

## Muokausmenetelmien vaikutus maaperän mikrobistoon ja niiden tarjoamiin ekosysteemipalveluihin

Timo P. Sipilä<sup>1,2</sup>, Kim Yrjölä<sup>3</sup>, Laura Alakukku<sup>1</sup> ja Ansa Palojärvi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Maataloustieteiden laitos PL 28 00014 Helsingin yliopisto, timo.p.sipila@helsinki.fi, laura.alakukku@helsinki.fi

<sup>2</sup>MTT Kasvintuotannon tutkimus, 31600 Jokioinen, ansa.palojarvi@mtt.fi

<sup>3</sup>Biotieteiden laitos, PL 56 00014 Helsingin yliopisto, kim.yrjala@helsinki.fi

### Tiivistelmä

Maatalous kohtaa ilmastonmuutoksen myötä entistä suurempia ympäristöhaasteita. Eroosio- ja ravinnekuorma vesistöihin kasvaa, mikäli talvet muuttuvat ennustetulla tavalla lauhemmiksi ja sateisemmiksi. Kasvipeitteisyys suojaa maan pintaa vähentäen eroosio- ja ravinnehuuhtoumariskiä, mutta kasvinjäte voi vaikeuttaa viljelyä ja luoda suotuisat olosuhteet maa- ja kasvinjätelevinteisille kasvitaudeille. SUCCESS-projekti toteutettiin osana MTT:n Muuttuva ilmasto ja maatalous tutkimusohjelmaa (2009–2012) ja Helsingin yliopiston Globaalien ympäristömuutoksen tutkimusohjelmaa (2008–2011). Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää muokausmenetelmien vaikutusta maaperämikrobistoon ja sen tuottamiin ekosysteemipalveluihin, kuten tautimikrobien tukahduttamiskykyyn. Maanäytteenotto tehtiin kuudelta erilliseltä peltoalalta, joissa pitkäaikaisina (8–12 vuotta) muokkauksikäsitellyinä olivat suorakylvö ja kyntö. Kokoomanäytteet (vähintään 20 kairallista/ruutu) otettiin muokauskerroksesta ennen syyskyntöä kolmelta eri syvyydeltä 0–5, 5–10 ja 10–20 cm (2009). Näytteistä analysoitiin sieni- ja bakteerimikrobiryhmien koostumus kolmella eri menetelmällä; PLFA rasvahapposormenjälki, PCR T-RFLP DNA-sormenjälki ja 454 FLX Titanium DNA-pyrosekvensoinnilla (Roche Applied science). Samanaikaisesti mitattiin laboratoriotestien avulla mallikasvitautesien (punahome, *Fusarium culmorum*) kykyä kasvaa peltomaan päällä ja näin saatiin arvio maiden kasvitautesien tukahduttamiskyvystä. Peltoalojen maaperän vaihtelusta riippumatta ja kaikilla käytettyillä mikrobiryhmien kuvausmenetelmillä huomattiin, että suorakylvössä muodostuu selkeä syvyysgradientti mikrobiryhmien suhteisiin. Vastaavaa gradienttia ei havaittu kyntökäsittelyssä. Suorakylvöruutujen syvyysgradientissa korostuivat etenkin suurimpien maaperän bakteeripääjaksojen suhteelliset osuudet (acidobakteerit, proteobakteerit ja aktinobakteerit) sekä nitriittiä nitraatiksi happettava *Nitrospira* pääjakso (Parittainen t-testi, Suorakylvö 0–5 vs. 10–20 cm,  $P < 0,05$ ). Käsitelyvaikutuksia havaittiin bakteeripääjaksojen suhteellisissa osuuksissa kyntö- ja suorakylvöruutujen välillä etenkin 0–5 ja 10–20 cm syvyyksissä. Suuren mikrobi- ( $r = -0,7$   $P < 0,02$ ) ja sienibiomassan ( $r = -0,89$   $P < 0,001$ ) havaittiin hidastavan punahomeen kykyä kasvaa biotestissä maan pinnalla. Projektissa tuotettiin arvokasta tietoa viljelymaan mikrobiologiasta käyttäen uusimpia molekyylibiologian menetelmiä, mikä on uutta Suomessa ja jopa Euroopan mittakaavassa. Muokausmenetelmien vaikutus mikrobiryhmien suhteisiin osoitettiin peltojen välisellä analyysillä, mikä osoittaa että muokausmenetelmien valinnalla pystytään mahdollisesti vaikuttamaan maaperän mikrobiologisiin prosesseihin. Nämä ovat avainasemassa kun pyritään hyödyntämään maaperän ekosysteemipalveluita kasvipatogeenien torjunnassa ja ilmastonmuutoksen ehkäisyssä.

Asiasanat: Suorakylvö, Kyntö, Mikrobiryhmät, Sienet, Bakteerit, Molekyylibiologiset menetelmät, Sekvensointi, Fungistasis, *Fusarium culmorum*

## Johdanto

Maatalous kohtaa ilmastonmuutoksen myötä entistä suurempia ympäristöhaasteita. Eroosio- ja ravinnekuorma vesistöihin kasvaa, mikäli talvet muuttuvat ennustetulla tavalla lauhemmiksi ja sateisemmiksi. Kasvipeitteisyys suojaa maan pintaa vähentäen eroosio- ja ravinnehuuhtoumariskiä, mutta kasvinjäte voi vaikeuttaa viljelyä ja luoda suotuisat olosuhteet maa- ja kasvinjätelevinteisille kasvitaudeille. SUCCESS-projekti toteutettiin osana MTT:n Muuttuva ilmasto ja maatalous tutkimusohjelmaa (2009–2012) ja Helsingin yliopiston Globaalin ympäristömuutoksen tutkimusohjelmaa (2008–2011).

Maaperän mikro-organismit tarjoavat monia hyödyllisiä ekosysteemipalveluja mm. orgaanisen aineksen hajottaminen ja maaperän ravinteiden kiertokulun ylläpitäminen ovat pääasiallisesti mikrobien aktiivisuuden seurausta (Torsvik ja Ovreås, 2006). Mikrobit estävät myös kasvipatogeenien kasvua maaperässä ja vaikuttavat maaperän kasvitautien tukahduttamiskykyyn monilla mekanismeilla. Maaperän mikro-organismien yhteisöjen rakenne vaihtelee erilaisten maan fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien seurauksena siksi myös pellon muokkausmenetelmällä on vaikutusta mikrobiyhteisöihin. Tämä on kuitenkin osoitettu vain yksittäisen koepeltojen laajuisissa tutkimuksissa (Ceja-Navarro *et al.*, 2010; Vargas Gil *et al.*, 2011), jotka eivät ota huomioon peltojen välistä vaihtelua. Tärkeää olisi tietää vaikuttavatko muokkausmenetelmät ennustettavasti mikrobiyhteisöjen rakenteeseen peltojen välisestä vaihtelusta huolimatta, sillä muokkauspäätökset tehdään peltoalakohtaisesti. Muokkausmenetelmille ominaiset mikrobiyhteisöt mahdollistaisivat mikrobien välittämien ekosysteemipalveluiden optimoinnin valitsemalla ja kehittämällä maaperäbiologian huomioonottavia muokkausmenetelmiä. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää muokkausmenetelmien vaikutusta maaperämikrobistoon ja sen tuottamiin ekosysteemi-palveluihin, kuten tautimikrobien tukahduttamiskykyyn.

Maaperän mikrobiyhteisöjen kuvaamisen haasteena on mikrobien suuri monimuotoisuus ja lukumäärä: yksi gramma maata voi sisältää ainakin kymmenen miljardia mikrobisolua ja kymmeniätuhansia lajeja. Tämän monimuotoisuuden kuvaaminen on ollut haastavaa perinteisillä DNA-sormenjälkiin pohjautuvilla menetelmillä (Torsvik ja Ovreås, 2006). Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät mahdollistavat satojen tuhansien merkkigeenien sekvensoinnin maaperästä. Merkkigeenien sekvenssimuuntelun avulla voidaan kuvata mikrobiyhteisöjen rakenne (Sogin *et al.*, 2006). Tutkimus hyödynsi uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä ja kuvasi niiden avulla muokkausmenetelmien vaikutusta mikrobiyhteisöihin.

## Aineisto ja menetelmät

Maanäytteenotto tehtiin kuudelta erilliseltä peltoalalta, joissa pitkäaikaisina (8–12 vuotta) muokkauksittelyinä olivat suorakylvö ja kyntö. Peltoalat (1–3) sijaitsivat Jokioisissa, (4) Vihdissä, (5) Säkylässä ja (6) Ylistarossa. Peltoalat 1–4 olivat maannostyyppiä Vertic Cambisol ja alat 5–6 tyyppiä Eutric Regosols (FAO, 1988). Kokoomänäytteet (vähintään 20 kairallista/ruutu) otettiin muokkaukserroksesta ennen syyskyntöä kolmelta eri syvyydeltä 0–5, 5–10 ja 10–20 cm (2009).

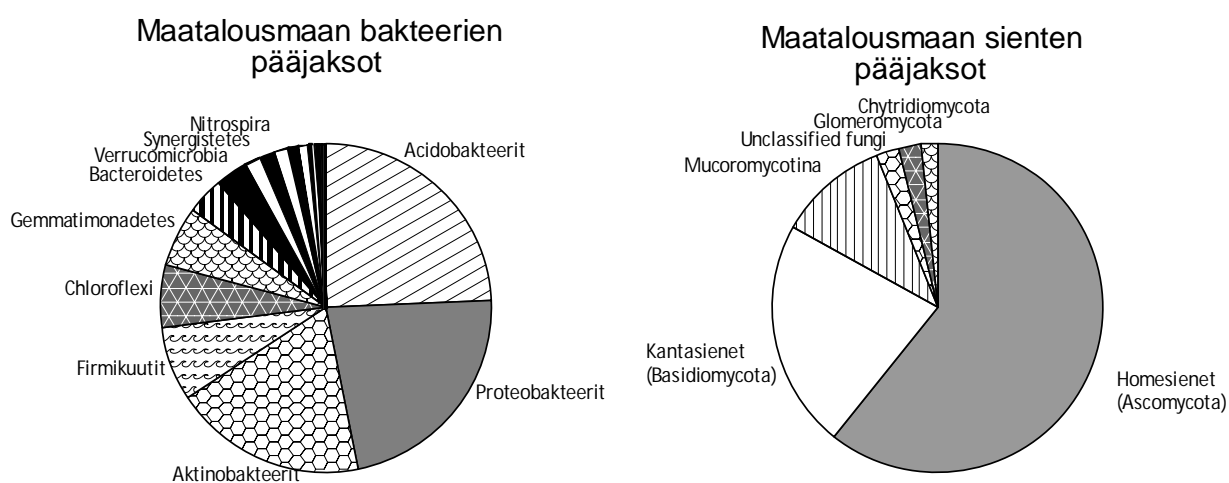
Maanäytteistä eristettiin DNA käyttämällä PowerSoil™ DNA Isolation Kit (Mo Bio laboratories, Inc USA). Eristetyn DNA:n laatua ja määrää mitattiin agaroosigeelielektroforeesin ja spektrofotometrin (NanoDrop 2000, Thermo scientific, USA) avulla. Näytteistä analysoitiin sieni- ja bakteerimikrobiyhteisöjen koostumus kolmella eri menetelmällä, PLFA rasvahapposormenjälki, PCR T-RFLP DNA-sormenjälki ja 454 FLX Titanium DNA-pyrosekvensoinnilla (Roche Applied science). Mikrobiyhteisöjen merkkigeenit monistettiin polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla. Sienten (ITS1-F ja ITS4) ja bakteerien (pA ja D<sup>+</sup>) monistamisessa käytetyt alukkeet ja menetelmät on julkaistu tutkimuksissa (Lane *et al.*, 1985; Edwards *et al.*, 1989; White *et al.*, 1990; Gardes ja Bruns, 1993). PLFA analyysi tehtiin Frostegård *et al.*, (1993) mukaan pienillä muutoksilla, jotka kuvattu julkaisussa Palojärvi (2006).

Laboratoriobiotestien avulla mitattiin miten maaperän mikrobiologiset ominaisuudet vaikuttavat mallikasvitautesien (punahome, *Fusarium culmorum*) kasvukykyyn ja näin saatiin arvio maiden kasvitautilien kasvun estokyvystä (fungistasis). Biotesti tehtiin julkaisun de Boer *et al.*, (1998) mukaan. Lyhyesti, biotestissä maat laimennettiin kuivapaino suhteessa (20/80) maata ja steriiliä montmorillonittiä.

Vesipitoisuus säädettiin 85% seoksen vedenpidätyskyvystä käyttämällä steriiliä vettä. Biotesti tehtiin petrimaljalla, johon punnitti 50 grammaa testimaaseosta. Maan päälle, petrimaljan keskelle, laitettiin steriili peitinlasi 2.2x2.2 cm. Peitinlasin päälle siirrostettiin *F. culmorum* patogeeniä PDA (potato dextrose agar) agarosipalassa 1.5 cm halkaisija. Petrimaljat suljettiin parafilmillä ja niitä inkuboitettiin kaksi viikkoa 25 °C, jonka jälkeen *F. culmorum* sienien kasvua mitattiin. Biotestit toistettiin kolmesti. Mitä pienempi kasvua oli sitä korkeampi on fungistasis tutkitussa maassa.

### Tulokset ja tulosten tarkastelu

Peltomaan bakteeriyhteisöjen yleisimmät pääjaksot olivat acidobakteerit (24%), proteobakteerit (22%) ja aktinobakteerit (19%) käsittäen 65% kaikista maaperän bakteeripääjaksoista. Sienien laajimmat pääjaksot maatalousmaassa olivat homesienet (61%) ja kantასienet (22%) (Kuva 1).



**Kuva 1.** Maatalousmaan bakteerien pääjaksosten suhteelliset osuudet (vasemmalla). Piirakkakuvio perustuu 34 näytteeseen syvyydeltä 0–20 cm, joista analysoitu 110823 16S rRNA merkkigeenisekvenssiä. Sekvenssit on tunnistettu sekvenssivertailun perusteella eri taksonomisiin pääjaksoihin. Maatalousmaan sienien pääjaksosten suhteelliset osuudet (oikealla). Piirakkakuvio perustuu 33 näytteeseen, syvyydeltä 0–20 cm, joista analysoitu 50936 ITS alue sekvenssiä. ITS sekvenssit on tunnistettu sekvenssivertailun perusteella eri sienien taksonomisiin pääjaksoihin.

Peltoalojen maaperän vaihtelusta riippumatta ja kaikilla käytetyillä mikrobiyhteisöjen kuvausmenetelmillä huomattiin, että suorakylvössä muodostuu selkeä syvyysgradientti mikrobiyhteisöihin. Vastaavaa gradienttia ei havaittu kyntökäsittelyssä. Suorakylvöruutujen syvyysgradientissa korostuivat etenkin suurimpien maaperän bakteeripääjaksosten suhteelliset osuudet (acidobakteerit, proteobakteerit ja aktinobakteerit) sekä nitriittia nitraatiksi hapettava *Nitrospira* pääjakso (Parittainen t-testi, Suorakylvö 0–5 vs. 10–20 cm,  $P < 0,05$ ). Proteobakteereita ja aktinobakteereita oli suhteellisesti enemmän pinnalla (0–5 cm) kuin syvemmissä näytteissä. Acidobakteeri ja *Nitrospira* pääjaksoja esiintyi taasen enemmän syvissä kerroksissa kuin pinnassa. Loiva gradientti oli havaittavissa myös sienipääjaksoissa, homesienien (Ascomycota) määrä oli korkeimmillaan suorakylvön pinnassa ja laski syvemmissä näytteissä. Vastakkaisesti kantასienet (Basidiomycota) lisääntyivät suorakylvö-käsittelyssä syvyyden suhteen.

Muokkausmenetelmä vaikutti myös bakteeripääjaksosten suhteellisiin osuuksiin kyntö- ja suorakylvökäsittelyjen välillä etenkin 0–5 ja 10–20 cm syvyyksissä (Taulukko 1). Proteobakteerien ja aktinobakteerien määrä oli korkeampi suorakylvö pinnassa (0–5 cm) kuin kyntökäsittelyssä. Chloroflexi pääjaksoa esiintyi taasen enemmän kynnössä kuin suorakylvössä. Syvyydellä 10–20 cm tulokset olivat proteobakteerien osalta käänteiset siellä kyntökäsittelystä löytyi enemmän proteobakteereita kuin

suorakylvöstä. Acidobakteerit dominoivat suorakylvön bakteeriyhteisöjä 10–20 cm syvyyden maanäytteisissä.

Sieniyhteisöissä peltoalojen välinen vaihtelu oli suurta ja varsinaisten käsittely erojen havaitseminen oli pääjaksotasolla hankalaa. Saman tapaiset sieniyhteisöt löydettiin Jokioisissa sijaitsevilta pelloilta (1–3) kun taas alojen (4–6) sieniyhteisöt poikkesivat toisistaan.

**Taulukko 1.** Muokkausmenetelmien vaikutus maaperän sienten ja bakteerien pääjaksojen suhteelliseen esiintymiseen syvyyksissä 0–5, 5–10 ja 10–20 cm. Tulokset ovat kuuden peltoalan käsittelyjen keskiarvoja. Keskihajonta on esitetty sulkeissa. Taulukoon on koottu bakteeri ja sieni pääjaksot, joiden välillä havaittiin merkitseviä eroja käsittelyiden suhteen.

Pääjakso	Suhteellinen osuus sekvenssikirjastossa (%)		Merkittävyys (Parittainen t-testi)
	Suorakylvö	Kyntö	
<i>Bakteerit</i>			
<b>Syvyys 0–5 cm</b>			
Proteobakteerit	26,87 (4,6)	23,34 (2,88)	o
Aktinobakteerit	21,00 (5,6)	19,30 (5,58)	*
Chloroflexi	4,61 (3,7)	8,06 (4,30)	*
<b>Syvyys 5–10 cm</b>			
Firmikuutit	8,47 (2,36)	6,96 (1,05)	o
<b>Syvyys 10–20 cm</b>			
Acidobakteerit	33,78 (5,93)	22,35 (6,15)	*
Proteobakteerit	19,13 (3,21)	24,55 (2,69)	*
Bakteroidetes	2,13 (0,52)	5,15 (1,65)	**
Verrucomicrobia	2,83 (0,52)	4,47 (0,94)	**
Nitrospira	2,43 (1,08)	1,06 (0,19)	*
Aquificae	0,21 (0,09)	0,32 (0,107)	o
<i>Sienet</i>			
<b>Syvyys 0–5 cm</b>			
-			
<b>Syvyys 5–10 cm</b>			
Kantasienet	25,01 (5,2)	22,75 (4,88)	o
<b>Syvyys 10–20 cm</b>			
-			

Merkittävyys: \*\*\*( $P < 0,001$ ), \*\*( $P < 0,01$ ), \*( $P < 0,05$ ) ja o( $P < 0,10$ ).

Tilastollisesti merkitsevää eroa ei saatu suorakylvö- ja kyntökäsittelyjen välille fungistasiksen voimakkuudessa. Mutta tulokset antavat viitteitä siitä että suorakylvön pintamaassa (0–10 cm) olisi suurempi fungistasis kuin kyntökäsittelyssä (Pelto 1, 2, 3 ja 5). Lisäksi suuren mikrobi- ( $r = -0,7$   $P < 0,02$ ) ja sienibiomassan ( $r = -0,89$   $P < 0,001$ ) havaittiin korreloivan negatiivisesti punahomeen kasvukyvyn kanssa. Pintakerroksen mikrobi- ja sienibiomassan on havaittu lisääntyvän suorakylvömuokkausmenetelmän pitkäkestoisien käytön seurauksena (Doran, 1980).

## Johtopäätökset

Projektissa tuotettiin arvokasta tietoa viljelymaan mikrobiologiasta käyttäen uusimpia molekyylibiologian menetelmiä, mikä on uutta Suomessa ja jopa Euroopan mittakaavassa. Muokkausmenetelmien vaikutus mikrobiyhteisöihin osoitettiin peltojen välisellä analyysillä, mikä osoittaa että muokkausmenetelmien valinnalla pystytään mahdollisesti vaikuttamaan maaperän mikrobiologisiin prosesseihin. Tutkimuksessa omaksuttu peltojen välinen vertailunäkökulma lisää myös tulosten yleistettävyyttä, mikä on tärkeää

mietittäessä tulosten käytännön sovellettavuutta. Erityisesti maaperän bakteerit osoittivat saman suuntaisia muutoksia muokkausmenetelmien suhteen, mikä helpottaa niiden ekosysteemipalveluiden hyödyntämistä. Tulokset viittaavat myös siihen että maan kokonaismikrobibiomassan (maan laatu) lisääminen voi ehkäistä maaperälevintäisten kasvitautien esiintymistä tehostamalla maan fungistasis ominaisuutta. Nämä ovat avainasemassa kun pyritään hyödyntämään maaperän ekosysteemipalveluita kasvipatogeenien torjunnassa ja ilmastonmuutoksen ehkäisyssä.

### **Kirjallisuus**

- Ceja-Navarro, JA., Rivera-Orduna, FN., Patino-Zuniga, L., Vila-Sanjurjo, A., Crossa, J., Govaerts, B. & Dendooven L.** 2010. Phylogenetic and Multivariate Analyses To Determine the Effects of Different Tillage and Residue Management Practices on Soil Bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol* 76: 3685-3691.
- De Boer, W., Gunnewiek, PJ. & Woldendorp J. W.** 1998. Suppression of hyphal growth of soil-borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Ammophila arenaria*. *New Phytol* 138: 107–116.
- Doran, JW.** 1980. Soil Microbial and Biochemical Changes Associated with Reduced Tillage. *Soil Sci Soc Am J* 44: 765-771.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, EC.** 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17: 7843-7853.
- FAO** 1988. FAO/Unesco Soil Map of the World. Revised Legend, with corrections. World Soil Resources Rep. 60, FAO, Rome. Reprinted Tech. Paper 20, ISRIC, Wageningen, 1994.
- Frostegård, Å., Tunlid, A. & Bååth E.** 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol* 59:3605–3617.
- Gardes, M. & Bruns, T.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.
- Lane, DJ., Pace, B., Olsen, GJ., Stahl, DA., Sogin, ML. & Pace, NR.** 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *P Natl Acad Sci USA* 82: 6955.
- Palojärvi A.** 2006. Phospholipid fatty acid (PLFA) analyses. Teoksessa: Bloem, J, Hopkins, DW, Benedetti, A. (Toim.), Microbiological methods for assessing soil quality. CABI Publishing Wallingford, 204-211 s.
- Sogin, ML., Morrison, HG., Huber, JA., Welch, DM., Huse, SM., Neal, PR. et al.** 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *P Natl Acad Sci USA* 103: 12115–12120.
- Torsvik, V. & Ovreås L.** 2006. Microbial phylogeny and diversity. Teoksessa: Modern Soil Microbiology. van Elsas, JD., Jansson, JK., Trevors, JT. (Toim.), CRC Press New York. 23-53 s.
- Vargas Gil, S., Meriles, J., Conforto, C., Basanta, M., Radl, V., Hagn, A. et al.** 2011. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *Eur J Soil Biol* 47: 55-60.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Teoksessa: Innis, MA., Gelfand, DH., Sninsky, JJ., White, TJ., (Toim.) PCR protocols A guide to methods and applications. Academic Press New York, 315-322 s.