

19

Maarit Niemi, Tarja Hyvärinen, Jukka Ahtiainen ja Pekka Vanhala

Mikrobien diversiteetti metsän maaperän tilan kuvaajana

Alustavien kokeiden tulokset

19

Maarit Niemi, Tarja Hyvärinen, Jukka Ahtiainen ja Pekka Vanhala

Mikrobien diversiteetti metsän maaperän tilan kuvaajana

Alustavien kokeiden tulokset

PAINOPAIKKA:
Suomen ympäristökeskuksen monistamo
Helsinki 1996

Julkaisija
Suomen ympäristökeskus

Julkaisun päivämäärä
28.3.1996

Tekijä(t) (toimielimestä: nimi, puheenjohtaja, sihteeri)

Niemi, Maarit, Hyvärinen, Tarja, Ahtiainen, Jukka ja Vanhala, Pekka
Suomen ympäristökeskus

Julkaisun nimi (myös ruotsinkielinen)

Mikrobien diversiteetti metsän maaperän tilan kuvaajana: Alustavien kokeiden tulokset
Evaluering av skogmarkens tillstånd med hjälp av mikrobiell diversitet från en preliminär studie

Julkaisun laji

Raportti

Toimeksiantaja

Toimielimen asettamispvm

Julkaisun osat

Tiivistelmä

Tutkimushankkeen tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja verrata mikrobien aktiivisuuden mittaamenetelmiä, viljelymenetelmiä ja molekyylibiologian menetelmiä arvioitaessa kuormituksen aiheuttamaa muutosta maaperän mikroobeissa ja niiden toiminnassa.

Kohdealueeksi valittiin Harjavalta (metallisulatto, raskasmetallilaskeuma), Koverhar (metallisulatto, rikki-, typpi- ja raskasmetallilaskeuma alkalisena), Savon Sellu OY:n ympäristö (rikki- ja typpilaskeuma), Siilinjärvi (lannoitetehtas, fluoridi-, rikki- ja typpipäästöt), Haapavesi (turvevoimala, rikki-, typpi- ja tuhkalaskeuma).

Aktiivisuuden mittaamisessa käytettiin maahengitysmittausta ja entsyymiaktiivisuuksien mittausta (API Zym semikvantitatiivisena ja hapan fosfataasi kvantitatiivisena mittauksena). Maahengitys oli heikentynyt Harjavallan alueella ja Savon Sellun läheisyydessä, mutta voimistunut Koverharin tehtaan läheisyydessä. Entsyymiaktiivisuuksia tutkittiin vain Harjavallan alueella, jossa aktiivisuus heikkeni tehtaan läheisyydessä. Bakteerien ja sienten pesäkemäärät mitattiin yleisalustoilla ja joillakin havaintopaikoilla kuormituksen mukaan muokatuilla kasvualustoilla. Kuormituksen indusoima mikrobiyhteisön toleranssin kasvu voitiin osoittaa Harjavallan ympäristössä, jonne oli kehittynyt raskasmetalleja sietäviä mikroobeita. Bioscreen C -laitteella toteutettu liemiviljely vahvisti pesäkelukumäärityksistä saadun kuvan resistenssin kehittymisestä. Molekyylibiologian menetelmistä saatiin näissä alustavissa kokeissa käyttöönotetuksi näytteille soveltuva DNA:n eristysmenetelmä, eräiden 16S rDNA -jaksojen monistus sekä denaturoiva gradienttegelelektroforeesi saman pituisten monistettujen sekvenssien erottelunsa. Molekyylibiologian menetelmien käyttöönottoa ja soveltamista jatketaan.

Asiasanat (avainsanat)

biodiversiteetti, mikrobi, bakteeri, sieni, maahengitys, pesäkeluku, entsyymiaktiivisuus, hapan fosfataasi, DNA

Muut tiedot

Sarjan nimi ja numero

Suomen ympäristökeskuksen moniste
19

ISBN

ISSN

Kokonaissivumäärä

48

Kieli

suomi

Hinta

Luottamuksellisuus

julkinen

Jakaja

Suomen ympäristökeskus
asiakaspalvelu
Puh. (90) 40300100
Telefax (90) 40300190

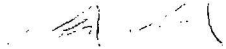
Kustantaja

Suomen ympäristökeskus
PL 140
00251 Helsinki

ESIPUHE

Tutkimushanketta ovat rahoittaneet Suomen Luonnonvarain Tutkimussäätiö, ympäristöministeriö ja Suomen ympäristökeskus. Sen vastuullisena vetäjänä on toiminut MMT Maarit Niemi Suomen ympäristökeskuksesta ja päätutkijana FK Tarja Hyvärinen, Suomen ympäristökeskuksesta, muina tutkijoina MMK Jukka Ahtiainen ja MMK Pekka Vanhala, Suomen ympäristökeskuksesta sekä asiantuntija-apua antavana yhteistyökumppaneina PhD Aimo Saano ja apul.prof. Kristina Lindström Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitokselta. Työ on toteutettu Suomen ympäristökeskuksen laboratoriossa. Tutkimusryhmä kiittää rahoittajia tuesta. Lämpimät kiitokset myös laboranteille Tuula Ollinkangas, Tarja Salo, Miia Aalto ja Keijo Tervonen, joiden innostus, huolellisuus ja osaaminen auttoivat oleellisesti työn toteuttamisessa.

Helsingissä 20.3.1996



Maarit Niemi
Erikoistutkija

SISÄLLYS

ESIPUHE	5
1 JOHDANTO	9
2 KOHDEALUEET	10
3 MENETELMÄT	15
3.1 Maahengitysmittaus	15
3.2 Entsyymiaktiivisuudet	15
3.3 Heterotrofinen pesäkeluku	15
3.4 Sienten pesäkeluku	16
3.5 Kasvun inhibition mittaus liemiviljelmistä	16
3.6 DNA:n eristys	17
3.7 DNA-jaksojen monistus	17
3.8 Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi	17
4 TULOKSET	17
4.1 Maahengitys	17
4.2 Entsyymiaktiivisuudet	20
4.3 Bakteerien ja sienten pesäkeluvut	20
4.4 Liemiviljelyt	25
4.5 DNA:n eristys	28
4.6 DNA-jaksojen monistus	28
4.7 Denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi	33
5 TULOSTEN TARKASTELU	35
5.1 Maan mikrobiaktiivisuus	35
5.2 Viljelymenetelmät	35
5.3 Molekyylibiologian menetelmät	36
5.4 Eri menetelmien antama kuva kuormituksen vaikutuksesta	37
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	38
KIRJALLISUUS	39
LIITTEET	42

1 JOHDANTO

Mikrobiologiset prosessit vastaavat keskeisesti aineiden kierrosta maassa ja vedessä. Metsäekosysteemissä maaperän mikrobisto ja pieneliöt hajottavat maahan päätyvän kuolleen orgaanisen aineksen ja vapauttavat siihen sitoutuneet ravinteet uudelleen kasvien käyttöön. Ympäristömuutosten, kuten happamoittavan laskeuman ja raskasmetallien, on havaittu olevan haitallisia hajottajaeliöstölle ja näinollen aiheuttavan häiriöitä hajotusprosessissa. Hajotuksen estyminen vinouttaa ravinnekiertoa ja vaikutukset heijastuvat koko ekosysteemin toimintaan. Maaperän mikrobiaktiivisuuden mittaukset antavat kuvan maakekosysteemin toiminnan kannalta keskeisestä prosessista, hajotustoiminnasta.

Maaperän mikrobiologista aktiivisuutta voidaan arvioida mittaamalla maahengitystä. Maahengitys tarkoittaa mikrobitoiminnan tuloksena maaperässä syntyvää hiilidioksidia, jonka määrä on sitä suurempi mitä aktiivisempaa mikrobitoiminta maassa on. Mittaukset tehdään metsämaan humuskerroksesta, jossa mikrobitoiminta on aktiivisinta ja johon ympäristömuutokset ensimmäiseksi kohdistuvat. Mikrobiaktiivisuutta voi arvioida myös mitaten entsyymiaktiivisuutta, esim. maan happaman fosfataasin aktiivisuutta. Metsämaan altistuessa esim. raskasmetalleille sen mikrobisto voi muuttua lajikoostumukseltaan. Herkemmat mikrobiryhmät ja lajit häviävät ja niiden ekologiset lokerot valtaavat raskasmetalleja paremmin sietävät mikrobit. Tämä mikrobien lajikoostumuksen muuttuminen voidaan todeta myös viljelymenetelmin. Kuormitetun alueen mikrobisto kestää korkeampia raskasmetallipitoisuuksia (Bååth 1989). Tämä PICT -ilmiö (*Pollution Induced Community Tolerance*) kertoo selvästi mikrobistoon kohdistuvasta selektiopaineesta (Blanck 1995).

Bio-geo-kemiallisten kiertojen eri vaiheisiin osallistuu suuri joukko mikrobeja, joista tunnetaan vain osa, koska kaikkia luonnossa esiintyviä organismeja ei ole pystytty viljelemään. Osa mikrobeista on erikoistunut harvinaisiin aineenvaihduntareaktioihin kun taas jotkut reaktiot ovat monille mikrobeille ominaisia. Sen vuoksi mikrobien biomassaa tai kokonaisaktiivisuutta mittaamalla ei voida saada lajiston koostumuksessa tapahtuneita haitallisia (yleensä biodiversiteettiä alentavia) muutoksia esiin. Jonkin tärkeästä kierron prosessista vastaavan ryhmän häviäminen voi tuntuvasti heikentää ekosysteemin toimintaa, vaikka esim. maahengitys ei vielä olisikaan häiriintynyt.

Mikrobien diversiteettiä pidetään myös tärkeänä luonnonvarana, koska nykyään tuntemattomat mikrobit voivat olla hyödyksi bioteknisissä sovellutuksissa niin lääkkeiden tuotossa kuin teollisissa ja ympäristöbiotekniikan tarvitsemisissä sovellutuksissa. Ihmisen toiminnan vaikutuksia ympäristöön tulisi voida tutkia mahdollisimman herkillä menetelmillä, jotka osoittavat muutokset lajistossa oli aiheuttajana sitten metsänhoidon tai maatalouden käsittelymenetelmä, teollisuuden ja liikenteen aiheuttama kuormitus, ilmastonmuutos tai vieraiden organismien (esim. geneettisesti muunnettujen organismien) lisääminen ympäristöön.

Koska vain pieni osa mikrobeista luonnonnäytteissä saadaan viljellen esiin, viime vuosina on voimakkaasti ryhdytty kehittämään luonnonnäytteille soveltuvia molekyylibiologian menetelmiä mikrobien osoittamiseen ja tunnistamiseen. Kehitteillä onkin suuri joukko erilaisia menetelmiä, joiden käyttökelpoisuudesta ja luotettavuudesta ei ole kattavasti kokemusta. Tämän "raivaajatyön" tärkeyttä korostavat mm. EU:n osoittama kiinnostus (mm. EC - GBF International Symposium Exploration of Microbial Diversity, Ecological Basis and Biotechnological Utility, 1995 Grosjar,

Germany), painotukset USAssa (The American Academy of Microbiology järjesti tammikuussa 1996 kokouksen "The Microbial World: Foundation of the Biosphere" valmistellakseen raportin mikrobien diversiteetistä; The National Science Foundation on korostanut mikrobien biodiversiteetin merkittävyyttä tekemällä useita aloitteita aihepiiriin kehittämiseksi) ja Englannissa (USAn National Science Foundation ja United Kingdom Natural Environment Research Council järjestivät yhdessä kokouksen "Life in Soil – Soil Biodiversity: Its importance to Ecosystem Processes", jossa korostettiin maaperän mikrobien diversiteetin suurta merkitystä ja käynnistettiin kansainvälistä yhteistyötä).

Lupaavia molekyylibiologian menetelmiä ovat toisaalta maasta suoraan eristety DNA:n taksonomista sijoittumista ilmentävien tai tärkeistä aineenvaihduntareaktioista koodaavan geenin monistaminen PCR-reaktiossa, tuotteiden erottelu denaturoivassa gradienttigeelielektroforeesissa (DGGE), sekä sekvenointi ja toisaalta *in situ* –hybridisaatioon perustuvat eri taksonomisten tasojen mikrobien suora osoitus maanäytteistä. Lisäksi molekyylibiologian uudet menetelmät tarjoavat entistä paremmat keinot maasta eristettyjen mikrobien tunnistamiseen.

Haasteellisen lähtökohdan maan mikrobien biodiversiteetin selvittämiseksi antaa se, ettei Suomen maaperän mikrobilajistoa ole laajasti karakterisoitu eikä laajasti selvittämisen keinoja ole vielä muuallakaan laajasti sovellettu. Nyt käynnissä oleville tutkimushankkeille on antanut lähtökohdan mm. Mikrobiologikillan vuonna 1990 julkaisema raportti "Ympäristömikrobiologian kehittäminen. Asiantuntijatyöryhmien selvitys" (Heinänen ja Niemi 1990).

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli saada käyttöön menetelmiä, joiden avulla voidaan havaita varhaisessa vaiheessa sellaiset ihmisen toiminnan aiheuttamat muutokset, jotka vaikuttavat haitallisesti metsän tuottoon. Menetelminä aiottiin käyttää olennaisesti molekyylibiologian menetelmiä, joita osittain täydennettiin perinteisillä viljelymenetelmillä ja mikrobiaktiivisuuden mittaamenetelmillä. Koska kuitenkin kolmivuotiseksi suunniteltu hanke päättyi ensimmäisen vuoden jälkeen, tässä voidaan raportoida vain kesän 1995 havaintoalueiden kuvaukset, ensimmäisen kasvukauden näytteiden aktiivisuusmittausten ja pesäke- ja liemiviljelyiden tulokset ja tiedot DNA:n eristämisestä sekä alustavat tulokset DNA-fragmenttien monistamisesta sekä denaturoivasta gradienttigeelielektroforeesista.

2 KOHDEALUEET

Kohdealueiden kasvillisuuden kuvaus perustuu näytteenoton yhteydessä tehtyihin pikaisiin havaintoihin ja sen tarkoituksena on antaa kuva alueen kasvillisuuden yleispiirteistä.

HARJAVALTA: Outokumpu metals

Outokumpu Harjavalta Metals Oy on ainoa kuparin ja nikkelin tuotantolaitos Suomessa. Tehdas (61°19'N, 22°7'E) sijaitsee Länsi-Suomessa, noin 30 km:n etäisyydellä Selkämeren rannikolta. Harjavallassa on metalliteollisuus toiminut jo puolen vuosisadan ajan; kuparisulatto aloitti toimintansa vuonna 1945 ja nikkelin sulatus vuonna 1960.

Päästöt: Vuonna 1947 rikkidioksidipäästöt olivat pahimmillaan ollen 35 000 tonnia vuodessa (nyt 5000 t/v). Päästöjen vaikutus näkyi puuston vakavana vaurioitumisena pian kuparisulaton toiminnan alettua. Rikkidioksidipäästöjä pystyttiin vähentämään rakentamalla kuparisulaton yhteyteen Rikkihappo- ja Superfosfaattitehtaat Oy:n (nyk. Kemira Oy) rikkihappotehdas vuonna 1947 ja ottamalla vuonna 1949 käyttöön liekkisulatusmenetelmä. Sulaton laajennusten seurauksena rikkidioksidipäästöt kasvoivat. Vuoden 1984 lopulla rikkikaasujen talteenotossa tehokkaampi rikkihappotehdas käynnisti toimintansa ja vanha tehdas lakkautettiin (Poutanen P. ym., 1994).

Ilmateitse, pölyn mukana leviävien metallien päästöjä pyrittiin vähentämään, kun vuonna 1994 kaksi matalaa piippua korvattiin 140 metriä korkealla piipulla. Päästöt kulkeutuvat nykyään laajemmalle alueelle kuin ennen ja tehtaan lähialueella ulkoilman rikkidioksidipitoisuudet alkavat vähetä. Piippuihin asennetut kuitusuodattimet puhdistavat poistokaasujen metallipölyjä ja laskelmien mukaan pölypäästöt ovat laskeneet viidennekseen aiemmista arvoista; tehtaiden lähellä raskasmetalli- ja arseenilaskeumat ovat kohonneita, mutta 2–3 kilometrin etäisyydellä pitoisuudet alkavat pienentyä (Rantalahti 1995). Vaikka laskeumamäärät ovat vähentyneet, maaperään joutuneiden ja sinne yhä tulevien raskasmetallien poistuma on hyvin hidasta. Viimeisen viiden vuoden ajalta mikrobiologisissa mittauksissa ei ole havaittu muutoksia parempaan (Helmisaari ym. 1995). Tehtaan vaikutusalueella maaperä on silmiinpistävästi karua. Aluskasvillisuus on erittäin niukkaa ja tummanharmaa pölyävä karike on levittäytynyt kaikkialle. Nykyisin tehtaiden päästöistä merkittävimmät ovat ilmasteitse leviävät Cu, Ni, Cd ja S.

Näytteenottopaikat: Näytteitä haettiin kolme kertaa (22.5., 1.8. ja 9.10.) viidestä eri paikasta (H1 – H5). Näytteenottoalueita yhdistää sama kaakosta luoteeseen kulkeva mäntyvaltainen harjujakso, Harjavallanharju. Ensimmäisen näytteenottokierroksella 22.5.1995 muista poiketen H5 -näyte otettiin harjun ulkopuolelta mäntyvaltaisesta hiekkamoreenimaastosta. Myös sienet kirjattiin 9.10.1995 :

- H1: etäisyys tehtaasta 500 m etelään, ei aluskasvillisuutta, pulkkosieniä ja kangasrousku; puusto koostuu harvaan kasvavista matalista männyistä, joiden neulastuotanto on vähäistä, ja koivuista.
- H2: etäisyys tehtaasta 1 100 m kaakkoon, niukka aluskasvillisuus, juolukka, variksenmarja, korte, suopursu, puolukka, pulkkosieni, kärpässieni; havaintopaikka sijaitsee suoalueen reunalla ja siellä kasvavat männyt, koivut, katajat ja kuuset ovat selvästi vaurioituneita, mutta kookkaampia kuin lähempänä tehdasta.
- H3: etäisyys tehtaasta 2 100 m kaakkoon, niukka aluskasvillisuus, puolukka, variksenmarja, mustikka, kangassieni; mäntymaastossa on edelleen silmiinpistävää vähäinen aluskasvillisuus.
- H4: etäisyys tehtaasta 7 400 m kaakkoon, runsas sammalpeite, puolukka, kanerva, sianpuolukka, poronjäkälä, hirvensarvenjäkälä, kangasrousku, kangastatti, seitikki, sappitatti.
- H5: etäisyys tehtaasta 17 000 m kaakkoon, runsas sammalpeite, puolukka, kanerva, mustikka, poronjäkälä, kangasrousku, kangastatti, seitikki, sappitatti

Näytepisteissä H1 – H3 on hyvin niukka aluskasvillisuus, joka ei pysty suojelemaan maata tuulen eikä sateen eroosiovaikutuksilta. Humuskerros on tummanharmaa, pölyvä ja hyvin ohut, paikoitellen lähes olematon, koostuen pääasiassa hajoamattomista havunneulasista. H4:ssa kasvaa runsaasti sammalta ja jäkälää, mutta muuten aluskasvillisuus on niukempaa kuin H5:ssa.

KOVERHAR: Oy Fundia Wire Ab

Tehdas (59°53'N, 23°15'E) sijaitsee ensimmäisellä Salpausselällä Lappohjassa, Hankoniemen tyvessä. Rautatehdas aloitti toimintansa Koverharissa vuonna 1961, joka laajeni rauta- ja terästehtaaksi vuonna 1971.

Päästöt: Koverharin rauta- ja terästehtaalla syntyy rikkidioksidi-, typen oksidi-, raskasmetalli- ja hiukkaspäästöjä. Monni ja Mäkinen (1995) ovat tehneet selvityksen Koverharin tehtaan ympäristöstä tehdyistä ympäristövaikutustutkimuksista. Selvityksen mukaan rikkidioksidipäästöt olivat vuonna 1980 liki 4000 tonnia ja vuonna 1993 noin 1300 tonnia; väheneminen johtui raaka-aineena käytetyn rautamalmin rikkipitoisuuden alenemisesta 0,5%:sta 0,005%:iin. Vuonna 1993 hiukkaspäästöt olivat 1178 tonnia, typen oksideja pääsi 554 tonnia ja raskasmetalleja (Cd, Pb, As, ja Zn) 1,5 tonnia. Ympäristöön pölyn mukana kulkeutuu mm. kalsiumia ja rautaa. Teräksen ja raudan valmistuksen yhteydessä syntyvä kalkkipöly saa aikaan alkalisen laskeuman tehtaan lähiympäristössä ja korkeassa pH:ssa maaperässä olevien raskasmetallien liukoisuus vähenee. Tehtaan vaikutusalueella pölylaskeuma on lisännyt maan tiiviyyttä, vedenpidätyskykyä ja samalla maan kosteutta. Jäkälä- ja mäntytutkimuksissa on tehty säännöllistä seurantaa Koverharin tehtaan vaikutusalueella. Seurannan mukaan tehtaan vaikutusalue ulottui vuonna 1985 noin viiden kilometrin päähän, oli supistunut hieman vuonna 1988, mutta palautui vuonna 1991 vuoden 1985 tasolle. Muita tutkimuksia on vaikea verrata keskenään, mutta eri eliöryhmät indikoivat ympäristön muutoksista (Monni ja Mäkinen 1995).

Näytteenottopaikat: Hankoniemi on melko tiuhaan rakennettu, mikä hankaloitti hyvän vertailualueen löytämistä. K2:n lähellä on mm. dynamiittitehdas, mutta sen ympärillä on laaja asumaton alue, jolla liikkuminen on kiellettyä. Valitsimme vertailualueemme dynamiittitehtaalle johtavan pikkutien varrelta. K2 sijaitsee kangasmetsässä, lähellä Hankoniemen kärkeä. Maaperä on kangashiekkaa. Aluskasvillisuus on runsasta ja humuskerros on melko ohut. Kangasmetsä on mäntyvaltaista. Näytteet haettiin kesän aikana 30.5. ja 7.8. vaikutusalueelta (K1) ja vertailualueelta (K2):

- K1: etäisyys tehtaasta n. 500 m koilliseen, runsas aluskasvillisuus, puolukka, kanerva, sianpuolukka, heinäkasveja ja sammalia.
- K2: etäisyys tehtaasta n. 11 000 m länteen, Furunäs, runsas sammalpeite, puolukka, kanerva.

KUOPIO: Savon Sellu

Savon Sellun tehdas (62°56'N, 27°43'E) sijaitsee Sorsasalon saarella Kuopion pohjoispuolella. Tehdas on ollut toiminnassa jo yli 20 vuoden ajan. Sorsasalon koillispuolella oleva kapea Virtasalmi erottaa saaren mantereesta.

Päästöt: Vaikka Savon Sellun vuosittaiset rikkipäästöt ovat huomattavia (n. 10 000 t/v), ovat metsämaan laskeuma-arvojen rikkipitoisuudet olleet typpi-arvoja (typpipäästöt NO_x n. 400 t/v ja NH_4 n. 8 t/v) pienempiä (Halonen ja Holopainen 1991). Edellä mainitun tutkimuksen mukaan suurimmat typpilaskeumat ovat tehtaan välittömässä läheisyydessä, jossa myöskin puustovauriot ovat vakavimpia. Suurimmat rikkipitoisuudet mitattiin alueelta, jossa havaintopaikka Sa 1 sijaitsee. Tehtaan pohjois- ja itäpuolella on männyissä havaittavissa voimakasta harsuuntumista aina 4,5 km:n etäisyydellä tehtaasta ja vuoden 1976 mittauksiin verrattaessa puuston ja jäkälien vaurioalue on laajentunut tehtaan pohjoispuolelle (Nerg ja Holopainen 1991).

Näytealueet: Sa 1 -näytteet otettiin mantereen puolelta, Virtasalmen rannalta kohoavalta rinteeltä. Alueen korkeat mäet ja kalliopaljastumat ovat paljolti vaikuttaneet maaperän nykyisiin muodostumiin. Mäntyvaltaisessa, louhikkoisessa kangasmaastossa on monipuolinen aluskasvillisuus. Humuskerros on melko paksu ja siinä on runsaasti juuria. Sa 2 -näytteet haettiin mäntymetsästä Kehvon etelälaidalta Haapaniemen tyvestä. Näytteitä otettiin 7.6. ja 14.8. läheltä tehdasta (Sa 1) ja vertailualueelta (Sa 2).

Sa 1: etäisyys tehtaasta n. 1 900 m pohjoiseen, runsas aluskasvillisuus, mustikka, puolukka, heinäkasveja

Sa 2: etäisyys tehtaasta n. 6 600 m luoteeseen, runsas aluskasvillisuus, mustikka, vadelma, heinäkasveja.

SIILINJÄRVI: Kemira Chemicals Oy

Kemiran Siilinjärven tehtailla tuotetaan lannoitteita ja niiden valmistuksessa käytettyjä happoja. Tehtaiden toiminta aloitettiin vuonna 1969, jolloin tuotettiin rikki- ja fosforihappoa. Tuotevalikoimaan kuuluu nykyään myös typpihappo. Fosforihapon jatkojalostuksessa saadaan rehufosfaattien raaka-ainetta ja kipsipigmenttiä paperiteollisuuden tarpeisiin. Nykyään Siilinjärven tehtailla tuotetaan puolet Suomen tarvitsemista lannoitteista. Siilinjärven toimipaikan tuotanto perustuu myös fosfaattimalmikaivoksen toimintaan; muualla Länsi-Euroopassa ei vastaavia kaivoksia ole. Kaivoksesta saatava pääartikkeli on fosfaattirikaste, apatiitti, jonka rikastuksessa malmista erotetaan ja jalostetaan fosfaattia, maanparannuskalkkia ja kiilletuotteita.

Päästöt: Tehtaat kuormittavat ympäristöä ilmateitse fluoriyhdisteillä, rikkidioksidilla, typen oksideilla, ammonium- ja nitraattitypellä ja hiukkasilla. Päästöjen määrää on alettu vähentää 70-luvulta lähtien. Rikkidioksidipäästöt on saatu viime vuosina vähenemään merkittävästi. Vuonna 1980 rikkidioksidipäästöt olivat vielä 6 000 t/v ja 90-luvulle tultaessa ne olivat 500 t/v. Kemiran tehdasalueella on vuosina 1984-87 tehdyissä tutkimuksissa havaittu metsävaurioita 50 hehtaarin alalla. Typpiyhdisteiden päästöt vähenivät merkittävästi 90-luvulle tultaessa. Vielä vuonna 1980 typen oksideja kulkeutui ilmateitse ympäristöön n. 1000 t/v (1990 alle 100 t/v) ja ammoniakkia ja nitraattityppeä vuonna 1983 n. 2500 t/v (1990 alle 200 t/v) (Kemira, Ympäristöraportti 1991).

Näytteenottopaikat: Tehtaan ympäristö on muutamassa vuodessa muuttunut kaivostöiden takia maisemallisesti paljon. Vain kapeita metsäkaistaleita on itse tehdasalueella jäljellä. Tehdas (63°06'N, 27°45'E) sijaitsee Juurusveden Kuuslahden rannalla ja koska tehdasalueella ei ollut jäljellä käsittelemätöntä metsää, valitsimme

tehdasta lähinä sijaitsevan näytteenottopaikkamme lahden vastarannalta. Kummassakin näytteenottopaikassa, Si1 ja Si2, on kuusivaltainen metsä. Maaperä molemmissa näytteenottopaikoissa on moreenia:

Si1: etäisyys tehtaasta 2 150 m koilliseen, runsas aluskasvillisuus

Si2: etäisyys tehtaasta 13 700 m lounaaseen, runsas aluskasvillisuus.

HAAPAVESI: IVO Tuotantopalvelut Oy/ Haapaveden voimalaitos

Haapaveden sähköä tuottava turvelauhdevoimalaitoksen kaupallinen käyttö on aloitettu vuoden 1989 joulukuussa. Pääpolttoaineena on jyrsinturve sekä tuki- ja varapolttoaineena raskas polttoöljy. Turvevoimalaitos (64°07'N, 25°25'E) sijaitsee Haapaveden kunnan Eskolanniemen alueella, Haapajärven itärannalla, Pyhäjoen laskukohdan pohjoispuolella. Jäähdytysvesi otetaan Pyhäjoesta ja johdetaan jätelämpöineen Haapajärveen.

Päästöt: Turvevoimalaitoksesta tulevat päästöt koostuvat pääasiassa rikkidioksidista, typen oksideista ja lentotuhkasta. Turvevoimalan suunnitteluvaiheessa arvioitiin ilman epäpuhtauksien maksimipitoisuuksien esiintyvän 1,5–2 km:n etäisyydellä voimalasta. Päästömääräksi arvioitiin rikkidioksidia n. 3500–4000 t/v, typen oksideita n. 2600–4000 t/v ja lentotuhkaa n. 350–450 t/v (Muurman 1989). Vuoden 1988 aikana Haapaveden kunta yhdessä Ympäristöinstituutin kanssa laati ilmanlaatuselvityksen kunnan alueella. Erityisesti Haapaveden kunnan keskustassa oli vähäistä, mutta selvästi havaittavaa muutosta kasvillisuudessa; puuston lievää harsuuntumista sekä neulasten rikkipitoisuuden ja sammalten raskasmetallipitoisuuden kohoamista (Virkamäki 1989). Selvitys tehtiin ennen IVO:n turvevoimalaitoksen käyttöönottoa ja sen antamalla informaatiolla on hyötyä lisääntyvien päästömäärien vaikutusta seurattaessa. Rikkidioksidimittaukset lopetettiin vuoden 1995 lopulla, koska mittaustulokset olivat vuodesta 1988 lähtien olleet alle Valtioneuvoston ulkoilman enimmäispitoisuuksista antamien ohjearvojen ja vuosina 1995–96 keskitytään bioindikaattoritutkimuksiin (Sirpa Välilehto, Haapaveden ympäristönsuojelusihteri, suullinen ilmoitus).

Näytteenottopaikat: Kesällä 1995 haettiin Haapavedeltä maanäytteitä vain kerran, 14.6.. Näytteenottopaikan valinta tuotti hankaluuksia, koska maa oli otettu tehokkaaseen hyötykäyttöön laajalla alueella tehtaan lähimaastossa. Valitsimme metsäsaarekkeen (Ha1) asutuksen ja peltojen lomasta edustamaan kuusi- ja mäntymetsää. Myös vertailualueen (Ha2) löytäminen oli työlästä, koska seutu on hyvin soista ja lähes kaikki metsät on ojitettu. Vertailualueen puusto on Ha1:n kaltainen, mutta aluskasvillisuus on kostean sammaleista. Molemmilla alueilla maaperä on moreenia.

Ha1: etäisyys 460 m turvevoimalasta koilliseen, aluskasvillisuus runsasta, sammalta, mustikkaa, puolukkaa

Ha2: etäisyys 10 500 m turvevoimalasta pohjoiseen, aluskasvillisuus kosteaa ja runsasta, sammalta, mustikkaa.

3 MENETELMÄT

3.1 Maahengitysmittaus

Kultakin koealalta otettiin kaksi rinnakkaista humusnäytettä, A ja B. Näytteet otettiin humuskerroksesta kivennäismaahan asti, kuitenkin enintään 5 cm syvyyteen käyttäen halkaisijaltaan 72 mm maaperäkairaa. Näytteet olivat kokoomanäytteitä muodostuen kymmenestä sattumanvaraisesti otettusta kairallisesta jotka laitettiin muovipussiin ja kuljetettiin laboratorioon kylmälaukuissa ja säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Näytteet seulottiin 4 mm seulalla ja vihreät kasvinosat sekä suuret juuret poistettiin. Taustatiedoiksi näytteistä määritettiin kosteusprosentti, vedenpidätyskyky, orgaanisen aineksen määrä ja vesi-pH.

Mikrobiologista kokonaisaktiivisuutta kuvastava maahengitys määritettiin IR-hiilianalyssaattorilla mittaamalla humusnäytteestä muodostuva CO₂ (Vanhala ja Ahtiainen 1994). Kustakin näytteestä punnittiin 2 grammaa kuiva-ainetta vastaava määrä humusta kahteen rinnakkaiseen 130 ml pulloon ja näytteiden kosteudeksi säädettiin 60% vedenpidätyskyvystä. Näytteiden annettiin stabiloitua 7 vuorokautta 14°C:n lämpötilassa. Tämän jälkeen pulloja inkuboitiin 6 tuntia 14 °C:n vasihauteessa ja muodostuneen CO₂:n määrä mitattiin IR-hiilianalyssaattorilla.

3.2 Entsyymiaktiivisuudet

Viimeisellä näytekeralla tuoreista seulotuista Harjavallan maanäytteistä kartoitettiin eri entsyymien aktiviteettia **API Zym-** testikitillä (API Bio Mérieux SA). Testikitin avulla voidaan havaita 20 eri entsyymin aktiivisuus (Liite 1) värireaktioiden avulla. Maanäytettä punnittiin 5 g steriiliin veteen (15 ml), suspensio homogenoitiin tasoravistelijassa (20 min/200 rpm) ja kiintoaines poistettiin sentrifugoimalla (5 min/1600 rpm). Supernatanttia pipetoitiin 65 µl kuhunkin näytetaskuun. Testiliuskoja inkuboitiin yön yli (16 tuntia) 20 asteessa ja reaktiot luettiin valmistajan ohjeiden mukaan.

Harjavallan lokakuun näytteiden **happaman fosfataasin aktiivisuus** mitattiin yhdennteytyn seurannan ohjeiden mukaan (Environment Data Centre 1993). Tuoretta maanäytettä punnittiin 1 g 8 ml:aan puskuria (pH 5,0). Substraatiksi lisättiin 2 ml 0.115 M PNP-P (p-nitrofenyylifosfaatti) liuosta. Inkuboinnin aikana (2 h/ 20 °C) maanäyteen hapan fosfataasientsyymi muuntaa substraatin keltaiseksi p-nitrofenoliksi, jonka määrä mitattiin spektrofotometrisesti.

3.3 Heterotrofinen pesäkeluku

Heterotrofisen pesäkeluvun määrityksessä käytettiin R2A-agarin vakiomuunnosta, johon lisättiin sykloheksimidiä (Actidion pitoisuudeksi 50 mg/l) eukarioottien kasvun estämiseksi; Vaara ym. 1979) ja jonka pH laskettiin arvoon 6.0 (= R2Av). Näytteet laimennettiin puskuriiin (SFS 4112) käyttäen näytteiden homogenisointiin 60 sekunnin käsittelyä nopeudella 7 Omni Mixerillä. Kahtena rinnakkaisena viljellyt näytteet inkuboitiin lämpötilassa 14°C 7, 14 ja 21 d ajan.

Tämän perusviljelyn lisäksi joidenkin havaintopaikkojen näytteet viljeltiin lisäksi R2Av -alustasta edelleen muunnetulla alustalla, johon oli lisätty kohdealueen kuormitusta vastaavia tekijöitä:

- Harjavallan näytteiden viljelyyn lisättiin raskasmetalleita klorideina lopulliseksi pitoisuudeksi (metallina laskettuna) 23.5.1995 ja 2.8.1995 Cu 500 mg l⁻¹, Pb, Zn ja Ni 100 mg l⁻¹, 9.10.1995: Cu 50 mg l⁻¹ sekä Zn ja Ni 10 mg l⁻¹ ja Cu 5 mg l⁻¹ sekä Zn ja Ni 1 mg l⁻¹.

- Savon Sellun ympäristöstä otettujen näytteiden viljelyyn lisättiin rikkiä 25 µg ml⁻¹ K₂SO₄:na ja typpeä 200 µg ml⁻¹ NH₄Cl:na.

- Siilinjärven Kemiran tehtaan ympäristön näytteisiin lisättiin 15 µg ml⁻¹ fluoridia natriumsuolana.

Muunnetut R2Amod-maljat inkuboitiin, kuten R2Av-maljatkin.

Harjavallan 2.8.1995 otetuista näytteistä R2Amod alustoilta eristettiin 26 bakteerikantaa, joista valtaosa oli sädesieniä, sekä 2 hometta, jotka sietivät korkeita raskasmetallipitoisuuksia.

3.4 Sienten pesäkeluku

Sienten pesäkeluku määritettiin mallasuuteagarilla (MEA), jossa oli Rose-Bengalia 35 mg l⁻¹ ja aureomysiiniä 35 mg l⁻¹ (Niemi ym. 1982). Maljoja inkuboitiin lämpötilassa 22°C vain 7d, koska kauemmin inkuboitessa maljalla levinneistä itiöistä kasvaneet sekundaaripesäkkeet selvästi häiritsivät. Kuormituksen vaikutusta sienten pesäkemääriin tutkittiin muuntamalla MEA-maljoja, kuten bakteeriviljelyiden R2Amod-maljoja.

3.5 Kasvun inhibition mittaus liemiviljelmistä

Maanäytteiden mikrobien määrää ja etenkin raskasmetalliresistenssiä arvioitiin myös kasvattamalla maanäytteen mikrobistoa liemiviljelmässä eri metallien läsnäollessa Bioscreen C- laitteessa (Labsystems). Laite mittaa mikrobien kasvua sameusmittauksin (absorbanssialueella 420 - 580 nm).

Harjavallan seulottuja tuoreita maanäytteitä punnittiin 10 g ja homogenoitiin 90 ml:aan SFS-4112 puskuria. Tätä suspensiota otettiin 10 ml R2A -liemeen esikasvatukseen (6 h 20 °C:ssa). Siirrokseksi Bioscreen- liemikasvatukseen kuoppalevyjen kaivoihin pipetoitiin 20 µl em. esikasvatettua viljelmää 350 µl:n kokonaistilavuuteen R2A-lientä. Lisättyinä raskasmetalleina olivat kupari (CuCl₂), nikkeli (NiCl₂) ja sinkki (ZnCl₂) sekä ensimmäisellä näytekerralla sinkin sijalla kadmium (CdCl₂). Metallien pitoisuudet olivat ensimmäisellä kerralla 0,5 mg/l, toisella 1 mg/l ja viimeisellä kerralla 10 mg/l kutakin metalli-ionia kohden laskettuina. Kutakin metallilisäystä (Cu, Ni, Zn ja Cu+Ni, Cu+Zn, Ni+Zn ja Cu+Ni+Zn) sekä ilman metalleja kasvatettuja kontrollikaivoja oli 5 rinnakkaista.

Kuoppalevyjä inkuboitiin yli kolme vuorokautta Bioscreen laitteessa 20 °C:ssa, jona aikana laite mittasi viljelmien kasvun.

3.6 DNA:n eristys

DNA:n eristämässä verrattiin Saanon ja Lindströmin (1995) menetelmää ja modifikaatiota, jossa lisättiin mekaaninen käsittelyvaihe muutoin muuttamattomaan menettelyyn. Mekaaninen käsittely tehtiin bead beater –homogenaattorilla (Medical Braun MSK) käyttäen 3 x 90 sekunnin käsittelyä (4000 rpm, halkaisijaltaan 100...110 µm lasihelmet) CO₂:lla jäädytettynä. DNA:n puhdistus tehtiin Saanon ja Lindströmin (1995) ohjeen mukaisesti. Eristetty ja puhdistettu DNA säilytettiin lyhyen aikaa lämpötilassa +4 °C ja pidempään lämpötilassa -70 °C.

3.7 DNA-jaksojen monistus

DNA:n monistamisen tarkoituksena oli saada monistettua kaikille bakteereille soveltuvilla alukkeilla 16S rDNA:ta koodaavia DNA-jaksoja. DNA:n monistus, polymerase chain reaction (PCR), suoritettiin OmniGenelaitteella (Hybaid). Alukkeina käytettiin koko 16 S rDNA:ta monistavia alukkeita fD1 ja rD1 (Weisburg et al. 1991), 16S rDNA:n 550 bp:n fragmenttia monistavia GM5F- ja 907R-alukkeita (Muyzer et al. 1995), jossa GM5F-alukkeen 5'-päähen on liitetty 40:n nukleotidin runsaasti GC:tä sisältävä sekvenssi (GC-clamp) lisäämään monistetun fragmentin stabiilisuutta DGGE:ssä. Edellisten lisäksi käytettiin 300 bp:n fragmenttia monistavia Y1- ja Y2-alukkeita (Young et al. 1991), sekä samoja alukkeita modifioituna siten, että Y1-alukkeen 5'-päähen liitettiin GC-clamp (Y1GC). Kaikki alukkeet hankittiin KEBO OY:ltä.

PCR-tuotteet analysoitiin ajamalla näytteet 1%:ssa agarosigeelissä, johon oli lisätty 0,5 µg/ml etidumbromidia (EtBr). Markkerina käytettiin λBst EII:sta. EtBr:llä värjätty, fluoresoivat PCR-tuotteet taltioitiin geeliltä kuvantallennuslaitteella UV-valossa (Cybertech CS-1).

3.8 Denaturoiva gradienttigelelektroforeesi

DGGE-laitteen pystyttämässä sovellettiin Työterveyslaitoksella käytössä olevasta vastaavasta laitteesta ja kirjallisuusviitteistä (Myers et al. 1987, Muyzer 1995) saatua tietoa. DGGE-ajot tehtiin Muyzerin ohjeen mukaan.

4 TULOKSET

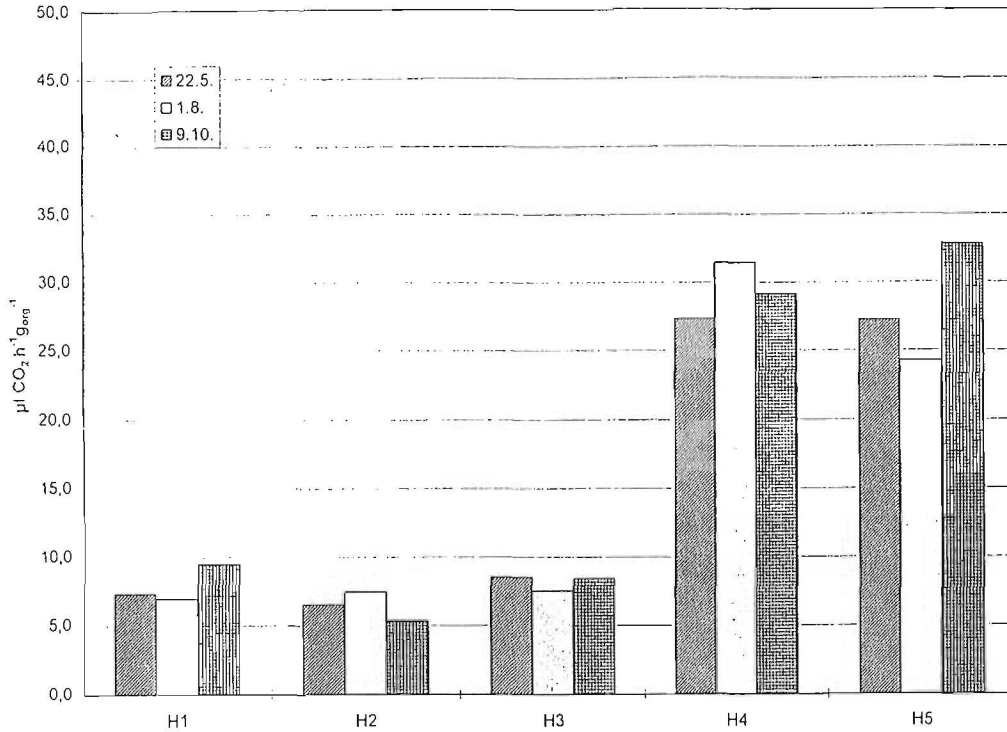
4.1 Maahengitys

Taulukossa 1. on esitetty pH- ja maahengitysmittausten tulokset näytteenottokerroittain A ja B näytteistä ja kosteusprosentit. Maahengitystulokset on esitetty maan orgaanista ainetta kohti. Kuvassa 1. on esitetty maahengitys Harjavallan alueelta

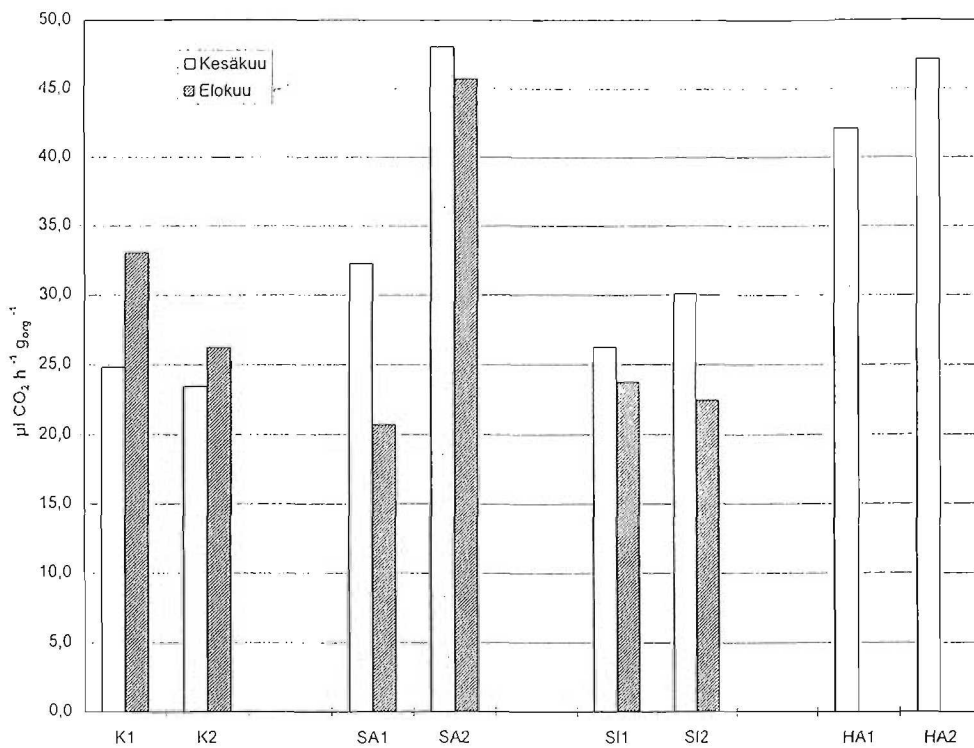
kolmena eri näytteenottokertana rinnakkaisnäytteiden keskiarvoina. Maahengitysaktiivisuus ei vaihdellut Harjavallassa merkittävästi eri näytteenottokierrosten välillä. Maahengitys oli selvästi alentunut kolmella päästölähdettä lähimpänä olleella koealalla, ollen alle 30% kahdesta kauempana olevasta. Kuvassa 2. on vastaavat tulokset Koverharin, Savon Sellun, Siilinjärven ja Haapaveden koealoilta. Koverharissa molemmilla näytteenottokierroksilla maahengitys oli voimakkaampaa päästölähteen vieressä kuin tausta-alueella. Savon Sellun lähialueella maahengitys oli selvästi vähäisempää kuin vastaavalla tausta-alueella. Siilinjärvellä ja Haapavedellä ei koealojen maahengitysaktiivisuudessa koealojen välillä voida havaita selviä eroja.

Taulukko 1. Maanäytteiden pH- ja maahengitys näytteenottokerroittain. Maahengityksen yksikkö on $\text{CO}_2\text{h}^{-1}\text{g}_{\text{org}}^{-1}$.

Koeala		pH		Maahengitys		Kosteus %
		A	B	A	B	
Harjavalta						
H1	22.5.	4.4	4.7	4.1	10.5	61
	1.8.	4.0	4.2	7.7	6.3	57
	9.10.	3.8	3.9	9.4	9.6	29
H2	22.5.	4.1	4.1	6.9	6.2	58
	1.8.	4.2	4.2	7.4	7.5	57
	9.10	3.8	3.8	5.2	5.2	29
H3	22.5.	4.1	4.1	7.1	10.0	66
	1.8	4.2	4.1	7.4	7.6	43
	9.10	4.0	4.0	7.0	9.8	43
H4	22.5	4.0	4.1	29.7	24.9	67
	1.8.	3.8	3.7	30.6	32.3	37
	9.10.	3.7	3.8	35.3	22.9	43
H5	22.5.	4.0	4.0	29.0	25.4	72
	1.8.	4.0	4.0	24.7	23.8	44
	9.10.	4.0	3.7	28.1	37.5	63
Koverhar						
K1	30.5.	7.0	7.0	18.5	31.1	28
	7.8.	6.7	6.1	35.7	30.4	19
K2	30.5.	4.3	4.3	19.8	27.0	53
	7.8.	4.2	4.1	20.8	31.6	30
Savon Sellu						
SA1	7.6.	4.2	4.2	31.8	32.8	64
	14.8	3.9	3.8	23.5	17.9	52
SA2	7.6	4.7	4.6	54.4	41.7	40
	14.8	4.2	4.4	47.8	43.6	32
Siilinjärvi						
SI1	7.6.	4.5	4.5	24.1	28.4	65
	14.8.	4.8	4.4	24.2	23.2	53
SI2	7.6.	4.1	4.2	29.8	30.4	56
	14.8.	4.0	3.9	19.4	25.5	45
Haapavesi						
Ha1	14.6.	4.1	4.1	41.1	43.1	69
Ha2	14.6	4.1	4.0	46.0	48.2	55



Kuva 1. Maahengitys Harjavallan alueella kolmena eri näytteenottokertana rinnakkaisnäytteiden keskiarvoina (havaintopaikkojen etäisyys tehtaalta H1 = 500 m, H2 = 1100 m, H3 = 2100 m, H4 = 7400 m ja H5 = 17000 m).



Kuva 2. Maahengitys Koverharin (K), Savon Sellun (SA), Siilinjärven (SI) ja Haapaveden (HA) koealoilla kahden rinnakkaisen keskiarvoina (havaintopaikat 1 = kuormitetulla alueella, 2 = vertailualueella).

Humusten happamuus näytealoilla oli keskimäärin pH 4, mutta vaihtelu alueiden välillä oli huomattavaa. Happamuus näytti lievästi lisääntyvän kasvukauden aikana. Koverharissa lähellä päästölähdettä olleella koealalla alkaalinen laskeuma oli nostanut pH:n 7,0:aan ensimmäisissä näytteissä ja 6,4:ään toisissa näytteissä kun taas vertailualalla vastaavat luvut olivat 4,3 ja 4,2. Savon sellun lähellä humus oli noin puoli pH-yksikköä happamampaa kuin vertailualueella. Siilinjärven vertailualueella humus oli noin puoli pH-yksikköä happamampaa kuin päästölähteen lähellä. Harjavallassa ja Haapavedellä humuksen happamuus ei vaihdellut näytealojen välillä. Tulosten perusteella näyttää siltä, että Harjavallan ja Savon Sellun ympäristössä tuotantolaitosten aiheuttama paikallinen laskeuma on vähentänyt mikrobiologista aktiivisuutta. Harjavallassa tämä johtuu lähinnä raskasmetalleista ja Savon Sellun ympäristössä rikkilaskeumasta, mikä on johtanut myös humuksen lievään happamoitumiseen. Koverharissa alkalinen laskeuma on johtanut pH:n nousuun ja mikrobiologisen aktiivisuuden kohoamiseen. Siilinjärvellä ja Haapavedellä ei laskeuman vaikutuksia havaittu.

4.2 Entsyymiaktiivisuudet

Maanäytteiden Api Zym- testikitillä arvioitujen eri entsyymien aktiivisuudet Harjavallan maanäytteissä esitetään kuvassa 3. Hapan fosfataasiaktiivisuus sekä fosfoamidaasiaktiivisuus kasvaa selkeästi siirryttäessä kauemmas päästölähteestä. Sama trendi, joskin heikompana on havaittavissa myös alkalisen fosfataasin ja betaglukosaminidaasin aktiivisuuksissa. Muissa entsyymiaktiivisuuksissa päästölähteen vaikutuksia ei voida selkeästi havaita. Harjavallan lokakuun näytekerän kahden rinnakkaisen maanäytteen fosfataasiaktiivisuudet esitetään kuvassa 4. Aktiivisuus laskee selvästi päästölähdettä kohti.

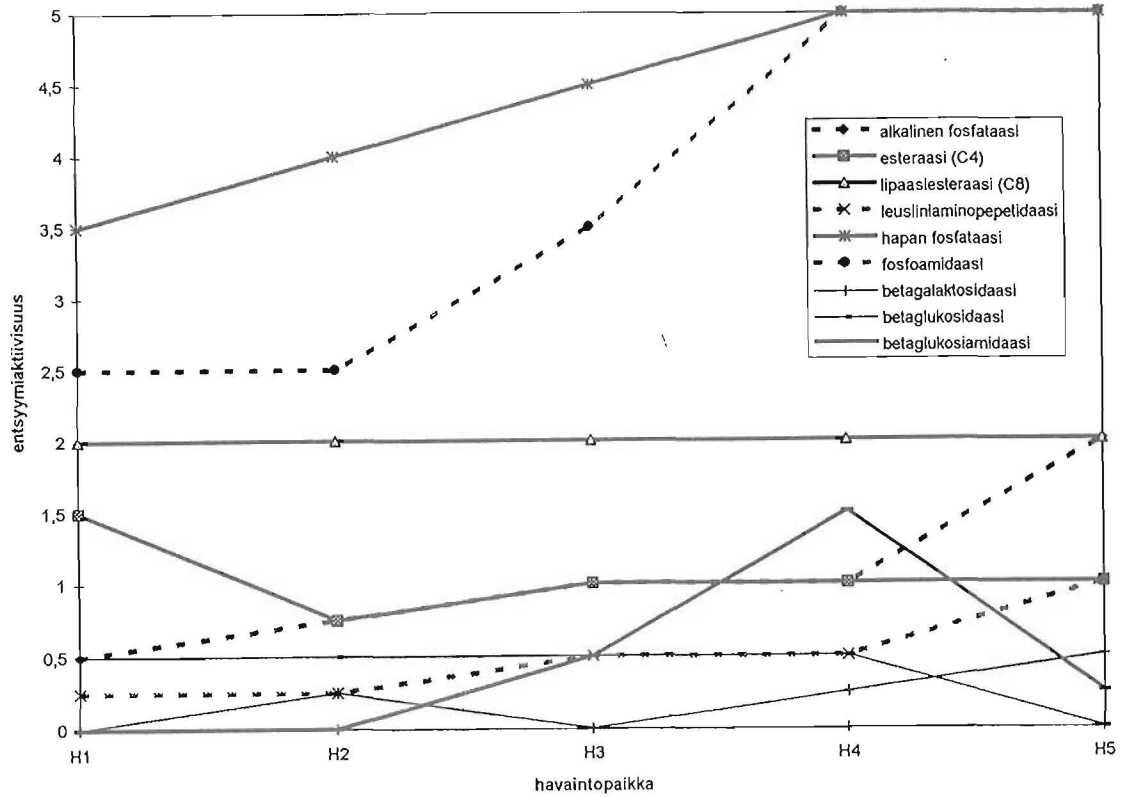
4.3 Bakteerien ja sienten pesäkeluvut

Bakteerien ja sienten suhteellisessa lukumäärätiheydessä pesäkelukuina mitattuna havaittiin eroja kohdealueiden välillä (kuvat 5–7) ja eräillä havaintoalueilla todettiin eroja kuormitetun ja kontrollialueen välillä. Näytteenoton ajankohta saattoi vaikuttaa kuormituksen vaikutuksen ilmenemiseen. Rinnakkaisten näytteiden väliset erot eivät yleensä olleet kovin suuria (liite 2).

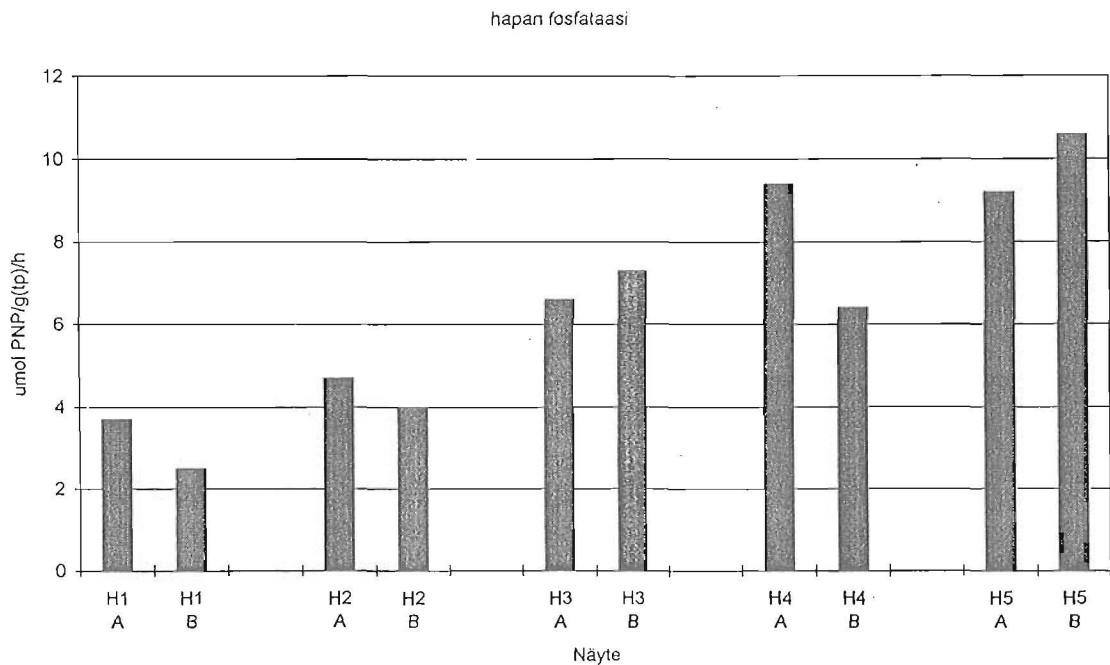
Kuormitus vaikutti heterotrofiseen pesäkelukuun R2A-agarilla määritettynä sekä Harjavallassa että Koverharin alueella (varianssianalyysi logaritmitransformoiduille pesäkeluvuille riippui havaintopaikasta: Harjavalta $F_{4,10} = 5,51^*$, Koverhar $F_{1,4} = 34,89^{**}$). Muilla havaintopaikoilla ei havaittu merkitsevää riippuvuutta.

Toukokuussa otetuissa Harjavallan näytteissä todettiin selvä raskasmetallikuormituksen aiheuttama mikrobiflooran lajiston muuttuminen tehtaan läheisyydessä (kuva 5). Se näkyi sekä heterotrofisen pesäkeluvun nousemisena tehdasta lähinnä olevassa pisteessä R2Av-alustalla kontrollialueen tasolle verrattuna H2 ja H3 havaintopaikkojen alempiin pesäkelukuihin. Tuloksen vahvisti se, että kasvualustalla, johon oli lisätty suuret määrät raskasmetalleja ($500 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ ja $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}$ ja Ni), saatiin resistenttien bakteerien pesäkeluvuksi tehdasta läheisyydessä vielä H3 havaintopaikallakin selvästi suuremmat lukumäärätiheydet kuin etäämpänä. Sienillä pesäkeluku oli alhaisempi tehdasta läheisyydessä kuin vertailualueella (MEA) ja raskasmetalleille resistenttejä kantoja löytyi vain tehdasta läheisyydestä (MEAmo).

Harjavallan API ZYM

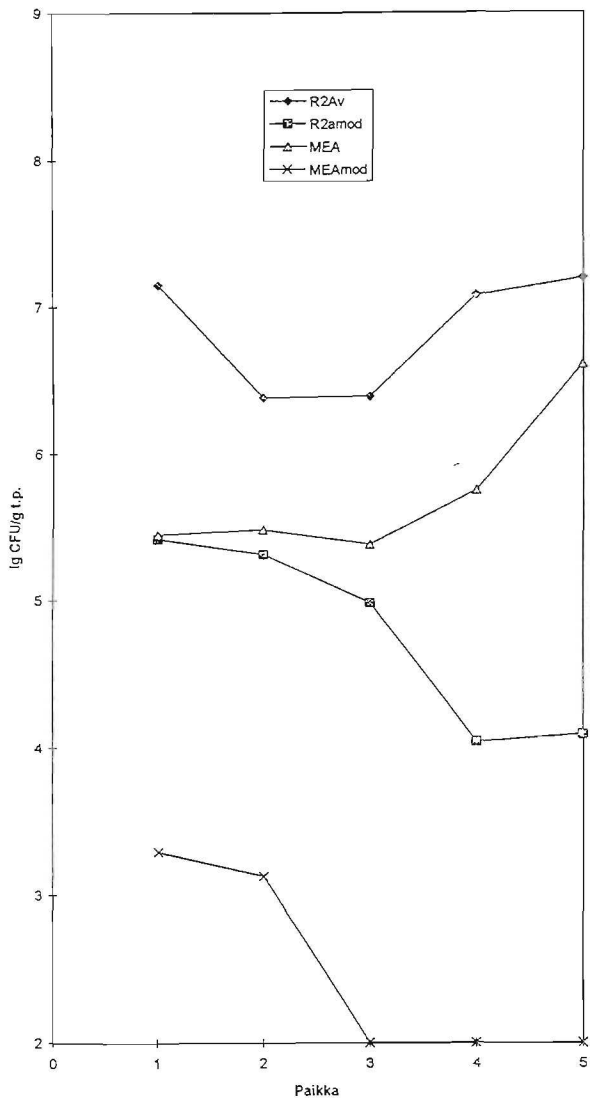


Kuva 3. Eri entsyymien aktiivisuudet Harjavallan maanäytteissä (reaktion voimakkuus 0–5, jossa 1 vastaa noin 5, 2 noin 10, 3 noin 20, 4 noin 30 ja 5 noin 40 tai enemmän nanomoolia entsyymiä; havaintopaikat kuten kuvassa 1).

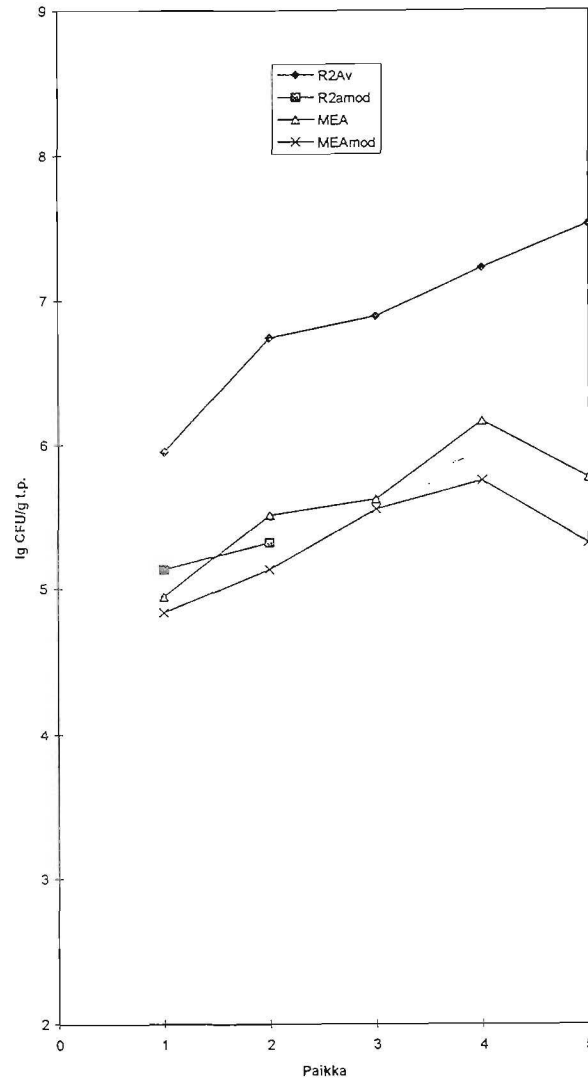


Kuva 4. Maanäytteiden hapan fosfataasiaktiivisuus (umol PNP/g(tp)/h) Harjavallan eri näytepaikoissa (havaintopaikat kuten kuvassa 1).

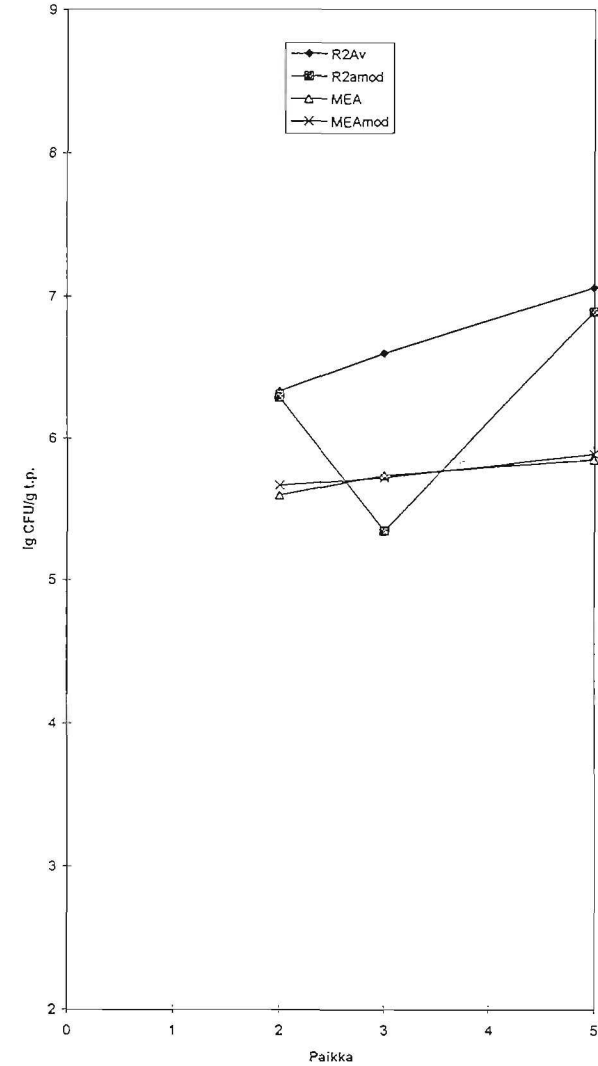
Harjavalta 23.5.1995



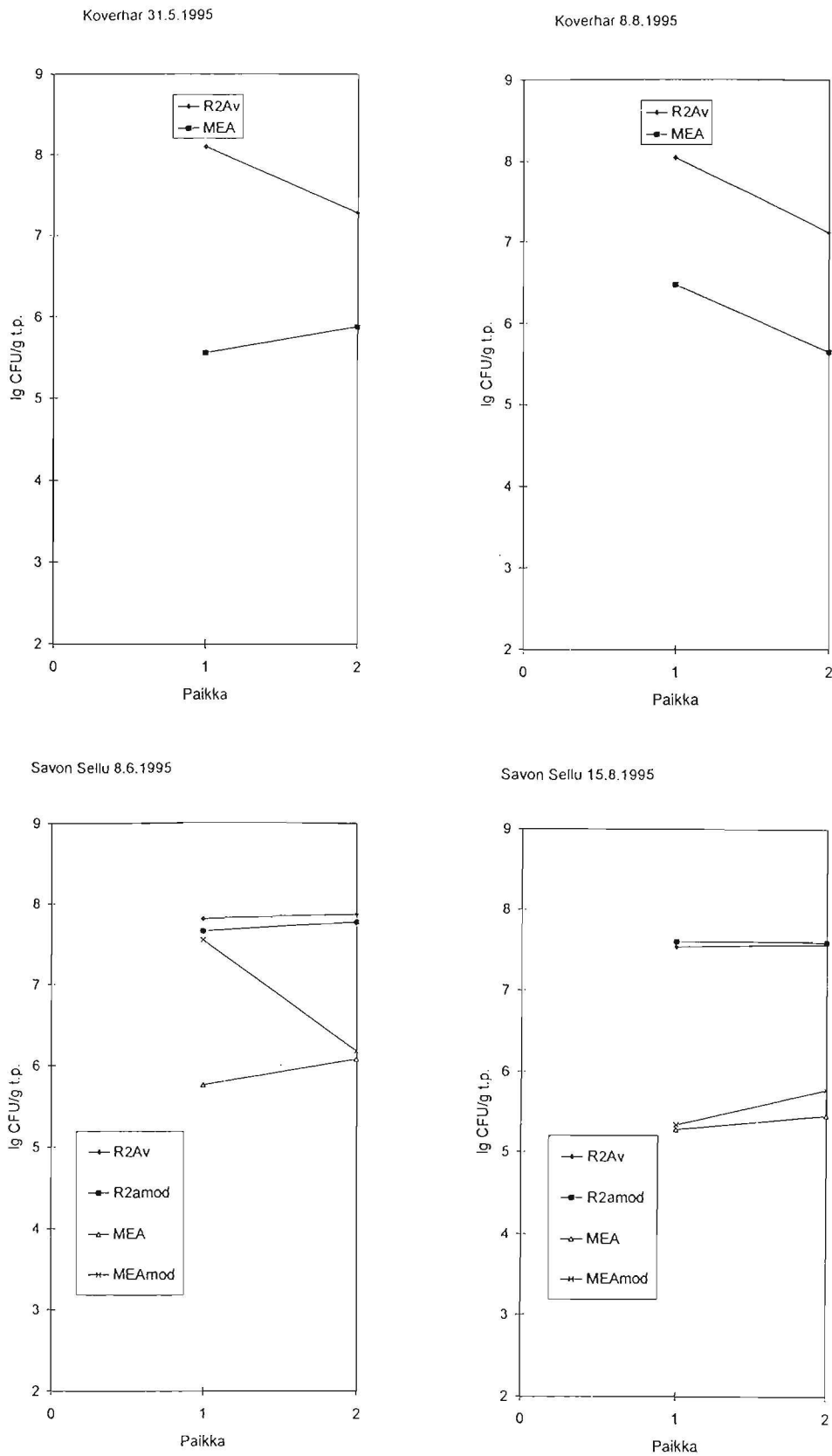
Harjavalta 2.8.1995



Harjavalta 9.10.1995

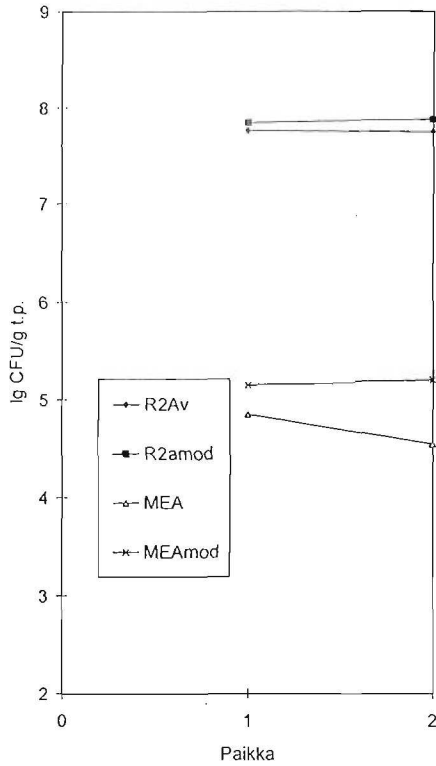


Kuva 5. Heterotrofisten bakteerien pesäkeluku R2Av, raskasmetalliresistenttien heterotrofisten bakteerien pesäkeluku R2Amo, sienten pesäkeluku MEA ja raskasmetalliresistenttien sienten pesäkeluku MEAmo Harjavallassa näytteissä kolmena havaintokertana (havaintopaikat kuten kuvassa 1).

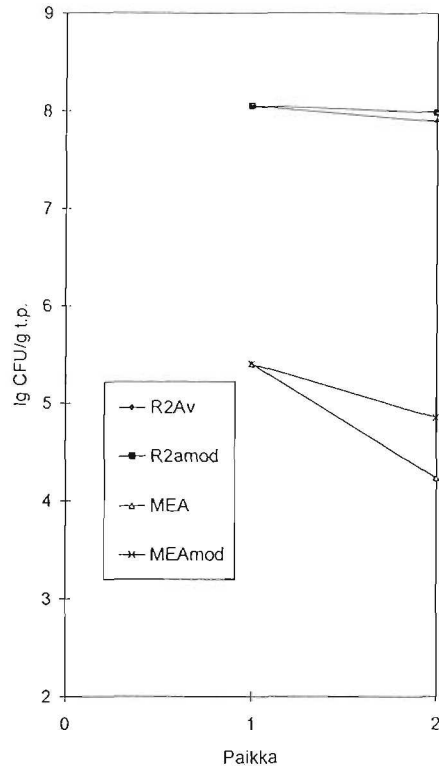


Kuva 6. Heterotrofisten bakteerien pesäkeluku R2Av ja sienten pesäkeluku MEA Koverharin ja Savon Sellun ympäristössä. Savon Sellun osalta esitetään myös tulokset kasvualustoilta, joihin on lisätty rikkiä ja typpeä (R2Amod ja MEAmod). (havaintopaikat 1 = kuormitetuulla alueella, 2 = vertailualueella).

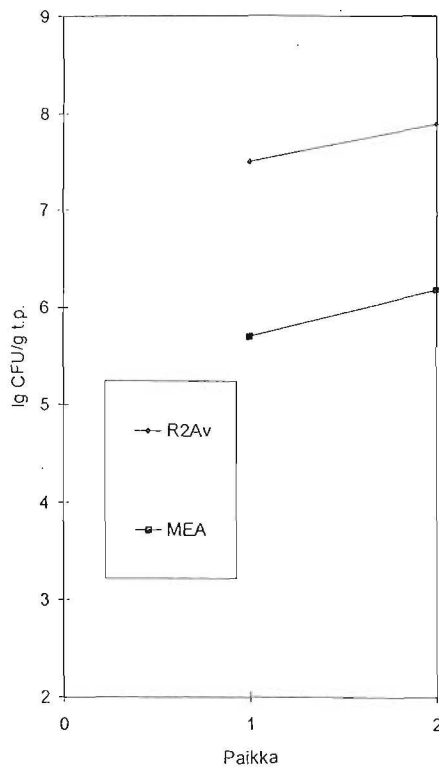
Siilinjärvi 8.6.1995



Siilinjärvi 15.8.1995



Haapavesi 15.6.1995



Kuva 7. Heterotrofiesten bakteerien pesäkeluku R2Av ja sienten pesäkeluku MEA Siilinjärven tehtaasta ja Haapaveden turvevoimalan läheisyydessä. Siilinjärven osalta on esitetty myös tulokset kasvualustoilta, joihin on lisätty fluoria (R2amod ja MEAmo) (havaintopaikat 1 = kuormitetulla alueella, 2 = vertailualueella).

Elokuun näytteenotossa havaittiin sekä bakteerien että sienten määrien laskevan tehdasta lähestyessä. Huolimatta sykloheksimidistä kasvualustassa, homeet haittasivat raskasmetalleja sisältävien R2A-mod-maljojen lukua näissä näytteissä. Resistenttien bakteerien määrät olivat samaa suuruusluokkaa kuin toukokuussa H1 ja H2 havaintopaikoissa. Sienten määrissä MEA-alustalla ja samalla raskasmetallisisäyksellä kuin bakteeriviljelyssä ei ollut selviä eroja. Molempien lukumäärät laskivat tehdasta kohti.

Lokakuussa tutkittiin vain havaintopaikat H2, H3 ja H5. R2A-mod-alustastaan lisättiin vain kymmenesosa siitä raskasmetallipitoisuudesta, jota käytettiin aiemmin. Tällä lisäyksellä ei havaittu eroja R2A-agarin tuloksiin nähden lukuunottamatta havaintopaikkaa H3, jossa metalleja sisältävällä alustalla oli vähemmän pesäkkeitä. Tämä tulos lienee satunnainen poikkeama. Sienten määrissä ei havaittu eroja havaintopaikkojen välillä.

Koverharin sulaton emäksinen laskeuma lisäsi bakteerien lukumäärätiheyttä vertailualueeseen verrattuna (kuva 6).

Savon Sellun, Siilinjärven tehtaan ja kaivoksen sekä Haapaveden turvevoimalan ympäristössä kuormitus ei ilmennyt mikrobien lukumäärien eroina (kuvat 6 ja 7). Siilinjärvellä bakteerien määrät olivat korkeat suhteessa sienten määriin.

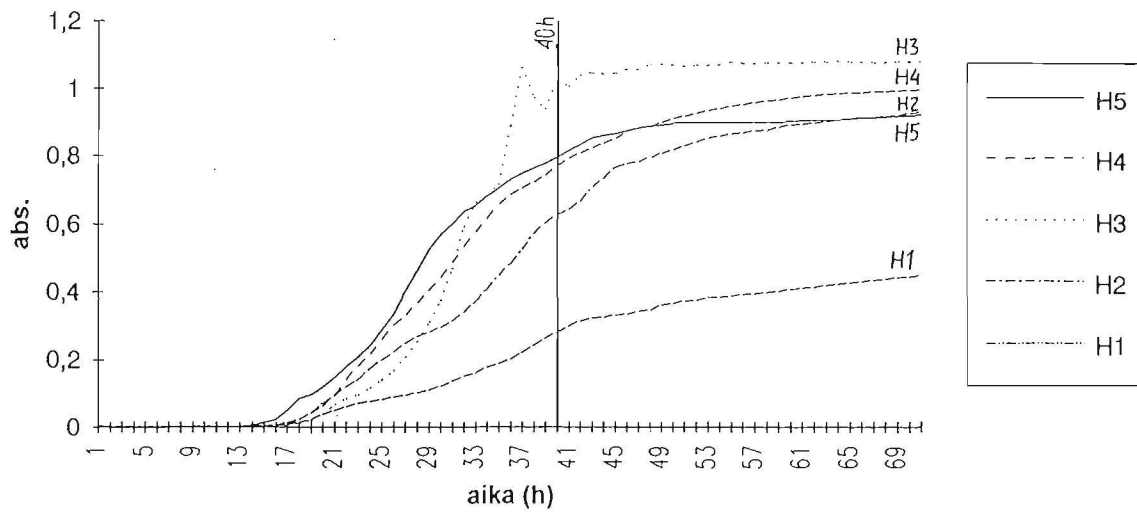
4.4 Liemiviljelyt

Kahden ensimmäisen näytekerroksen kasvatuksissa lisätyt metallipitoisuudet 0,5 mg/l ja 1 mg/l eivät vielä aiheuttaneet havaittavaa kasvunestymistä minkään näytepaikan mikrobistolle. Ilman metallisisäyksiä kasvatetuissa kontrollikaivoissa kasvu eri näytekerroilla oli tasoltaan sama. Ainoastaan havaintopaikkojen H1 ja H2 näytteiden aikaansaama kasvu jäi puoleen esim. paikan H5 kasvusta.

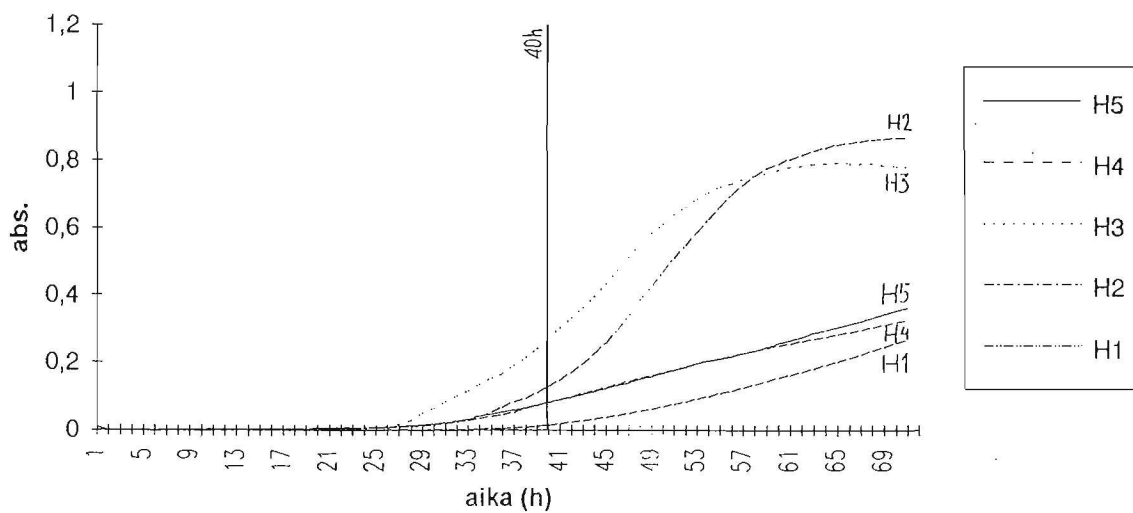
Kolmannella näytekerroksella lisätyt metallipitoisuudet olivat 10 mg/l kutakin metallionia. Tämän kasvatuskerran eri maanäytteiden mikrobiston kasvukäyrät (5 rinnakkaisen keskiarvo, hajonta n. +/-5%) kontrollikaivoissa esitetään kuvassa 8 sekä kolmen metallin kanssa (Cu, Ni, Zn) kuvassa 9. Lisätyt metallipitoisuudet pidensivät selvästi mikrobiston kasvun lag-vaihetta. Tämä havaitaan etenkin verrattaessa kasvua 40 tunnin jälkeen.

Inkuboinnin edistyessä, 70 tunnin jälkeen havaitaan kuvassa 9 (metallisisäykset) selvä ero tehdasta lähellä olevien näytepaikkojen H3 ja H2 kasvussa verrattuna puhtaan alueen näytteisiin H4 ja H5. Ilmeisesti pienestä alkupopulaatiosta johtuen näytepaikan H1 mikrobisto on vasta saavuttamassa eksponentiaalista kasvun vaihetta. Näytteen H1 mikrobisto jatkoi kasvua aina 115 tuntiin asti. Tällöin kasvu metallisisätyissä kaivoissa oli jopa kontrollikaivoja voimakkaampaa. Esimerkiksi kuparia, nikkeliä ja sinkkiä sisältävien kaivojen kasvu saavutti kontrollikaivojen kasvun 80 tunnin kuluessa. Kaikien eri metallisisäysten vaikutus näytepaikkojen mikrobiston kasvuun 70 tunnin jälkeen esitetään kuvassa 10.

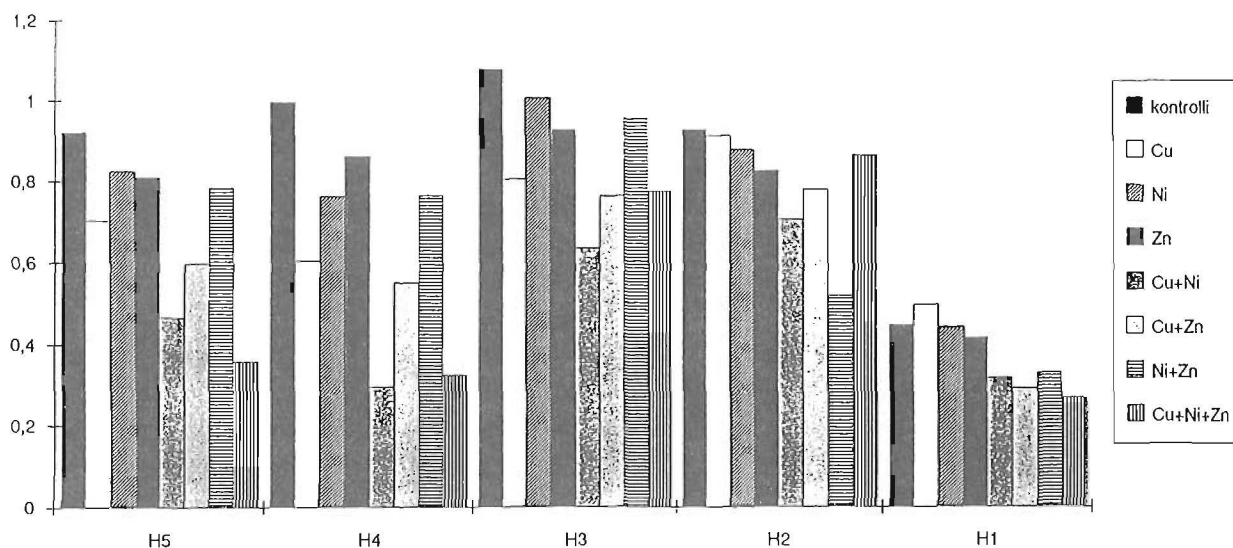
Lähempänä päästölähdettä havaittu mikrobiston metalliresistenssin lisääntyminen esitetään kuvassa 11. Tässä verrataan kunkin näytepaikan mikrobiston kasvua 70 tunnin aikana eri metallisisäyksissä verrattuna kontrollikaivoihin. Kolmen metallin



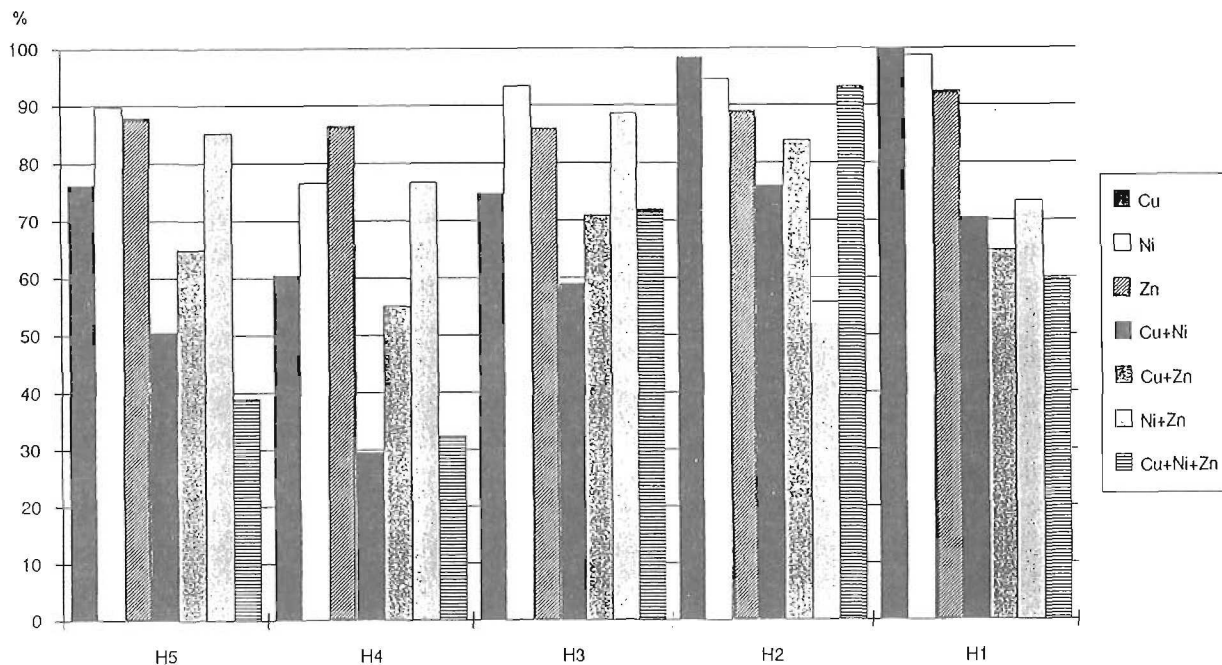
Kuva 8. Kolmannen kasvatuskerran eri maanäytteiden (H1,...H5) mikrobiston kasvukäyrät (absorbanssi, 5 rinnakkaisen keskiarvo, hajonta n. +/-5%) kontrollikaivoissa ilman metallilisäyksiä 70 tunnin kasvatuksen aikana.



Kuva 9. Kolmannen kasvatuskerran eri maanäytteiden (H1,...H5) mikrobiston kasvukäyrät (absorbanssi, 5 rinnakkaisen keskiarvo, hajonta n. +/-5%) kaivoissa, joihin on lisätty kuparia, nikkeliä ja sinkkiä 70 tunnin kasvatuksen aikana.



Kuva 10. Eri metallisäysten vaikutus näytepaikkojen mikrobiston kasvuun (absorbanssi) 70 tunnin jälkeen.



Kuva 11. Metallisäysten vaikutus eri näytepaikkojen mikrobiston kasvuun verrattuna kontrollikaivoihin (kasvu prosentteina kontrollikaivoista).

(Cu, Ni, Zn) lisäys estää selkeästi puhtaan alueen maanäytteiden H4 ja H5 mikrobiston kasvua (kasvu vain n. 50% kontrollista). Näytepaikan H2 mikrobiston kasvua em. metallilisäys esti ainoastaan alle 10%. Lähinnä päästölähdettä paikassa H1 esiintyi myös selkeää metalliresistenssiä, joka havaittiin kasvatuksen edistyessä selvemmin.

4.5 DNA:n eristys

DNA:n eristämisessä modifioitiin Saanon ja Lindströmin (1995) kehittämää menetelmää lisäämällä siihen Bead Beater -homogenointikäsitely. Homogenoinnin etuna oli suurentunut, joskin alkuperäistä pilkkoutuneempi DNA-saanto (kuva 12).

Soluseinärakenteeltaan erovien mikrobiryhmien DNA:n uuttumista verrattiin kokoelmakannoilla. Saanon menetelmällä saatiin gram-negatiivisilla bakteereilla hyvä saalis; gram-positiivisten bakteerien ja homeiden DNA:n uuttumista paransi mekaaninen käsittely, jota kokeiltiin ennen ja jälkeen setyylitrimetyyliammoniumbromidi (CTAB) -käsittelyn (kuva 13). Varmistettaessa mahdollisimman monien mikrobien DNA:n uuttuminen, päädyttiin käyttämään homogenisointia CTAB-lisäyksen jälkeen kaikilla tutkituilla näytteillä.

Maanäytteiden DNA:ta eristettäessä mekaaninen käsittely yleensä paransi saalista, mutta joissakin näytteissä DNA uuttui hyvin ilman homogenisointia (kuva 14). Uuttuvan DNA:n määrissä oli näytepaikkakohtaisia eroja.

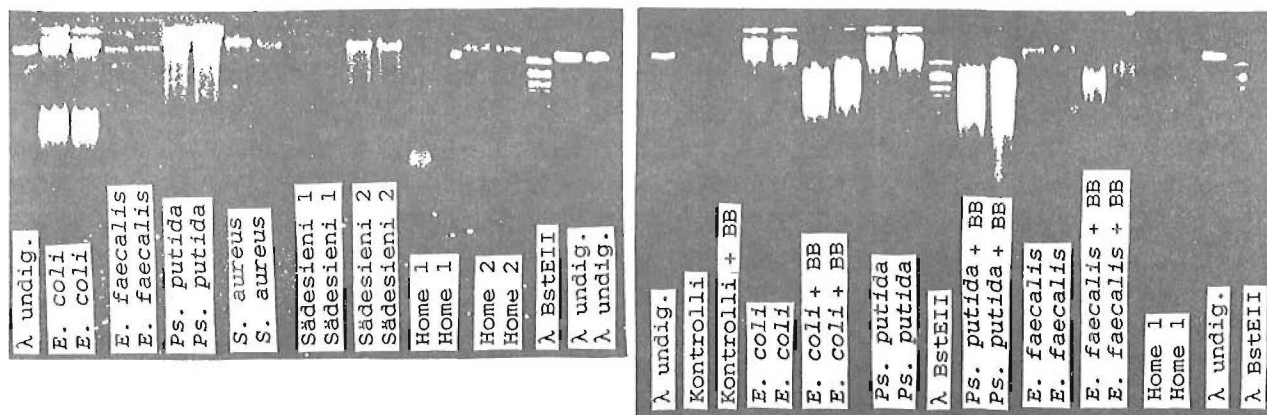
4.6 DNA-jaksojen monistus

Eri reaktiotilavuuksista ja parhaimmaksi osoittautui reaktioseoksen 50 µl:n totaaliolyymi. Eristetyistä DNA-näytteistä tehdyistä laimennoksista olivat 1:10 ja 1:100 yleensä parhaimmat. Muiden komponenttien osalta päädyttiin seuraaviin pitoisuuksiin: 20 pmol/µl kutakin dNTP (Pharmacia), alukkeita 5 pmol/µl (KEBO Lab), 10x reaktiopuskuri (Dynazymen) ja 2U DNA Polymerase F-500S (Dynazyme). Öljyä aplikoitiin reaktiotilavuutta vastaava määrä reaktioseoksen päälle.

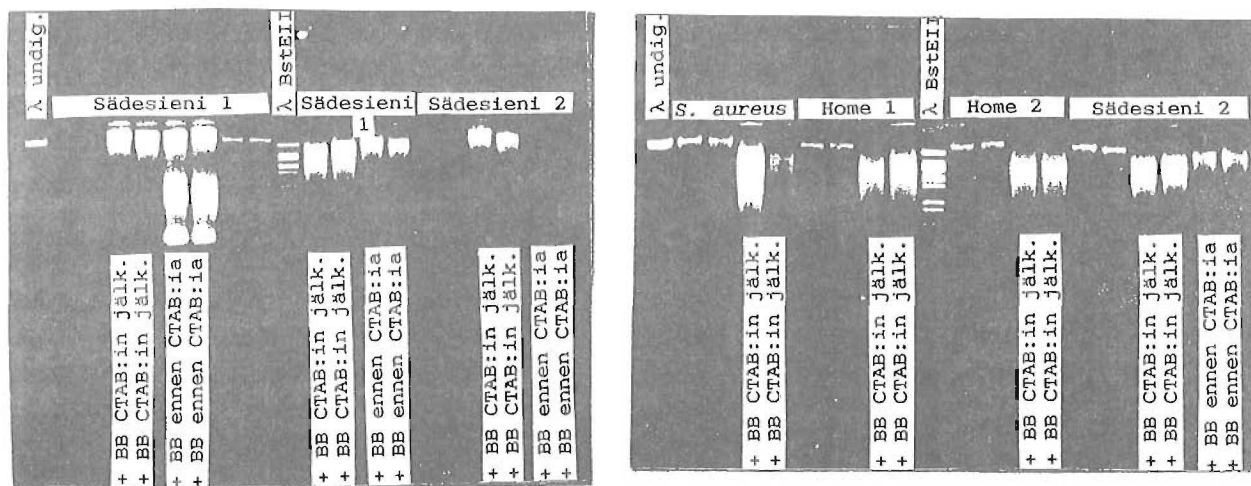
fd1- ja rD1 -alukkeilla monistus onnistui maljaviljelmästä eristetyllä DNA:lla *E. mundtii*, *E. faecium*, *E. hirae* ja *Ps. putida* kannoilla sekä Harjavallasta eristetyn resistentin gramnegatiivisen bakteerin DNA:lla (kuva 15). Harjavallan ja Koverharin maanäytteistä eristettyä 16S rDNA saatiin näillä alukkeilla monistettua (kuva 16). DGGE:n vaatimusten vuoksi siirryttiin kuitenkin uusiin alukkeisiin, joilla voitiin tuottaa lyhyempää fragmenttia 16S rDNA:sta.

GM5FGC- ja 905R -alukkeilla PCR-ajoa kokeiltiin puhtasviljelmille, *E. faecium* ja *Ps. putida*, joista viimeksimainitulla ei saatu monistettua oikean kokoista tuotetta lainkaan. Sen sijaan sekä Koverharista että Harjavallasta eristettyjen maanäytteiden monistus kyseisillä alukkeilla onnistui. Koska kaikkien bakteerien DNA-jaksojen monistaminen näillä alukkeilla ei vaikuttanut luotettavalta, siirryttiin käyttämään uusia alukkeita.

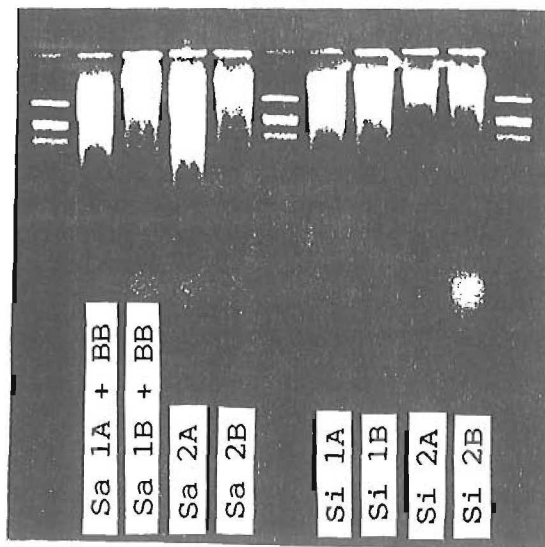
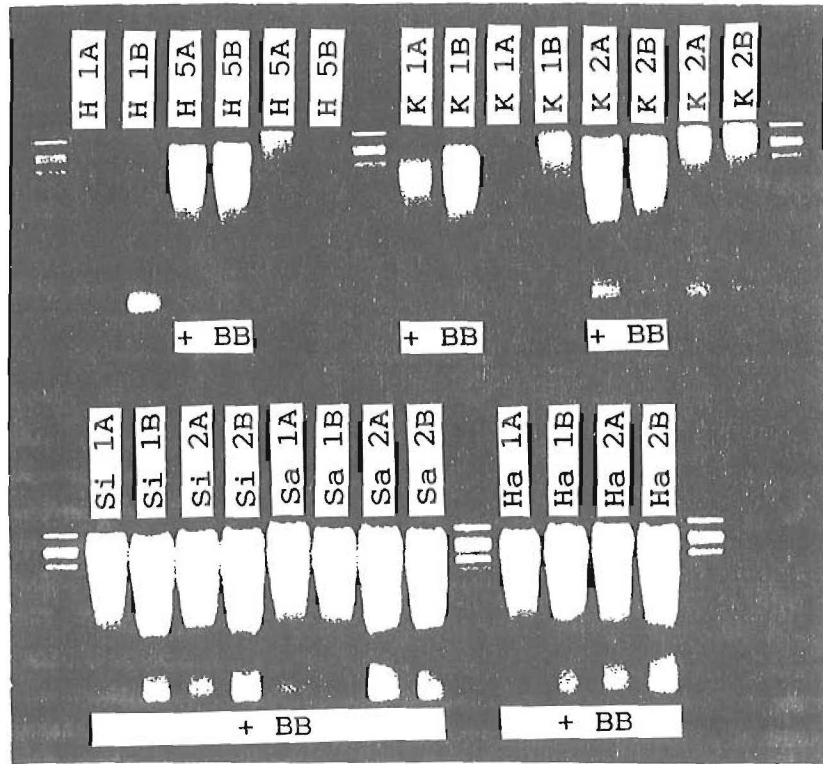
Y1- ja Y2 -alukkeilla saatiin sekä *E. faeciumilla* että *Ps. putidalla* monistettua oikean kokoista fragmenttia (kuva 17). Lupaavien tulosten vuoksi päätettiin jatkossa käyttää



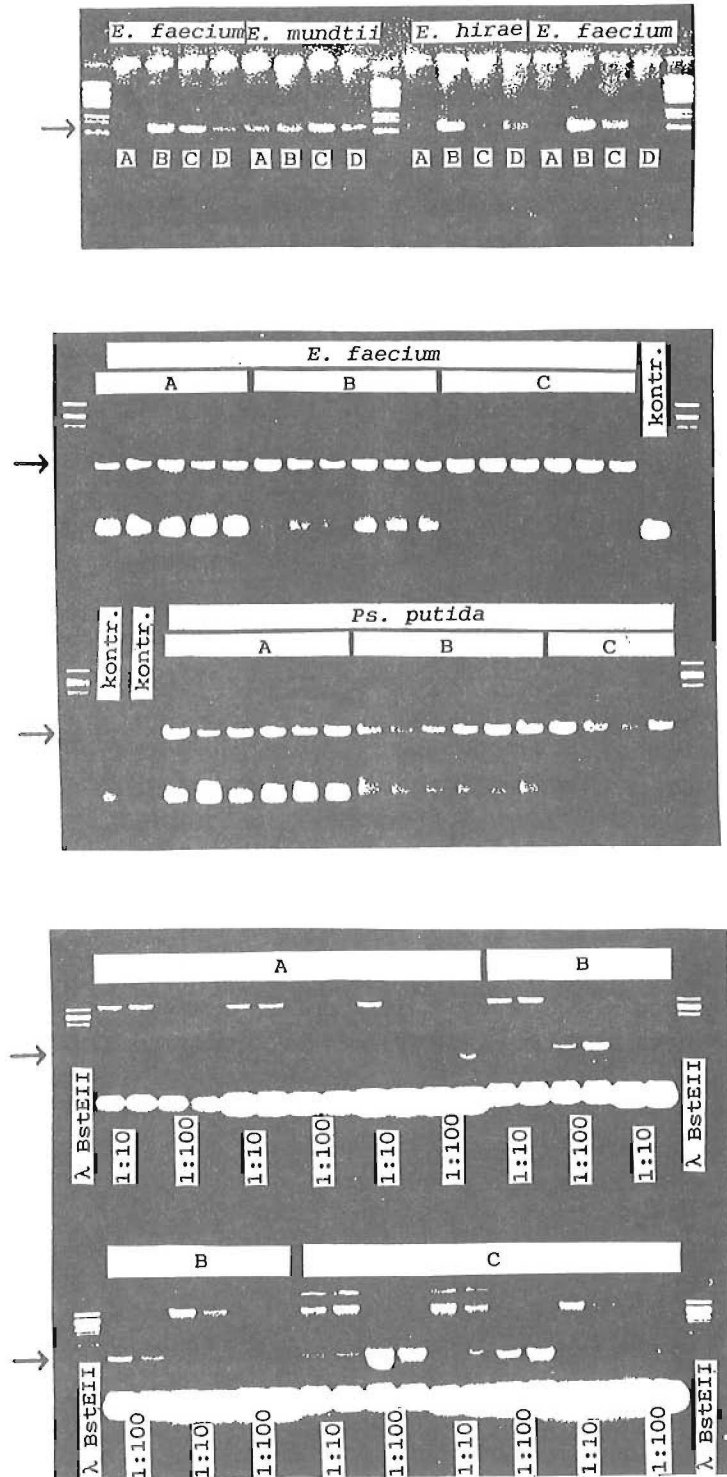
Kuva 12. DNA:n eristys eri mikrobeista Saanon ja Lindströmin (1995) esittämällä menetelmällä sellaisenaan ja täydennettynä mekaanisella käsittelyllä (BB).



Kuva 13. DNA:n eristys eri mikrobeista Saanon ja Lindströmin (1995) menetelmällä ja täydennettynä mekaanisella käsittelyllä (BB) ennen tai jälkeen CTBA-lisäyksen.

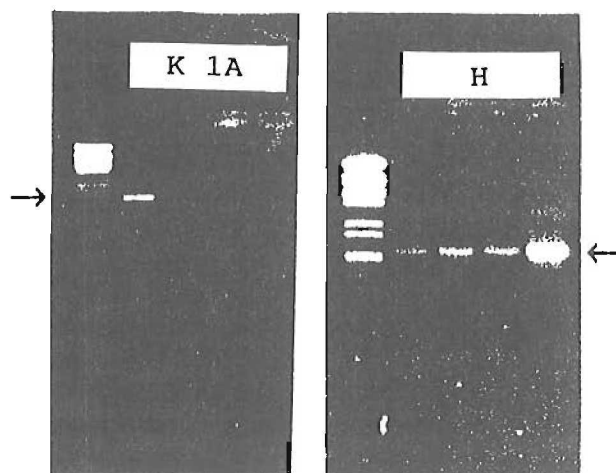


Kuva 14. DNA:n eristys maanäytteistä Saanon ja Lindströmin (1995) menetelmällä sellaisenaan ja täydennettynä mekaanisella käsittelyllä (BB) (havaintopaikat kuten kuvissa 1 ja 2; markkerina λ Bst EII).

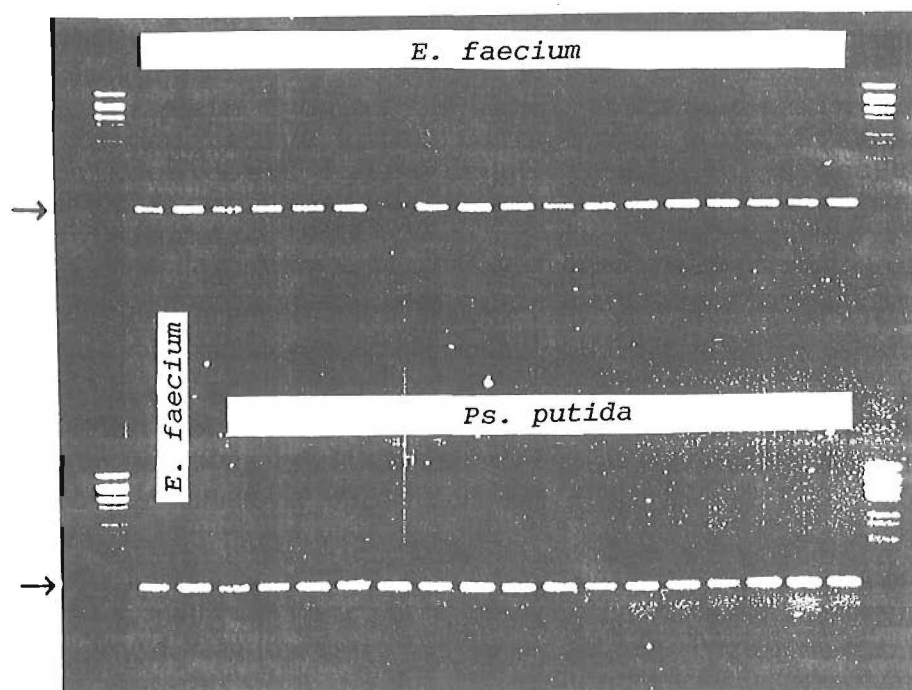


Kuva 15. Puhdasvilejmiem DNA:n monistus fD1- ja rD1-alukkeilla (markkerina λ Bst EII; n. 1500 pb tuote on merkitty nuolella)

- a) A = reaktiivilavuus 50 μ l, templaatin laimennos 1:10
 B = reaktiivilavuus 50 μ l, templaatin laimennos 1:100
 C = reaktiivilavuus 100 μ l, templaatin laimennos 1:10
 D = reaktiivilavuus 100 μ l, templaatin laimennos 1:100
- b) A = 100 pmol/ μ l; B = 50 pmol/ μ l; C = 20 pmol/ μ l
- c) Nukleotidipitoisuus A = 20, B = 100 ja C = 200 pmol/ μ l; templaatin laimennokset on merkitty kuvaan.



Kuva 16. Koverharin ja Harjavallan maanäytteistä eristetyyn DNA:n monistus *fD1*- ja *rD1*-alukkeilla. Templaatin laimennos 1:10 antoi parhaan tuloksen (markkerina λ Bst EII; n. 1500 pb tuote on merkitty nuolella).



Kuva 17. *E. faecium* ja *Ps. putida* kannoista eristetyyn DNA:n monistus *Y1*- ja *Y2*-alukkeilla (markkerina λ Bst EII; n. 300 pb tuote on merkitty nuolella).

näitä alukkeita kuitenkin siten muunnettuina, että toiseen alukkeeseen lisättiin runsaasti guaniinia ja sytosiinia sisältävä jakso DGGE-ajojen onnistumisen varmistamiseksi. Kokeilut Y1GC- ja Y2 -alukkeilla antoivat samankaltaisia tuloksia, kuin ilman GC-jaksoa eli ne toimivat puhdasviljelmäkokeiluissa.

4.7 Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi

DGGE-menetelmä perustuu DNA:n kaksoiskierteen aukeamiseen (sulamiseen) osittain yksijuosteiseksi G+C%:n funktiona tietyssä urean ja formamidin konsentraatiossa käyttäen gelielektroforeesilaitetta. Pienikin ero sekvenssissä muuttaa fragmentin käyttäytymistä DGGE:ssä, joten samanpituisia, mutta sekvensseiltään eroavia DNA-jaksoja voidaan erotella toisistaan erilaisten kulkeutumisominaisuuksien vuoksi.

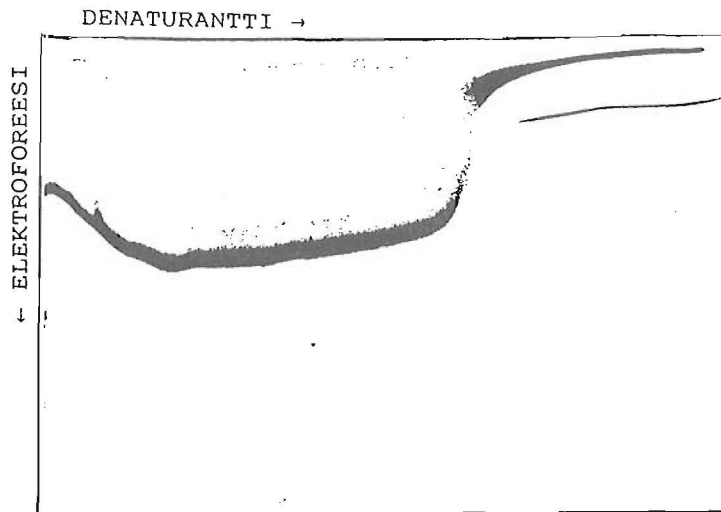
Alunperin aiottiin monistaa PCR-reaktiossa maasta eristetystä DNA:sta ja maasta eristetyistä mikrobeista eristetystä DNA:sta 16S rDNA-jaksoja ja analysoida niitä edelleen DGGE-ajoissa. Tässä vaiheessa tuloksia on käytettävissä vain laboratorionpuhdasviljelmistä.

DGGE-laite ja ajo-olosuhteet optimoitiin käytettyjen alukkeiden monistustuotteita varten käyttäen templaattina kokelmakantoja. Aluksi käytettiin PCR-monistukseen fD1- ja rD1-alukkeita, joilla monistuu noin 1500 emäsparin jakso. Tuotteen ajo perpendicular-geelissä, jossa näytteen kulkusuunta sähkökentässä ja geelin kasvava urea-formamididi -pitoisuus ovat kohtisuorassa toisiaan vastaan, antoi odotetun S-käyrän (kuva 18).

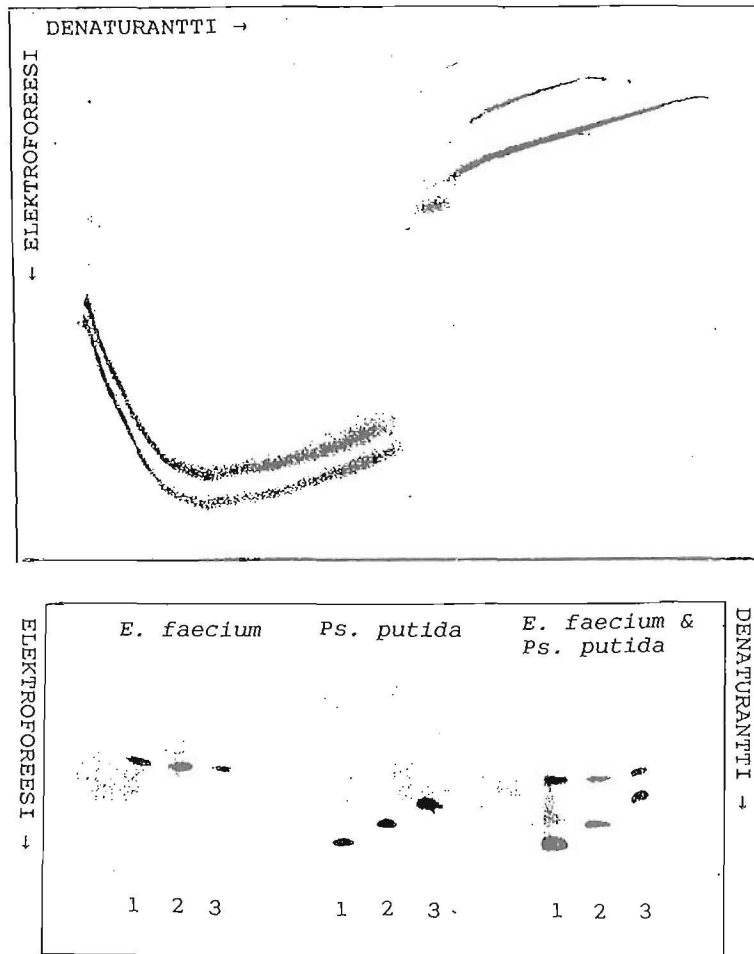
DGGE-ajossa voitiin kokeilla vain *E. faeciumin* monistustuotetta 907R- ja GM5FGC-alukkeilla, koska *Ps. putidalla* monistus ei onnistunut. *E. faeciumin* 550 emäsparin monistustuotteen sulamisalue saatiin DGGE-ajossa arvioitua.

Y1- ja Y2-alukkeilla pystyttiin monistamaan molempien tutkittujen puhdasviljelmä-kantojen, *E. faeciumin* ja *Ps. putidan*, DNA-jaksot. PCR-reaktiossa tuotettujen eri puhdasviljelmien 16S rDNA-jaksot, noin 300 emäsparia, pystyttiin DGGE:ssä erottamaan toisistaan. Perpendicular-geelissä syntyi kaksi toisiaan myötäilevää S-käyrää (kuva 19). Samoilla näytteillä ajettiin parallel-geeli, jossa näytteet kulkevat sähkökentän suuntaan kasvavaa urea-formamididi -pitoisuutta kohti. *E. faeciumin* 16S rDNA-fragmentti kulki geelissä hitaammin, kuin vastaava *Ps. putidan* fragmentti (kuva 19).

Vaikka analyysit ovat vielä kesken, Y1GC- ja Y2-alukkeiden PCR-tuotteiden toivotaan olevan DGGE:ssä stabiilimpia, kuin ilman alukkeeseen tehtyä GC-lisäystä. Harjavallasta eristettyjen resistenttien kantojen DGGE -analyysit ovat Y1- tai Y1GC- ja Y2 -alukkeilla alkamassa.



Kuva 18. DGGE:n perpendicular-geeli *E. faecium* ja *Ps. putida* kannoista eristetystä DNA:sta fd1- ja rd1-alukkeilla tuotetuilla 16S rDNA-fragmenteilla (denaturanttikonsentraatio vaihtelee välillä 0 - 80%, akrylamidigeelin väkevyys on 6% ja ajoaika 4 h).



Kuva 19. *E. faecium* ja *Ps. putida* kannoista eristetystä DNA:sta Y1- ja Y2-alukkeilla monistettujen 16S rDNA-fragmenttien DGGE-geelit:

a) perpendicular-geeli (ajo-olosuhteet kuten kuvassa 18).

b) parallel-geeli, jossa ajoaika näytteille 1 = 6 h, 2 = 5,5 h ja 3 = 5 h (6% akrylamidigeelin denaturanttikonsentraatio oli 45 - 80%). Pisimmälle kulkeutuneet näytteen ovat n. 60% denaturanttikonsentraation kohdalla.

5 TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Maan mikrobiaktiivisuus

Ihmisen toiminnan haitalliset vaikutukset metsäluonnolle pitäisi voida havaita niin ajoissa, että korjaavat toimenpiteet vielä ovat mahdollisia. Maaperän mikrobitoiminta on keskeinen perusta metsäekosysteemissä. Maahengitystä (CO₂-tuotto) ja mikrobi-biomassaa mittaamalla saadaan hyödyllistä tietoa ainetaseiden laskemisen pohjaksi ja voidaan havaita esimerkiksi raskasmetalleilla vahvasti kuormitettujen maa-alueiden heikentynyt hajoitustoiminta (Vanhala ja Ahtiainen 1992). Maahengitysmittausten tulokset tässä tutkimuksessa osoittivat kuormituksen vähentävän mikrobiaktiivisuutta Harjavallan alueella ja Savon Sellun läheisyydessä, mutta lisäävän sitä Koverharin sulaton läheisyydessä. Muilla tutkituilla alueilla ei maahengitysmittausten perusteella havaittu mikrobiaktiivisuudessa kuormituksen aiheuttamaa muutosta. On kuitenkin ilmeistä, että mikrobeista voi valikoitua jäljelle kuormitusta sietäviä lajeja kuormituksen seurauksena, vaikka kuormitus ei vielä heijastu maahengityksen alenemisena.

Harjavallan ympäristössä on tehty runsaasti ilmansaasteisiin liittyvää ekologista tutkimusta. Tämä tutkimus osoitti, että Harjavallassa raskasmetallilaskeuma on vähentänyt selvästi maan mikrobiologista aktiivisuutta päästölähteen ympäristössä. Vastaaviin tuloksiin Harjavallassa ovat päätyneet myös Fritze ym. (1989), Vanhala ja Ahtiainen (1994) sekä Fritze ym. (1996). Koverharissa alkalinen laskeuma oli nostanut humuksen pH:ta ja lisännyt mikrobiologista aktiivisuutta sulaton lähellä. Saman on raportoinut myös Fritze (1991). Savon Sellun rikkilaskeuman kuormittamalla koealalla mikrobiologinen aktiivisuus oli alempi kuin kuormittamattomalla tausta-alueella. Humus oli myös happamampaa päästölähteen läheisyydessä. Siilinjärvellä ja Haapavedellä ei laskeuman vaikutuksia havaittu. Happamoittavan laskeuman vaikutuksia metsämaan mikrobiflooraan on tutkittu runsaasti. Tulokset ovat olleet usein ristiriitaisia, mutta ainakin voimakkaan happamoittavan laskeuman on havaittu vähentävän mikrobitoimintaa (Fritze 1992, Vanhala ym. 1996).

Maan eri entsyymien aktiivisuus saattaisi maahengitystä herkemmin muuttua kuormituksen seurauksena (Bååth 1989). Harjavallan maanäytteissä entsyymiaktiivisuudet olivat lähempänä tehdasta selvästi estyneitä kontrollialueisiin verrattuna. Selvimpänä tämä gradientti havaittiin happaman fosfataasin aktiivisuudessa sekä kvantitatiivisessa mittauksessa että Api Zym-entsyymikitillä. Muista entsyymeistä selkeä gradientti havaittiin fosfoamidaasiaktiivisuudessa. Kuten fosfataasikin tämä entsyymi on tyypillinen fosforin mineralisaatioon liittyvä eksoentsyymi, joka pilkkoo valkuaisaineiden typpi-fosforisidoksia vapauttaen edelleen ortofosfaattia. Muiden entsyymien aktiivisuudet jäivät melko vähäisiksi eikä selvää entsyymitoiminnan monimuotoisuuden vähenemistä voida todeta kuin tehdasta lähinnä olevassa näytepaikassa. Myös maanäytteiden sisältämät raskasmetallit saattoivat inhiboida maanäytteen sisältämien entsyymien toimintaa vielä inkuboinnin aikana.

5.2 Viljelymenetelmät

Viljelymenetelmien haittana on se, että vain osa mikrobeista saadaan esiin viljellen eikä tiedetä, ovatko viljelyssä esiin saadut lajit toimineet aktiivisesti ympäristössä näytteenottohetkellä. Erityisesti sienten osalta viljelyissä voidaan saada esiin pesäkkeitä maassa passiivisina olleista itiöistä. Etuna viljelymenetelmissä on se, että

olosuhteita säätelämällä saadaan esiin spesifisiä taksonomisia tai funktionaalisia ryhmiä ja että eristettyjen mikrobien ominaisuuksia voidaan tutkia ja ne voidaan tunnistaa, jolloin on käytettävissä julkaistu kirjallisuus niiden ominaisuuksista ja ekologiasta.

Tässä tutkimuksessa heterotrofinen pesäkeluku vaihteli 10^7 ja 10^8 CFU/g tp välillä lukuunottamatta Harjavallan kuormitettuja alueita, joissa se oli alempi. Sienten pesäkeluvut olivat huomattavasti pienempiä. Erityisesti Siilinjärven alueella havaittiin alhaisia sienten lukumääriä. Tilastollisesti merkitsevä kuormituksen vaikutus hetrotrofiseen pesäkelukuun todettiin vain Harjavallan ja Koverharin vaikutuspiirissä. Harjavallassa ilmeisesti raskasmetallikuormitus pienensi ja Koverharissa alkaalinen laskeuma nosti bakteerien pesäkelukua. Ajankohdan vaikutus ei ollut Harjavallan näytteissä tilastollisesti merkitsevä, mutta koetoistoja lisäämällä vaikutus tulisi todennäköisesti esiin.

Tutkimuksessa testattiin myös bakteerien ja sienten metalliresistenssin riippuvuutta kuormituksesta. Heterotrofinen pesäkeluku aleni lähestyttäessä kontrollialueelta Harjavallan tehdasta, mutta nousi uudelleen tehtaan läheisyydessä. Tämä viittasi resistentin flooran kehittymiseen ja havainnon vahvisti viljelytulos kasvualustalla, johon oli lisätty raskasmetalleja Metalliresistenttien mikrobien lisääntyminen lähempänä Harjavallan tehdasta havaittiin selvästi myös Bioscreen- liemikasvatuksissa. Sienten osalta tulokset olivat viitteellisiä, mutta ainoat metalliresistentit sienet löytyivät tehtaan läheisyydestä viljelyistä näytteistä. Tässä tutkimuksessa havaitut tulokset ovat sopusoinnussa aiemmin julkaistujen tietojen kanssa myös siltä osin, että sädesienten ohella resistentteinä eristetyt bakteerit osoittautuivat gram-negatiivisiksi (Bååth 1989).

5.3 Molekyylibiologian menetelmät

Molekyylibiologian menetelmistä nukleiinihappojen tutkimus tarjoaa ympäristömikrobiologian tutkimukseen runsaasti lupaavia mahdollisuuksia, joista on kuitenkin toistaiseksi vain rajoitetusti kokemusta.

Molekyylibiologian menetelmin runsaasti tutkituille ryhmille voidaan käyttää julkaistuihin tietoihin perustuvia alukkeita DNA-jaksojen monistuksessa ja geenikoettimia hybridisaatiossa. Käyttönotettavien alukkeiden valinta perustuu nykytietämykseen niiden spesifisyydestä eri taksonomisille ryhmille. Tietoja ei kuitenkaan ole riittävästi kaikista keskeisistä suurista taksonomisista ryhmistä eikä funktionaalisista ryhmistä. *In situ* -hybridisaatiossa käytetään fluoresoivalla leimalla varustettuja 16S rRNA:han sitoutuvia oligonukleotidejä (Schleifer ym. 1993). Koska solussa on runsaasti näitä molekyylejä, sitoutuneet oligonukleotidit saavat koko solun fluoresoimaan, jolloin ne voidaan epifluoresenssimikroskoopissa havaita. Menetelmä on lupaava, mutta sitä käytetään toistaiseksi vain harvoissa laboratorioissa ja kattavan, spesifisyydeltään tunnetun, oligonukleotidikokoelman aikaansaaminen vaatii vielä työtä, jossa DNA:n eristykseen, spesifisten jaksojen monistukseen, niiden erotteluun esim. DGGE:n avulla, ja sekvenointiin perustuvia menetelmiä voidaan käyttää hyväksi.

Maaperässä tärkeille taksonomisille mikrobiryhmille, kuten arkkiorganismit, sädesienet ja *Clostridium/Bacillus*-haara tarvittaisiin spesifiset alukkeet ja koettimet, jotta voitaisiin ensin kartoittaa suurten taksonomisten ryhmien esiintyminen ja sitten selvit-

tää alempien taksonomisten ryhmien esiintymistä. Tärkeistä aineenvaihduntareaktioista vastaavien mikrobien osoittaminen (typen kierto, raskasmetalliresistenssi, haitallisten aineiden hajotus yms.) on myös ympäristövaikutusten havaitsemiseksi hyödyllistä ja vaatii myös luonteenomaisesta reaktiosta vastaavien geenien spesifisten jaksujen etsimistä.

Puhdasviljelmien hyväksikäyttö täydentää luonnon näytteen DNasta saadun tiedon. Esimerkiksi, kun näytteestä eristetyistä DNasta voidaan osoittaa tietty taksonominen tai funktionaalinen ryhmä, voidaan haluttaessa optimoida viljelyolosuhteet ja pyrkiä eristämään kiinnostava kanta jatkotarkasteluja varten. Tässä hankkeessa Harjavallan kuormitetulta alueelta maasta eristetyyn DNA:n ja samoista näytteistä eristettyjen bakteereiden DNA:ta verrataan DGGE-ajoissa jatkotutkimuksissa, jotka ovat käynnissä.

DNA:n uuttamisessa maanäytteistä on pyrittävä pääsemään eroon häiritsevästä tekijöistä, kuten humuksesta, joten Saanon ja Lindströmin (1995) kehittämä menetelmä on hyvä suomalaisen metsämaan humuskerroksen näytteille. Koska menetelmää on aiemmin käytetty ennenkaikkea gram-negatiivisille bakteereille, tässä tutkimuksessa lisättiin menetelmään mekaaninen homogointivaihe, jotta DNA saataisiin uuttamaan mahdollisimman monenlaisen soluseinärakenteen mikrobeista. Homogointi pilkkoo DNA:ta eri mikrobeilla ja eri maanäytteissä eri määriin, mikä saattaa katkaista DNA-kaksoissäikeen myös monistettavasta kohdasta. Toisaalta maaperässä esiintyvien kaikkien mikrobiryhmien esiinsaaminen on välttämätöntä, jottei saataisi vinoutunutta kuvaa flooran koostumuksesta.

Kokonaisen 16S rDNA:n PCR-monistus fd1- ja rD1 -alukkeilla (Weisburg ym. 1991) antoi lupaavia tuloksia sekä puhdasviljelmillä että maanäyteillä, mutta niiden käytöstä luovuttiin, koska monistustuotteen koko (1500 bp) asetti rajoitukset DGGE-analyysille. Hyviä tuloksia on saatu DGGE:ssä, kun analysoitavat fragmentit ovat 25:stä muutamaa sataan emäsparia pitkiä (Muyzer ym. 1995). Muizerin ym. suosittamia alukkeita 907R ja GM5F, jossa on 40 bp:n GC-clamp 5' päässä, käytettiin monistamaan 16S rDNA:n 550 bp:n fragmenttia *E. faecium*illa ja *Ps. putida*lla. *Ps. putida* ei kuitenkaan monistunut kyseisillä alukkeilla ja siitä voitiin päätellä, etteivät kyseiset alukkeet todennäköisesti luotettavasti toimi sekapopulaatiol-lekaan. Siksi siirryttiin 16S rDNA:n 300 bp:n fragmenttia monistaviin alukkeisiin Y1 ja Y2 (Young et al. 1991). Näillä alukkeilla saatiin sekä *E. faecium* että *Ps. putida* kantojen DNA-jaksot monistumaan ja monistustuotteet erotettua DGGE-analyysissä. *E. faecium* kulki geelissä hitaammin kuin *Ps. putida*. Jatkokokeita varten on Y1-alukkeen 5'-päähän liitetty 40 bp:n GC-clamp lisäämään näytteiden stabiilisuutta DGGE:ssä ja näitä alukkeita käytetään tutkittaessa eri havaintoalueilta eristettyä DNA:ta sekä Harjavallasta eristettyjä metalliresistenttejä bakteereita. Alukkeiden välinen ero 16S rDNA:n fragmenttien monistumisessa havaittiin tässä tutkimuksessa. Kokeellisesti ilmiötä ovat selvittäneet Suzuki ja Giovannoni (1996).

5.4 Eri menetelmien antama kuva kuormituksen vaikutuksesta

Maahengitysmittaukset (ilmoitettuna hehkutushäviötä kohti) ja bakteerien pesäkelukumääritykset (ilmoitettuna tuorepainoa kohti) antoivat hyvin yhtenevän kuvan kuormituksen vaikutuksesta. Kuitenkin ero havaittiin Savon Sellun osalta, jossa bakteereiden ja sienten pesäkeluvuissa ei todettu eroa vaikutusalueella ja vertailualue-

eella, mutta maahengitys oli selvästi heikentynyt vaikutusalueella. Tällä alueella jatkotutkimukset (entsyymiaktiivisuudet, mikrobilajisto) olisivat aiheellisia. Samoin jatkotutkimuksia olisi syytä tehdä Koverharin alueella, jossa laskeuma lisää maahengitystä ja bakteerilukumääriä.

Harjavallan näytteissä maahengitys, entsyymiaktiivisuudet, bakteerien ja sienten pesäkelukumääritykset ja liemiviljelyssä mitattu raskasmetallien vaikutus kasvuun antoivat kaikki samansuuntaiset tulokset eikä menetelmien herkkyyden välillä ilmennyt eroja käytetyssä koejärjestelyssä. Menetelmien herkkyyttä verrattaessa saattaisi olla tarkoituksenmukaista mitata vaikutuksia Harjavallassa havaintopaikkojen H3 ja H5 välisellä alueella. H3 on silminähdn häiriintynyt, kun taas H4-alueella ei ole selvästi havaittavia muutoksia.

Bääth (1989) on ansiokkaasti arvioinut raskasmetallikuormituksen vaikutuksia maaperän mikrobeihin ja niiden toimintaan sekä arvioinut eri mittaamenetelmiä. Hänen esittämänsä näkökohdat sopivat monelta osin kuormituksen tai muuttavan toiminnan vaikutusten arviointiin yleisemminkin. Tämä tutkimus vahvistaa Bääthin näkemyksen maahengitysmittauksen ja entsyymiaktiivisuuksien mittausten käyttökel-
poisuudesta. Myös hänen esittämänsä näkemys typen kierron prosessien mittaamisesta kuormituksen vaikutusten arvioimiseksi todennäköisesti hiilen mineralisaatiota herkempänä menetelmänä ansaitsee tulla huomioon otetuksi.

Heterotrofisen pesäkeluvun ja sienten pesäkelukujen määrittäminen ei sinällään lisännyt maahengitysmittauksen antamaa tietoa kuormituksen vaikutuksesta tässä tutkimuksessa. Kuitenkin pesäkelukumäärityksin pystyttiin osoittamaan kuormituksen indusoiman resistentin mikrobiflooran kehittyminen, jonka hiilidioksidin tuotto ei kuitenkaan ollut yhtä tehokasta kuin häiriintymättömän flooran. Viljelymenetelmien etuna onkin lähinnä se, että viljelyolosuhteita muuntamalla voidaan saada esiin haluttuja taksonomisia ja funktionaalisia ryhmiä ja eristää kantoja tarkempiin tutkimuksiin.

Molekyylibiologian tarjoamat menetelmät ovat lupaavia lajistaselvityksissä erityisesti siksi, että esiin saadaan myös mikrobit, joita ei osata viljelymenetelmin saada esiin, ja koska niiden avulla päästään luotettavaan tunnistukseen ja fylogenian selvittämiseen. Toisaalta toistaiseksi on riittämättömästi tietoa saannosta DNA:ta eristettäessä ja sen jaksoja monistettaessa maanäytteistä. Alustavat kokeet tässä tutkimuksessa kuitenkin rohkaisevat jatkamaan. DNA:n eristykseen perustuvaa analytiikkaa tulisi täydentää käyttämällä *in situ* -hybridisaatiomenetelmiä, joiden käyttöönottoon ja kehittämiseen tulisi sijoittaa voimavaroja.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa voitiin osoittaa maahengitysmittauksen, entsyymiaktiivisuuksien ja mikrobien pesäkelukumääritysten heijastelevan kuormitusta eräillä havaintoalueilla ja tunnistaa havaintoalueita, joille jatkotutkimuksia herkkien menetelmien testaamiseksi tulisi keskittää. Maahengityksen ohella olisi tarpeen mitata typen kierron prosessien intensiteettiä tai potentiaalia.

Entsyymiaktiivisuuksien käyttöä ilmentämään haitallisia muutoksia mikrobifloorassa tulisi kehittää siten, että saataisiin mitattua vaikutuksia mahdollisimman monenlaisiin aineenvaihduntareaktioihin ja aineiden kiertokulkuun. Tässä voidaan käyttää sekä olemassa olevia entsyymitestisarjoja ja bakteerien tunnistukseen tarkoitettuja identifointijärjestelmiä että yksittäisten entsyymien aktiivisuutta osoittavia testejä. Hyvän entsyymikirjon tarjoamalla testisysteemillä saattaisi olla kaupallisia menestymisen mahdollisuuksia.

Molekyylibiologian menetelmien käyttöä suoraan maanäyteillemä tulisi jatkaa ja menetelmiä täydentää hybridisaatioon perustuvilla menetelmillä. Lisäksi näitä menetelmiä voitaisiin käyttää eristettyjen kantojen tarkkaan identifointiin. Koska samankin suvun sisällä on tapahtunut lajistomuutoksia kuormituksen seurauksena (Bååth 1989), tarvitaan lajitason taksonomisia selvityksiä keskeisistä mikrobisuvuista ja näissä tarvitaan edelleen viljelymenetelmien hyväksikäyttöä.

KIRJALLISUUS

- Blanck H. 1995. Community level ecotoxicological test systems for algae and bacteria. In: Development of (eco)toxicity tests. Tema Nord 1995: 623. Nordic Council of Ministers.
- Bååth, E. 1989. Effects of heavy metal in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution* 47: 335–379.
- Environment Data Centre 1993. Manual for integrated monitoring. p. 83. National Board of Waters and the Environment.
- Fritze H. 1991. Forest soil microbial response to emission from an iron and steel works. *Soil Biol. Biochem.* 23: 151–155.
- Fritze H. 1992. Effects of environmental pollution on forest soil microflora – a review. *Silva Fennica* 26: 37–47.
- Fritze, H., Niini, S., Mikkola, K. & Mäkinen, A. 1989. Soil microbial effects of a Cu–Ni smelter in southwestern Finland. *Biol. Fertil. Soils* 8: 87–94.
- Fritze, H., Vanhala, P., Pietikäinen, J. & Mälkönen, E. 1996. Vital fertilization of Scots pine stands growing along a gradient of heavy metal pollution: short-term effects on microbial biomass and respiration rate of the humus layer. *Fresenius J. Anal. Chem.* In press.
- Halonen, A. & Holopainen, T. 1991. Typpi- ja rikkilaskeuman vaikutus männyn sienijuuriin Savon Sellun ympäristössä. *Savon Luonto* 22: 29–32.
- Helmisaari, H-S., Derome, J., Fritze, H., Nieminen, T., Palmgren, K., Salemaa, M. & Vanha Majamaa, I. 1995. Heavy metals in Scots pine forest – Ecosystem study in southwestern Finland. E. Sasaki and T. Saarinen, (toim.). *Second Finnish Conference of Environmental Science, Helsinki, Nov. 16–18, 1995.* pp. 321–324.
- Kemira. Ympäristöraportti. 1991. 47 s. Helsinki.

- Monni, S. & Mäkinen, A. 1995. Ilman epäpuhtaudet ja niiden vaikutukset maaekosysteemeihin ja lohijärvien vedenlaatuun. Oy Fundia Wire Ab:n Koverharin rauta- ja terästehtaan ympäristössä Hankoniemellä vuosina 1959–1993. Helsingin yliopisto. Ekologian ja systematiikan laitos, Ekologian laboratoriot. 114 s. Helsinki
- Myers, R.M., Maniatis, T. & Lerman, L.S. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155: 501–527.
- Muyzer, G. 1995. Protocols for the DGGE. Workshop on Application of DGGE and TGGE in Microbial Ecology. June 7–10, Germany.
- Muyzer, G., Teske, A., & Wirsén, C.O. 1995. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165–172.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O. & Jannasch, H.W. 1995. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164: 165–172.
- Muurman, J. 1989. Haapaveden turvevoimalaitoksen lupa- ja ilmoitusmenettely. Ympäristöministeriön ympäristönsuojeluosaston selvitys 69/1989. 70 s. Helsinki.
- Nerg, A. & Holopainen, T. 1991. Savon Sellun ympäristön metsävauriot. *Savon Luonto* 22: 33–39.
- Niemi, R.M., Knuth, S. & Lundström, K. 1982. Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 378–388.
- Poutanen, P. & Kuisma, M. 1994. Puoli vuosisataa kuparia ja nikkeliä. Outokummun Harjavallan tehtaat 1944–1994. Jyväskylä.
- Rantalahti, R. 1995. *Vasken Viesti*. 3–4: 2–6.
- Saano, A. & Lindström, K. 1995. Small scale extraction of DNA from soil with spun column cleanup. In: A.D.L. Akkermans, J. D. van Elsas & F.J. de Bruijn (toim.). *Molecular Microbial Ecology Manual* 1.3.4.: 1–6. The Netherlands.
- Schleifer, K.H., Ludwig, W. & Amann, R. 1993. Nucleic acid probes In: Goodfellow, M. & A.G. O'Donnel (toim.). *Handbook of new bacterial systematics*, Ch. 13, P. 463–510. Cambridge.
- Suzuki, M.T. & S.J. Giovannoni 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625–630.
- Vaara, T., Vaara, M. & Niemelä, S.I. 1979. Two improved methods for obtaining axenic cultures of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1011–1014.
- Vanhala P., Ahtiainen J. 1994. Soil respiration, ATP content, and *Photobacterium* toxicity test as indicators of metal pollution in soil. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 9: 115–121.

- Vanhala, P., Fritze, H. & Neuvonen, S. 1996. Prolonged simulated acid rain treatment in the subarctic: Effect on the soil respiration rate and microbial biomass. *Biol Fertil Soils*. In press.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., & Lane, D.J.. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
- Virkamäki, T. 1989. Haapaveden kunnan ilmanlaatuselvitys. Ympäristöinstituutti. 31 s. II.
- Young, J.P.W., Downer, H.L. & Eardly, B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology.* 173: 2271–2277.

LIITE 1

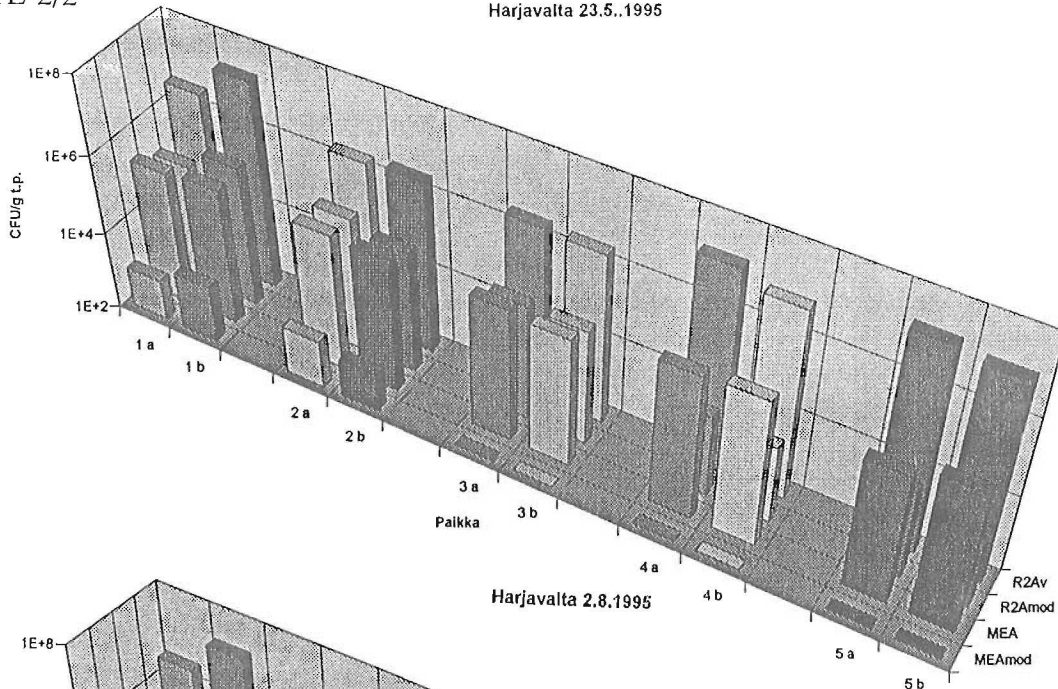
LIITE 1. API Zym -testien reaktiot.

Nro	mitattava entsyymi	substraatti	pH	tulos	
				positiivinen	negatiivinen
1	kontrolli			ei väriä tai näyteen oma väri	
2	alkaalinen fosfataasi	2-naftyylifosfaatti	8.5	violetti	Ei väriä tai kontrollikuopan kanssa yhtenevä väri, jos liuskaa ei ole pidetty valossa.
3	esteraasi (C 4)	2-naftyylibutyraatti	6.5	violetti	
4	lipaasi esteraasi (C 8)	2-naftyylikaprylaatti	7.5	violetti	
5	lipaasi	2-naftyyli-myristaatti	7.5	violetti	
6	leusiini-aryyliamidaasi	L-leusiini-2-naftyyliamidi	7.5	oranssi	
7	valiini-aryyliamidaasi	L-valiini-2-naftyyliamidi	7.5	oranssi	
8	kystiini-aryyliamidaasi	L-kystiini-2-naftyyliamidi	7.5	oranssi	
9	trypsiini	N-bentsoyyli-DL-arginiini-2-naftyyliamidi	8.5	oranssi	
10	kymotrypsiini	N-glutaryyli-fenyylialaniini-2-naftyyliamidi	7.5	oranssi	
11	hapan fosfataasi	2-naftyylifosfaatti	5.4	violetti	
12	naftoli-AS-BI-fosfohydrolaasi	naftoli-AS-BI-fosfaatti	5.4	sininen	Erittäin vaalean keltainen, jos liuskaa ei ole pidetty valossa.
13	α -galaktosidaasi	6-Br-2-naftyyli- α D-galaktopyranosidi	5.4	violetti	
14	β -galaktosidaasi	2-naftyyli- β -D-galaktopyranosidi	5.4	violetti	
15	β -glukuronidaasi	naftyyli-AS-BI- β D-glukuronidi	5.4	sininen	
16	α -glukosidaasi	2-naftyyli- α D-glukopyranosidi	5.4	violetti	
17	β -glukosidaasi	6-Br-2-naftyyli- β D-glukopyranosidi	5.4	violetti	
18	N-asetyyli- β -glukosaminidaasi	1-naftyyli-N-asetyyli- β D-glukosaminidi	5.4	ruskea	
19	α -mannosidaasi	6-Br-2-naftyyli- α D-mannopyranosidi	5.4	violetti	
20	α -fukosidaasi	2-naftyyli- α -L-fukopyranosidi	5.4	violetti	

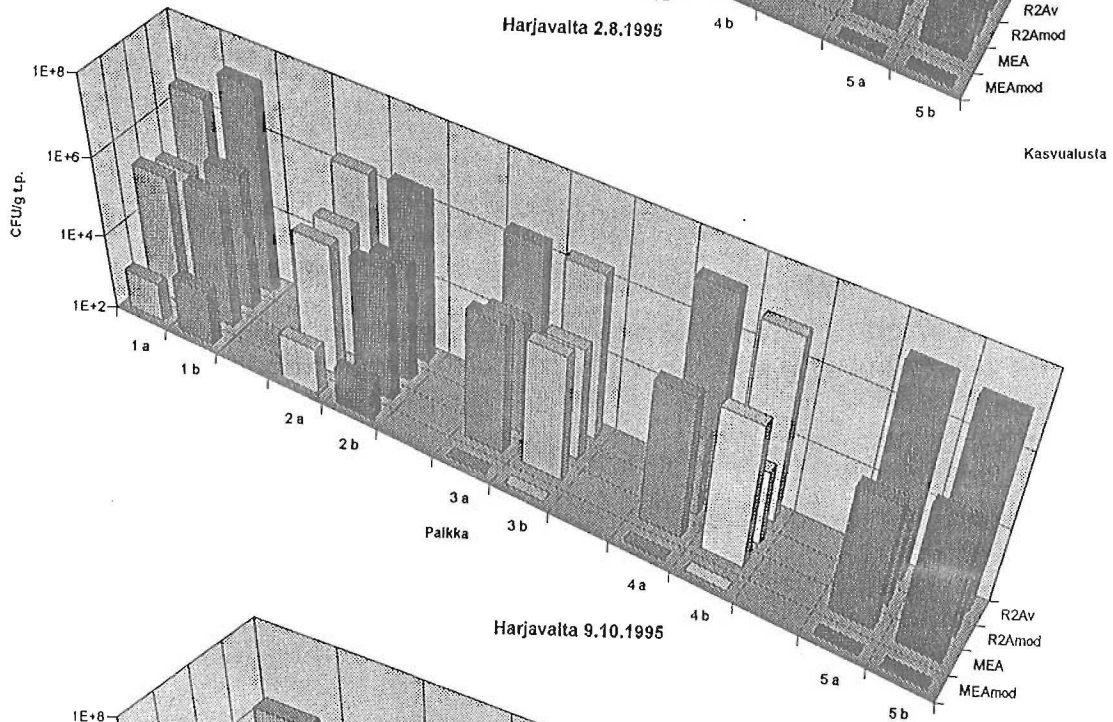
LIITE 2. Mikrobin pesäkeluvut eri havaintopaikoissa. Rinnakkaismääritysten (a ja b) tulokset on esitetty omina pylväinään.

LIITE 2/2

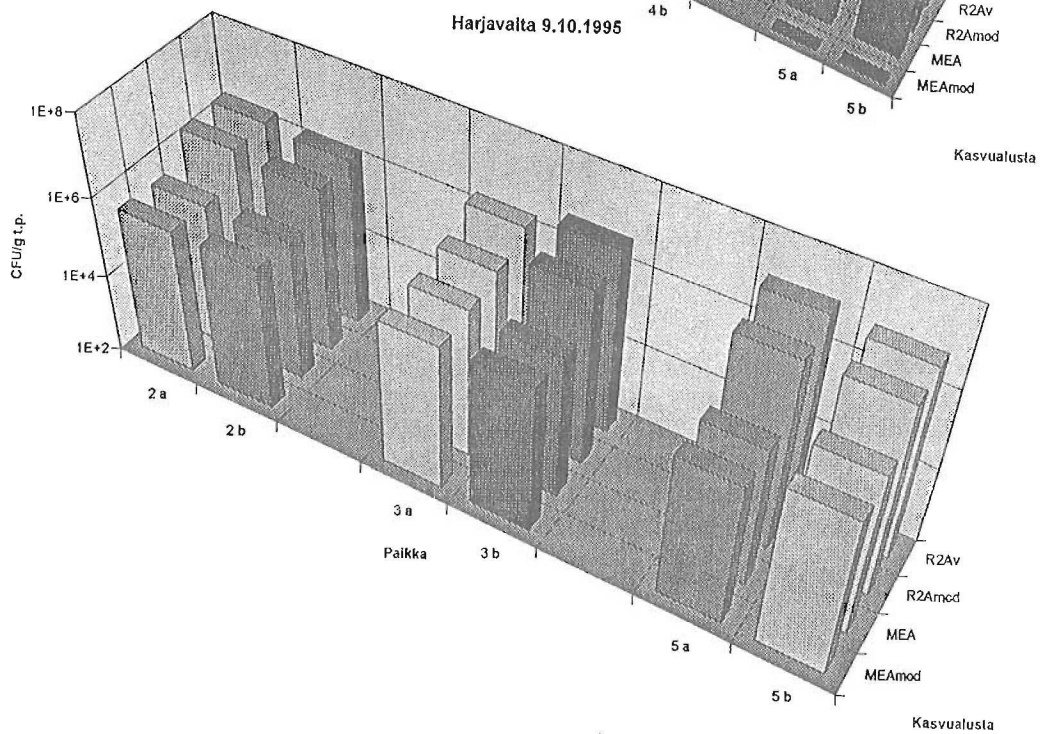
Harjavalta 23.5.1995

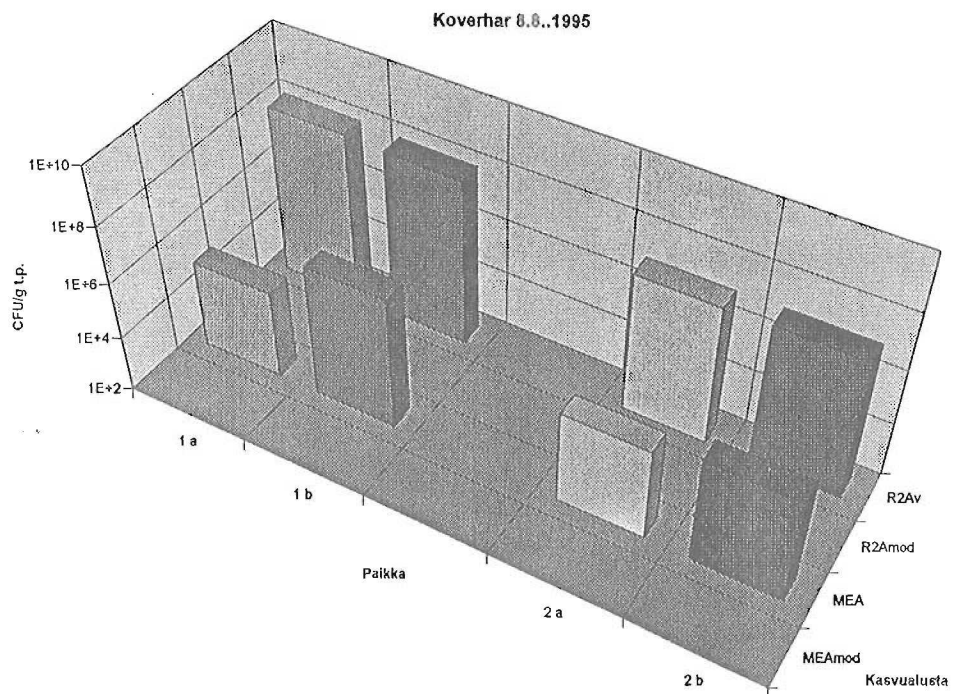
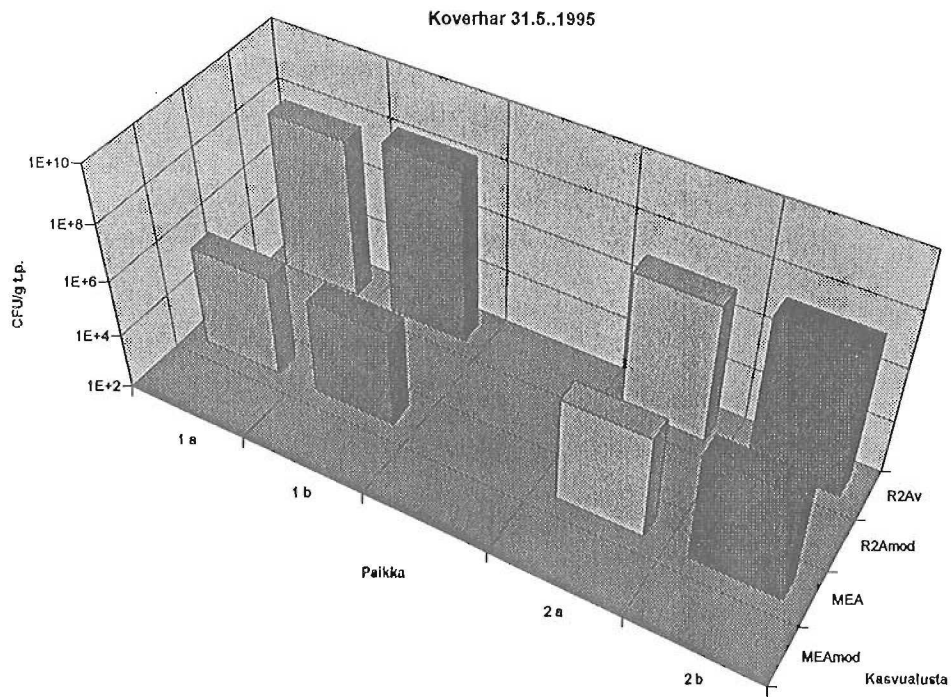


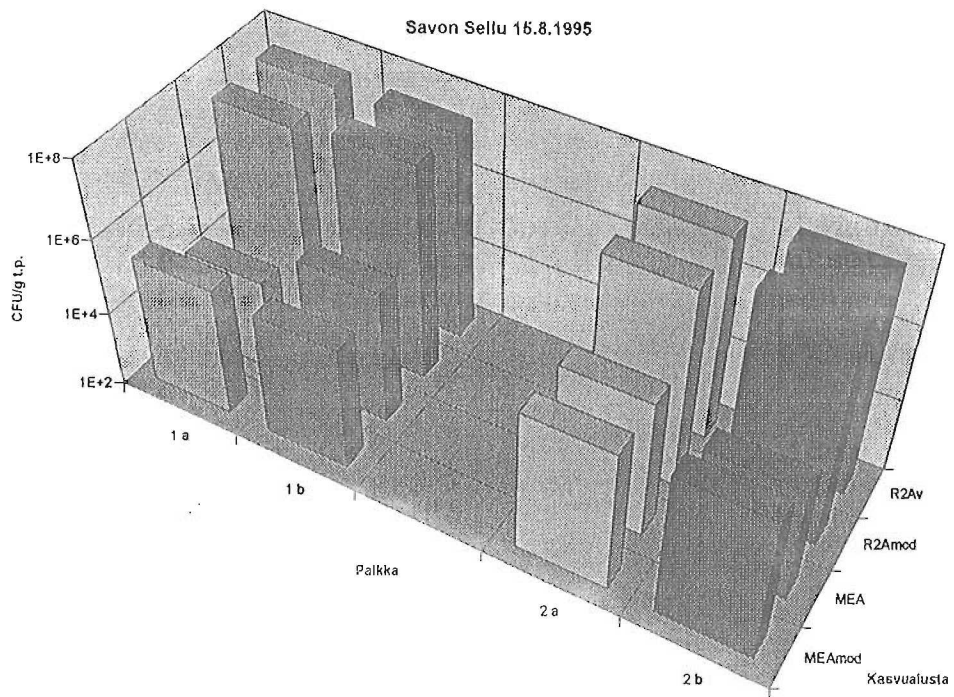
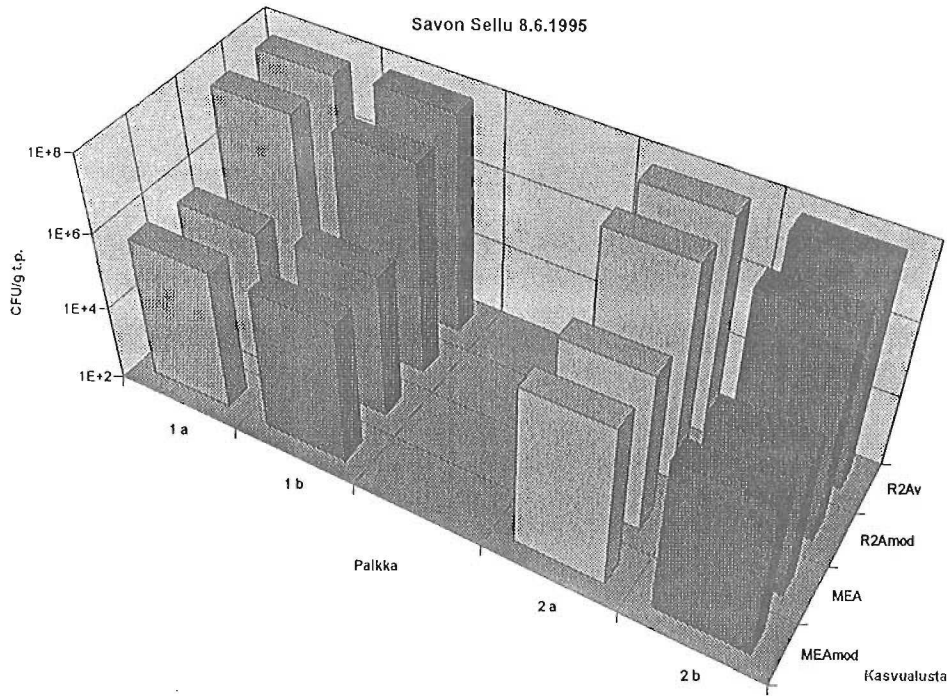
Harjavalta 2.8.1995

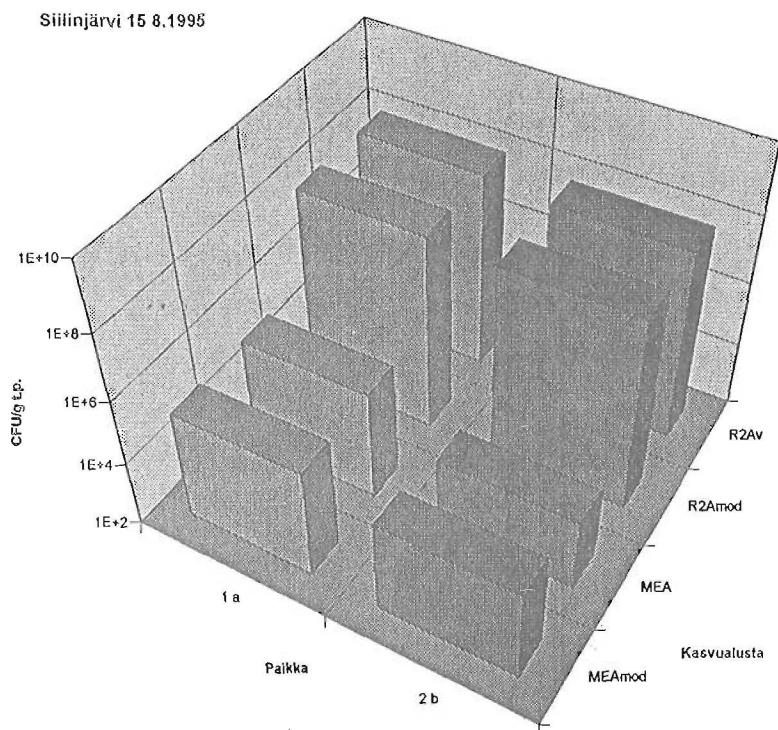
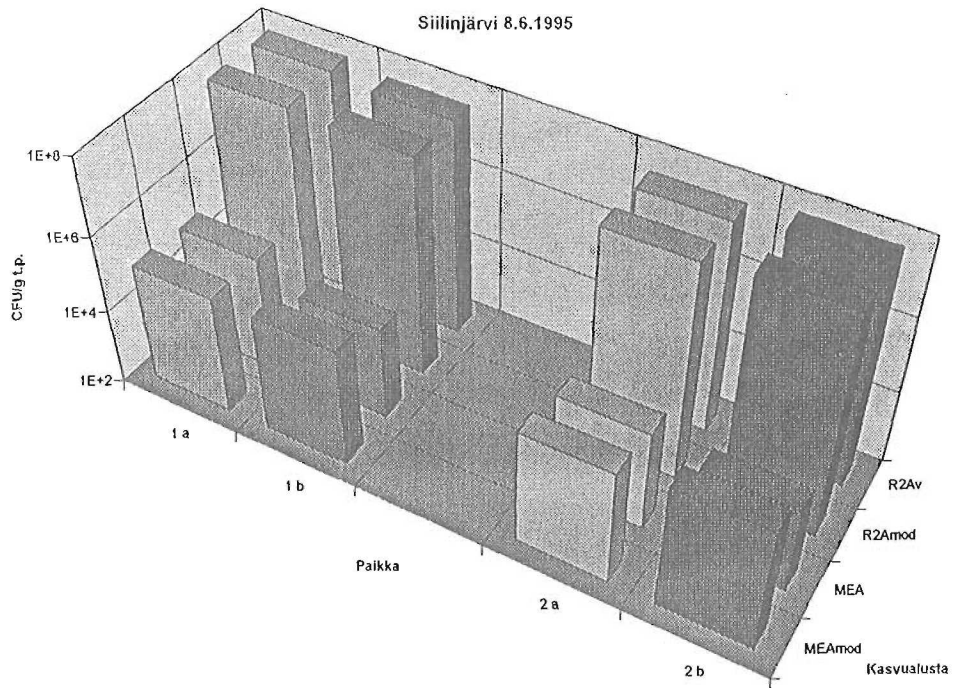


Harjavalta 9.10.1995









LIITE 2/6

