituneet ja hengitys kasvaa tietylle tasolle. SIR -tuloksia voidaan käyttää suhteellisena mikrobibiomassan mittana (Anderson & Domsch 1978). Mittauksen ongelmana oli maahengitystason kasvaminen koko mittausjakson ajan lähes kaikissa näytteissä, joihin oli lisätty öljyä.

## 2.4 Mikrobien yhteisötason muutokset

BIOLOG® Eco MicroPlate kasvatuslevyillä (Biolog Inc., Hayward, CA) voidaan tutkia epäsuorasti heterotrofisten bakteerien yhteisötason fysiologisia muutoksia energianlähteenä olevien hiiliyhdisteiden suhteen (Garland & Mills 1991, Garland 1995, Haack ym. 1995). BIOLOG® Eco MicroPlate kasvatuslevyissä on 96 kaivoa, jotka sisältävät valmiiksi eri substraatteja hiilenlähteiksi tai vettä. Hiilenlähteitä on 31 ja jokaisesta on yhdellä kasvatuslevyllä kolme

toistoa. Substraatit on valittu siten, että ne ovat tärkeitä mikrobin aineenvaihdunnalle ja että ne edustavat hyvin yleisesti tunnettuja maaperän hiilenlähteitä.

Hiilenlähteen hyväksikäyttö johtaa mikrobihengityksen kasvuun, josta seuraa väriaineena olevan tetrazoliumin palautumaton pelkistyminen värilliseksi formazaniksi (Garland 1995). Värimuutos mitataan säännöllisin välein ja absorbanssilukemia käytetään mikrobiyhteisön hiilenkäytön indikaattorina.

BIOLOG® -mikrobien hiilenkäyttöprofiilitarkastelua varten maanäytteistä punnittiin 10 g steriloituihin pulloihin, joihin lisättiin kuhunkin 100 ml Ringerin liuosta (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, Natriumlaktaatti, N-asetyyli-1-kysteini, vastaa fysiologista NaCl-liuosta). Kymmenen minuutin ravistelun jälkeen osa liuksesta sentrifugoitiin 10 min 2300 RPM (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Supernatantti laimennettiin 1:5 Ringerin liuokseen ja laimennosta pipetoitiin 150 µl jokaiseen kaivoon Eco MicroPlate -levyille. Absorbanssit mitattiin skannerilla (Labsystems Multiscan RC) heti pipetoinnin jälkeen ensimmäisen kerran lähtötilanteen selvittämiseksi sekä sen jälkeen kerran päivässä samaan kellonaikaan kahdeksan vuorokauden ajan. Ensimmäisen mittauksen jälkeen levyjen säilytysalustalle lisättiin vettä kosteuden ylläpitämiseksi, levyt peitettiin muovilla ja inkuboitiin huoneenlämmössä.

Keskimääräinen värinkehitys eli AWCD (Average Well Color Development) laskettiin kaavalla  $(C-R)/\{[S(C-R)]/96\}$ , jossa C on samaa substraattia sisältävien kaivojen absorbanssien keskiarvo, R on veden (kontrolli) absorbanssi, S on kunkin levyn eri kaivojen absorbanssien summa ja 96 on yhden levyn kaivojen kokonaismäärä. Todellinen näytteen absorbanssi saatiin siis vähentämällä näytteen absorbanssista veden absorbanssi ja jakamalla tulos koko levyn keskimääräisellä värinkehityksellä  $\{[S(C-R)]/96\}$ , jotta eri levyjen tuloksia voidaan verrata toisiinsa. Negatiivinen tulos muutettiin nollassi.

## 2.5 Maaperän sienibiomassa ja juurten mykorritsa-sienet

Ergosteroli on sienten solukalvoon sidottu lipidiosa, joka vapautuessaan solun kuoltua häviää nopeasti maasta. Sitä voidaan käyttää elävän sienibiomassan määrän mittaamiseen maa- ja juurinäytteistä (Nylund & Wallander 1992). Eristys maasta tapahtui uuttamalla ergosteroli noin 1 g:sta tuoretta maata etanolilla ja vapauttamalla ergosteroli saippuomalla näyte 60 % KOH:lla 80° C:ssa 30 minuuttia. Tämän jälkeen uutosto suodatettiin suodatinpaperin (S&S 589<sup>3</sup>) läpi. Suodos tehtiin kaksifaasiseksi lisäämällä 3 ml vettä ja 6 ml pentaania. Ergosteroli on hydrofobinen ja hakeutuu pentaanifaasiin, joka eristetään pipetillä.

Pentaanin annettiin haihtua yön yli vetokaapissa, jonka jälkeen putket säilöttiin pakastimeen  $-20^{\circ}\text{C}$ :een.

Ergosterolin eristäminen juurista tehtiin uuttamalla noin 30 mg nestemäisessä työssä jauhettua ja kylmäkuivurissa kuivattua juurinäytettä etanolissa ja vapauttamalla ergosteroli saippuomalla näyte 60 % KOH:lla  $95^{\circ}\text{C}$ :ssa 45 minuuttia. Uutos kaadettiin koeputkiin, joihin oli lisätty 3 ml vettä. Tämän jälkeen toimittiin samoin kuin maanäytteiden uuttamisessa. Määritys perustuu ergosterolin kaksoissidoksiin, jotka absorboivat 280 nm aallonpituudella (Nylund & Wallander 1992). Pakastimessa säilytettyihin maa-utoksiin lisättiin 1 ml ja juuriuutoksiin 0,5 ml metanolia ja haudutettiin vesihautessa  $45^{\circ}\text{C}$ :ssa 20 minuuttia. Ennen näytteiden injektioimista nestekromatografiin (HPLC I. High Performance Liquid Chromatography) (Merck), näyte suodatettiin (Nylon Acrodisc, 13 mm,  $0,45\ \mu\text{m}$ ). Kustakin näytteestä tehtiin kaksi rinnakkaista määrittystä. Ajoliuoksena käytettiin 100 % metanolia.

Öljyt häiritsivät ergosterolin mittaamista, koska ergosterolin erottaminen perustuu sen kemiallisiin ominaisuuksiin lipidinä. Näin ollen näyte, joka injektoidiin nestekromatografiin, sisälsi ergosterolin lisäksi näytteen mineraali- tai bioöljyn. Ergosteroli kulkeutui kuitenkin HPLC-pylväässä nopeammin kuin mineraali- ja bioöljy, joten sen piikki tuloksissa oli selvästi erillinen ja näin ollen ergosterolipitoisuus oli mitattavissa.

## 2.6 Maaperäeläimet ja taimet

Sukkulamadot eroteltiin Sohleniuksen (1979) ja änkyrimadot O'Connorin (1962) kehittämällä tekniikoilla. Änkyrimatojen erottelussa maalla täytetty verkkokori kastettiin veteen ennen sen laittamista erottelulaitteeseen, jotta ylimääräinen mineraalimaa-aines huuhtoutuisi pois eikä häiritsisi erottelua. Eläimiä säilytettiin laskemisen aikana vedessä koeputkissa. Koeputkiin lisättiin kaksi pisaraa formaliinia ja niitä säilytettiin  $+5^{\circ}\text{C}$ :ssa, jotta näytteet säilyisivät kunnossa kunnes laskenta oli suoritettu.

Mikroniveljalkaisten erottelemiseksi rakennettiin Tullgren-tyypin erottelu-laite ja erottelu tehtiin ohjeen mukaan (Crossley & Blair 1991). Näytteistä määritettiin hyppyhäntäisten ja punkkien kokonaismäärät sekä eri punkki-ryhmien osuudet. Eläinten lukumäärät näytteissä laskettiin petrimaljoilta valomikroskoopin avulla.

Männynntaimien juurten, neulasten ja rangan kosteusprosentti määritettiin punnitsemalla 0,1–0,2 g tuoretta näytettä ja punnitsemalla näytteet uudelleen 12 tuntia kuivauksen ( $105^{\circ}\text{C}$ ) jälkeen. Loput neulaset ja juuret pakastettiin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) ravinneanalyysjä varten.

## 2.7 Tilastolliset analyysit

Maanäytteiden homogeenisuus kokeen aloitushetkellä eri öljykäsittelyihin valittujen maanäytteiden ja kontrollimaiden välillä testattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA). Lisäksi yksisuuntaisella varianssianalyysillä testattiin kosteus eri öljykäsittelyihin valittujen maanäytteiden ja kontrollimaiden välillä kokeen aloitus- ja lopetushetkellä. Öljykäsittelyjen vaikutus mitattuihin muuttujiin testattiin 2-asteen regressiolla. Tilastolliset testit tehtiin erikseen mineraaliöljy- ja bioöljykäsittelyille käyttäen kuitenkin kummassakin testauksessa samaa kontrollia. Tilastollinen testaus tehtiin SPSS -ohjelmalla (SPSS 1999).

Mikrobien hiilenkäyttöprofiilianalyysin (BIOLOG®) tulosten tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin RDA (redundancy analysis) -menetelmän avulla. RDA perustuu pääkomponenttianalyysiin (PCA), jonka avulla voidaan suoraan arvioida ympäristön muuttujien ja monimuuttuja-aineiston välisiä suhteita. Mikrobien hiilenkäyttöprofiilianalyysin tuloksista tehtiin lisäksi Monte Carlo -permutaatiotesti tilastollisen merkitsevyyden tutkimiseksi (Bossio & Scow 1998). Tilastollinen testaus tehtiin PC-Ord -ohjelmalla (McCune & Mefford 1999).

## 3 Tulokset

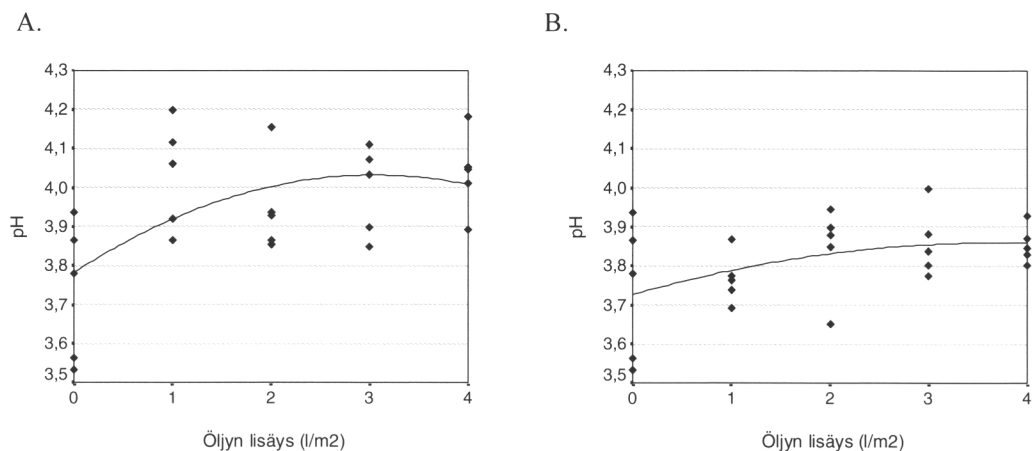
### 3.1 Alkutilanne ja kokeen suoritus

Koeyksiköihin jaetut maanäytteet olivat kokeen aloitushetkellä pH:ta ja kaliumpitoisuuksia lukuun ottamatta fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan homogeenisia. Ruukkuja kasteltiin koko kasvatusajan, joten kasvihuoneen lämpötilan noususta huolimatta maat eivät päässeet kuivumaan. Öljykäsittelyjen välillä ei ollut eroa kosteudessa, vaikka öljyisten maiden taimien juuripaakkujen huomattiin olevan kokeen purkamishetkellä kosteampia verrattaessa kontroleihin. Kuoripunkit olivat suurilukuisin punkkiryhmä maanäytteissä.

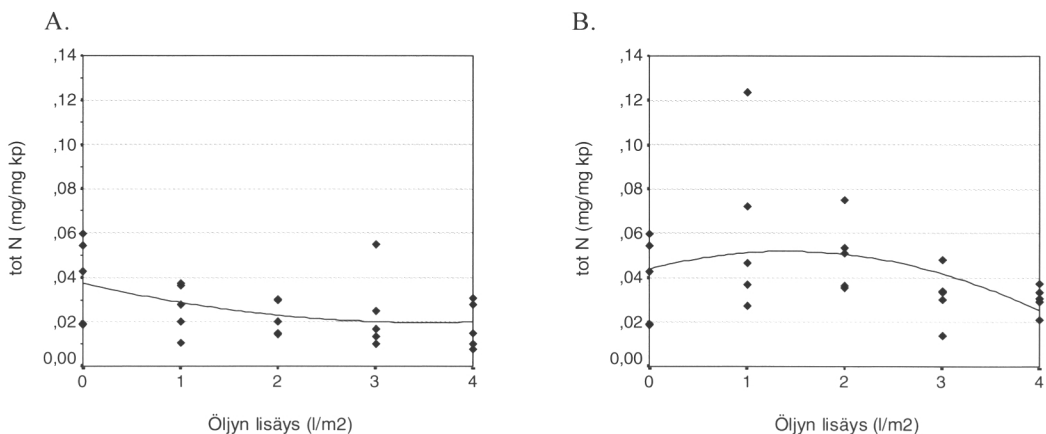
### 3.2 Maan fysikaalis-kemialliset muutokset

Maanäytteiden pH laski kokeen aikana. Mineraaliöljykäsittelyssä pH laski vähemmän kuin kontrollissa ja bioöljykäsittelyssä (kuva 1).

Bioöljykäsittelyssä pieni öljypitoisuus lisäsi liukoisen kokonaistypen pitoisuutta maaperässä, mutta pitoisuus laski öljyn määrän kasvaessa. Mineraaliöljykäsittelyssä liukoisen kokonaistypen pitoisuus laski öljyn määrän lisääntyessä (kuva 2). Öljyt vähensivät ammoniumtypen ( $\text{NH}_4^+$ ) määrää maassa molemmissa öljykäsittelyissä, joskin ammoniumtypen määrä lisääntyi pienissä bioöljypitoisuuksissa ja laski suurissa pitoisuuksissa (kuva 3). Nitraattitypeä



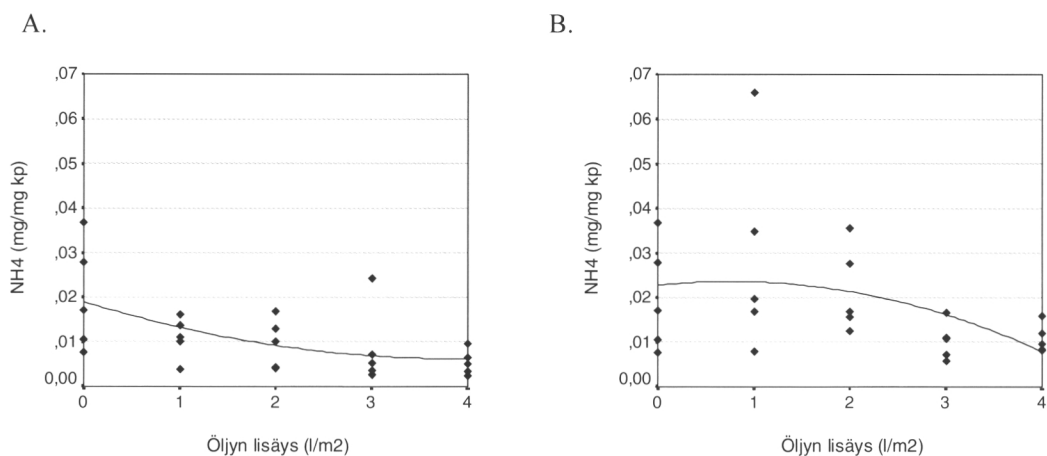
Kuva 1. Maan happamuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,3132$ ,  $F = 10,4886$ ,  $p < 0,005$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,2023$ ,  $F = 5,8329$ ,  $p < 0,025$ ).



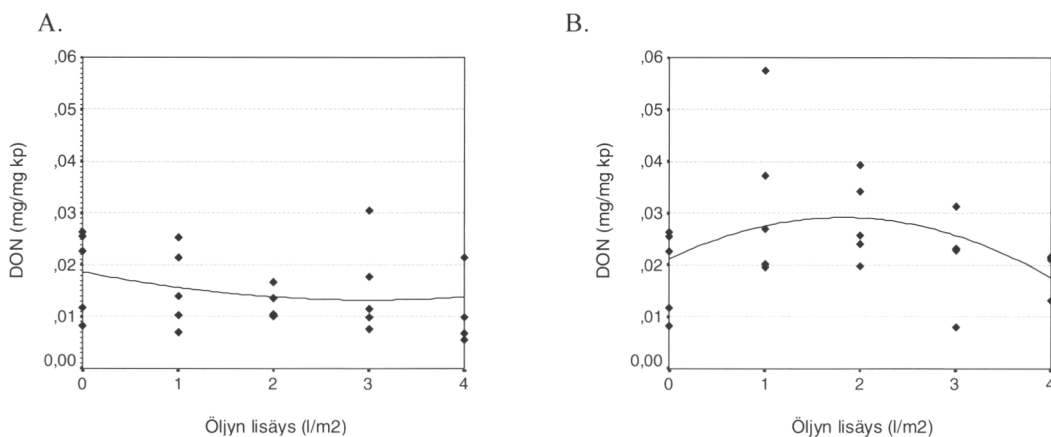
Kuva 2. Totaalityypen pitoisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,2116$ ,  $F = 6,1730$ ,  $p < 0,01$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,1716$ ,  $F = 4,7644$ ,  $p < 0,025$ ).



(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ei löytynyt näytteistä lainkaan. Kuten liukoisen kokonaistypen ja liukoisen ammoniumtypen kohdalla, myös liukoisen orgaanisen typen (DON) pitoisuus lisääntyi pienissä bioöljypitoisuuksissa, mutta laski suurissa pitoisuuksissa. Mineraaliöljykäsittely ei muuttanut liukoisen orgaanisen typen pitoisuutta maaperässä (kuva 4).



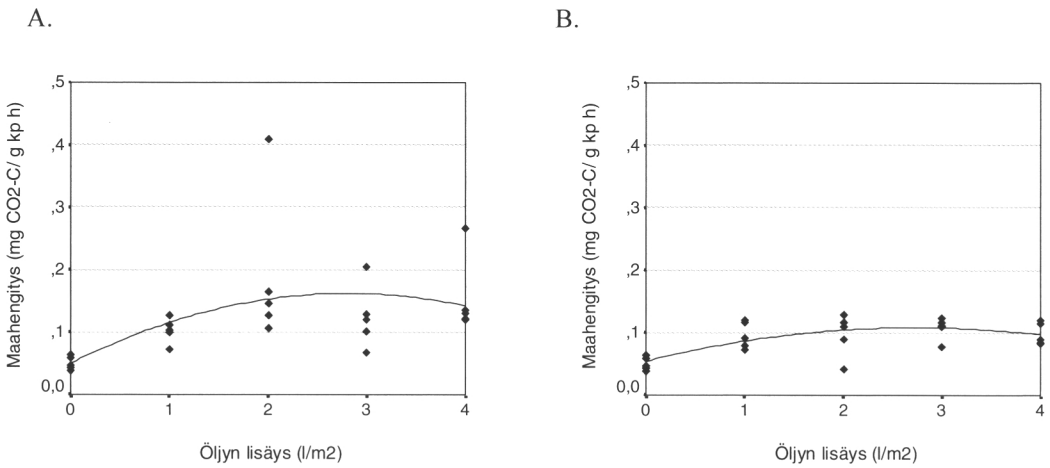
Kuva 3. Ammoniumtypen pitoisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,3134$ ,  $F = 10,4984$ ,  $p < 0,005$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,1923$ ,  $F = 5,4759$ ,  $p < 0,025$ ).



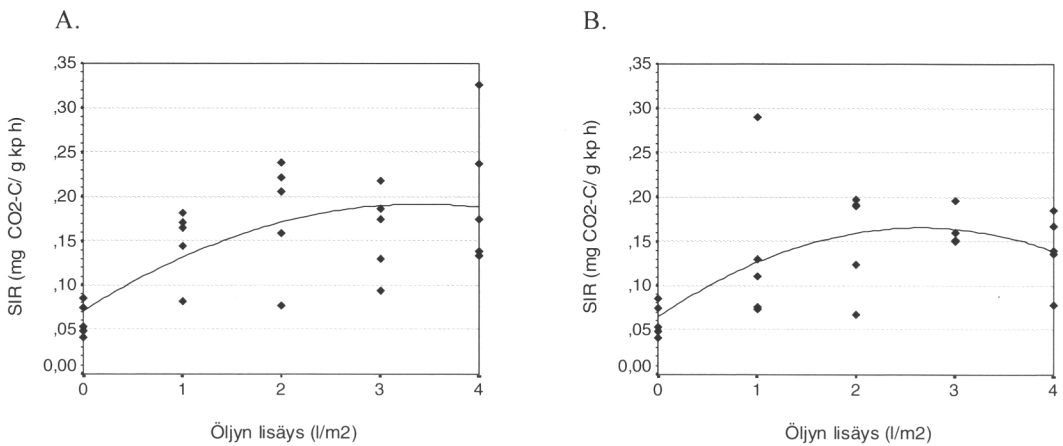
Kuva 4. Liukoisen orgaanisen typen (DON) pitoisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,0767$ ,  $F = 1,9106$ ,  $p > 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,1776$ ,  $F = 4,9669$ ,  $p < 0,05$ ).

### 3.3 Mikrobit

Öljyt lisäsivät sekä mikrobien aktiivisuutta (kuva 5) että biomassaa (kuva 6). Öljyn pitoisuudella tai laadulla ei ollut eroa. Tilastollisten testien mukaan kummallakaan öljyllä ei ollut merkitsevää vaikutusta mikrobien hiilenkäyttöprofiiliin (BIOLOG®).



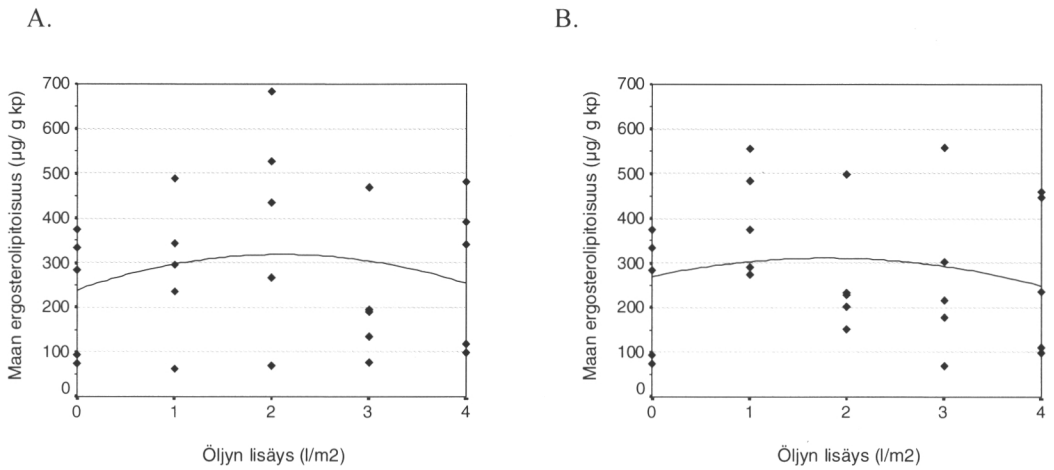
Kuva 5. Mikrobiaktiivisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,2791$ ,  $F = 8,9046$ ,  $p < 0,005$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,4781$ ,  $F = 21,0698$ ,  $p < 0,001$ ).



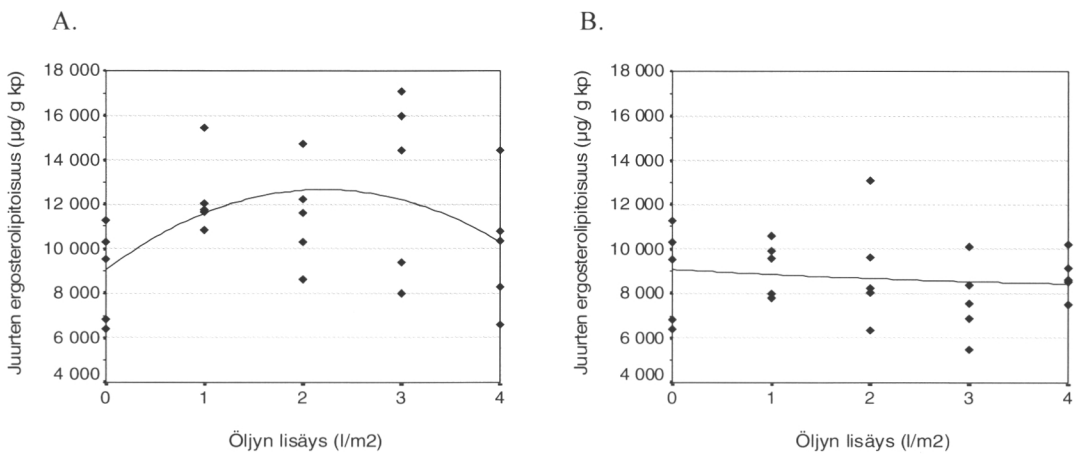
Kuva 6. Mikrobibiomassa eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,4257$ ,  $F = 17,0488$ ,  $p < 0,001$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,3668$ ,  $F = 13,3234$ ,  $p < 0,005$ ).

### 3.4 Maan sienibiomassa ja juurten mykorrhizasienet

Kummallakaan öljyllä ei ollut vaikutusta maaperän ergosterolipitoisuuteen (kuva 7). Regressioanalyysin mukaan juurten ergosterolipitoisuus kasvoi pienissä bioöljypitoisuuksissa ja laski suurissa pitoisuuksissa. Sen sijaan mineraaliöljyllä ei ollut vaikutusta juurten ergosterolipitoisuuteen (kuva 8).



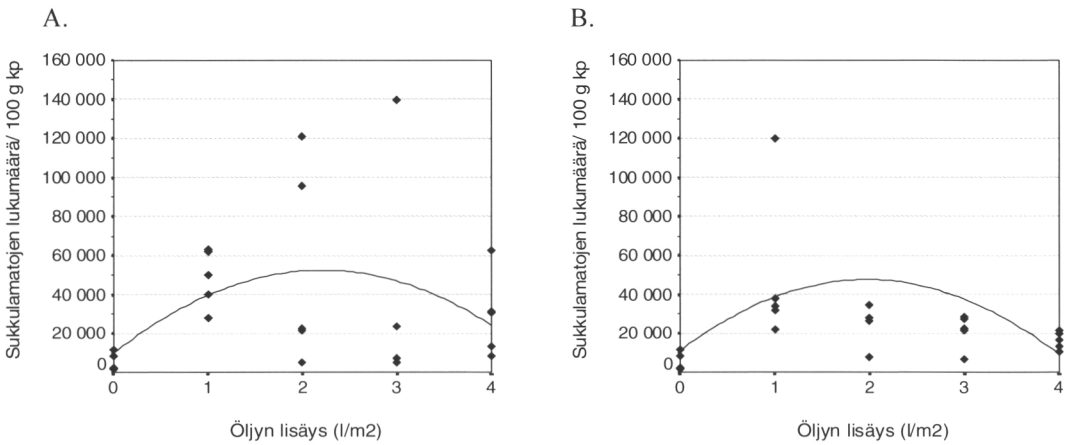
Kuva 7. Maaperän ergosterolipitoisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,0332$ ,  $F = 0,7898$ ,  $p > 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,0239$ ,  $F = 0,5632$ ,  $p > 0,05$ ).



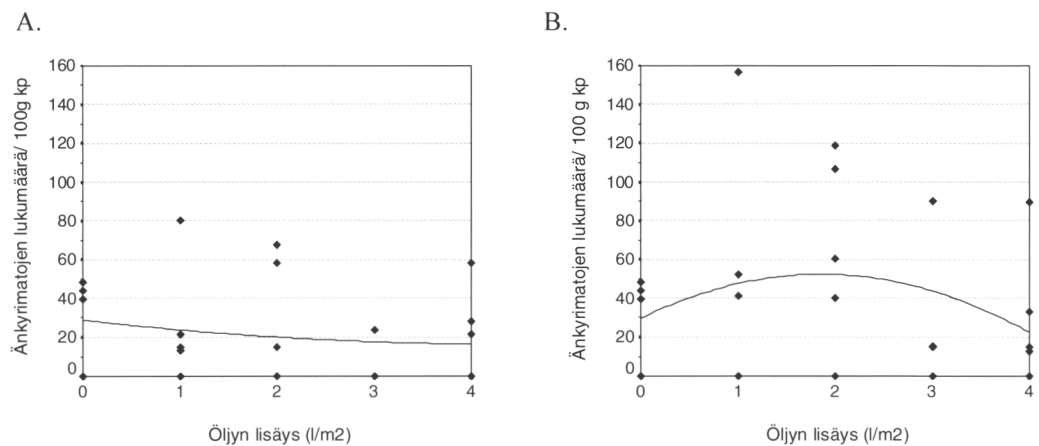
Kuva 8. Juurten ergosterolipitoisuus eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,2072$ ,  $F = 6,0111$ ,  $p < 0,01$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,0185$ ,  $F = 0,4335$ ,  $p > 0,05$ ).

### 3.5 Maaperäeläimet

Öljyt lisäsivät sukkulamatojen määrää verrattuna kontrolliruukkuihin. Sukkulamatojen määrä kuitenkin väheni suurimmissa öljypitoisuuksissa. Mineraaliöljykäsittelyssä sukkulamatojen määrässä oli kuitenkin suuri hajonta (kuva 9). Änkyrimadot runsastuivat bioöljykäsittelyssä mineraaliöljykäsittelyä enemmän,

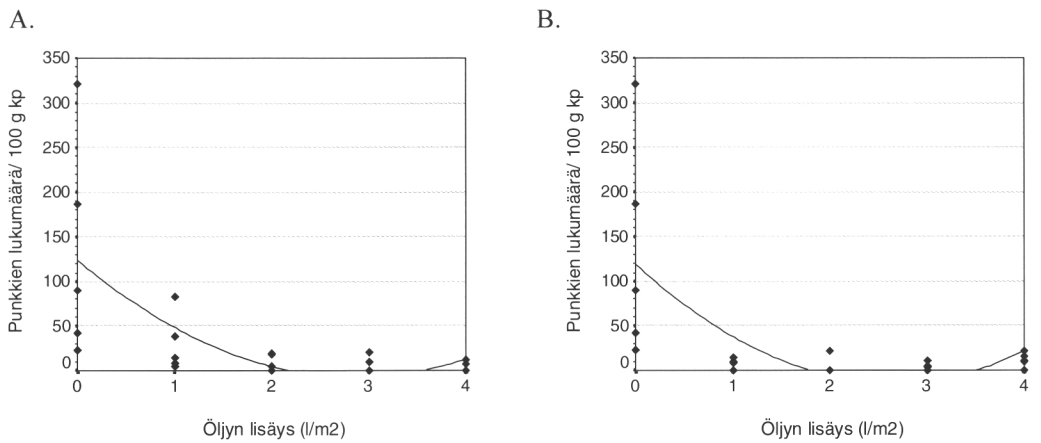


Kuva 9. Sukkulamatojen lukumäärä eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,1764$ ,  $F = 4,9262$ ,  $p < 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,1981$ ,  $F = 5,6818$ ,  $p < 0,05$ ).

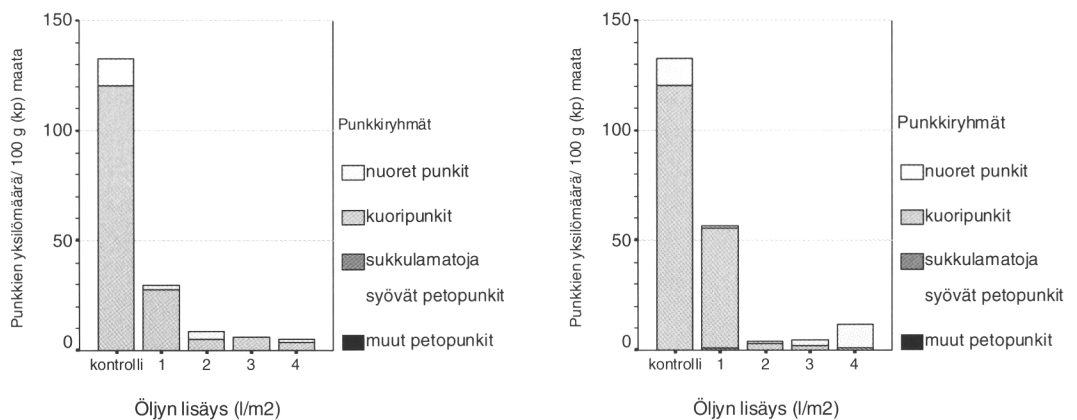


Kuva 10. Änkyrimatojen lukumäärä eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,0333$ ,  $F = 0,7923$ ,  $p > 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,0699$ ,  $F = 1,7285$ ,  $p > 0,05$ ).

mutta molemmissa käsittelyissä hajonta oli suuri (kuva 10). Sekä mineraali-että bioöljy vähensivät selvästi punkkien määrää maanäytteissä. Myös kontrolli- maiden punkkien määrä väheni (kuva 11). Vaikutus näkyi kaikissa punkki-ryhmissä, mutta selkeimmin metsämaassa suurilukuisimmassa punkkiryhmässä, kuoripunkteissa (*Oribatida*) (kuva 12). Öljyt vähensivät merkittävästi hyppyhäntäisten määrää (kuva 13).



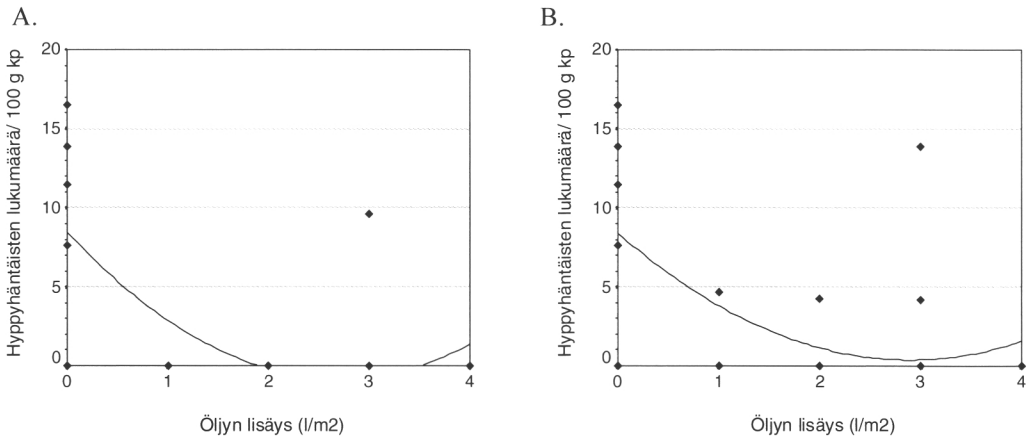
Kuva 11. Punkkien lukumäärä eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,4507$ ,  $F = 18,8715$ ,  $p < 0,001$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,4474$ ,  $F = 18,6214$ ,  $p < 0,001$ ).



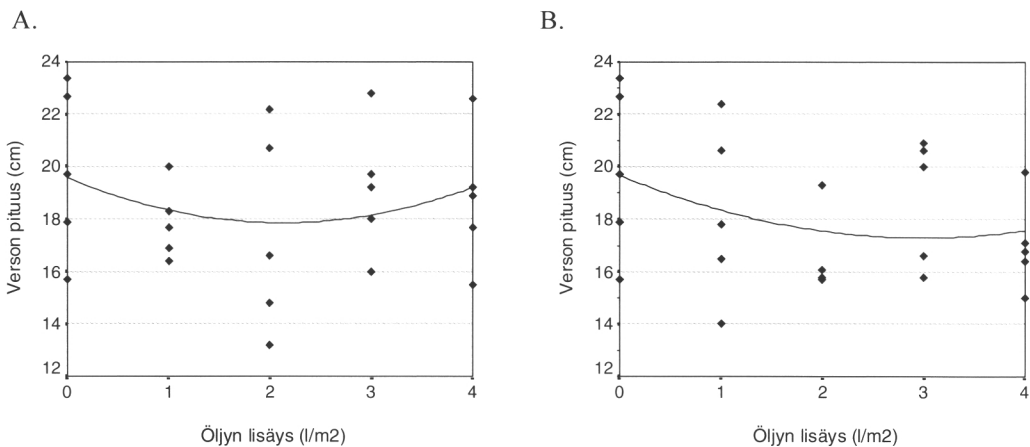
Kuva 12. Punkkien lukumäärät punkkiryhmittäin kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy, B = bioöljy.  $n = 5$ .

## 3.6 Taimet

Yksi taimista bioöljypitoisuudessa 3 l/m<sup>2</sup> kuoli kokeen aikana. Taimien pituuksissa (mineraaliöljy  $F = 0,580$ ,  $p = 0,681$ , bioöljy  $F = 1,399$ ,  $p = 0,270$ ) (kuva 14) tai biomassassa (mineraaliöljy  $F = 0,404$ ,  $p = 0,804$ , bioöljy  $F = 1,678$ ,  $p$

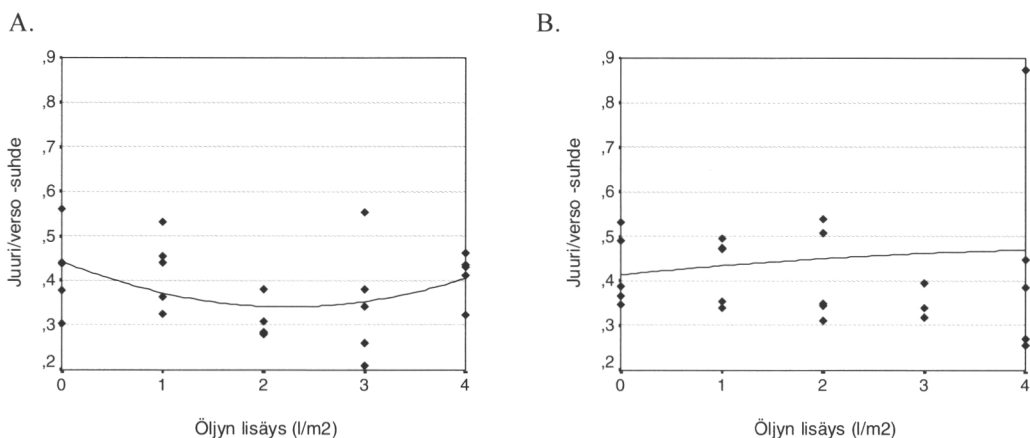


Kuva 13. Hyppyhäntäisten lukumäärä eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,4508$ ,  $F = 18,8791$ ,  $p < 0,001$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,3159$ ,  $F = 10,6208$ ,  $p < 0,005$ ).

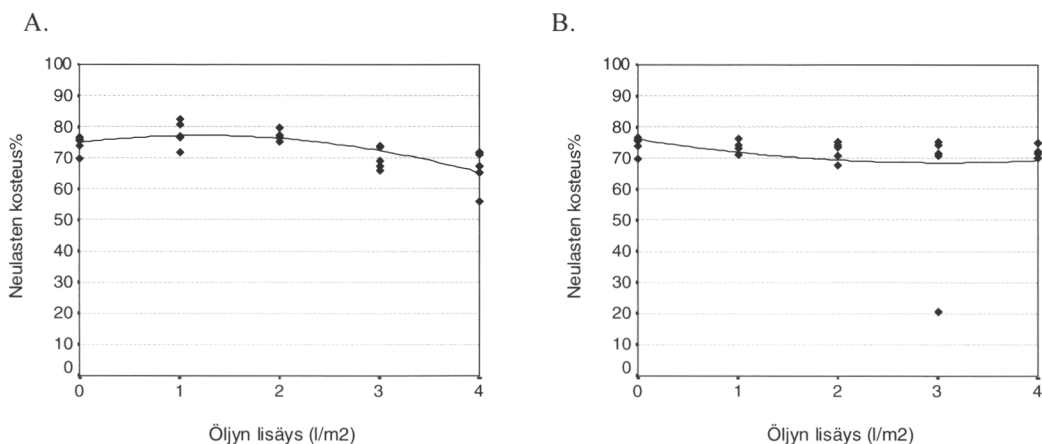


Kuva 14. Verson pituus eri öljytasoilla kokeen päättyessä, kuollut taimi mukana. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,0589$ ,  $F = 1,4395$ ,  $p > 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,1103$ ,  $F = 2,8514$ ,  $p > 0,05$ ).

0,194) ei syntynyt eroja koeyksiköiden välille. Juuri-verso -suhde pysyi bioöljyssä muuttumattomana, mutta vaihteli hieman mineraaliöljyssä (kuva 15). Mineraaliöljyllä käsitellyissä maanäytteissä kasvaneiden taimien neulaset olivat suurimmassa pitoisuudessa kontrollia kuivempia (kuva 16).



Kuva 15. Taimien juuri/verso -suhde eri öljytasoilla kokeen päättyessä, ilman kuollutta taimea. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,1652$ ,  $F = 4,5515$ ,  $p < 0,05$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,0118$ ,  $F = 0,2746$ ,  $p > 0,05$ ).



Kuva 16. Neulausten kosteusprosentti eri öljytasoilla kokeen päättyessä. A = mineraaliöljy ( $r^2 = 0,5475$ ,  $F = 27,8287$ ,  $p < 0,001$ ), B = bioöljy ( $r^2 = 0,0683$ ,  $F = 1,6861$ ,  $p > 0,05$ ). Bioöljykäsittelyssä pitoisuudessa 3 l/m<sup>2</sup> kuoli yksi taimi.

## 4 Tulosten tarkastelu

### 4.1 Öljyt vaikuttivat eri lailla maan typpipitoisuuteen

Maaperän kemiallinen koostumus vaihtelee karikkeen, maalajin ja kallioperän laadusta riippuen. Eri ravinteiden suhteelliset pitoisuudet vaikuttavat eliöiden kykyyn hajottaa detritusta. Hiili-typpi -suhdetta on yleisesti pidetty hyvänä indikaattorina maaperän eliöiden kyvystä hajottaa detritusta. Kokeen aloitushetkellä humuksen C/N suhde oli 27. Suhteen ollessa yli 20 eli tyypeä on vähän suhteessa hiileen, tehokkaampaan typen hyödyntämiseen kykenevät sienet dominoivat hajotusta. Mikäli maaperän orgaanisen aineksen C/N suhde on alle 30, suurempi osa tyypestä immobilisoituu mikrobeihin, jolloin kasveille on saatavilla vähemmän tyypeä (Zibilske 1999, Kimmins 1997, Beeby 1993). Hajottajamikrobien optimisuhde on yleensä noin 25, mutta happamassa, ligniini-pitoisessa metsämaassa mineralisaatiota tapahtuu suhteen ollessa jopa yli 50 (Paul & Clark 1996). Öljyssä on paljon hiiltä, mutta vähän tyypeä. Jos maaperään lisätään öljyä hiilen ja energian lähteeksi heterotrofisille mikrobeille, typen suhteellinen määrä maaperässä todennäköisesti vähenee (Skipper 1999).

Tässä kokeessa pienen bioöljyn lisäyksen seurauksena maaperän liukoisen kokonais-, ammonium- sekä liukoisen orgaanisen typen pitoisuus kasvoi. Koska öljyt sisältävät vain vähän tyypeä, vapautuneet typpiyhdisteet olivat peräisin maaperän orgaanisesta aineksesta (SOM). Näin ollen hajotus tehostui pienen bioöljyn lisäyksen seurauksena. Kun öljyn pitoisuutta maaperässä kasvatettiin, mineralisaatio hidastui kontrollia hitaammaksi, mutta säilyi silti mineraaliöljykäsittelyä tehokkaampana. Mineraaliöljyn lisäys johti maaperän liukoisen kokonaistypen ja ammoniumtypen vähenemiseen.

Mineralisaation tehostuminen edellyttää, että ainakin osa mikrobeista kykeni hyödyntämään öljyjen sisältämiä hiiliyhdisteitä sekä energiaa. Tulosten mukaan kummallakaan öljyistä ei ollut vaikutusta mikrobien hiilenkäyttöprofiiliin eli mikrobien toiminnallisten ryhmien rakenteeseen, vaikka kemikaalialtistuksen ja fyysisen stressitilan seurauksena mikrobiyhteisön lajistollisen rakenteen on useissa tutkimuksissa huomattu muuttuvan ja monimuotoisuuden pienenevän (Hanson ym. 1997, Lindström ym. 1999, Nyman 1999). Runsaan mineraaliöljyaltistuksen on huomattu johtavan alkuvaiheessa hiilivetyjä hyödyntävien mikrobien biomassan runsastumiseen sekä alkuperäisten bakteerien hajotustoiminnan hidastumiseen (Hanson ym. 1997, Lindström ym. 1999, Nyman 1999). Myös raskasmetalleilla on havaittu olevan haitallisia vaikutuksia typen kiertoön (Powlson 1994). Mikrobien yhteisötason muutoksia mitanneen hiilenkäyttöanalyysitulosten mukaan aikaisempien tutkimusten kaltaista toiminnallisten ryhmien suhteen muutosta ei tapahtunut tässä tutki-



muksessa, joten mikrobibiomassan ja aktiivisuuden kohoamiseen molemmissa öljykäsittelyissä osallistui alkuperäinen mikrobilajisto tasapuolisesti.

Muutokset typpiyhdisteiden pitoisuuksissa eivät korreloi öljyn pitoisuudesta riippumattomasti kohonneen mikrobibiomassan ja aktiivisuuden kanssa. Ammoniumin nettotuotantoon vaikuttavat ympäristön olosuhteiden lisäksi substraatin ja mikrobien C/N -suhde sekä maaperäeläimet, joilla on tärkeä rooli bakteerien ja sienten laiduntajina. Sienibiomassa sekä sukkulamatojen määrä lisääntyi pienen bioöljylisäyksen seurauksena verrattuna kontrolliin ja suurempiin öljypitoisuuksiin. Näin ollen näyttää siltä, että maaperäeläinten ansiosta ravinteet olivat paremmin kasvien saatavilla, sillä ilman laidunnusta ne olisivat sitoutuneena mikrobibiomassaan (Setälä & Huhta 1991, Coûteaux & Bottner 1994, Kandeler ym. 1994). Sukkulamatojen merkitys juuri typen kierrolle on osoitettu olevan merkittävä (Moore ym. 1996, Laakso ym. 2000).

Maaperäeläinten laiduntaessa mikrobeja ammoniumia vapautuu kuona-aineena, koska petojen C/N -suhde on samanlainen kuin mikrobeilla, mikä johtaa typen ylimäärään, sillä hiiltä menetetään hengityksessä (Myrold 1999). Öljyn määrän kasvaessa haitalliset vaikutukset sukkulamatoihin lisääntyivät ja sukkulamatojen määrä alkoi vähentyä, jolloin mikrobeihin sitoutuneen typen määrä alkoi kasvaa.

Vaikka sukkulamatojen määrä näytti bioöljykäsittelyssä korreloivan maaperän typpiyhdisteiden kanssa, näin ei ollut mineraaliöljykäsittelyssä, jossa hajonta oli hyvin suuri. Maaperäeläinten osalta mineraali- ja bioöljy eroavat myös siinä, että bioöljyisissä ruukuissa oli keskimäärin enemmän änkyrimatoja. Änkyrimatojen vaikutusta hajotukseen, ravinteiden kiertoon sekä kasvien kasvuun on useissa tutkimuksissa pidetty tärkeänä ja jopa muiden eliöiden vaikutuksia tärkeämpänä (Nieminen & Setälä 1998, Setälä 2000). Änkyrimadot syövät detritusta ja sen mukana mikrobeja. Orgaanista materiaalia hajottaessaan ne tehostavat saprofyyttisten mikrobien hajotusta. Laidunnuksen vaikutus ei aina ole inhiboiva, vaan saalistajien määrästä riippuen se voi myös stimuloida saalisteläinten aktiivisuutta (Coûteaux & Bottner 1994, Mikola 1998).

Saalistus stimuloi aktiivisuutta voimistamalla hiilen kierron nopeutta ja typen mineralisaatiota. Se voi myös vähentää kilpailua (Coûteaux & Bottner 1994). Näin ollen maaperän eläinten ja saprofyyttisten mikrobien väliset suorat ja epäsuorat vuorovaikutukset vaikuttivat maaperän kasveille saatavilla olevien typpiyhdisteiden pitoisuuksiin.

Kasveille saatavilla oleva typpiyhdiste vaikuttaa ritsosfääriin happamuuteen. Kun kasvit käyttävät nitraattia, maaperän happamuus vähenee. Ammonium typen lähteenä kasveille taas lisää happamuutta jopa niin, että bakteerien määrä voi vähentyä (Kennedy 1999). Happamuuden ja ammoniumpitoisuuden korreloiminen negatiivisesti molemmissa öljykäsittelyissä tukee teoriaa. Nitraattia

ei löytynyt näytteistä. Maaperän nitraattipitoisuuteen vaikuttaa mm. happamuus, sillä nitraattia ei synny pH:n ollessa lähellä 4, vaikka nitrifikaatiobakteereita ja ammoniumia olisikin runsaasti. On mahdollista, että taimet käyttivät nitraattia mineraaliöljyisissä ruukuissa, koska ammoniumtyypen vähenemisestä huolimatta liukoisen orgaanisen kokonaistypen pitoisuus pysyi muuttumattomana. Todennäköisempää on kuitenkin, että öljyjen kemikaalit olivat emäksisempiä kuin humus, jolloin maaperän pH nousi öljylisäyksen seurauksena.

## 4.2 Tuottavuus ei kasvanut kaikissa trofiaryhmissä

Mikrobien aktiivisuus ja biomassa kasvoivat sekä mineraali- että bioöljylisäyksen seurauksena, joten suora bottom-up -vaste on huomattavissa. Maa-hengitys kasvoi enemmän mineraaliöljyssä kuin bioöljyssä. Tulokset vastaavat tutkimuksia, joissa lisätyn substraatin määrä lisäsi kasvustojen kokoa sekä kohotti mikrobien tuottavuutta (Jürgens & Sala 2000, Salminen ym. 2001).

Vaikka mineraali- ja bioöljylisäyksen seurauksena mikrobibiomassa ja ensimmäisen asteen kuluttajien määrä lisääntyi, mikroniveljalkaispetojen määrä romahti täysin. Tulokset tukevat aikaisempia tutkimustuloksia (Pirhonen & Huhta 1984, Lehtinen ym. 1999). Toisin kuin Mikolan (1998) tutkimuksessa, jossa substraatin lisäys johti tuottavuuden lisääntymiseen kaikilla trofiatasoilla riippumatta trofiatasojen lukumäärästä tai mikrobivorien lajikoostumuksesta, tässä tutkimuksessa öljyt toimivat energian lisäyksen lisäksi suoraan toksisesti ravintoketjun huippupetoihin, jolloin niiden tuottavuus ei lisääntynyt. Mineraali- ja bioöljyjen vasteissa ei ollut suurta eroa.

Ruumiin koko ja detrituksen hajoamisaste vaikuttavat maaperän selkärangattomien levinneisyyteen elinympäristössään. Öljyt leviävät kuitenkin helposti maaperässä (Salminen ym. 2001), joten eliöryhmien altistumisen voimakkuudessa tuskin oli eroa sen mukaan, millä syvyydellä kukin eliöryhmä elää. Sen sijaan maaperän mikrofauna voi elää ainoastaan maapartikkelien pinnalla veden muodostamilla pintakalvoilla, kun taas mesofauna elää maaperän huokosissa. Vain makrofauna on tarpeeksi suuri pystyäkseen vastustamaan maaperän fysikaalisia esteitä (Ingham 1999). Näin ollen kapillaarivesi suojaa sukkulamatoja öljyn välittömältä vaikutukselta, joka tuhoaa punkit ja hyppyhäntäiset (Pirhonen & Huhta 1984, Lehtinen ym. 1999). Vaikka kapillaariveteen liukenee öljystä ainesosia, joiden pitoisuuden kasvaminen maavedessä voi vaikuttaa lopulta myrkyllisesti muihin mikrofaunan eläinlajeihin, sukkulamatojen kitiiniä sisältävä kutikula suojaa kemiallisten aineiden suoralta vaikutukselta (Wolters 2000). Vaikka maavesi tai kutikula ei suojannut änkyrimatoja kuten sukkulamatoja, niiden määrä ei kuitenkaan vähentynyt merkittävästi kummasakaan öljykäsittelyssä. Änkyrimatojen runsaudessa oli kuitenkin suuri hajonta

öljyisissä ruukuissa verrattuna kontrolliruukkuihin, mikä voi kertoa häiriötilasta. Öljyjen lisäksi happamuuden väheneminen ja kuumuus ovat voineet vaikuttaa maaperäeläimiin.

Öljyistä kapillaariveteen lienneet ainesosat ovat myös kasvien saatavilla (Lehtinen ym. 1999). Vaikka taimien typpitalous parani bioöljykäsittelyssä, vaikutukset eivät näkyneet taimien kasvussa. Lauhasen ym. (1999b) tutkimuksissa mineraali- ja bioöljykäsittelyt 20 l/ha eivät haitanneet männyntaimien kasvua verrattuna kontrolleihin, mutta pitoisuuksien kasvaessa taimien fysiologisissa ominaisuuksissa oli merkkejä häiriötilasta. Myös tässä tutkimuksessa taimissa oli merkkejä häiriötilasta, sillä mineraaliöljykäsittely johti neulasten kuivumiseen. Koska kuivumista ei tapahtunut bioöljyllä käsitellyissä koeyksiköissä, kuumuus tai riittämätön kastelu eivät olleet syynä kuivumiseen.

## 5 Kirjallisuus

- Anderson, J. P. E & Domsch, K. H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. – *Soil. Biol. Biochem.* 10: 215–221.
- Beeby, A. 1993. *Applying ecology*. Chapman & Hall, Lontoo.
- Bengtsson, J., Setälä, H. & Zheng, D. W. 1996. Food webs and nutrient cycling in soils: interactions and positive feedbacks. – Kirjassa: Polis, G. & Wine-miller, K. (toim.), *Food webs – integration of patterns and dynamics*: 30–38. Chapman & Hall, New York.
- Bossio, D. A., Scow, K. M. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. – *Microb. Ecol.* 35: 265–278.
- Coûteaux, M.- M., Bottner, P. 1994. Biological interactions between fauna and the microbial community in soils. – Kirjassa: Ritz, K., Dighton, J. & Giller, K. E. (toim.), *Beyond the biomass – compositional and functional analysis of soil microbial communities*: 159–172. British Society of Soil Science, A Wiley-Sayce Publications, Lontoo. 275 s.
- Crossley, D.A. Jr. & Blair, J.M. 1991. A high-efficiency, “low-technology” Tullgren-type extractor for soil microarthropods. – *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34: 187–192.
- Faulkner, B. C. & Lochmiller, R. L. 2000. Increased abundance of terrestrial isopod populations in terrestrial ecosystems contaminated with petrochemical wastes. – *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 86–90.
- Filimonova, Z. V. & Pokarzhevskii, A. D. 2000. Enchytraeid *Enchytraeus crypticus* as a test organism for crude oil contamination of soil. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 407–414.

- Garland, J. L. & Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. – *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351–2359.
- Garland, J. L. 1995. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. – *Soil. Biol. Biochem.* 28: 213–221.
- Haack, S. K., Garchow, H., Klug, M. J. & Forney, L. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1458–1468.
- Hanson, K. G., Anuranjini, N., Madhavi, K. & Anjana, J. D. 1997. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3. – *Curr. Microbiol.* 35: 191–193.
- Hartel, P. G. 1999. The soil habitat. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 21–43. Prentice Hall. 550 s.
- Huhta, V. 1997. Maaperä on punkkien, hyppyhäntäisten, lierojen ja änkyrimatojen valtakuntaa. – Kirjassa: Turunen, S., Uotila, P., Syrjämäki, J., Koponen, T. & Walls, M. (toim.), Suomen luonnon sata vuotta: 133–138. Suomen Biologian Seura Vanamo. Yliopistopaino, Helsinki. 256 s.
- Hunter, M. D. & Price, P. W. 1992. Playing chutes and ladders: heterogeneity and relative roles of bottom-up and top-down forces in natural communitation. – *Ecology* 73: 724–732.
- Ingham, E. R. 1999. Protozoa and nematodes. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 115–131. Prentice Hall. 550 s.
- Jürgens K. & Sala M. M. 2000. Predation-mediated shifts in size distribution of microbial biomass and activity during detritus decomposition. – *Oikos* 91: 29–40.
- Kandeler, E., Winter, B., Kampichler, C. & Bruckner, A. 1994. Effects of mesofaunal exclusion on microbial biomass and enzymatic activities in field mesocosms. – Kirjassa: Ritz, K., Dighton, J. & Giller, K. E. (toim.), Beyond the biomass – compositional and functional analysis of soil microbial communities: 181–189. British Society of Soil Science, A Wiley-Sayce Publications, Lontoo. 275 s.
- Kennedy, A. C. 1999. Theritsosphere and the spermosphere. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 389–407. Prentice Hall. 550 s.
- Kimmins, J. P. 1997. Forest ecology. 2. painos. Prentice Hall. 596 s.

- Kirschbaum, M. U. F. 1995. The temperature dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. – *Soil. Biol. Biochem.* 27: 753–760.
- Kjøller, A. & Struwe, S. 1994. Analysis of fungal communities on decomposing beech litter. – Kirjassa: Ritz, K., Dighton, J. & Giller, K. E. (toim.), *Beyond the biomass – compositional and functional analysis of soil microbial communities*. British Society of Soil Science, A Wiley-Sayce Publications, Lontoo. 275 s.
- Laakso, J., Setälä, H. & Palojärvi, A. 2000. Influence of decomposer food web structure and nitrogen availability on plant growth. *Plant Soil* 225: 153–165.
- Laine, M. M., Ahtiainen, J., Wågman, N., Öberg, L.G. & Jørgensen, K. S. 1997a. Fate and toxicity of chlorophenols, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans during composting of contaminated sawmill soil. – *Environ. Sci. Technol.* 31: 3244–3250.
- Lauhanen, R., Kolppanen, R., Kuokkanen, T. & Sarpola, S. 1999a. Metsätyössä käytettävien öljyjen biohajoavuus. Metsätalouden ympäristökuormitus. Tutkimusohjelman väliraportti: 139–146. – Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 745.
- Lauhanen, R., Sutinen S., Mäenpää M. & Kolppanen R. 1999b. Ennakkotuloksia metsätyössä käytettävien öljyjen vaikutuksesta männyn ja hieskoivun taimien kasvuun, kuolemiseen sekä neulas- ja lehtivaurioihin. – Kirjassa: Ahti, E., Granlund, H., Puranen, E. (toim.), *Metsätalouden ympäristökuormitus*. Tutkimusohjelman väliraportti: 153–157. – Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 745.
- Lauhanen, R., Kolppanen, R., Takalo, S., Kuokkanen, T., Kola, H. & Välimäki, I. 2000. Effects of biodegradable oils on forest environment and forest machines. – Kirjassa: *Forest and wood technology vs. environment – proceedings of the International scientific conference, 20–22 November 2000, Brno, Czech Republic*.
- Lindstrom, J. E., Barry, R. P. & Braddock, J. F. 1999. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. – *Soil. Biol. Biochem.* 31: 1677–1689.
- Lima, J. L. F. C., Montenegro, M. C. B. S. M & Pinto, A. P. M. O. 1999. Determination of total nitrogen in food by flow injection analysis (FIA) with a potentiometric differential detection system. – *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 364: 353–357.
- Lehtinen, M., Lauhanen, R. & Kolppanen, R. 1999. Teräketjuöljyjen vaikutus maaperän sukkulamatoihin (*Nematoda*) ja änkyrimatoihin (*Enchytraeidae*). Metsätalouden ympäristökuormitus. Tutkimusohjelman väliraportti: 147–152. – Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 745.

- Lämsä, M. 1995. Environmentally friendly products based on vegetable oils. – Technical Biochemistry, report 2, Helsingin Teknillinen korkeakoulu.
- McCune, B. & M.J. Mefford. 1999. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA.
- Mikola, J. 1998. Effects of microbivore species composition and basal resource enrichment on trophic-level biomasses in an experimental microbial-based soil food web. – *Oecologia* 117: 396–403.
- Moore, J. C., de Ruiter, P. C., Hunt, H. W., Coleman, D. C. & Freckman, D. W. 1996. Microcosms and soil ecology: Critical linkages between fields studies and modelling food webs. – *Ecology* 77: 694–705.
- Myrold, D. D. 1999. Transformations of nitrogen. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 259–294. Prentice Hall. 550 s.
- Nieminen, J. K. & Setälä, H. 1998. Enclosing decomposer food web: implications for community structure and function. – *Biol. Fert. Soils* 26: 50–57.
- Nordgren, A. 1988. Apparatus for the continuous long-term monitoring of soil respiration rate in a large number of samples. – *Soil. Biol. Biochem.* 20: 955–957.
- Nylund, J.- E. & Wallander, H. 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. – *Methods in Microbiology* 24: 77–88.
- Nyman, J. M. 1999. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. *Microb. Ecol.* 37: 152–162.
- Nyman, J. M. 1999. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. *Microb. Ecol.* 37: 152–162.
- O'Connor, F. B. 1962. The extraction of Enchytraeidae from soil. – Kirjassa: P. W. Murphy (toim.), Progress in soil zoology: 279–285. Butterworths, Lontoo.
- Oksanen, L, Fretwell, S. D., Arruda, J. & Niemelä, P. 1981. Exploitation ecosystems in gradients of primary productivity. – *Am Nat* 118: 240–261.
- Pirhonen, R. & Huhta, V. 1984. Petroleum fractions in soil: effects on populations of Nematoda, Enchytraeidae and Microarthropoda. – *Soil. Biol. Biochem.* 16: 347–350.
- Powlson, D. S. 1994. The soil microbial biomass: before, beyond and back. – Kirjassa: Ritz, K., Dighton, J. & Giller, K. E. (toim.), Beyond the biomass – compositional and functional analysis of soil microbial communities. British Society of Soil Science, A Wiley-Sayce Publications, Lontoo. 275 s.

- Salminen, J. M., Tuomi, P. M. & Jørgensen, K. S. 2001. Evidence for natural attenuation of petroleum hydrocarbons in boreal soil. – Kirjassa: Lehtonen, T., Salminen, J.-P. & Pihlaja, K. (toim.), Proceedings of the Fifth Finnish Conference of Environmental Sciences, Turku May 18–19 2001. Finnish Society for Environmental Sciences, University of Turku.
- Scheu S., Theenhaus A. & Hefin Jones T. 1999. Links between detritivore and the herbivore system: effects of earthworms and Collembola on plant growth and aphid development. – *Oecologia* 119: 541–551.
- Setälä H. 1995. Growth of birch and pine seedlings in relation to grazing by soil fauna on ectomycorrhizal fungi. – *Ecology* 76: 1844–1851.
- Setälä, H. 2000. Reciprocal interactions between Scots pine and soil food web structure in the presence and absence of ectomycorrhiza. – *Oecologia* 125: 109–118.
- Setälä, H. & Huhta, V. 1991. Soil Fauna increase *Betula pendula* growth: laboratory experiments with coniferous forest floor. – *Ecology* 72: 665–671.
- Skipper, H. D. 1999. Bioremediation of contaminated soils. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 469–481. Prentice Hall. 550 s.
- Sohlenius, B. 1979. A carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in a Swedish coniferous forest soil. – *Holarctic Ecology* 2: 30–40.
- SPSS, 1999. SPSS for Windows 10.0, julkaisu 9.0.1. SPSS, Chicago.
- Wolters, V. 2000. Invertebrate control of soil organic matter stability. – *Biol. Fertil. Soils* 31: 1–19.
- Zibilske L. M. 1999. Composting of organic wastes. – Kirjassa: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. & Zuberer, D. A. (toim.), Principles and applications of soil microbiology: 482–497. Prentice Hall. 550 s.











