

Puuntuhkan vaikutus humuskerroksen mikrobistoon kangasmaalla

**Hannu Fritze
Jonna Perkiömäki**

**Metsätehon raportti 82
17.12.1999**

Puuntuhkan vaikutus humuskerroksen mikrobistoon kangasmaalla

**Hannu Fritze
Jonna Perkiömäki**

Metsätehon raportti 82
17.12.1999

Konsortiohanke: Fortum Power and Heat Oy, Metsähallitus,
Metsäliitto Osuuskunta, Metsäteollisuus ry,
Pölkky Oy, Stora Enso Oyj, UPM Kymmene Oyj,
Vapo Timber Oy

Kirjoittajien yhteystiedot: Metsäntutkimuslaitos
Vantaan tutkimuskeskus
PL 18, 01301 Vantaa
Puhelin: (09) 857 051

Asiasanat: tuhka, kadmium, mikrobit

© Metsäteho Oy

Helsinki 1999

SISÄLLYS

ALKUSANAT	3
TIIVISTELMÄ	4
1 TAUSTAA	5
1.1 Puuntuhka ja sen hyödyntäminen.....	5
1.2 Tuhkan lannoitekäytön tutkimustarve.....	5
2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA TOTEUTUS	6
2.1 Tavoitteet ja koejärjestelyt.....	6
2.2 Menetelmät.....	7
3 TULOKSET	8
3.1 Humuskerroksen pH.....	8
3.2 Humuskerroksen mikrobiologinen aktiivisuus.....	11
3.3 Bakteerien Cd-toleranssi.....	13
3.4 Mikrobibiomassa.....	13
3.5 Mikrobiyhteisö.....	14
4 TULOSTEN TULKINTA	15
KIRJALLISUUS	16

ALKUSANAT

Metsäteollisuusyritykset pyysivät 1995 Metsätehoa selvittämään sitä, mitä tutkimuksia ja kehittämistoimia pitäisi tehdä, jotta luotaisiin edellytykset suurien voimalaitosten tuottaman etupäässä puuperäisen tuhkan laajamittaiselle metsäkäytölle. Selvitystyön johdosta käynnistettiin vuoden 1996 lopulla Metsätehon koordinoimana Biotuhkan hyödyntäminen metsänparannusaineena -hanke. Hankkeessa tutkitaan erityisesti tuhkan metsäkäytön ympäristövaikutuksia, kuten ravinteiden huuhtoutumista ja vaikutusta vesiin, tuhkan vaikutusta marjojen ja sienien raskasmetallipitoisuuksiin sekä maaperän mikro-organismeihin. Teknistaloudellisten tutkimusten ja kokeilujen tehtävänä puolestaan on tuottaa tietoa mm. tuhkan esikäsitteystä ja hyödyntämisen tekniikoista ja taloudesta.

Tuhkahanke on 3-vuotinen ja päättyy vuoden 1999 lopussa. Hankkeen rahoittajat ovat Fortum Power and Heat Oy, Metsäliitto Osuuskunta, Metsähallitus, Metsäteollisuus ry, Pölkky Oy, Stora Enso Oyj, UPM Kymmene Oyj, Vapo Timber Oy ja TEKES. Hankkeessa tutkimuksia suorittavat organisaatiot ovat Helsingin yliopisto, Kuopion yliopisto, Oulun yliopisto, Metsäntutkimuslaitos, Metsäteho Oy sekä Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos.

Tässä raportissa esitetään Metsäntutkimuslaitoksen Vantaan tutkimusyksikössä FT Hannu Fritzen johdolla tehdyt tutkimukset, jotka koskivat tuhkalannoituksen mikobistovaikutuksia kangasmaalla.

Helsinki 10.10.1999

Antti Korpilahti

Tuhkahankkeen koordinaattori

TIIVISTELMÄ

Tuhkan sisältämien raskasmetallien mahdollisia haittoja ei riittävästi tunneta. Varsinkin Cd on erittäin myrkyllinen aine. Tuhkassa se on enimmäkseen oksidina (CdO) ja säilyy maastossa pitkään liukenemattomassa muodossa tuhkan pH:ta nostavan vaikutuksen ja oksidimuodon hidasliukoisuuden takia. Metsämaan sienet ja bakteerit hajottavat orgaanista ainesta ja vapauttavat siten karikkeeseen sekä humukseen sitoutuneet ravinteet kasvien käyttöön. Metsämaan mikrobit ovat tottuneet toimimaan happamassa ympäristössä, sillä Suomessa metsämaan humuksen luontainen pH on n. 4. Tuhka on emäksistä ja nostaa humuksen pH:ta 1 – 2 yksikköä levitysmäärästä riippuen.

Tutkimuksen tavoitteena oli arvioida pöly- ja itsekovetetun puuntuhkan eri annostustasojen välitöntä vaikutusta metsämaan humuskerroksen mikrobitoimintaan sekä kadmiumin haitallisuutta humuskerroksen mikrobitoiminnalle. Kokeet tehtiin Muhoksella kahdella ravinteisuudeltaan erilaisella kasvupaikalla, jotka olivat kuivan kankaan (ECT, variksenmarja-kanervatyypin) ja tuoreen kankaan (VMT, puolukka-mustikkatyypin) metsiköt.

Tuhkalannoitus aiheutti eri metsätyypeillä samansuuntaiset muutokset. Humuskerroksen pH nousi ja pölytuhka vaikutti enemmän kuin itsekovetettu tuhka ja muutokset korreloivat tuhkan levitysmäärän kanssa. Mikrobiaktiivisuus kasvoi ja mikrobiyhteisön rakenne muuttui. Pölytuhka aiheutti itsekovetettua tuhkaa tehokkaammin mitattuja muutoksia. Tuhkan sisältämä kadmium ei kuitenkaan aiheuttanut vuodessa haitallisia muutoksia metsämaan mikrobistoon. Kadmiumin määrän vaikutusta tutkittiin lisäksi erillisellä Cd-lisäyksellä. Se osoitti, että kadmiumin määrä tuhkassa ei korreloinut bakteeriyhteisön muutosten eikä mikrobiyhteisön hengitysaktiiviteetin kanssa.

1 TAUSTAA

1.1 Puuntuhka ja sen hyödyntäminen

Suomen teollisuudesta on arvioitu tulevan vuosittain 250 000–300 000 tonnia tuhkaa. Metsäteollisuudessa syntyy puhdasta puu- ja kuorituhkaa noin 100 000 tonnia vuodessa. Tuhkan alkuainekoostumus vaihtelee runsaasti mm. käytetyn polttoaineen ja -tekniikan mukaan, mutta yleensä tuhka sisältää runsaasti kasvinravinteita. Tuhka on mm. metsätaloudelle mahdollinen lannoite- tai maanparannusaine. Puuntuhkalla voitaisiin Suomessa lannoittaa noin 25 000 hehtaaria metsää joka vuosi.

Metsien tuhkalannoitukseen on tunnettu vaihtelevaa mielenkiintoa Suomessa jo 1930-luvulta lähtien. Puuntuhkan suotuisa ja pitkäaikainen vaikutus puuston kehitykseen ojitetuilla turvemaidella, entisillä suopelloilla ja turpeennostokenttien pohjilla perustuu sen monipuoliseen ja tasapainoiseen ravinnesisältöön sekä kykyyn neutraloida maaperää. Maan hajotustoiminta tehostuu ja turpeen luontaiset ravinnearat, lähinnä typpi, saatetaan näin puiden käyttöön. Puuntuhka sisältää typpeä ja rikkiä lukuun ottamatta puuston tarvitsemia ravinteita likimain samassa suhteessa kuin ne ovat sitoutuneena puustoon. Kangasmailla typpi on yleensä puuston kasvua rajoittava minimiravinne, joten tuhkan vaikutus jää niillä vähäiseksi. Hapannan laskeuman haittojen torjunnassa ja luontaisen happamoitumisen estämisessä tuhkan käyttö on kangasmaillakin perusteltua.

1.2 Tuhkan lannoitekäytön tutkimustarve

Tuhkantuottajien taholla kiinnostus tuhkaan on kasvanut viime aikoina. Pölytuhkan käsittely ja levitys on hankalaa, minkä vuoksi metsien tuhkalannoitus on ollut vähäistä. Tuhkan rakeistaminen tai itsekovettuminen on välttämätön edellytys tuhkan laajamittaisemmalle käytölle. Rakeistuksessa tai itsekovettumisessa tuhka muuttuu hitaammin liukenevaksi, minkä seurauksena tuhkalannoituksen pH-shokki pintakasvillisuudessa ja maaperässä lievenee.

Tuhkan sisältämien raskasmetallien mahdollisia haittoja ei riittävästi tunneta. Varsinkin tuhkan sisältämä kadmium (Cd) on ollut keskustelun aiheena, sillä uuden lannoitelain nojalla annettavien säädösten valmistelun yhteydessä on ehdotettu maanparannusaineen kadmiumpitoisuuden ylärajaksi 1,5 mg kg⁻¹ kuiva-ainetta (k.a.). Puuaineksen luontaisesti sisältämä Cd konsentroituu poltettaessa tuhkaan, jonka Cd-pitoisuus vaihtelee 4 – 20 mg kg⁻¹ k.a. Cd on erittäin myrkyllinen raskasmetalli, jonka kierto ja vaikutus metsäluonnossa tulisi tarkkaan tuntea. Tuhkassa kadmium on enimmäkseen oksidina (CdO) ja säilyy maastossa pitkään liukenemattomassa muodossa tuhkan pH:ta nostavan vaikutuksen ja oksidimuodon hidasti liukoisuuden takia. Lähtiessään liikkeelle biologisen ja geokemiallisen rapautumisen seurauksena

kadmium saattaa sitoutua humukseen, kulkeutua kasveihin, kerääntyä marjoihin ja sieniin tai poistua metsäekosysteemistä huuhtoutumalla. Paitsi korkean myrkyllisyytensä, myös vaikeasti ennustettavan käyttäytymisensä takia Cd eroaa huomattavasti muista raskasmetalleista. Tuhkan Cd jakaantuu ekosysteemin eri osiin, ja siten sen pitoisuus pienenee häviten luonnolliseen vaihteluun. Tutkimuksessa levitettävän tuhkan Cd-pitoisuutta on siten keinotekoisesti lisättävä, jotta Cd:n kierto, kiertonopeus sekä toksisuus metsäekosysteemissä voidaan arvioida.

2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA TOTEUTUS

2.1 Tavoitteet ja koejärjestelyt

Tutkimuksen tavoitteena on arvioida 1) pöly- ja itsekovetetun puuntuhan eri annostustasojen välitöntä vaikutusta metsämaan humuskerroksen mikrobitoimintaan sekä 2) puuntuhassa esiintyvän kadmiumin haitallisuutta humuskerroksen mikrobitoiminnalle. Metsämaan sienet ja bakteerit hajottavat orgaanista ainesta ja vapauttavat siten karikkeeseen sekä humukseen sitoutuneet ravinteet kasvien käyttöön. Metsämaan mikrobit ovat tottuneet toimimaan happamassa ympäristössä, sillä Suomessa metsämaan humuksen luontainen pH on n. 4. Tuhka on emäksistä ja nostaa humuksen pH:ta 1 – 2 yksikköä levitysmäärästä riippuen. Humuksen pH:n muutos vaikuttaa mikrobien aktiivisuuteen ja lajistoon. Kokeissa käytettiin Oy Metsä-Botnia Ab:n Äänekosken tehtaan tuhkaa, joka on peräisin pääosin koivun ja männyn kuoresta.

Tehtävä 1. Tutkimuksessa verrataan pölytuhkan ja itsekovetetun tuhkan aiheuttamia muutoksia humuskerroksen mikrobistoon kahdella ravinteisuudeltaan erilaisella kasvupaikalla. Kohteina ovat Metsäntutkimuslaitoksen Muhoksen tutkimusaseman läheisyyteen 1997 perustetut kuivan kankaan (ECT = variksenmarjakanervatyypin, Lummelampi) ja tuoreen kankaan (VMT = puolukka-mustikkatyypin, Sadinselkä) kokeet. Metsikkökokeet koostuvat viidestä käsitte-lystä kolmena toistona:

Kontrolli (**K**)

Pölytuhka 3 000 ja 9 000 kg ha⁻¹ (**PT3** ja **PT9**)

Itsekovetettu tuhka 3 000 ja 9 000 kg ha⁻¹ (**IT3** ja **IT9**)

Koealoja on yhteensä 30.

Tehtävä 2. Cd-tutkimusta varten on perustettu metsikkökoe kuivahkolle kan-kaalle (EVT; Cd-koe) Muhoksen tutkimusaseman läheisyyteen syksyllä 1997. Koe koostuu kolmesta käsittelystä kolmena toistona:

Kontrolli (**K**)

Puuntuhka 3 000 kg ha⁻¹ (**PT3**)

Puuntuhka (3 000 kg ha⁻¹) + CdO (n. 400 mg kg⁻¹ tuhkaa) (**PT3+Cd**)

Koealoja on yhteensä 9. Tuhkaan on lisätty kadmiumia niin, että sen Cd-pitoisuus on n. 10 – 20 -kertainen tuhkan normaalipitoisuuksiin verrattuna.

Kokeissa käytetyn tuhkan alkuainepitoisuudet olivat (15 näytteen keski- arvot):

Cd	Cu	Mn	Zn	Al	Ca	Fe	Mg	P	K
mg kg ⁻¹				mg g ⁻¹					
15	72	10	2,6	12	354	9,3	17	9,1	27

Itsekovettuneen tuhkan vesipitoisuus oli 30 % painosta.

2.2 Menetelmät

Kaikkien koealojen (39 kpl) koko on n. 30 x 30 m. Näytteet otettiin humus-kairalla kerranäytteenottona 1 - 1,5 vuotta lannoituskäsittelyjen jälkeen elokuussa 1998. Jokaiselta koealalta kerättiin kolmelta linjalta yhteensä 21 humusnäytettä (7/linja), jotka yhdistettiin yhdeksi kokoomanäytteeksi. Siten tutkimuksessa oli yhteensä 39 näytettä. Jokainen näyte seulottiin (4 mm) ja karikkekerros, juuret sekä vihreät kasvinosat poistettiin näytteistä. Samalla näytteet homogenisoituivat.

Humusnäytteistä mitattiin pH vesisuspensiosta (1/2), kuivamassa ja orgaanisen aineen pitoisuus heikutushäviönä. Biologisista muuttujista näytteistä määritettiin mikrobien aktiivisuus ja biomassa, sieni/bakteeri-suhde sekä bakteerien yhteisö-muutokset suhteessa käsittelyihin. Mikrobien aktiivisuutta määritettiin kaasukromatografisesti mittaamalla humusnäytteen CO₂-tuottoa tietyssä aikayksikössä (Pietikäinen ja Fritze 1995). Juurihengityksen osuus oli poistettu näytteestä seulomalla humus 4 mm seulan läpi. Mikrobibiomassa, sieni/bakteeri-suhde ja bakteeriyhteisön muutokset määritettiin uuttamalla humusnäytteistä mikrobeille spesifiset solukalvon rasvahapot (Phospho- lipid Fatty Acid; PLFA), jotka identifioitiin lopullisesti kaasukromatografisesti (Pennanen ym. 1998a). Uutettujen rasvahappojen summa (PLFA_{totaaali}) korreloi mikrobibiomassan kanssa. Sienille spesifinen rasvahappo (PLFA_{sieni}) korreloi näytteessä olevaan sienibiomassaan ja bakteerispesifisten rasvahappojen summa (PLFA_{bakteeri}) korreloi bakteeribiomassaan (Frostegård ja Bååth 1996). Jos käsittelyt ovat muuttaneet mikrobiyhteisön rakennetta, niin

se näkyy rasvahappospektreissä eli uutettujen rasvahappojen suhteesta toisiinsa. Sen selvittämiseksi analysoitiin rasvahappoaineisto monimuuttujamenetelmällä; kanonisella erotteluanalyysillä. Analyysin graafisessa tarkastelussa toisiaan muistuttavat näytealat tulostuvat lähekkäisinä pisteinä aineiston päävaihtelusuuntia kuvaaville akseleille. Lisäksi näytteiden bakteerimäärä laskettiin mikroskooppisesti, jota varten humusnäytettä laimennettiin vedellä ja bakteerit värjättiin akriidiinioranssilla (AO).

Ainoastaan ympäristön muutokseen sopeutunut mikrobiyhteisö pystyy ylläpitämään metsäekosysteemissä tarvittavaa ravinnekiertoa. Siten mikrobien, tässä tapauksessa bakteerien, kyky sopeutua tuhkan mahdollisesti korkeisiin Cd-pitoisuuksiin on erittäin tärkeä. Bakteerit kehittävät raskasmetalleja vastaan sietokykyä mikäli joutuvat niiden kanssa kosketukseen (Pennanen ym. 1996). Kadmiumin myrkyllisyyttä vertailtiin radioaktiivisesti leimatun ³H-tymidiinin kertymismenetelmällä (Pennanen ym. 1996, 1998a, 1998b). Tymidiini on solun perintöaineen DNA:n rakenneosana ja bakteerit ottavat tymidiinin mieluummin kasvuympäristöstään kuin syntetisoivat sitä itse. ³H-tymidiinin sitoutuminen solun DNA:han riippuu solun DNA-synteesin nopeudesta, mikä on puolestaan verrannollinen mikrobien kasvunopeuteen. Kasvuliemeen lisätyn Cd:n myrkyvaikutus ja mahdollinen bakteereiden kohonnut sietokyky nähdään muutoksina kasvunopeudessa.

Tulokset laskettiin orgaanista ainetta kohti. Aineisto käsiteltiin tilastollisesti siten, että aineisto tarkasteltiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä jakaen varianssitulokset metsätyyppeihin, käsittelyihin ja niiden yhdysvaikutuksiin. Keskiarvoja tarkasteltiin Tukey'n testillä. Cd-kokeen aineisto testattiin erikseen käsittelyjen selvittämiseksi yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukey'n keskiarvotestillä. Tilastotestien merkitsevyytasoksi otettiin 5 % riskiraja.

3 TULOKSET

3.1 Humuskerroksen pH

Tuhkalannoitus nosti humuskerroksen pH-arvoa kaikilla koealueilla. Metsätyyppeivertailussa käsittelyt aiheuttivat samansuuntaiset muutokset mutta metsätyypit eivät eronneet keskenään. Pölytuhka (PT) nosti humuskerroksen pH:ta itsekovetettua tuhkaa (IT) tehokkaammin. Pölytuhkakäsittelyistä PT9 nosti humuskerroksen pH:n 1,5 yksiköllä, kun vastaava IT9 käsittely aiheutti vain 0,5 yksikön muutoksen (taulukot 1 ja 2). Tilastollisesti PT9-käsittely erosi kaikista muista käsittelyistä. IT3 ja IT9 eivät tilastollisesti eronneet kontrollista eivätkä PT3-käsittelystä. PT3 erosi merkitsevästi kontrollista. Humuskerroksen pH-tulokset korreloivat selvästi käytetyn tuhkan määrään ja liukoisuuteen. Pölytuhka saatiin levitettyä kangasmaalle tasaisemmin kuin hidasliukoisempi itsekovetettu tuhka. Levitys ja liukoisuus molemmat heijastuvat humuskerroksen pH-arvoihin.

Cd-kokeessa käytettiin ainoastaan pölytuhkaa. Käsittelyt PT3 ja PT3+Cd nostivat humuskerroksen 0,2-yksiköllä kontrolliin verrattuna, mutta muutos ei ollut tilastollisesti merkitsevä (taulukko 3).

Tulokset ovat kolmen rinnakkaisen maanäytteen keskiarvoja. Hehikutushäviö on ilmoitettu prosentteina kuiva-aineesta. Perushengitysnopeus ($\mu\text{g CO}_2\text{-C h}^{-1}$) on ilmoitettu grammaa orgaanista ainetta kohden ja tymidiini-inkorporaationopeus tunnissa solua kohden ($\text{mol solu}^{-1} \text{h}^{-1}$). IC_{50} kuvaa kadmiumin sietokykyä. Tässä Cd-konsentraatiossa (M) kasvu on laskenut puoleen sellaisen näytteen kasvusta, johon ei ole lisätty kadmiumia. AO tarkoittaa akridiini-oranssivärijäyso- menetelmällä määritettyjä bakteerisolumääriä grammaa orgaanista ainesta kohden. $\text{PLFA}_{\text{totaali}}$, $\text{PLFA}_{\text{bakteeri}}$ ja $\text{PLFA}_{\text{sieni}}$ indikoivat totaali-, bakteeri- ja sieni-biomassaa ($\mu\text{mol g}^{-1}$ o.a.). Sieni/bakteeri ilmaisee $\text{PLFA}_{\text{sieni}}$ ja $\text{PLFA}_{\text{bakteeri}}$ välisen suhteen. Keskivirheet ovat sulussa. Käsittelyjen aiheuttamien muutoksien tilastolliset merkitsevyydet on ilmoitettu kuvassa 1.

TAULUKKO 1 Tuhkakäsittelyjen vaikutukset kuivan kankaan (ECT) humuskerroksen kemiallisiin ja mikrobiologisiin tunnuksiin

	K	PT3	PT9	IT3	IT9
Hehikutushäviö	21,0 (4,10)	24,0 (6,75)	24,6 (7,74)	22,6 (4,16)	22,8 (3,58)
pH(H ₂ O)	4,03 (0,07)	4,98 (0,26)	5,78 (0,41)	4,12 (0,03)	4,52 (0,07)
Perushengitys	7,41 (0,46)	10,81 (0,81)	13,96 (4,13)	9,07 (0,43)	8,84 (1,35)
log IC ₅₀	-2,82 (-3,26)	-3,17 (-3,20)	-4,56 (-4,71)	-2,91 (-3,35)	-3,30 (-4,73)
TdR inkorporaatio $\times 10^{-22}$	3,99 (0,32)	7,51 (1,65)	12,42 (4,1)	4,33 (0,79)	4,61 (0,72)
AO $\times 10^{11}$	1,36 (0,08)	1,32 (0,10)	1,41 (0,14)	1,27 (0,05)	1,21 (0,12)
PLFA _{totaali}	2392,5 (280)	2321,5 (217)	2471,2 (330)	2350,2 (188)	2180,8 (163)
PLFA _{bakteeri}	630,5 (77,7)	570,9 (46,4)	659,5 (78,7)	576,9 (51,1)	537,0 (52,0)
PLFA _{sieni}	294,1 (28,8)	346,4 (53,7)	344,8 (42,1)	327,3 (30,0)	320,2 (19,7)
sieni/bakteeri	0,470 (0,02)	0,601 (0,05)	0,522 (0,04)	0,567 (0,004)	0,601 (0,04)

Käsittelyt on koodattu: K (lannoittamaton), PT3 (pölytuhkaa 3 000 kg ha⁻¹), PT9 (pölytuhkaa 9 000 kg ha⁻¹), IT3 (itsekovetettua tuhkkaa 3 000 kg ha⁻¹) ja IT9 (itsekovetettua tuhkkaa 9 000 kg ha⁻¹).

TAULUKKO 2 Tuhkakäsittelyjen vaikutukset tuoreen kankaan (VMT) humuskerroksen kemiallisiin ja mikrobiologisiin tunnuksiin

	K	PT3	PT9	IT3	IT9
Hehikutushäviö	38,4 (7,33)	41,9 (11,3)	55,5 (10,9)	48,6 (9,47)	23,0 (7,16)
pH(H ₂ O)	4,22 (0,03)	4,65 (0,18)	5,93 (0,09)	4,44 (0,08)	4,77 (0,33)
Hengitys	11,33 (1,34)	11,13 (1,40)	16,51 (0,79)	12,35 (2,16)	12,24 (2,57)
log IC ₅₀	-2,50 (-2,84)	-2,53 (-2,57)	-4,38 (-5,24)	-3,18 (-4,02)	-2,77 (-2,89)
TdR inkorporaatio × 10 ⁻²²	4,94 (0,4)	7,84 (0,7)	26,32 (7,53)	5,83 (0,57)	8,42 (2,47)
AO × 10 ¹¹	1,57 (0,21)	1,42 (0,01)	1,49 (0,23)	1,47 (0,25)	1,47 (0,12)
PLFA _{totaali}	2911,7 (244)	3322,1 (255)	3034,5 (375)	3066,6 (320)	3893,9 (172)
PLFA _{bakteeri}	791,8 (69,9)	980,1 (118)	783,2 (88,1)	846,2 (115)	1066,5 (13,2)
PLFA _{sieni}	336,9 (33,6)	352,4 (77,1)	401,7 (63,6)	363,1 (21,6)	492,9 (88,5)
sieni/bakteeri	0,425 (0,01)	0,386 (0,12)	0,508 (0,03)	0,438 (0,03)	0,464 (0,09)

TAULUKKO 3 Tuhkakäsittelyjen vaikutukset kuivahkon kankaan (EVT) humuskerroksen Cd-kokeen kemiallisiin ja mikrobiologisiin tunnuksiin

	K	PT3	PT3+Cd
Hehikutushäviö	32,0 (2,14)	29,3 (1,44)	37,2 (8,72)
pH(H ₂ O)	4,05 (0,03)	4,22 (0,07)	4,27 (0,13)
Hengitys	7,54 (0,90)	7,69 (1,58)	6,54 (1,08)
log IC ₅₀	-2,26 (-2,92)	-2,49 (-2,90)	-2,41 (-3,05)
TdR inkorporaatio × 10 ⁻²²	5,05 (1,03)	3,83 (0,40)	3,82 (0,89)
AO × 10 ¹¹	1,52 (0,09)	1,30 (0,11)	1,41 (0,20)
PLFA _{totaali}	3283,4 (274)	2738,3 (238)	2817,7 (518)
PLFA _{bakteeri}	970,6 (91,4)	743,5 (54,6)	755,4 (157)
PLFA _{sieni}	387,6 (51,0)	331,7 (46,1)	357,8 (44,5)
sieni/bakteeri	0,397 (0,02)	0,442 (0,03)	0,501 (0,09)

Käsittelyt on koodattu: K (lannoittamaton), PT3 (pölytuhkaa 3 000 kg ha⁻¹) ja PT3+Cd (pölytuhkaa 3 000 kg ha⁻¹, jossa 400 mg Cd kg⁻¹ tuhkaa). Tulokset ovat kolmen rinnak-

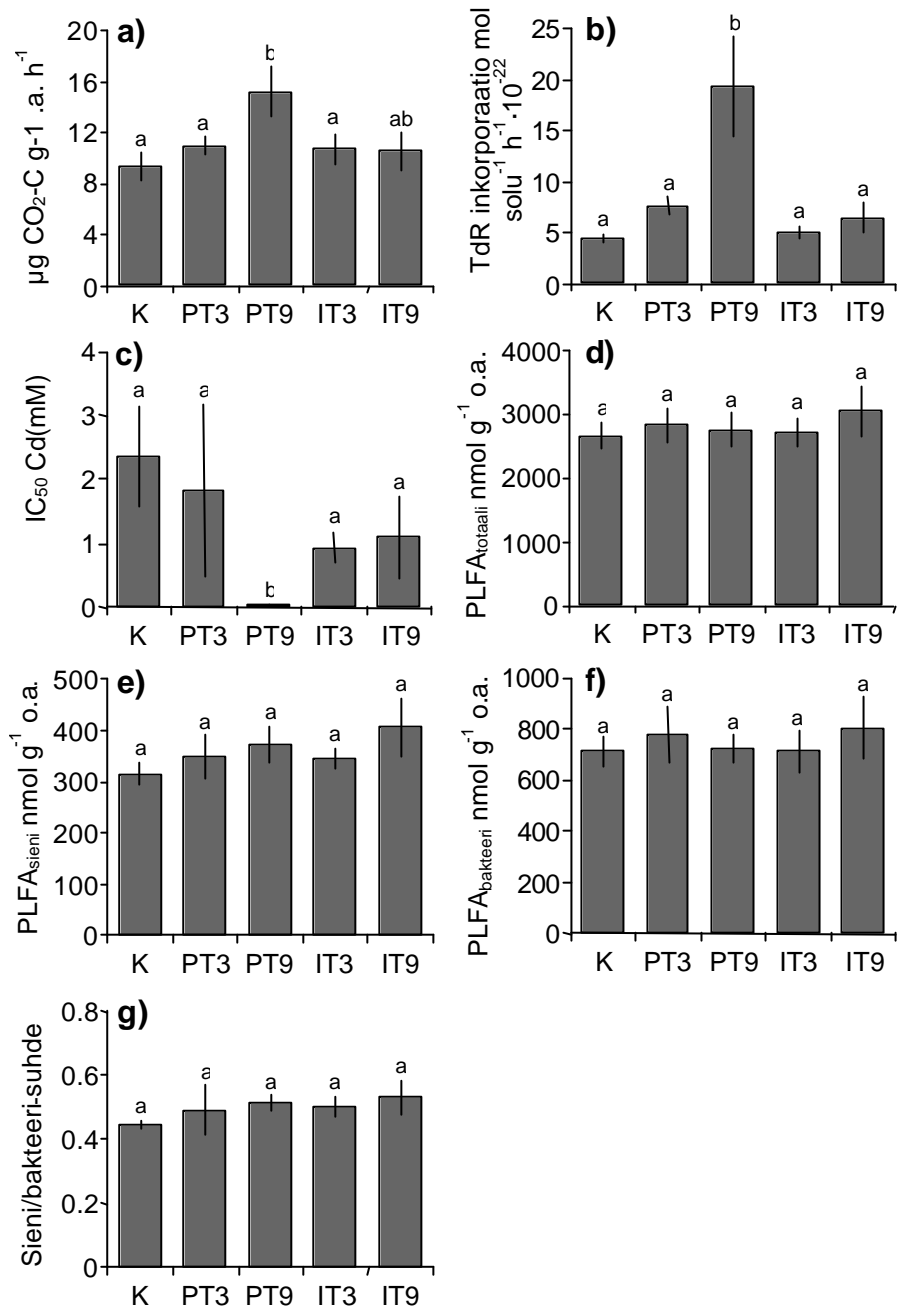
kaisen maanäytteen keskiarvoja.

3.2 Humuskerroksen mikrobiologinen aktiivisuus

Humuskerroksen mikrobiologinen aktiivisuus mitattiin kahdella tavalla, humusnäytteiden mineralisaationopeutena ja bakteerisolujen kasvunopeutena.

Humusnäytteiden mineralisaationopeutta mitattiin CO₂-tuottona tunnissa. Tässä mittaustavassa metsätyypit erosivat tilastollisesti toisistaan. Tuoreella kankaalla oli kauttaaltaan korkeampi mineralisaationopeus kuin kuivalla kankaalla (taulukot 1 ja 2). Käsittelyt vaikuttivat molemmissa metsätyypeissä samansuuntaisesti. PT9-käsittely melkein kaksinkertaisti CO₂-tuoton, ja erosi siten merkitsevästi kontrollista. PT9 ei eronnut tilastollisesti muista käsittelyistä (PT3, IT3 ja IT9), ja muut käsittelyt nostivat CO₂-tuottoa kontrolliin verrattuna niin vähän, etteivät eronneet siitä tilastollisesti (kuva 1a).

Cd-kokeessa kuivahkolla kankaalla käsittelyt eivät eronneet tilastollisesti toisistaan. PT3 hienokseltaan nosti CO₂-tuottoa (taulukko 3) kontrolliin verrattuna, mutta vähemmän kuin Lummelammen kuivan kankaan kokeella, ja PT3+Cd pienensi mineralisaationopeutta 13 % (taulukko 3).



Kuva 1. Tuhkakäsittelyjen vaikutuksia humuskerroksen mikrobiologisiin tunnuksiin. Tulokset kuivan ja tuoreen kankaan keskiarvoina, koska käsittelyt eivät tilastollisesti eronneet metsätyypeittäin.

Käsittelyt on koodattu K (lannoittamaton), PT3 (pölytuhkaa 3 000 kg ha⁻¹), PT9 (pölytuhkaa 9 000 kg ha⁻¹), IT3 (itsekovetettua tuhkkaa 3 000 kg ha⁻¹) ja IT9 (itsekovetettua tuhkkaa 9 000 kg ha⁻¹).

Perushengitysnopeus (a) tunnissa on ilmoitettu orgaanista ainetta kohden ja tymidiinin kertymisnopeus (b) tunnissa solua kohden. IC_{50} (c) kuvaa kadmiumin sietokykyä. Tässä Cd-konsentraatiossa (M) kasvu on laskenut puoleen sellaisen näytteen kasvusta, johon ei ole lisätty kadmiumia. $PLFA_{\text{totaali}}$ (d), $PLFA_{\text{sieni}}$ (e) ja $PLFA_{\text{bakteeri}}$ (f) indikoivat totaali-, bakteeri- ja sieni-biomassaa (nmol g^{-1} o.a.). Sieni/bakteeri (g) ilmaisee $PLFA_{\text{sieni}}$ ja $PLFA_{\text{bakteeri}}$ välisen suhteen. Samalla kirjaimella koodatut käsittelyt eivät eroa tilastollisesti toisistaan.

Toisena aktiivisuusmittauksena käytettiin bakteerisolujen kasvunopeutta. Tätä varten laskettiin humusnäytteiden bakteerimäärä mikroskooppisesti sekä määritettiin tymidiinin kertymisnopeus bakteereihin. Lopullinen testisuure on solun sisään otetun tymidiinin määrä yhtä bakteerisolua kohti. Mitä korkeampi luku sitä suurempi on bakteerin kasvunopeus. Tuoreella kankaalla bakteerien kasvunopeus oli kauttaaltaan korkeampi kuin kuivalla kankaalla (taulukot 1 ja 2). Käsittelyt vaikuttivat molemmilla metsätyypeillä samansuuntaisesti. Tuhkakäsittelyt nostivat bakteerien kasvunopeutta. Pölytuhkakäsittely oli itsekovetettua tuhkaa tehokkaampi ja PT9 erosi tilastollisesti kaikista muista käsittelyistä erittäin korkean kasvunopeuden osalta (kuva 1b). Cd-kokeessa käsittelyt eivät eronneet tilastollisesti toisistaan. PT3 ja PT3+Cd laskivat bakteerien kasvunopeutta kontrolliin verrattuna (taulukko 3).

3.3 Bakteerien Cd-toleranssi

Edellä kuvattua kasvunopeusmittaria on käytetty myös kuvaamaan humusnäytteiden bakteereiden Cd-kestävyyttä. Kokeessa kasvatettiin humusnäytteistä erotettuja bakteereita kahden tunnin ajan kohonneissa Cd-pitoisuuksissa leimatun tymidiinin kanssa. Käytetyt Cd-konsentraatiot olivat 0,01 ja 0,000001 M välillä. Tuloksista laskettiin IC_{50} arvo, joka tarkoittaa sitä Cd-pitoisuutta, jolla kasvunopeus laskee puoleen ilman Cd-lisäystä mitatuista alkuperäisestä arvostaan. Metsätyyppien välillä IC_{50} arvo ei eronnut, mutta PT9-käsittely herkisti bakteeriyhteisön Cd:lle (kuva 1c). Kun kontrollin IC_{50} arvo oli 2,34 mM Cd, niin PT9-käsittelyjen IC_{50} arvo oli 0,035mM. Kontrollin bakteeriyhteisö siis kesti yli 60-kertaisia Cd-pitoisuuksia PT9-käsittelyjen bakteeriyhteisöön verrattuna. Taulukkoon 1 ja 2 IC_{50} arvot on ilmoitettu alkuperäisten arvojen logaritmeina. Myös Cd-kokeessa tuhkakäsittelyt herkistivät bakteeriyhteisön kadmiumille. Erot kontrolliin olivat kaksinkertaiset (taulukko 3), mutta ne eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

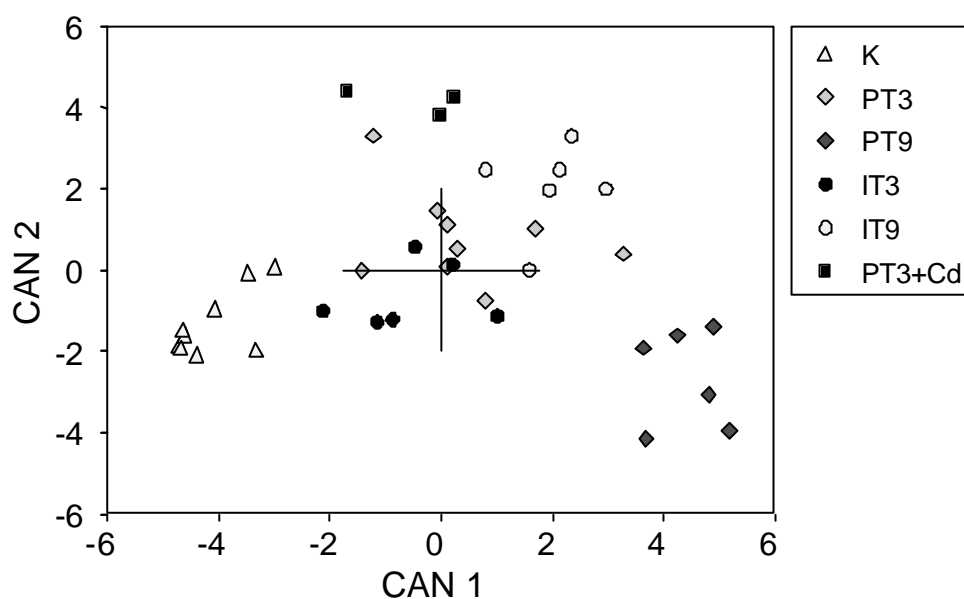
3.4 Mikrobibiomassa

Humuksesta uutetuista mikrobirasvahapoista laskettiin tunnuksia indikoimaan mikrobibiomassan ($PLFA_{\text{totaali}}$), sienibiomassan ($PLFA_{\text{sieni}}$) ja bakteeribiomassan ($PLFA_{\text{bakteeri}}$) määrää. Tuoreella kankaalla oli tilastollisesti korkeampi kokonaismikrobibiomassa, bakteeribiomassa ja sienibiomassa kuin kuivalla kankaalla (taulukot 1 ja 2). Käsittelyt eivät vaikuttaneet mihinkään edellä mainittuun muutтуjaan (kuvat 1d–f). $PLFA_{\text{sieni}}$ ja $PLFA_{\text{bakteeri}}$ arvoista laskettiin vielä sie-

ni/bakteeri-suhde, joka oli merkitsevästi korkeampi VT:llä mutta käsittelyillä ei ollut vaikutusta (kuva 1g). Cd-kokeen rasvahapoista laskettiin samat tunnuksat. PT3 ja PT3+Cd eivät eronneet kontrollista (taulukko 3).

3.5 Mikrobiyhteisö

Käsittelyt muuttivat mikrobiyhteisön rakennetta, mikä näkyi rasvahappospektreistä eli uutettujen rasvahappojen suhteesta toisiinsa. Kanonisen erotteluanalyysin ensimmäinen komponentti CAN1 ryhmitteli samankaltaiset mikrobiyhteisöt. Tähän analyysiin käytettiin kaikkien 39 koealan rasvahappoaineisto. Kontrollit ja PT9-käsittelyt ryhmittyivät täysin omiksi ryhmikseen (kuva 2) ja siten niiden mikrobiyhteisö oli erilainen. Kaikki muut käsittelyt PT3, IT3, IT9 ja PT3+Cd muodostivat yhden ison ryhmän, joista lähimpänä kontrolleja olivat IT3-käsittelyt. PT3- ja IT9-käsittelyt ryhmittyivät keskenään sekaisin, joten niiden mikrobiyhteisö oli samankaltainen.



Kuva 2. Kanoninen erotteluanalyysi humuksesta uutetuista rasvahapoista.

Käsittelyt on koodattu K (lannoittamaton), PT3 (pölytuhkaa 3 000 kg ha⁻¹), PT9 (pölytuhkaa 9 000 kg ha⁻¹), IT3 (itsekovetettua tuhkaa 3 000 kg ha⁻¹) ja IT9 (itsekovetettua tuhkaa 9 000 kg ha⁻¹).

Analyysin graafisessa tarkastelussa toisiaan muistuttavat näytealat tulostuvat lähkekkäisinä pisteinä aineiston päävaihtelusuuntia kuvaaville akseleille.

4 TULOSTEN TULKINTA

Kuivan kankaan (ECT, Lummelampi) ja tuoreen kankaan (VMT, Sadinselkä) metsiköistä kerättiin humusnäytteet n. 1,5 vuotta lannoituskäsittelyjen jälkeen. Odotusten mukaisesti tuhkalannoitus nosti humuksen pH-arvoa ja nousu oli riippuvainen tuhkalajista ja tuhkan määrästä. Pölytuhka (PT-käsittelyt) nosti pH-arvoa itsekovettettua tuhkaa (IT-käsittelyt) enemmän. Vaikka syytä siihen ei tämän aineiston puitteissa ole tutkittu, voidaan olettaa, että pH on suoraan verrannollinen tuhkan liukoisuuteen ja tuhkan vaikutusalueeseen. Pölytuhka liukenee itsekovettettua tuhkaa nopeammin humuskerroksen maaveteen. Pölytuhka peittää myös suuremman humuspinta-alan kuin itsekovettu tuhka, sillä vielä näytteenottohetkenä itsekovettu tuhka näkyi koealalla suurina yksittäisinä kokkareina. Metsikköjen kesken ei ollut käsittelyjen välisiä eroja pH-tulosten suhteen. Cd-koe perustettiin kuivahkon kankaan EVT-metsikköön lähelle Lummelammen koetta noin puoli vuotta myöhemmin. Myös tässä kokeessa humuskerroksen pH nousi tuhkakäsittelyjen ansiosta, muttei niin paljon kuin Lummelammen kokeessa. Ero selittyy tuhkan lyhyemmällä vaikutusajalla.

Mikrobien aktiivisuus (bakteereiden ja sienten CO₂-tuotto) korreloi humuskerroksen pH:n muutoksen kanssa positiivisesti, ja oli siten yhteydessä tuhkalajeihin. Tämä tulos on havaittu aikaisemmin pölytuhkalannoituskokeissa (esim. Bååth ym. 1995) ja muissa humuskerroksen pH:ta nostavissa lannoituskäsittelyissä, kuten kalkituksen (Smolander ym. 1994) ja urealannoituksissa joitakin vuosia käsittelyjen jälkeen (Foster ym. 1980). Tutkimustulosten puuttuessa selitykseksi on arveltu, että humuskerroksen pH:n nousun yhteydessä maaveteen liukenee suurempia määriä laadultaan helposti mineralisoituvia hiiliyhdisteitä, jotka nostaisivat riemenomaan bakteeriyhteisön aktiivisuutta. Tässä tutkimuksessa kiinnitettiin huomiota bakteerien aktiivisuuteen sekä yhteisömuutoksiin ja tulokset tukevat edellä esitettyä hypoteesiä. Tutkittaessa bakteeriyhteisön spesifistä aktiivisuutta tymidiinin kertymistekniikalla todettiin, että bakteerit lisäsivät kasvunopeuttiaan ja aktiivisuuttaan humuksen pH:n nousun myötä. Tämän lisäksi bakteeriyhteisön koostumus poikkesi kontrollista sitä voimakkaammin mitä korkeampi humuskerroksen pH oli. Tulokset olivat samansuuntaisia ravinteisuudeltaan erilaisissa koemetsiköissä. Syy bakteeriyhteisön muutokseen on humuksen pH:n nousu, sillä vastaavia muutoksia on mitattu myös metsämaan kalkituksen jälkeen.

Tuhkan sisältämän kadmiumin on arveltu olevan haitallinen metsäekosysteemin toiminnalle. Kokeessa käytettiin tuhkaa, jonka Cd-pitoisuus oli 15 mg kg⁻¹, joten kadmiumia levitettiin metsään 45 g ja 135 g ha⁻¹ lannoitustasosta riippuen. Kun humuskerroksen paksuudeksi oletetaan 1,5 cm (tyypillinen kuivilla kankailla) ja kuivan, seulotun humuksen tiheydeksi n. 0,1 g cm⁻³ (keskiarvo tutkimuksissamme) niin humusta olisi n. 15 000 kg ha⁻¹. Tässä kokeessa lisättiin suurimman tuhkaannoksen mukana 135 g ha⁻¹ Cd:a, joten kadmiumpitoisuudeksi kuivassa humuksessa tulee 9 mg kg⁻¹. Humuskerroksen luontainen Cd-pitoisuus on keskimääränä 0,47 mg kg⁻¹ (Tamminen ja Starr 1990). Riittävän suurina pitoisuuksina veteen liukeneva CdCl₂ on haitallinen maan mikrobistolle, jota on käsitelty tuhkalla 5

vuotta aikaisemmin (Fritze ym. 1995). Cd-pitoisuuden piti olla tuhkalannoituskokeen ($2,5 \text{ t ha}^{-1}$) humuksessa $2\,500 \text{ mg kg}^{-1}$, jotta hengitysaktiivisuus laski puoleen alkuperäisestä. Samassa kokeessa todettiin myös, että kadmiumia tarvitaan vähintään 400 mg kg^{-1} humusta, jotta tuhkalannoituksen indusoima hengitysaktiivisuuden nousu laskisi kontrollin tasolle.

Koska kenttäkokeessamme tuhkalannoitus nosti mikrobien hengitysaktiivisuutta, oletimme, että tuhkan mukana lisätty Cd ei vaikuttanut vuodessa mikrobistoon haitallisesti. Oletus tarkastettiin kahdella tavalla. Suojamekanismina metsämaan bakteeriyhteisö kehittää vastustuskykyä kohonneita raskasmetallipitoisuuksia vastaan (Pennanen ym. 1996). Mittasimme koealojen bakteeriyhteisön Cd:n sietokykyä. Mikäli tuhkalannoitetuissa bakteeriyhteisöissä kehittyi Cd-resistenssiä, niin tuhkan mukana tullut Cd on ylittänyt bakteeriyhteisön Cd:n sietokynnyksen. Nostimme keinotekoisesti yhden tuhkaerän Cd-pitoisuutta 400 mg :aan tuhkakiloa kohti kadmiumoksidilla (CdO). Tuhkassa esiintyvä Cd on enimmäkseen oksidimuodossa korkean palolämpötilan vuoksi (Anttila 1998). Koska tämän kokeen tuhka-annos oli $3\,000 \text{ kg ha}^{-1}$, niin Cd:a lisättiin $1\,200 \text{ g ha}^{-1}$ ja laskennallinen Cd-pitoisuus humuksessa oli n. 80 mg kg^{-1} . Cd-resistenssiä ei kehittynyt vuodessa yhdellekään koealan bakteeriyhteisölle. Itse asiassa lannoitettujen koealojen bakteeriyhteisöt sietivät vähemmän kadmiumia kontrollikoealojen bakteeriyhteisöihin verrattuna. Lisäksi niissä kokeissa (PT3+Cd), joissa tuhkan Cd-pitoisuutta nostettiin keinotekoisesti, bakteeriyhteisön rakenne ei eronnut muista vastaavista tuhkakäsittelyistä (PT3).

Yhteenvetona toteamme, että tuhkalannoitus aiheutti kahdella eri metsätypillä samansuuntaiset muutokset. Mikrobiaktiivisuus kasvoi ja mikrobiyhteisön rakenne muuttui. Pölytuhka aiheutti itsekovettua tuhkaa tehokkaammin mitattuja muutoksia. Tuhkan sisältämä kadmium ei aiheuttanut vuodessa haitallisia muutoksia metsämaan mikrobistoon. Kadmiumin määrä tuhkassa ei korreloinut bakteeriyhteisön muutosten eikä mikrobiyhteisön hengitysaktiviteetin kanssa.

KIRJALLISUUS

- Anttila, P.** 1998. Tuhkahankkeen väliraportit vuodelta 1997. Metsätehon raportti 56:14–24.
- Bååth, E., Frostegård, Å., Pennanen, T. & Fritze, H.** 1995. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 27:229–240.
- Foster, N.W., Beauchamp, E.G. & Corke, C.T.** 1980. Microbial activity in *Pinus banksiana* lamb. Forest floor amended with nitrogen and carbon. *Canadian Journal of Soil Science* 60:199–209.

- Fritze, H., Kapanen, A. & Vanhala, P.** 1995. Cadmium contamination of wood ash and fire treated coniferous humus: effect on soil respiration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 54:775–782.
- Frostegård, Å. & Bååth, E.** 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Pemmanen, T., Frostegård, Å., Fritze, H. & Bååth, E.** 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal polluted gradients in coniferous forests. *Applied Environmental Microbiology* 62:420–428.
- Pemmanen, T., Fritze, H., Vanhala, P., Kiikkilä, O., Neuvonen, S. & Bååth, E.** 1998a. Structure of a microbial community in soil after prolonged addition of low levels of simulated acid rain. *Applied Environmental Microbiology* 64:2173–2180.
- Pemmanen, T., Perkiömäki, J., Kiikkilä, O., Vanhala, P., Neuvonen, S. & Fritze, H.** 1998b. Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbial Ecology* 27:291–300.
- Pietikäinen, J. & Fritze, H.** 1995. Clear-cutting and prescribed burning in coniferous forest: comparison of effects on soil fungal and total microbial biomass, respiration activity and nitrification. *Soil Biology and Biochemistry* 27:101-109.
- Smolander, A., Kurka, A., Kitunen, V. & Mälkönen, E.** 1994. Microbial biomass C and N and respiratory activity in soil of repeatedly limed and N- and P- fertilized Norway spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry* 26:957–962.
- Tamminen, P. & Starr, M.** 1990. A survey of forest soil properties related to soil acidification in southern Finland. In: Kauppi, P., Anttila P. & Kenttämies, K. (eds.). *Acidification in Finland*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 235 – 251.