

**Pro Gradu -tutkielma**

**Typensidonta ja siihen osallistuva mikrobiyhteisö soiden  
primäärisuknessiojatkumon rahkasammalissa**

**Maija Aarva**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Biologia

20.6.2011

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Biologia

AARVA, M. : Typensidonta ja siihen osallistuva mikrobiyhteisö soiden primäärisuknessiojatkumon rahkasammalissa

Pro Gradu -tutkielma: s. 40

Työn ohjaajat: Dos. Jari Haimi, Dos. Eeva-Stiina Tuittila, Dos. Tuula Larmola, FM Sanna Leppänen

Tarkastajat: Dos. Jari Haimi, FT Elisa Vallius

Kesäkuu 2011

---

Hakusanat: metanotrofit, primäärisuknessio, rahkasammalet, suo, typensidonta, typensitojamikrobit

## TIIVISTELMÄ

Rahkasammalet (*Sphagnum* spp.) ovat pohjoisten soiden valtalajeja, joiden rakenne ja toiminta vaikuttavat suoekosysteemin suknessioon. Turpeenmuodostuksen ansiosta pohjoisten seutujen rahkasammalvaltaisten soiden merkitys on suuri myös maailmanlaajuisessa hiilen kierrossa. Sammalten ylläpitämien kosteiden olojen ansiosta soilla elää monimuotoinen aineiden kiertoon osallistuva mikrobiyhteisö. Rahkasammalissa elävät metanotrofit tarjoavat rahkasammalille hiilen lähteen metaaninhapetuksessa (CH<sub>4</sub>) syntyvästä hiilidioksidista. Metaaninhapetuksen lisäksi metanotrofit voivat sitoa typpeä. Soilla elää myös muita bakteereja, joilla on edellytykset typensidontaan. Rahkasammalet voivat tarjota myös näille typensitojille mikrohabitaatin. Suknession edetessä turpeeseen kertyy hiilen lisäksi kasvien kasvuun tarvitsemaa typpeä. Turvekerros eristää suknession aikana suon pinnan mineraalimaasta, eivätkä kasvit saa typpeä kuin laskeumana. Tutkimuksemme tavoitteena olikin selvittää rahkasammalten merkitystä biologisessa ilmakehän typensidonnassa (N<sub>2</sub>). Tutkimme myös typensidonnan ja siihen osallistuvan mikrobiyhteisön muutosta suknession edetessä sekä metaaninhapetuksen ja typensidonnan välistä yhteyttä. Tutkimus tehtiin Pohjanlahden maankohoamisrannikolla kehittyneellä luonnontilaisella suoekosysteemien aikasarjalla. Typensidonnan ja metaaninhapetuksen selvittämisessä käytettiin vakaisiin isotooppeihin perustuvaa menetelmää, jossa rahkasammalia inkuboitiin leimattuja <sup>15</sup>N<sub>2</sub> - ja <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> -kaasuja sisältävissä lasipulloissa 2 vrk *in situ*. Typensidontaan mahdollisesti osallistuvien mikrobiryhmien selvittämiseksi käsittelyt toistettiin valossa ja pimeässä. Tulosten perusteella suknessiovaiheet eivät eronneet toisistaan typensidonnassa. Typensidonta oli kuitenkin suurinta mesotrofisella sarasuolla *S. platyphyllum* -näytteissä, 2,7 μmol N g<sup>-1</sup> sammalbiomassaa d<sup>-1</sup>. Typensidontaan osallistuivat mahdollisesti sinibakteerit, metanotrofit ja muut heterotrofiset bakteerit. Metaaninhapetuksen ja typensidonnan välillä havaittiin yhteys, mikä vahvistaa metanotrofien sitovan myös typpeä. Ympäristökijöistä vedenpinnan taso vaikutti typensidontaan ja metaaninhapetukseen. Metaaninhapetukseen vaikutti lisäksi suoveden pH ja metaanipitoisuus. Lisää tutkimusta tarvitaan, jotta voidaan selittää tarkemmin typensitojien aktiivisuuden vaihtelua suknessiojatkumolla. Typensidonnan ja metaaninhapetuksen välisen yhteyden merkitys maailmanlaajuisessa hiilenkierrossa vaatii myös lisää perehtymistä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
 Department of Biological and Environmental Science  
 Biology

AARVA, M. : Nitrogen fixation and nitrogen fixing organisms in *Sphagnum* mosses along mire primary succession-gradient

Master of Science Thesis: p. 40

Supervisors: PhD. Jari Haimi, PhD. Eeva-Stiina Tuittila, PhD. Tuula Larmola, MSc. Sanna Leppänen

Inspectors: PhD. Jari Haimi, PhD. Elisa Vallius

June 2011

---

Key Words: diazotrophs, methanotrophs, mire, nitrogen fixation, primary succession, *Sphagnum*

## ABSTRACT

*Sphagnum* mosses are abundant in northern mire ecosystems. Peat accumulation leads to successional changes in the ecosystem and has an effect on the global carbon cycle. *Sphagnum* mosses also sustain high water table which provides moist conditions to diverse micro-organisms mediating element cycles. Methanotrophic microbes inhabiting *Sphagnum* provide the moss with carbon dioxide which is a by-product of their methane (CH<sub>4</sub>) oxidizing activity. Methanotrophs are also capable of biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation. *Sphagnum* could be a microhabitat to other nitrogen fixing microbes, diazotrophs, as well. During mire succession peat layer thickens and isolates plants from the mineral groundwater. Besides carbon, also nitrogen that is essential for the plants growth accumulates in peat. Our aim was to study the importance of *Sphagnum* in biological fixation of the atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>). In addition we studied the change of nitrogen fixation and diazotrophs during mire succession. We were also interested to know if there was a correlation between methanotrophy and nitrogen fixation. Nitrogen fixation was measured along a pristine mire chronosequence on the land uplift coast of the Bay of Bothnia in the western coast of Finland. Stable isotope technique was used to study nitrogen fixation and methane consumption in *Sphagnum* mosses. Moss samples were incubated in glass bottles with labeled <sup>15</sup>N<sub>2</sub>- and <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>-gases for 2 days *in situ*. To reveal the microbes responsible for the nitrogen fixation bottles were incubated both light and dark conditions. Our results showed no statistical differences between the successional stages. However, the highest nitrogen fixation rate was measured in mesotrophic fen, 2,7 μmol N g<sup>-1</sup> dry weight d<sup>-1</sup> in *S. platyphyllum*. Based on our results, the main nitrogen fixing groups were possibly cyanobacteria, methanotrophs and other heterotrophic bacteria. The correlation between nitrogen fixation and methane oxidation showed that methanotrophs contributed to nitrogen fixation. Water level was the key environmental factor regulating nitrogen fixation and methanotrophy in *Sphagnum*. Methanotrophy was also affected by the acidity and methane concentration of pore water. More research is still needed to understand variation in the activity of the nitrogen fixing organisms along succession gradient. It is also important to study further the importance of the nitrogen fixation and methane oxidation connection in global carbon cycle.

## Sisältö

<b>1. JOHDANTO</b> .....	<b>5</b>
<b>2. TYPENSIDONTA SUKKESSIOJATKUMOLLA</b> .....	<b>6</b>
2.1. Boreaalisten soiden sukkeasio .....	6
2.2. Rahkasammalet soiden valtalajeina.....	7
2.3. Biologinen typensidonta rahkasammalissa .....	7
2.4. Typenkierto suoekosysteemissä .....	9
2.5. Typen merkitys suoekosysteemin hiilitaseessa .....	10
<b>3. AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>11</b>
3.1. Tutkimusalue .....	11
3.2. Tutkimusasetelma.....	11
3.2.1. Sukkeasiojatkumo .....	11
3.2.2. Sukkeasiovaiheiden erityispiirteet .....	12
3.2.3. Isotooppimenetelmä.....	13
3.2.4. Kaasu- ja vesinäytteet .....	15
3.2.5. Typen määrän laskeminen .....	16
3.3. Tilastolliset analyysimenetelmät .....	17
<b>4. TULOKSET</b> .....	<b>17</b>
4.1. Typensidonta primäärisukkeasiojatkumolla .....	17
4.2. Metaaninhapetus primäärisukkeasiojatkumolla .....	19
4.3. Mikrobiyhteisön erot primäärisukkeasiojatkumolla.....	21
4.4. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen vaikuttavat ympäristötekijät .....	24
<b>5. TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>28</b>
5.1. Typensidonta primäärisukkeasiojatkumolla .....	28
5.2. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen osallistuva mikrobiyhteisö.....	30
5.3. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen vaikuttavat ympäristötekijät .....	32
5.4. Typensidontan merkitys primäärisukkeasiojatkumolla .....	33
5.5. Otoksoon riittävyys ja muut mahdolliset virhelähteet.....	33
<b>JOHTOPÄÄTÖKSET</b> .....	<b>35</b>
<b>Kiitokset</b> .....	<b>35</b>
<b>Kirjallisuus</b> .....	<b>36</b>

## 1. JOHDANTO

Suot ovat planeettamme tärkeimpiä hiilivarastoja (Rydin & Jeglum 2006, Limpens ym. 2008). Soilla biomassan tuotanto on suurempaa kuin hajotustoiminta, ja soihin kertyy hiiltä turpeen muodossa. Soihin onkin sitoutuneena kolmasosa maailman hiilestä, vaikka ne peittävät vain 3 % maapallon pinta-alasta. Globaalissa hiilen kierrossa etenkin pohjoisten seutujen rahkasammalvaltaisten suoekosysteemien ekologinen merkitys on suuri (Gorham 1991).

Rahkasammalet (*Sphagnum* spp.) ovat pohjoisten soiden valtalajeja, joiden ekologia vaikuttaa suoekosysteemien sukkessioon (Clymo & Hayward 1982, Rydin & Jeglum 2006). Sukkession aikana kasvava turvekerros eristää suon pintakasvillisuuden mineraalimaasta (Laine & Vasander 1996a). Suo kehittyy pohjavesiravinteisesta minerotrofisesta suosta kohti niukkaravinteista ombrotrofista suota. Rahkasammalet ylläpitävät lisäksi suolla korkeaa vedenpinnan tasoa, minkä ansiosta suolla vallitsevat monimuotoiselle mikrobiyhteisölle suotuisat kosteat olosuhteet (Golovchenko ym. 2007). Rahkasammalten rahkasolukoissa, pinnalla ja välittömässä lähiympäristössä onkin havaittu elävän erilaisia mikrobeja (Granhall & Hofsten 1976, Opelt ym. 2007). Viime aikoina on osoitettu, että rahkasammalet ovat myös metaaninhapetuksesta vastaavien heterotrofisten bakteerien, metanotrofien mikrohabitaatti (Basiliko ym. 2004, Raghoebarsing ym. 2005).

Metanotrofien metaaninhapetustoiminta vaikuttaa maailmanlaajuiseen hiilenkiertoon (Raghoebarsing ym. 2005, Kip ym. 2010). Metanogeenit, arkit tuottavat metaania suon hapettomissa olosuhteissa tapahtuvan hajotuksen yhteydessä (Rydin & Jeglum 2006). Metanotrofit vähentävät tätä suosta vapautuvaa metaanikaasua käyttämällä sitä energian ja hiilen lähteenään. Metanotrofien avulla osa metaanin hiilestä sitoutuu takaisin rahkasammalten biomassaan (Raghoebarsing ym. 2005, Kip ym. 2010, Larmola ym. 2010). Metanotrofien aktiivisuus kuitenkin vaihtelee ympäristöolojen mukaan.

Typen saatavuus on yksi metaaninhapetukseen vaikuttavista tekijöistä (Bodelier & Laanbroek 2004). Riisipelloilla ammonium-typen lisän on havaittu lisäävän metaaninhapettajien määrää ja aktiivisuutta vähentäen siten mahdollisesti metaanipäästöjä (Bodelier ym. 2000). Biologinen typensidonta voi olla merkittävä typen lähde silloin, kun tyyppiä on muuten vähän saatavilla (Gerdol ym. 2006). Rahkasammalten pinnalla, solukoissa ja välittömässä lähiympäristössä elää myös mikrobeja, joista osalla on fysiologiset edellytykset typensidontaan (Granhall & Hofsten 1976, Opelt ym. 2007). Omavaraiset sinibakteerit ja toisenvaraiset eli heterotrofiset bakteerit voivat sitoa ilmakehän tyyppiä (N<sub>2</sub>) kasveille käyttökelpoiseen muotoon, ammonium-ioneiksi ja nitraateiksi. Rahkasammalten ja typensitojien symbioosista on saatu viitteitä jo vuosikymmeniä sitten (Granhall & Selander 1973, Basilier & Granhall 1978, Basilier 1980). Myös metanotrofien tiedetään sitovan tyyppiä (Davis ym. 1964). Metanotrofien ja muiden typensitojien aktiivisuus voi vaikuttaa metaaninhapetuksen kautta ekosysteemin hiilen kiertoon.

Sukkessiojatkumot tarjoavat mahdollisuuden tutkia, miten sukkession aikana muuttuvat tekijät vaikuttavat aineiden kiertoon liittyviin mikrobivälitteisiin prosesseihin ekosysteemissä. Typensidonnasta ja siihen osallistuvista mikrobeista ei ole kuitenkaan vielä tutkimustietoa soiden sukkessiojatkumolta. Ekosysteemin hiilen ja typenkiertoon liittyvät prosessit, metaaninhapetus ja typensidonta voivat liittyä mahdollisesti yhteen rahkasammalissa elävien mikrobien välityksellä. Typensidonnasta sekä typensidonnan ja metaaninhapetuksen yhteydestä tarvitaan kuitenkin lisää tutkimustietoa.

Suurin osa Suomen suoalasta on syntynyt metsämaan soistuessa, mutta soita on muodostunut myös mannerjään ja vesistöjen alta paljastuneille alueille. Pohjanlahden rannikolla jääkauden jälkeinen maankohoaminen on synnyttänyt havumetsävyöhykkeen suoekosysteemien aikasarjan (Leppälä ym. 2008). Primäärisuknessiojatkumolla on nähtävissä kehityskulku nuorista minerotrofisista sarasoista kohti ombrotrofisia rahkasammalvaltaisia soita rannikolta sisämaahan siirryttäessä. Tämä luonnontilainen suknessiojatkumo tarjoaa tilaisuuden tutkia suoekosysteemin rahkasammalten typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa tapahtuvia muutoksia suknession edetessä.

Tutkimuksen tavoitteena on vastata typen leimaamiseen perustuvan menetelmän avulla seuraaviin kysymyksiin:

- 1) Onko rahkasammalten typensidonnassa eroja suknessiovaiheiden välillä?
- 2) Millainen on typensidontaan mahdollisesti osallistuva mikrobiyhteisö eri suknessiovaiheissa?
- 3) Onko typensidonnalla ja metaaninhapetuksella yhteys?
- 4) Mitkä ovat typensidontaan ja metaaninhapetukseen keskeisesti vaikuttavat ympäristötekijät?

## **2. TYPENSIDONTA SUKNESSIOJATKUMOLLA**

### **2.1. Boreaalisten soiden suknessio**

Suknessio on yksi vanhimmista kasviekologian käsitteistä (Rydin & Jeglum 2006). Tirrin ym. (2001) mukaan suknessio kuvaa populaation, eliöyhteisön tai ekosysteemin ajallista muutosta tietyssä paikassa. Suknessio jaetaan syntyvän mukaan primääri- ja sekundäärisuknessioon. Primäärisuknessio käynnistyy alueilla, joilla ei ole aikaisemmin ollut kasvillisuutta. Suomessa primäärisuknessioon johtaa yleisesti jääkauden jälkeinen maankohoaminen eli orgaanisesta aineesta vapaan mineraalimaan paljastuminen (Rydin & Jeglum 2006, Salonen 2006). Voimakkainta maankohoaminen on läntisillä Pohjanlahden rannikkoalueilla (Ekman 1996). Paljastuneen alueen fyysiset ominaisuudet kuten tasaisuus, loiva kaltevuus ja painanteet yhdessä kokonaishaihdunnan ylittävän sadannan kanssa luovat suokasvillisuuden ja suon kehittymiselle otolliset olosuhteet (Eurola ym. 1995, Rydin & Jeglum 2006, Salonen 2006). Ensimmäiset makroskooppiset yhteyttävät kasvit ovat usein jäkälä ja sammalia, jotka leviävät paljastuneelle alueelle itiöinä tuulen mukana (Campbell & Reece 2005). Suokasvillisuus valtaa pian veden alta paljastuneen maan (Joensuu 2004). Sekundäärisuknessiota puolestaan esiintyy alueilla, joilta aikaisempi kasvillisuus on hävinnyt tai tuhoutunut.

Suknession kehityskulut ovat lisäksi autogeenisia ja allogeenisia. Autogeenista suknessiota ohjaavat alueen omien ympäristötekijöiden muutokset, kun taas allogeenisessa suknessiossa alueen ominaisuuksia muovaavat ulkopuoliset tekijät (Rydin & Jeglum 2006). Soilla merkittävin autogeeninen prosessi on turpeen kertyminen. Allogeeniset kehityskulut liittyvät usein ilmastoon ja suon hydrologiaan (Bunting & Warner 1998). Autogeenisten ja allogeenisten tekijöiden osuus voi lisäksi vaihdella suknession edetessä.

Soiden suknessiolle tyypillistä on vaiheittainen siirtymä minerotrofiasta ombrotrofiaan (Laine & Vasander 1996a, Rydin & Jeglum 2006). Minerotrofisille soille kulkeutuu vettä ja ravinteita pohjaveden mukana. Minerotrofiset suot jaotellaan vielä ravinteisuuden perusteella kolmeen alaluokkaan, eu- meso- ja oligotrofisiin soihin, joista

eutrofinen suo on ravinteisin. Ombrotrofinen suo saa kaikki ravinteensa, myös typen lähes yksinomaan sadeveden mukana. Muutos näkyy myös suon kasvillisuudessa (Klinger & Short 1996). Nuorille soille tyypilliset ruohot ja sarat korvautuvat vähitellen rahkasammalvaltaisten soiden varvuilla. Sukkession edetessä rahkasammalmaton peittävyys kasvaa, lajistollinen monimuotoisuus laskee, mätäs-painannepintavaihtelu lisääntyy ja suo happamoituu (Rydin & Jeglum 2006, Leppälä ym. 2008).

## 2.2. Rahkasammalet soiden valtalajeina

Rahkasammalet ovat tärkeimpiä turpeenmuodostajia ja siten vastaavat suurimmasta osasta sukcession aikana tapahtuvista autogeenisistä muutoksista (Rydin & Jeglum 2006). Fysiologiansa ja ekologiensa ansiosta niillä on moniulotteisia vaikutuksia ympäristöönsä (Clymo & Hayward 1982, van Breemen 1995, Laine & Vasander 1996a, Turetsky 2003, Rydin & Jeglum 2006). Rahkasammalten menestys perustuu niiden biologisiin ominaisuuksiin. Ne ovat sopeutuneet niukkaravinteiseen ympäristöön ja sietävät hyvin happamia ja märkiä olosuhteita. Rahkasammalet myös edistävät kasvulle otollisten ympäristön fyysisten ja kemiallisten ominaisuuksien syntyä. Yksi merkittävimmistä ominaisuuksista on rahkasammalten kyky johtaa vettä kapillaarisen verkostonsa avulla. Lisäksi niillä on kyky pidättää vettä kuolleissa rahkasolukoissa ja lehtien välissä. Näiden ominaisuuksiensa avulla rahkasammalet voivat pitää yllä korkeaa vedenpinnan tasoa suolla. Tämä puolestaan johtaa hapettomien olojen syntymisen ja hajoamistoiminnan hidastumisen kautta turpeen kertymiseen. Rahkasammalet tuottavat myös orgaanisia happoja, mikä johtaa ympäristön luonnolliseen happamoitumiseen. Sukkession edetessä tapahtuu muutoksia myös rahkasammallajistossa (Glime 2007, Leppälä ym. 2008, Laine ym. 2011).

Vaikka rahkasammalet voivat elää niukkaravinteisessa ympäristössä, nekin tarvitsevat ravinteita ja hivenaineita kasvuun (Rydin & Jeglum 2006). Typpi on yksi niiden kasvua eniten rajoittavista tekijöistä. Sammalille onkin kehittynyt erilaisia tapoja hankkia ravinteita. Ravinteiden hankkimiseen liittyvien sopeumien merkitys korostuu niukkaravinteisella ombrotrofisella suolla (Rydin & Jeglum 2006, Glime 2007). Osan tyyppistä sammalet saavat laskeumana. Rahkasammalet siirtävät lisäksi orgaanisia typpimolekyylejä kuolevista ja kuolleista solukoista kohti kärkisilmua (Brown 1982). Aminohappojen lisäksi hajoavan orgaanisen aineen muut typpipitoiset molekyylit kuten nukleiinihapot ovat sammalten hyödynnettävissä (Glime 2007). Rahkasammalten on kuitenkin saatava tarpeeksi typpeä ammonium-ioneina ( $\text{NH}_4^+$ ), jotta kasvu voi olla tasapainoista (Glime 2006). Ombrotrofisissa suoekosysteemeissä biologinen typensidonta saattaa toimia merkittävänä lisätypen lähteenä (Granhall & Selander 1973, Gerdol ym. 2006). Typensidonnan lisäksi mikrobit vapauttavat typpeä sammalten käyttöön hajottamalla orgaanista ainetta epäorgaanisiksi typpiyhdisteiksi (Gerdol ym. 2006, Rydin & Jeglum 2006).

## 2.3. Biologinen typensidonta rahkasammalissa

Sammalten ylläpitämien kosteiden olojen ansiosta soilla elää monimuotoinen mikrobiyhteisö (Golovchenko ym. 2007). Näihin mikrobeihin kuuluu useita bakteereja, joilla on *nifH*-geeni. Tämän geenin avulla bakteerit voivat tuottaa typensidonnassa tarvittavaa nitrogeenaasientsyymiä (Opelt ym. 2007). Biologisessa typensidonnassa mikrobit muuttavat ilmakehän typpeä ( $\text{N}_2$ ) kasveille käyttökelpoisempaan muotoon, orgaanisiksi ammonium-ioneiksi ( $\text{NH}_4^+$ ) ja nitraateiksi ( $\text{NO}_3^-$ ) (Glime 2007). Typensidonta

tapahtuu hapettomissa oloissa nitrogenaasientsyymin avulla. Mikrobin sitoma typpi vapautuu lopulta niiden lähiympäristöön muiden eliöiden käytettäväksi.

Merkittävimpiä typensidontaan osallistuvia mikrobiryhmiä ovat autotrofiset eli omavaraiset sinibakteerit, mm. *Nostoc* ja *Anabaena*, joiden erikoistuneet solut, heterokystit, tarjoavat nitrogenaasientsyymin toiminnalle sopivan hapettoman ympäristön (Glime 2006). Typensidontaan osallistuvat myös heterotrofit (Basilier 1980, Glime 2006). Typensidonta on runsaasti energiaa vaativa prosessi. Energiaa tarvitaan kahden typpiatomien välisen kolmoissidoksen hajottamiseen (Haaker & Klugkist 1987, Galloway ym. 2004). Sinibakteerit saavat sidontaan tarvittavan energian yhteyttämistään hiiliyhdisteistä, mutta heterotrofit tarvitsevat ulkopuolisen hiilen lähteen. Metanotrofit voivat käyttää typensidonnassa energianlähteenään metanogeenien tuottamaa metaanikaasua (Auman ym. 2001, Rydin & Jørgensen 2006). Osasta metanotrofeja on myös löydetty *nifH*-geeni (Auman ym. 2001).

Typensidontaan kykenevät bakteerit voivat elää suossa vapaina tai rahkasammaliin kiinnittyneinä (Granhall & Selander 1973, Granhall & Hofsten 1976, Basilier 1980). Typensitojista mm. sinibakteereita ja metanotrofeja on löydetty rahkasammalten pinnan lisäksi sammalten rahkasoluista (Granhall & Hofsten 1976, Basilier 1980, Raghoebarsing ym. 2005, Opelt ym. 2007). Metanotrofien on havaittu tarjoavan rahkasammalille hiilen lähteen metaaninhapetuksen sivutuotteena syntyvästä hiilidioksidista. On kuitenkin vielä epäselvää onko sammalten ja metanotrofin suhde symbioottinen (Chen & Murrell 2010). Typeä sitovien sinibakteerien ja rahkasammalten symbioottisesta suhteesta on saatu viitteitä jo aiemmin (Granhall & Selander 1973). Myös Basilier (1980) havaitsi, että sammalten epifyyttisten sinibakteerien typensidonta oli suurempaa kuin samassa ympäristössä vapaana elävillä sinibakteereilla. Rahkasammalten elävissä osissa sidonnan on lisäksi havaittu olevan aktiivisempaa kuin kuolleissa osissa (Basilier & Granhall 1978). Symbioosista on saatu näyttöä myös sinibakteerien ja seinäsammalten (*Pleurozium schreberi*) välillä. Zackrisson ym. (2004) havaitsivat, ettei maljoilla kasvatettujen sinibakteerien typensidonta yltänyt samalle tasolle kuin seinäsammalten epifyyttisten sinibakteerien.

Typensidontaprosessiin voi liittyä myös mikrobien välisiä monimuotoisia vuorovaikutussuhteita. Sinibakteerien ja heterotrofien välisestä symbioosista rahkasammalten rahkasolukoissa on saatu viitteitä jo 1970-luvulla (Granhall & Selander 1973, Granhall & Hofsten 1976). Tässä symbioottisessa prosessissa sinibakteerien sitomaa typeä käyttävät heterotrofiset bakteerit stimuloivat hengityksessä tuottamansa hiilidioksidin avulla vastavuoroisesti sinibakteerien typensidontaa. Sinibakteerien ja heterotrofien symbioosista on havaintoja myös muista elinympäristöistä. Vesiympäristössä *Anabaena*-sinilevien heterokystien pinnalla elävien heterotrofien havaittiin lisäävän nitrogenaasientsyymin aktiivisuutta (Paerl 1987).

Soilla typensidontaan osallistuvan mikrobisyhteisön koostumuksesta tiedetään vasta vähän (Kravchenko & Doroshenko 2003, Opelt ym. 2007, Zadorina ym. 2009). Opelt ym. (2007) osoittivat rahkasammalten pinnalla ja solukoissa elävän bakteerisyhteisön lajistoltaan ja toiminnaltaan monimuotoiseksi. He havaitsivat eroja mikrobisyhteisössä ja sen koostumuksessa sammalten pinnalla ja soluissa tutkimuksen mallilajien (*Sphagnum magellanicum*, *S. fallax*) välillä. Erot johtuivat joko lajien erilaisista elinympäristöistä tai lajien fysiologisista ja kemiallisista eroista. Erityisesti typensidontaan kykenevät bakteerit olivat monimuotoisempia kummankin lajin sisällä kuin pinnalla.

Myös ympäristön olosuhteet ja niiden vaihtelu vaikuttavat mikrobisyhteisöön ja typensitojien aktiivisuuteen (Granhall & Selander 1973, Rastetter ym. 2001, Rydin &



Jeglum 2006, Golovchenko ym. 2007). Mikrobin esiintymiseen vaikuttavat kemiallisten olosuhteiden lisäksi happitilanne ja lämpötila (Rydin & Jeglum 2006) sekä valo ja kosteus (Smith 1984, Zackrisson ym. 2004). Suon sukkession aikana monet mikrobeille tärkeät ympäristötekijät muuttuvat. Happamoituminen, ravinteisuuden, esim. typpipitoisuuden muutokset, ja mätäs-rimpi-vaihtelun lisääntyminen yhdysvaikutuksineen voivat vaikuttaa lajistomuutosten lisäksi myös suoraan tai välillisesti typensitojien aktiivisuuteen (Granhall & Selander 1973, Taiz & Zeiger 2002, Rydin & Jeglum 2006). Basilierin (1979) tutkimuksessa ympäristön ravinteisuudella oli vaikutus mikrobin nitrogeenaasientsyymin aktiivisuuteen. Mikrobiyhteisön koostumus ja typensidonta vaihtelevat saman suon sisällä (Granhall & Selander 1973) ja minerotrofisten ja ombrotrofisten soiden välillä (Golovchenko ym. 2007).

#### 2.4. Typenkierto suoekosysteemissä

Havumetsävyöhykkeen soiden suokasvillisuus saa tarvitsemansa typen pääasiassa pohjaveden mukana, laskeumana tai typensidonnan välityksellä (Limpens ym. 2006). Suotyyppi vaikuttaa siihen, mikä typen lähde on merkittävin typenhankinnassa. Minerotrofiset sarasuot saavat ravinteensa pohjaveden mukana, mutta ombrotrofiset rahkasuot saavat typpeä lähes yksinomaan kuiva- ja märkälasseumana. Rahkasammalet ottavat käyttöönsä tehokkaasti laskeumana saatavaa typpeä ennen kuin se ehtii tavoittaa syvempiä suon kerroksia (Woodin & Lee 1987). Rahkasammalten typenpidätyskyky vaihtelee kuitenkin ympäristöolojen mukaan (Aldous 2002). Rahkasammalten hitaampi hajoaminen verrattuna muuhun suokasvillisuuteen korostaa myös kuolleen rahkasammalaineksen merkitystä typen varastona (Limpens ym. 2006). Noin puolet tyypeistä päätyy suon syvempiin, anaerobisiin osiin, katotelmiin, jossa se säilyy lähes pysyvästi varastoituneena rahkasammalturpeeseen (Nordbakken ym. 2003). Hitaan hajoamisnopeuden vuoksi juuri ombrotrofisten soiden turve on typen suurin varasto (Limpens ym. 2006). Varastoituminen johtaa myös typen hitaaseen kiertoon ekosysteemissä. Tyypeä on turpeen lisäksi sitoutuneena myös elävään suokasvillisuuteen kuten sammaliin sekä mikrobeihin ja huokosveteen. Huokosveden typen pitoisuutta on kuitenkin vaikea arvioida, sillä se on vain hetkellinen typen varasto. Lisäksi tyypeä vapautuu kasvien käyttöön mineralisaation tuloksena. Tyypeä poistuu soilta valunnan mukana ja anaerobisessa mikrobin denitrifikaatioprosessissa, jossa mikrobit pelkistävät nitraatin takaisin  $N_2$ -muotoon typpikaasuksi.

Biologisen typensidonnan merkitykseen ekosysteemin typen lähteenä on kiinnitetty yhä enemmän huomiota (Vitousek ym. 2002a). Typensitojamikrobin merkitys typenkiertossa voi olla huomattava, sillä ne sitovat tyypeä suoraan ilmakehästä, suurimmasta typen varastosta (Glime 2007). Typensidonnan avulla on mahdollista saada kasveille käyttökelpoista tyypeä myös sellaisiin ympäristöihin, joissa tyypeä on niukasti saatavilla tai typenkierto on muuten hidasta (Vitousek ym. 2002a, b). Sukkession aikana muuttuvat ympäristötekijät voivat vaikuttaa myös typenkiertoon liittyviin prosesseihin. Eroja typensidonnassa on havaittu metsän sekundäärisukkessiojatkumolla sekä sarasoiden ja rahkasoiden välillä (Waughman & Bellamy 1980, Zackrisson ym. 2004, DeLuca ym. 2007). Soiden sukkessiojatkumoilla vastaavaa tutkimusta ei ole kuitenkaan aikaisemmin tehty. Lisäksi typensidontaan liittyvästä ekologisesta säätelystä on vasta vähän tutkimustietoa. Keskeisimmät typensidontaan vaikuttavat tekijät liittyvät typensitojien ja muiden eliöiden sekä typensitojien ja ympäristön välisiin vuorovaikutussuhteisiin (Vitousek ym. 2002a). Typensidontaa säätelevät prosessit vaihtelevat monella tasolla

typensitojien geenien säätelystä ja biokemiallisesta säätelystä ekosysteemitason säätelyyn. Typensidontaan vaikuttavien tekijöiden selvittämisessä haasteena ovat myös typensitojien lajistollinen ja toiminnallinen monimuotoisuus (Opelt ym. 2007) sekä typensidontan tarkka mittaaminen (Vitousek ym. 2002a, Galloway ym. 2004).

## 2.5. Typen merkitys suoekosysteemin hiilitaseessa

Vaikka turvesuot peittävät vain 3 % maapallon maapinta-alasta, havumetsävyöhykkeen ja subarktisten alueiden soihin on varastoitunut 15–30 % maapallon hiilestä turpeen muodossa (Limpens ym. 2008). Lisäksi soiden paikallinen mikrobivälitteinen metaaninkierto vaikuttaa koko maapallon hiilen kiertoon (Raghoebarsing ym. 2005, Kip ym. 2010). Soiden hiilenkierrossa keskeisiä prosesseja ovat myös hiilen sitoutuminen suokasvillisuuden biomassaan ja sen vapautuminen hajotustoiminnan avulla (Rydin & Jeglum 2006). Suokasvillisuuden koostumus vaikuttaa yhteyttämiseen, ilmaan vapautuviin hiilidioksidi- ja metaanikaasuihin sekä turpeen laatuun ja siten suon hiilitaseeseen. Hiilen kiertoon liittyviin prosesseihin vaikuttavat myös vallitsevat ympäristöolosuhteet kuten vedenpinnan taso, happamuus ja ravinteiden saatavuus (Limpens ym. 2008). Pohjoisten alueiden luonnontilaiset turvesuot toimivat hiilinieluna, eli hiilen pitkäaikaisena varastona, koska hajoaminen on hidasta (Limpens ym. 2008). Soiden valjastaminen turvetuotantoon tai raivaaminen maa- ja metsätalouden käyttöön on kuitenkin vaikuttanut soiden kykyyn toimia hiilen varastoina (Asplund 1996).

Myös ravinteiden, esimerkiksi typen on havaittu vaikuttavan soiden hiilitaseeseen mm. kasvillisuudessa tapahtuvien muutosten välityksellä (Aerts ym. 1992, Aerts ym. 2001, Markham 2009, Wiedermann ym. 2009). Tutkimus typen ja hiilenkierron prosessien välisiin yhteyksiin liittyen onkin tarpeen, sillä ihmisperäisten typen yhdisteiden määrä on lisääntynyt ilmakehässä runsaasti teollistumisen ja ruokatuotannon kasvamisen seurauksena (Galloway ym. 2004). Suot saavat siten enenevässä määrin typpeä laskeuman mukana. Lisäksi kosteikkojen väheneminen on vähentänyt denitrifikaatiota. Tämä on johtanut typen yhdisteiden lisääntymiseen myös vesistöissä.

Typen vaikutusta suoekosysteemien hiilitaseeseen on jo tutkittu typen lisäämiseen perustuvien menetelmien avulla (Aerts ym. 1992, Aerts ym. 2001, Gerdol ym. 2006, Wiedermann ym. 2009). Wiedermannin ym. (2009) tutkimuksessa typen lisäys vähensi rahkasammalten peittävyttä ja lisäsi putkilokasvien määrää. Muutos johtui pääosin typen määrästä, joka ylitti rahkasammalten typenottokyvyn. Koska hiilen kertyminen on suurempaa rahkasammal- kuin putkilokasvivaltaisilla soilla, kasvillisuudessa tapahtuneella muutoksella oli suuri vaikutus suon kykyyn toimia ilmakehän hiilen nieluna. Myös Markhamin (2009) tutkimus vahvisti soiden hiilitaseen ja typen välisen on yhteyden. Typensidontan aktiivisuuden havaittiin vaikuttavan hiilitaseeseen, koska tuottavuus ja hajoaminen ovat soilla riippuvaisia tpeestä. Lisäksi lämpötilan merkitys korostui typensidontaan vaikuttavana tekijänä. Ilmaston lämpeneminen voi johtaa tulevaisuudessa typensidontan lisääntymisen kautta merkittäviin muutoksiin suoekosysteemeissä. Lisäksi ilmastonmuutos voi lisätä typen mineralisaatiota ja siten vaikuttaa epäsuorasti typensidontaan. Borealiset suot saattavat silloin muuttua hiilinielusta hiilen lähteeksi.

Hiilen kiertoon on liitetty myös sukkession näkökulma. Sukkession aikana muuttuvan kasvillisuuden on havaittu vaikuttavan primäärisukkessiojatkumon soiden hiilidynamiikkaan (Leppälä ym. 2008, 2011a,b,c). Myös sukkession aikana kasvavalla rahkasammalten peittävyydellä (Laine ym. 2011) voi olla vaikutus eri aineiden kierrossa merkittävien mikrobien toimintaan. Typenkierron hiilidynamiikkaan voivat kytkeä

rahkasammalissa esimerkiksi metanotrofit, joilla on sekä kyky hapettaa metaania että sitoa typpeä (Davis 1964). Lisäksi typen saatavuuden on havaittu vaikuttavan metaaninhapetukseen (Bodelier & Laanbroek 2004). Tiedot metaaninhapetuksen ja typensidonnan välisestä yhteydestä ovat kuitenkin puutteellisia ja ristiriitaisia. Yleisesti typen on ajateltu vähentävän metaaninhapetusta metsämailla (Steudler ym. 1989). Ammonium-pohjaisten lannoitteiden on kuitenkin havaittu olevan merkittävässä roolissa metaaninhapettajien aktiivisuutta ja kasvua säätelevänä tekijänä riisipelloilla (Bodelier ym. 2000). Ammoniumtypen lisäys kasvatti metaaninhapettajien määrää ja aktiivisuutta, ja vähensi siten mahdollisesti metaanipäästöjä. Typensidonnan avulla on mahdollisuus saada typpeä myös niukkaravinteisissa oloissa. Siten myös muiden typensitojien aktiivisuus voi vaikuttaa metaaninhapetuksen kautta hiilen kiertoon. Koska metaaninhapetus on keskeinen osa maailmanlaajuista hiilenkiertoa, typensidonta voi osoittautua yhdeksi maailmanlaajuista hiilenkiertoa sääteleväksi tekijäksi. Typensidonnan merkitystä suoekosysteemin typenkierrossa ja eri sukkessiovaiheissa ei vielä tiedetä. Rahkasammalissa ja niiden välittömässä läheisyydessä elävät mikrobit voivatkin liittää niin hiilen kuin typenkiertoon liittyvät prosessit, typensidonnan ja metaaninhapetuksen yhteen.

### 3. AINEISTO JA MENETELMÄT

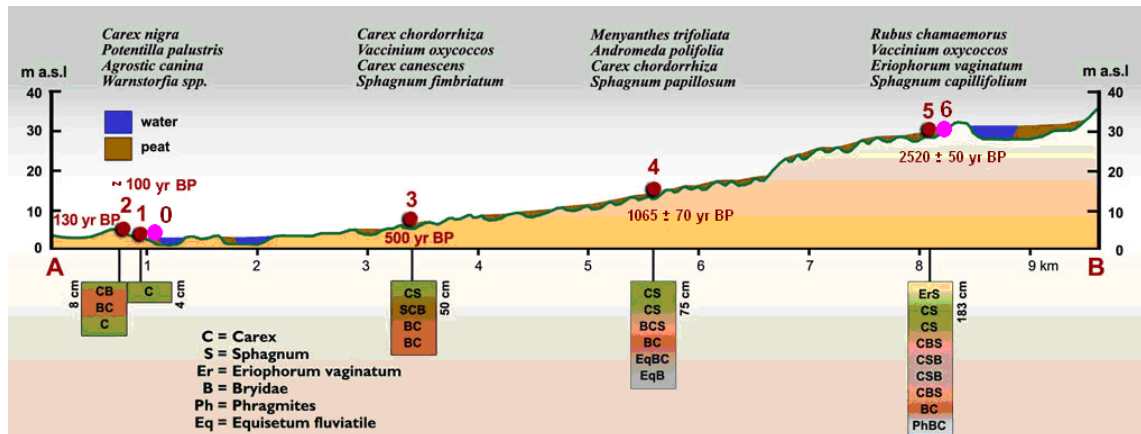
#### 3.1. Tutkimusalue

Tutkimuskohteena oli neljään eri sukkessiovaiheeseen kuuluvien havumetsävyöhykkeen soiden aikasarja. Tutkimusalue sijaitsi Siikajoella Pohjanlahden rannalla (64°45' N, 24°42'E), missä maankohoaminen on suhteellisen voimakasta, 7,5 mm vuodessa (Ekman 1996). Suot sijaitsivat fossiilisten dyynien välisillä alueilla ja vaihtelivat kooltaan, 0,5–1,5 ha. Primäärisuknessiojatkumon suot erosivat toisistaan iältään, kasvilajikoostumukseltaan, vedenpinnan vaihtelultaan, turpeen paksuudeltaan ja ravinteikkuudeltaan sekä mätäs-rimpi-vaihtelultaan. Typensidonnan ja metaaninhapetuksen sekä niihin osallistuneiden mikrobiyhteisöjen erojen selvittämiseksi eri sukkessiovaiheiden soiden valtasammallajeja kerättiin lasipulloihin, jotka altistettiin erilaisille valo- ja kaasukäsittelyille *in situ*. Aineisto kerättiin soilta 31.5.- 4.6.2010 välisenä aikana ja käsiteltiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriossa 7.6- 27.7.2010.

#### 3.2. Tutkimusasetelma

##### 3.2.1 Sukkessiojatkumo

Tutkimusalueen soiden luokittelussa noudatettiin Leppälän ym. (2008) mallia. Mallin sukkessiovaiheista tutkimukseen valittiin mukaan SJ2-, SJ3-, SJ4- ja SJ5- vaiheen suot (Kuva 1). Näistä SJ2-tyyppi edustaa nuorinta ja SJ5 vanhinta sukkessiovaihetta (SJ = Siikajoki). SJ0- ja SJ1- vaiheet jätettiin tutkimuksen ulkopuolelle niiltä puuttuvan rahkasammalajiston vuoksi. SJ5- ja SJ6-vaiheiden samankaltaisuuden vuoksi tutkimukseen katsottiin tarpeelliseksi ottaa mukaan vain näistä toinen sukkessiovaihe, SJ5. SJ6-vaiheesta ei ollut alueella myöskään rinnakkaisia soita. Tutkimukseen valitun aikasarjan suotyypit ovat luhtaniitty (SJ2), mesotrofinen sarasuo (SJ3), oligotrofinen sarasuo (SJ4) ja sarasuo-rahkasuo-vaihettuma (SJ5). Iältään ne ovat 200 (SJ2), 700 (SJ3), 1070 ± 70 (SJ4) ja 2520 ± 50 (SJ5) vuotta vanhoja.



Kuva 1. Poikkileikkaus Siikajoen primäärisuksessiojatkumosta. Tutkimuksessani mukana olivat sukessiovaiheet 2-5, joilla rahkasammalet ovat valtalajeja. Sukessiovaiheille tyypilliset kasvilajit (yläpuolella) sekä turpeen paksuus ja koostumus kerroksittain (alapuolella). Sukessiovaiheiden arvioidut iät (BP, before present) ja korkeus merenpinnasta (m.a.s.l., meters above sea level) (kuva: Merilä ym. 2006).

### 3.2.2. Sukessiovaiheiden erityispiirteet

SJ2-tyyppin luhtaniitylle on ominaista vähäinen mikrotopografinen vaihtelu. Turpeen paksuus on enintään 10 cm ja niin turvekerros kuin kasvipeite ovat vielä epäyhtenäiset. Sarat ja heinät ovat luhtaniityn valtalajeja sammalkerroksen jäädessä harvaksi. Tyypilajeja ovat *Carex nigra* ja *Agrostis canina*. Korkeus merenpinnasta on alueella alle kaksi metriä. SJ3- ja SJ4-tyyppisiä yhdistää mikrotopografinen vaihtelu ja yhtenäinen sammalpeite. Myös tyypilajit ovat Leppälän ym. (2008) mukaan samat: *C. chordorrhiza*, *C. rostrata* ja *C. canescens*. Mesotrofisella sarasuolla (SJ3) kasvaa sarojen lisäksi heiniä. Turvekerroksen paksuus on SJ3-tyyppillä 50 cm ja SJ4-tyyppillä 75 cm. SJ3-tyyppin korkeus merenpinnasta on 7 m kun se on SJ4-tyyppillä 12 m. Sarasuo-rahkasuo -vaihtuman (SJ5) mätäs-rimpi-vaihtelu on huomattavaa. Mätäiden yleisimpiä lajeja ovat *Rubus chamaemorus*, *Empetrum nigrum* ja *Eriophorum vaginatum*. Rimmissä tavallisia ovat puolestaan *Scheuchzeria palustris* ja *Carex limosa*. SJ5-tyyppin suon korkeus merenpinnasta on 25 m ja turvekerroksen paksuus n. 1,8 m.

Kunkin ikävaiheen soita on tutkimuksessa mukana kolme aitoa ekologista toistoa, eli tutkimuksessa otettiin näytteitä kahdeltatoista suolta (1–12). Näytteenottoapaikat valittiin niin, että kustakin sukessiovaiheesta (SJ2–SJ5) saatiin mahdollisimman edustava otos. Apuna soiden erityispiirteiden määrittämisessä käytettiin aiempaa tutkimustietoa sukessiovaiheille tyypillisestä kasvillisuudesta ja veden pinnan tasosta (Leppälä ym. 2008, Putkinen ym. 2011) Nuorimmalle ikävaiheelle (SJ2) ominaista on vähäinen mätäs-rimpi-vaihtelu, siksi kolmelta nuorimmalta suolta näytteet kerättiin samasta tasosta. Vanhemmilla soilla (SJ3–SJ5) puolestaan esiintyy mätäs-rimpi-vaihtelua. Näiltä yhdeksältä suolta näytteet kerättiin kahdesta kohtaa, mätääältä ja rimmestä. Näytteenottoapaikkoja tutkimukseen saatiin siten 21. Aiempaa tutkimustietoa käytettiin apuna myös suo-aloja ja niiden mätäs-rimpi -vaihtelua tyypittävien rahkasammallajien valitsemisessa kyseisten alojen näytelajeiksi. SJ2-vaiheen soilta valtasammallajeja kerättiin vain yksi suota kohden, SJ3–SJ5 -vaiheiden soilta puolestaan kaksi, rimmestä ja mätääältä. Näytelajeiksi soille valikoitui aikaisempiin tutkimuksiin (Leppälä ym. 2008, 2011a, Putkinen ym. 2011) perustuen *Sphagnum subsecundum*, *S. squarrosum*, *S. fimbriatum*, *S. platyphyllum*, *S. papillosum*, *S. majus*, *S. obtusum* ja *S. fuscum* (Taulukko 1).

Putkilokasvien nimistö on tutkimuksessani Hämet-Ahti ym. (1998) mukainen ja rahkasammalten nimistö Laine ym. (2009) mukainen.

Taulukko 1. Soilta kerätyt sammalnäytteet.

Sukessiovaihe	Suo	Sammallaji	
		Mätäs	Rimpi
SJ2	1	-	<i>S. subsecundum</i>
	2	-	<i>S. squarrosum</i>
	3	-	<i>S. squarrosum</i>
SJ3	4	<i>S. fimbriatum</i>	<i>S. squarrosum</i>
	5	<i>S. squarrosum</i>	<i>S. platyphyllum</i>
	6	<i>S. papillosum</i>	<i>S. majus</i>
SJ4	7	<i>S. papillosum</i>	<i>S. subsecundum</i>
	8	<i>S. papillosum</i>	<i>S. subsecundum</i>
	9	<i>S. obtusum</i>	<i>S. subsecundum</i>
SJ5	10	<i>S. fuscum</i>	<i>S. majus</i>
	11	<i>S. papillosum</i>	<i>S. subsecundum</i>
	12	<i>S. fuscum</i>	<i>S. obtusum</i>

### 3.2.3. Isotooppimenetelmä

Ensimmäiset typensidontaan liittyvät tutkimukset tehtiin asetyleenin pelkistykseen (etyleeniksi) perustuvalla menetelmällä (acetylene reduction technique). Tekniikan avulla voitiin selvittää nitrogeenaasientsyymin aktiivisuutta. Menetelmän havaittiin kuitenkin estävän metaanin hapetusta, eikä sen avulla siksi saada luotettavaa tietoa metanotrofien typensidonnasta (Flett ym. 1975). Siirtyminen vakaisiin isotooppeihin perustuvaan menetelmään (Fry 2006) on mahdollistanut tutkimuksen tarkkuuden lisääntymisen lisäksi metanotrofien tutkimisen osana muita typensitojia. Isotooppimenetelmä on kuitenkin kalliimpi kuin asetyleenimenetelmä, eikä sitä ole käytetty tiettävästi aikaisemmin kuin yhdessä typensidontaan liittyvässä tutkimuksessa (Gavazov ym. 2010).

Saman alkuaineen massaluvultaan erilaiset atomit ovat isotooppeja. Isotooppien ytimissä on siis eri määrä neutroneja. Vakaisissa isotoopeissa neutronien määrä on lähellä protonien määrää ja ne ovat siksi luonteeltaan pysyviä. Vakaaan muotonsa ansiosta näitä isotooppeja voidaan käyttää tutkimuksissa luonnollisina leimoina aineiden ja ravinteiden kierron sekä ekologisten vuorovaikutussuhteiden selvittämisessä. Tässä tutkimuksessa käytettiin typen ja hiilen vakaita, raskaita isotooppeja,  $^{15}\text{N}$  ja  $^{13}\text{C}$ , jotka ovat luonnossa harvinaisempia kuin yleiset  $^{14}\text{N}$  ja  $^{12}\text{C}$  (Fry 2006). Vakaiden isotooppien avulla selvitettiin oliko rahkasammalissa typensidontaan ja metaaninhapetukseen aktiivisesti osallistuvia mikrobeja, eli siirtyikö isotooppileima näytepulloihin lisätyistä leimatuista  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{13}\text{CH}_4$ -kaasuista rahkasammaliin ja niiden mikrobeihin. Biologiseen typensidontaan osallistuvan mikrobiyhteisön eroja kuvaavat typensidonnan ja metaaninhapetuksen vaihtelu eri valo- ja ympäristöoloissa sekä eri kaasukäsittelyissä.

Kultakin näytteenottoaikalta otettu rahkasammalnäyte jaettiin kuuteen käsittelyyn. Kaasukäsittelyt,  $^{15}\text{N}_2$  (typpileima),  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  (typpi-metaani -kaksoisleima) ja ulkoilma (kontrolli), toistettiin pimeässä ja valossa, jotta saatiin selville ovatko typensidontaan osallistuvat mikrobit yhteyttäviä vai toisenvaraisia (Taulukko 2). Mättäiden ja rimprien

väliden erojen selvittämiseksi kaikki käsitellyt toistettiin SJ3-, SJ4- ja SJ5-sukessiovaiheiden soilla mättään ja rimmen sammalilla.

Taulukko 2. Tutkimuksen kannalta kiinnostavimpien mikrobiryhmien aktiivisuus eri valo- ja kaasukäsittelyissä.

Mikrobien aktiivisuus				
Käsittely	Valo	Havaittava leima	Pimeä	Havaittava leima
$^{15}\text{N}_2$	Sinibakteerit	$^{15}\text{N}$	-	-
	Heterotrofit	$^{15}\text{N}$	Heterotrofit	$^{15}\text{N}$
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	Sinibakteerit	$^{15}\text{N}$	-	-
	Heterotrofit	$^{15}\text{N}$	Heterotrofit	$^{15}\text{N}$
	Metanotrofit	$^{15}\text{N}+^{13}\text{C}$	Metanotrofit	$^{15}\text{N}+^{13}\text{C}$
kontrolli	Sinibakteerit	-	-	-
	Heterotrofit	-	Heterotrofit	-
	Metanotrofit	-	Metanotrofit	-

Näytealoilta otetut sammalnäytteet jaettiin 120 ml lasisiin näytepulloihin. Sammalia lisättiin pulloon kunnes pullo oli lähes täysi sammalta tiivistämättä. Näytteet edustivat useampaa sammalyksilöä, sillä sammalyksilöiden välillä voi olla vaihtelua typensidonnassa (Basilier & Granhall 1978). Lisäksi sammalversot katkaistiin elävän ja kuolleen osan väliltä. Tutkimukseen otettiin mukaan vain versojen elävät osat. Pullot suljettiin ilmatiiviiksi kumikorkein ja sinetöitiin metallireunuksilla. Kuhunkin pulloon lisättiin mittaruiskulla 10 ml suovettä näytteenottoaikalta kosteuden säilyttämiseksi pullossa.  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä pulloon lisättiin injektioimalla 20 ml leimattua typpikaasua ( $^{15}\text{N}_2$ , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Yhdysvallat).  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä pulloon lisättiin sekä leimattu typpikaasu että 1,2 ml leimattua metaanikaasua ( $^{13}\text{CH}_4$ , CK Gas Products Ltd, Hampshire, Iso-Britannia). Leimattua tyyppiä oli pullojen ilmatilan kokonaistypestä 21,2 % ja leimatun hiilen sisältämää metaania pullojen ilmatilan kokonaismetaanista 98,9 %. Kontrollinäyte käsiteltiin samalla tavalla kuin koekäsittelyn saaneet näytteet, mutta pulloon ei lisätty leimattuja kaasuja. Lisäksi pimeäkäsittelyn lasipullot peitettiin huolellisesti alumiinifoliolla. Valmiit näytepullot asetettiin takaisin näytteenottokohtaan niin, että niiden yläosa, noin puolet pullon korkeudesta, jäi suon pinnan yläpuolelle valon saamisen varmistamiseksi. Pullot jätettiin suohon kahdeksi vuorokaudeksi (48 h). Kokeen päättämiseksi pullojen sinetit avattiin ja pulloista kaadettiin ylimääräinen vesi pois. Pullot kuljetettiin kylmälaukkuihin pakattuina mahdollisimman pian pakastimeen mikrobitoiminnan pysäyttämiseksi. Paluumatkalla Jyväskylään pakastettuja pulloja säilytettiin kylmälalleilla jäädytetyissä kylmälaukuissa.

Sammalpullot sulatettiin Jyväskylän yliopiston biologian ja ympäristötieteiden laitoksen laboratoriossa lämminvesihauteessa ja huoneenlämmössä. Näytteet siirrettiin pulloista pinsettien avulla paperipusseihin kuivausta varten. Näytteitä kuivattiin 50 °C:ssa uunissa (S-S 4-43, Oy Santasalo-Sohlberg AB. 1973) 24 h ajan tai kunnes ne olivat täysin kuivia. Kuivapainojen selvittämiseksi kuivat näytteet paperipusseineen punnittiin vaa'alla (MettlerToledo AG/PG, PB3002-S Delta Range) myöhempää aineiston tarkastelua varten. Lisäksi selvitettiin uunissa kuivattujen paperipussien keskimääräinen paino.

Kuivat sammalnäytteet homogenisoitiin massaisotooppilaitteella analysointia varten. Näytepussin koko sisältö hienonnettiin ensin saksilla lähes homogeeniseksi, jotta näytteen sammalten eri osat sekoittuisivat tasaisesti. Saksitusta näytteestä osa siirrettiin 2 ml:n näyteputkiin (Sarstedt). Näyteputkiin lisätiin teräskuulat (halkaisija 5 mm) jauhamista varten. Näyteputket asetettiin kuulamylllyyn (Microdismembrator U, B. Braun Biotech International), joka ravisti niitä kolmen minuutin ajan 1500 rpm (rounds per minute, kierrosta minuutissa) nopeudella.

Homogenisoinnin jälkeen näyteputkista punnittiin (Sartorius M2P, 15102719) 1,9–2,4 mg sammaljauhetta foliokuppeihin. Foliokupit taiteltiin näytteineen kasaan mahdollisimman ilmatiiviisti. Näytteet poltettiin ensin alkuaineanalysaattorissa (Carlo Erba Flash EA1112) ja analysoitiin lopuksi massaisotooppilaitteella (CF/IRMS, Thermo-Finnigan, Delta<sup>Plus</sup> Advantage). Isotooppilaitteen avulla saatiin selville näytteen typen ja hiilen isotooppien keskinäiset suhteet. Typensidonnin ja metaaninhapetuksen määrien kuvaamiseen käytettiin typen ja hiilen isotooppien  $\delta$ -arvoja (‰).  $\delta$ -arvo kertoo, kuinka paljon raskasta isotooppia on näytteessä suhteessa kevyempään isotooppiin. Positiivinen  $\delta$ -arvo tarkoittaa, että raskasta isotooppia on näytteessä enemmän kuin International Atomic Energy Agency:n (IAEA) kansainvälisessä standardissa.  $\delta$ -arvot voivat olla myös negatiivisia, jolloin raskasta isotooppia on vastaavasti vähemmän kuin standardissa (Fry 2006).

Näytteen vertailukohtana käytetyt hiilen ja typen työstandardien (C: peruna -26,26 ‰  $\delta^{13}\text{C}$  vs. Vienna-Pee-Dee Belemnite [VPDB], N: 4,39 ‰  $\delta^{15}\text{N}$  vs. ilmakehän  $\text{N}_2$  [Air], National Institute of Standards and Technology) isotooppiarvot kalibroitiin ennen käyttöönottoa typelle ammoniumsulfatilla (IAEA-N-2) ja sitruslehdellä (IAEA NBS 1572) sekä hiillelle asetaniidilla (Thermo Finnigan P/N 338,40008) ja atropiinilla (Thermo Finnigan P/N 338,40012). Näytteen sisäinen tarkkuus oli typen suhteen parempi kuin 1,5 ‰ ja hiilen suhteen parempi kuin 0,1 ‰ työstandarditoistojen keskihajontaan perustuen. Laitteen antamien arvojen epälineaarisuus ja ajautuminen (drift) korjattiin korjaustaulukolla Wernerin & Brandin (2001) työhön perustuen.

#### 3.2.4. Kaasu- ja vesinäytteet

Ympäristötekijöiden avulla voitiin selvittää mahdollisia syitä havaittujen typensidonnin ja metaaninhapetuksen erojen taustalla. Ympäristön olosuhteiden tarkastelemiseksi näytealoilta mitattiin lämpötiloja ja otettiin näytteitä suovedestä. Vesinäytteistä tutkittiin myöhemmin laboratoriossa suoveden hiilidioksidi- ja metaanipitoisuus sekä pH.

Tallentavat lämpömittarit (datalogger iButton, Maxim Integrated Products, Inc., Sunnyvale, CA, Yhdysvallat) rekisteröivät ilman lämpötilan näytepullojen vierestä suon pinnasta tunnin välein koko koekäsittelyn ajan. Nämä mittarit oli sijoitettu soilla pääosin rimpiin. Yhdellä soista (suolla 10) dataloggerit rekisteröivät lämpötiloja rymmen lisäksi myös mättäältä. Yhdeltä suolta taas (suolta 6) ei saatu lämpötilatietoja. Näytteenottohetkellä mitattiin lisäksi suon pintalämpötila kahdesta kohtaa (Fluke). Tilastollisissa analyyseissä käytetty ”lämpösumma” saatiin laskemalla tunnin välein rekisteröidyt lämpötila-arvot yhteen kunkin näytteen koekäsittelyyn kuluneelta tarkalta ajalta.

Vesinäytteen otossa noudatettiin Larmola ym. (2010) tutkimuksessa käytettyä menetelmää. Vesinäytteet otettiin mittaruiskulla soiden pohjavesikaivoista. Sukkessiovaiheiden SJ3, SJ4 ja SJ5 soilta näytteet otettiin sekä rymmen että mättään kaivosta. Mittaruiskuun (100 ml) vedettiin kustakin kaivosta 30 ml vettä. Veden

metaanipitoisuus selvitettiin ”headspace equilibration” -tekniikalla (McAuliffe 1971). Menetelmässä ruiskuun lisättiin vedenoton jälkeen 30 ml ulkoilmaa, joka sekoitettiin veteen ravistamalla ruiskua voimakkaasti 3 minuutin ajan. Ravistamisen aikana suurin osa veden metaanista ja hiilidioksidista liukeni ilmatilaan, josta kaasujen pitoisuudet voitiin analysoida. Vesitilaan jääneet pienet kaasupitoisuudet laskettiin liukoisuuden ja tasapainovakioiden avulla. Näytteiden analysoinnissa käytettiin kaasukromatografia (Agilent 7890A). Metaani- ja hiilidioksidipitoisuudet laskettiin Lide & Fredrikse (1995) saamalla arvoilla Henryn lain periaatteiden mukaisesti.

Näytteenottoaikoilta pH-mittauksia varten otetut vesinäytteet pakastettiin Siikajoella ja kuljetettiin kylmälaukussa Jyväskylään. Näytteiden annettiin sulaa kylmiössä ja huoneenlämmössä 24 h ajan. Huoneenlämpöiset vesinäytteet kaadettiin vuorollaan mitta-astiaan, josta pH mitattiin pH-mittarilla (Methrom 744).

### 3.2.5. Typen määrän laskeminen

Typensidonnan nopeuden laskemisessa tarvittiin massaisotooppilaitteen antamien  $\delta$ -arvojen lisäksi näytekohtainen typen määrä kuivapainosta (%N) ja atomimassaprosentteja (at%  $^{15}\text{N}$ ), eli kuinka monta prosenttia näytteen typpi-atomeista oli raskaampaa isotooppia (Kaava 1). Atomimassaprosentin laskemiseen tarvittiin ilmakehän typen R-arvo ( $R_{\text{standardi}}$ ) eli raskaan ja kevyen typen isotoopin suhdetta. Typensidonnan nopeuden selvittämiseksi laskettiin ensin näytepullojen ilmatilan sisältämän leimatun typen osuus pullon kokonaistypestä, eli raskaan isotoopin fraktionaatiokerroin ( $f$ ). Tämä luku sijoitettiin kaavaan 2 (Fry 2006), jonka avulla voitiin laskea kuinka paljon raskasta isotooppia oli pullossa (at%  $^{15}\text{N}_{\text{pullo}}$ ). Kaavan 3 avulla saatiin selville kuinka paljon typpeä sidottiin koekäsittelyn kesto (48h) ja g kuivapainoa kohden ( $\mu\text{mol N g}^{-1}$ ). Jotta tuloksia voitaisiin verrata aikaisempiin tutkimuksiin, laskettiin edelleen kuinka paljon typpeä sidottiin vuorokaudessa ( $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Metaanin hapon nopeuden laskemisessa käytettiin samoja kaavoja, joihin sijoitettiin vastaavasti hiilen osuus kuivapainosta (%C), metaanin R-arvo ( $R_{\text{standardi}}$ ) ja metaanin sisältämän hiilen raskaan isotoopin atomimassaprosentit (at%  $^{13}\text{C}$ ).

$$\text{at}\%^{15}\text{N} = 100 * \left( \frac{(\delta + 1000)}{\delta + 1000 + \frac{1000}{R_{\text{standardi}}}} \right) \quad (1)$$

$$\text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{pullo}} = f_1 * (\text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{ilma}} - \text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{leima}}) + \text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{leima}} \quad (2)$$

$$N[\mu\text{mol g}^{-1}] = \frac{1}{100} * \frac{\%N}{100} * \frac{\text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{näyte}} - \text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{kontrolli}}}{\text{Atomimassa}(N_2)} * 10^6 * \frac{100}{\text{at}\%^{15}\text{N}_{\text{pullo}}} \quad (3)$$



### 3.3. Tilastolliset analyysimenetelmät

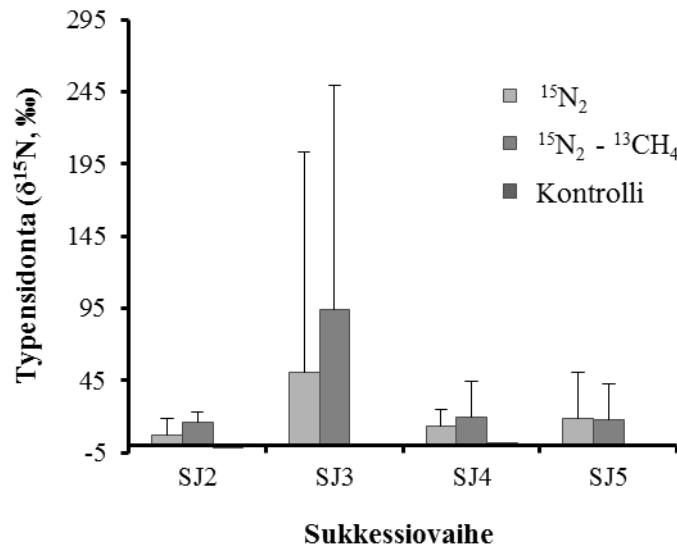
Suknessiovaiheiden, käsittelyjen ja rahkasammallajien välisiä eroja typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa tutkittiin varianssianalyysin avulla. Analyyseissä käytettiin parametritonta Kruskal-Wallis 1-suuntaista varianssianalyysia koska aineisto ei ollut normaalisti jakautunut, varianssit erosivat toisistaan, eivätkä parametrisen ANOVA:n ehdot täyttyneet edes muunnosten jälkeen. Typensidontaa ja metaaninhapetusta analysoitaessa tarkasteltiin erikseen tyypileima- ja kaksoisleimakäsittelyn arvoja. Testit tehtiin typen ja hiilen absoluuttisille  $\delta$ -arvoille, joista ei vähennetty kontrollin osuutta  $\delta$ -arvojen vaihtelusta. Kontrollin vähentäminen ei olisi muuttanut tulosten merkitsevyyttä. Jatkotarkastelussa parittaiset monivertailut käsittelyjen ja suknessiovaiheiden välillä tehtiin Tukeyn testillä (Högmander ym. 2009). Parittaiset vertailut mikrotopografia- ja valokäsittelyjen välillä tehtiin parametrittömällä Mann-Whitney U -testillä. Ympäristötekijöiden yhteyttä typensidontaan ja metaaninhapetukseen tutkittiin Spearmanin järjestyskorrelaation avulla. Korrelaation avulla selvitettiin myös onko typensidonnalla ja metaaninhapetuksella tilastollinen yhteys. Tilastolliset testit tehtiin SPSS-ohjelmistolla (PASW Statistics 18).

## 4. TULOKSET

### 4.1. Typensidonta primäärisuknessiojatkumolla

Typensidonta Siikajoen suknessiojatkumon rahkasammalissa vaihteli välillä 0-2,7  $\mu\text{mol N g}^{-1}$  kuivaa sammalbiomassaa  $\text{d}^{-1}$  (Taulukko 3). Erot suknessiovaiheiden suurimmissa havaituissa typensidonnoissa olivat suurimmillaan monikymmenkertaisia. Typensidonta oli suurinta SJ3-vaiheessa, missä typensidonta oli maksimissaan  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä 2,7  $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$  ja  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä 1,9  $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Typensidontanopeus oli pienin SJ2-vaiheessa kummassakin kaasukäsittelyssä. Saman osoittavat myös  $\delta$ -arvot (Kuva 2).

Typensidonnan nopeudessa havaituista eroista huolimatta suknessiovaiheiden välillä ei ollut tilastollisia eroja typensidonnassa  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 6,571$ ,  $\text{df} = 3$ ,  $P = 0,087$ ), eikä  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä ( $\chi^2 = 5,456$ ,  $\text{df} = 3$ ,  $P = 0,141$ ). Sen sijaan kun nämä koekäsittelyt yhdistettiin, suknessiovaiheiden välillä oli eroja ( $\chi^2 = 10,813$ ,  $\text{df} = 3$ ,  $P = 0,013$ ).



Kuva 2. Typensidonta ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) sukessiojatkumolla (SJ2-SJ5) eri kaasukäsittelyissä ( $^{15}\text{N}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ ), (keskiarvo  $\pm$  S.D.). Huomaa kontrollin pienet arvot, jotka kuvaavat luonnollista  $\delta$ -arvon vaihtelua sammalissa.

Taulukko 3. Leimatun typen sidontanopeus eri sukessiovaiheiden sammalissa vuorokaudessa g/kuivapainoa ( $\mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyissä. Keskiarvo (ka), minimiarvo (min), maksimiarvo (max) ja keskihajonta (S.D.).

Kaasukäsittely	Suksessiovaihe	$\mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$			S.D.
		min	ka	max	
$^{15}\text{N}_2$	SJ2	0,0005	0,03	0,09	0,03
	SJ3	0	0,3	1,9	0,5
	SJ4	0,01	0,04	0,1	0,04
	SJ5	0	0,04	0,2	0,06
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	SJ2	0,03	0,06	0,09	0,02
	SJ3	0,005	0,4	2,7	0,7
	SJ4	0,01	0,08	0,3	0,09
	SJ5	0	0,05	0,2	0,06

Mikrobit sitoivat typpeä nopeammin  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -kaasukäsittelyssä kuin pelkän typpileiman sisältävässä  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä (Kuva 2, Taulukko 3). SJ3-vaiheen suurin typensidonta oli  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -kaasukäsittelyssä 1,5-kertainen  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyn suurimpaan sidontaan verrattuna. Keskiarvojen perusteella  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyt erosivat lisäksi kontrollista (Kuva 2). Vaikka taulukon 4 mukaan kaasukäsittelyjen välillä oli eroja eri sukessiovaiheissa, Tukeyn monivertailuiden jälkeen tilastollisesti merkitsevä ero löytyi vain  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ - ja kontrollikäsittelyn väliltä SJ2- ja SJ4-vaiheista (Liite 2). Suksessiovaiheita huomioimatta  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyn ja kontrollin välinen ero oli lähes merkitsevä (Tukey:  $df = 2$ ,  $P = 0,082$ ).

Soiden välillä oli havaittavissa sukessiovaiheista riippumatonta vaihtelua typensidonnassa  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä (Kruskall-Wallis:  $\chi^2 = 22,374$ ,  $df = 11$   $P = 0,022$ ).

Tukeyn monivertailuissa selvisi, että kaksi soista erosi keskenään: suolla 5 typensidonta oli voimakkaampaa kuin suolla 11. Muita eroja soiden väliltä ei löytynyt (Liite 1).  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä eroja soiden välillä ei ollut (Kruskall-Wallis:  $\chi^2 = 18,555$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,070$ ).

Taulukko 4. Erot kaasukäsittelyjen välillä typensidonnassa sukkessiojatkumolla. Kruskall-Wallis -testin testisuure ( $\chi^2$ ), vapausasteet (df) ja tilastollinen todennäköisyys (P).

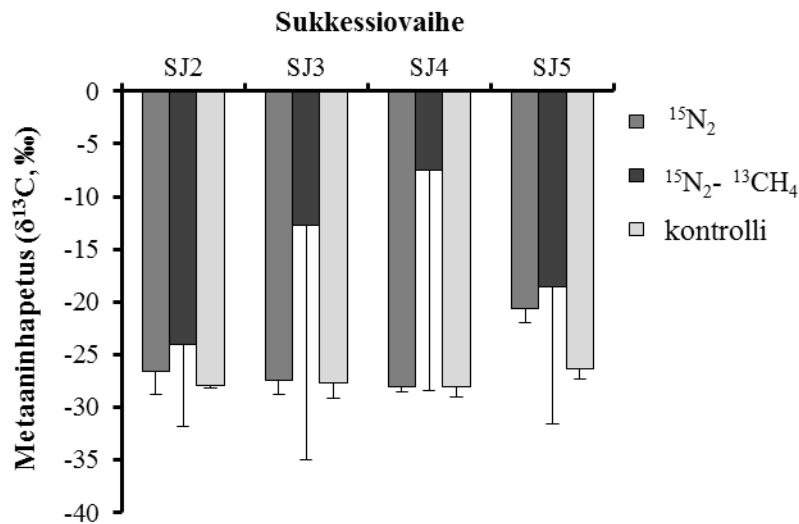
$\delta^{15}\text{N}$			
Sukcessiovaihe	$\chi^2$	df	P
SJ2	11,380	2	0,003
SJ3	16,883	2	0,001
SJ4	23,646	2	0,001
SJ5	15,335	2	0,001

#### 4.2. Metaaninhapetus primäärisukcessiojatkumolla

Sukcessiojatkumolla metaaninhapetus vaihteli välillä 0–9,6  $\mu\text{mol C g}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Taulukko 5). Metaaninhapetus oli suurinta SJ4-vaiheessa. (Kuva 3). Vähiten metaania hapetettiin SJ2-vaiheessa. SJ4-vaiheessa metaania hapetettiin noin kolme kertaa enemmän kuin SJ2-vaiheen soilla. Sukcessiovaiheiden väliset erot metaaninhapetuksessa havaittiin Kruskall-Wallis -testissä ( $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ :  $\chi^2 = 9,461$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0,024$ ), mutta parittaisissa vertailuissa eroja ei ollut.

Metaaninhapetus oli oletetusti suurinta metaanilisän sisältävässä käsittelyssä. Eri kaasukäsittelyt erosivat toisistaan metaaninhapetuksen suhteen vain SJ3- ja SJ4-vaiheissa (Taulukko 6). Tukeyn monivertailut osoittivat lisäksi, että  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittely erosi SJ4-vaiheessa kontrollista ja  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelystä, joissa metaanilisää ei ollut (Liite 2). Metaanilisäkäsittelyn vertailukohtana olleiden kontrolliarvojen ja  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyn arvojen vaihtelu selittyy sammalten  $\delta^{13}\text{C}$ -arvojen luonnollisella vaihtelulla.

Soiden välillä oli sukkessiovaiheista riippumattomia eroja metaaninhapetuksessa  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (Kruskall-Wallis:  $\chi^2 = 20,875$ ,  $df = 11$ ,  $P = 0,035$ ). Tukeyn monivertailuissa eroja ei kuitenkaan tässä käsittelyssä löytynyt (Liite 1).



Kuva 3. Metaaninhapetus ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) suknessiojatkumolla eri kaasukäsittelyissä ( $^{15}\text{N}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ , kontrolli) (keskiarvo  $\pm$  S.D.). Kontrollin ja  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyn arvot kuvaavat luonnollista  $\delta$ -arvon vaihtelua sammalissa. Suuret  $\delta$ -arvot tarkoittavat voimakkainta aktiivisuutta.

Taulukko 5. Metaaninhapetuksen nopeus suknessiovaiheiden rahkasammalissa vuorokaudessa g/kuivapainoa ( $\mu\text{mol C g}^{-1} \text{d}^{-1}$ )  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä. Keskiarvo (ka), minimiarvo (min), maksimiarvo (max) ja keskihajonta (S.D.).

Kaasukäsittely	Suknessiovaihe	$\mu\text{mol C g}^{-1} \text{d}^{-1}$			S.D.
		min	ka	max	
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	SJ2	0,003	0,6	3,0	1,2
	SJ3	0,07	2,5	8,3	3,1
	SJ4	0,05	2,9	9,6	2,8
	SJ5	0	1,2	6,4	2,0

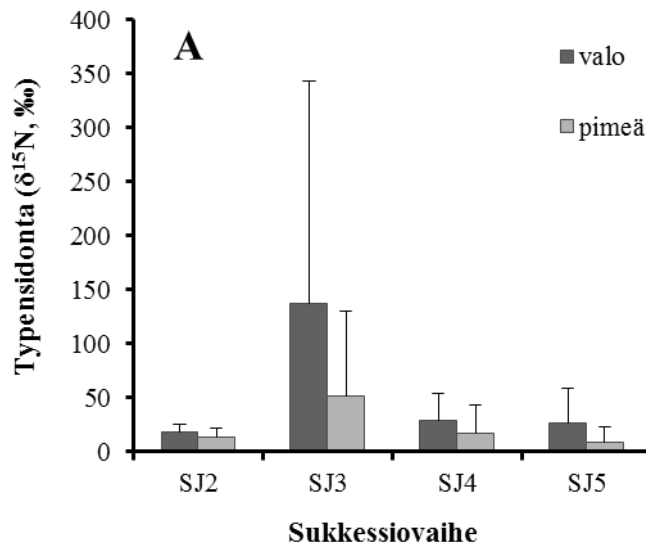
Taulukko 6. Erot kaasukäsittelyjen välillä metaaninhapetuksessa suknessiojatkumolla. Kruskal-Wallis -testin testisuure ( $\chi^2$ ), vapausasteet (df) ja tilastollinen todennäköisyys (P).

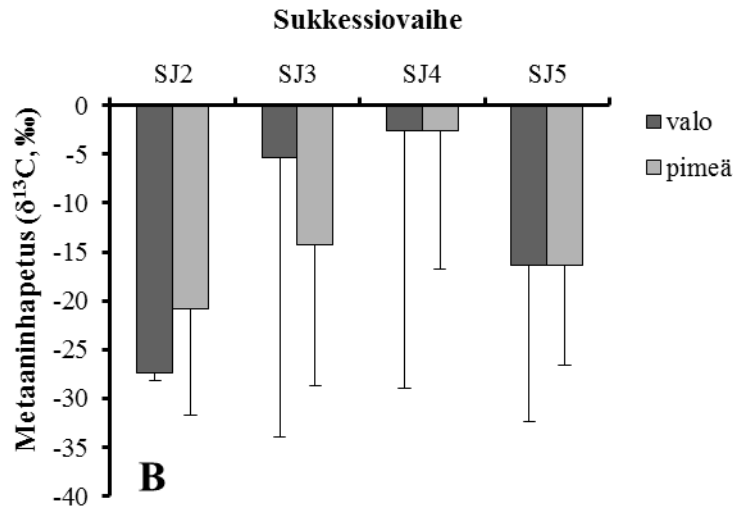
$\delta^{13}\text{C}$			
Suknessiovaihe	$\chi^2$	df	P
SJ2	3,520	2	0,172
SJ3	17,465	2	0,001
SJ4	23,365	2	0,001
SJ5	4,086	2	0,130

### 4.3. Mikrobyhteisön erot primäärisuknessiojatkumolla

Typensidontaa ja metaaninhapetusta havaittiin sekä valossa että pimeässä (Kuva 4) kaikissa kaasukäsittelyissä. Keskiarvojen perusteella typensitojat olivat kaikissa suknessiovaiheissa aktiivisempia valossa kuin pimeässä (Kuva 4A). Typensidonta oli suurinta valokäsittelyssä SJ3-vaiheessa. Yleisesti ottaen valo- ja pimeäkäsittelyn väliltä löytyikin ero  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (Mann-Whitney U:  $Z = -2,126$ ,  $n = 42$ ,  $P = 0,034$ ). Typensidontanopeuksien perusteella typensitojat olivat SJ3-vaiheessa ja SJ5-vaiheessa valossa kolme kertaa niin aktiivisia kuin pimeässä. Suknessiovaiheiden sisäisten erojen tarkastelussa kävi kuitenkin ilmi, että valo- ja pimeäkäsittely erosivat toisistaan tilastollisesti vain SJ4-vaiheessa  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (Taulukko 7).  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä valo- ja pimeäkäsittelyn välillä ei ollut eroja typensidonnassa ( $Z = -1,371$ ,  $n = 42$ ,  $P = 0,170$ ).

Metaaninhapetuksessa ei löytynyt tilastollisia eroja valo- ja pimeäkäsittelyn väliltä ( $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ :  $Z = -0,239$ ,  $n = 42$ ,  $P = 0,811$ ). Keskiarvojen perusteella metaaninhapetus oli voimakkainta SJ3- ja SJ4-vaiheissa (Kuva 4B).





Kuva 4. A) Typensitojien ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) ja B) metaaninhapettajien ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) aktiivisuus valo- ja pimeäkäsittelyssä eri suksessiovaiheissa  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (keskiarvo  $\pm$  S.D.).

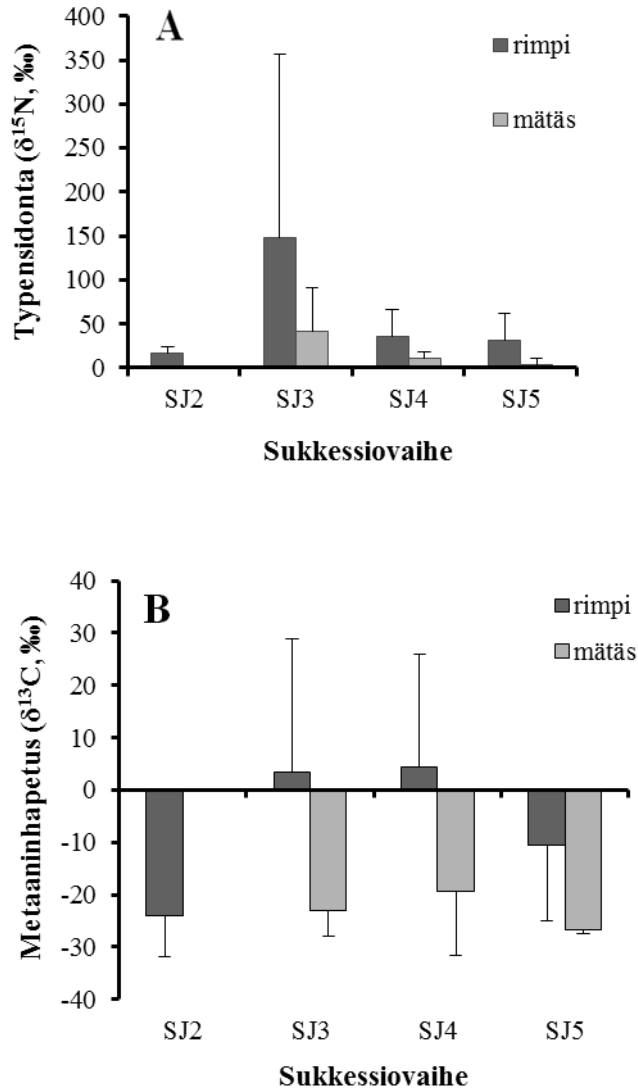
Taulukko 7. Typensidonnin erot valo- ja pimeäkäsittelyn välillä  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä suksessiojatkumolla. Mann-Whitney U -testin testisuure ( $U$ ), toistojen määrä ( $n$ ) ja tilastollinen todennäköisyys ( $P$ ).

		$\delta^{15}\text{N}$		
Kaasukäsittely	Suksessiovaihe	$U$	$n$	$P$
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	SJ2	3,0	12	0,513
	SJ3	11,0	12	0,262
	SJ4	5,0	12	0,037
	SJ5	9,0	12	0,150

Typensidontaa havaittiin kaikissa suksessiovaiheissa myös rimmissä ja mätäillä molemmilla kaasukäsittelyissä. Keskiarvot viittaavat typensitojien olleen aktiivisempia rimmissä kuin mätäillä (Kuva 5). Voimakkainta typensidontaa oli SJ3-vaiheen rimmissä. Typensidonnin nopeuksien perusteella typensitojat olivat rimmissä kuusikertaisesti aktiivisempia kuin mätäillä. Typensidonnassa olikin eroja mätäiden ja rimpjen välillä  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (Mann-Whitney U:  $Z = -2,821$ ,  $n=42$ ,  $P = 0,005$ ). Suksessiovaihekohtaisissa jatkotarkasteluissa selvisi kuitenkin, että mätäiden ja rimpjen typensidonnassa oli eroja vain SJ5-vaiheessa  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (Taulukko 8).  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä eroja mätään ja rimpjen typensidonnassa ei ollut ( $Z = -1,601$ ,  $n = 42$ ,  $P = 0,109$ ). SJ2-vaiheessa ei esiintynyt mätäs-rimpi -vaihtelua, joten siellä mikrobien aktiivisuus kuvaa aktiivisuutta rimmessä (Kuva 5).

Myös metaaninhapetuksessa oli eroja mätäiden ja rimpjen välillä  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä ( $Z = -2,542$ ,  $n = 42$ ,  $P = 0,011$ ). Typensitojien tavoin metaaninhapettajat

olivat aktiivisimpia rimpien rakkasammalissa. Voimakkainta metaaninhapetus oli SJ3- ja SJ4-vaiheiden rimmissä. Sukkessiovaihekohtaisissa jatkotarkasteluissa eroja mättään ja rimmen metaaninhapetuksessa löytyi SJ4- ja SJ5-vaiheiden soilta (Taulukko 8).



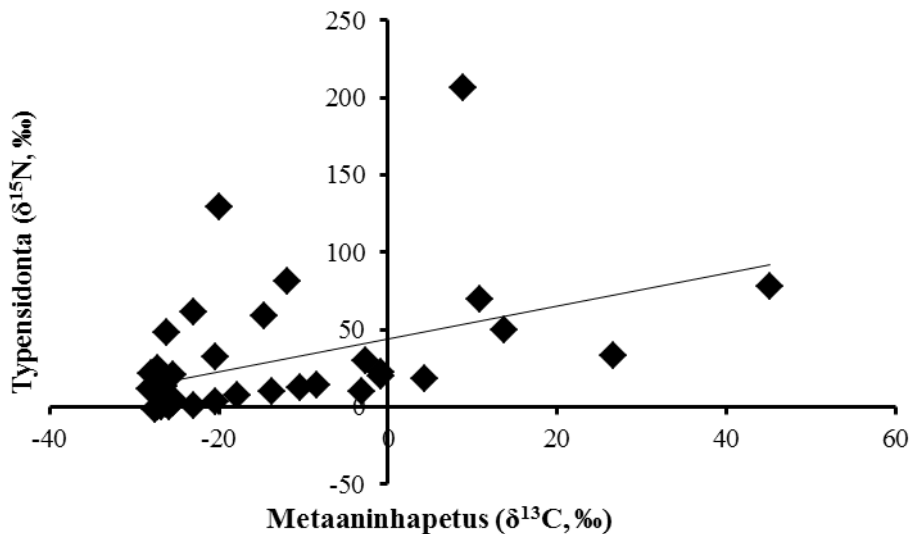
Kuva 5. Mätäs-rimpi -vaihtelun vaikutus A) typensidontaan ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) ja B) metaaninhapetukseen ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) eri sukkessiovaiheissa  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä (keskiarvo  $\pm$  S.D.).

Taulukko 8. Typensidonnan ja metaaninhapetuksen erot mättäiden ja rimprien välillä  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä sukessiojatkumolla. Mann-Whitney U -testin testisuure ( $U$ ), toistojen määrä ( $n$ ) ja tilastollinen todennäköisyys ( $P$ ).

Kaasukäsittely	Sukessiovaihe	$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$		
		$U$	$n$	$P$	$U$	$n$	$P$
$^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$	SJ3	10,0	12	0,200	8,0	12	0,109
	SJ4	9,0	12	0,150	4,0	12	0,025
	SJ5	4,0	12	0,025	0,0	12	0,004

#### 4.4. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen vaikuttavat ympäristötekijät

Metaaninhapetuksen ja typensidonnan väliltä löytyi positiivinen yhteys  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä (Spearman:  $r_s = 0,546$ ,  $n = 42$ ,  $P < 0,001$ ). Kun metaaninhapettajat olivat aktiivisia, myös typensä sidottiin enemmän (Kuva 6).



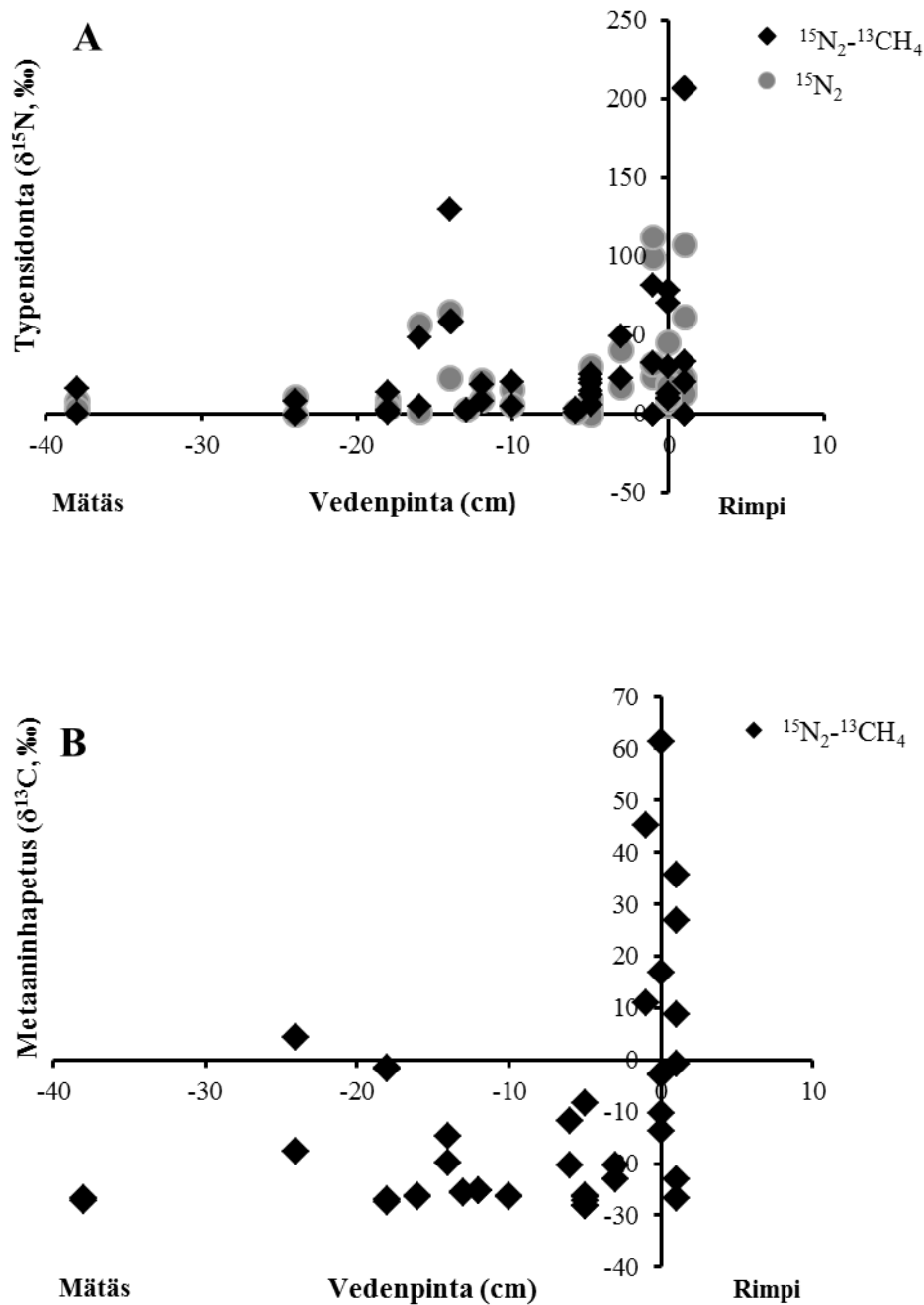
Kuva 6. Typensidonnan ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) ja metaaninhapetuksen ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) järjestyskorrelaatio  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä. Kuvan selkeyden vuoksi rimpeen sijoittuva typensidonnan huippuarvo ( $\delta^{15}\text{N}$ : 549) ja sitä vastaava metaaninhapetuksen arvo ( $\delta^{13}\text{C}$ : 35,6) jätettiin kuvasta pois.

Spearmanin järjestyskorrelaation (Taulukko 9) perusteella typensidonnan ja vedenpinnan tason välillä oli yhteys  $^{15}\text{N}_2$ -käsittelyssä. Typensidonta oli sitä suurempaa mitä määremmästä kohdasta näyte oli otettu.  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä korrelaatio löytyi vedenpinnan tason lisäksi koekäsittelyn aikana kertyneen lämpösumman ja typensidonnan väliltä. Rahkasammalissa havaittiin sitä enemmän typensidontaa mitä suurempi oli kertynyt lämpösumma. Lisäksi typensidonta oli suurempaa rimmissä kummassakin kaasukäsittelyssä (Kuva 7A).

Metaaninhapetus korreloi  $^{15}\text{N}_2\text{-}^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä suoveden metaanipitoisuuden, vedenpinnan tason, lämpösumman, pH:n ja kokeen keston kanssa. Metaaninhapetus oli sitä aktiivisempaa mitä suurempi oli suoveden metaanipitoisuus, kertynyt lämpösumma ja pH sekä mitä pidempään koekäsittely oli kestänyt. Suovedestä mitattujen pH:n,



metaanipitoisuuden ja hiilidioksidipitoisuuden vaihtelu on esitetty taulukossa 10. Myös metaaninhapetus oli aktiivisinta rimpien näytteissä (Kuva 7B).



Kuva 7. Vedenpinnan (cm) korkeuden suhde sammalten A) typensidontaan ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) koekäsittelyissä  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  ja B) metaaninhapetukseen ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰)  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä. Vedenpinnan tasoa kuvaavat negatiiviset arvot sijoittavat näytteenotokohdan mättäälle ja positiiviset arvot rimpeen. Kuvan selkeyden vuoksi kaksi rimpeen sijoittuvaa typensidontan huippuarvoa ( $\delta^{15}\text{N}$ :549 ja 377) jätettiin kuvasta A pois.

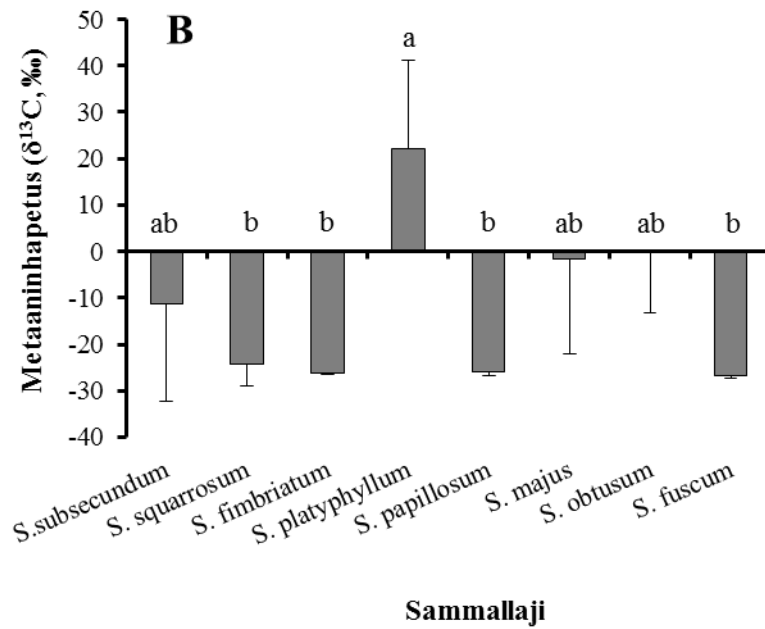
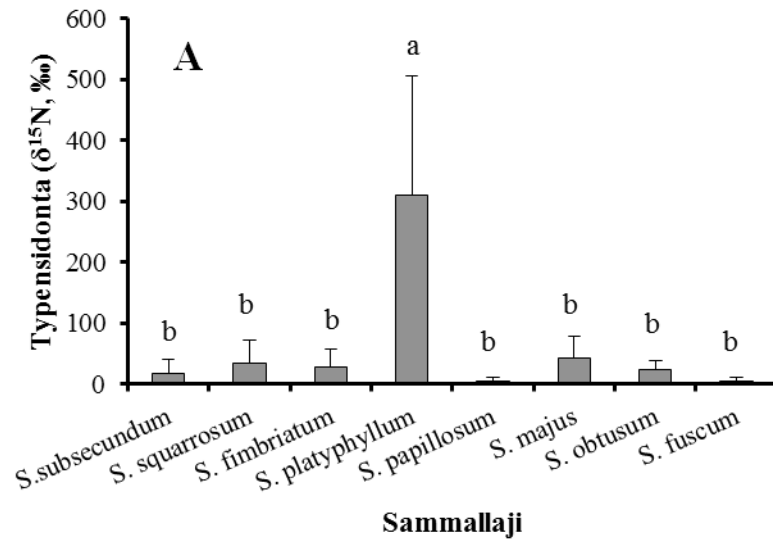
Taulukko 9. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen vaikuttavat ympäristötekijät ja koeolosuhteet. Spearmanin korrelaatiokerroin ( $r_s$ ), toistojen määrä (n) ja tilastollinen todennäköisyys (P). Vedenpinnan tasoa kuvaavat arvot kuten kuvassa 7A.

Kaasu- käsittely	Ympäristötekijät	$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$		
		$r_s$	n	P	$r_s$	n	P
$^{15}\text{N}_2$	pH	0,174	42	0,27	-0,319	42	0,04
	CO <sub>2</sub> (μM)	0,053	42	0,738	-0,465	42	0,002
	CH <sub>4</sub> (μM)	0,092	42	0,563	-0,393	42	0,010
	maan lämpötila (°C)	-0,006	42	0,967	0,413	42	0,007
	lämpösumma (°C)	0,317	38	0,053	-0,278	38	0,091
	vedenpinta (cm)	0,461	42	0,002	-0,268	42	0,086
	kokeen kesto (h)	0,186	42	0,238	-0,342	42	0,027
	kuivapaino (g)	0,039	42	0,806	-0,102	42	0,522
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	pH	0,177	42	0,261	0,508	42	0,001
	CO <sub>2</sub> (μM)	0,01	42	0,951	0,125	42	0,431
	CH <sub>4</sub> (μM)	0,053	42	0,739	0,335	42	0,030
	maan lämpötila (°C)	0,051	42	0,749	-0,079	42	0,619
	lämpösumma (°C)	0,393	38	0,015	0,662	38	0,001
	vedenpinta (cm)	0,585	42	0,001	0,656	42	0,001
	kokeen kesto (h)	0,235	42	0,133	0,331	42	0,032
	kuivapaino (g)	0,005	42	0,977	0,036	42	0,819

Taulukko 10. Suoveden pH:n, metaanin, CH<sub>4</sub> (μM) ja hiilidioksidin, CO<sub>2</sub> (μM), vaihteluvälit. Keskiarvo (ka), minimiarvo (min), maksimiarvo (max) ja keskihajonta (S.D.).

Ympäristötekijä	min	ka	max	S.D.
pH	4,5	5,3	6,1	0,4
CH <sub>4</sub> (μM)	0,7	41,3	140,4	45,0
CO <sub>2</sub> (μM)	482,7	1976,6	3606,4	902,1

Rahkasammallajien välillä oli eroja typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyissä (Taulukko 11). Sammallajeista *S. platyphyllum*issa typensidonta ja metaaninhapetus oli suurinta (Kuva 8). Tukeyn monivertailuissa paljastui, että *S. platyphyllum* erosi typensidonnaltaan muista sammalista  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyissä (P < 0,001, P < 0,001).  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyssä *S. platyphyllum* erosi *S. squarrosomista* (P = 0,003), *S. fimbriatumista* (P = 0,021), *S. papillosumista* (P = 0,002) ja *S. fuscumista* (P = 0,004).



Kuva 8. A) Typensidonta (δ<sup>15</sup>N, ‰) <sup>15</sup>N<sub>2</sub>- ja <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>-käsittelyissä ja B) metaaninhapetus (δ<sup>13</sup>C, ‰) <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-<sup>13</sup>CH<sub>4</sub>-käsittelyssä eri sammallajien välillä (keskiarvo ± S.D.). Eri kirjainsymbolein (a, b) merkityt sammallajit erosivat toisistaan merkitsevästi Tukeyn Post Hoc -testin mukaan. Suuret arvot tarkoittavat voimakkaampaa aktiivisuutta.

Taulukko 11. Erot sammallajien välillä typensidonnassa ( $\delta^{15}\text{N}$ ) ja metaaninhapetuksessa ( $\delta^{13}\text{C}$ )  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyissä. Kruskall-Wallis -testin testisuure ( $\chi^2$ ), vapausasteet (df) ja tilastollinen todennäköisyys (P).

Kaasukäsittely	$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$		
	$\chi^2$	df	P	$\chi^2$	df	P
$^{15}\text{N}_2$	15,365	7	0,032	19,018	7	0,008
$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	20,155	7	0,005	25,803	7	0,001

## 5. TULOSTEN TARKASTELU

### 5.1. Typensidonta primäärisuknessiojatkumolla

Tutkimukseni osoitti, että 1) suknessiovaiheet eivät eronneet toisistaan typensidonnassa. Typensidonta oli kuitenkin mesotrofisella sarasuolla monikymmenkertaista muihin suknessiovaiheisiin verrattuna. 2) Typensidontaan osallistuvan mikrobiyhteisön koostumuksessa oli havaittavissa eroja suknessiojatkumolla typensidonnassa ja metaaninhapetuksen vaihtelun sekä koekäsittelyjen välisten erojen perusteella. Sinibakteerien sekä metanotrofien ja muiden heterotrofien aktiivisuus vaihteli eri käsittelyissä suknessiojatkumolla. 3) Metaaninhapetuksen ja typensidonnassa välillä havaittiin yhteys. Metaanileiman sisältävässä käsittelyssä tyyppiä sidottiin enemmän kuin muissa käsittelyissä, ja mitä aktiivisempia metaaninhapettajat olivat, sitä enemmän tyyppiä sidottiin. Metanotrofit olivat siten merkittävä osa typensidontaan osallistunutta mikrobiyhteisöä. 4) Typensidonnassa vaihteluun vaikuttivat monet ympäristötekijät. Näistä vedenpinnan tasolla oli merkitys typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa. Metaaninhapetus ja typensidonta oli sitä voimakkaampaa, mitä märemmistä oloista sammalnäyte oli otettu. Typensidonta ja metaaninhapetus olikin suurinta rimpin sammalissa. Valo lisäsi typensidontaa kaikissa suknessiovaiheissa. Metaaninhapetus oli sitä suurempaa, mitä korkeampi pH oli ja mitä enemmän suovedessä oli metaania.

Suknessiovaiheet eivät eronneet merkittävästi toisistaan typensidonnassa suhteen kun koekäsittelyjä  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  tarkasteltiin erikseen. Näiden käsittelyjen typensidonnassa yhdistäminen toi kuitenkin eroja esille, kun tilastollisen tarkastelun kohteena olevan aineiston laajuus kasvoi. Mesotrofisen sarasuon korkeaa typensidontaa muihin suknessiovaiheisiin verrattuna tukevat aikaisemmat havainnot. Waughman & Bellamy (1980) vertailivat eri metsä- ja suoympäristöistä otettujen turvenäytteiden typensidontaa. Suurinta typensidontaa oli ravinteisilla sarasoilla ja heikointa ombrotrofisilla rahkasoilla. Samoin metsä- ja suoympäristöjen vertailussa ravinteisilla sarasoilla havaittiin korkein nitrogeenasientsyymien aktiivisuus (Basilier 1979). Myös Granhall & Selander (1973) havaitsivat typensidonnassa olevan suurempaa minerotrofisissa kuin ombrotrofisissa osissa suota. Lisäksi Golovchenko ym. (2007) havaitsivat, että typensidonnassa potentiaali oli suurempi minerotrofisilla kuin ombrotrofisilla soilla. Typensidonta oli minerotrofisilla soilla suurimmillaan  $0,6 \mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Havainto tukee tutkimuksessani mitattuja typensidonnassa arvoja. Saamani tulokset typensidonnassa nopeudesta ovat samansuuntaisia myös Krumholtzin ym. (1995) tulosten kanssa, joissa typensidonta oli suon

pintakerroksessa  $12 \mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Krumholtzin ym. (1995) typensidontakokeen aikana vallitsi  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  lämpötila, mikä saattaa selittää korkeampaa typensidontaa suhteessa Siikajoella mittaamaani suurimpaan sidontaan,  $2,7 \mu\text{mol N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Tutkimukseni aikana lämpötila vaihteli  $2\text{-}27 \text{ }^\circ\text{C}$  välillä Krumholtzin ym. (1995) koeolosuhteista poiketen. Selitys voi olla myös tutkimukseni soiden pohjoisempi sijainti. Typensidontaan liittyvien tulosten vertailua vaikeuttaa kuitenkin se, ettei havumetsävyöhykkeen soiden primäärisuknessiojatkumolta ole aikaisempaa tutkimustietoa typensidonnasta.

Zackrissonin ym. (2004) mukaan typensidonta riippuu niistä ekologisista tekijöistä, jotka vaihtelevat suknessiovaiheiden välillä. Havaintoa tukee se, että sammalversojen siirto metsän nuorista suknessiovaiheista vanhoihin metsiin lisäsi typensidontaa ja siirto vanhoista nuoriin vähensi typensidontaa (DeLuca ym. 2007). Typen saatavuus on yksi metsien ja soiden suknession aikana muuttuvista tekijöistä, joka voi selittää eroja suknessiovaiheiden välillä typensidonnassa (Rastetter ym. 2001). Yleisesti primäärisuknessiojatkumolla suknession alkuvaiheille on tyypillistä vähäinen typen saatavuus, koska suknessio alkaa vasta paljastuneella maalla, jossa ei ole juurikaan aikaisempaa orgaanista ainesta tai kasvillisuutta. Menge & Hedin (2009) havaitsivat, että metsän primäärisuknessiojatkumolla typen saatavuus oli heikkoa suknession alku- ja loppuvaiheissa, ja suurimmillaan keskivaiheissa. Ravinteisilla sarasoilla puolestaan tuottavuus on suknession keskivaiheilla verraten suurta, tyyppi sitoutunut biomassaan ja saatavilla olevan typen määrä siten vähäinen (Waughman & Bellamy 1980). Siikajoen suknessiojatkumolta ei ole aikaisempaa tutkimustietoa ravinnepitoisuuden vaihtelusta suknessiovaiheiden välillä. Vitousekin ym. (2002b) mukaan typensitojilla on kilpailuetu silloin kun tyyppiä on vähän. Myös Waughmanin & Bellamyn (1980) mukaan typensidonnan voimakkuus saattaa olla vaste lisääntyneeseen typen tarpeeseen. Onkin mahdollista, että myös Siikajoen suknessiojatkumolla havaitut suurimmat typensidonnat kertovat kasveille käyttökelpoisen typen vähäisyydestä sarasoilla. Myös Granhallin & Selanderin (1973) havainnot sammalten suuremmasta tuottavuudesta ja voimakkaammasta typensidonnasta viittaavat tyyppiä olleen vähän saatavilla juuri minerotrofisella suolla.

Erot typensidonnassa saattavat liittyä myös typensitojien mikrohabitaattiin, rahkasammaliin. Ensimmäisessä suknessiovaiheessa, luhtaniityllä, typensidonta oli vähäisintä. Selityksenä saattaa olla suknessiovaiheelle ominainen rahkasammalten vähäisyys ja sammalpeitteen epäyhtenäisyys. Mikrobeille ei ehkä ole tarjolla mikrohabitaatteja samalla tavalla kuin myöhäisemmissä suknessiovaiheissa. Syynä saattaa olla myös, etteivät typensidontaan pystyvät mikrobit ole ehtineet vielä kolonisoida rahkasammalia tässä suknessiovaiheessa kuten myöhäisemmissä vaiheissa. Ajatusta tukevat seinäsammaliin kohdistuneet tutkimukset sekundäärisuknessiojatkumoilla (Zackrisson ym. 2004, DeLuca ym. 2007). Seinäsammalten typensidonta riippui epifyyttisten sinibakteerien kolonisoinnista. Typensidonta seinäsammalissa oli suurinta suknession myöhäisemmissä vaiheissa, joissa sinibakteerien kolonisaatio seinäsammalten versoissa saavutti huippunsa ja ympäristössä oli vähän käyttökelpoista tyyppiä saatavilla. Sinibakteerien epätasainen kolonisaatio selitti myös eroja *Brachytecium sublicatum* -lajin versojen typensidonnassa (Smith 1984).

Suknessiovaiheista riippumatonta vaihtelua havaittiin typensidonnassa soiden välillä tyypileimakäsittelyssä. Mesotrofisen sarasuo-vaiheen suolla 5 havaittiin suurimmat typensidonnat, ja se erosi tilastollisesti suon 11 typensidonnasta. Nämä suon 5 huippusidonnat mitattiin rimmissä yhden sammallajin, *S. platyphyllum*, näytteissä. Suon 5 erot muiden soiden typensidontaan saattavatkin selittyä tämän sammalten mahdollisesti muista poikkeavalla fysiologialla. Suon 5 huippusidonnat vaikuttavat merkittävästi myös

mesotrofisen sarasuon typensidonnan keskiarvoon, ja ilman *S. platyphyllum* -lajia sukkessiovaiheiden typensidontanopeuksien väliset monikymmenkertaiset erot häviävät.

## 5.2. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen osallistuva mikrobiyhteisö

Tulokseni viittaavat siihen, että sukkessiojatkumolla typensidontaan osallistuivat sinibakteerit, metanotrofit ja muut heterotrofit. Luhtaniityllä tyyppiä saattoivat sitoa sekä sinibakteerit että heterotrofit. Metanotrofit eivät kaasukäsittelyjen erojen perusteella olleet kovin aktiivisia tässä sukkessiovaiheessa. Typensidonta ja metaaninhapetus oli voimakkainta sarasoilla metaanilisän sisältämässä käsittelyssä. Sarasoilla typensidontaa oli lisäksi eniten valossa rimprien näytteissä. Toisaalta myös metanotrofien metaaninhapetus oli suurinta näissä sukkessiovaiheissa, mikä voi kertoa myös niiden osallistuneen typensidontaan. Tätä tukee havainto pimeässä sidotusta tyypestä ja metaanilisäkäsittelyssä havaitut erot typensidonnassa mättäiden ja rimprien välillä. Myös muut heterotrofit saattoivat olla aktiivisia. Metaaninhapetus oli suurinta oligotrofisella sarasuolla, mikä saattaa tarkoittaa myös metanotrofien typensidonnan olleen suurinta tässä sukkessiovaiheessa. Typensidonta oli suurinta mesotrofisella sarasuolla valossa, mikä voi merkitä sinibakteerien olleen sukkessiovaiheen aktiivisimpia typensitojia. Sarasuo-rahkasuo -vaiheittoman soilla metaaninhapettajien aktiivisuus oli sarasoihin verrattuna vähäisempää. Metaanilisä ei lisännyt metanotrofien aktiivisuutta kuten sarasoilla, ja typensidonta oli suurempaa pelkässä typpikäsittelyssä. Tämä saattaa kertoa sinibakteerien sitoneen tyyppiä muita mikrobeja enemmän.

Typensitojat olivat kaikissa sukkessiovaiheissa aktiivisempia valossa kuin pimeässä. Sinibakteerit olivat siten merkittävä osa typensidontaan osallistuvaa mikrobiyhteisöä kaikissa sukkessiovaiheissa. Sarasoiden sammalten typensidonnan on havaittu olevan valosta riippuvaista jo aikaisemmin (Basilier & Granhall 1978, Basilier 1979). Metanotrofit saavat typensidontaan tarvittavan energian metaania hapettamalla (Auman ym. 2001). Niiden typensidontaan liittyvän aktiivisuuden esteenä ei siis ole yhteyttämisessä välttämätön valo. Tutkimuksessani valokäsittelyjen välillä ei löydetty eroja metaaninhapetuksessa.

Typensitojat olivat aktiivisempia rimmissä kuin mättäillä. Mättäiden ja rimprien typensidonnat erosivat toisistaan sarasuo-rahkasuo -vaiheittomalla, jossa suon pinnan mätäs-rimpi -vaihtelu oli sukkessiovaiheista voimakkainta. Mättäiden typensidonta väheni sukkession edetessä ja mätäs-rimpi -vaihtelun voimistuessa. Selitys voi olla sukkession aikana kasvava rimprien ja mättäiden korkeusero. Havaintoja tukee myös typensidonnan korrelaatio vedenpinnan tason kanssa.

Mättäiden ja rimprien väliset erot typensidonnassa tulivat esille metaanileiman sisältävässä käsittelyssä. Mätäs-rimpi -vaihtelu vaikuttikin erityisesti metanotrofien aktiivisuuteen, sillä aikaisempien tutkimustulosten mukaisesti metaaninhapetus oli voimakkainta rimprien vesikylläisissä sammalissa (Raghoebarsing ym. 2005, Kip ym. 2010, Larmola ym. 2010). Basiliko ym. (2004) havaitsivat, että metaaninhapetus oli suurinta lammessa, keskisuurta sarasoiden rimmissä ja pienintä sarasoiden mättäillä sekä rahkasoiden rimmissä ja mättäillä. Tämä tukee myös havaintoani siitä, että metaaninhapetus oli suurempaa rimmissä kuin mättäillä ja suurempaa sarasoilla kuin sarasuo-rahkasuo -vaiheittomalla. Kuten typensidonnassa, metaaninhapetuksessa oli eroja mättään ja rimmen välillä etenkin viimeisissä sukkessiovaiheissa.

Kravchenkon & Doroshenkon (2003) mukaan typensidonnan aktiivisuuteen vaikuttaa eniten sidontaan kuluvan energian, mm. hiilen, saatavuus. Tutkimuksessani metaanilisän

sisältävässä käsittelyssä metanotrofit hapettivat metaania, ja tämän energianlähteen turvin saattoivat myös sitoa typpeä. Metaaninhapetusta havaittiin typensidonnan tavoin kaikissa sukkessiovaiheissa. Sukkessiovaiheiden ja käsittelyjen välillä oli myös eroja metanotrofien aktiivisuudessa. Oligotrofisella sarasuolla metaaninhapetus oli suurinta ja myös kaasukäsittelyjen väliset erot tulivat esiin. Metaaninhapetus oli kuitenkin alle kymmenesosa muissa tutkimuksissa saaduista arvoista (Taulukko 11).

Taulukko 11. Metaaninhapetuksen suurimmat arvot eri tutkimuksissa.

Tutkimus	$\mu\text{mol C g}^{-1} \text{d}^{-1}$
Oma tutkimus	9,6
Krumholtz ym. 1995	38,4
Basiliko ym. 2004	3164
Raghoebarsing ym. 2005	20
Kip ym. 2010	80
Larmola ym. 2010	62

Tutkimuksessani typensidontaa havaittiin rahkasammalissa kaikissa sukkessiovaiheissa ja koekäsittelyissä. Tämä kertoo mikrobiyhteisön monimuotoisuuden lisäksi siitä, että rahkasammalet ovat typensidontaan ja metaaninhapetukseen osallistuvien mikrobien mikrohabitaatteja. Mikrobeille on siis oltava edullista elää yhteydessä rahkasammaliin. Päätelmää vahvistavat etenkin metanotrofeihin kohdistuneet tutkimukset. Pohjoisilla soilla vedenpinta on tavallisesti korkea. Sammalkerroksen pinta onkin ehkä ainut osa suosta, jossa metaaninhapetus onnistuu hapellisten olojen ansiosta (Basiliko ym. 2004). Kipin ym. (2010) tutkimuksessa kaikissa elävissä sammalissa havaittiin metaaninhapetusta, mikä myös kertoo metanotrofien yleisyydestä sammalissa. Kipin ym. (2010) mukaan ilmiö voi johtua siitä, että mikrobit voivat elää sammalissa kohtuullisen pysyvässä ympäristössä suon syvyysprofiilin metaanigradientilla. Myös sammalelta saatu happi voi hyödyttää metanotrofeja. Sammalet puolestaan hyötyvät metanotrofien aktiivisuudesta etenkin jos hiilidioksidia on muuten vähän saatavilla. Vedessä hiilidioksidin siirtyminen sammaleen on hitaampaa kuin ilmassa. Siksi metaaninhapetus hyödyttää sammalia eniten rimmisissä. Tämä voi olla osasyynä myös rimpien sammalissa havaittuihin korkeampiin typensidontoihin mättäiden sammaliin verrattuna. Myös muiden typensitojien, sinibakteerien ja heterotrofien sidonta sammalnäytteissä vahvistaa niiden elävän jonkinlaisessa yhteydessä rahkasammaliin. Tutkimukseni ei kuitenkaan tarjoa tarkkaa tietoa typensitojien ja metaaninhapettajien sijainnista sammalissa. Typensidonta näytteissä ei välttämättä ole peräisin ainoastaan rahkasammalten pinnan ja solukoiden mikrobiaktiivisuudesta. Näytepulloihin lisätty suovesi saattoi rahkasammalten lisäksi sisältää mikrobeja, jotka sitoivat typpeä koekäsittelyn aikana. Toisaalta aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että typensitojat (Basilier & Granhall 1978, Basilier 1980) ja metaaninhapettajat (Raghoebarsing ym. 2005, Kip ym. 2010) ovat aktiivisia kun ne elävät sammalten päällä tai kokonaan tai osittain niiden sisällä. Raghoebarsing ym. (2005) havaitsivat, ettei pelkässä suovedessä tapahtunut metaaninhapetusta. Voidaankin olettaa, että tutkimuksessani typpeä sitoneet ja metaania hapettaneet mikrobit muodostavat jonkinasteisen vuorovaikutussuhteen rahkasammalten kanssa.

### 5.3. Typensidontaan ja metaaninhapetukseen vaikuttavat ympäristötekijät

Typensidontaan liittyvästä ekologisesta säätelystä on vasta vähän tutkimustietoa (Vitousek ym. 2002a). Tiedetään, että vedenpinnan tason alapuolella happipitoisuus laskee, mikä edesauttaa nitrogeenaasientsyymien toimintaa (Rydin & Jeglum 2006, Glime 2007). Tässä työssä havaittu vedenpinnan tason vaikutus typensitojien aktiivisuuteen voi selittyä myös sammalten vesipitoisuuden vaihtelulla mättäiden ja rimprien sammalien välillä. Vedenpinnan alapuolella sammatet ovat vesikylläisiä. Jo Smith (1984) havaitsi, että mitä suurempi oli sammalten vesipitoisuus, sitä suurempaa oli typensidonta. Kosteuden merkitys korostui etenkin kun vallitsi typensidonnalle optimaalinen lämpötila.

Se, että happamuus ei tässä työssä vaikuttanut typensidontaan, on ristiriidassa aikaisempien tutkimusten kanssa, joiden mukaan pH vaikuttaa typensidontaan ja siihen osallistuvan mikrobisyhteisön koostumukseen sekä vuorovaikutuksiin mikrobien välillä (Granhall & Selander 1973, Basilier 1979, Smith 1984, Krumholtz ym. 1995). Toisaalta Basilier & Granhall (1978) ja Basilier (1979) eivät myöskään havainneet yhteyttä pH:n ja typensidonnin välillä. Tutkimuksessani havaittiin korrelaatio lämpösumman ja typensidonnin välillä metaanilisän sisältävässä käsittelyssä. Mitä suurempi lämpösumma koealalla oli kertynyt, sitä suurempaa oli typensidonta. Myös muissa tutkimuksissa lämpötila on vaikuttanut sidontaan (Basilier & Granhall 1978, Smith 1984). Gentilin ym. (2005) mukaan eri mikrobeilla saattaa olla erilaiset vasteet lämpötiloihin.

Aikaisemmat tutkimukset vahvistavat vedenpinnan tason vaikuttavan metaaninhapetukseen saamieni tulosten tavoin (Basiliko ym. 2004, Kip ym. 2010, Larmola ym. 2010). Larmolan ym. (2010) mukaan metanotrofien kolonisoiminen veden välityksellä voi mahdollisesti myös selittää vedenpintaan liittyviä metanotrofien aktiivisuuden muutoksia. Lisäksi sammalten suhteellisen kosteuden ja vedenpidätyskyvyn on todettu vaikuttavan metaaninhapetukseen (Krumholtz ym. 1995, Larmola ym. 2010) Krumholtzin ym. (1995) mukaan spatiaalisen vaihtelun merkitys metaaninhapetuksessa saattoi johtua vedenpinnan tason vaihtelusta. Metaanipitoisuuden vaihtelulla voikin olla myös vedenpinnan tason vaihtelun kautta vaikutus metaaninhapetukseen (Basiliko ym. 2004).

Typensidonta ja metaaninhapetus oli voimakkainta *S. platyphyllum* -lajissa. *S. platyphyllum* -lajin typensidonnasta ja metaaninhapetuksesta ei ole aikaisempaa tutkimustietoa. Sammallajien väliltä on kuitenkin aikaisemmissa tutkimuksissa löydetty eroja typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa. Erot sammalten sidonnoissa voivat johtua sammalten välisistä fysiologisista eroista, niiden lähiympäristössä elävien mikrobisyhteisöjen eroista tai sammalten kasvupaikkojen välisistä eroista (Basiliko ym. 2004, Opelt ym. 2007, Markham 2009). Tutkimuksessani sammalten välisiä eroja sidonnoissa voivat selittää vesipitoisuuteen liittyvät ympäristötekijät ja fysiologiset tekijät. Suurimmat typensidonnat havaittiin *S. platyphyllum* -näytteissä rimmessä. Huippusidontoja havaittiin kuitenkin vain tässä yhdessä rimmen sammallajissa. Rahkasammalten väliset mahdolliset erot fysiologiassa voivat selittää eroja rimprien sammalten välillä. Granhall & Hoffsten (1976) havaitsivat sammallajin vaikuttavan siihen, onko rahkasolukoissa typensidontaan osallistuvia bakteereja. Rice ym. (2008) mukaan sammalten vesipitoisuuden ja rahkasolujen koon välillä voi olla yhteys. Rahkasammallajien väliset erot vedenpidätyskyvyssä saattavatkin vaikuttaa metaaninhapetukseen vedenpinnan tasosta riippumatta (Larmola ym. 2010).



#### 5.4. Typensidonnan merkitys primäärisuknessiojatkumolla

Näkemykset biologisen typensidonnan merkityksestä ovat olleet vaihtelevia. Kravchenkon & Doroshenkon (2003) tutkimuksessa typensidonta turvenäytteissä oli vähäistä. Mengen & Hedinin (2009) mukaan typensidonta on yhtä tärkeä typen lähde kuin laskeumana saatava typi metsän primäärisuknessiojatkumolla. Waughman & Bellamy (1980) sekä Gerdol ym. (2006) painottavat, että typensidonta on vain osa suon typenlähteestä, mutta niukkaravinteisissa olosuhteissa sen merkitys voi korostua. Granhallin & Selanderin (1973) mukaan ombrotrofisissa osissa suota, tai alhaisessa pH:ssa typensidonnalla voi olla suurempi merkitys kuin laskeumana saatavalla typellä. Lisäksi typensidonta kerryttää ravinteita ja edesauttaa siten suknessiota, kuten on havaittu Andien vuoristossa jään alta paljastuneen maan primäärisuknession alkuvaiheita tutkittaessa (Schmidt ym. 2009). Tutkimuksessani typensidonnan merkityksen puolesta puhuu typensidonnan monimuotoisuus. Koska typensidonta ja metaaninhapetus vaikuttavat aineiden kiertoon suoekosysteemissä, ja niihin osallistuvat mikrobit elävät sammalissa tai niiden kiinteässä lähiympäristössä, rahkasammalilla on merkittävä rooli typen ja hiilen kiertoon vaikuttavissa mikrobiologisissa prosesseissa.

Typen vaikutuksia hiilidynamiikkaan on tutkittu lähinnä typenlisäys -menetelmillä (Aerts ym. 1992, Aerts ym. 2001, Gerdol ym. 2006, Wiedermann ym. 2009). Tiedot metaaninhapetuksen ja typensidonnan välisestä yhteydestä ovat kuitenkin puutteellisia ja ristiriitaisia (Bodelier & Laanbroek 2004). Metanotrofit tarvitsevat typpeä kasvuun ja keskeisten elintoimintojen ylläpitämiseen (Bodelier & Laanbroek 2004). Typensidonta on kuitenkin energieettisesti kallista, ja siksi metanotrofeille on edullisempaa käyttää typenlähteenään vapaasti saatavilla olevia typen epäorgaanisia muotoja. Ympäristöissä, joissa typpeä on vähän saatavilla, typensidonta ja metaaninhapetus saattavat liittyä yhteen hyvinkin läheisesti. Ilmiön taustalla vaikuttavat tekijät tunnetaan kuitenkin huonosti. Typen vaikutus metaaninhapetukseen voi liittyä metanotrofien kasvuun, suoraan metaaninhapetusprosessiin tai säädellä metanotrofien populaation kokoa. Sarasoiden ja rahkasoiden välisiä eroja metaanipäästöissä on myös selitetty typen ja metaaninhapetuksen yhteydellä. Vastoin yleisiä tuloksia Updegraff ym. (2001) havaitsivat, että sarasuolla oli alhaisemmat metaanipäästöt kuin rahkasuolla. Tutkimuksessani metanotrofit olivat aktiivisimpia sarasuolla, joilla myös typpeä sidottiin enemmän kuin muissa vaiheissa. Ehkä metanotrofien itse sitoma tai muiden mikrobien sitoma typi lisäsi myös metaaninhapetusta. Typensidonnan ja metaaninhapetuksen vuorovaikutusta on kuitenkin haasteellista arvioida, sillä tutkimustietoa aiheesta ei ole juurikaan saatavilla. Onkin vaikea lopulta tietää, lisäkö metaanilisa tutkimuksessani metanotrofien metaaninhapetusta ja siten niiden typensidontaa vai typen lisäys tai muiden mikrobien typensidonta metanotrofien metaaninhapetukseen liittyvää aktiivisuutta sarasuolla.

#### 5.5. Otokoon riittävyys ja muut mahdolliset virhelähteet

Tulosten perusteella on ilmeistä, ettei otoskoko ollut riittävä tutkimuskysymyksiin vastaamiseen. Toistojen alhainen määrä lisäsi tilastollista riskiä, eivätkä suknessiovaiheiden väliset erot olleet lopulta merkitseviä. Suotoistojen määrää lisäämällä tilastolliset erot typensidonnassa suknessiovaiheiden ja käsittelyjen välillä olisivat voineet vahvistua. Toistojen lisääminen olisi voinut mahdollisesti lisätä myös numeraalisen aineiston normaalisuutta, ja tarkastelussa olisi voitu käyttää parametrillisia testejä.

Aineiston keräämiseen liittyy mahdollisia riskitekijöitä. On mahdollista, että käyttämämme suknessiovaiheiden luokitukset eivät päde kaikkien näytteiden kohdalla.

Oligotrofiseksi sarasuoksi karkeasti luokitellulta sukkessiovaiheelta kerättiin näytelajiksi rimmistä *S. subsecundum*, joka joidenkin luokittelujen mukaan edustaa mesotrofiaa (Eurola ym. 1992, Laine ym. 2009).

Vaikka koekäsittelyt tehtiin soilla saman viikon aikana, päivien välillä oli eroja säässä ja lämpötilassa. Lämpösumman korrelaatiot typensidonnan ja metaaninhapetuksen kanssa voivat selittyä myös jollain muulla taustamuuttujalla. Lisäksi suolta 6 ei saatu lämpötila-aineistoa alalta puuttuneen tallentavan lämpötilamittarin vuoksi.

Mätäs-rimpi -vaihtelua tutkittaessa näytteiden välillä oli selvä ero kosteudessa. Kosteuden on aikaisemmissa tutkimuksissa osoitettu vaikuttavan typensidontaan ja metaaninhapetukseen sammalissa (Smith 1984, Krumholtz ym. 1995, Larmola ym. 2010). Vaikka mättäiden ja rimpien sammalnäytteisiin lisättiin saman verran suovettä, lähtökohtaisesti rimpien näytteissä oli enemmän vettä. On siis mahdollista, että rimpien näytteissä oli enemmän sidontaa sen vuoksi, että näytteet olivat valmiiksi mämpiä kuin mättäiden näytteet. Näytteenoton haastavuutta mättäiltä ja rimmistä lisäsi mätäs-rimpi -vaihtelun erot sukkessiovaiheiden välillä. Sarasoilla suon pinnan mätäs-rimpi -vaihtelu ei ollut vielä kovin yhtenäistä, ja mättäät olivat paikoitellen melko pieniä ja matalia. Sammalnäytteeseen saattoi näillä aloilla tulla näytteenotossa mukaan myös sammalia rimmen ja mättään rajapinnalta. Tällä voi olla merkitystä sarasoilla havaituissa korkeammassa typensidonnoissa. Basilier & Granhall (1978) havaitsivat, että sinibakteerien kolonisaatio oli suurta etenkin sammalyhteisöjen ja avoimen veden välisen rajapinnan sammalissa. Tulevissa tutkimuksissa näytteenottoon rimmistä ja mättäiltä tulisikin kiinnittää enemmän huomiota. Toisaalta vedenpinnan tason korrelointi typensidonnan kanssa ottaa huomioon myös eri korkeudelta suhteessa vedenpintaan otetut sammalnäytteet.

Rahkasammallajien valinta näytelajeiksi perustui aikaisempiin Siikajoen sukkessiojatkumolla tehtyihin tutkimuksiin. Sammallajit olivat siksi näytelajeina melko satunnaisesti (Taulukko 1). *S. squarrosom* oli sekä rimmen että mättään näytelajina eri sukkessiovaiheissa. *S. platyphyllum*, *S. obtusum* ja *S. fimbriatum* -lajeista oli puolestaan vain yksi näyte kustakin. Lajikohtaisten erojen vertailu sidonnoissa on siksi haasteellista. *S. platyphyllum* -lajissa havaitun muista lajeista selvästi eronneen typensidonnan tason vuoksi olisi kiinnostava selvittää tarkemmin syitä erojen taustalla. Menetelmän valtalajien valinnasta tutkimuslajeiksi voisi mahdollisesti vaihtaa tiettyjen lajien tarkasteluun koko sukkessiojatkumolla mahdollisuuksien mukaan. Metaaninhapetusta eri sammalissa on tutkittu pohjoisilla soilla vastaavalla menetelmällä (Basiliko ym. 2004). Menetelmää muuttamalla mikrobien mikrohabitaatti säilyisi sammalen osalta samana, ja vain sukkessiovaihekohtaiset ympäristöolosuhteet ja muut ekologiset tekijät muuttuisivat. Yleisyyden perusteella sukkessiojatkumon tutkimuslajeja voisivat olla *S. papillosum*, *S. squarrosom* ja *S. subsecundum*. Lisäksi *S. platyphyllum* -lajin typensidontaa olisi kiinnostavaa tutkia esimerkiksi sijoittamalla sammallajin näytteitä eri kasvuympäristöihin sukkessiojatkumolla. Näin voitaisiin vertailla lajeista ja ympäristötekijöistä johtuvia eroja typensidonnassa.

Koska kuivapaino ja inkubointiaika eivät korreloineet typensidonnan ( $\delta^{15}\text{N}$ ) kanssa, voidaan todeta, että nämä sidonnat ovat keskenään vertailukelpoisia ja koe onnistunut. Kuivapainolla ei ollut vaikutusta myöskään metaaninhapetukseen ( $\delta^{13}\text{C}$ ). Sen sijaan koekäsittelyjen kesto korreloi metaaninhapetuksen kanssa. Ne näytteet, joissa koekäsittely oli kestänyt pitempään, olivat sitoneet enemmän hiiltä.

## JOHTOPÄÄTÖKSET

Ekosysteemitason tutkimus on tärkeää, jotta voidaan ennustaa ihmistoimien vaikutuksia ympäristöön ja suojella riittävästi erilaisia elinympäristöjä. Erityisesti kasvien merkitys aineiden kierrossa on osoittautunut huomattavaksi. Suomessa suoekosysteemien tilaan on vaikuttanut merkittävästi ojittaminen (Päivänen & Paavilainen 1996, Joensuu 2004). Niin Suomessa kuin muuallakin maailmassa soiden kuivaaminen viljelymaaksi, metsän kasvatukseen soveltuvaksi tai turpeen energiakäyttöön (Asplund 1996) jatkuu edelleen ja muodostaa uhan niin soiden omaleimaiselle lajistolle kuin aineiden kierrolle ekosysteemeissä (Waughman & Bellamy 1980). Ihmistoiminnan vaikutukset kohdistuvat soiden hydrologiaan suorasti ja epäsuorasti. Vedenpinnan taso on yksi tärkeimmistä suon ominaisuuksiin ja kasvillisuuteen vaikuttavista tekijöistä (Rydin & Jeglum 2006). Tutkimukseni osoitti aikaisempia tutkimuksia tukien vedenpinnan tason tärkeyden myös mikrobiologisissa prosesseissa, biologisessa typensidonnassa ja metaaninhapetuksessa. Soiden hydrologian järkkymisellä voi olla siten kauaskantoisia seurauksia myös typen ja hiilen kierrolle suoekosysteemeissä. Jotta on mahdollista ennustaa, miten suoekosysteemit reagoivat ympäristön muutoksiin, on kehitettävä tietämystä aineiden kiertoon vaikuttavista tekijöistä suoekosysteemeissä.

Tutkimukseni osoitti, että typensidonta on prosessina varsin monimuotoinen. Typensidontaan voivat vaikuttaa niin ympäristötekijät kuin muutokset mikrobiyhteisön koostumuksessa tai aktiivisuudessa, sekä mahdollisesti vuorovaikutussuhteet rahkasammalten ja eri mikrobien välillä. Sukkession kehityskulut ja niiden mukanaan tuomat muutokset ympäristössä ja sammalpeitteen rakenteessa vaikuttavat typensidontaan ja metaaninhapetukseen sekä niihin osallistuvaan mikrobiyhteisöön. Koska typensidontaa esiintyi kaikissa sukkessiovaiheissa ja koekäsittelyissä, typensidontaa voidaan ajatella olevan yksi suoekosysteemin typen kiertoon vaikuttavista tekijöistä. Saamani tulokset korostavat myös rahkasammalten roolia suoekosysteemille keskeisissä mikrobiologisissa prosesseissa, metaaninhapetuksessa ja typensidonnassa. Typensidontaan ja metaaninhapetuksen välillä havaitun yhteyden perusteella nämä mikrobiologiset prosessit liittyvät rahkasammalet merkittäväksi osaksi myös maailmanlaajuisesta hiilenkiertoa.

Lisää tutkimusta tarvitaan, jotta voidaan selvittää tarkemmin typensidontaan osallistuvan mikrobiyhteisön koostumusta ja typensitojien aktiivisuuteen vaikuttavia tekijöitä eri sukkessiovaiheissa. Jatkossakin typensidontaa on syytä tarkastella suhteessa metanotrofeihin ja hiilen kiertoon. Tämä tutkimus on kohdistettava tulevaisuudessakin soiden valtalajeihin ja mikrobiologisten prosessien mikrohabitaattina toimiviin rahkasammaliin.

## KIITOKSET

Kiitän ohjaajiani Tuula Larmolaa, Eeva-Stiina Tuittilaa ja Sanna Leppästä kiinnostavan tutkimusaiheen tarjoamisesta ja innostuksen sytyttämisestä soiden mikrobiekologiaan. Suuri kiitos Tuulalle ja Sannalle avusta aineiston keräämisessä ja analysoinnissa, työn kommentoinnista sekä siitä, että olitte läsnä työn kaikissa vaiheissa. Haluan kiittää lämpimästi myös ohjaajaani Jari Haimia opintojen alusta Pro Gradu -työn viime vaiheisiin kestäneestä kannustuksesta ja rohkaisemisesta itsensä haastamiseen. Opintoni ja Pro Gradu -työni eivät olisi valmistuneet ilman perheeni, isovanhempieni, ystävieni ja Markun tukea. Kiitos teille innostukseni jakamisesta ja kaikesta siitä tuesta, jonka olen teiltä saanut matkalla kohti haaveeni toteuttamista.

## KIRJALLISUUS

- Aerts R., Wallén B. & Malmer N. 1992. Growth-limiting nutrients in *Sphagnum*-dominated bogs subject to low and high atmospheric nitrogen supply. *J. Ecol.* 80: 131–140.
- Aerts R., Wallén B., Malmer N. & de Caluwe H. 2001. Nutritional constraints on *Sphagnum*-growth and potential decay in northern peatlands. *J. Ecol.* 89: 292–299.
- Aldous A. R. 2002. Nitrogen retention by *Sphagnum* mosses: responses to atmospheric nitrogen deposition and drought. *Can. J. Bot.* 80: 721–731.
- Asplund D. 1996. Energy use of peat. Teoksessa: Vasander H. (toim.), *Peatlands in Finland*, Finnish Peatland Society, Gummerus, Helsinki, 107–113.
- Auman A. J., Speake C. C. & Lidstrom M. E. 2001. nifH Sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4009–4016.
- Basilier K. 1979. Moss-associated nitrogen fixation in some mire and coniferous forest environments around Uppsala, Sweden. *Lindbergia* 5: 84–88.
- Basilier K. 1980. Fixation and uptake of nitrogen in *Sphagnum* blue-green algal associations. *Oikos* 34: 239–242.
- Basilier K. & Granhall U. 1978. Nitrogen fixation in wet minerotrophic moss communities of a subarctic mire. *Oikos* 31: 236–246.
- Basiliko N., Knowles R. & Moore T. R. 2004. Roles of moss species and habitat in methane consumption potential in a northern peatland. *Wetlands* 24: 178–185.
- Bodelier P. L. E., Roslev P., Henckel T. & Frenzel P. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403: 421–424.
- Bodelier P. L. E. & Laanbroek H. J. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 265–277.
- Brown D. H. 1982. Mineral nutrition. Teoksessa: Smith A. J. E. (toim.), *Bryophyte ecology*, Chapman & Hall, New York, 383–444.
- Bunting M. J. & Warner B. G. 1998. Hydroseral development in southern Ontario: patterns and controls. *J. Biogeogr.* 25: 3–18.
- Chen Y. & Murrell J. C. 2010. Methanotrophs in moss. *Nat. Geosci.* 3: 595–596.
- Clymo R. S. & Hayward P. M. 1982. The Ecology of *Sphagnum*. Teoksessa: Smith A. J. E. (toim.), *Bryophyte ecology*, Chapman & Hall, New York, 229–289.
- Davis J. B., Coty V. F. & Stanley J. P. 1964. Atmospheric nitrogen fixation by methaneoxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 88: 468–472.
- DeLuca T. H., Zackrisson O., Nilsson M. C. & Sellstedt A. 2002. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature* 419: 917–920.
- DeLuca T. H., Zackrisson O., Gentili F., Sellstedt A. & Nilsson M. C. 2007. Ecosystem controls on nitrogen fixation in boreal feather moss communities. *Oecologia* 152: 121–130.
- Ekman M. 1996. A consistent map of the postglacial uplift of Fennoscandia. *Terra Nova* 8: 158–165.

- Eurola S., Bendiksen K. & Rönkä A. 1992. *Suokasviopas – Oulanka Reports*. Oulangan biologinen asema, Oulun yliopisto, 205 s.
- Eurola S., Huttunen A. & Kukko-Oja K. 1995. *Suokasvillisuusopas- Oulanka Reports*. Oulangan biologinen asema, Oulun yliopisto, 85 s.
- Flett R. J., Rudd J. W. M. & Hamilton R. D. 1975. Acetylene reduction assays for nitrogen fixation in freshwaters: a note for caution. *Appl. Microbiol.* 29: 580–583.
- Fry B. 2006. *Stable isotope ecology*. Springer, New York, 308 s.
- Galloway J. N., Dentender F. J., Capone D. G., Boyer E. W., Howarth R. W., Seitzinger S. P., Asner G. P., Cleveland C.C., Green P. A., Holland E. A., Karl D. M., Michaels A. F., Porter J. H., Townsend A. R & Vörösmarty C. J. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70: 153–226.
- Gavazov K. S., Soudzilovskaia N. A., van Logtestijn R. S. P., Braster M. & Cornelissen J. H. C. 2010. Isotopic analysis of cyanobacterial nitrogen fixation associated with subarctic lichen and bryophyte species. *Plant Soil* 333: 507–517.
- Gentili F., Nilsson M-C., Zackrisson O., DeLuca T. H. & Sellstedt A. 2005. Physiological and molecular diversity of feather moss associative N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* 56: 3121–3127.
- Gerdol R., Bragazza L. & Brancaloni L. 2006. Microbial nitrogen cycling interacts with exogenous nitrogen supply in affecting growth of *Sphagnum papillosum*. *Environ. Exp. Bot.* 57: 1–8.
- Glime J. M. 2007. *Bryophyte ecology*. Volume 1. E-kirja, Michigan Technological University, International Association of Bryologists. Luettu 20.7.2010 <http://www.bryoecol.mtu.edu>
- Golovchenko A. V., Tikhonova E. Y. & Zvyagintsev D. G. 2007. Abundance, biomass, structure, and activity of the microbial complexes of minerotrophic and ombrotrophic peatlands. *Microbiology* 76: 630–637.
- Gorham E. 1991. Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol. Appl.* 1: 182–195.
- Granhall U. & Hofsten A. V. 1976. Nitrogenase activity in relation to intracellular organisms in *Sphagnum* mosses. *Physiol. Plant.* 36: 88–94.
- Granhall U. & Selander H. 1973. Nitrogen fixation in a subarctic mire. *Oikos* 24: 8–15.
- Haaker H. & Klugkist J. 1987. The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 57–71.
- Hämet-Ahti L., Suominen J., Ulvinen T., Uotila P. & Vuokko S. 1998. *Retkeilykasvio*. Luonnontieteellinen keskusmuseo, Kasvimuseo, Helsinki, 656 s.
- Högmander H., Kankainen A. & Nissinen K. 2009. Varianssianalyysi. Teoksessa: Högmander H., Kankainen A., Kärkkäinen S., Leskinen E., Lyyra A-L., Nissinen K & Pahkinen E. (toim.), *Tilastolliset analyysimenetelmät osa 1*. Matematiikan ja tilastotieteen laitos, Jyväskylän yliopisto, 39–40.
- Joensuu S. 2004. Suot. Teoksessa: Kuuluvainen T., Saaristo L., Keto-Tokoi P., Kostamo J., Kuuluvainen J., Kuusinen M., Ollikainen M. & Salpakivi-Salomaa P. (toim.), *Metsän kätköissä – Suomen metsäluonnon monimuotoisuus*, Edita Publishing Oy, Helsinki, 285–292.

- Kip N., van Winden J. F., Pan Y., Bodrossy L., Reichart G.-J., Smolders A. J. P., Jetten M. S. M., Sinninghe Damsté J. S. & Op de Camp H. J. M. 2010. Global prevalence of methane oxidation by symbiotic bacteria in peat-moss ecosystems. *Nat. Geosci.* 3: 617–621.
- Klinger L. F. & Short S. K., 1996. Succession in the Hudson Bay Lowland, Northern Ontario, Canada. *Arctic Alpine res.* 28: 172–183.
- Kravchenko I. K. & Doroshenko E. V. 2003. Nitrogen-fixing activity in peat soils from a raised bog. *Microbiology* 72: 98–102.
- Krumholtz L. R., Hollenback J. L., Roskes S. J. & Ringelberg D. B. 1995. Methanogenesis and methanotrophy within a *Sphagnum* peatland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 215–224.
- Laine, A. Juurola, E., Hajek, T., Tuittila, E.-S. 2011. *Sphagnum* growth and ecophysiology during mire succession. *Oecologia* DOI: 10.1007/s00442-011-2039-4.
- Laine J. & Vasander H. 1996a. Ecology and vegetation gradients of peatlands. Teoksessa: Vasander H. (toim.), *Peatlands in Finland*, Finnish Peatland Society, Gummerus, Helsinki, 10–19.
- Laine J. & Vasander H. 1996b. The natural history of mires in Finland and the rate of peat accumulation. Teoksessa: Vasander H. (toim.), *Peatlands in Finland*, Finnish Peatland Society, Gummerus, Helsinki, 20–26.
- Laine J., Harju P., Timonen T., Laine A., Tuittila E.-S., Minkkinen K. & Vasander H. 2009. *The intricate beauty of Sphagnum mosses – a Finnish guide to identification*. University of Helsinki Department of Forest Ecology Publications 39: 1–190.
- Leppälä M., Kukko-Oja K., Laine J. & Tuittila E.-S. 2008. Seasonal dynamics of CO<sub>2</sub> exchange during primary succession of boreal mires as controlled by phenology of plants. *Écoscience* 15: 460–471.
- Leppälä, M., Laine, A., Seväkivi M.-L. Tuittila E.-S. 2011a. Differences in CO<sub>2</sub> dynamics between successional mire plant communities during wet and dry summers. *J. Veg. Sci.* 22: 357–366. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2011.01259.x.
- Leppälä, M. Laine, A. Tuittila E.-S. 2011b. Winter carbon losses from a boreal mire succession sequence follow summertime patterns in carbon dynamics. *Suo* 62: 1–11.
- Leppälä, M., Oksanen, J. and Tuittila E.-S. 2011c. Methane flux dynamics during mire succession. *Oecologia* 165: 489–499. DOI 10.1007/s00442-010-1754-6.
- Lide D. R. & Fredrikse H. P. R. 1995. *CRC handbook of chemistry and physics*, 76. painos. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Limpens J., Heijmans M. M. P. D. & Berendse F. 2006. The nitrogen cycle in boreal peatlands. Teoksessa: Wieder R. K & Vitt D. H. (toim.), *Boreal Peatland Ecosystems -Ecological studies, Vol. 188*, Springer Berlin Heidelberg, New York, 195–230.
- Limpens J., Berendse F., Blodau C., Canadell J. G., Freeman C., Holden J., Roulet N., Rydin H. & Schaepman-Strub G. 2008. Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications – a synthesis. *Biogeosciences* 5: 1475-1491.
- Markham J. H. 2009. Variation in moss-associated nitrogen fixation in boreal forest stands. *Oecologia* 161: 353–359.

- McAuliffe C. C. 1971. GC determination of solutes by multiple phase equilibration. *Chemical Technology* 1: 46–51.
- Menge D. N. L. & Hedin L. O. 2009. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology* 90: 2190–2201.
- Merilä P., Galand P. E., Fritze H., Tuittila E-S., Kukko-Oja K., Laine J. & Yrjälä K. 2006. Methanogen communities along a primary succession transect of mire ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 221–229.
- Nordbakken J. F., Ohlson M. & Högberg P. 2003. Boreal bog plants: nitrogen sources and uptake of recently deposited nitrogen. *Environ. Pollut.* 126: 191–200.
- Opelt K, Chobot V., Hadacek F., Schönmann S., Eberl L. & Berg G. 2007. Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with Sphagnum mosses. *Environ. Microbiol.* 9: 2795–2809.
- Paerl H. W. 1978. Role of heterotrophic bacteria in promoting N<sub>2</sub> fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. *Microb. Ecol.* 4: 215-231.
- Putkinen A., Larmola T., Siljanen H., Tuomivirta T., Bodrossy L., Tuittila E-S. & Fritze H. 2011. Metaania hapettavien bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus suon sukkessiogradientilla kasvavissa rahkasammalissa. *Pro Terra* 52/2011, Suomen maaperätieteiden seura s. 115.
- Päivänen J. & Paavilainen E. 1996. Forestry on peatlands. Teoksessa: Vasander H. (toim.), *Peatlands in Finland*, Finnish Peatland Society, Gummerus, Helsinki, 72–83.
- Raghoebarsing A. A., Smolders A. J. P., Schmid M. C., Rijpstra W. I. C., Wolters-Arts M., Derksen J., Jetten M. S. M., Schouten S., Damsté J. S. S., Lamers L. P. M., Roelofs J. G. M., Op den Camp H. J. M. & Strous M. 2005. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. *Nature Lett.* 436: 1153–1156.
- Rastetter E. B., Vitousek P. M., Field C., Shaver G. R., Herbert D. & Agren G. I. 2001. Resource optimization and symbiotic nitrogen fixation. *Ecosystems* 4: 369–388.
- Rice, S. K., Aclander L. & Hanson D. T. 2008. Do bryophyte shoot systems function like vascular plant leaves or canopies? Functional trait relationships in *Sphagnum* mosses (Sphagnaceae). *Am. J. Bot.* 95: 1366–1374.
- Rydin H. & Jeglum J. K. 2006. *The biology of peatlands*. Oxford University Press, New York, 343 s.
- Salonen V. 2006. *Kasviekologia*. Wsoy, Helsinki, 306 s.
- Schimel J. P. & Bennet J. 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85: 591–602.
- Schmidt S. K., Reed S. C., Nemergut D. R., Grandy A. S., Cleveland C. C., Weintraub M. N., Hill A. W., Costello E. K., Meyer A. F., Neff J. C. & Martin A. M. 2008. The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. *Proc. R. Soc. B* 275: 2793–2802.
- Smith V. R. 1984. Effects of abiotic factors on acetylene reduction by cyanobacteria epiphytic on moss at a subantarctic island. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 594–600.

- Stuedler P. A., Bowden R. D., Melillo J. M. & Aber J. D. 1989. Influence of nitrogen fertilisation on methane uptake in temperate forest soils. *Nature* 341: 314–316.
- Taiz L. & Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, 690 s.
- Tirri R., Lehtonen J., Lemmetyinen R., Pihakaski S. & Portin P. 2001. *Biologian sanakirja*. Otava, Helsinki, 888 s.
- Turetsky M. R., 2003. The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling. *The Bryologist* 106: 395–409.
- Updegraff K., Bridgham S. D., Pastor J., Weishampel P. & Harth C. 2001. Response of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> emissions from peat lands to warming and water table manipulation. *Ecol. Appl.* 11: 311–326.
- Vitousek P. M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C. B., Grimm N. B., Howarth R. W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E. B. & Sprent J. I. 2002a. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1–45.
- Vitousek P. M., Hättenschwiler S., Olander L. & Allison S. 2002b. Nitrogen and nature. *Ambio* 31: 97–101.
- Waughman G. J. & Bellamy D. J., 1980. Nitrogen fixation and the nitrogen balance in peatland ecosystems. *Ecology* 61: 1185–1198.
- Werner R. A. & Brand W. A. 2001. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 501–519.
- Wiedermann M. M., Gunnarson U., Nilsson M. B., Nordin A. & Ericson L., 2009. Can small-scale experiments predict ecosystem responses? An example from peatlands. *Oikos* 118: 449–456.
- Woodin S. J & Lee J. A. 1987. The fate of some components of acidic deposition in ombrotrophic mires. *Environ. Pollut.* 45: 61–72.
- Zackrisson O., Deluca T. H., Nilsson M. C., Sellstedt A. & Berglund L. M., 2004. Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology* 85: 3327–3334.
- Zadorina E. V., Slobodova N. V., Boulygina E. S., Kolganova T. V., Kravchenko I. K. & Kuznetsov B. B. 2009. Analysis of the diversity of diazotrophic bacteria in peat soil by cloning of the nifH gene. *Microbiology* 78: 218–226.



## Liite

Liite 1. Suon 5 erot typensidonnassa ( $\delta^{15}\text{N}$ ) ja metaaninhapetuksessa ( $\delta^{13}\text{C}$ ) muihin soihin verrattuna  $^{15}\text{N}_2$ - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ -käsittelyssä. Tukeyn testi, tilastollinen todennäköisyys (P).

Kaasukäsittely	Sukessiovaihe	Suo	$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$
			$^{15}\text{N}_2$	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	$^{15}\text{N}_2$
				5	
				P	
	SJ2	1	0,189	0,057	0,912
		2	0,162	0,044	0,959
		3	0,339	0,051	0,031
	SJ3	4	0,377	0,016	0,900
		5	-	-	-
		6	0,070	0,006	0,105
	SJ4	7	0,056	0,006	1,0
		8	0,082	0,006	0,997
		9	0,141	0,027	1,0
	SJ5	10	0,287	0,014	0,039
		11	0,045	0,003	0,172
		12	0,105	0,009	0,698

Liite 2. Tukeyn monivertailut kaasukäsittelyjen ( $^{15}\text{N}_2$  -,  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  ja kontrolli) typensidonnassa ( $\delta^{15}\text{N}$ ) ja metaaninhapetuksen ( $\delta^{13}\text{C}$ ) välisistä eroista sukessiojatkumolla (SJ2-SJ5).

Sukessiovaihe	Kaasukäsittely	$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$	
		$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	kontrolli	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$	kontrolli
				P	
SJ2	$^{15}\text{N}_2$	0,143	0,170	-	-
	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$		0,004		-
SJ3	$^{15}\text{N}_2$	0,795	0,322	0,640	0,873
	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$		0,103		0,360
SJ4	$^{15}\text{N}_2$	0,351	0,065	0,006	0,999
	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$		0,002		0,005
SJ5	$^{15}\text{N}_2$	0,987	0,117	0,001	1,0
	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$		0,157		0,001

Liite 3. Sukkessiovaiheiden väliset erot metaaninhapetuksessa  $^{15}\text{N}_2$  - ja  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$  -käsittelyissä. Tukeyn monivertailut sukkessiovaiheiden välillä (SJ2\* SJ3), vapausasteet (df) ja tilastollinen todennäköisyys (P).

Kaasukäsittely	Sukkessiovaihe	df	$\delta^{13}\text{C}$	
			$^{15}\text{N}_2$	$^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{CH}_4$ P
	SJ2* SJ3	3	0,497	0,400
	SJ2* SJ4	3	0,097	0,273
	SJ2* SJ5	3	0,998	0,929
	SJ3* SJ4	3	0,637	0,989
	SJ3* SJ5	3	0,226	0,635
	SJ4* SJ5	3	0,017	0,445