

Orgaanisten lannoitteiden ja mikrobivalmisteiden kasvuvaikutusta kuvaavan biotestin toteuttaminen

Liiteraportti.

Sanna Kukkonen, Mauritz Vestberg, Ansa Palojärvi ja Tapio Salo



1 Sisältö

1 Sisältö	2
2 Johdanto.....	3
3 Aineisto ja menetelmät	4
3.1 Testikasvit	4
3.2 Kasvualustat	4
3.3 Esimerkkituotteet ja niiden käyttö testissä	4
3.3.1 Typpibakteerivalmiste	5
3.3.2 Biolietekomposti	5
3.3.3 Mykorritsaivalmiste	6
3.4 Testin pystytys	6
3.4.1 Kasvualustojen ruukutus	6
3.4.2 Lannoitus.....	7
3.4.3 Toistojen määrä.....	9
3.4.4 Siementen kylvö.....	9
3.5 Koeasetelma	10
3.6 Testiolosuhteet ja testin hoito.....	11
3.7 Havainnot	11
3.8 Aineiston tilastollinen analysointi	12
4 Tulokset ja tuloksen tarkastelu	13
4.1 Kasvualustojen ominaisuudet.....	13
4.2 Orgaanisten lannoitevalmisteiden toimivuus testissä ja siihen vaikuttavat tekijät.....	14
4.2.1 Lannoitustason ja testikasvin vaikutus typpibakteerivalmisteen toimivuuteen.....	14
4.2.2 Testikasvin ja kasvualustan vaikutus kompostipelletin testitulokseen.....	15
4.2.3 Fosforilannoituksen vaikutus mykorritsaivalmisteen toimivuuteen.....	17
4.3 Ruukutus ja kylvö	20
4.4 Lannoitus.....	21
4.5 Kastelu.....	22
4.6 Testikasvi	24
4.7 Kasvualusta	24
4.8 Koeasetelma ja toistot	24
4.9 Kasvuhavainnot.....	26
4.10 Testin kesto ja työmäärä.....	26
5 Yhteenveto.....	28
6 Kirjallisuus	31
7 Liitteet	33

2 Johdanto

Kasvibiotestejä on käytetty yleensä kuvaamaan peltoviljelyssä käytettäväksi tarkoitettujen aineiden mahdollisten kasvuhaittojen osoittamiseksi tai poissulkemiseksi. Biotestejä on kehitetty eri tyyppisille valmisteille soveltuviksi, esim. maanparannusaineille ja kasvualustoille (EN 16086-1:2011) tai komposteille ja biokaasulaitosten mädänteille (Itävaara ym. 2006, Itävaara ym. 2010, Maunuksela ym. 2012). Toisaalta kasvien avulla voidaan osoittaa maan saastuneisuutta ts. onko maassa haitallisia aineita (ISO 22030:2005 (E)).

Osa kasvibiotesteistä on standardoitu, jolloin ne ovat vain standardin ostajan käytettävissä. Osa biotesteistä on julkisesti kuvattu erilaisissa tutkimusraporteissa ja julkaisuissa. Lisäksi on tehty vertailuja testikäytännöistä ja testien toimivuudesta ja (esim. Baumgarten ja Spiegel 2004) sekä julkaistu yleisohjeita biotestien hyväksi käytännöiksi (esim. OECD 2006).

Yhteistä useimmille kasvibiotesteille on siis haittavaikutusten havaitseminen, vähemmän on kehitetty testejä hyödyllisten vaikutusten osoittamiseksi. Esimerkkinä tällaisista testeistä mainittakoon mykorritsasymbioosin toimivuutta (Kahiluoto ja Vestberg 2000, Kahiluoto ym. 2000) tai kompostien taudinehkäisykykyä (Vestberg ym. 2011) kuvaavat testit. Positiivisten vaikutusten mittaamiseksi kehitettyjä menetelmiä ei kuitenkaan ole standardoitu.

Osana kansallista lannoitevalmistelainsäädäntöä (MMM 24/11), Suomessa on syntynyt tarve antaa viranomaisille ja toisaalta lannoitevalmisteiden tuottajille käyttöön menetelmiä, joilla voidaan osoittaa orgaanisten lannoitevalmisteiden ravinnevaikutus tai muu kasvin kasvua edistävä vaikutus. Vuosina 2010-2012 toteutettiin hanke ”Orgaanisten lannoitevalmisteiden testipaketti (LAVITESTI)”, jossa etsittiin MTT:n, HY:n ja Eviran asiantuntijoiden avulla käyttökelpoisia menetelmiä orgaanisten lannoitevalmisteiden viljelykasvien kasvuun vaikuttavien tekijöiden määrittämiseen.

Tämän julkaisun tavoitteena oli testata voidaanko haitallisuutta kasvien kasvulle kuvaavia biotestejä soveltaa myös orgaanisten lannoitteiden ja mikrobituotteiden (MMM 24/11, Liite 1, Kansallinen tyyppinimiluettelo) mahdollisten hyödyllisten vaikutusten osoittamiseen. Tavoitteena oli valita toimivimmat vaihtoehdot ja tehdä tarkentavia suosituksia orgaanisten lannoitevalmisteiden kasvuhaittaa tai -hyötyä kuvaavan kasvibiotestin toteuttamiseksi. Tämä toteutettiin valitsemalla MTT:n ja Eviran asiantuntijoiden tietoon ja kokemukseen pohjautuen eri standardeissa esitetyistä testikäytännöistä todennäköisesti parhaiten soveltuvat. Valinnassa otettiin huomioon testin tavoite, testitulosten sovellettavuus peltoviljelyyn ja käytännön kokemukset biotestien toteuttamisesta. Testi pyrittiin rakentamaan mahdollisimman pitkälle maanparannusaineiden ja kasvualustojen kasvuhaittojen testaamiseksi kehitetyn standardoidun biotestin (EN 16086-1:2011) ohjeiden mukaiseksi. Koska standardissa ei kovin tarkasti kaikkia käytännön ratkaisuja testin toteuttamiseksi ole esitetty, testattiin myös eri käytäntöjen vaikutusta testin lopputulokseen. Biotestin testausvaiheen toisena tavoitteena olikin etsiä käytännön ratkaisuja esim. biotestin lannoituksen toteuttamiseksi niin, että testitulokset eivät olisi riippuvaisia lannoitevalmisteen sisältämistä ravinteista.

3 Aineisto ja menetelmät

Maaliskuussa 2012 perustettiin biotesti, jonka tarkoituksena oli soveltaa maanparannusaineille ja kasvualustoille tarkoitettua kiinankaalin ruukkukasvatustestiä (EN 16086-1:2011) orgaanisille lannoitteille ja mikrobivalmisteille. Biotesti toteutettiin MTT:n kasvihuoneessa Jokioisissa. Alla on esitetty ja perusteltu ne koetekniset ratkaisut, jotka biotestiin valittiin tai joiden toimivuutta testattiin. Käytännön ratkaisuja valittaessa on hyödynnetty paitsi yllä mainittua standardia, myös muita standardoituja fytotoksisuustestejä, MTT:n ja Eviran asiantuntijoiden kokemusta sekä OECD:n yleisiä ohjeita kasvibiotestien toteuttamisessa (OECD 2006 ja OECD 2008). Kunkin alaotsikon alla on esitetty ja perusteltu EN 16086-1:2011 standardista mahdollisesti poikkeavat ratkaisut.

3.1 Testikasvit

Testikasveiksi kokeiluun otettiin EN 16086-1:2011 standardin mukaisesti kiinankaali (*Brassica campestris*, lajike Morillo storido) ja kaksitahoinen ohra (*Hordeum vulgare*, lajike Saana). Käytetyt siemenet olivat peittaamattomia.

3.2 Kasvualustat

Biotestissä käytettiin kasvualustoina sekä keinotekoista OECD:n ohjeiden mukaan valmistettua standardimaata että OECD:n kriteerit täyttävää peltomaata (hieta, orgaaninen hiili < 1.5%). Kasvualustaksi ei valittu standardissa (EN 16086-1:2011) esitettyjä rahkaturvetta tai perliittiä, sillä nämä katsottiin olevan liian kaukana peltomaan ominaisuuksista. Tulos ei todennäköisesti olisi ollut sovellettavissa peltoviljelyyn. Peltomaa oli Jokioisten alueelta kerättyä ja 2 mm seulan läpi seulottua hietamaata.

Standardimaa valmistettiin kvartsihiekaista, kaoliinista, maanparannusturpeesta sekä kalkitusaineena käytettävästä CaCO₃:sta seossuhteessa 74.4 + 20 + 5 + 0.6 kuiva-ainetta. Kvartsihiekan raekoko oli 100-500 µm. Maanparannusturpe seulottiin 5 mm seulan läpi ja kuivattiin n. vuorokausi +40°C:ssa ennen seoksen tekoa. Raaka-aineiden kuiva-ainepitoisuus määritettiin ja raaka-aineiden seosuhde laskettiin. Sopivaa kalkitustasoa varten tehtiin seoksesta koe-erä, johon laitettiin 7 g CaCO₃/kg k-a. Koeseoksen pH mitattiin pari päivää valmistamisen jälkeen ja se oli 6.6. Standardimaan sopivaksi kalkitusmääräksi arvioitiin tämän perusteella 6 g/kg k-a. Standardimaan valmistamiseen tarvittavat raaka-aineet punnittiin käyttökosteudessa ja seos sekoitettiin betonimyllyssä pyörittäen sitä n. 5 min.

3.3 Esimerkkituotteet ja niiden käyttö testissä

Biotestiin valittiin kolme esimerkkivalmistetta, joiden vaikutustapa oli erilainen. Typpibakteerivalmiste edusti assosiativisia tyyppiä sitovia mikrobeja sisältävää tuotetta, jonka vaikutustapa on moninainen valmistajan ilmoituksen perusteella. Mykorrisatuote oli juuristosymbionttinen valmiste, jossa valmistajan mukaan oli myös muita kasvien kasveille edullisia mikrobeja. Orgaanisia lannoitteita edusti biolietteestä valmistettu kompostipelletti.

3.3.1 Typpibakteerivalmiste

Testiin valittu typpibakteerivalmiste on kylmäkuivattua bakteerijauhetta, joka valmistajan ilmoituksen perusteella sisältää *Azorhizobium*-, *Azospirillum*- ja *Azoarcus*-sukuisia kasvien kasvua edistäviä bakteereja yhteensä 10^{11} pmy. Valmistajan tiedotteen mukaan tuotteen sisältämät bakteerit sitovat typpeä kasvin käyttöön, lisäävät juuriston pinta-alaa tuottamansa indoli-3-etikkahapon ansiosta sekä liukoistavat maaperän trikalsiumfosfaattia, jolloin kasvin kalsiumin ja fosforin saanti paranee.

Valmisteen mukana toimitettu elatusainejauhe ja kylmäkuivattu bakteerijauhe sekoitettiin desilitraan klooraamatonta vettä. Käytännössä käytettiin vesijohtovettä, koska sen klooripitoisuus arvioitiin hyvin pieneksi. Seosta pidettiin neljä tuntia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen seos laimennettiin käyttöväkevyyteen (2.6×10^7 CFU/ml). Käyttömääräksi valittiin huomattavasti valmistajan ilmoittamaa käyttöväkevyyttä (1×10^6 CFU/ml) suurempi annos testin suhteellisen lyhyen keston vuoksi. Pelto-olosuhteissa mikrobeilla on kasvukauden aikana huomattavasti enemmän aikaa lisääntyä kuin tällaisessa keskimittaisessa testissä. Suhteellisen suurella käyttömäärällä haluttiin varmistaa, että kasvuvaiikutuksen havaitseminen ei olisi kiinni riittävän suuren mikrobimäärän puuttumisesta.

Käsittelyn onnistumiseksi ruiskutus tuli valmistajan ohjeen mukaan suorittaa kosteissa sääolosuhteissa, ja bakteerisuspension tuli ehtiä imeytyä kasvien pintaan vähintään neljän tunnin ajan. Ilman kosteus oli päivällä enimmäkseen 60-80 % eikä testikasveja kasteltu ennen seuraavaa päivää. Koska valmiste voidaan antaa sekä kasvinsuojeluruiskutteenä että kastelulannoituksena, käytettiin testissä molempia tapoja. Typpibakteerivalmiste annettiin pipetoimalla kasvien tyveen 9 vrk (3.1×10^8 CFU/ruukku) ja lehtiruiskutteenä 14 vrk (2.6×10^8 CFU/ruukku) kasvien kylvön jälkeen.

3.3.2 Biolietekomposti

Biotestiin valittu kompostituote oli valmistettu biolietekompostista ja pelletöity. Kompostin pH oli lähellä neutraalia ja orgaanista ainesta oli hieman yli puolet painosta. Kompostin kypsyystä kertova $\text{NO}_3\text{-N}/\text{NH}_4\text{-N}$ -suhde oli 12, mikä viittaa kypsään kompostiin. Taulukossa 1 on tarkemmat tiedot kompostista mitatuista fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Kompostipelletti lisättiin kasvualustaan murskattuna ja 6 mm seulan läpi seulottuna 27 g k-a/l kasvualustaa (vastaa peltolevityksessä 23 tn/ha k-a). Käytännössä 23 g k-a murskattua kompostia sekoitettiin kunkin testiruukun kasvualustaan. Käyttömäärä laskettiin kokonaistypen mukaan niin, että käyttömäärä ylitti 1.8 kertaa nitraattidirektiivin salliman suurimman levitysmäärän. Kompostia päätettiin käyttää suhteellisen lyhytkestoisessa testissä hieman peltolevitystä suurempi määrä vaikutusten esiin saamiseksi.

Taulukko 1. Pelletöidyn biolietekompostin valmistajan ilmoittamat fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet sekä käytetystä tuote-erästä määritetyt ravinteet.

Ominaisuus	Tuoteseloste	Käytetty erä
pH	6.8	
Johtokyky (mS/m)	618	
Tuhkapitoisuus (m-% k-a)	46.5	
Orgaaninen aines (%)	53.5	
Saapumiskosteus (m-%)	15.3	
Tilavuuspaino (g/l)	856	
Irtotiheys (g/l)	725	
NH ₄ -N (mg/kg k-a)	216	218
NO ₃ -N (mg/kg k-a)	2625	2669
Liukoinen P (mg/kg k-a)	11	
Kokonais-N (mg/kg k-a)	29500	25899
Kokonais-P (mg/kg k-a)	22000	20488
Kokonais-K (mg/kg k-a)	14400	
As (mg/kg)	12	
Cd (mg/kg)	0.61	
Cr (mg/kg)	78	
Cu (mg/kg)	220	
Ni (mg/kg)	21	
Pb (mg/kg)	35	
Zn (mg/kg)	430	
Hg (mg/kg)	0.29	

3.3.3 Mykorritsavalmiste

Testattavaksi valittiin siemenpeittauksena käytettävä mykorritsatuote, joka sisältää valmistajan ilmoituksen mukaan hyödyllisiä mykorritsasieniä, kasvien kasvua parantavia bakteereita ja sieniä sekä orgaanisia kasviravinteita. Tuotteen ilmoitetaan edistävän nurmen juuriston kasvua ja stressinsietoa sekä nopeuttavan kylvettyjen nurmialueiden taimettumista. Tuote on valmistettu sentrifuugikuivamaalla ja se sisältää zeoliittia tai vulkaanista kiveä kanto- ja suoja-aineena. Tuotetta suositellaan käytettäväksi erityisesti rölli-, nata- ja raiheinänurmille urheilualueilla. Minimilevitysmääräksi suositellaan 3 kg sekoitettavaksi hehtaarille kylvettävälle siemenmäärälle. Biotestissä mykorritsavalmiste sekoitettiin siemeniin kylvön yhteydessä (0.5 g/ruukku), mikä tekee käyttömääräksi 377 kg/ha.

3.4 Testin pystytys

3.4.1 Kasvualustojen ruukutus

Kokeessa käytettiin 1 litran pyöreitä muoviruukkuja, joissa oli reiät pohjassa. Kasvualustan valuminen ruukusta pois estettiin ruukun pohjalle asetetulla harsokankaalla. Ruukkuun tuleva

maamäärä päätettiin vakioida tilavuuden suhteen niin, että riippumatta testimaan ominaispainosta ruukkuihin tuli sama tilavuus kasvualustaa. Lisäksi päätettiin, että kasvualusta ruukutetaan kahdessa vaiheessa siementen kylvön vuoksi. Kylvösten alapuolelle tuleva maa oli tilavuudeltaan sama kaikissa ruukuissa, mutta kylvösten päälle laitettava maamäärä vaihteli testikasvin vaatiman kylvösyvyyden mukaan. Ohran siementen päälle päätettiin laittaa 1 cm ja kiinankaalin siementen päälle 2 mm kasvualustaa.

Koeruukutuksella selvitettiin paljonko standardimaata ja hietamaata voidaan kuiva-aineena ruukkuun lisätä, että saavutetaan n. 850 ml tilavuus. Ruukutettavan kasvualustan kosteus säädettiin 50% vedenpidätyskyvystä, annettiin lannoitelius ja ruukutettiin. Tämä osoittautui kuitenkin huonoksi ratkaisuksi, sillä kasvualustasta tuli liian märkää ja ruukkuun siirtäminen vaikeutui. Esikostutuksesta luovuttiin. Toisessa ruukutuskokoilussa käytettiin kostuttamatonta kasvualustaa (kosteus SDmaassa 1% ja peltomaassa 19 %). Koeruukku täytettiin kasvualustalla melkein kokonaan, tiivistettiin pudottamalla ruukku kolme kertaa n. 3 cm korkeudelta pöydälle ja painamalla kasvualustan pintaa kevyesti muovilevyllä. Tämän jälkeen täsmätettiin kasvualustan pinta n. 1.5 cm (vastaa n. 850 ml tilavuutta) ruukun reunan alapuolelle poistamalla tai lisäämällä kasvualustaa. Ruukut punnittiin ja lisättiin 1 cm kasvualustaa päälle, jonka jälkeen ruukut punnittiin uudelleen.

Koeruukutuksen perusteella biotestiruukkuihin lisättiin 900 g k-a SDmaata ja 750 g k-a hietamaata ennen siementen kylvöä. Siementen kylvösten päälle lisättiin 50% kostudessa (suhteessa vedenpidätyskykyyn) olevaa kasvualustaa taulukon 2 mukaisesti. Kompostia lisättäessä vähennettiin kasvualustan määrää kompostin kuivapainon verran, jotta kasvualustan kuivapaino olisi sama verranteessa ja testiruukuissa.

Taulukko 2. Koeruukutuksen perusteella määritetty 850 ml tilavuutta vastaava kasvualustamäärä sekä siemenkylvöksen päälle laitettavan kasvualustan määrä. Arvot on ilmoitettu sekä kuiva-aineena että käyttökosteudessa. Siemenkylvön päälle lisätty maa kostutettiin 50% vedenpidätyskyvystä.

Kasvialusta	STDmaa	STDmaa	Hietamaa	Hietamaa
Kasvi	Ki	Oh	Ki	Oh
Käyttökosteus (%)	0.9	0.9	10.1	10.1
Astiakapasiteetti (g H ₂ O/g)	0.38	0.38	0.49	0.49
Kasvialustaa ennen kylvöä (g k-a/ruukku)	900	900	750	750
Kasvialustaa siementen päälle (g k-a)	17	93	88	16
Kasvialustaa ennen kylvöä (g käyttökost.)	908	908	927	927
Kasvialustaa siementen päälle (g 50% WHC/ruukku)	20	110	20	110

3.4.2 Lannoitus

Standardin mukaan verrannekasvialusta ja tutkittava kasvialusta lannoitetaan vesiliukoisella, hivenaineita sisältävällä täyslannoitteella niin, että saadaan 225±25 mg N/l. Lisäksi typpeä sitovia materiaaleja testattaessa testiruukkuja lannoituskastellaan myös testin aikana. Tavoiteravinnetasoa runsasravinteisemmille testimateriaaleille voidaan järjestää lisäkontrolli, jonka ravinnepitoisuus nostetaan lannoituksella testimateriaalia vastaavalle tasolle. Biotestin tavoitelannoitustasoksi määriteltiin 240 mgN/l, 100 mgP/l ja 250 mgK/l.

MTT:n laboratoriossa valmistettiin neljä erilaista lannoiteliuosta ja niiden sisältämät ravinnemäärät on ilmoitettu taulukossa 3. Lannoiteliuosta, jossa typpimäärä oli puolitettu, annettiin puolelle typpibakteeritestin ruukuista (taulukko 4). Vastaavasti osalle mykorritsatestin ruukuista annettiin puolitettu fosforilannoitus. Kompostipellettiruukkujen lannoitus arvioitiin kompostin sisältämän liukoisen typen (tuoteselosteen mukaan 2.8 g/kg k-a kompostia) perusteella niin, että kompostin ja liuoslannoituksen yhteenlaskettu typpimäärä vastasi puolta testin verranteen typpimäärästä. Puolet kompostikäsitellyn typpilannoituksesta arvioitiin tulevan kompostista testin aikana vapautuvasta tpestä. Käytännössä kompostikäsitelyihin lisättiin samaa lannoiteliuosta kuin verranteeseen, mutta vähemmän (25 ml).

Lannoiteliukset sekoitettiin lähes kuivaan (kosteus 1 %) standardimaahan vadissa. Käytännössä sekoittaminen tehtiin kuhunkin ruukkuun tulevaan kasvualustamäärään erikseen. Hietamaan havaittiin koeruukutuksessa olevan niin kosteaa, että lannoiteliuksen sekoittamisen jälkeen kasvualusta tiivistyi liikaa. Lannoiteliuos annettiin peltomaata sisältäviin ruukkuihin kasteluna. Testin aika ruukkuja ei lannoitettu.

Taulukko 3. Biotesteissä käytettyjen ravinneliuosten koostumus.

	100N	50N	50P	Fe-lannos
Kemikaali	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
NH ₄ NO ₃	800	600	800	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	9440	0	9440	
KNO ₃	6570	6570	6570	
KH ₂ PO ₄	2040	2040	1020	
MgSO ₄ ·6H ₂ O	2800	2800	2800	
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	650	650	650	
MnSO ₄ ·H ₂ O	13.5	13.5	13.5	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11.5	11.5	11.5	
H ₃ BO ₃	16	16	16	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.9	1.9	1.9	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.2	1.2	1.2	
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0	7000	0	
K ₂ SO ₄	0	0	650	
FeCl ₃ ·6H ₂ O				484

Taulukko 4. Ravinneliuosten annostelu eri valmisteiden biotesteissä.

Koe	Kasvualusta	Tuotekäsittely	Lannoituskäsitte- ely	kasvualustaa g k-a/ruukku	Lannoite- liuos	Lann. liuosta ml/ruukku	Rauta- lannosta ml/ruukku
Typpibakteerivalmiste							
	SDmaa	Ei tuotetta	Optimaalinen	900	100N	100	10
	SDmaa	Typpibakteerivalmiste	Optimaalinen	900	100N	100	10
	SDmaa	Ei tuotetta	Puolitettu N	900	50N	100	10
	SDmaa	Typpibakteerivalmiste	Puolitettu N	900	50N	100	10
Kompostipelletti							
	SDmaa	Ei tuotetta	Optimaalinen	900	100N	100	10
	SDmaa	Kompostipelletti	Puolitettu N ja P	900	100N	25	10
	Hietamaa	Ei tuotetta	Optimaalinen	750	100N	100	10
	Hietamaa	Kompostipelletti	Puolitettu N ja P	750	100N	25	10
Mykorriitsavalmiste							
	SDmaa	Ei tuotetta	Optimaalinen	900	100N	100	10
	SDmaa	Mykorriitsavalmiste	Optimaalinen	900	100N	100	10
	SDmaa	Ei tuotetta	Puolitettu P	900	50P	100	10
	SDmaa	Mykorriitsavalmiste	Puolitettu P	900	50P	100	10

3.4.3 Toistojen määrä

Hajontaa voidaan biotestissä hallita sekä rinnakkaisten ruukkujen (toistojen) että ruukkuun kylvettävien siementen määrällä. OECD (2006) antaa tästä yleisohjeen, että toistojen määrä tulee olla riittävä käytettävään tilastolliseen menetelmään ja kasvin kasvuvasteen hajontaan nähden. Suurisiemenisiä (ja nopeakasvuisia) kasveja ei voida kylvää yhtä paljon ruukku kohti, jolloin niitä käytettäessä on syytä olla enemmän rinnakkaisia ruukkuja kuin pienisiemenisiä, tiheäkylvöisiä testikasveja käytettäessä. Yleisohje on, että siementen tiheys tulisi olla enintään 3-10/100 cm², mikä tekee esim. 5-10 vehnää 15 cm halkaisijaltaan olevaan ruukkuun. Standardissa EN 16086-1:2011 kiinankaalin siemeniä kylvetään 20 kpl halkaisijaltaan 12 cm ruukkuun (18 kpl/100 cm²) ja rinnakkaisia ruukkuja on vähintään kolme.

Biotestiruukut olivat halkaisijaltaan 13 cm ja niihin kylvettiin 6 kiinankaalin ja 10 ohran siementä. Itämisen jälkeen taimet harvennettiin niin, että kasvamaan jäi 3 kiinankaalin (2.3 tainta/100 cm²) ja 6 ohran tainta (4.6/100 cm²). Rinnakkaisia ruukkuja tehtiin kuusi. Riittävää toistojen määrää etsittiin analysoimalla osa kasvuparametreista 4, 5 ja 6 toistolla.

3.4.4 Siementen kylvö

Siemenet kylvettiin 5 päivää ruukutuksen jälkeen. Kylvö tehtiin tasattuun kasvualustan pintaan jakaen siemenet mahdollisimman tasaisesti pinnan alalle ja kasteltiin varovasti hajottajaa käyttäen. Mykorriitsakäsittelyn saavien ruukkujen siemenet pyöriteltiin ennen kylvöä 0.5 g:ssa mykorriitsapeittausjauhetta ja peittausjauhe kaadettiin siementen mukana ruukkuun. Siemenet peitettiin laittamalla ohraruukkuihin 1 cm kerros (88/93 g k-a, peltomaata/SDmaata) ja kiinankaaliruukkuihin 2 mm kerros (17 g k-a) 50% WHC:hen kostutettua kasvualustaa. Pinta tasattiin lopuksi kevyesti levyllä painaen ja ruukut peitettiin muovilla itämiseen saakka. Testi kirjattiin alkaneeksi kylvöpäivänä 20.3.2012.

3.5 Koeasetelma

Kukin lannoitevalmiste muodosti oman testinsä, johon valittiin tuotekohtaiset koekäsittelyt. Typpibakteerivalmisteen osalta tutkittiin typpilannoituksen (tavoitelannoitus 240 mgN/l tai puolitettu lannoitus 120 mgN/l) ja testikasvin vaikutusta tuotteen vaikutuksen havaitsemiseen. Kompostipelletin osalta selvitettiin kasvualustan ja testikasvin vaikutusta sekä mykorritsa- ja fosforilannoituksen (tavoitelannoitus 100 mgP/l tai puolitettu 50 mgP/l) vaikutusta tuotteen toimintaan. Testien käsittelyt ja verranteet on esitetty taulukossa 5.

Kukin testi sijoitettiin kasvihuoneeseen satunnaistettujen täydellisten lohkojen kokeen mukaisesti. Käytännössä testialue jaettiin lohkoihin koe-olosuhteiden todennäköisen vaihtelun mukaisesti. Lohkot pyrittiin muodostamaan niin, että lohkon sisällä lämpötila, valaistus ja kosteus olivat mahdollisimman samanlaiset. Olosuhteissa esiintyvät erot pyrittiin saamaan lohkojen välille. Ruukut sijoitettiin kahdelle pöydälle niin, että lohko muodostui kokeesta riippuen aina 4 tai 8 ruukun rivistä. Jokainen käsittely esiintyi lohkoissa kerran ja käsittelyn sijainti lohkoissa arvottiin. Liitteessä 1 on testialueen kartta.

Taulukko 5. Käytetyt testikasvit, kasvualustat ja lannoitustasot eri valmisteiden biotesteissä.

Koe	Kasvualusta	Testikasvi	Peruslannoitus	Tuotekäsittely
Typpibakteerivalmiste				
	SDmaa	Kiinankaali	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	SDmaa	Ohra	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	SDmaa	Kiinankaali	Tavoitelannoitus	Typpibakteerivalmiste
	SDmaa	Ohra	Tavoitelannoitus	Typpibakteerivalmiste
	SDmaa	Kiinankaali	Puolitettu N	Ei tuotetta
	SDmaa	Ohra	Puolitettu N	Ei tuotetta
	SDmaa	Kiinankaali	Puolitettu N	Typpibakteerivalmiste
	SDmaa	Ohra	Puolitettu N	Typpibakteerivalmiste
Mykorritsa- ja fosforilannoitus				
	SDmaa	Ohra	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	SDmaa	Ohra	Puolitettu P	Ei tuotetta
	SDmaa	Ohra	Tavoitelannoitus	Mykorritsa- ja fosforilannoitus
	SDmaa	Ohra	Puolitettu P	Mykorritsa- ja fosforilannoitus
Kompostipelletti				
	SDmaa	Kiinankaali	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	SDmaa	Ohra	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	Hieta	Kiinankaali	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	Hieta	Ohra	Tavoitelannoitus	Ei tuotetta
	SDmaa	Kiinankaali	Puolitettu N ja P	Kompostipelletti
	SDmaa	Ohra	Puolitettu N ja P	Kompostipelletti
	Hieta	Kiinankaali	Puolitettu N ja P	Kompostipelletti
	Hieta	Ohra	Puolitettu N ja P	Kompostipelletti

3.6 Testiolosuhteet ja testin hoito

Biotestikokeet toteutettiin Jokioisilla MTT:n osastoidussa kasvihuoneessa 20.3. - 25.4.2012. Kasvihuoneessa on kasvihuoneautomaatiikkaan perustuva kosteuden ja lämpötilan seuranta sekä säätö. Lämpötila kokeen osastossa oli päivällä $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ja yöllä $+18\pm 2^{\circ}\text{C}$. Valoisaksi ajaksi oli määritelty 16 tuntia, jolloin keinovalot kytkeytyivät automaattisesti päälle valotason alittaessa 200 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

Tavoitteena oli pitää yllä tasaista, riittävää kosteutta kaikille kasvilajeille ja kasvualustatyypeille. Tämä toteutettiin niin, että kaikki ruukut kasteltiin 2-3 päivän välein kastelijan silmämääräisen arvioon perustuen. Sopivaa kastelun määrää tarkkailtiin punnitsemalla koeruukut kerran viikossa. Lisälannoitusta ei testin aikana annettu.

3.7 Havainnot

Käyttämättömistä kasvualustoista määritettiin pH, orgaaninen aines, tilavuuspaino, huokostila ja vedenpidätyskyky. Määritykset tehtiin myös kompostilisätyistä kasvualustoista. Happamuus mitattiin sekä vesi- että CaCl_2 -uuttuna uutussuhteella 1+2.5 näyte:vesi. Orgaaninen aines määritettiin tuhkaamalla EN 13039: 1999 -standardin mukaisesti $+450^{\circ}\text{C}$:ssa.

Fysikaaliset määritykset tehtiin kasvualustoille tarkoitettujen EN-standardien mukaisesti. Kasvualusta valmistettiin määrityksiä varten sekä määritettiin laboratoriotiivistetty tilavuuspaino standardin EN 13040:1999 mukaisesti. Tilavuuspainon määrittäminen perustuu tässä standardissa 1 litran vetoisessa (korkeus 10 cm ja halkaisija 12 cm) astiassa olevan kasvualustan tiivistämiseen 8 g/cm^2 voimalla.

Kasvualustan ilma- ja vesitila määritettiin ns. sandbox -menetelmällä (EN 13041: 1999), joka perustuu kasvualustan kyllästämiseen vedellä ja veden poistamiseen hiekkapedillä, johon kohdistuu -10 cm imuvoima. Menetelmän avulla laskettiin myös kasvualustan vedenpidätyskyky. Tässä kokeessa vedenpidätyskyky määritettiin myös ns. suppilomenetelmällä, jossa lasisuppiloon asetettu 50 g kasvualustanäyte kasteltiin 30 min 100 ml vesimäärässä. Maan ja veden poisvaluminen estettiin lasivillatupolla ja letkunpuristimella. Maahan imeytymätön vesi valutettiin pois yön yli avaamalla letkunpuristin. Läpi valunut vesimäärä mitattiin. Näytteet kuivattiin ja laskettiin vedenpidätyskyky kuiva-ainetta kohti.

Kasvualustojen kosteutta seurattiin kolmella tavalla. Ruukut punnittiin kerran viikossa ja laskettiin kasvualustan kosteus paino-%. Kokeen lopussa määritettiin myös kasvualustan kuivapaino ruukuissa. Kompostikokeen yhteen lohkoon asennettiin minitensiometrit (vedellä täytettävät lasianturit), joiden sähkönjohtavuus mitattiin 2-7 päivän välein. Kolmantena tapana käytettiin kasvualustan vesipitoisuuden mittaamista kosteusanturilla (Grodan) 14 testiruukusta. Laitteen anturi (5 piikkiä) työnnettiin mittauksen ajaksi kasvualustaan ja kosteuslukema luettiin mittarista.

Itäneiden siementen määrä laskettiin 8 vrk kylvöstä. Kiinankaalien suurimman lehden pituus ja ohran pisimmän kasvin pituus tyvestä ylimmän lehden kärkeen mitattiin viikoittain. Kiinankaaleista laskettiin viikoittain myös lehtien määrä. Lehtivihreän toimintaa mitattiin klorofyllin fluoresenssimittarilla (Pocket Pea Chlorophyll Fluorimeter, Hansatech Instruments) kompostikokeesta 14 vrk ja mykorritsakokeesta 23 vrk kylvön jälkeen. Mittauksesta saadaan tietoa kasvin stressitilasta ja erilaisia tunnuslukuja viherhiukkasten toiminnasta. Fluoresenssimittari antaa voimakkaan valoimpulssin ja mittaa lehdestä poisheijastuvaa valoa ensimmäisen sekunnin aikana.

Testi päätettiin 5 viikkoa siementen kylvöstä laskemalla elossa olevien kasvien määrä ja leikkaamalla kasvit tyvestä. Kasvien tuore- ja kuivapainot (kuivatus x h +60°C) punnittiin ruukkukohtaisesti. Kaikista kompostikokeen kasveista määritettiin liukoisten ravinteiden pitoisuus (N, P, Ca, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn, Zn, S, Na).

Mykorritsakokeesta tutkittiin arbuskelimykorrhitsan (AM) juurikolonisaatio Grace ja Stribley:n (1991) menetelmän mukaan. Juuria pidettiin ensin 12 tuntia 10 %:ssa KOH:ssa, jonka jälkeen ne pidettiin 2 tuntia 1 %:ssa HCl:ssä. Tämän jälkeen juuret värjättiin mykorritsarakenteiden havainnollistamiseksi. Siihen käytettiin metyyliisistä väriainetta, 100 mg/l värjäysliuosta (maitohapon, glyserolin ja veden sekoitus). Värjättyjen juurten AM-kolonisaaation määrä arvioitiin silmävaraisesti stereomikroskooppia käyttäen asteikolla 0 – 100 %.

Mykorritsatuotteesta etsittiin AM-itiöitä seulomalla tuotteesta tehty vesisuspensio (runsaasti vettä ja vähän tuotetta) 0.25 ja 0.05 mm seulojen läpi. Seulonnassa tuotteen kiinteät osat jäävät karkeammalle seulalle ja mahdolliset AM-itiöt hienomman seulan päälle. Molempien seulojen päälle jäänyt aines pestiin Petri-maljoihin stereomikroskooppitarkastelua varten. Karkeammasta seulasta etsittiin tuotteen kiinteässä aineksessa mahdollisesti kiinni olevia AM-itiöitä. Hienommasta seulasta etsittiin irrallisia, karkeamman seulan läpi päässeitä AM-itiöitä.

3.8 Aineiston tilastollinen analysointi

Koejäsenten välisten merkitsevien erojen osoittamiseksi useimmat mitatut muuttujat analysoitiin tilastollisen testin avulla. Analyysit toteutettiin SAS Enterprise Guide 4.3 –ohjelmalla (SAS Institute 2006-2010) MIXED –proseduuria käyttäen. Testinä käytettiin varianssianalyysyä, joka oli sovellettu satunnaistettujen täydellisten lohkojen koeasetelmaan. Käsittely oli kiinteä tekijä ja lohko satunnaistekijä, koska haluttiin testata vain käsittelyn vaikutusta tutkittavaan muuttujaan. Lohkon vaikutus otettiin testissä huomioon, mutta sitä ei haluttu kuvata sen tarkemmin. Testissä sovellettava tilastollinen malli oli:

$$y_{ij} = \mu + \rho_i + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

jossa,

μ = yleiskeskisarvo

τ_j = käsittelyn j vaikutus

ρ_i = lohkon i vaikutus

ε_{ij} = koevirhe

Riittävän toistojen (lohkojen) määrän valitsemiseksi typpibakteerivalmistetta koskevan testin tulokset analysoitiin myös ottaen mukaan joko neljä tai viisi toistoa. Tämä toteutettiin niin, että analyysi suoritettiin kaikille mahdollisille toistojen kombinaatioille. Esim. viiden toiston osalta analyysi tehtiin kuusi kertaa jättäen analyysistä vuorotellen pois lohkon 1, 2, 3, 4, 5 tai 6. Vastaavasti neljälle toistolle tuli erilaisia lohkokombinaatioita 15.

4 Tulokset ja tuloksen tarkastelu

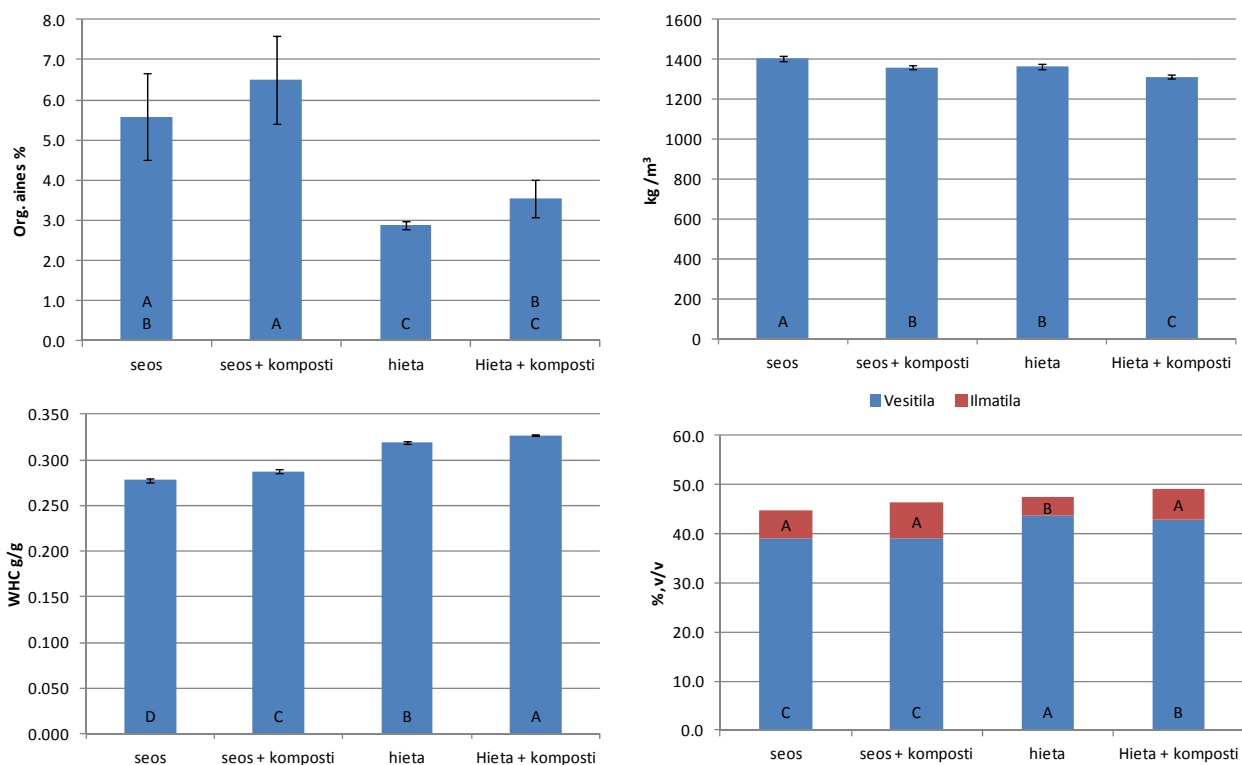
4.1 Kasvualustojen ominaisuudet

Standardimaan kalkitusta varten tehtiin koeseos, joka kalkittiin 6.9 g CaCO₃/kg k-a. Koeseoksen pH oli 6.1 (CaCl₂-uutto) kolme vuorokautta kalkitsemisen jälkeen. Tämän perusteella valittiin varsinaisen testimaan kalkitukseksi 6 g/kg k-a. Kalkitus osoittautui kuitenkin testin aikana ylimitoitetuksi. Standardimaan pH oli testin alussa 6.4 ja testin lopussa 7.5. Kompostin käyttö ei juuri nostanut pH-tasoa, sillä kompostiruukuissa pH oli testin lopussa 7.6. Peltomaan pH:ta ei säädetty kokeeseen ja se oli testin alkaessa 5.0. Kalkituksen vaikutus tulee näkyviin viiveellä ja yleensä kasvualusta kalkitaan viikkoa tai paria viikkoa ennen käyttöä. Tehty seos oli hyvin kuivaa eikä kalkitus kerinnyt vaikuttaa ennen testin alkua. Ilmeisesti myös kaoliini nosti pH:ta testin aikana. Kokemuksen perusteella standardimaan kalkitusta tulisi vähentää, todennäköisesti sopiva määrä on 3-4 g/kg.

Standardimaan tilavuuspaino oli kasvualustoille kehitetyn standardin mukaan tiivistettynä 1.41 kg/l ja peltomaan 1.36 g/l. Standardimaahan lisättiin maanparannusturvetta 5% kuivapainosta, mutta eloperäisen aineksen pitoisuus oli keskimäärin 5.5%. Hiedan eloperäisen aineksen määrä oli puolestaan 2.9%. Eloperäinen aines oli epätasaisemmin jakautunut standardimaassa kuin peltomaassa, mikä johtunee turpeen keinotekoisesta sekoittamisesta kivennäisaineiden sekaan.

Standardimaassa vesitilaa oli 39% ja ilmatilaa 6%. Hiedassa puolestaan vesitilaa oli hieman enemmän (44 %) ja ilmatilaa vähemmän (4 %), mikä näkyi myös standardimaata suurempana vedenpidätyskykynä.

Kompostipelletin biotestissä lisättiin molempiin kasvualustoihin sama määrä kompostia ruukku kohti, jolloin kompostia tuli hietamaahan enemmän kuiva-ainetta kohti (hieta 2.7 g/g k-a ja SDmaa2.2 g/g k-a). Komposti ei merkittävästi lisännyt orgaanisen aineksen määrää kummassakaan maatyypissä, mutta nosti kasvualustan vedenpidätyskykyä tilastollisesti merkitsevästi. Käytännön kannalta vaikutus ei ollut kuitenkaan suuri, sillä veden pidättyminen lisääntyi hietamaassa 2.5% ja standardimaassa 3.6%. Kompostin käyttö kevensi molempien kasvualustojen tilavuuspainoa 3-4%, mutta lisäsi merkittävästi (58%) vain hietamaan ilmatilaa. Jatkossa tulisi ottaa huomioon, että kompostin käyttömäärä tulisi laskea kasvualustan kuiva-ainetta kohti.



Kuva 1. Biotestissä käytettyjen kasvualustojen a) orgaaninen aines, b) tilavuuspaino, c) vedenpidätyskyky sekä d) vesi- ja ilmatila. Kasvualustaan lisätty komposti (käyttömäärä) oli biolietepohjainen ja pelletöity, mutta pelletit murskattiin ja testiin käytettiin vain 6 mm seulan läpi menneet osa.

4.2 Orgaanisten lannoitevalmisteiden toimivuus testissä ja siihen vaikuttavat tekijät

4.2.1 Lannoitustason ja testikasvin vaikutus typpibakteerivalmisteen toimivuuteen

Typpibakteerivalmiste ei voinut vaikuttaa testikasvien itävyyteen, sillä valmiste annettiin vasta siementen itämisen jälkeen. Pituuskasvuhavaintojen tilastollinen testaaminen toi esiin joitakin valmisteen vaikutuksia. Typpibakteerivalmiste ei vaikuttanut ohran kasvuun puolitetulla typpilannoituksella, mutta optimaalisella typpilannoituksella jonkin verran (Kuvat 2 ja 7). Erot eivät olleet käytännön kannalta kovin suuria. Ennen valmisteen ensimmäistä antoa, typpibakteerikäsittelyn saavat ohrat olivat vajaan 1 cm verran etäisiä pidempiä, mutta 14 vrk kohdalla eroa ei enää ollut. Sen sijaan 23 vrk kohdalla typpibakteerivalmistetta saaneet ohrat olivat vajaa 0.5 cm verran etäisiä lyhyempiä, mutta 29 vrk kohdalla 2.7 cm pidempiä.

Kiinankaalilla tulokset olivat samansuuntaisia kuin ohralla. Typpibakteerivalmiste ei vaikuttanut kiinankaalin pisimmän lehden pituuteen merkitsevästi puolitetulla typpilannoituksella, mutta optimaalisella kivennäislannoituksella valmistetta saaneiden kiinankaalien lehdet olivat 2.5 cm verran suurempia 29 vrk kohdalla. Huomionarvoista tuloksissa on myös se, että ohralla saatiin tilastollisesti merkitseviä eroja pienemmillä suhteellisilla kasvueroilla kuin kiinankaalilla.

Kokeen lopussa (36 vrk) määritetyn versojen kuivapainon mukaan typpibakteerivalmiste ei vaikuttanut ohran tai kiinankaalin biomassaan kummallakaan lannoitustasolla (Kuva 8).

Typpilannoitustaso vaikutti testikasvien kasvuun jonkin verran. Puolitetun typpilannoituksen saaneet ohrat olivat 1.3 cm verran taimia pidempiä 8 vrk kylvöstä, mutta 23 vrk kohdalla lähes 2 cm lyhyempiä. Typpilannoituksen vähentäminen kasvatti myös kiinankaalien lehtikokoa testin alkuvaiheessa, mutta 14 vrk eteenpäin vaikutusta ei ollut havaittavissa. Puolitettu typpilannoitus vähensi kiinankaalin biomassakertymää testin aikana vajaa 9%, mutta ei ohran.

Typpibakteerivalmiste tai lannoituksen pienentäminen eivät vaikuttaneet kasvien stressitasoon (fluoresenssimittarilla mitattuna) ainakaan 23 vrk itämisen jälkeen. Valmisteella tai typpilannoitustasolla ei ollut vaikutusta myöskään kiinankaalin yhteyttämiseen. Alhaisemmalla lannoitustasolla reaktiokeskukset hieman vähenivät, mutta niiden toiminta tehostui, mikä kompensoi yhteyttämisen valoreaktiot samalle tasolle verranteen kanssa. Ohralla oli havaittavissa lievää reaktiokeskusten toiminnan tehostumista, mutta lehtitasolla ei sanottavaa muutosta valoreaktioiden nopeudessa.

Typpibakteerivalmisteen sisältämää mikrobistoa ei tutkittu testissä käytettävästä erästä, mutta hankkeen aikana valmisteesta tehtiin hyvinkin tarkkoja määrytyksiä. Määrytyksissä selvisi, että tuote sisälsi valmistajan lupauksen mukaisesti *Azoarcus*-, *Azorhizobium*- ja *Azospirillum* -sukuisia bakteereja, mutta kaikkien bakteerilajien pitoisuudet tuotteessa eivät olleet luvulla tasolla (Orasmaa 2012). Bakteerikannat tuottivat indoli-3-etikkahappoa, ACC-deaminaasia sekä sideroforia ja näiden ominaisuuksien perusteella tuotteella voisi olla kasvien kasvua edistävää vaikutusta. Lyhytaikaisissa kasvatuskokeissa vain *Azospirillum brasilense* -kanta paransi kiinankaalin versojen kasvua 41 %. Muihin käytettyihin testikasveihin sillä ei ollut vaikutusta. Toisaalta kasvua edistävää vaikutusta ei havaittu käytettäessä typpibakteerituotetta sellaisenaan.



Kuva 2. Kiinankaalit (vasen) ja ohrat typpibakteerivalmisteen biotestin lopussa. Yhdessä kasviritivissä on saman käsittelyn rinnakkaiset (6) ruukut ja käsittelyn nimi on rivin yläpuolella.

4.2.2 Testikasvin ja kasvualustan vaikutus kompostipelletin testitulokseen

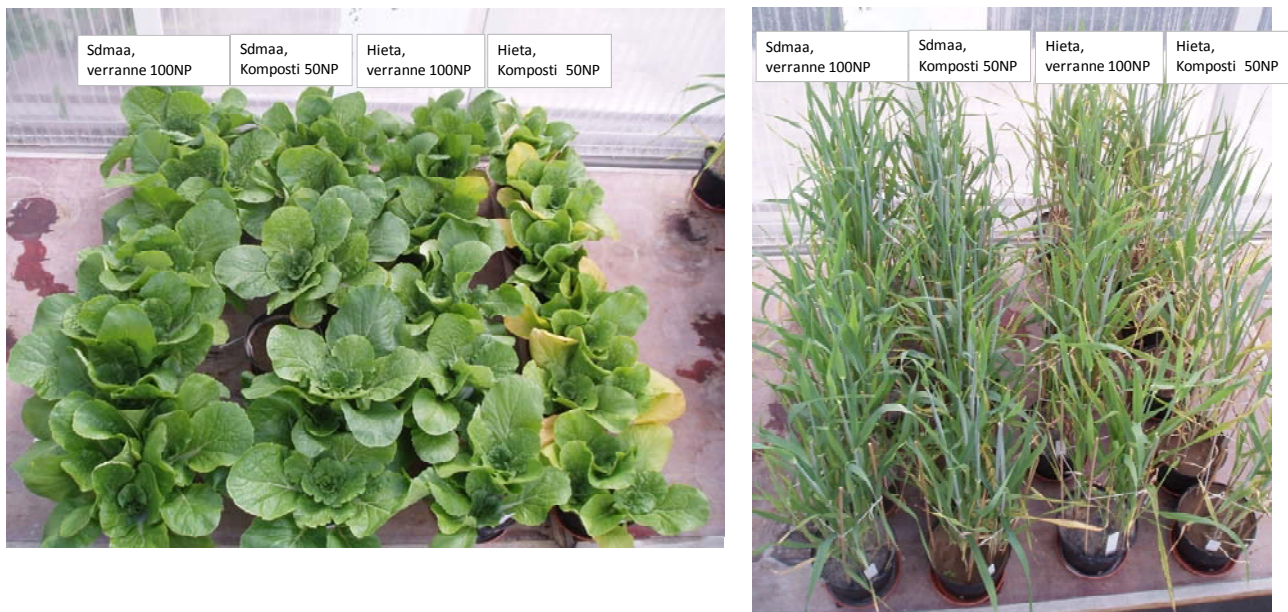
Standardimaassa kompostin käytöllä ei ollut vaikutusta kiinankaalin tai ohran itämiseen (Taulukko 6). Sen sijaan hietaan sekoitettaessa, komposti paransi kiinankaalin, mutta ei ohran ($p=0.061$) itävyyttä hiedassa. Vain puolet kylvetyistä kiinankaaleista iti pelkässä hietamaassa. Koska itävyys kuitenkin standardimaassa oli yli 90%, voidaan päätellä, että hietamaalla oli itämistä heikentävä vaikutus. Hietamaan osalta testi ei siis täytä yleisiä fytotoksisuusbiotestin kelpoisuusvaatimuksia. OECD:n ohjeiden mukaan itävyys tulisi olla verranteessa yli 70% ja standardin (EN 16086-1:2011)

mukaan 85%. Toisaalta kompostin itämistä parantava vaikutus tuli selvästi ilmi, kun verranteen itävyys ei ollut optimaalinen. Jos halutaan saada esiin myös tuotteiden positiivisia vaikutuksia, ei verranteen kasvu välttämättä kannata olla optimaalisella tasolla.

Komposti ei vaikuttanut ohran pituuskasvuun testin aikana, mutta testin lopussa kompostiseoksessa kasvaneet ohrat olivat 15-20% verrannetta kevyempiä (Kuvat 7 ja 8).

Aluksi komposti nopeutti kiinankaalin pituuskasvua 75% hietamaassa, mutta ero väheni kokeen loppua kohti. Standardimaassa kompostilla ei ollut merkittävää vaikutusta kiinankaalin kasvuun, vaikka kompostia saaneet olivatkin keskimäärin pienempiä kuin verrannekasvit. Kokeen lopussa tehty kasvien punnitus paljasti kuitenkin toisenlaisia tuloksia. Komposti heikensi kiinankaalin kasvua sekä standardimaassa (-29%) että hiedassa (-21%).

Kiinankaali kerrytti kuivapainoa 8% enemmän standardimaassa kuin peltomaassa ja kompostin käytön vaikutus tuli standardimaassa paremmin esiin (Kuva 6). Ohra kasvoi yhtä hyvin standardimaassa ja hiedassa. Kompostin vaikutus kasvuun voi johtua lannoitustasosta, kompostin haitta-aineista ja kiinankaalilla myös liiallisesta märkydestä (ks. 4.2.3).

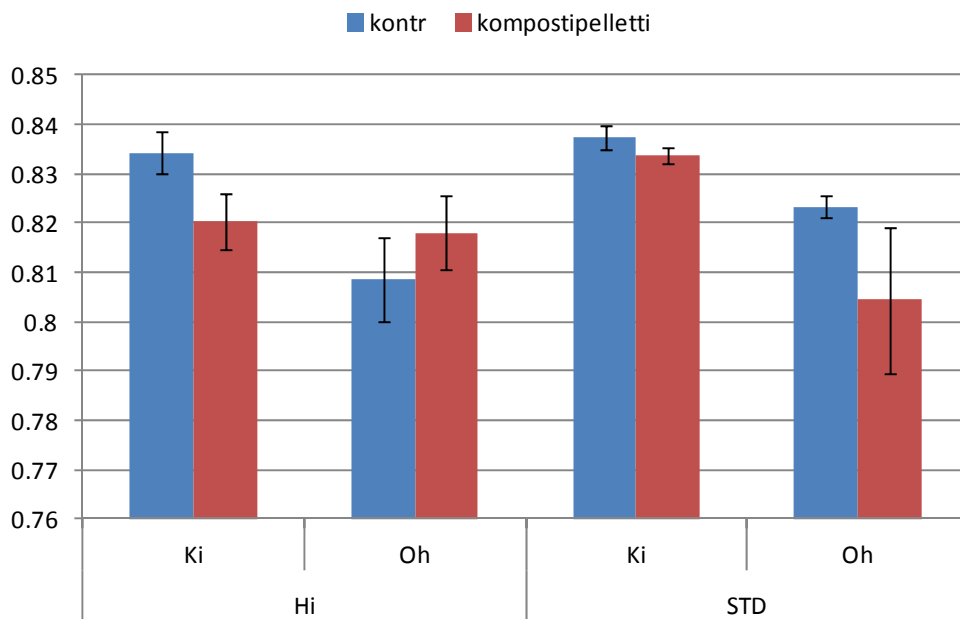


Kuva 3. Kiinankaalit (vasen) ja ohrat kompostipelletin biotestin lopussa. Yhdessä kasv rivissä on saman käsittelyn rinnakkaiset (6) ruukut ja käsittelyn nimi on rivin yläpuolella.

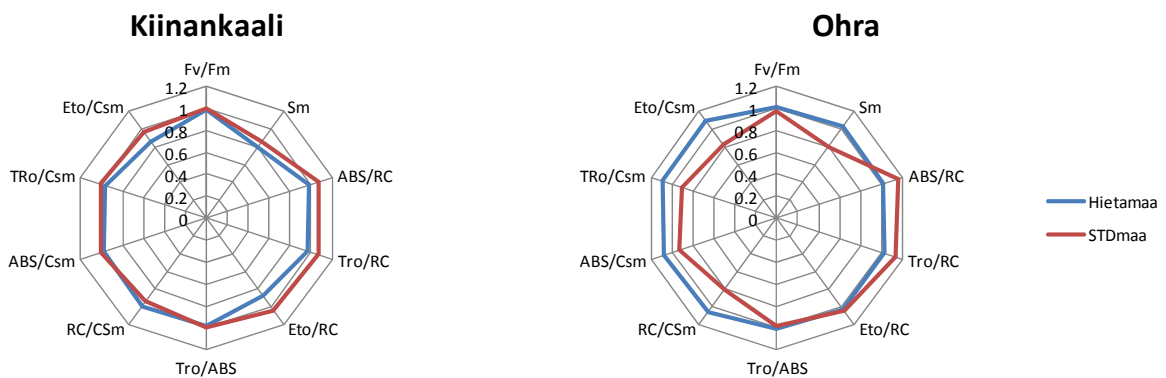
Stressitasoa kuvaavan parametrin (F_v/F_m -suhde) arvot osoittivat biotestin kiinankaalien voivan hieman ohraa paremmin testiolosuhteissa (Kuva 4). Komposti lisäsi hieman kiinankaalin stressitasoa hietamaassa. Ohralla viitteitä stressin vähenemisestä kompostiruukuissa, mutta rinnakkaisten määritysten vaihtelu oli niin suurta että vaikutus ei todennäköisesti olisi merkittävä (aineistoa ei ole käsitelty tilastollisesti).

Kompostikäsitteilyn vaikutus yhteyttämisreaktioihin riippui kasvualustasta (Kuva 5). Kompostikäsitteilyllä oli hietamaassa kiinankaalin yhteyttämisreaktioita heikentävä vaikutus, erityisesti elektroninsiirtoketju QA:lta eteenpäin oli heikentynyt. Komposti heikensi ohralle valoenergian kanavoitumista yhteyttämiseseen SDmaassa. Tuloksia tulkittaessa on syytä muistaa, että mittaus kertoo hetkellisestä yhteyttämisestä tehokkuudesta. Tässä tapauksessa mittaukset tehtiin

kiinankaalien suurimpien lehtien ollessa 5-7 cm. Tulos ei ole tue samaan aikaan tehtyjen kasvumittausten tuloksia, sillä tässä vaiheessa komposti lisäsi kiinankaalin lehtikokoa hietamaassa eikä kompostilla ollut vaikutusta ohran pituuskasvuun.



Kuva 4. Testikasvien stressitaso kompostipelletin biotestissä lehtivihreän fluoresenssimittarilla mitattuna. Mitä suurempi arvo stressitasoa kuvaavan suhdeluvun (Fv/Fm) arvo on, sitä vähemmän kasvi kärsii stressistä. Stressittömän kasvin lehdistä mitatun Fv/Fm –suhteen arvo on 0.86.



Kuva 5. Kompostin vaikutus testikasvien yhteyttämisreaktioihin hietamaassa ja SDmaassa. Ympyrän oikealla olevat muuttujat kuvaavat yksittäisten viherhiukkasten toimintaa ja vasemmalla puolella olevat muuttujat puolestaan reaktiokeskusten määrää (RC/Csm) ja yhteyttämisen tehokkuutta lehtipinta-alaa kohti. Jos kaaviossa oleva käyrä ylittää arvon 1, kompostilla on ollut haitallinen vaikutus kyseiseen muuttujaan.

4.2.3 Fosforilannoituksen vaikutus mykorrhitsavalmisteen toimivuuteen

Mykorrhitsatuote ei vaikuttanut ohran itävyyteen, pituuskasvuun tai kuiva-ainekertymään kokeen aikana (kuva 6). Myöskään stressitasossa ei havaittu muutoksia 14 vrk kohdalla. Mykorrhitsan biotestissä ei ollut mukana kiinankaalia, sillä se ei muodosta mykorrhitsasymbioosia lainkaan. Testikasvin juuristoista löytynyt sienijuurirakenteita. Myöskään tuotteessa ei löytynyt mykorrhitsaan viittaavia rakenteita mikroskopoinnilla eikä se aiheuttanut mykorrhitsoitumista ruokohelvellä.

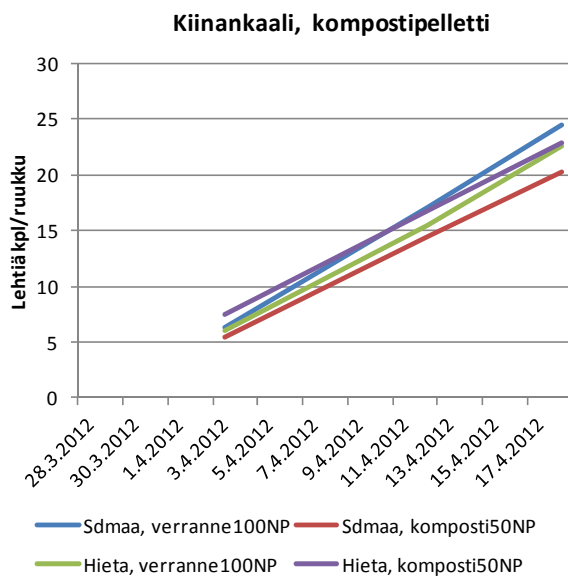
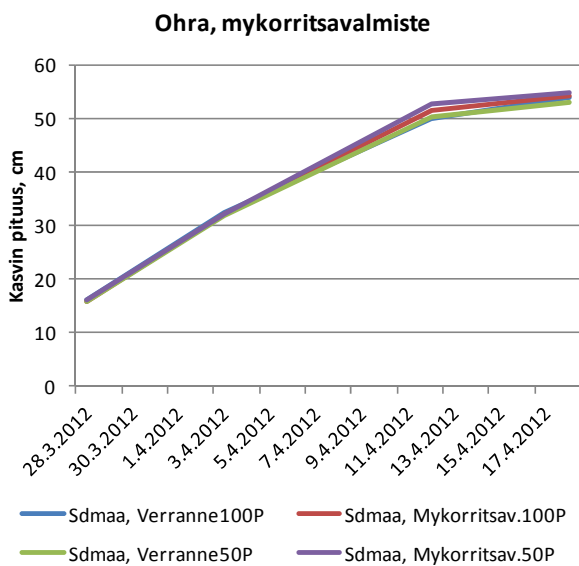
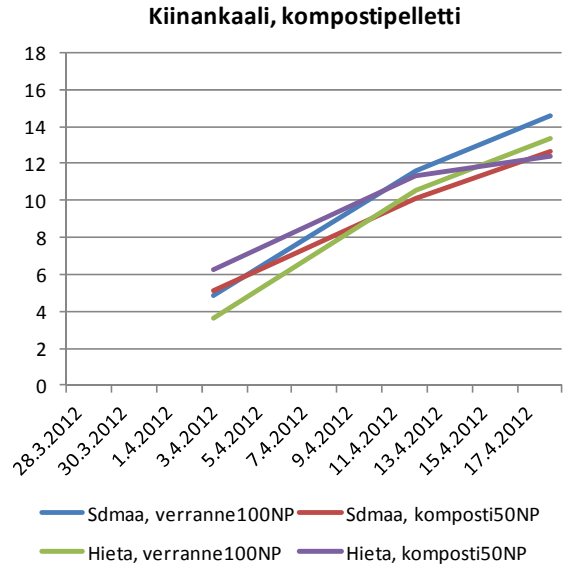
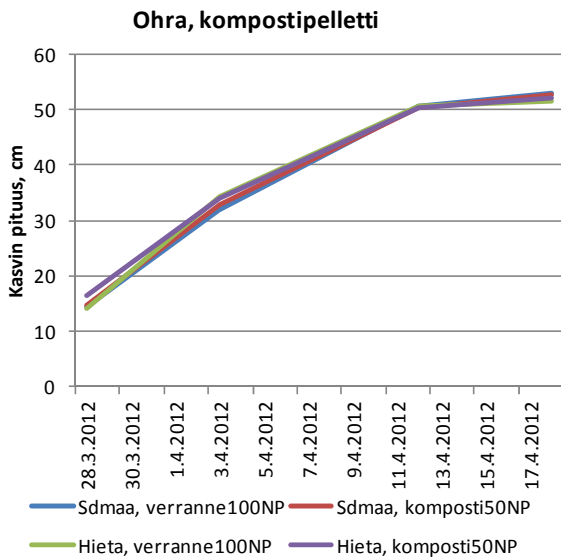
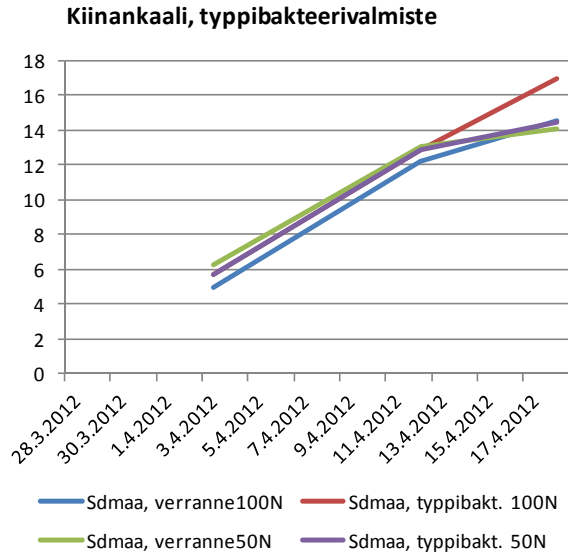
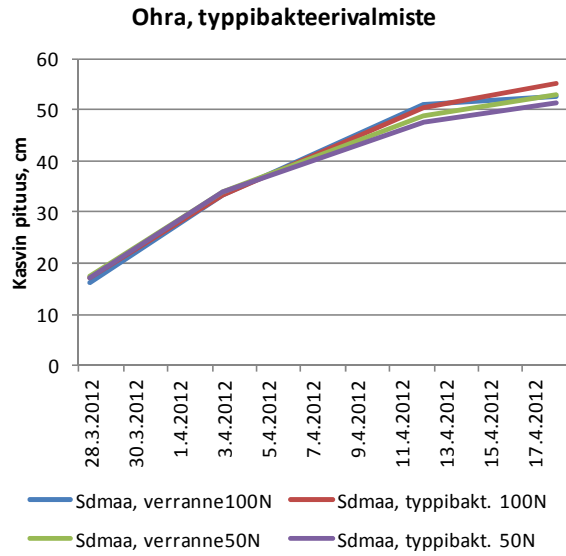
Puolitettu fosforilannoitus ei vaikuttanut ohran pituuskasvuun (Kuva 7), mutta kokeen lopussa vähemmän fosforia saaneet kasvit olivat 9% kevyempiä (Kuva 8).



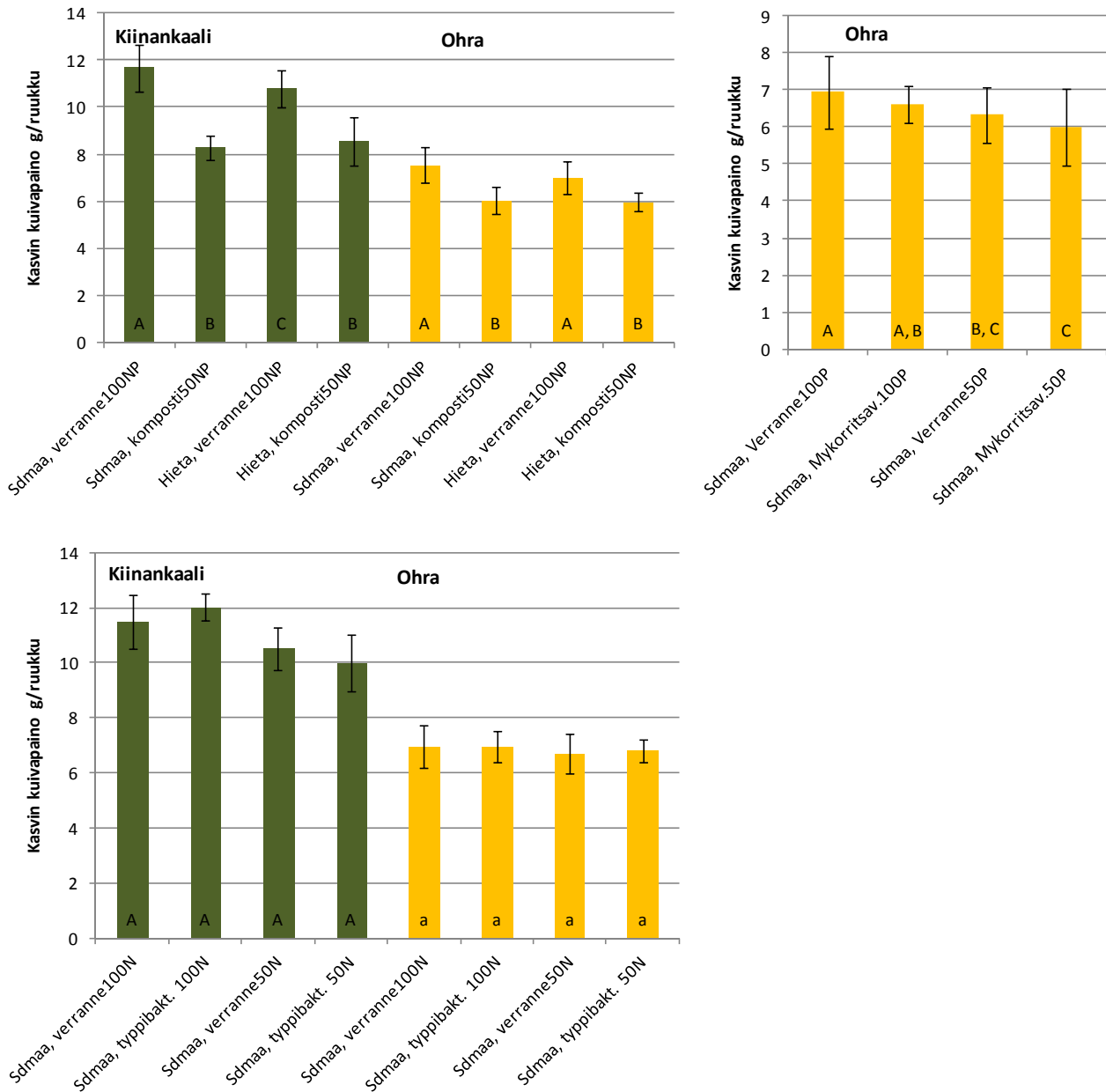
Kuva 6. Ohrat mykorritsavalmisteen biotestin lopussa. Yhdessä kasviryivissä on saman käsittelyn rinnakkaiset (6) ruukut ja käsittelyn nimi on rivin yläpuolella.

Taulukko 6. Itäneiden testikasvien määrä ruukussa 8 vrk kylvön jälkeen. Kiinankaalin siemeniä kylvettiin 6 kpl ja ohran siemeniä 10 kpl/ruukku. Keskivirhe kertoo itäneiden määrän keskiarvoestimaatin vaihtelusta.

Testikasvi	Käsittely	Itäneet kpl	Keskivirhe
Kiinankaali	Sdmaa, verranne100N	5.7	0.25
Kiinankaali	Sdmaa, typpibakt. 100N	5.8	0.25
Kiinankaali	Sdmaa, verranne50N	5.8	0.25
Kiinankaali	Sdmaa, typpibakt. 50N	6.0	0.25
Kiinankaali	Sdmaa, verranne100NP	5.5	0.49
Kiinankaali	Sdmaa, komposti50NP	6.0	0.49
Kiinankaali	Hieta, verranne100NP	3.0	0.49
Kiinankaali	Hieta, komposti50NP	4.8	0.49
ohra	Sdmaa, verranne100N	9.7	0.25
ohra	Sdmaa, typpibakt. 100N	9.0	0.25
ohra	Sdmaa, verranne50N	9.5	0.25
ohra	Sdmaa, typpibakt. 50N	9.7	0.25
ohra	Sdmaa, verranne100NP	8.8	0.49
ohra	Sdmaa, komposti50NP	9.3	0.49
ohra	Hieta, verranne100NP	8.0	0.49
ohra	Hieta, komposti50NP	9.3	0.49
ohra	Sdmaa, Verranne100P	9.3	0.35
ohra	Sdmaa, Mykorritsav.100P	9.2	0.35
ohra	Sdmaa, Verranne50P	9.3	0.35
ohra	Sdmaa, Mykorritsav.50P	9.2	0.35



Kuva 7. Testikasvien pituus biotestin aikana eri käsittelyissä sekä kiinankaalin lehtien määrä kompostipellettitestissä.



Kuva 8. Testikasvien kuivapaino kompostipelletin, mykorritsavalmisteen ja typpibakterivalmisteen biotestin lopussa (n=6).

4.3 Ruukutus ja kylvö

Kasvualustan määrä ruukussa vakioitiin tilavuuden suhteen niin, että ennen siementen kylvöä kasvualustaa tuli ruukkuun 850 ml. Tämä tehtiin siksi, että ruukut saatiin yhtä täyteen kasvualustan ominaispainosta riippumatta. Kun kasvualustan tilavuus ja samalla syvyys ruukuissa on sama, antaa tämä hyvät lähtökohdat myös pinta-alaa kohti levitettävien lannoitevalmisteen käytölle testissä. Käytännössä päätettiin kuitenkin lisätä kasvualusta ruukkuihin punnitsemalla, koska näin saatiin maamäärä helpommin vakioitua rinnakkaisten ruukkujen välillä. Tämä aiheutti paljon laskemista. Tilavuus muunnettiin koeruukutuksen avulla painoksi, mutta luotettavampi tapa olisi ollut käyttää standardimenetelmällä tiivistettyä tilavuuspainoa. Koeruukutuksen avulla määritetty tilavuus ei

ollut kovin luotettava, sillä tilavuuden ja painon suhde (SDmaa 1060 ja hieta 882 g/l) ei vastannut standardimenetelmällä määritettyä tilavuuspainoa (ks. 4.1). Erityisesti hietamaan osalta koeruukutuksessa määritetty tilavuus oli liian löyhä ja maa painui kokeen aikana silminnähden. Litran ruukkuun sopiva SDmaan tai hietamaan määrä on 900 g k-a. Koska hietamaan tilavuuspaino sandbox –määrityksessä oli hyvin lähellä SDmaan tilavuuspainoa, molemmille tässä testissä käytetyille kasvualustoille voidaan soveltaa samaa ohjetta.

Koska eri kasvien siemenet suositellaan kylvettäväksi eri syvyyteen, kylvösten päälle laitettava maa vaihteli testikasvin mukaisesti. SDmaa kuitenkin kovettui ruukussa ollessaan, mikä silmämääräisesti arvioiden vaikeutti itujen nousemista maasta. Itävyys kuitenkin oli molemmissa kasvualustoissa riittävän hyvä (ks. 3.3.3). Kylvökset voitaisiin peittää vaihtoehtoisesti jollain muulla aineksella, esim. hiekalla tai vermikuliitilla, mutta tulokset eivät antaneet aihetta tähän.

Siemeniä kylvettiin suurempi määrä kuin testissä tarvittiin. Tämä osoittautui onnistuneeksi ratkaisuksi, sillä hietamaassa vain puolet kiinankaaleista iti. Testissä, josta havainnoidaan sekä itävyys että kasvin kasvu, on oltava riittävä määrä siemeniä ruukkuun kohti itävyyden luotettavaksi määrittämiseksi. Ruukkuun ei kuitenkaan kannata jättää kasvamaan kovin montaa tainta, jotta keskinäinen kilpailu ei rajoittaisi testikasvien kasvuun. Kun itämisen jälkeen jätetään vain osa kasveista kasvamaan suuriksi, itävyydessä mahdollisesti ilmenevät erot eivät heijastu enää kasvien kasvuun taimitehden ollessa sama kaikissa ruukuissa.

Testiä lopetettaessa havaittiin, että vetistä liejua oli joidenkin ruukkujen pohjalla. Tämä saattoi johtua joko harsokankaan huokosten tukkeutumisesta tai kasvualustan tiivistymisestä kokeen aikana esim. liiallisen kastelun vuoksi. Tiivistymisen ja hapettomien olosuhteiden ehkäisemiseksi juuristovyöhykkeellä on tärkeää, että vähän ilmatilaa sisältäviä kasvualustoja ei ylikastella testin aikana. Lisäksi ylimääräisen veden poistuminen ruukusta on järjestettävä.

4.4 Lannoitus

Testikasveista tehdyt ravinnemääritykset osoittivat biotestin lannoituksen tärkeyden vertailukelpoisten tulosten saamiseksi. Testikasvit olivat saaneet hietamaassa enemmän fosforia kuin SDmaassa, vaikka testin alussa molemmille annettiin sama lannoitus (Taulukko 7). Kiinankaalilla vaikutus oli suurempi (90%) kuin ohralla (17-37%). Tämä johtuu ilmeisesti peltomaan luontaisista fosforivarannoista, jotka keinotekoisesti tehdystä maasta puuttuvat. Standardimaata käytettäessä riittävän lannoituksen merkitys korostuu. Toisaalta taas ravinnetaso on helpommin hallittavissa, kun ravinnereservejä ei ole.

Myös typen ja fosforin lannoitustaso vaikutti testikasvien ravinteiden saantiin. Puolitettu fosforilannoitus vähensi ohran fosforinsaantia kolmanneksen. Fosforilannoituksen vaikutusta kiinankaalin fosforin ottoon ei tuloksista tule ilmi, sillä mykorritsatuotteen testauksessa ei käytetty kiinankaalia. Typpilannoituksen puolittaminen näkyy selvästi molempien kasvien typen ja kalsiumin otossa, kiinankaalilla myös hivenravinteiden otto heikentyi typpilannoituksen vähentyessä.

Kompostin vaikutus näkyy testikasveissa erityisesti typen, kalsiumin ja natriumin otossa. Kompostikäsittelyissä kasvaneet testikasvit olivat saaneet vähemmän typpeä kuin verrannekasvit. Kompostin vaikutus typen ottoon oli suurempi hietamaassa (-35/-40%) kuin standardimaassa (-18/-19%). Kompostista kasveille saatavissa oleva typpi oli siis testin lannoitusta suunniteltaessa yliarvioitu. Oletuksena oli, että puolet tavoitetason typestä vapautuisi kompostista, mutta

käytännössä vapautumista ei tapahtunut. Tämä vahvistettiin testin jälkeen tehdyssä typen mineralisaatiomäärityksessä (Salo ym. 2013), mutta testiä suunniteltaessa tietoa orgaanisen typen vapautumisesta kompostista ei ollut käytettävissä. Kompostista tulevat suolat näkyvät selvästi kasvien Na-pitoisuuden nousuna. Hietamaassa fosforin ja kaliumin saanti oli vähentynyt jonkin verran (12-16%) kompostikäsitellyissä, mutta SDmaassa ei.

Taulukko 7. Ravinnepitoisuudet testikasveissa biotestin lopussa (5 viikkoa).

Kasvi	Kasvual.	Käsittely	N	Ca	K	Mg	P	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
			% k-a	g/g k-a									
Ki	hieta	Verranne 100NP	1.84	14.4	28.3	1.7	4.1	3.8	0.5	7.8	311.2	37.2	21.8
Ki	hieta	Komposti 50N50P	1.11	8.9	21.5	1.1	3.4	3.6	2.2	6.5	294.5	24.7	14.7
Ki	STDmaa	Verranne 100NP	1.90	18.5	23.6	1.5	2.2	5.2	1.6	7.3	154.0	61.7	21.5
Ki	STDmaa	Komposti 50N50P	1.55	13.1	20.8	1.2	2.4	5.4	2.4	7.7	145.3	47.3	20.5
Ki	STDmaa	Verranne 100N	2.01	17.8	27.8	1.4	2.3	5.6	1.6	6.6	103.0	62.2	22.0
Ki	STDmaa	Verranne 50N	1.37	13.9	25.9	1.2	2.6	5.7	1.0	7.7	68.0	46.5	18.2
Oh	hieta	Verranne 100NP	2.43	5.8	33.2	1.5	3.2	3.0	0.3	8.0	80.3	39.3	33.0
Oh	hieta	Komposti 50N50P	1.58	3.8	27.6	1.3	2.8	2.0	2.3	8.0	93.7	35.3	24.8
Oh	STDmaa	Verranne 100NP	2.68	6.8	36.9	1.7	2.3	2.9	1.7	7.5	167.7	78.8	17.8
Oh	STDmaa	Komposti 50N50P	2.17	7.0	38.2	1.6	2.5	2.4	3.4	11.0	132.7	120.2	35.0
Oh	STDmaa	Verranne 100P	2.90	8.0	42.6	1.6	2.7	3.3	1.7	7.7	63.8	78.8	20.3
Oh	STDmaa	Verranne 50P	2.86	7.5	45.1	1.6	1.8	2.7	1.2	8.4	63.7	90.3	23.3
Oh	STDmaa	Verranne 100N	2.86	7.7	41.8	1.7	2.6	3.3	1.6	7.6	61.2	80.5	20.3
Oh	STDmaa	Verranne 50N	2.00	6.8	38.5	1.5	3.4	2.9	1.3	7.8	56.2	70.8	22.2

4.5 Kastelu

Koeruukkuja kasteltiin 2-3 päivän välein kastelijan arvioon perustuen. Testiruukkujen kosteutta seurattiin biotesteistä kolmella rinnakkaisella tavalla. Pian kokeen alkamisen jälkeen huomattiin, että tensiometrilukemat eivät muuttuneet kokeen aikana vallitsevissa kosteusoloissa juuri lainkaan ja tästä mittauksesta luovuttiin. Käytetyt kasvualustat saattoivat olla liian karkeitä tensiometreille ja kosteustason vaihtelut liian pieniä. Tensiometrejä ei voida suositella käytettäväksi näillä kasvualustoilla toteutettavassa biotestissä.

Kosteusmittarin avulla saatiin kasvualustan vesipitoisuus (tilavuus-%) selville nopeasti. Tulokset osoittivat, että testiruukkujen kosteus vaihteli kokeen aikana huomattavasti käytetyllä kastelumenetelmällä (Kuva 1). Seurattujen 14 ruukun keskimääräinen (mittaus 6, 8, 10, 14, 21 ja 28 vrk kohdalla) kosteus oli $32 \pm 8.7\%$ ja vaihteluväli 16-63%. Standardimaan vesitila oli sandbox-määrityksessä 39 % ja hiedan 44%. Pikamittarilla määritettynä kasvualustan kosteus ylitti ajoittain tämän maksimaalisen vesitilan, mikä osoitti ylikastelua.

Kolmantena kosteustason määritystapana käytettiin ruukkujen punnitsemista. Kaikki ruukut punnittiin, kun testi oli kestänyt 8, 14, 21, 28 ja 35 vrk. Punnitustuloksen ja kasvualustan kuiva-aineen perusteella laskettiin kasvualustan vesipitoisuus paino-%. Kompostin biotestin lopussa kosteimpia olivat kiinankaalit, jotka kasvoivat kompostikäsitellyissä. Kompostiruukut olivat myös kosteampia kuin verranneruukut. Vaikka testikasvien kasvu oli heikompaa kompostikäsitellyissä, ei tätä oltu huomioitu kastelun mitoittamisessa. Samaa trendiä oli havaittavissa myös muissa biotesteissä: heikommin kasvavien kasvien ruukut olivat kosteimpia.

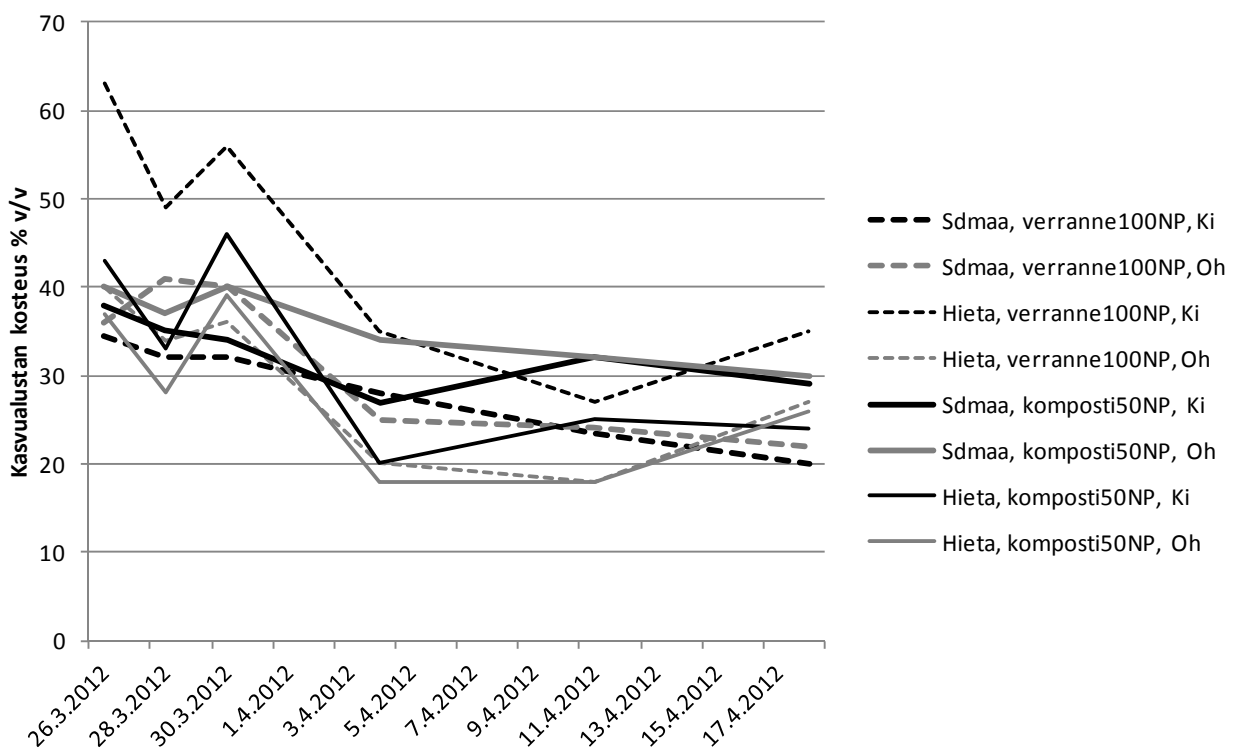
Pikamittarilla ja punnituksen avulla määritetty kasvualustojen vesipitoisuus korreloi melko heikosti, kun katsotaan kaikkia mittauksia yhdessä (38 %). Korrelaatio oli kuitenkin kokeen alussa melko korkea (72% 6 vrk kokeen alusta), mutta heikkeni kokeen loppua kohti (28% 28 vrk kokeen alusta). Tämä viittaa siihen, että testikasvien paino alkaa häiritä luotettavan kosteusmittaustuloksen saantia punnitsemalla.

Pikamittarin huonona puolena oli se, että anturi teki joka mittauskerralla reiät kasvualustaan, mikä saattoi vaikuttaa kasvualustan vedenläpäisevyyteen. Lisäksi anturi tulee puhdistaa huolellisesti verranteen ja testattavan materiaalin välillä, sillä se voi kontaminoida verranteen, jos tutkitaan esim. mikrobituotteita. Pikamittarilla ei myöskään havaittu ruukkujen pohjalle kertynyttä liiallista märkyyttä.

Kosteuden määrittäminen punnituksen avulla on melko hidasta ja kasvin paino vaikuttaa tuloksiin. Viimeisistä punnitusten avulla määritetyistä kosteushavainnoista oli mahdollista vähentää kasvin paino, sillä kasvit punnittiin kokeen lopussa. Muilta mittauskerroilta ei kasvipainoa pystytty luotettavasti määrittämään, sillä korrelaatio kasvin pituuden ja painon välillä oli heikko. Ruukkujen vesimäärän selvittäminen punnitsemalla onkin käyttökelpoinen menetelmä, jos testikasvin paino (verso + juuret) ei muodosta huomattavaa osaa ruukun painosta. Nyt verson paino muodosti kokeen lopussa keskim. 6% ruukun kokonaispainosta. Haittana on myös se, että punnitustuloksen muuttaminen kosteustasoksi vaatii laskutoimituksia. Toisaalta punnitsemista voidaan hyödyntää kastelun yhteydessä annettavan veden määrän perusteena. Tällöin ruukut tulee siirtää kastelua varten vaa'alle ja vesimäärän annostelu hidastuu. Tämä on tarkin, mutta työläin menetelmä.

Tulosten perusteella kastelu pitäisi pystyä mitoittamaan tarkemmin kasvin tarpeiden mukaiseksi. Tämä tulee toisaalta olemaan helpompaa, jos testikasveja ja kasvualustatyyppejä on testissä vain yksi. Kosteusmittauksia ei pystytty testissä hyödyntämään kastelutarpeen mitoittamisessa.

Standardissa ohje kastelun järjestämisestä on varsin väljä. Yleisohjeena on, että kastelu tehdään kasvualustan pintaan laatuluokan 3 vedellä ja kasteluväli riippuu kasvu- ja ympäristöolosuhteista. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää standardissa ISO 22030 esitettyä kasteluprosessia, jossa kastelu tapahtuu alta käsin lasikuitunaran avulla. Tämä edellyttää sitä, että kasvualusta absorboi vettä.



Kuva 9. Kasvualustan vesipitoisuus (%) kompostipelletin biotestin ruukuissa (lohko IV) pikamittarilla mitattuna. Ki=kiinankaali ja Oh=ohra.

4.6 Testikasvi

OECD:n ohjeiden mukaan biotesteihin valittavien kasvien tulisi edustaa laaja-alaisesti kasvien diversiteettiä ja elinkiertoa sekä olla suhteellisen yleisesti esiintyviä ja reagoida herkästi ympäristössä tapahtuviin muutoksiin (OECD 2006). Standardeissa suositellaan yleensä käytettäväksi ainakin yhtä yksisirkkaista ja yhtä kaksisirkkaista kasvia, jotta nähdään eri tyyppisten kasvien vasteessa ilmenevät erot. Testissä on hyvä olla myös yksi vakiotestikasvi, jotta testin kelpoisuus voidaan osoittaa vakiotestikasvin kasvulla.

Kiinankaalia on yleisesti käytetty testikasvina, koska se reagoi kasvutavallaan ja –nopeudellaan herkästi epäedullisiin kasvuoloihin (Maunuksela ym. 2012, muita). Lisäksi kiinankaali soveltuu kasvihuoneessa vallitseviin kosteaan ja tasaisen, melko korkean lämpötilan olosuhteisiin. Myös nyt saadut tulokset osoittivat, että kiinankaali reagoi käytettävään lannoitustasoon ja lannoitevalmisteisiin herkemmin kuin ohra. Muita herkkiä ja yleisesti suositeltavia testikasveja ovat retiisi, krassi ja salaatti (Boluda ym. 2011, Fuentes ym. 2006, Itävaara ym. 2010).

4.7 Kasvualusta

Kasvibiotesteissä testattava aines voidaan sekoittaa kasvuturpeeseen (EN 16086-1:2011), tietyt kriteerit täyttävään peltomaahan (OECD 2006, ISO 22030:2005), keinotekoiseen maahan (OECD 2008) tai keinotekoiseen muuhun aiheeseen (OECD 2006). Standardimaan rakenne ja käyttäytyminen matkii pelto-olosuhteita, mutta toistettavuus on peltomaata parempi. Turpeen käyttö ei ole suositeltavaa, sillä turve voi absorboivana materiaalina muuttaa ravinteiden liukoisuutta tai tuotteen mikrobien toimintaa. Toisin sanoen tutkittavan valmisteen sekoittaminen turpeeseen ei anna peltoviljelyyn soveltuvaa tietoa valmisteen vaikutuksista. Peltomaa on lähimpänä käytännön olosuhteita, joissa tuotetta käytetään. Lisäksi peltomaassa on luontaisia kasvua rajoittavia tekijöitä, joista voi olla hyötyä tuotteiden positiivisen vaikutuksen esiin saamisessa. Toisaalta peltomaan edustaa vain yhtä maalajia ja fysikaalis-kemiallis-biologisten ominaisuuksien yhdistelmää. Tuotteen vaikutukseen testissä voi tällöin vaikuttaa esim. peltomaan lähtöravinnetilanne ja vallitsevat biologiset tekijät Tämä voi vaikeuttaa tulosten tulkintaa ja heikentää testin toistettavuutta.

4.8 Koeasetelma ja toistot

Koeasetelmana kaikissa testeissä oli satunnaistettujen täydellisten lohkojen koe. Tämän mallin etuna on se, että ympäristötekijöissä esiintyvää vaihtelua voidaan hallita lohkokattamisen avulla. Käytännössä niin, että testialueella esiintyvät olosuhde-erot pyritään saamaan lohkojen välille. Näin jokainen käsittely joutuu jokaiseen vallitsevaan olosuhteeseen tasapuolisesti. Myös kasvihuoneessa esiintyy väistämättä olosuhde-eroja esim. lämpötilan, valaistuksen, ilmavirtauksien ym. suhteen.

Lohkottamisen onnistumista järjestetyissä biotesteissä voidaan arvioida laskemalla kuinka suuren osan lohko selitti varianssianalysissä satunnaisvaihtelusta kunkin muuttujan osalta. Useimmissa tapauksissa lohkon ei selittänyt lainkaan satunnaisvaihtelua, mikä osoittaa, että lohkokattamisen avulla ei saatu kontrolloitua testiolosuhteissa esiintyvää vaihtelua lainkaan. Parhaimmillaan lohko selitti

satunnaisvaihtelusta 9%. Tämä koski kompostikokeessa testikasvien kuivapainoa, muissa testeissä lohkokattamisella ei ollut vaikutusta testikasvien biomassaan. Lisäksi lohkokattaminen kontrolloi 7% tyypibakteerivalmisteen biotestin satunnaisvaihtelusta. Tämä tarkastelu osoittaa, että biotestien lohkokattaminen ei ollut tapahtunut optimaalisella tavalla.

Toistojen (tässä tapauksessa lohkojen) määrän vaikutusta tuloksiin tutkittiin vertaamalla tyypibakteerivalmisteen muuttujien varianssianalyysin tulosta neljällä, viidellä ja kuudella toistolla. Jos tulos oli lähellä tilastollisen merkitsevyyden rajaa ($p=0.03-0.07$), viidellä toistolla ”oikean” tuloksen todennäköisyys väheni noin puoleen ja neljällä toistolla n. 30-40%:iin (Taulukko 8). Varjoissa tapauksissa (tuotteella selvä vaikutus/ei vaikutusta) erojen havaitseminen onnistui yhtä hyvin 4, 5 ja 6 toistolla.

Toistojen määrää voidaan vähentää myös kylvämällä enemmän taimia ruukkuun ja toisaalta virhevaihtelun kontrolloimisella testin koeasetelmassa. OECD:n suositus 4 toistoa tai 20 tainta (meillä kiinankaaleja 6 x 3 ja ohria 6 x 6). Standardeissa ei yleensä ole esitetty koeasetelmaan liittyviä ratkaisuja. Esim. EN 16086-1:2011 standardissa testiruukut neuvotaan sijoittamaan satunnaisesti koko testialueelle. Käytännössä tämä vastaa täydellisesti satunnaistetun kokeen koeasetelmaa. Lohkokattamisella saadaan kuitenkin yleensä kontrolloitua kasvuolosuhde-eroja, joita käytännössä myös kasvihuoneen sisällä esiintyy. Esim. valo ei jakaudu tasaisesti koko kasvihuonepöydälle ja tuulettimet aiheuttavat lämpötila- ja kuivumisgradienttia.

Taulukko 8. Toistojen määrän vaikutus tyypibakteerivalmisteen vaikutuksen havaitsemiseen. Analyysiin on otettu kontrolli ja tuotekäsittely standardimaassa. Lannoitusosaksi on valittu se, jossa tuote on enemmän vaikuttanut testikasvin kasvuun. Eron merkitsevyyttä on kuvattu varianssianalyysin p-arvolla (käsittelyjen välillä on merkitsevä ero, kun on $p<0.05$). Lisäksi on ilmoitettu kuinka monta kertaa saadaan 4 tai 5 toistolla sama tulos (p-arvon tulkinta) kuin 6:lla.

Testikasvi	Vastemuuttuja	Lohkoja analyysissä	Ero % (verranne vs. tyypibakt.val miste)	p-arvo	tapaukset, jossa tulos sama kuin 6 toistolla
Kiinankaali	Kuivapaino 36 vrk (g)	6	5	0.349	-
		5		0.161-0.738	6/6
		4		0.134-0.901	15/15
	Tuorepaino 36 vrk (g)	6	7	0.031	
		5		0.016-0.078	3/6
		4		0.028-0.164	15/15
	Maksimipituus 29 vrk (cm)	6	17	0.036	-
		5		0.002-0.094	2/6
		4		0.002-0.226	6/15
Lehtimäärä 26 vrk (kpl)	6	1	0.871		
	5		0.456-1.000	6/6	
	4		0.182-1.000	15/15	
Ohra	Kuivapaino 36 vrk (g)	6	7	0.096	-
		5		0.082-0.206	6/6
		4		0.099-0.286	15/15
	Tuorepaino 36 vrk (g)	6	17	<0.001	-
		5		<0.001	6/6
		4		0.001-0.002	15/15
	Maksimipituus 29 vrk (cm)	6	5	0.012	-
		5		0.001-0.038	6/6
		4		0.002-0.110	6/15

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 tulee järjestää enemmän toistoja kuin pienikokoisille, sillä pieniä voidaan kylvää enemmän ruukkuun, mikä vähentää ruukkujen välistä vaihtelua. EN 16086-1:2011 –standardin mukaan rinnakkaisia ruukkuja on oltava vähintään kolme ja niissä 20 kiinankaalin siementä.

4.9 Kasvuhavainnot

Itävyyttä käytetään yleisesti toksisuustesteissä mittarina aineiden haitallisuudelle. Tässä testissä havaittiin, että komposti paransi kiinankaalin itävyyttä hietamaassa. Viikoittaisella kasvin pituus seurannalla saadaan kasvunopeudessa esiintyvät erot riittävän herkästi esiin. Toisaalta pituus kertoo enemmän kasvutavasta kuin kasvin biomassan kasvusta, sillä pituus ei juurikaan korreloinut kasvin kuiva-ainekertymän kanssa. Lehtimäärä ei ole riittävän herkkä mittari tuotteiden vaikutukselle. Klorofyllin fluoresenssimittauksen hyödyntämistä tulisi selvittää tarkemmin, yksinkertainen suorittaa, mutta vaatii asiantuntevan tulosten käsittelijän.

Kasvien stressi johtuu yleensä suuremmasta auringon valon määrästä kuin kasvi pystyy kanavoimaan yhteyttämiseensä. Viherhiukkaset ylivirittyvät ja seurauksena on happiradikaalien tuotannon lisääntyminen. Nämä aiheuttavat monenlaista tuhoa kasvisolukoille.

Fluoresenssimittauksella kuvataan yhteyttämässä stressin vaikutuksesta tapahtuvia muutoksia. Mitä huonommat kasvuolosuhteet ovat, sitä enemmän kasvi joutuu kanavoimaan valoenergiaa muuhun kuin yhteyttämiseen. Menetelmän on todettu kuvaavan ainakin kylmyyden, kuumuuden ja jossain määrin myös kuivuuden aiheuttamia muutoksia yhteyttämässä. Etenkin kylmyyden vaikutus yhteyttämiseen on helppo ymmärtää: matala lämpötila hidastaa entsyymitoimintaa, josta pimeäreaktiot ovat riippuvaisia. Hidastuneiden pimeäreaktioiden vuoksi kasvi pyrkii voimakkaassa valossa heijastamaan takaisin suuren osan valoenergiasta tai muuttamaan sen lämmöksi. Stressitila voi olla palautuva tai palautumaton. Palautumattomia muutoksia ovat viherhiukkasten saamat vauriot.

Fluoresenssimittauksen perusteella voidaan laskea useita yhteyttämisen tehokkuudesta kertovia muuttujia, mutta yleisimmin käytetään suhdelukua F_v/F_m eli fluoresenssin vaihteluvälin suhde maksimifluoresenssiin. Fluoresenssin vaihteluväli lasketaan pienimmän ja suurimman arvon erotuksena. Kasvilajista riippumatta normaalitilassa olevan kasvin F_v/F_m –arvo on yli 0.8. Stressin lisääntyessä arvo laskee, koska kasvi heijastaa valoa pois sen sijaan että kanavoisi sen yhteyttämiseen. Toistaiseksi ei kuitenkaan ole olemassa ohjearvoja, joiden avulla voitaisiin helposti tulkita milloin kasvi kärsii lievästä ja milloin voimakkaasta stressistä tai milloin kasvinosa on palautumattomasti vaurioitunut. Suuntaa antavasti voidaan kuitenkin sanoa, että alle 0.7 arvot kertovat kasvin kärsivän stressistä ja alle 0.4 arvot ovat todennäköisesti osoitus palautumattomasta stressitilasta.

4.10 Testin kesto ja työmäärä

Testikasvit kasvoivat 5 viikon aikana varsin suuriksi käytettyyn ruukkuun nähden. Ruukun koko olisi tästä eteenpäin alkanut rajoittaa kasvien kasvua ja lannoitevalmisteen vaikutus tuskin olisi enää tullut selvemmin ilmi. Testin kestoa voidaan mahdollisesti lyhentää viidestä viikosta neljään

luotettavuuden oleellisesti kärsimättä. Tästä lyhyempi testiaika ei hidasvaikutteisille, eloperäisille valmisteille sovi.

Testin kesto voidaan vaihtoehtoisesti sitoa myös kontrollikasvien kasvuvaiheeseen, jolloin vuodenaikaiset erot kasvunopeudessa tulevat paremmin huomioitua. Standardin (EN 16086-1:2011) mukainen biotesti lopetetaan, kun puolessa vertailunäytteen kiinankaaleissa on viides varsinainen lehti selkeästi näkyvässä tai puolella vertailunäytteen ohrista on toinen varsinainen lehti isompi kuin ensimmäinen. Jos tätä ohjetta olisi sovellettu, biotesti olisi lopetettu 24 vrk (3.5 viikkoa) kylvöstä (ks. kuva 7).

Kolmen biotestin perustamiseen käytettiin aikaa yhteensä 58 työtuntia, kun jätetään huomioimatta alkutestauksiin mennyt työaika. Työaika-arvioon sisältyy kasvualustan sekoittaminen betonimyllyssä, ruukutus, lannoitus ja siementen kylvö sekä näihin liittyvät oheistyöt. Koska testejä pystytettiin samalla kertaa kolme (testiruukkuja yhteensä 120 kpl), työaika kului testiä kohti (keskimäärin 40 ruukkuja) noin 17 tuntia. Testin lopetus oli perustamista nopeampaa ja testiä kohti kului aikaa 13 tuntia, sisältäen testikasvien leikkuun, tuore- ja kuivapainon määrittämisen, valokuvauksen ja jälkien siivouksen.

Biotestin välittömät hoitotoimenpiteet ja havainnointi veivät testiä kohti noin 3 tuntia/viikkoa. Tämä jakautui melko tasaisesti kastelun, kasvualustan kosteuden mittaamisen ja kasvien havainnoinnin välillä. Tulosten laskemiseen ja raportointiin käytettyä työaika ei arvioitu. Testin kustannuksia arvioitaessa on syytä ottaa huomioon myös testien määrä ja testaajien kokemus. Yksikkökustannukset vähenevät rutiinin lisääntyessä ja useiden testien samanaikaisessa toteutuksessa.

5 Yhteenveto

Standardoitua fytotoksisuustestiä (EN 16086-1:2011) voidaan soveltaa orgaanisten lannoitteiden ja mikrobivalmisteiden mahdollisen haitallisuuden osoittamiseen. Haittavaikutusten testaamiseen kehitetyn biotestin soveltuvuus valmisteiden hyödyllisten ominaisuuksien testaamiseen ei kuitenkaan ole paras mahdollinen. Testi toteutetaan optimaalisissa olosuhteissa, jolloin testikasvin kasvua rajoittaa ensisijaisesti vain tutkittavan tuotteen mahdolliset haitalliset ominaisuudet. Hyödylliset ominaisuudet saataisiin selvemmin esille, jos kasvua rajoittaisivat normaalit pelto-oloissa esiintyvät ravinne- ym. olosuhteet. Tämä voidaan ottaa kasvihuoneessa toteutettavassa testissä huomioon räätälöimällä testi tuotekohtaisesti. Esim. mykorritsatuotteen ollessa kyseessä voidaan fosforin määrää rajoittaa ja kasvitauteja ehkäisevän tuotteen osalta voidaan testikasvit altistaa kasvitautidille.

Biotestin toteuttamisesta ja soveltamisesta saatiin paljon arvokasta tietoa tehtyjen kokeilujen perusteella. Seuraavassa on tarkasteltu EN 16086-1:2011 testin käytännön ratkaisusta saatuja kokemuksia ja niistä tehtäviä johtopäätöksiä testin soveltamisesta orgaanisille lannoitteille ja mikrobituotteille.

Testikasvi. Testikasvin valinnassa on syytä ottaa huomioon lannoitevalmisteen käyttökohde ja vaikutustapa. Mykorritsavalmisteita testattaessa tulee testikasviksi valita mykorritsasymbioosin muodostava kasvi. Lisäksi biotestissä on suositeltavaa käyttää vähintään kahta erityyppistä testikasvia ja toinen niistä olisi hyvä olla vakiotestikasvi. Tämä helpottaa testin kelpoisuuden osoittamista. Ohran käyttöä testikasvina puoltaa testin tulosten helppo sovellettavuus viljan viljelyyn. Toisaalta ohra ei reagoinut juurikaan käytettyihin lannoitevalmisteisiin tai muutoksiin kasvuoloissa. Kiinankaali sen sijaan reagoi itämisellään ja kasvullaan herkemmin mikrobi- ja lannoitevalmisteisiin sekä testin peruslannoitukseen.

Kasvualusta. Standardimaan käytännön toimivuudesta ruukutestissä saatiin hyviä kokemuksia, tosin pH:n säätö vaatii vielä tarkentamista. Kiinankaali iti ja kasvoi paremmin standardimaassa kuin peltomaassa, mutta ohra yhtä hyvin molemmissa. Toisaalta kasvua edistävien vaikutusten esiin saaminen voi vaarantua, jos verranteen kasvu on optimaalisella tasolla. Ottaen huomioon peltomaan luontaisten ominaisuuksien vaihtelun ja siitä johtuvan heikon toistettavuuden, voidaan suositella tämän tyyppisen testin kasvualustaksi käytettävän rinnakkain sekä puhdasta, keinotekoista standardimaata että peltomaata.

Joillakin suurina määrinä käytettävillä lannoitevalmisteilla voi olla vaikutusta myös kasvualustan rakenteeseen. Esimerkiksi tässä testauksessa havaittiin kompostin lisäävän kasvualustan ilmatilaa, vedenpidätyskykyä ja eloperäisen aineksen määrää. Orgaanisilla lannoitteilla voikin olla vaikutusta myös maan rakenteen kautta.

Koeasetelma ja toistojen määrä. Testissä käytettiin satunnaistettujen täydellisten lohkojen koeasetelmaa, jolloin ruukut sijoitettiin kasvihuoneeseen arvioiden siellä esiintyvät olosuhte-erot. Lohkottamisella ei kuitenkaan saatu juurikaan kontrolloitua koeolosuhteiden vaihtelua. Lohkottamisen toimivuutta voidaan parantaa, jos lohkot voidaan muodostaa mitattujen olosuhte-erojen mukaisesti. Parhaimmillaan lohkottaminen vähentää rinnakkaisten ruukkujen tarvetta, sillä kasvuolosuhteista johtuvat erot saadaan osittain kontrolloitua eivätkä ne mene aineiston testauksessa virhevaihteluun. Vakioidulle, toistuvasti samassa tilassa toteutettavalle testille on

todennäköisesti kannattavaa laatia toimiva koeasetelma, sillä sen avulla koeruukkujen määrä voidaan minimoida. Toimivaa ja optimoitua koeasetelmaa voidaan sitten soveltaa kyseisissä testiolosuhteissa testistä toiseen.

Testissä verrattiin 4, 5 ja 6 rinnakkaisen ruukun (joissa kussakin 3 kiinankaalin tai 6 ohran tainta) vaikutusta kasvuvasteen havaitsemiseen. Mitä selvempi kasvun muutos oli, sitä vähemmän toistojen määrä vaikutti lopputulokseen. Toisaalta mitatun kasvuvasteen keskihajonnasta riippui kuinka suuri ero saatiin tilastollisesti merkitseväksi. Esim. 17 % ero kiinankaalin suurimman lehden maksimipituudessa oli merkitsevä kuudella toistolla, mutta viidellä tai neljällä toistolla eron havaitsemisen todennäköisyys oli 1/3. Toisaalta 5% ero ohran maksimipituudessa havaittiin yhtä hyvin kuudella ja viidellä toistolla, mutta neljällä toistolla enää 1/3 tapauksesta. Myös ruukkuun kylvettävä siementen määrä vaikuttaa toistojen tarpeeseen. Kolme kiinankaalin ja 6 ohran tainta osoittautuivat maksimimääräksi testin keston (5 viikkoa) nähden. Taimitiheys (kiinankaalilla 2.3 ja ohralla 4.6 tainta/ 100 cm²) vastasi OECD:n suosituksia biotestin taimitiheydelle. Kylvettävä siementen määrä kannattaa kuitenkin olla suurempi, jotta itävyyden arviointi on luotettavampaa. Itämisen jälkeen taimet voidaan harventaa kaikkiin ruukkuihin samaksi, jolloin itävyydessä esiintyvät erot eivät enää heijastu kasvuvasteeseen erilaisen taimitiheyden kautta. Ruukkujen kokoa suurentamalla voidaan nostaa kasvien määrää, mikä vähentää toistojen määrän tarvetta.

Lannoitus. Käytetty lannoitustaso (240 mgN/l, 100 mgP/l ja 250 mgK/l) osoittautui riittäväksi testikasveina käytetyille ohralle ja kiinankaalille. Typpilannoituksen puolittamisella ei ollut vaikutusta typpibakteerivalmisteen toimivuuteen testissä. Mykorritsa- ja fosforilannoituksen vaikutusta, mutta valmisteen mykorritsattomuuden vuoksi vaikutusta ei voitu osoittaa. Kompostipelletin kanssa käytetty lannoitus (puolitettu N ja P) osoittautui riittämättömäksi ja oli ainakin osasyynä kompostivalmisteen negatiiviseen vaikutukseen testikasvien kasvuun.

Kompostin ja muiden orgaanisten lannoitevalmisteiden ravinteista riippumattoman haitta- tai hyötyvaikutuksen testaaminen on haastavaa. Oikeanlaisen verranteen järjestäminen on keskeisessä osassa. Lannoitustaso tulisi säätää verranteen ja testiruukun välille suhteellisen samaksi. Lannoitevalmisteen tuoteselosteesta tai erillisenä analyysinä voidaan selvittää helppoliukoisten ravinteiden määrä sekä arvioidaan ravinteiden liukeneminen testin aikana (aikaisempaan kokemukseen pohjautuen tai ravinteiden liukoisuustestillä). Toisena ratkaisuna on käyttää useampaa verrannetta tai käsittelyä. Kompostirakeen kaltaisia materiaaleja voidaan joko käyttää useampia eri määriä tai järjestää useampia ravinneverranteita materiaalin mahdollisella lannoitusalueella. Testin lopussa voidaan sitten valita kasvualustan ravinnepitoisuuden määrittämisellä, mikä lannoitustaso on lähimpänä testattavan valmisteen lannoitusvaikutusta.

Kastelu. Standardeissa kastelu on ohjeistettu yleensä hyvin väljästi. Ohjeena on yleensä, että kastellaan tiettyin väliajoin ja vältetään liiallista kastelua. Testin toteutuksessa tuli ilmi, että käytetyllä kastelumenetelmällä kasvien erilainen kastelutarve ei tullut riittävästi huomioitua. Kastelijan arvioon perustuvassa kastelussa hitaammin kasvavia kasveja tuli herkästi ylikasteltua, erityisesti jos niiden lehdet peittivät näkyvyyden kasvualustan pintaan. Käytännössä heikommin kasvavat kompostikäsitellyn kiinankaalit kärsivät myös liiallisesta märkyydestä testin lopussa.

Luotettavin tapa kastelun määrän vakioimiseksi on kastella ruukut aina tiettyyn kosteuteen punnitsemalla. Tämä on kuitenkin työlästä ja kasvien kasvaessa suuremmaksi, niiden paino alkaa vaikuttaa punnitustulokseen. Vesimäärän vakioimisella ei yleensä saada ruukkujen kosteustasoa vakioitua, sillä kuivumisnopeus vaihtelee ruukuittain huomattavastikin. Altakastelu on usein todettu toimivaksi tavaksi välttää kasvualustan kuivuus- tai märkyysongelmat.

Lannoitevalmisteiden käyttötapa. Lähtökohtana lannoitevalmisteiden käytölle biotestissä tulisi olla valmistajan ilmoittama käyttötapa ja -määrä. Valmiste voidaan sekoittaa kasvualustaan, siemeniin kylvön yhteydessä tai antaa ruiskutteena. Testin lyhyestä kestosta johtuen voidaan lannoitevalmisteita harkinnan mukaan käyttää peltokäyttöön suositeltavia määriä enemmän vaikutusten esiin saamisen varmistamiseksi. Etenkin, jos on kyseessä valmiste, jonka yliannostuksesta ei todennäköisesti ole haittaa.

Testin pituus. Orgaanisten lannoitevalmisteiden testaamiseen soveltuvan testin kesto on vähintään 4 viikkoa, sillä biologisten vaikutusten esiin tuleminen kestää kauemmin kuin ravinnevaikutusten. Testin hoitokustannukset eivät viikkoa kohti ole kovinkaan suuret, mutta kasvihuoneen ylläpito- tai vuokratkustannukset voivat huomattavasti lisätä testin kokonaiskustannuksia. Biotestin ei ole syytä olla pidempi kuin vaikutusten esiin saaminen sitä vaatii. Testikasvit ovat kasvihuoneolosuhteissa nopeakasvuisia ja huomattavan suuria jo 5 viikon kasvatuksen jälkeen. Vuodenaikoina esiintyvät erot kasvunopeudessa voidaan huomioida niin, että testin kesto kytketään testikasvien kasvuvaiheeseen.

Esimerkkilannoitevalmisteiden tulokset. Käytetyllä biotestillä pystyttiin osoittamaan, että vain komposti vaikutti testikasvien biomassakertymään merkittävästi. Komposti heikensi erityisesti kiinankaalin, mutta myös ohran kasvua. Lisäksi havaittiin, että kompostin käytön haittavaikutus tuli standardimaassa hieman paremmin esiin kuin käytetyssä peltomaassa. Kastelun epätasaisuus ja kompostikäsitteilyn alhaisempi ravinnetaso aiheutti kuitenkin epävarmuutta testituloksen tulkintaan. Varmuudella ei voida sanoa, johtuiko heikko kasvu pelkästään kompostin haitta-aineista. Ilmeisesti kompostikäsitteilyn lannoitus ei ollut verrattavissa verranteeseen, sillä kasvien ravinteiden saanti oli heikentynyt ja lehdissä esiintyi selvää kellastumista. Havainto korostaa sitä seikkaa, että testattavien orgaanisten lannoitevalmisteiden parusanalyyysien tulokset tulisi olla tiedossa kasvibiotestiä toteutettaessa.

Typfibakteerivalmiste ei merkittävästi vaikuttanut testikasvien biomassaan, vaikka pituuskasvussa testin aikana havaittiin joitakin positiivisia vaikutuksia. Bakteerivalmistetta annosteltiin testin pituuden vuoksi useamman kertaluokan verran valmistajan antamaa käyttömäärää suurempi annos. Tällä otettiin huomioon, että bakteerisoluja on riittävästi, vaikka lisääntymisaikaa niillä ei ollutkaan yhtä kauan kuin luonnonoloissa kasvukauden aikana. Lisäksi valmisteen pääsy vaikutusalueelle (tässä tapauksessa juuristo ja lehdet) varmistettiin antamalla valmiste sekä kasteluna kasvualustaan että lehtiruiskutteena kasvien lehdille. Bakteerisolujen määrää ei kuitenkaan tutkittu käytetystä tuote-erästä tai testikasveista. Kyseisen valmisteen toisesta myyntierästä tehtyjen mikrobimääritysten mukaan valmisteessa oli luvattuja mikrobeja, mutta valmistajan ilmoittamaa määrää vähemmän.

Mykorritsatuotteella ei myöskään ollut vaikutusta testikasviin eikä mykorritsaa tuotteesta löydetty. Näin ollen biotestin toimivuutta mykorritsatuotteen osalta ei voitu todeta.

6 Kirjallisuus

- 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
- Boluda, R., Roca-Pérez, L. & Marimón, L. 2011. Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere* 84: 1-8.
- Fuentes, A., Lloréns, M., Sáez, J., Aguilar, M. I., Pérez-Marín, A. B., Ortuño, J. F. & Meseguer, V. F. 2006. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environ. Pollut.* 143: 355-360.
- Grqace, C. & Stribley, D. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95: 1160-1162.
- ISO 22030:2005 (E). Soil quality – Biological methods – Chronic toxicity in higher plants. 18 s.
- Itävaara, M., Vikman, M., Kapanen, A., Venelampi, O. & Vuorinen, A. 2006. Kompostin kypsystestit, 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 Sci. Util.* 18: 174-183.
- Kahiluoto, H. & Vestberg, M. 2000. Creation of a non-mycorrhizal control for a bioassay of AM effectiveness. 2. Benomyl application and soil sampling time. *Mycorrhiza* 9: 259-270.
- Kahiluoto, H., Ketoja, E. & Vestberg, M. 2000. Promotion of utilization of arbuscular mycorrhiza through reduced P fertilization 1. Bioassays in a growth chamber. *Plant and soil* 227: 191-206.
- Maunuksela, L., Herranen, M. & Torniaainen, M. 2012. Quality Assessment of Biogas Plant End Products by Plant Bioassays. *International Journal of Environmental Science and Development* 3: 305-310.
- Orasmaa, Saila 2012. Kasvien kasvua edistävien kaupallisten mikrobialmisteiden laadunvalvontamenettelyn kehittäminen. Maisterintutkielma, Helsingin yliopisto, Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Mikrobiologia. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/34874/Saila_Orasmaa_Gradu.pdf?sequence=1
- OECD 2006. OECD guidelines for the testing of chemicals. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test_9789264070066-en
- OECD 2008. OECD guidelines for the testing of chemicals. Predatory mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) reproduction test in soil. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-226-predatory-mite-hypoaspis-geolaelaps-aculeifer-reproduction-test-in-soil_9789264067455-en

Vestberg, M., Kukkonen, S., Rantala, S., Prochazka, P., Tuohimetsä, S., Setälä, H., Romantschuk, M., Kurola, J., Yu, D. ja Parikka, P. 2011. Suppressiveness of finnish commercial compost against soil borne disease. In: Proceedings of the international symposium on growing media and composting: Charlotte, NC, USA, June 1-5, 2009 / Convener W. C. Fonteno. Acta Horticulturae 891: 59-65.

7 Liitteet

Liite 1. Typpibakteerivalmisteen, mykorrhitsavalmisteen ja kompostipelletin biotestien ruukkujen sijoittelu kasvihuoneen pöydille. Koealue jaettiin lohkoihin (ruokkurivit) ja ruukkujen sijainti kunkin lohkon sisällä arvottiin satunnaistamalla. Ruudun sisällä oleva numero ilmoittaa käsittelyn numeron. Punaisella ja sinisellä merkityistä ruukuista seurattiin kasvualustan kosteustasoa pikakosteusmittarilla (Grodan) ja punaisella merkityistä ruukuista myös mitensimetriällä.

			ulkoseinä					
sisäseinä	1	3	4	Mykorrhitsavalmiste- testi	2	1	3	sisäseinä
	4	4	3		3	3	1	
	3	1	2		1	4	4	
	2	2	1		4	2	2	
	3	1	5	Kompostipelletti- testi	5	5	5	
	6	2	2		2	6	7	
	7	5	1		7	3	8	
	4	6	8		1	8	4	
	8	8	7		8	1	3	
	5	7	3		4	7	1	
				Lämpötila-anturi				
	1	4	4		3	2	6	
2	3	6	6	4	2			
1	7	1	Typpibakteeri- valmistetestti	1	2	4		
8	3	5		2	7	2		
3	1	2		4	3	8		
5	6	7		3	5	7		
7	2	4		5	6	6		
2	4	3		6	4	5		
6	5	8		7	8	1		
4	8	6		8	1	3		
I	II	III	IV	V	VI	Lohkon nrc		
Vesipiste								
osaston sisäseinä								