



Maankäytön vaikutus Etelä-Suomen pohjavesien bakteeriyhteisöihin

Iikka Jaakola
2115100
Pro Gradu-tutkielma, 750658S, 40 op
Ekologian ja genetiikan
tutkimusyksikkö
Luonnontieteiden tiedekunta
Oulun Yliopisto
18.12.2020

Tiivistelmä

Vesiekosysteemien ekologisen tilan heikkeneminen on lisännyt niiden suojelun ja lainsäädännöllisen säätelyn tarvetta. Pohjavesi ja siitä riippuvaiset ekosysteemit eivät ole saaneet kuitenkaan tarpeeksi huomiota, sillä pohjavesiä koskevat säädännöt liittyvät pääsääntöisesti veden kemiallisiin ominaisuuksiin vedenoton näkökulmasta. Mikrobit, ja erityisesti ravinneköyhille pohjavesiekosysteemeille tyypilliset bakteerit, ovat vielä nykypäivänäkin puutteellisesti tunnettu eliöryhmä, vaikka niiden merkitys pohjavesien tarjoamien ekosysteemipalveluiden kannalta on huomattava. Tutkielmassani selvitin, miten lähiympäristön maankäyttö vaikuttaa pohjavesiriippuvaisten ekosysteemien (lähteet) bakteeriyhteisöjen monimuotoisuuteen, lajikoostumukseen ja toimintaan (orgaanisen aineksen hajotus). Aineisto kerättiin 64 eteläisen Suomen lähteestä, joiden lähiympäristön maankäyttöä tarkasteltiin kahden kilometrin puskurivyöhykkeiden avulla. CORINE-maanpeiteaineiston perusteella tutkimuskohteet jaettiin 1) lähiympäristön maankäytöltään muuttumattomiin metsälähteisiin (vertailuryhmä), 2) viljelymaiden lähteisiin ja 3) rakennettujen alueiden ja viljelymaiden lähteisiin ja 4) rakennettujen alueiden lähteisiin. Tarkastelin eri maankäyttömuotojen vaikutusta pohjaveden kemialliseen laatuun (nitraatti- ja kloridipitoisuus), sekä miten nämä kemialliset muutokset heijastuivat bakteeriyhteisöissä (taksonomisesti ja toiminnallisesti). Tulokset osoittivat lähteen lähiympäristön rakentamisen ja maanviljelyn heikentävän pohjaveden kemiallista laatua. Maankäytön ympäröimät lähteet erosivat sekä nitraatti, että kloridipitoisuuden suhteen luonnontilaisista lähteistä. Maankäyttö vähensi bakteeriyhteisön monimuotoisuutta ja nitraattipitoisuuden osalta työssä havaittiin yksihuippuinen vaste, jossa bakteerien monimuotoisuus ensin kasvoi, mutta jo 100-300 $\mu\text{g L}^{-1}$ pitoisuuksissa alkoi vähenemään. Maankäytön muuttamien lähteiden yhteisöt erosivat lajikoostumukseltaan vertailulähteistä ja pohjaveden kemialliset tekijät pääosin selittivät yhteisöjen rakennetta. Myös lajistovaihtelussa (β -diversiteetti) havaittiin eroja, mutta vastoin odotuksia, maankäytön muuttamien lähteiden yhteisöt olivat lajistoltaan vaihtelevampia vertailuryhmään verrattuna. Myös orgaanisen aineksen hajotuksen osalta työssä havaittiin yksihuippuinen vaste, jossa hajotustoiminta aluksi kasvoi, mutta heikentyi pohjaveden nitraattipitoisuuksien ylittäessä $\sim 400 \mu\text{g L}^{-1}$. Tutkielman tulokset osoittavat, että lähialueen maankäyttö vaikuttaa pohjaveden kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka vuorostaan aiheuttavat merkittäviä muutoksia pohjavedestä riippuvaisten ekosysteemien bakteeriyhteisöissä. Tulosten perusteella jo varsin pienet muutokset pohjaveden nitraattipitoisuudessa heikentävät bakteeriyhteisön monimuotoisuutta ja toimintaa, ja näin ollen pohjavesien nitraattipitoisuuden rajoja tulisikin uudelleen tarkastella pohjavesien ekologisen tilan näkökulmasta. Tutkielman tulokset korostavat bakteerien ekologista merkitystä pohjavesissä ja siitä riippuvaisissa ekosysteemeissä, sekä tuovat uutta tietoa tämän merkittävän eliöryhmän osalta.

Avainsanat

Lähteet, mikrobiologia, akvaattinen ekologia, mikrobiologia, 16S rRNA,

Ohjaajat

FT Kaisa Lehosmaa, Dosentti Jussi Jyväsjärvi, Professori Timo Muotka

Sisällys

1. Johdanto	4
1.1. Pohjavesivarannot	4
1.2. Pohjavesiriippuvaiset ekosysteemit	6
1.3. Pohjavesien mikrobiyhteisöt	6
1.4. Pohjavesien seuranta Suomessa	8
1.5. Pohjavesien pilaantuminen	9
1.7. Tutkimuksen tavoitteet	10
2. Aineisto ja menetelmät	11
2.1. Tutkimuspaikkojen valinta ja tutkimusasetelma	11
2.2. Näytteenotto	12
2.3. Mikrobihajotustoiminnan mittaus	12
2.4. Molekyylibiologiset menetelmät	13
2.4.1. PCR	13
2.5. Bioinformatiikka	15
2.5.1. Sekvensointi	15
2.5.2. Bioinformatiikka	15
2.6. Tilastolliset menetelmät	16
3. Tulokset	18
3.1. Maankäytön vaikutus pohjaveden kemialliseen laatuun	18
3.2. Maankäytön vaikutus bakteeriyhteisöihin	19
3.3. Mikrobien hajotustoiminta	23
4. Pohdinta	24

Lyhenteet

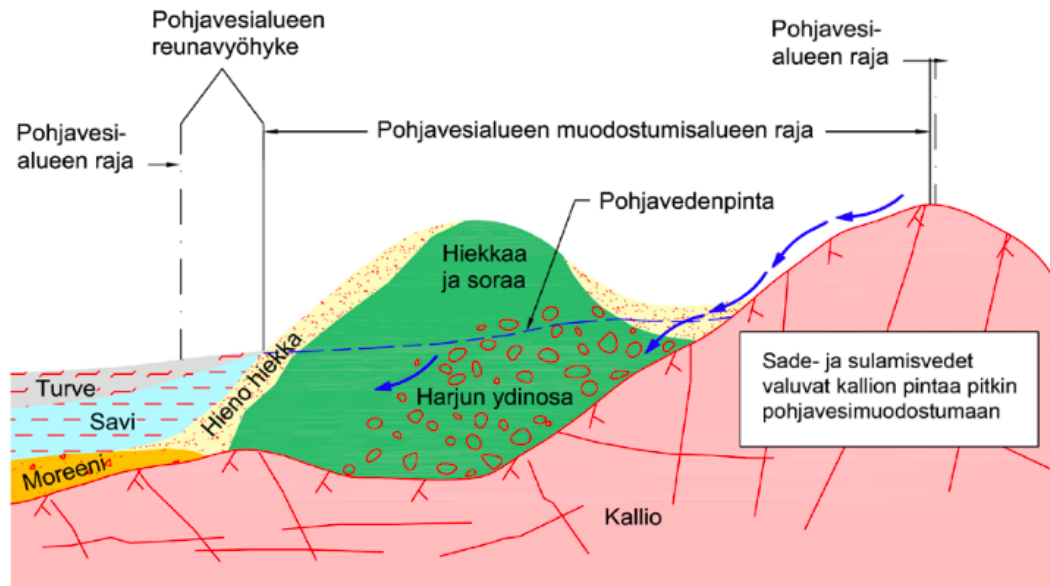
16S rRNA	Prokaryooteilta löytyvä geeni, jota hyödynnetään DNA:n perustuvassa tunnistamisessa
ANOVA	Analysis of variance
Cl ⁻	Kloridi
DOC	Liuennut orgaaninen hiili
GIS	Geographic Information System
ESV	Exact Sequence Variant
NO ₃ -N	Nitraatti typpinä
PCR	Polymeraasiketjureaktio
POVET	Suomen ympäristökeskuksen ylläpitämä pohjavesitietokanta
TAE	tris-asettaatti-EDTA

1. Johdanto

Pohjavesivarantojen hupeneminen ja pilaantuminen ovat väestönkasvun aiheuttamien ilmiöiden seurauksia. Ilmastonmuutos, lisääntynyt maankäyttö, kasvanut juomaveden tarve ja kaupungistuminen aiheuttavat muun muassa pohjavesien laadun heikkenemistä ja määrän vähenemistä (Jones, 2009; Vinod ym., 2015). Puhdas pohjavesi on keskeinen resurssi sekä luonnolle että ihmiselle. Lisäksi useat pintavesi- ja maaekosysteemit ovat riippuvaisia pohjavedestä (Fitts, 2002; Babiker ym., 2004; Jones, 2009; Cantonati ym., 2012; Ilmonen ym., 2012; Vinod ym., 2015). Tasaisesti virtaava kylmä ja hyvälaatuinen pohjavesi estää esimerkiksi monia latvapuroja kuivumasta talvella ja kuivina kausina (Fitts, 2002; Cantonati ym., 2012). Ilmastonmuutoksen edetessä pohjavedellä voi olla myös kriittinen rooli kylmästenotermisten lohikalakantojen hengissä säilymisen kannalta (Isaak ym., 2012). Suot ovat usein riippuvaisia pohjavedestä, mutta ne myös vaikuttavat merkittävästi pohjaveden määrään varastoimalla sade- ja sulamisvettä (Mitsch ym., 2009; Ilmonen ym., 2012). Erityisen herkkiä pohjaveden fysikaalis-kemiallisille ja määrällisille muutoksille ovat lähteet, joiden eliöyhteisöt ovat täysin riippuvaisia pohjavedestä (Cantonati ym., 2012; Ilmonen ym., 2012; Lehosmaa ym., 2018). Akviferit eli pohjavesivarastot ovat usein happi-, hiili- ja ravinneköyhiä ympäristöjä, joissa mikrobit ovat keskeisin bioottinen elementti (Griebler & Lueders, 2009; Flynn ym., 2013). Mikrobit säätelevät pohjaveden biogeokemiallisia prosesseja, mutta toisaalta myös pohjaveden kemiallinen laatu vaikuttaa mikrobiyhteisön rakenteeseen (Sirisena ym., 2018).

1.1. Pohjavesivarannot

Lähes 99% maapallon sulasta makeasta vedestä on pohjavettä (Younger, 2007). Suomessa pohjavettä käytetään ihmisen toimesta noin 240 miljoonaa litraa vuodessa (SYKE, 2018). Pohjavesi on sade- ja sulamisvedestä maaperään imeytynyttä vettä (Kuva 1), joka varastoituu maan alle pohjavesimuodostumiksi eli akvifereiksi (Geologian tutkimuskeskus, 2011). Pohjavettä muodostuu parhaiten alueilla, joilla vesi pääsee imeytymään maahan, eli maaperä on karkearakenteista ja huokoista, kuten hiekkaa tai soraa (Geologian tutkimuskeskus, 2011). Pohjavesi on tavanomaisesti kirkasta, hyvälaatuista ja vapaata haitallisista mikrobeista, koska maaperä toimii veden epäpuhtauksien luonnollisena suodattimena (Babiker ym., 2007). Laadultaan ja määrältään parhaat pohjavedet löytyvät hiekka- ja sorapohjaisilta harju- ja reunamuodostumilta (Kuva 1) (Geologian tutkimuskeskus, 2011). Rannikkoalueilla, joilla pohjavesialueet ovat pieniä ja usein savikerroksen alla piilossa, on tällaisia alueita Suomessa vähän (Britschgi ym., 2018). Suomessa pohjavesialueet ovat pääsääntöisesti 1-2 km² laajuisia, 2-4 metrin syvyydessä maanpinnasta, ja kyllästyneen maakerroksen paksuus niissä on noin 10 metriä. Maanpinnan läheisyys ja huokoinen rakenne altistavat pohjavesimuodostumia saasteille (Britschgi ym., 2018). Ilmastolla on vahva vaikutus pohjaveden kemialliseen laatuun ja sen kausittaiseen vaihteluun. Erityisesti lämpötila ja sateiden määrä vaikuttavat pohjavesiin (Britschgi ym., 2018).



Kuva 1. Tyypillisen suomalaisen pohjavesimuodostuman poikkileikkaus (Britschgi ym., 2018).

Maanalaisen sijaintinsa vuoksi pohjavesien tutkimus on ollut haastavaa ennen nykyistä teknologiaa (Gilbert ym., 1994). Aina 2000-luvulle asti tutkimuksissa keskityttiin lähinnä pohjavesien määrän ja laadun muutoksiin, sekä niihin vaikuttaviin tekijöihin (Fitts, 2002). Kansainvälisen ja kansallisen ympäristölainsäädännön kehittyessä myös biologiset elementit ovat vakiinnuttaneet paikkansa osana vesistöjen tilanseurantaa (Hering ym., 2010). Tilanne ei ole kuitenkaan pohjavesien ja niistä riippuvaisten ekosysteemien kohdalla yhtäläinen. Tämä on johtunut osakseen siitä, että pintavesiin verrattuna pohjavesien biologiset tutkimukset ovat huomattavasti haastavampia. Lisäksi pohjavesien tilan arviointi on ollut lähinnä määrällistä ja laadullista, resurssinäkökulmasta tehtävää tarkastelua eikä pohjavesien ekologian merkitystä kemiallisen laadun säätelijänä ole ymmärretty kuin vasta viime vuosikymmenellä (Stein ym., 2010). Kuluneella vuosikymmenellä Euroopan Unionin vesipolitiikan puitteiden mukaisesti (Euroopan Unioni, 2000) mukaista ekologisen tilan seuranta on yritetty soveltaa myös pohjavesiin (Stein ym., 2010; Sirisena ym., 2018). Toistaiseksi standardisoitujen menetelmien tai esimerkiksi pintavesien tilan arvioinnissa käytettyjen vesimuodostumille tyypillisten taksonien tunnistaminen ei ole vielä pohjavesien osalta riittävällä tasolla, mutta ponnistuksia eteenpäin on tehty ympäri maailmaa tutkimusten ja käytänteiden muodossa (Stein ym., 2010; Sirisena ym., 2018). Pohjavesien tilan arviointi pohjaa vielä tänä päivänäkin pitkälti Yhdysvaltojen EPA:n (United States Environmental Protection Agency) vuonna 1987 julkaisemaan pohjaveden haavoittuvuusanalyysiin, eli *DRASTIC*-malliin. Malli keskittyy tunnistamaan pilaantumiselle alttiita pohjavesiä niiden hydrogeologisten ominaisuuksien perusteella, joita ovat veden syvyys, muodostuvan pohjaveden määrä, maaperä, pintamaa, topografia, vadoosivyöhykkeen vaikutus ja veden johtokyky (Babiker ym., 2005). Vadoosivyöhyke on akviferin ja maanpinnan välinen maa-aines, jonka koostumus vaikuttaa merkittävästi veden läpäisykykyyn (Stephens, 1995). Poikkeus lienee Uusi-Seelanti, jossa on tunnistettu mikrobisyhteisöjen merkitys pohjavesien tilan seurannassa sekä tarve akviferien monimuotoisten ja huonosti tunnettujen ekosysteemien kartoittamiselle. Maan lainsäädäntöön onkin liitetty menettelytavat pohjavesien mikrobisyhteisöjen suojeluun ja seuraamiseen (New Zealand Ministry for the Environment, 2014; Sirisena ym., 2018).

1.2. Pohjavesiriippuvaiset ekosysteemit

Maan pinnalle purkautuessaan pohjavesi vaikuttaa moniin muihin ekosysteemeihin ja luo pohjavedestä riippuvaisia ekosysteemejä (GDE, groundwater-dependent ecosystem) (Bertrand ym., 2012; Cantonati ym., 2012; Sirisena ym., 2018; Britschgi ym., 2018; Lehosmaa ym., 2018). Akviferien ja pohjavesiriippuvaisten ekosysteemien rajapinnat voidaan jakaa neljään merkittävään ryhmään: lähteet, pintavedet, suot ja maaekosysteemit (Bertrand ym., 2012). Muutokset pohjaveden laadussa ja määrässä vaikuttavat näihin pohjavesiriippuvaisiin ekosysteemeihin riippuen siitä, kuinka tärkeä resurssi pohjavesi ekosysteemille on (Cantonati ym., 2012). Erilaiset tekijät määräävät pohjaveden ekologisen roolin pohjavesiriippuvaisissa ekosysteemissä (Bertrand ym., 2012). Lähteissä merkittävin piirre on lähteen morfologia, pintavesissä pohjan rakenne ja huokoisuus, suoekosysteemeissä orgaanisen aineksen rakenne ja määrä ja maaekosysteemeissä pohjaveden pinnan korkeuden vaihtelu ja tulvat (Bertrand ym., 2012). Virtavesien osalta pohja on aktiivinen vaihteittumisvyöhyke, jossa pintavesi imeytyy maaperään ja pohjavettä purkautuu vastavuoroisesti puro- tai jokiekosysteemiin. Veden lisäksi maaperästä kulkeutuu pohjaveden mukana ravinteita ja orgaanista materiaalia. Pohjaveteen valuva pintavesi kuljettaa vastavuoroisesti imeytyntä happea sekä ravinteita (Boulton ym., 1998).

Kaikista herkimpiä pohjaveteen yhteydessä olevista ekosysteemeistä ovat lähteet, jotka ovat tyypillisesti täysin riippuvaisia tasaisesti purkautuvasta pohjavedestä. Lähteet ovat lajistoltaan poikkeuksellisia ekosysteemejä, joihin muutokset pohjaveden määrässä ja kemiallisessa laadussa vaikuttavat herkästi. Erilaisten lähteiden ja niissä olevien mikrohabitaattien suuri määrä tekee niistä erityisen merkittäviä paikalliselle ja alueelliselle monimuotoisuudelle (Cantonati ym., 2012). Lähteet ovat kahden tai useamman ekosysteemin vaihteittumisvyöhykkeitä, jotka yhdistävät maa- ja vesiekosysteemejä sekä pinta- ja pohjavesiekosysteemejä (Cantonati ym., 2012, Ilmonen ym., 2012). Hyvälaatuinen ja vuoden ympäri kylmä vesi mahdollistaa useiden harvinaisten lajien esiintymisen, jotka ovat tyypillisesti herkkiä ihmistoiminnan vaikutukselle (Cantonati ym., 2012; Ilmonen ym., 2012; Lehosmaa ym., 2018). Monet lähteet voivat kuivua väliaikaisesti pohjaveden määrän vuodenaikaisvaihteluiden vuoksi, minkä on havaittu vaikuttavan myös lähteen eliöyhteisön rakenteeseen (Cantonati ym., 2012). Lähteiden eliöyhteisöt koostuvat pääosin vesikasveista selkärangattomista ja mikrobeista, kuten piilevistä, sienistä ja bakteereista. Lähteet, jotka kuivuvat säännöllisesti omaavat usein erilaisen lajiston, jonka on havaittu suosivan vahvoja levittäytyjiä ja uudelleen asuttajia, sekä lajeja, joiden munat tai välimuodot kestävät kuivuutta (Cantonati ym., 2012). Suomessa turvemaiden ojitamisen on havaittu vaikuttavan negatiivisesti pohjaveden määrään ja laatuun, minkä on puolestaan havaittu yksipuolistavan lähteiden pohjaeläin-, piilevä- ja vesisammallajistoa (Ilmonen ym., 2012; Lehosmaa ym., 2018).

1.3. Pohjavesien mikrobiyhteisöt

Arviolta 40% maapallon prokaryoottien biomassasta elää maan alla (Griebler & Lueders, 2009). Nämä yhteisöt omaavat valtavan monimuotoisuuden, joka tunnetaan toistaiseksi vain osittain (Griebler & Lueders, 2009). Pohjavesien tiedetään ylläpitävän huomattavan monimuotoisia mikrobiyhteisöjä, joiden ekologia on vasta osittain tunnettu (Stein ym., 2010). Mikrobien rooli pohjavedessä on erityisen tärkeä, sillä ne tarjoavat selkärangattomille ravintoa ja vaikuttavat veden kemialliseen laatuun (Korbel ym., 2013). Mikrobien elinkierto on lyhyt, ja niiden metaboliset vasteet ovat nopeita.

Ne eivät ole paikkasidonnaisia, vaan olosuhteisiin sidonnaisia, jonka vuoksi mikrobit heijastavat pohjaveden näytteenottohetkellä vallitsevaa tilaa (Stein ym., 2010). Tämä tekee mikrobeista erittäin lupaavan seurantakohteen pohjavesien ajallista seurantaa ajatellen, koska hetkelliset ja paikalliset häiriöt voivat heijastua tässä eliöryhmässä varsin lyhyellä viiveellä. Toistaiseksi bakteerinäytteitä on pääasiassa otettu pohjavesistä vain mahdollisia patogeenisia bakteereja (esim. *Escherichia coli*) silmällä pitäen, kun taas mikrobien biomassaa, aktiivisuutta, monimuotoisuutta tai mahdollisia ekologisia avainlajeja ei ole juurikaan tarkasteltu mahdollisina pohjaveden laadullisina mittareina (Stein ym., 2010; Sirisena ym., 2013). Mikrobit ovat osallisina lähes kaikissa pohjavesiekosysteemeissä tapahtuvissa biogeokemiallisissa prosesseissa, vaikuttaen siten vallitseviin abioottisiin olosuhteisiin ja veden laatuun (Stein ym., 2010; Korbel ym., 2013; Ben Maamar ym., 2015). Nykyinen tietämys erilaisten pohjavesiekosysteemien tärkeimmistä biokemiallisista prosesseista sekä ekosysteemin toimintaan vaikuttavista keskeisistä mikrobiryhmistä on vielä osittaista (Griebler & Lueders, 2009). Bioinformatiikan ja molekyylienetelmien kehitys sekä DNA-sekvensoinnin kustannustehokkuuden ja tarkkuuden lisääntyminen ovat kuitenkin edistäneet pohjavesibakteerien ekologista tutkimusta (Stein ym., 2010, Griebler ym., 2014).

Mikrobien esiintymistä on pidetty pitkään ainoastaan olosuhdesidonnaisena, mutta viime vuosina tätä pitkään vallassa ollutta paradigmaa on alettu kyseenalaistamaan (Griebler ym., 2014). Pitkään on ajateltu bakteerien olevan läsnä kaikkialla vain muutaman tekijän (esim. ääriämpötila (>121 °C), happamuus/emäksisyys tai veden saatavuus; ks. Griebler & Lueders, 2009) rajatessa niiden esiintymistä. Mikrobien levinneisyyttä selittävät mallit ovat hyvin keskeneräisiä erityisesti pohjavesien osalta (Griebler & Lueders, 2009). Tiedämme kuitenkin, että koko maapallon maanalainen maailma, jossa olosuhteet mahdollistavat elämän, on mikrobien asuttamaa. Maanalaiset mikrobiyhteisöt koostuvat pääosin bakteereista ja arkeista, mutta myös alkueläimistä (Protozoa) ja sienistä (Fungi). Akviferit voivat olla hyvin erilaisia keskenään hydrologisesti, kemiallisesti sekä geologisesti (Griebler & Lueders, 2009; Ben Maamar ym., 2015). Pohjavesiekosysteemeissä ei valon puutteen vuoksi tapahdu yhteyttämistä, eikä hiiltä tai ravinteita ole runsaasti saatavilla. Akviferejä asuttavien mikrobiyhteisöjen uskotaan kuitenkin koostuvan suurilta osin heterotrofisista bakteereista ja sienistä, jotka ovat sopeutuneita ravinneköyhiin ja karuihin pohjavesisysteemeihin (Griebler & Lueders, 2009).

Suurin osa akviferien prokaryooteista elää kiinnittyneenä sedimenttiin, kivien päälle tai kuolleeseen orgaaniseen ainekseen (detritus), joihin ne muodostavat biofilmejä tai kolonioita (Griebler ym., 2002). Tällaiset pinnat tarjoavat biogeokemiallisesti monimuotoisen mikroekosysteemin, josta löytyy runsaasti ekologisia lokeroita varsinaiseen ravinne- ja hiiliköyhään pohjaveteen verrattuna (Griebler & Lueders, 2009). Toinen ryhmä ovat irrallaan pohjavedessä elävät planktiset bakteerit (Hazen ym., 1991). Tyypillisesti pohjavesissä substraattiin kiinnittyneiden bakteerien määrä on moninkertainen planktisiin bakteereihin nähden (Griebler ym., 2002). Tähän vaikuttavat liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) ja ravinteiden määrä sekä sedimentin raekoko ja mineraloginen koostumus (Griebler ym., 2001; Griebler & Lueders, 2009). Kun liuennta orgaanista hiiltä on hyvin vähän, koostuu mikrobiyhteisö pääosin sellaisista anaerobisten mikrobien populaatioista, jotka pystyvät käyttämään hapen sijaan muita elektroniakseptoreita, kuten nitraattia, rautaa, sulfaattia tai hiilidioksidia soluhengityksessä (Salkinoja-Salonen & Aalto, 2002; Flynn ym., 2013; Ben Maamar ym., 2015). Näiden hapettamis- ja pelkistysreaktioiden seurauksena pohjavesien mikrobeilla on merkittävä vaikutus pohjaveden kemialliseen koostumukseen (Flynn ym., 2013). Bakteereita jaotellaan myös toiminnallisuuden perusteella. Esimerkiksi

heterotrofit ovat eliöitä, jotka eivät pysty muodostamaan omaa ravintoaan, joten ne ovat riippuvaisia muiden eliöiden tuottamista yhdisteistä (Reece ym., 2014). Lithoautotrofit muokkaavat hiilidioksidia ja saavat tarvitsemansa energian hapettamalla epäorgaanisia mineraaleja. Ne ovat heterotrofien ohella tärkeä osa pohjavesien mikrobiyhteisöjä (Griebler & Lueders, 2009).

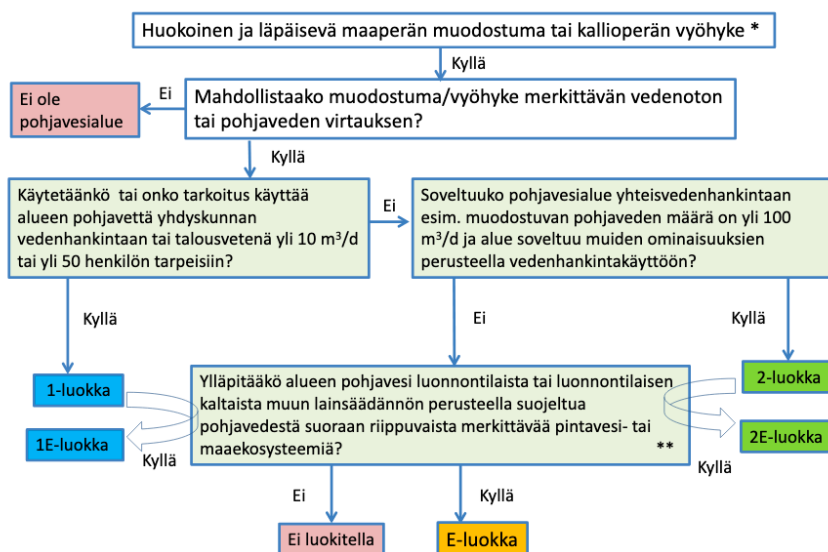
1.4. Pohjavesien seuranta Suomessa

Suomessa on noin 6000 ympäristöhallinnon luokittelemaa pohjavesialuetta, joiden tiedot ovat kaikille saatavilla pohjavesitietojärjestelmä POVET:ssa, joka on osa ympäristötiedon HERTTA-hallintajärjestelmää. Lisäksi POVET:in kautta saa käyttöön ympäristöhallinnon 80 pohjavesiasemalta kerätyn seurantatiedon. Tämä valtakunnallinen pohjavesiseurantaverkko tuottaa ja jakaa hydrogeologista tietoa pohjavesien pinnankorkeuden vaihtelusta, laadusta ja muodostumisesta, sekä geologisten, hydrologisten tekijöiden ja ihmisen toiminnan vaikutuksesta pohjaveden määrään ja laatuun (Ympäristöhallinto, 2017).

Pohjavesialueiden vedenhankintakäyttöön soveltuvuuden ja suojelutarpeen luokittelee alueellinen Elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskus (ELY). Lain mukaan jokainen pohjavesialue tulee luokitella johonkin kolmesta määritellystä luokasta:

- 1) Vedenhankintaa varten tärkeä pohjavesialue, jonka vettä käytetään tai jota on tarkoitus käyttää yhdyskunnan vedenhankintaan tai talousvetenä enemmän kuin keskimäärin 10 kuutiometriä vuorokaudessa tai yli viidenkymmenen ihmisen tarpeisiin (Ympäristöhallinto, 2017).
- 2) Muuhun vedenhankintakäyttöön soveltuva pohjavesialue, joka soveltuu riittoisuuden ja laadun puolesta luokkaan 1 (Ympäristöhallinto, 2017).

Lisäksi pohjavesialueiden luokittelussa on mukana 3) E-luokka, johon luokitellaan pohjavesialueet, josta läheiset merkittävät pintavesi- tai maaekosysteemit ovat suoraan riippuvaisia (Kuva 2) (Ympäristöhallinto, 2017). Tällaisia voivat olla esimerkiksi luonnontilaiset, luonnontilaisen kaltaiset tai muun lainsäädännön nojalla (esim. Natura 2000-luokitus) suojellut lähteet ja lähdepurot (Britschgi ym., 2018). Tämä tarkoittaa, että vaikkei pohjavesimuodostuma olisi vedenhankinnan kannalta yhteiskunnalle merkittävä, voi se silti saada suojelustatuksen (Britschgi ym., 2018).



*) Tarkastelussa hyödynnetään aiempaa hallinnolliseen ohjeistukseen pohjautuvaa pohjavesiaineistoa

**) Ekosysteemien tunnistamisessa hyödynnetään käytettävissä olevia luontotyyppien inventointitietoja ja tietoaaineistoja.

Kuva 2. Pohjavesialueiden luokittelu Suomessa (Britschgi ym., 2018).

1.5. Pohjavesien pilaantuminen

Ihmisten aiheuttama stressi pohjavesiekosysteemille voi olla fyysistä (lämpötilan nousu), kemiallista (saasteet) tai biologista (patogeenit) (Stein ym., 2010). Pohjavesien pilaantuminen on paitsi terveysriski pohjavettä käyttäville ihmisille ja eläimille, myös voimakas häiriö pohjaveteen yhteydessä oleviin ja tai siitä riippuvaisille ekosysteemeille (Babiker ym., 2004; Ilmonen ym., 2012; Chen ym., 2017; Lehosmaa ym., 2018). Pohjavesien pilaantuminen voidaan yhdistää kiihtyneeseen väestönkasvuun ja sen tuomiin ongelmiin (Jones, 2009). Pilaantumisriskiin vaikuttavat useat tekijät, kuten maankäyttö lähialueella, sekä pohjavesimuodostuman hydrogeologiset ominaisuudet (Babiker ym., 2004; Ilmonen ym., 2012; Lehosmaa ym., 2018). Maanviljely on maailmanlaajuisesti merkittävin yksittäinen pohjavesiä kuormittava tekijä, mutta kaupunkiasutuksen ja pistekuormituslähteiden (esim. teollisuuslaitokset, turkistarhaus) on myös havaittu vaikuttavan merkittävästi pohjavesien ravinnekuormitukseen (Babiker ym., 2004; Lehosmaa ym., 2018).

Nitraatti (NO_3^-) on pohjavesien osalta maailmanlaajuisesti yleisin haitta-aine, jonka arvot nousevat usein yli määriteltyjen raja-arvojen (Spalding & Exner, 1993; Vinod ym., 2015). Maailman terveysjärjestö WHO (2017) ja Euroopan unioni (Mitikka ym., 2020) ovat määrittäneet pohjavedelle raja-arvon 50 mg L^{-1} , jonka ylittävät pohjavesivarannot luokitellaan pilaantuneiksi. Nitraattia vapautuu useista eri maankäyttömuodoista (WHO, 2017). Yleisesti maanviljely, kaupunkiasutus, erilaisten pistekuormitusten sekä ulosteiden joutuminen ympäristöön ovat keskeisiä nitraattipitoisuuksia kasvattavia tekijöitä (Babiker ym., 2004). Väestönkasvu ja kasvanut ruuan tarve ovat johtaneet maatalouden tehostumiseen, ja tätä kautta pohjavesien nitraattikuormituksen kasvuun. Nitraattia vapautuu erityisesti lannoitteista, joita käytetään maanviljelyssä (Babiker ym., 2004; Spalding & Exner, 1993). Suomessa nitraatille asetettu raja-arvo (50 mg L^{-1}) ylittyi SYKE:n 2012-2015 raporttijakson mittauksissa neljässä maatalouden lähellä sijaitsevassa kohteessa. Kuudessa maatalouden lähellä sijaitsevassa pisteessä havaittiin tämän lisäksi kohonnut nitraattipitoisuus (välillä $25\text{--}50 \text{ mg L}^{-1}$), ja loput pisteistä luokiteltiin tilaltaan hyväksi ($<25 \text{ mg L}^{-1}$) (SYKE, 2017). Vuosien 2016-2019 seurantajaksolla molemmissa raja-arvon ylittäneissä luokissa oli enää kolme kohdetta, ja nitraattipitoisuuden keskiarvoksi 142 maatalouden vaikutusalueella olevassa pohjavesimuodostumassa ilmoitettiin $10,88 \text{ mg L}^{-1}$ (Mitikka ym., 2020). Suomen ympäristöministeriön raportissa todetaan, että nitraatti ei ole ongelma Suomen pohjavesissä (Mitikka ym., 2020).

Nitraattia käytetään lannoitteissa, koska se on typpiyhdiste, jonka useimmat kasvit pystyvät ottamaan ja käsittelemään suoraan maaperästä (Crawford & Glass, 1998). Suomessa korkeimmat nitraatti-, ammonium- ja fosforipitoisuudet ovat yhdistettävissä pistekuormitukseen (SYKE, 2017). Tällaisia pistekuormituksen lähteitä ovat yleisimmin turkis- ja taimitarhat (SYKE, 2017). Turkiseläinten uloste sisältää typen ja fosforin eri fraktioita, jotka imeytyvät usein riittämättömien jätteenhallintaratkaisujen takia sade- ja sulamisvesien mukana pinta- ja pohjavesiin (Salminen ym., 2012). Ulosteista peräisin oleva ammonium on typpiyhdiste, jonka maaperässä ja pohjavedessä olevat bakteerit muuttavat helposti nitraatiksi hapellisen nitrifikaatio-prosessin kautta (Salminen ym., 2012). Nitrifikaatio aiheuttaa myös pohjavesien happamoitumista sekä lisää useimpien raskasmetallien imeytymistä pohjavesiin (Salminen ym., 2012).

Myös kloridi on yleinen haitta-aine Suomen pohjavesissä, joka päättyy ympäristöön pääsääntöisesti teiden suolauksen seurauksena (Nystén & Hänninen, 1997). Kloridipitoisuuden nousu lisää pohjaveden syövyttävyyttä (Tidenberg ym., 2007). Tien

sijainti suhteessa pohjaveden havainto paikkaan, sekä ympäröivän maaperän rakenne vaikuttavat merkittävästi pohjaveden kloridipitoisuuksiin (Nystén & Hänninen, 1997). Sähkönjohtavuuden on havaittu luotettavasti ilmentävän maaperän ja vesistöjen kohonnutta kloridipitoisuutta (Rhoades ym., 1999).

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu yhteys pohjaveden kemiallisen laadun, maankäytön, bakteerien monimuotoisuuden sekä hapetus-pelkistyspotentiaalin välillä (Sirisena ym., 2013; Lehosmaa ym., 2018). Pohjaveden kemiallinen laatu on siten merkittävä bakteryhteisön rakennetta säätelevä tekijä (Sirisena, ym., 2013). Ilmiö toimii myös käänteisesti, sillä myös bakteerit vaikuttavat pohjaveden kemialliseen laatuun, kun ne hankkivat energiaa liuenneen raudan, mangaanin, typen, sulfaatin, nitraatin sekä monien muiden alkuaineiden ja yhdisteiden hapetus-pelkistysreaktioilla (Sirisena ym., 2013, Ben Maamar ym. 2015). Tämän myötä on odotettavissa, että pienetkin muutokset pohjaveden kemiallisessa laadussa tai akviferin sedimentissä johtavat muutokseen bakteryhteisön rakenteessa (Haack ym., 2004). Veden kemiallisen laadun muuttumisen on havaittu vaikuttavan myös keskeisiin ekosysteemin ylläpitämiin prosesseihin (Woodward, 2012). Esimerkiksi orgaanisen aineksen hajotuksen osalta on virtavesiekosysteemeissä havaittu, että hajotustehokkuus usein kasvaa ravinnekuormituksen myötä, kunnes pitoisuudet kasvavat haitallisen korkeiksi ja alkavat heikentää eliöstön kykyä ylläpitää toimintoja (Woodward ym., 2012). Vastaavankaltainen yksihiippuinen vaste onkin todennäköinen myös pohjavesissä ja niistä riippuvissa ekosysteemeissä (Lehosmaa ym., 2018).

1.7. Tutkimuksen tavoitteet

On tärkeää kasvattaa tietämystä pohjaveden kemiallisen laadun ja pohjavesiekosysteemin välisistä suhteista, jotta pohjavesiä ja niistä riippuvaisia ekosysteemejä pystytään suojelemaan paremmin ihmistoiminnan vaikutuksilta (Griebler & Lueders, 2009; Stein ym., 2010; Cantonati ym., 2012; Sirisena ym., 2018). Ekologisen tilan kartoitus on edellytys pohjavesien suojelemiselle, ja toistaiseksi selkeät kriteerit tähän puuttuvat (Griebler ym., 2010). Tämän pro gradu -tutkielman tarkoitus on tarkastella miten eri maankäyttömuodot (rakennetut alueet, maatalous ja näiden yhteisvaikutus) muuttavat pohjavesien kemiallista laatua ja niiden bakteryhteisöjen monimuotoisuutta, rakennetta ja toimintaa. Tarkastelin 64 Etelä- ja Keski-Suomessa sijaitsevan lähteen ympäröivää maankäyttöä, vesikemiallista laatua ja bakteryhteisöjä. Työssä testaan kolmea tutkimushypoteesia, jotka ovat; 1) lähialueen maankäyttö muuttaa pohjaveden laadullisia (nitraatti- ja kloridipitoisuus) ominaisuuksia 2) maankäyttö ja siitä johtuvat muutokset pohjaveden laadussa muuttavat yhteisöjen rakennetta ja vähentävät pohjavesibakteeriston paikallista monimuotoisuutta (α -diversiteetti) ja yhteisövaihtelua (β -diversiteetti) ja 3) muutokset bakteryhteisöjen koostumuksessa heijastuvat keskeisiin ekosysteemiprosesseihin (orgaanisen aineksen hajotus) ja tämä suhde on yksi hiippuinen, eli ensin nouseva, mutta tietyn taitepisteen jälkeen laskeva (Woodward ym., 2012).

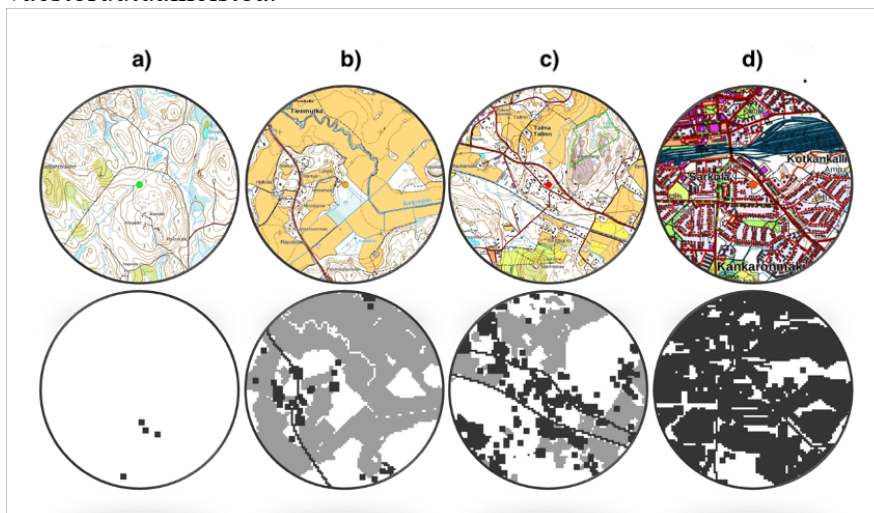
2. Johdanto

2.1 Tutkimuspaikkojen valinta ja tutkimusasetelma

Tutkielmaan valittiin 64 Etelä-Suomen (66.72°- 69.07° P; 27.82°- 49.86° I) alueella sijaitsevaa lähdeä. Eteläisessä Suomessa on runsaasti maataloutta, suuria kaupunkikeskittymiä sekä lukuisia kemialliselta laadultaan poikkeavia harjualueisiin muodostuneita pohjavesimuodostumia, mikä tarjoaa ihanteellisen tutkimusalueen työn toteuttamiseen.

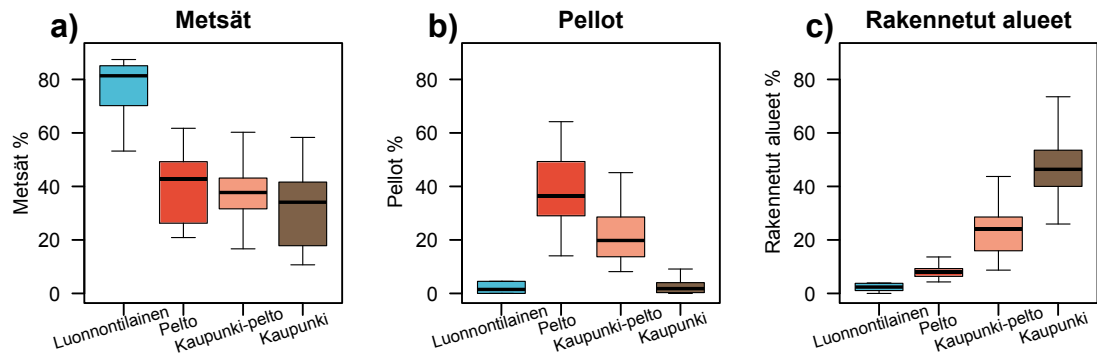
Työn aineisto kerättiin tutkimusalueen lähteistä ja muista pohjaveden purkaumakohdista kesien 2015 ja 2017 aikana. Lähteistä otettujen vesinäytteiden on aiemmissa tutkimuksissa havaittu edustavan hyvin koko pohjavesimuodostumaa (Pronk ym., 2009). Vuonna 2015 alkukesällä kerättiin näytteitä 21 lähteestä ja 2017 tätä aineistoa täydennettiin 43 uudella kohteella. Tavoitteena oli löytää eri maankäyttömuotojen 1) lähiympäristön maankäyttöltään muuttumattomia, 2) viljelymaiden 3) rakennettujen alueiden ja viljelymaiden 4) rakennettujen alueiden ympäröimiä lähteitä. Tutkimuslähteet etsittiin hyödyntäen maastokarttoja, seurantaraportteja, alueellisia lähdekartoituksia sekä ympäristöhallinnon ylläpitämää POVET-tietokantaa Suomen pohjavesialueista ja niiden seurantapististä.

Kullekin paikalle määriteltiin ArcGis-ohjelmistossa (ESRI, 2011) halkaisijaltaan kahden kilometrin puskurialue, jolta laskettiin kunkin tutkimuskohteen maankäyttöä kuvaavia muuttujia käyttäen CORINE 2012 -aineiston tason 2 maanpeitetietoja. Maanpeitetietojen avulla tutkimuskohteet luokiteltiin neljään eri maankäyttöluokkaan; luonnontilainen (9), pelto (19), kaupunki-pelto (18), ja kaupunki (n=18) (Kuva 3). Peltolähteiden tärkein ilmaiseva muuttuja oli maatalousalueiden suhteellinen osuus puskurialueella. Kaupunkilähteillä tämä vuorostaan oli rakennettujen alueiden osuus, ja kaupunki-peltolähteiden ympäriltä löytyi sekä peltoja että rakennettuja alueita. Luonnontilaisilla tutkimuskohteilla maankäyttö oli merkittävästi vähäisempää ja lähiympäristö koostui pääosin varttuneista metsistä (Kuva 3). Tämän lisäksi puskurialueilta määritettiin tieverkoston tiheys (km km^{-2}) käyttäen Väyläviraston Digiroad-aineistoa sekä asukastiheys (asukasta km^{-2}) käyttäen Tilastokeskuksen väestöruutuaineistoa.



Kuva 3. Esimerkkejä eri lähdeluokkia ympäröivistä puskurialueista maastokarttakuvassa (yläriivi), sekä CORINE 2012 rasterikuvassa-kuvassa (alarivi). Rasterikuvassa harmaa väri kuvaa maanviljelyä, musta rakennettua aluetta ja valkoinen metsää. a) Luonnontilainen lähde (N=9), b) Peltolähde (N=19), c) Kaupunki-peltolähde (N=18), d) Kaupunki-lähde (N=18)

Luonnontilaisten lähteiden kahden kilometrin halkaisijalla olevalla alueella rakennettujen alueiden ja peltojen prosentuaalinen osuus oli selvästi pienin, kun taas metsien määrä vyöhykkeestä oli selkeästi suurin (Kuva 4). Peltolähteiksi luokitelluilla paikoilla peltojen määrä oli ryhmistä korkein (keskiarvo noin 40 %), mutta rakennettujen alueiden määrä alle 10 %. Kaupunkilähteissä rakennettujen alueiden suhteellinen osuus oli keskiarvoltaan noin 47 % (Kuva 4). Peltoja kaupunkilähteissä oli keskimäärin alle 5 %. Kaupunki-pelto-lähteiksi luokiteltu ryhmä asettui peltojen ja rakennettujen alueiden osuuksien suhteen kaupunki- ja peltolähteiden väliin (peltojen osuus noin 20 %, rakennettujen alueiden osuus noin 22 %). Metsien osuus laski rakennettujen alueiden nousun myötä (Kuva 4).



Kuva 4. a) Metsien, b) peltojen ja c) rakennettujen alueiden osuudet kahden kilometrin halkaisijalla olevalla puskurialueella eri maankäyttöluokissa. Laatikkodiagrammin keskimäinen paksu viiva kuvaa mediaania ja laatikon reunat rajaavat ylemmän ja alemman neljänneksen havainnoista. Janat laatikon ylä- ja alapuolella kuvaavat ääriarvoja.

2.2. Näytteenotto

Näytteenotto tapahtui kahdessa osassa: 8.6. -12.6.2015 (21 lähdeä) ja 29.5. -2.6.2017 (43 lähdeä). Jokaisessa kohteessa pohjaveden purkaumapiste paikannettiin lämpökameralla (Flir C2, FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA). Purkaumapisteen kohdalta otettiin vesinäytteet bakteerilajiston, nitraatin, vedyn ja hapen isotooppien sekä liuenneen orgaanisen hiilen määrittystä (DOC) varten. Tämän lisäksi lähdehabitaatin luonnontila arvioitiin visuaalisesti (Heino et al. 2005), sekä vedestä mitattiin pH, sähkönjohtavuus ja lämpötila WTW Multi 350i (WTW, Weilheim, Saksa) kenttämittarin avulla. Sähkönjohtavuutta käytettiin koko aineistossa kloridipitoisuuden indikaattorina, sillä ne korreloivat voimakkaasti vuoden 2015 aineistossa ($r = 0.91$).

2.3. Mikrobihajotustoiminnan mittaus

Orgaanisen materiaalin (selluloosa) hajotustoimintaa mitattiin standardisoidulla puuvillakangas-kokeella (Tiegs ym., 2013). Orgaanisen aineksen hajoamista mitattiin 15 näytteenoton yhteydessä valitusta lähteestä. Nämä lähteet valittiin edustamaan vaihtelevaa maankäyttöä ja vesikemialta. Puuvillakangas-menetelmä on vakiinnuttanut paikaansa sisävesien ekologisessa tutkimuksessa (Colas ym., 2019). Menetelmän on havaittu antavan hyvän käsityksen bakteerien yleisestä aktiivisuudesta, sekä sellulolyyttisten bakteerien runsaudesta, ja se on havaittu toimivaksi myös pohjavesien mikrobialisen aktiivisuuden selvittämisessä (Lategan ym., 2010). Puuvillakangaiden valmistelussa, kokeessa ja jälkikäsittelyssä noudatettiin Tiegs ym. (2013) ohjeistusta. Puuvillakangat (2.5×8 cm) punnittiin ennen koetta ja kolme kappaletta kangaita kiinnitettiin tasavälein kahdelle 80 cm nylon-narulle, jotka kiinnitettiin ankkurina toimivaan rakennustiileen ja tiili asetettiin lähteen pohjaan. Inkubointiajat olivat

ensimmäiselle osalle (n=3) kankaita kuusi viikkoa ja toiselle osalle (n=3) 12 viikkoa ja inkuboinnin jälkeen hajotustoiminta pysäytettiin uittamalla kankaita 96 % etanolissa 60 sekunnin ajan. Laboratoriossa puuvillakankaat kuivattiin uunissa 50 °C lämpötilassa 48 tunnin ajan, minkä jälkeen kankaat punnittiin uudelleen. Kankaiden vetolujuus Newtonina (N) testattiin tensiometrillä (Zwick/Roell Z010, Saksa). Kangasliuskaa vedettiin tasaisella voimalla (2cm/min), kunnes kangas repesi. Inkuboitujen kankaiden vetolujuutta verrattiin kontrollikankaiden keskimääräiseen vetolujuuteen. Tämä määritettiin mittaamalla kymmenen hanavedessä kastetun ja uunissa kuivatun kangasliuskan vetolujuuden keskiarvo. Vetolujuushävikki laskettiin inkubointijaksoa kohden (Tiegs ym., 2013). Kuuden ja 12 viikon inkubointiajoista laskettiin keskiarvot, joita käytettiin tilastollisissa analyyseissä. Kullakin paikalla toiseen naruista kiinnitettiin lämpötilaloggeri (iButton, Thermochron; Maxim Integrated, San Jose, CA, USA) joka mittasi veden lämpötilaa 60 minuutin välein. Päivittäisten lämpötilojen keskiarvojen summat eivät kuitenkaan eronneet merkitsevästi maankäyttöryhmien välillä, joten hajoamisnopeuksiin ei nähty tarvetta tehdä lämpötilakorjauksia.

2.4. Molekyylibiologiset menetelmät

Bakteeriyhteisöjen rakenteen ja monimuotoisuuden selvittämiseksi pohjavesinäytteistä eristettiin ribosomaalinen DNA (rDNA), jonka jälkeen 16S rRNA V4-V5 geenialue monistettiin polymeerasiketjureaktiolla (PCR). DNA:n eristäminen tehtiin Oulun yliopiston Ekologian ja Genetiikan Tutkimusyksikön molekyylibiologian laboratoriossa Qiagenin DNeasy PowerWater®-eristysmenetelmällä valmistajan ohjeita seuraten. Eristyksen jälkeen näytteiden puhtaus, sekä DNA:n konsentraatio testattiin spektrofotometrisesti NanoDrop- laitteella (Thermo Scientific).

2.4.1. PCR

Eristettyjen näytteiden DNA monistettiin polymeerasiketjureaktiossa (PCR). Jokaisesta näytteestä tehtiin PCR-ajoa varten kolme rinnakkaisnäytettä. PCR:n Mastermix-liuoksen osat olivat steriili vesi, GC-puskuriliuos, R-alue (9262tr), dNTP (deoksinukleotidit) ja polymeerasientsyymi. PCR-reaktioliuoksen ainesosien määrä per reaktio on eritelty Taulukossa 1. GC-puskuriliuos parantaa PCR-reaktion olosuhteita monistumisen onnistumiseksi, sekä vakauttaa polymeerasientsyymien toimintaa. Polymeerasientsyymi rakentaa kopioitavan juosteen deoksinukleotideistä (dNTP). R- ja F-alukkeiden (Forward primer) tehtävä on rajata DNA-juosteen 5'- ja 3'-päistä alue, jonka polymeerasientsyymi monistaa. F-alue oli jokaiselle näytteelle yksilöllinen, jotta näytteet pystyttiin tunnistamaan PCR:n jälkeen (Madigan ym., 2009). Lisäksi jokaiseen ajoon lisättiin negatiivinen kontrolli, jonka tarkoitus oli ilmaista mahdollinen kontaminaatio.

Varsinaiset reaktiot tehtiin Veriti ® Thermal Cycler (Life Technologies) PCR-laitteella. PCR perustuu kolmen eri vaiheen toistamiseen. Nämä vaiheet ovat denaturaatio, alukkeiden kiinnittymisvaihe ja pidentyminen (Taulukko 2) (Madigan ym., 2009). Denaturaatiossa DNA:n vastinjuosteet eroavat toisistaan. Tämän jälkeen seos viilentyy ja alukkeet ja polymeerasi kiinnittyvät toisistaan eronneisiin juosteisiin. Viimeisessä vaiheessa, eli pidentymisessä, polymeerasi jatkaa alukkeita rakentamalla deoksinukleotideistä uudet vastinjuosteet käyttäen kohdejuostetta templaattina (Madigan ym., 2009). Näitä edellä mainittua kolmea sykliä toistetaan useita kertoja, jolloin haluttu DNA-alue on kopioitunut jopa miljoonakertaiseksi (Madigan ym., 2009). Käyttämässämme ohjelmassa suoritettiin ensin kolmen minuutin alkudenaturaatio,

jonka jälkeen kolme vaihetta toistettiin 30 kertaa. Lopuksi laite laskee lämpötilan 4°C:een. Vähäisen DNA-määrän takia joidenkin näytteiden reaktioliuokseen lisättiin eristetyn DNA-templaatin määrää, jotta monistuminen saatiin optimoitua näytekohtaisesti.

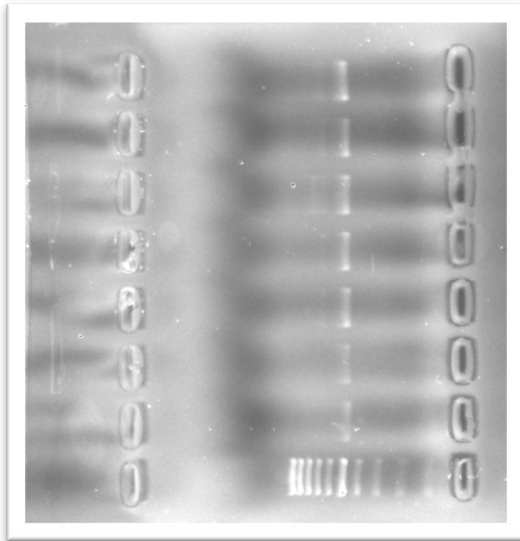
Taulukko 1. PCR-reaktioliuoksen osat ja niiden määrät

H ₂ O (molegrade)	11,4 μ l
GC-puskuriliuos	4 μ l
R-aluke	1 μ l
dNTP	0,4 μ l
Phusion II DNA-polymeraasi	0,2 μ l
Mastermix	=17 μ l
Näyte (templaatti-DNA)	2 μ l
F-aluke	1 μ l
Yhteensä	=20 μl

Taulukko 2. PCR-ohjelma ja sen eri vaiheet, sekä niiden lämpötilat, ajat ja syklien määrät

PCR-vaihe	Lämpötila(°C)	Aika(min)	Syklien määrä
Alkudenaturaatio	98	3:00	1
Denaturaatio	98	0:10	30
Alukkeiden kiinnittyminen	64	0:30	
Pidentyminen	72	0:20	
Lopullinen pidentyminen	72	5:00	1

PCR:n jälkeen monistumisen onnistuminen testattiin agarosigeelielektroforeesilla, jossa käytettiin agarosigeeliä. Agarosigeeli kuvattiin Bio-Rad-Image-kuvantamislaitteella (Bio-Rad Laboratories Inc.) (Kuva 5). Agarosigeelillä määritetään DNA-fragmenttien koko. Valmis geeli asetettiin ajolaitteeseen, jossa puskurinesteenä käytettiin 1 % TAE. Ensimmäiseen kuoppaan (Kuva 5, alin rivi) pipetoitiin 5 μ l Gene Ruler DNA Ladder, joka mahdollistaa DNA- tai RNA- molekyylien koon tunnistamisen merkkamalla geeliin eri kohdat eri kokoisille molekyyleille. Muihin kuoppiin pipetoitiin 5 μ l näytettä sekä 1 μ l SYBR Green-väriainetta. Ajolaitteen toisessa päässä on anodi ja toisessa katodi, ja ajo tapahtuu katodiin päin. Tässä työssä käytettiin 20 minuutin ajoaikaa, 125 V jännitettä ja 250 mA virtausta. PCR:ssä monistettu geenialue oli 16S:n V4-V5 geenialue, jonka lopputuote noin 500 emäsparia (Kuva 5).



Kuva 5. Agarosigeelelektroforeesi. Alimmalla rivillä Gene Ruler DNA Ladder, joka jättää geeliin portaat, jotka näyttävät kohdat eri DNA-määrille. Kaikki ensimmäisen sarakkeen kuoppien näytteet (vasen), ovat onnistuneita. Puhdas lopputuote on 500 emäsparia.

2.5. Bioinformatiikka

2.5.1. Sekvensointi

Ennen varsinaista sekvensointia näytteet monistettiin emulsio-PCR:llä, jossa DNA pilkotaan osiin, joihin liitetään adapterit (Kanagal-Shamanna, 2016). Adapterien avulla pilkotut templaatti-DNA-fragmentit kiinnittyvät helmiin. Yhteen helmeen voi kiinnittyä vain yksi templaatti (Kanagal-Shamanna, 2016). Tämän jälkeen helmet lisätään yhteen seokseen, jossa itse monistuminen tapahtuu, eli templaatti-DNA:ta kopioidaan helmen pinnalle (Kanagal-Shamanna, 2016). Monistetun DNA:n biokemiallinen informaatio muutettiin digitaaliseen muotoon sekvensoimalla (Life Technologies Corporation, 2013). Tämä tapahtui puolijohdesekvensointitekniikkaa hyödyntävällä Ion Torrent-sekvensointilaitteella (Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) System, Thermo Fisher Scientific). Menetelmä perustuu DNA:n polymerisaatiossa vapautuvien vetyionien reaaliaikaiseen havaitsemiseen (Life Technologies Corporation, 2013). Monistumisen jälkeen helmet siirretään mikrosirulle, joka asetetaan itse sekvensointilaitteeseen. DNA-polymeraasi rakentaa puolikkaalle juosteelle vastinjuostetta, jonka yhteydessä Ion Torrent havaitsee jokaisen uuden nukleotidin. Tämä on mahdollista, koska nukleotidit, joista vastinjuoste rakentuu, ovat omilla vetyioneilla merkattuja. Fluoresenssiin perustuvat anturit havaitsevat eri taajuuksia vapautuneista vetyioneista, joista voidaan päätellä, mikä nukleotidi on kyseessä (Kanagal-Shamanna, 2016).

2.5.2. Bioinformatiikka

Sekvenssit analysoitiin QIIME 2 (Quantitative insights Into Microbial Ecology) –ohjelmistolla (Bolyen ym., 2018). Dada2 (error rate) algoritmia sekä SILVA tietokantaa hyödynnettiin sekvenssien analysoimisessa sekä ESVs (Exact Sequence variants) tunnistamisessa. Bioinformatiikkaosuuden teki tutkimusryhmän muu jäsen.

2.6. Tilastolliset menetelmät

Tilastolliset analyysit suoritettiin R-ohjelmistolla (R Core Team, 2018). Analyyseissä käytettiin R:n pakettia *vegan* (Oksanen ym., 2013). Ympäristömuuttujien paikka- ja ryhmäkohtaista vaihtelua tarkasteltiin laatikkodiagrammeilla sekä pääkomponenttianalyysillä (Principal Component Analysis, PCA).

Monimuuttujamenetelmissä moniulotteinen aineisto järjestetään kaksiulotteiseen avaruuteen, jolla pyritään saamaan aineisto helposti hahmotettavampaan muotoon menettämättä oleellista tietoa. PCA pyrkii selittämään moniulotteisen aineiston varianssi-kovarianssirakennetta yhdistämällä alkuperäisiä muuttujia muutamiksi latenteiksi muuttujiksi, eli pääkomponenteiksi, minkä avulla pyritään redusoimaan ja tulkitsemaan aineistoa (Johnson, 2002). Tässä työssä PCA:lla tarkasteltiin maankäyttöluokkien välisiä eroja ympäristömuuttujien ja maankäytön suhteen, eli oliko maankäyttöluokkien välillä eroa myös ympäristömuuttujien suhteen. Erojen merkitsevyyttä testattiin PERMANOVA-testillä euklidisia etäisyyksiä käyttäen (permutational multivariate analysis of variance; 999 permutaatiota; *adonis*-funktio, paketti *vegan*). Ympäristömuuttujien vaihtelua eri maankäyttöluokissa kuvattiin laatikkodiagrammeilla. Erojen merkitsevyyttä testattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (one-way ANOVA), johon sisällytettiin myös Tukeyn HSD-testi (honest significant difference), jolla testattiin eri ryhmien parittaisia eroja.

Yhteisöjen rakenteen ja sitä säätelevien ympäristötekijöiden tarkasteluun käytettiin etäisyyksiin perustuvaa redundanssianalyysia (distance-based redundancy analysis, dbRDA, R *vegan*-paketti). dbRDA on epäsymmetrinen ordinaatiomenetelmä, jonka avulla tarkasteltiin, eroavatko maankäyttöryhmät bakteerien lajikoostumuksen osalta ja toisaalta, mitkä ympäristömuuttujat selittävät parhaiten lajikoostumuksen vaihtelua paikkojen välillä. Menetelmä sallii perinteisestä redundanssianalyysistä (RDA) poiketen muiden kuin euklidisten etäisyyssmittojen käytön, kuten Bray Curtis -etäisyyssmitta, jota myös tässä työssä käytettiin (Oksanen ym., 2013). Ympäristömuuttujille tehtiin neliöjuurimuunnos eri muuttujien välisten erojen tasoittamiseksi. Ympäristömuuttujien välinen multikollinearisuus arvioitiin *car* R-paketin *vif*-komennolla (variance inflation factor; VIF) ja voimakkaasti keskenään korreloituneet muuttujat ($VIF > 5$) poistettiin alustavasta mallista. Ympäristömuuttujien ja yhteisöordinaation välisiä riippuvuussuhteita testattiin ja lopulliseen malliin valikoituvat ympäristömuuttujat valittiin permutaatioihin ($n=999$) perustuvan askeltavan muuttujavalinnan avulla (*ordistep*-funktio, *vegan*-paketti).

Eroja bakteeriyhteisöjen rakenteessa eri maankäyttöryhmien välillä testattiin PERMANOVA-testillä (permutational multivariate analysis of variance; 999 permutaatiota; *adonis*-funktio, paketti *vegan*). Merkitsevän yleistestin jälkeen ryhmien välisiä eroja testattiin parittaisilla PERMANOVA-testeillä. Bakteerien ESV-runsauksien eroja luonnontilaisten lähteiden ja eri maankäyttöryhmien välillä testattiin yleistetyllä lineaarisella mallilla (generalized linear model, GLM) käyttäen poisson virhejakaumaa.

Yhteisövaihtelun (1. β -diversiteetti) eroja maankäyttöryhmien välillä testattiin *betadisper*-funktion avulla (*vegan*-paketti). Menetelmä arvioi jokaiselle ryhmälle painopisteen pääkoordinaattianalyysiä (Principal Coordinates Analysis; PCoA) käyttäen, ja laskee kullekin paikalle etäisyyden tästä painopisteestä. Painopiste kuvastaa ns. malliyhteisöä. Mitä suurempi etäisyys on painopisteeseen, sitä enemmän

yhteisökoostumuksellista vaihtelua luokan sisällä on. Yhteisövaihtelujen varianssille tehtiin myös Tukey HSD-testi (honest significant difference), joka testaa, ovatko ryhmien välillä olevat erot tilastollisesti merkitseviä.

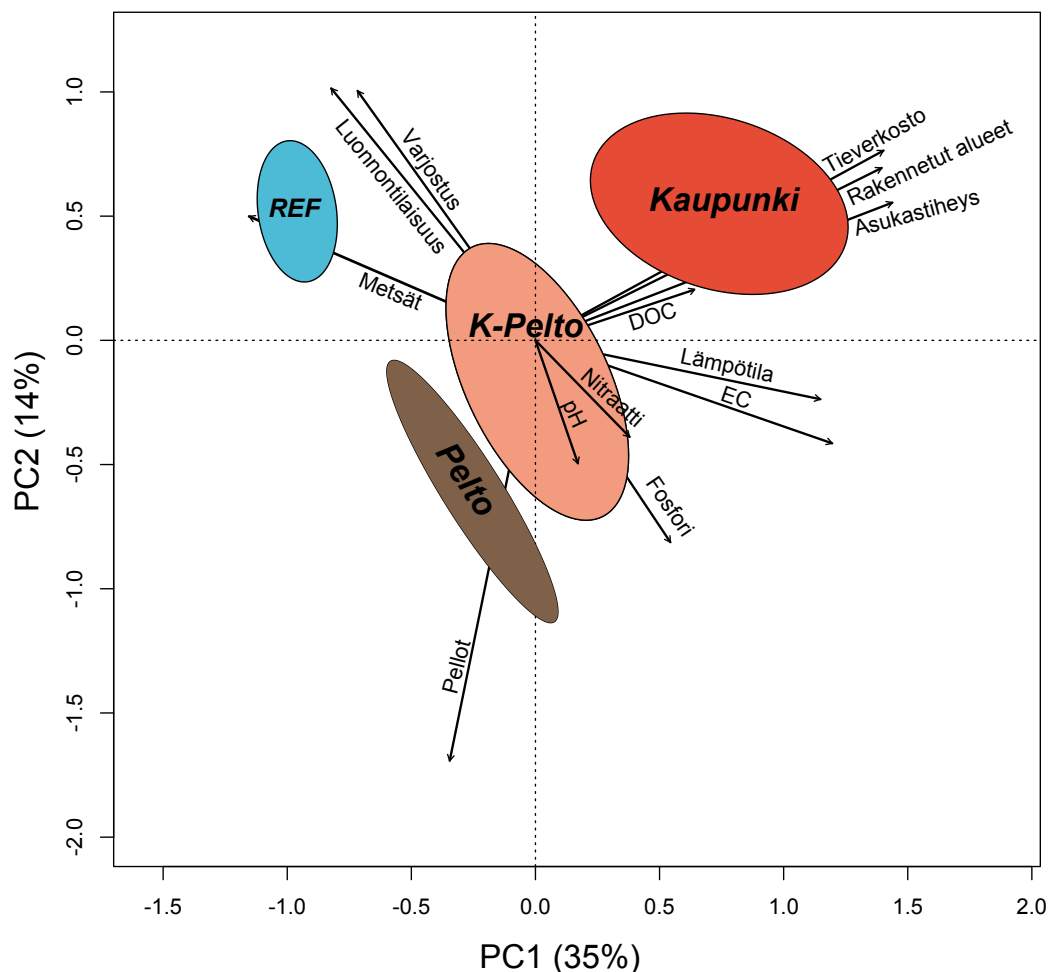
Pääryhmien osuuksia kuvaavassa pylväskuvaajassa bakteerien pääryhmät yhdistettiin QIIME2:n 6-tason (sukutaso) taksoneista, koska tätä tasoa käytettiin muissa testeissä. Myös kaikki samaan maankäyttöluokkaan kuuluvat paikat yhdistettiin. Yhteisöjen eroja tarkasteltiin myös maankäyttöryhmien jakamien ja ryhmäkohtaisten ESV-määrien suhteen Venn-diagrammilla (paketti gplots, Warnes ym., 2016). Venn-diagrammia käytetään useiden joukkojen yhtäläisyyksien ja eroavaisuuksien tarkasteluun ja sen käyttö mikrobiomien tarkastelussa on yleistynyt (Shade & Handelsman, 2012).

Nitraattipitoisuuden ja bakteerien ESV-määrän sekä puuvillakankaiden vetolujuushävikin välistä suhdetta tarkasteltiin lineaarisen regressioanalyysin avulla. Koska lähteet olivat epätasaisesti jakaantuneet nitraattigradientille, tehtiin nitraattiarvoille kymmenkantainen logaritmuunnos. Vasteen mahdollisen yksihuippuisuuden testaamiseksi malleihin sisällytettiin myös toisen asteen termi, mikäli se paransi mallin sovitetta. Vaihtoehtoisten mallien vertaaminen perustui Akaike Information Criterion -arvoon (AIC) ja toisen asteen malli valittiin, mikäli sen AIC-arvo oli > 2 yksikköä pienempi yhden termin malliin verrattuna.

3. Tulokset

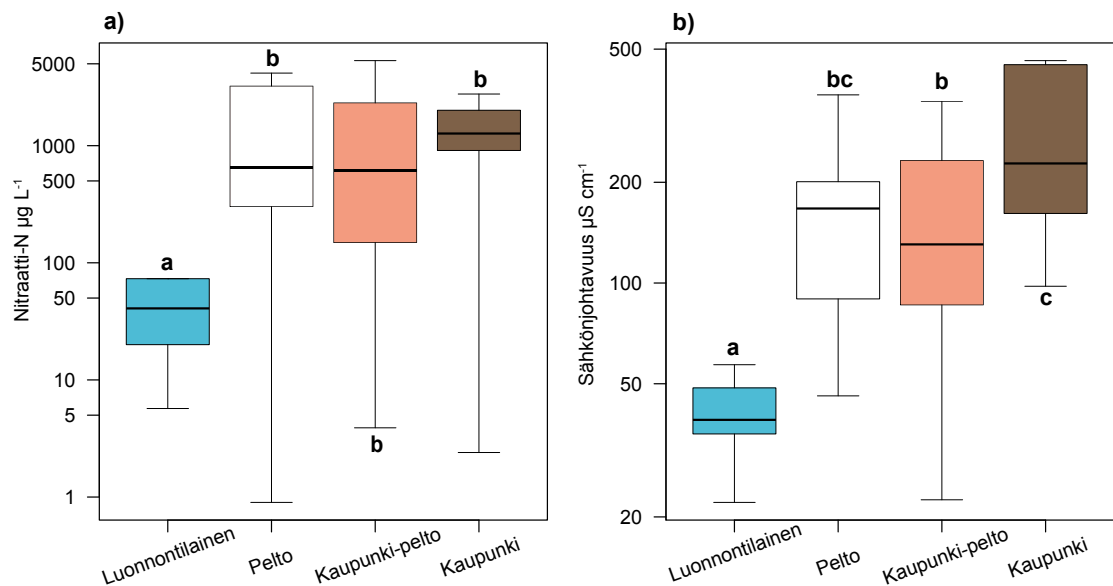
3.1. Maankäytön vaikutus pohjaveden kemialliseen laatuun

Veden kemiallinen laatu ilmentää ympäröivää maankäyttöä, joka on nähtävillä Kuvassa 6, johon on otettu mukaan lähialueen maankäyttöön liittyvät muuttujat, mitatut vesikemialliset muuttujat (nitraatti, DOC, lämpötila, sähkönjohtavuus (EC), pH ja kokonaisfosfori) sekä muutama näytteenoton yhteydessä arvioitu paikkakohtainen ympäristömuuttuja (lähdeympäristön luonnontilaisuus ja varjostus). Maankäyttöryhmät erosivat merkitsevästi toisistaan ympäristömuuttujien suhteen (PERMANOVA $F_{3,60} = 7.2$, $P = 0.001$). Pääkomponenttianalyysin ensimmäiset kolme pääkomponenttia selittivät yhteensä 61.35% ympäristöaineiston vaihtelusta. Ensimmäinen pääkomponentti (PC1) korreloi vahvasti rakennettujen alueiden osuuden, teiden määrän ja asukastiheyden sekä veden lämpötilan ja sähkönjohtavuuden kanssa. PC2 korreloi eniten lähdehabitaatin luonnontilaisuuden, varjostuksen, peltojen osuuden ja kokonaisfosforipitoisuuden kanssa. Maankäyttöryhmät sijoittuivat ordinaatiossa siten, että varjostus, lähdehabitaatin luonnontilaisuus ja metsien osuus puskurialueella latautuivat luonnontilaistenlähteiden suuntaan. Peltolähteitä ilmensi peltojen osuus puskurialueella. Kaupunki-peltolähteet asettuivat ordinaation keskelle, ja täten se ryhmä korreloi kaikkien ympäristömuuttujien suhteen, mutta vähemmän, kuin muut maankäyttöryhmät. Kaupunkilähteitä ilmensi tieverkoston määrä, rakennettujen alueiden osuus ja asukastiheys puskurialueella. Nitraattipitoisuus, pH, kokonaisfosfori, lämpötila ja sähkönjohtavuus korreloivat kaikkien maankäyttöryhmien kanssa.



Kuva 6. Maankäyttörhmien sijoittuminen kaksiulotteisessa PCA-ordinaatiossa. Ellipsit kuvaavat ryhmäkohtaisia 95% luottamuspiiviä laskettuna paikkojen keskihajonnan perusteella ja nuolet kuvaavat eri ympäristömuuttujien latautumisen suuntaa ja voimakkuutta suhteessa pääkomponentteihin. REF= luonnontilaiset ja K-Pelto = kaupunki-peltolähteet.

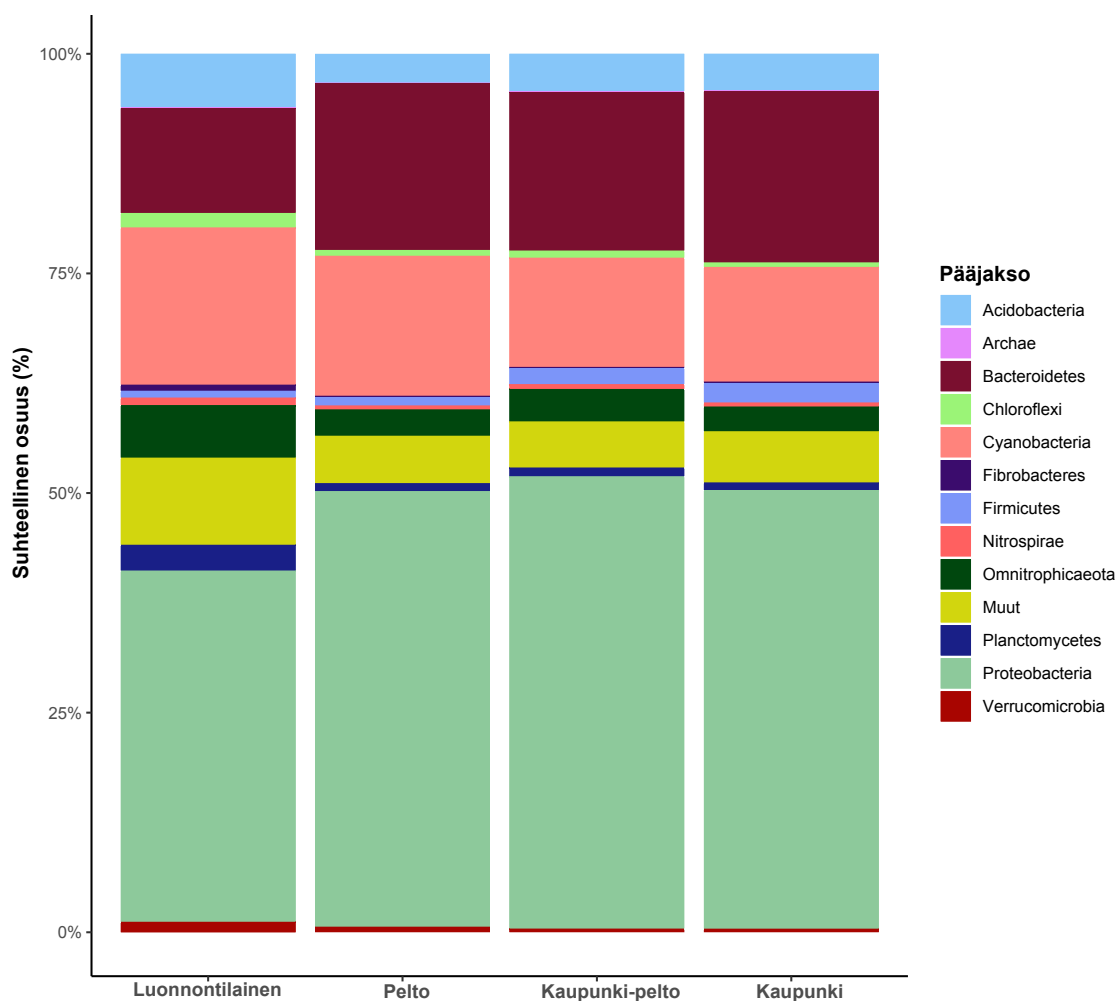
Mitattujen nitraattipitoisuuksien vaihteluväli aineistossa oli 0.9-8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ja keskiarvo ($\pm\text{SD}$) oli $1460\pm 1799 \mu\text{g L}^{-1}$. Ryhmäkohtaiset nitraattipitoisuuden keskiarvot ($\pm\text{SD}$) olivat: pelto = $1571\pm 1545 \mu\text{g L}^{-1}$, kaupunki-pelto = $1961\pm 2503 \mu\text{g L}^{-1}$ ja kaupunki = $1534\pm 1380 \mu\text{g L}^{-1}$. Luonnontilaisissa lähteissä vastaava luku oli $76\pm 87.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Kloridipitoisuuden indikaattorina käytetyn sähkönjohtavuuden keskiarvo ($\pm\text{SD}$) koko aineistossa oli $196.2\pm 186.7 \mu\text{S cm}^{-1}$, luonnontilaisissa lähteissä $44.7\pm 19.3 \mu\text{S cm}^{-1}$, peltolähteissä $179.6\pm 107.6 \mu\text{S cm}^{-1}$, kaupunki-pelto-lähteissä $153.5\pm 93.6 \mu\text{S cm}^{-1}$ ja kaupunki-lähteissä $332.1\pm 272.2 \mu\text{S cm}^{-1}$. Veden kemiallinen laatu muuttui maankäytön myötä sekä nitraattipitoisuuden (ANOVA; $F_{3,60} = 4.8$, $P = 0.005$) että sähkönjohtavuuden ($F_{3,60} = 16.1$, $P < 0.001$) osalta (Kuva 7). Maankäytön vaikutuksen alaiset lähteet erosivat merkitsevästi luonnontilaisista lähteistä sekä nitraatin (pelto: $P < 0.01$, kaupunkipelto: $P < 0.05$, kaupunki: $P < 0.01$), että sähkönjohtavuuden (pelto: $P < 0.001$, kaupunkipelto: $P < 0.001$, kaupunki: $P < 0.001$) osalta (Kuva 7).



Kuva 7. a) Nitraattipitoisuuden ja b) sähkönjohtavuuden vaihteluväli, mediaani, sekä ylä- ja alaneljännes eri maankäyttöluokissa. Ryhmät jotka jakavat saman kirjaimen, eivät eroa toisistaan merkitsevästi riskitasolla $P < 0.05$ (ANOVA, Tukey HSD, $P < 0.001$).

3.2. Maankäytön vaikutus bakteeriyhteisöihin

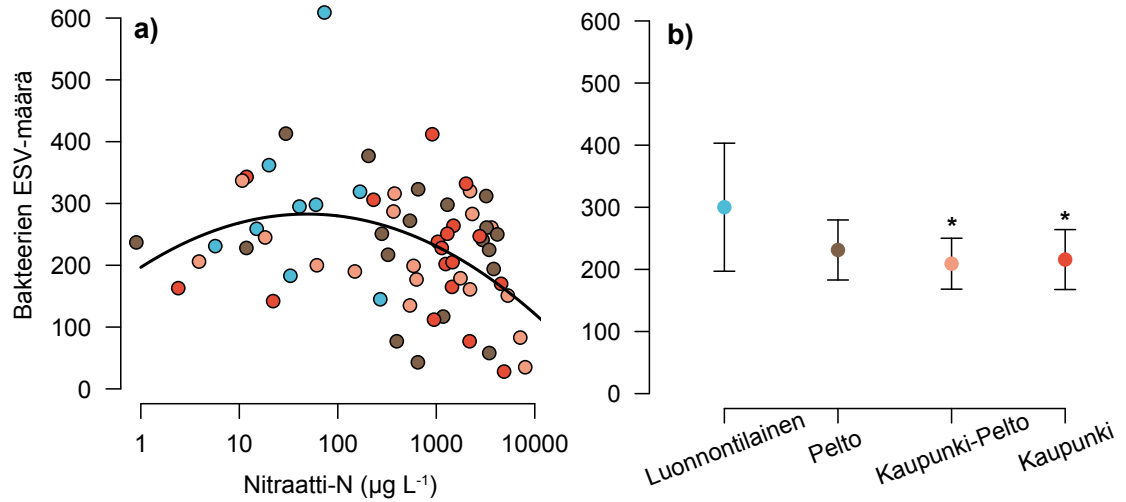
Kaikkiaan aineistosta löydettiin 1890 sukutason bakteri-ESV:tä ja 52 pääjaksoa, joista 48 % oli proteobakteereja, 17 % bakterioideja ja 15 % cyanobakteereja. Muita merkittäviä pääjaksoja olivat acidobakteerit (4,5 %) ja Omnitrophicaeota (4 %). Ryhmä ”muut” piti sisällään pienemmät pääryhmät, yhteensä 6,7 % kaikista löydetyistä taksoneista. ”Muut”-ryhmä oli suurempi luonnontilaisissa lähteissä (9,9 %) kuin pelto- (5,7 %), kaupunki-pelto- (5,3 %) tai kaupunkilähteissä (5,8 %). Tämä ryhmä koostui pienemmistä pääryhmistä, kuten aktinobakteereista, Elusimicrobia ja Rokubacteria. Samankaltainen tulos oli havaittavissa kaikissa muissa pääryhmissä paitsi kahdessa suurimmassa, eli proteobakteerit (luonnontilainen: 40 %, pelto: 52,3 %, kaupunki-pelto: 51,5 % ja kaupunki: 49,9 %) ja Bakterioidea (luonnontilainen: 40 %, pelto: 52,3 %, kaupunki-pelto: 51,5 % ja kaupunki: 49,9 %) sekä pääjaksossa firmikuutit (Kuva 8).



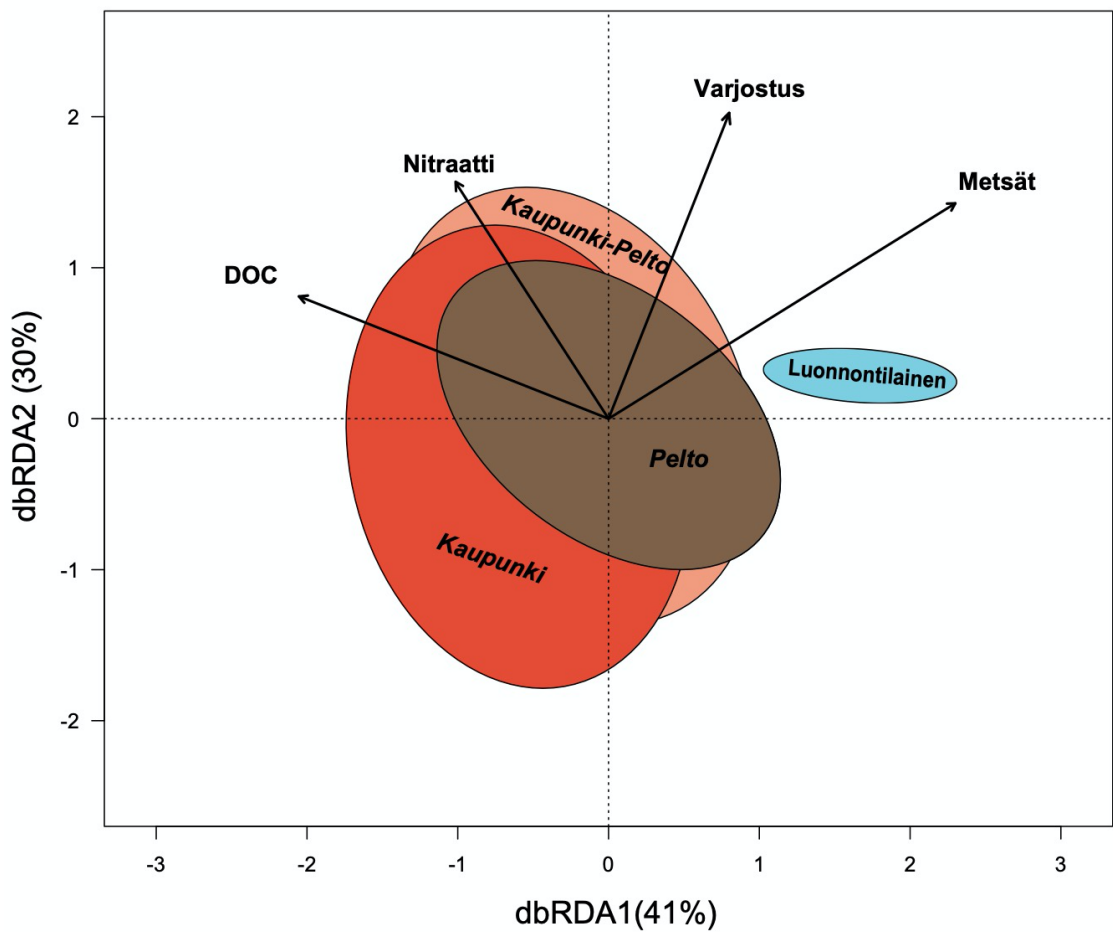
Kuva 8. Bakteerien pääjaksojen suhteelliset osuudet eri maankäyttöluokissa. "Muut"-ryhmä pitää sisällään kaikki pienemmät pääjaksot.

Nitraattipitoisuuden ja bakteerien ESV-määrän välillä havaittiin yksihuippuinen vaste, jonka taitekohta oli $\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.163$, $P = 0.019$; Kuva 9a). Bakteerien monimuotoisuus lähti pieneneään verrattain alhaisissa nitraattipitoisuuksissa, ja jo yli $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ pitoisuuksissa ESV-määrä laski alle luonnontilaisten lähteiden keskiarvon. Bakteerien ESV-määrä oli suurin luonnontilaisissa lähteissä. Kaupunki-pelto- (GLM: $t = -2.227$, $P = 0.03$) ja kaupunkilähteet ($t = -2.064$, $P = 0.044$) erosivat ESV-määrien osalta luonnontilaisista merkitsevästi, mutta peltolähteiden ($t = -1.701$, $P = 0.0941$) suhteen ero ei ollut merkitsevä (Kuva 9b).

Bakteeriyhteisöjen rakenne maankäyttöryhmien välillä erosi merkitsevästi (PERMANOVA, $F_{3,60} = 1.75$, $P < 0.001$) (Kuva 10). Parittaiset PERMANOVA-testit osoittivat, että pelto- ($R^2 = 0.081$, $P < 0.05$), kaupunki-pelto- ($R^2 = 0.079$, $P < 0.01$) ja kaupunkilähteiden ($R^2 = 0.101$, $P < 0.01$) bakteeriyhteisöt erosivat merkitsevästi luonnontilaisten lähteiden yhteisöistä. Sen sijaan maankäytön muuttamien lähteiden välillä ei ollut merkitseviä eroja. Parhaiten yhteisöjen vaihtelua selittivät metsien osuus ($F_{1,59} = 2.18$, $P = 0.02$), liuennut orgaaninen hiili (DOC) ($F_{1,59} = 1.84$, $P = 0.008$), nitraattipitoisuus ($F_{1,59} = 1.62$, $P = 0.018$) ja lähdehabitaatin varjostus ($F_{1,59} = 1.39$, $P = 0.047$) (Kuva 10).

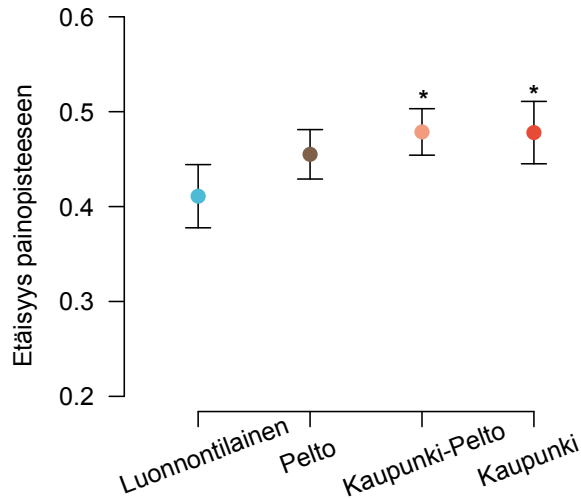


Kuva 9. a) Bakteerien ESV-määrän suhde nitraattipitoisuuteen, b) Bakteerien ESV-määrä eri maankäyttöluokissa. Tähdet hajontaviivojen yläpuolella ilmaisevat tilastollisesti merkitsevää eroa Luonnontilaisryhmään (* $P < 0.05$).



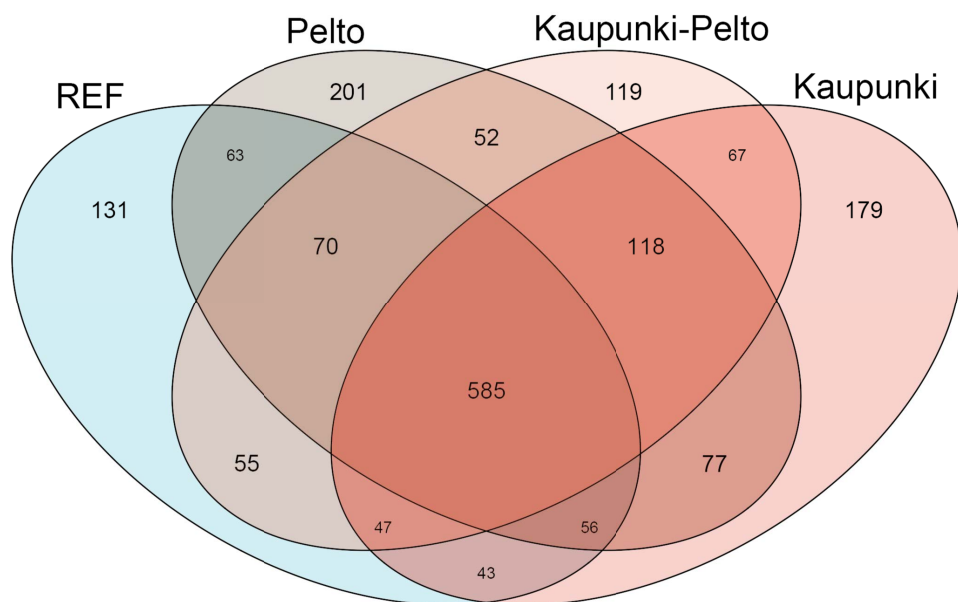
Kuva 10. Eri maankäyttöryhmien sijoittuminen bakteeriyhteisöjen mukaan dbRDA-ordinaatiossa. Eri maankäyttöluokkiin kuuluville lähteille on piirretty luottamusellipsit, jotka osoittavat 95% luottamusväliä painopisteen ympärillä. Nuolet kuvaavat mihin suuntaan mentäessä parhaiten yhteisövaihtelua selittävät ympäristömuuttujat kasvavat.

Ryhmiä sisäinen β -diversiteetti kasvoi maankäytön myötä ja oli merkitsevästi suurempaa kaupunki-pelto- ($P = 0.021$) ja kaupunkilähteissä ($P = 0.020$) luonnontilaisiin lähteisiin verrattuna (Kuva 11). Peltolähteissä ero ei ollut merkitsevä ($P = 0.201$).



Kuva 11. Beta-diversiteetti eri maankäyttöluokkien sisällä. Tähdet hajontaviivojen yläpuolella ilmaisevat tilastollisesti merkitsevää eroa Luonnontilaiset-ryhmään (* $P < 0.05$).

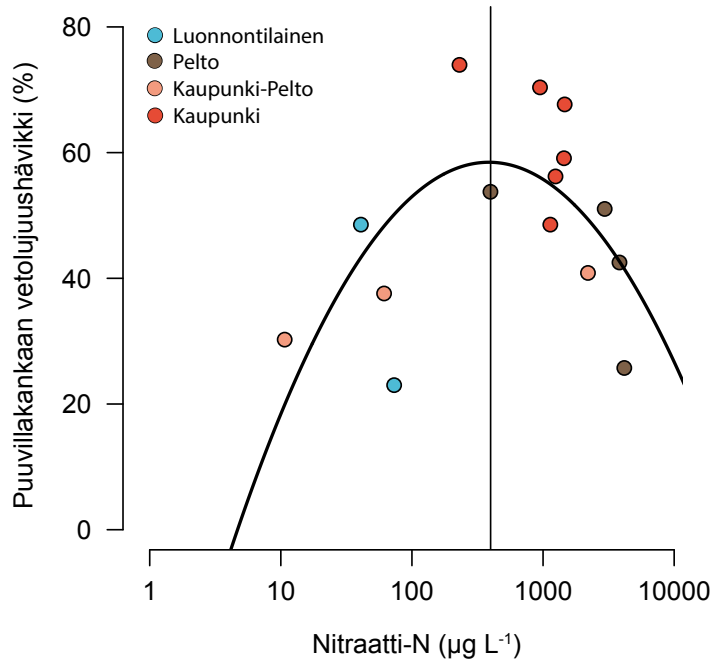
Luonnontilaisissa lähteissä havaittiin 131 yksinomaan tässä ryhmässä havaittua ESV:tä, peltolähteissä vastaava luku oli 201, kaupunki-peltolähteissä 119 ja kaupunkilähteissä 179 (Kuva 12). Kaikissa maankäyttöluokissa yhteisiä ESV:tä oli 585. Maankäytön muuttamat pelto-, kaupunki-pelto ja kaupunki-lähteet pitivät sisällään 118 yhteistä ESV:tä.



Kuva 12. Venn-diagrammi, joka kuvaa eri bakteeritaksoneiden (ESV) jakautumista maankäyttöryhmien välillä. Jokaisen joukon luvut kertovat niiden bakteeritaksoneiden määrän, jotka löytyivät vain kyseistä luokasta, ja luokkien leikkaukset kertovat, kuinka monta taksonia ryhmät jakavat keskenään. Jokainen taksoni voi kuulua vain yhteen joukkoon diagrammissa.

3.3. Mikrobin hajotustoiminta

Mikrobin aiheuttaman orgaanisen aineksen hajotustoiminnan havaittiin vastaavan ESV-runsauden lailla yksihiippuisesti nitraattipitoisuuden kasvuun ($R^2 = 0.195$, $P = 0.05$) (Kuva 13). Mikrobin hajotustoiminta kiihtyi aluksi nitraattipitoisuuden noustessa, mutta lähti alenemaan nitraattipitoisuuden ollessa noin $400 \mu\text{g L}^{-1}$ ja kääntyi jyrkkään laskuun yli $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ pitoisuuksissa (Kuva 13).



Kuva 13. Puuvillakankaan prosentuaalinen vetolujuushävikki logaritmisella nitraattigradientilla.

4. Pohdinta

Tutkielmani tulokset vahvistivat aiempien tutkimusten tuloksia (Babiker ym., 2004; Babiker ym., 2005; Tidenberg ym., 2007; Lehosmaa ym. 2018), joiden mukaan niin maanviljely kuin kaupunkirakentaminenkin heikentävät pohjaveden kemiallista laatua ja nostavat erityisesti pohjaveden nitraatti- ja kloridipitoisuutta. Maankäytön aiheuttamat muutokset pohjaveden kemiallisessa laadussa heijastuivat bakteeriyhteisöissä ja laskivat paikallista monimuotoisuutta (α -diversiteetti). Eri maankäyttöluokkien sisäinen yhteisövaihtelu (β -diversiteetti) oli vastoin hypoteesia pienintä luonnontilaisissa lähteissä. Monimuotoisuuden tavoin orgaanisen aineksen hajotustehokkuuden vaste suhteessa pohjaveden nitraattipitoisuuteen oli yksihuippuinen, jonka taitekohta oli noin $400 \mu\text{g L}^{-1}$.

Maankäytöllä havaittiin olevan selvä vaikutus pohjaveden kemialliseen laatuun, eli kohonnut nitraattipitoisuus tai sähkönjohtavuus ilmentää lähialueen ihmistoimintaa. Kaikki mitatut kemialliset arvot viittasivat tähän (Kuva 7), ja ainoat ympäristömuuttujat, jotka olivat korreloivat positiivisesti maankäytöltään luonnontilaisiin lähteisiin, olivat metsien määrä puskurialueella ja lähdehabitaatin varjostuksen määrä. Oletin nitraattipitoisuuksien olevan suurimpia peltolähteissä lannoitteiden käytön seurauksena, mutta tulosten mukaan nitraattipitoisuus oli samankaltainen kaikissa ihmistoiminnan muuttamissa lähteissä, muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Tulokseni myötäilevät aiempia tutkimuksia sen osalta, että kaupunkikeskittymät ovat myös merkittäviä nitraattilähteitä (Babiker ym., 2004; Sirisena ym., 2013; Hosen ym., 2017; Lehosmaa ym., 2018). SYKE:n (2017) tutkimuksissa sen sijaan taimi- ja turkistarhat nousivat suurimmiksi nitraattikuormittajiksi. Tässä tutkimuksessa ei ollut mukana yhtään turkistarhauksen lähellä sijaitsevaa pohjavesimuodostumaa, mutta taimitarhauksen havaittiin kuitenkin olevan merkittävä nitraatin pistekuormittaja. Maankäytön ympäröimissä lähteissä nitraattipitoisuuden keskiarvo vaihteli $1571\text{--}1961 \mu\text{g L}^{-1}$ välillä, kun taas luonnontilaisissa lähteissä vastaava luku oli $76 \mu\text{g L}^{-1}$. Tulos osoittaa, että nitraattipitoisuus nousee lähialueen maankäyttöalueen myötä, mutta yksikään tämän tutkielman tutkimuspisteistä ei päässyt lähellekkään pilaantuneeksi luokitellun pohjaveden raja-arvoa (50 mg L^{-1}). Sähkönjohtavuuden suhteen kaupunkilähteistä mitattiin suurimmat arvot. Sähkönjohtavuus korreloi vahvasti pohjaveden kloridipitoisuuden kanssa, joka voidaan puolestaan yhdistää lähteiden läheisyydessä olevien teiden suolaukseen (Rhoades ym., 1999; Tidenberg ym., 2007). Ben Maamar ym. (2015) havaitsivat pohjaveden nitraattipitoisuuden olevan selvästi korkeampaa lähempänä maan pintaa olevissa kerroksissa, kuin syvemmällä maaperässä, jossa pohjaveden viipymäaika voi olla jopa tuhansia vuosia. Läheltä pintaa otetut näytteet olivat lähellä WHO:n ja EU:n asettamaa raja-arvoa (50 mg L^{-1}), mutta syvemmältä otetuissa näytteissä pitoisuudet olivat lähempänä tässä tutkimuksessa havaittuja arvoja. Kloridipitoisuuksien havaittiin vastavuoroisesti olevan korkeampia syvältä otetuissa näytteissä. Myös rauta- (Fe) ja sulfaattipitoisuudet (SO_4^{2-}), joita ei tässä tutkielmassa mitattu, nousivat syvemmällä maaperässä, kun taas happipitoisuus vastavuoroisesti laski syvemmälle mentäessä. Kohonneen rautapitoisuuden on havaittu kiihdyttävän nitrifikoivien bakteerien toimintaa (Dollhopf ym., 2005). Maaperän huokoisuuden ja läpäisevyyden lisäksi pohjaveden viipymäaika, virtausreitit ja maa- ja kallioperän geologiset ominaisuudet vaikuttavat pohjaveden geokemiallisiin ominaisuuksiin (Ben Maamar ym., 2015). Tämän myötä olisi vesikemiallisten näytteiden ottaminen eri syvyyksistä mielenkiintoista myös tässä tutkimuksessa olleista paikoista, joka voisi

vahvistaa Ben Maamar ym. (2015) saamia tuloksia tai avata uutta tietoa vierasaineiden kierrosta Etelä-Suomen pohjavesimuodostumien eri kerroksissa.

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu, että maankäyttö ja kohonnut nitraattipitoisuus laskevat bakteerien monimuotoisuutta ja muuttavat bakteeriyhteisöjä (Sirisena ym., 2014; Chen ym., 2017; Hosen ym., 2017; Lehosmaa ym., 2018). Tässä työssä saadut tulokset vahvistavat tätä käsitystä. Paikkakohtainen tarkastelu osoitti, että nitraattiarvojen kasvaessa bakteerien monimuotoisuus kasvaa ensin, mutta pian yli 100-300 $\mu\text{g L}^{-1}$ pitoisuuksissa monimuotoisuus alkaa vähenemään vähitellen muodostaen yksihuippuisen jakauman. Yksittäisten bakteerien pääjaksojen tai vielä alemman taksonomisen tason tarkastelu nitraattigradientilla olisi mahdollisesti antanut joidenkin taksonien suhteen myös U-muotoisen kaksihuippuisen jakauman, joka on havaittu tutkimuksissa joidenkin taksonien suhteen aiemmin (Horner-Devine ym., 2003). U-muotoiselle jakaumalle ei ole löytynyt selkeää teoriaa, mutta nykyisten käsitysten mukaan jakauma voi heijastaa taksonien välistä kilpailua (Horner-Devine ym., 2003). Kaikista suurimpien nitraattipitoisuuksien lähteissä myös muut kemiallisten vierasaineiden määrät nousevat todennäköisesti korkeiksi, ja on siten vaikea sanoa tarkkaan, kuinka paljon nitraatti yksin selittää työssä havaittua bakteerien monimuotoisuuden laskua.

Kaikki maankäyttöryhmät olivat bakteeriyhteisöjen rakenteen suhteen lähellä toisiaan. Luonnontilaiset lähteet olivat selvästi ja merkittävästi ainoa erillinen ryhmänsä. Alhainen yhteisövaihtelu luonnontilaisissa lähteissä viittaa siihen, että luonnontilaiset vähäravinteiset lähteet ovat yhteisörakenteeltaan varsin samankaltaisia, kun taas muissa ryhmissä vaihteleva vesikemia aiheuttaa luultavasti ryhmien sisäistä vaihtelua yhteisökoostumuksessa. Yhteisöjen ryhmäkohtainen tarkastelu osoitti, että pohjaveden kemiallisen laadun muuttuessa luonnontilaisille pohjavesille ominaiset bakteerit katoavat ja tulevat muuttunutta vesikemiaa suosivien bakteerien korvaamiksi (Lehosmaa ym., 2018). Tämän tutkimuksen tulokset kuitenkin tukevat sitä ajatusta, että luonnontilaisten pohjavesien bakteeriyhteisöt eivät ole täysin endeemisiä (Stein ym., 2010; Sirisena ym., 2013; Lehosmaa ym., 2018). Kaikki tutkitut maankäyttöryhmät sekä luonnontilaisten lähteiden ryhmä jakoivat keskenään 585 bakteeri-ESV:tä, eli noin kolmas osa kaikista havaituista ESV:stä löytyi kaikista tutkittavista ryhmistä. Bakteerien pääjaksojen tarkastelu eri maankäyttöryhmissä kuvaa sitä, miten pohjaveden kemiallisen laadun muutokset heijastuvat bakteeriyhteisöjen rakenteisiin. Proteobakteerit olivat kaikissa maankäyttöryhmissä, luonnontilaiset mukaan lukien, runsaslukuisin pääjakso, mutta niiden osuus oli suurempi maankäytön ympäröimissä lähteissä. Lisäksi maankäyttö lisäsi Bakteroidien ja Firmikuuttien suhteellista osuutta. Samaan aikaan Acidobakteerien, Chloroflexien, Cyanobakteerien, Fibrobakteerien, Omnitrophicaeota, Planktomycetes ja Verrucombimicrobia suhteellinen osuus pieneni luonnontilaisiin lähteisiin verrattuna. Myös ”muiden”, eli jäljelle jäävien pienempien pääryhmien osuus pieneni merkittävästi.

Tämän ja aiempien tutkimusten perusteella nitraattikuormituksen kasvu näyttäisi aiheuttavan proteobakteerien suhteellisen määrän kasvun bakteeriyhteisöissä (Ben Maamar ym., 2015; Chen et al., 2017; Dong et al., 2019;). Aikaisemmissä tutkimuksissa proteobakteerit on jaettu luokkiin (alpha-, beta-, gamma- ja deltaproteobakteerit) (Ben Maamar ym., 2015), ja tämä tarkastelu on osoittanut, että vesikemialla on selkeä vaikutus proteobakteeriyhteisöjen vaihteluun. Ben Maamar ym. (2015) havaitsivat, että betaproteobakteerit olivat kauttaaltaan runsaslukuisin luokka proteobakteereista, mutta heidän tutkimuksessaan suurempi kuin yksikään toinen pääryhmä. Erityisesti vanhasta pohjavedestä otetut näytteet, joiden nitraatti- ja happipitoisuus olivat alhaisia ja rauta- ja

sulfaattipitoisuus korkeita, osoittivat, että betaproteobakteerit dominoivat syvällä maan alla ja pitävät sisällään noin 60-75% kaikista havaituista bakteereista. Läheltä maan pintaa otetut näytteet olivat nitraattipitoisuudeltaan todella korkeita omiin tuloksiini nähden, mutta suhteellisen lähellä toisiaan (47-53 mg L⁻¹). Kuitenkin nämä olivat yhteisöiltään keskenään, mutta myös verrattuna tässä tutkielmassa saatuihin tuloksiin, hyvin erilaisia. Myös Firmikuutit paikoin dominoivat pinnan läheltä otetuissa näytteissä (46%), ja niistä suurin osa havaittiin kuuluvan *Clostridium*-sukuun, joka tyypillisesti yhdistetään nisäkkäiden suolistoympäristöön. Tässä työssä havaittiin myös Firmikuuttien nousua maankäytön seurauksena, mutta niiden suhteelliset osuudet olivat kauttaaltaan pienempiä (luonnontilainen: 0,7 %, pelto: 1 %, kaupunki-pelto: 1,8 % ja kaupunki: 2,2 %).

Tulokseni osoittavat, että Suomessa on mahdollista vielä tarkastella ja tutkia minimaalisen ihmistoiminnan vaikuttamia pohjavesi- ja lähde-ekosysteemejä, joka ei ole yleistä edes Euroopassa (Mitikka ym., 2020). Lehosmaa ym., 2018 havaitsivat tutkimuksessaan luonnontilaisille lähteille tyypillisiä bakteeritaksoneita kuten *Beijerinckia* sp., *Pedomicrobium* sp. ja Cystobacterineae-alalahko, jotka kuuluvat kaikki Proteobakteereihin. Pohjaveden kemialliseen kuormitukseen yhdistettiin taksonit *Paucibacter* sp., *Acidovorax* sp., *Delftia* sp. and Comamonadaceae-heimo, ja Bakteroideihin kuuluva *Flavobacterium* sp. *Acidovorax*-suku on aiemmin yhdistetty jäteveden puhdistamoihin ja nitraarin hajotustoimintaan (Ehsani ym., 2015) ja *Baucibacter* kaupunkiasutuksen ympäröimien latvapurojen kohonneisiin nitraattipitoisuuksiin (Hosen ym., 2017). Samassa tutkimuksessa havaittiin *Gallionella*-suvun viittaavaan läheisiin ojituksiin. Ben Maamar ym. (2015) huomasivat vuorostaan, että kyseinen bakteeritaksoni dominoi (25-40 %) syvempää otettuja vanhoja pohjavesinäytteitä. *Gallionella*-suku ovat rautaa (Fe) pelkistäviä bakteereja (Ben Maamar ym., 2015). Tässä työssä *Gallionella*-suvun bakteereja havaittiin 15 lähteessä ja jokaisesta maankäyttöryhmästä. Tätä tulosta voi selittää se, että Ben Maamar ym., (2015) tutkimuksessa kaikkien maan pintaa läheltä otettujen pohjavesinäytteiden nitraattipitoisuudet olivat suhteessa todella korkeita verrattuna Lehosmaa ym. (2018), sekä tämän tutkielman tuloksiin. Tähän tutkielmaan laji- ja sukutason analyysistä ei sisällytetty suuren lisätyömäärän vuoksi.

On tärkeää hankkia tietoa siitä, miten bakteeriyhteisöt vaihtelevat suhteessa pohjaveden kemiaan, jotta pystymme ymmärtämään paremmin, mikä osa vaihtelusta on luonnollista ja mikä ihmisen aiheuttamaa. Ben Maamar ym. (2015) osoittivat pohjavesimuodostuman geokemiallisten ominaisuuksien ja pohjaveden viipymääjan merkityksen pohjaveden kemialliseen laatuun ja bakteeriyhteisöihin, jota olisi mielenkiintoista tarkastella myös Suomen pohjavesien osalta. Tässä työssä käytetyn 16S-geenin avulla bakteerilajiston tunnistamisen lisäksi myös uusien mikrobiomien analysointitekniikoita on noussut pinnalle (Knight et al., 2018). Metagenomiikka ja metatranskriptomiikka kuuluvat näihin uusiin tekniikoihin, joita kutsutaan omiikoiksi. Metagenomisessa sekvensoinnissa kaikki näytteessä oleva DNA sekvensoidaan, mikä johtaa tarkempaan, mutta toisaalta kalliimpaan ja työläämpään menetelmään. 16S rRNA-geenialuetta käytettäessä tietokannan valinta ja alukepari vaikuttavat lopputulokseen. Metatranskriptomiikassa selvitetään RNA-sekvensoinnin avulla näytteen geeniekspressiota ja aktiivisten geenien sen hetkistä tilaa. Kaikki nämä menetelmät tuottavat hieman erilaista informaatiota, joten ideaalitulanteessa jokainen näyte kannattaisi sekvensoida jokaisella edellä mainitulla menetelmällä. Tässä työssä käytetty 16S-menetelmä on kuitenkin yleisesti käytetty menetelmä, kun halutaan tutkia yhteisökoostumusta ja mikrobien taksonomiaa, ja se on myös kustannustehokkaampi kuin metagenomiikka (Knight et al., 2018).

Tutkielmani on ensimmäinen laajempi katsaus Suomen pohjavesien bakteeriyhteisöihin, ja siihen miten ympäröivä maankäyttö ja siitä johtuva pohjaveden kemiallisen laadun vaihtelu vaikuttaa mikro-organismeihin. Tämän tutkimusten tulosten perusteella Suomessakin voimassa oleva nitraatin raja-arvo 50 mg L^{-1} on todella korkea bakteeriyhteisöjä ajatellen (SYKE, 2017). Korkeimmat nitraattipitoisuudet, joita aineistossani havaitsin, olivat vain 8 mg L^{-1} , ja jo näissä pitoisuuksissa muutokset bakteeriyhteisöjen rakenteessa ja monimuotoisuudessa olivat huomattavia verrattuna ympäröivältä alueeltaan lähes luonnontilaisiin kohteisiin. Tämän tutkimustulosten perusteella nykyiset raja-arvot, jotka koskevat juomaveden kelpoisuutta, ovat ekosysteemien kannalta epärelevantteja. Tässä työssä saatujen tulosten perusteella raja-arvo, jonka jälkeen pohjaveden bakteeriyhteisöt alkavat muuttumaan merkitsevästi, on noin $400 \mu\text{g L}^{-1}$. Tämä pitäisi ottaa huomioon vähintään suojeltavien kohteiden (pohjavesialueiden E-luokka) lähialueen maankäyttöä suunniteltaessa. Kuten aiemmin totesin, nitraatti on yleisin haitta-aine, jota pohjaveteen päätyy (Spalding & Exner, 1993; Vinod ym., 2015). On kuitenkin todennäköistä, että tässä työssä havaitut nitraatin haitalliset vaikutukset ovat varsinaisen nitraattipitoisuuden vaikutuksen sijaan enemmänkin eri ihmistoimintaan liittyvien kemiallisten muuttujien yhteisvaikutusta, jota nitraattipitoisuus työn perusteella luotettavasti ilmentää. Tässä tutkimuksessa esimerkiksi havaittiin, että yleensä, nitraattipitoisuuden osalta kuormitetuilla pohjavesialueilla myös kloridipitoisuudet pyrkivät olemaan varsin korkeat. Maankäytön ja siitä aiheutuvien vesikemiallisten muutosten myötä pohjavesiin muodostuu ”kemiallisia cocktaileja” (Kaushal ym., 2018), jotka ovat eri muodoissaan pohjavesieliöstölle haitallisia tai jopa letaaleja.

Pohjaveden mikrobiyhteisöjä koskeva tutkimus on lisääntynyt viime vuosina ympäri maailman, ja näitä monimutkaisia ekosysteemejä sääteleviä tekijöitä ymmärretään koko ajan paremmin. Lisäksi kansalliset velvoitteet ekosysteemien tilan tarkkailuun myös pohjavesien osalta on otettu käyttöön jo osassa Eurooppaa, Australiassa, sekä Uudessa-Seelannissa (Sirisena ym., 2018). Uudessa-Seelannissa on luotu kansallinen poliittinen konteksti pohjavesien mikrobiyhteisöjen ymmärtämiselle, hoitamiseksi ja suojelemiseksi (New Zealand Ministry for the Environment, 2014; Sirisena ym., 2018). Myös Suomessa bakteeriyhteisöjen seuranta tulisi ottaa osaksi pohjavesien jatkuvaa tilan seurantaa, eikä vähiten pohjavesibakteerien maailmanlaajuisesti tunnistetun merkityksen vuoksi. Tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia voitaisiin soveltaa Suomessa pidempiaikaisen seurannan suunnittelussa, jossa saataisiin tietoa pohjavesien ja sen eliöstön ajallisesta vaihtelusta. Lisäksi luonnontilaisille pohjavesille ominaiset bakteerit ansaitsevat aivan yhtä paljon huomiota, jotta tiedämme paremmin, mitä lajeja ja niiden ylläpitämiä toimintoja katoaa maankäytön seurauksena. Bakteeriyhteisöt ovat herkkiä muutokselle ja pohjavesien bakteeriyhteisöjen ajallisesti ajallisesta vaihtelusta tiedetään hyvin vähän, jonka vuoksi pitkäaikainen jatkuva seuranta parantaisi ymmärrystä mikrobien ja veden kemian monimutkaisesta vuorovaikutuksesta. Tämän tiedon tarve ja kiireellisyys on suuri, koska ilmastonmuutoksen sekä jatkuvasti kasvavan maankäytön asettamat uhat koskevat myös maanalaisia pohjavesiekosysteemejä ja niiden maanpäällisiä rajapintoja, eli lähteitä (Jyväsjärvi ym., 2015). Tutkielmani tulokset osoittavat, että jo suhteellisen pieni muutos pohjaveden kemiallisessa laadussa vaikuttaa bakteeriyhteisöihin sekä niiden toimintaan. Tutkielman tulokset osoittavat, että olemassa olevat lainsäädännölliset raja-arvot, eivät sovellu pohjaveteenyhteydessä oleviin ekosysteemeihin. Tämä aihe ansaitsee Suomessa laajempaa huomiota ja tutkimusta, jotta taustalla olevat monimutkaiset säätelevät tekijät saadaan tarkemmin tietoon.

Lähteet

- Babiker, I. S., Mohamed, M. A., Terao, H., Kato, K., & Ohta, K. (2004). Assessment of groundwater contamination by nitrate leaching from intensive vegetable cultivation using geographical information system. *Environment International*, 29, 1009-1017.
- Babiker, I. S., Mohamed, M. A., Hiyama, T., & Kato, K. (2005). A GIS-based DRASTIC model for assessing aquifer vulnerability in Kakamigahara Heights, Gifu Prefecture, central Japan. *Science of the Total Environment*, 345, 127-140.
- Babiker, I. S., Mohamed, M. A., & Hiyama, T. (2007). Assessing groundwater quality using GIS. *Water Resources Management*, 21, 699-715.
- Ben Maamar, S., Aquilina, L., Quaiser, A., Pauwels, H., Michon-Coudouel, S., Vergnaud-Ayraud, V., ... & Dufresne, A. (2015). Groundwater isolation governs chemistry and microbial community structure along hydrologic flowpaths. *Frontiers in microbiology*, 6, 1457.
- Bertrand, G., Goldscheider, N., Gobat, J. M., & Hunkeler, D. (2012). From multi-scale conceptualization to a classification system for inland groundwater-dependent ecosystems. *Hydrogeology Journal*, 20, 5-25.
- Boulton, A. J., Findlay, S., Marmonier, P., Stanley, E. H., & Valett, H. M. (1998). The functional significance of the hyporheic zone in streams and rivers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 59-81.
- Britschgi, R., Rintala, J., & Puharinen, S. T. (2018). Pohjavesialueet–opas määrittämiseen, luokitukseen ja suojeleusuunnitelmien laadintaan. Ympäristöhallinnon ohjeita 3/2018. Ympäristöministeriö, Helsinki.
- Cantonati, M., Füreder, L., Gerecke, R., Jüttner, I., & Cox, E. J. (2012). Crenic habitats, hotspots for freshwater biodiversity conservation: toward an understanding of their ecology. *Freshwater Science*, 31, 463-480.
- Chen, C., Xu, X. J., Xie, P., Yuan, Y., Zhou, X., Wang, A. J., ... & Ren, N. Q. (2017). Pyrosequencing reveals microbial community dynamics in integrated simultaneous desulfurization and denitrification process at different influent nitrate concentrations. *Chemosphere*, 171, 294-301.
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3, 389-395.
- Dollhopf, S. L., Hyun, J. H., Smith, A. C., Adams, H. J., O'Brien, S., & Kostka, J. E. (2005). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 240-246.
- Dong, Y., Li, J., Sun, Z., Soldatova, E., & Zan, J. (2019). Bacterial diversity and community structure in nitrate-contaminated shallow groundwater in the Poyang Lake basin, China. *E3S Web of Conferences* (Vol. 98, p. 01012).

- Dufrêne, M., & Legendre, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67, 345-366.
- Ehsani, E., Jauregui, R., Geffers, R., Jarek, M., Boon, N., Pieper, D. H., & Vilchez-Vargas, R. (2015). First draft genome sequence of the *Acidovorax caeni* sp. nov. type strain R-24608 (DSM 19327). *Genome Announcements*, 3.
- ESRI, R. (2011). ArcGIS desktop: release 10. Environmental Systems Research Institute, CA.
- Euroopan unioni (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Fitts, C. R. (2002). *Groundwater science*.
- Flynn, T. M., Sanford, R. A., Ryu, H., Bethke, C. M., Levine, A. D., Ashbolt, N. J., & Santo Domingo, J. W. (2013). Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer. *BMC Microbiology*, 13, 146.
- Gilbert, J., Danielopol, D., & Stanford, J. A. (1994). *Groundwater ecology*. Academic Press, San Diego, California.
- Griebler, C., Mindl, B., & Slezak, D. (2001). Combining DAPI and SYBR Green II for the enumeration of total bacterial numbers in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology* 86, 453-465.
- Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D., & Geiger-Kaiser, M. (2002). Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquatic Microbial Ecology*, 28, 117-129.
- Griebler, C., & Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54, 649-677.
- Griebler, C., Stein, H., Kellermann, C., Berkhoff, S., Brielmann, H., Schmidt, S., ... & Hahn, H. J. (2010). Ecological assessment of groundwater ecosystems—vision or illusion? *Ecological Engineering*, 36, 1174-1190.
- Griebler, C., Malard, F., & Lefébure, T. (2014). Current developments in groundwater ecology—from biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 159-167.
- Haack, S. K., Fogarty, L. R., West, T. G., Alm, E. W., McGuire, J. T., Long, D. T., ... & Forney, L. J. (2004). Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environmental Microbiology*, 6, 438-448. John Wiley & Sons.
- Hazen, T. C., Jiménez, L., de Victoria, G. L., & Fliermans, C. B. (1991). Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microbial Ecology*, 22, 293-304. Springer

- He, Z., Zhang, P., Wu, L., Rocha, A. M., Tu, Q., Shi, Z., ... & Curtis, D. (2018). Microbial functional gene diversity predicts groundwater contamination and ecosystem functioning. *MBio*, 9, e02435-17.
- Heino, J., Virtanen, R., Vuori, K. M., Saastamoinen, J., Ohtonen, A., & Muotka, T. (2005). Spring bryophytes in forested landscapes: land use effects on bryophyte species richness, community structure and persistence. *Biological Conservation*, 124, 539-545.
- Hering, D., Borja, A., Carstensen, J., Carvalho, L., Elliott, M., Feld, C. K., ... & Solheim, A. L. (2010). The European Water Framework Directive at the age of 10: a critical review of the achievements with recommendations for the future. *Science of the total Environment*, 408, 4007-4019.
- Hosen, J. D., Febria, C. M., Crump, B. C., & Palmer, M. A. (2017). Watershed urbanization linked to differences in stream bacterial community composition. *Frontiers in microbiology*, 8, 1452.
- Claire Horner-Devine, M., Leibold, M. A., Smith, V. H., & Bohannon, B. J. (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology letters*, 6, 613-622.
- Ilmonen, J., Mykrä, H., Virtanen, R., Paasivirta, L., & Muotka, T. (2012). Responses of spring macroinvertebrate and bryophyte communities to habitat modification: community composition, species richness, and red-listed species. *Freshwater Science*, 31, 657-667.
- Jones, J. A. A. (2009). Threats to Global Water Security: Population Growth, Terrorism, Climate Change, or Commercialisation? In *Threats to Global Water Security*. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Edited by J.A.A. Jones, T.G. Vardanian and C. Hakopian. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Johnson, R. A., & Wichern, D. W. (2002). *Applied multivariate statistical analysis* (Vol. 5, No. 8). Upper Saddle River, NJ.
- Jyväsjärvi, J., Marttila, H., Rossi, P. M., Ala-Aho, P., Olofsson, B., Nisell, J., ... & Britschgi, R. (2015). Climate-induced warming imposes a threat to north European spring ecosystems. *Global Change Biology*, 21, 4561-4569.
- Kanagal-Shamanna, R. (2016). Emulsion PCR: Techniques and applications. In *Clinical Applications of PCR* (pp. 33-42). Edited by Y. D. Lo, Humana Press, New York, NY.
- Kaushal, S. S., Gold, A. J., Bernal, S., Johnson, T. A. N., Addy, K., Burgin, A., ... & Mayer, P. (2018). Watershed 'chemical cocktails': forming novel elemental combinations in Anthropocene fresh waters. *Biogeochemistry*, 141, 281-305.
- Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., ... & Melnik, A. V. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 410-422.

Korbel, K. L., Hancock, P. J., Serov, P., Lim, R. P., & Hose, G. C. (2013). Groundwater ecosystems vary with land use across a mixed agricultural landscape. *Journal of Environmental Quality*, 42, 380-390.

Lategan, M. J., Korbel, K., & Hose, G. C. (2010). Is cotton-strip tensile strength a surrogate for microbial activity in groundwater? *Marine and Freshwater Research*, 61, 351-356.

Lehosmaa, K., Jyväsjärvi, J., Ilmonen, J., Rossi, P. M., Paasivirta, L., & Muotka, T. (2018). Groundwater contamination and land drainage induce divergent responses in boreal spring ecosystems. *Science of the Total Environment*, 639, 100-109.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. (2009). *Brock biology of microorganisms* (12th ed.). Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Mitsch, W. J., Gosselink, J. G., Zhang, L., & Anderson, C. J. (2009). *Wetland ecosystems*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

New Zealand Ministry for the Environment (2014). National policy statement for freshwater management 2014. *New Zealand Gazette*, 81, 1. Ministry for the Environment, Wellington.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package*, 2.

Mitikka, S., Kauppila, P., Pyykkönen, S., Orvomaa, M., & Rankinen, K. (2020). Nitraatidirektiivin täytäntöönpano Suomessa: Raportointijakso 2016–2019. Suomen Ympäristöministeriö, Helsinki.

Nystén, T., & Hänninen, T. (1997). Tiesuolan pohjavesihaittojen vaikutuksista ja torjuntakeinoista. Suomen ympäristökeskus, Helsinki.

Pronk, M., Goldscheider, N., & Zopfi, J. (2009). Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeology Journal*, 17, 37-48.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2014). *Campbell: Biology*. Pearson, Boston.

Rhoades, J. D., Chanduvi, F., & Lesch, S. M. (1999). Soil salinity assessment: Methods and interpretation of electrical conductivity measurements (No. 57). Food & Agriculture Organization of United Nations, Roma.

Salminen, J., Tuominen, S., & Nystén, T. (2012). Nitraatilla pilaantuneen maaperän ja pohjaveden biologinen kunnostaminen turkistarha-alueilla. Suomen ympäristökeskus SYKE, Helsinki.

Salkinoja-Salonen, M. & Aalto, J. (2002). *Mikrobiologian perusteita*. Helsingin yliopisto, Helsinki.

Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental microbiology*, 14, 4-12.

Sirisena, K. A., Daughney, C. J., Moreau-Fournier, M., Ryan, K. G., & Chambers, G. K. (2013). National survey of molecular bacterial diversity of New Zealand groundwater: relationships between biodiversity, groundwater chemistry and aquifer characteristics. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 490-504.

Sirisena, K. A., Daughney, C. J., Moreau, M., Ryan, K. G., & Chambers, G. K. (2014). Relationships between molecular bacterial diversity and chemistry of groundwater in the Wairarapa Valley, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48, 524-539.

Sirisena, K. A., Daughney, C. J., Moreau, M., Sim, D. A., Lee, C. K., Cary, S. C., ... & Chambers, G. K. (2018). Bacterial bioclusters relate to hydrochemistry in New Zealand groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, 94, fty170.

Spalding, R. F., & Exner, M. E. (1993). Occurrence of nitrate in groundwater—a review. *Journal of Environmental Quality*, 22, 392-402.

Stein, H., Kellermann, C., Schmidt, S. I., Brielmann, H., Steube, C., Berkhoff, S. E., ... & Griebler, C. (2010). The potential use of fauna and bacteria as ecological indicators for the assessment of groundwater quality. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 242-254.

Stephens, D. B. (1995). *Vadose zone hydrology*. CRC press, Los Alamos, New Mexico.

Tidenberg, S., Kosonen, E. & Gustafsson, J (2007). Teiden talvikunnossapidon vaikutukset pohjaveteen. Seurannan tuloksia. Suomen ympäristökeskus SYKE, Helsinki.

Vinod, P. N., Chandramouli, P. N., & Koch, M. (2015). Estimation of nitrate leaching in groundwater in an agriculturally used area in the state Karnataka, India, using existing model and GIS. *Aquatic Procedia*, 4, 1047-1053.

Warnes, M. G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., & Huber, W. (2016). Package ‘gplots’. Various R Programming Tools for Plotting Data. CRAN.

Woodward, G., Gessner, M. O., Giller, P. S., Gulis, V., Hladyz, S., Lecerf, A., ... & Dobson, M. (2012). Continental-scale effects of nutrient pollution on stream ecosystem functioning. *Science*, 336, 1438-1440.

Verkkolähteet

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2006/118/EY, annettu 12 päivänä joulukuuta 2006, pohjaveden suojelusta pilaantumiselta ja huononemiselta. Viitattu 11.11.2020.

Life Technologies Corporation. 2013. Longer read lengths improve bacterial identification using 16S rRNA gene sequencing on the ION PGM™ system. Viitattu 24.4.2019. Saatavilla: <<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fbrochures%2F16S-rRNA-Gene-Sequencing-App>>

Note.pdf&title=MTZTIHJSTkEgR2VuZSBTZXF1ZW5jaW5nIG9uIHRoZSBJb24gUEdNJnRyYWRIQyBTeXN0ZW0>

Geologian tutkimuskeskus (2011). Pohjavesien esiintyminen. Viitattu 25.2.2019.
<http://weppi.gtk.fi/aineistot/mp-opas/pohjav_esiintyminen.htm>

MO BIO Laboratories 2017. DNeasy® PowerWater® Kit Handbook. Version: 11212013. Viitattu 31.3.2015.
<<https://www.qiagen.com/kr/resources/resourcedetail?id=0b5d47e0-e312-413d-bfd8-563fec8fcc9f&lang=en>>

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<<https://www.R-project.org/>>

Suomen ympäristökeskus SYKE, (2017). Pohjavesien torjunta. aine- ja ravinne pitoisuuksista uutta tietoa. Viitattu 26.2.2019.
<[https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Pohjavesien_torjuntaaine_ja_ravinnepitoi\(43662\)](https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Pohjavesien_torjuntaaine_ja_ravinnepitoi(43662))>

Suomen ympäristökeskus SYKE, (2017). Maataloudesta vesistöihin päätyvän nitraatin alhainen määrä ei katkaise rehevöitymistä. Viitattu 7.12.2020.
<[https://www.syke.fi/fi-FI/Tutkimus_kehittaminen/Vesi/Maataloudesta_vesistoihin_paatyvan_nitra\(41972\)](https://www.syke.fi/fi-FI/Tutkimus_kehittaminen/Vesi/Maataloudesta_vesistoihin_paatyvan_nitra(41972))>

Suomen Ympäristökeskus SYKE. 2018. Pohjavesitietojärjestelmä - ohjeita tiedontuottajille. Viitattu 12.4.2018.
<[http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Tietojarjestelmat/Pohjavesitietojarjestelma_ohjeita_tiedo\(8279\)](http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Tietojarjestelmat/Pohjavesitietojarjestelma_ohjeita_tiedo(8279))>

Suomen Ympäristökeskus SYKE. 2018. Pohjavesien tilan seuranta. Viitattu 12.4.2018.
<http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Pohjavesien_tila/Pohjavesien_tilan_seuranta>

Suomen Ympäristökeskus SYKE. 2018. Pohjavesialueet. Viitattu 24.5.2019.
<[https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Vesiensuojelu/Pohjaveden_suojelu/Pohjavesialueet/Pohjavesialueet\(26765\)](https://www.ymparisto.fi/fi-FI/Vesi/Vesiensuojelu/Pohjaveden_suojelu/Pohjavesialueet/Pohjavesialueet(26765))>