

Pro gradu -tutkielma

**Kokonaistoksisuuden testauksen soveltuvuus suomalais-
ten yhdyskuntajätevesien riskinarviointiin ja tarkkai-
luun**

Pauli Kärkkäinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede ja -teknologia

18.11.2016

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede ja -teknologia

Kärkkäinen Pauli: Kokonaistoksisuuden testauksen soveltuvuus suomalaisten yhdyskuntajätevesien riskinarviointiin ja tarkkailuun
Pro gradu -tutkielma: 51 s., 12 liitettä (6 s.)
Työn ohjaajat: Professori Jussi Kukkonen, FT Eija Schultz ja FT Markus Silanpää
Tarkastajat: Professori Jussi Kukkonen ja FT Eeva-Riikka Vehniäinen
Marraskuu 2016

Hakusanat: ekotoksikologia, kokonaistoksisuus, näytteenotto, riskinarviointi, tarkkailu, yhdyskuntajätevesi.

TIIVISTELMÄ

Jätevesissä on monia erilaisia yhdisteitä, joista osa on ympäristölle haitallisia. Kemikaalien yhteisvaikutusten riskinarviointi ja tarkkailu on mahdotonta pelkkien fysikaalis-kemiallisten testien voimin. Täten onkin kehitelty biologisia menetelmiä, joiden avulla näiden monimuotoisten seosten haitallisuutta voidaan tarkkailla. Vaikka maailmalla jätevesien kokonaistoksisuuden testausta on käytetty jo 1980-luvulta lähtien, menetelmää on toistaiseksi hyödynnetty Suomessa vain vähänlaisesti.

Tämän tutkielman tavoitteena oli tutkia kokonaistoksisuuden testauksen soveltuvuutta suomalaisten yhdyskuntajätevesien analysointiin. Biotestien luotettavuutta tarkasteltiin niiden toistettavuutta vertailemalla: koesarjoja ja pitoisuuksia mitattiin useita rinnakkaisia. Tutkimusmenetelmiksi valittiin standardisoidut ja toksisuustestauksessa yleisesti käytössä olevat menetelmät: akuuttia toksisuutta tutkittiin valobakteerin bioluminesenssin inhibitiotestillä ja vesikirppujen lyhytkestoisella toksisuustestillä, ja kroonista toksisuutta leväkasvun inhibitiotestillä. Kokeissa tutkittiin näytteitä kolmelta erikokoiselta jätevedenpuhdistamolalta: Klaukkalan keskuspuhdistamolalta, Suomenojan puhdistamolalta ja Viikinmäen puhdistamolalta. Mahdollisuuksien mukaan pyrittiin myös määrittämään hyväksyttävän inhibition raja-arvot, joita suuremmat vaikutukset olisivat hälytysmerkkinä sille, että näytettä olisi tutkittava tarkemmin herkemmillä testeillä. Lisäksi työssä tutkittiin näytteiden pakastamisen vaikutuksia toksisuustestauksen tuloksiin.

Tutkimustulokset osoittivat toksisuustestauksen soveltuvan suomalaisten puhdistettujen yhdyskuntajätevesien tutkimiseen. Rinnakkaisista koesarjoista mitatut vasteet olivat pääasiassa samansuuntaisia. Suurinta vaihtelu oli leväkasvun inhibitiotestissä. Näytteiden pakastaminen vaikutti sopivan säilytystavaksi ainakin valobakteereilla ja vesikirpuilla toteutettaviin toksisuustesteihin. Haittavaikutuksia ei juurikaan havaittu, joten raja-arvoja puhdistetun yhdyskuntajäteveden aiheuttamalle hyväksyttävälle inhibitiolle ei näiden kokeiden perusteella voitu määrittää.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science and Technology

Kärkkäinen Pauli: Applicability of whole effluent assessment to monitoring and risk assessment of Finnish municipal wastewaters
Master thesis: 51 p., 12 appendices (6 p.)
Supervisors: Professor Jussi Kukkonen, doctor Eija Schultz and doctor Markus Sillanpää
Inspectors: Professor Jussi Kukkonen and doctor Eeva-Riikka Vehniäinen
November 2016

Key words: ecotoxicology, monitoring, municipal wastewater, risk assessment, sampling, whole effluent assessment.

ABSTRACT

Wastewaters contain numerous of different substances. Part of the substances are harmful to environment. Risk assessment and monitoring of synergetic effects is not possible by conducting physical and chemical analysis alone. Therefore toxicological tests and other biological tests have been developed to assess the harmfulness of complex mixtures. Whole effluent assessment have been widely used over the world since the 1980's but only occasionally in Finland.

Aim of the study was to determine the suitability of whole effluent assessment to monitoring Finnish treated municipal wastewaters. The reliability of bioassays were studied by comparing test repeatability using comprehensive test sets with many repetitions. The bioassays chosen to be explored were standardized and commonly used in toxicity testing. Acute toxicity tests conducted were the test of inhibition of bioluminescence of luminescent bacteria and short-term toxicity test to water fleas. Chronic toxicity was studied with algal growth inhibition test. Samples tested were collected from municipal wastewater treatment plants of Klaukkala, Suomenoja and Viikki. Threshold values for harmful responses were tried to determine in order to show if more sensitive test methods should be used. Effects of freezing on toxicity of treated wastewater samples were studied as well.

As a result of the studies it was indicated that using whole effluent assessment is suitable for monitoring Finnish treated municipal wastewaters. Observations from parallel test series had similar trends almost every time. Variations of response in algal growth inhibition tests were the largest observed. Freezing had no observed effects on the sample when using luminescent bacteria or water fleas as test species. Threshold values for acceptable harmful responses couldn't be determined because almost zero harmful effects were observed.

LYHENNELUETTELO

3,5-DCP	3,5-dikloorifenoli, C ₆ H ₄ Cl ₂ O
AVL	asukasvastineluku, yksi yksikkö vastaa vuorokausikuormitusta, jonka seitsemän vuorokauden biokemiallinen hapenkulutus (BOD ₇) on 70 g happea (O ₂)
BAT	best available techniques, paras käyttökelpoinen tekniikka
BOD _{7ATU}	biochemical oxygen demand, biologinen hapenkulutus 7 vrk aikana (nitrifikatio estetty)
COD _{Cr}	chemical oxygen demand, täydellisen hapettumisen kemiallinen hapenkulutus
EC _x	effective concentration, pitoisuus joka aiheuttaa x prosentille koe-eliöistä jonkin ennalta määritellyn vaikutuksen
Kok. N	kokonaistyyppi, vedessä olevan typen kokonaismäärä
Kok. P	kokonaisfosfori, vedessä olevan fosforin kokonaismäärä
LOEC	lowest observable effective concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttanut pitoisuus
M	molaarinen, luonnontieteissä käytetty konsentraation (ainemäärä tilavuusyksikössä) yksikkö (mol/l)
NOEC	no observed effect concentration, suurin pitoisuus joka ei aiheuta havaittavia vaikutuksia koe-eliöissä
SS	suspended solids, vedessä kulkeutuvat kiintoainepartikkelit
TIE	toxicity identification evaluation, haitta-aineiden tunnistaminen toksisuustestien avulla
TRE	toxicity reduction evaluation, haitallisuuden vähentymisen todentaminen toksisuustestien avulla
WEA	whole effluent assessment, jäteveden kokonaistoksisuuden arviointi

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
1.1 Lainsäädäntö Suomessa.....	1
1.2 Jätevesien toksisuuden arviointi.....	2
1.3 Jätevesien toksisuustestaus maailmalla.....	2
1.4 Jätevedet.....	4
1.5 Näytteenotto.....	5
1.5.1 Näytteenottotiheys.....	5
1.5.2 Näytteenoton laadunvarmistus.....	6
1.5.3 Näytteiden säilytys ja varastointi.....	7
1.5.4 Näytteiden esikäsittely.....	7
1.6 Testimenetelmät.....	8
1.6.1 Toksisuustestit.....	8
1.6.2 Toksisuustestauksen suunnittelu.....	10
1.6.3 Lyhytkestoiset toksisuustestit.....	12
1.6.4 Tulosten tulkinta ja käyttö.....	13
1.6.5 Laadunvalvonta.....	14
1.7 Työn tavoite.....	15
2 AINEISTOT JA MENETELMÄT	16
2.1 Jätevedenpuhdistamot ja näytteenotto.....	16
2.2 Menetelmät.....	20
2.2.1 Akuutti toksisuustesti valobakteerilla.....	20
2.2.2 Akuutti toksisuustesti vesikirpulla.....	22
2.2.3 Leväkasvun inhibitiotesti.....	24
2.2.4 Ohjelmisto ja tilastolliset menetelmät.....	27
3 Tulokset	30
3.1 Akuutti toksisuustesti valobakteerilla.....	30
3.2 Akuutti toksisuustesti vesikirpulla.....	33
3.3 Leväkasvun inhibitiotesti.....	36
4 TULOSTEN TARKASTELU	40
4.1 Kokeiden toistettavuus.....	40
4.2 Näytteiden säilytyksen vaikutukset.....	41
4.3 Koejärjestelyjen arviointi.....	42
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	44
Kiitokset	45
Kirjallisuus	45
LIITTEET	52

1 JOHDANTO

1.1 Lainsäädäntö Suomessa

Yhdyskuntajätevesien käsittelyä Suomessa ohjaa valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä (888/2006). Asetus pohjautuu Euroopan yhteisöjen neuvoston direktiiviin yhdyskuntajätevesien käsittelystä (91/271/ETY). Direktiivi sisältää vaatimuksia jätevesien viemäroinnistä, käsittelystä, tarkkailusta ja näiden toimeenpanon seurannasta. Jätevesillä on ympäristölle haitallisia ominaisuuksia, ja direktiivin on tarkoituksena suojella ympäristöä jätevesien aiheuttamilta haitoilta.

Jätevesien käsittelystä direktiivissä on määritelty erilaisia vaatimustasoja, jotka perustuvat taajamien kokoon ja purkuvesistön olosuhteisiin. Ennen vesistöön johtamista jätevedet on käsiteltävä biologisesti (tai vastaavalla tavalla), minkä lisäksi niistä on poistettava myös ravinteita. Samalla vedestä poistuu taudinaiheuttajia (mm. bakteereita). Puhdistamojen tulee täyttää tietyt ympäristöluvassa määritellyt laatuvaatimukset käsitellyn jäteveden biologisen ja kemiallisen hapenkulutuksen, kiintoainepitoisuuksien, kokonaisfosforin ja kokonaistypen pitoisuuksien ja poistotehon suhteen. Lisäksi direktiivissä on vaatimuksia puhdistamoiden toimivuudesta ja kuormituksen tarkkailun tiheydestä (Santala & Etelämäki 2009). Kemikaalitestaukseen puhdistamoita ei kuitenkaan velvoiteta. Vesiympäristölle haitallisten tai vaarallisten aineiden päästöistä ja tarkkailusta on säädetty valtioneuvoston asetuksella (1022/2006) muutoksineen (343/2009, 1818/2009 ja 868/2010).

Ympäristönsuojelulaissa (86/2000) määritellään että ympäristön pilaantumisen vaaraa aiheuttavaan toimintaan (kuten jätevesien johtamiseen) tarvitaan ympäristö lupa. Lupaehdoissa määritellään mm. purkuveden laatuvaatimuksista, valvonnasta ja raportoinnista. Yhdyskuntajätevesistä otetaan näytteitä säännöllisin väliajoin ja niiden vuotuinen vähimmäismäärä (2–24 näytettä) määräytyy puhdistamon koon mukaan. Näytteiden tulokset raportoidaan alueelliselle ELY-keskukselle ja kunnan ympäristönsuojeluviranomaisille, ja tallennetaan ympäristöhallinnon tietokantaan. Teollisuusjätevesien kohdalla toimitaan luvissa määriteltyjen tapauskohtaisten tarkkailuohjelmien mukaisesti.

Muita kansainvälisesti tärkeitä ja Suomessakin relevantteja sopimuksia ovat esimerkiksi Koillis-Atlantin merellisen ympäristön suojelua koskeva yleissopimus (OSPAR-sopimus) ja Euroopan parlamentin ja jo lailla täytäntöön pantu neuvoston direktiivi 2000/60/EY yhteisön

vesipolitiikan puitteista (vesipuitedirektiivi). Näiden eräänä tavoitteena on vesien hyvä tila vesien suojelua tehostamalla.

1.2 Jätevesien toksisuuden arviointi

Yleensä jätevesiä karakterisoidaan vain niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Tavallisesti näytteistä määritetään esimerkiksi biologinen ja kemiallinen hapenkuutus, liuenneen kiintoaineen määrä, happamuus (pH) sekä tiettyjen haitallisten aineiden pitoisuudet (Säylä & Vilpas 2012). Jätevesien ominaisuuksia tutkimalla on pystytty vähentämään vesiin päätyvien haitallisten yhdisteiden määriä, ja samalla vedenlaatu monissa vesistöissä onkin parantanut. Tämä tapa toimii hyvin kuitenkin vain sellaisten jätevesien tapauksessa, joiden koostumus tunnetaan hyvin kuten esimerkiksi teollisuusjätevesien kohdalla. Tarkkaa tietoa jätevesien koostumuksesta ei aina ole saatavilla, ja vaikka sen selvittäminen periaatteessa mahdollista onkin, eivät pelkät pitoisuustiedot useinkaan anna todellista kuvaa jätevesien mahdollisista haittavaikutuksista. Täten kiinnostus jätevesien kokonaistoksisuuden testauksen (whole effluent assessment, WEA) soveltuvuudesta haitallisten aineiden riskinarviointiin ja tarkkailuun onkin kasvanut (IPPC 2011).

WEA-menettelyä käytetään jätevesien mahdollisen haitallisuuden selvittämiseen. Jäteveden tarkkaa koostumusta ei tarvitse selvittää vaan sen sijaan tutkitaan jäteveden ominaisuuksien yhteisvaikutuksen haitallisuutta. Menetelmän avulla jätevesien ympäristövaikutuksista saadaan siis riskinarvioinnin kannalta käyttökelpoisempaa tietoa kuin vain perinteisiä parametreja tarkasteltaessa. Erityisen hyvin menetelmä sopii käytettäväksi monia erilaisia tai täysin tuntemattomia yhdisteitä sisältävän jäteveden tutkimiseen, sillä tarkkailtavien aineiden lista on suhteellisen suppea eikä laajamittainenkaan kemiallinen testaus välttämättä kata kaikkia vesistöön kulkeutuvia yhdisteitä. Esimerkiksi tutkijapari Vasquez & Fatta-Kassinos (2013) osoitti fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan puhdistuksen laatuvaatimukset täyttävän jäteveden aiheuttavan toksista vastetta koe-eliöissä. Käytännössä kokonaistoksisuuden testaus tapahtuu altistamalla koe-eliöitä mahdollisimman vähän käsitellylle jätevedelle laboratorioympäristössä.

1.3 Jätevesien toksisuustestaus maailmalla

niiden ympäristövaikutuksia tarkkaillaan jo monissa maissa toksisuustestauksen avulla. Pisimmät perinteet jätevesien haitallisten aineiden toksisuustestauksesta on Pohjois-Amerikassa, tarkemmin ottaen Yhdysvalloissa, missä ensimmäiset ohjeet testauksesta painettiin jo

1988 (US EPA 1988). Ympäristöluvassa määritetään haitallisten aineiden sallitut pitoisuudet sekä yhdyskunta- että teollisuusjätevesille, ja niistä päättävät osavaltioiden viranomaiset, liittovaltion ympäristönsuojeluviraston ohjeistuksen mukaan (US EPA 2010). Samaan tapaan myös Kanadassa on pitkät perinteet jätevesien haitallisten aineiden tarkkailuun toksisuustestein, ja viimeisin uudistus koko maan kattavaan lainsäädäntöön koskien suurimpia yhdyskuntajätevesiä käsitteleviä laitoksia tehtiin vuonna 2012 (WSER 2012).

Euroopan maista Saksalla on pisimmät perinteet jäteveden toksisuuden tarkkailussa. Liittovaltio on määrittänyt yhteiset lakisääteiset raja-arvot osalle teollisuuden aloista, minkä lisäksi voimassa on osavaltiokohtaisia tiukempia rajoituksia. Raja-arvot on määritetty teollisuudenalakohtaisesti parhaaseen käyttökelpoiseen tekniikkaan (BAT) perustuen. Näytteet testataan kansainvälisten standardien mukaan, ja niitä voivat viranomaisten lisäksi suorittaa myös laitosten oma henkilökunta (Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Germany 2004). Puolassa suoraan vesistöihin tai maahan purettavista jätevesistä tiettyjen vesille haitallisten aineiden pitoisuuksia on tarkkailtu ainakin vuodesta 2006 saakka. Tarkkailu on lakisääteistä (Directive of the Minister of Environmental Protection 2006), ja ympäristölupaprosessissa hakijan täytyy osoittaa, etteivät määräyksessä määritetyt raja-arvot ylity. Raja-arvoja on määritetty myös biotesteille.

Yhdistyneissä kuningaskunnissa (Wales, Englanti, Skotlanti ja Pohjois-Irlanti) kokonaistoksisuuden tarkkailua harjoitetaan, mutta esimerkiksi Englannissa ja Walesissa lakisääteisiä raja-arvoja eri testeille ei ole asetettu (Secretary of State & Welsh Ministers 2010). Myös Irlanti on määrittänyt jätevesien haitallisille aineille kohtuuttomia kustannuksia tuottamattomaan parhaaseen käyttökelpoiseen tekniikkaan (BATNEEC, Best Available Technique Not Entailing Excessive Costs) perustuvat raja-arvot (Environmental Protection Agency 2010). Ensimmäiset toksisuustutkimukset tulee tehdä vähintään neljälle eri koe-eliölle. Myöhemmin seuranta jatketaan kahta herkimmäksi osoittautunutta lajia käyttäen (Hernan & O'Rourke 2012).

Baltian maista ainakaan Virossa ja Latviassa jätevesien toksisuustestaus ei toistaiseksi ole lakisääteistä. Toiveita toksisuustestauksen ottamisesta mukaan kansallisiin ympäristötilan seurantaohjelmiin on kuitenkin esitetty (Poikâne 2011, Roots & Leisk 2012). Liettuassa pintavesiin laskettavien jätevesien tulee läpäistä *Daphnia magna* -liikuntakyvyttömyydestesti (COHIBA 2010b). Ruotsissa haitallisia aineita tarkkaillaan teollisuusjätevesistä, ja biologinen tarkkailu suunnitellaan laitospohjaisesti luvan hakuprosessin aikana (Naturvårdsverket

2010). Tanskassa jätevesien kokonaistoksisuuden testaaminen ei ole lakisääteistä (Power & Boumphrey 2004), mutta ympäristölupaa varten kokeiden tekemiseen voidaan velvoittaa (Pedersen ym. 1994).

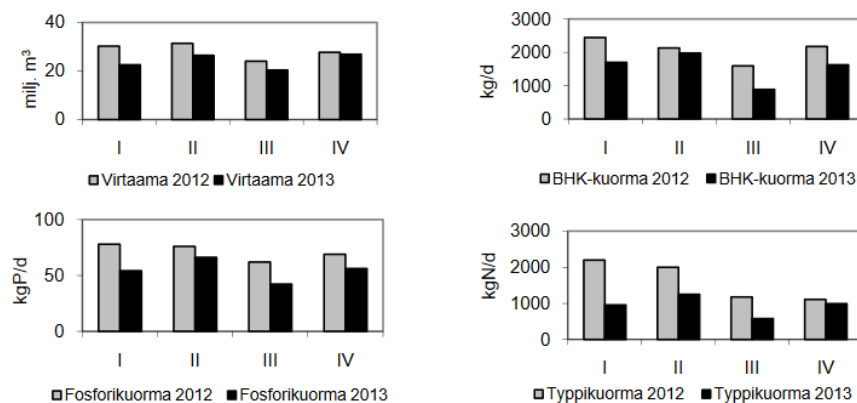
Maakohtaisten säädösten lisäksi haitallisten aineiden seuranta vesien suojelemiseksi edellyttävät myös useat kansainväliset direktiivit ja sopimukset. Toksisuustestit ja jäteveden toksisuustestaus mainitaan sopiviksi kemiallisten analyysien rinnalle IPPC–direktiiviin (2008/1/EY) liittyvissä asiakirjoissa (IPTS 2003a, IPTS 2003b). OSPAR-yleissopimus on ollut voimassa vuodesta 1998. Sopimusosapuolia ovat Koillis-Atlantin ja Pohjanmeren rantavaltioiden lisäksi EU, Sveitsi ja Luxemburg. HELCOM-sopimus astui voimaan vuonna 1980, ja sitä on uudistettu vuonna 1992. HELCOM-sopimuksella pyritään teollisuuden päästöjen vähentämiseen (HELCOM 2002a, HELCOM 2002b, HELCOM 2002c), ja sen osapuolina ovat Itämeren rantavaltiot ja EU. Meriveden haitallisia aineita koskevat myös sopimukset kansainvälisen merenkulkujärjestön (IMO) ja yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelmaan (UNEP) kanssa.

1.4 Jätevedet

Yhdyskuntajätevedenpuhdistamoille saapuvat vesimassat voivat olla hyvinkin monimuotoisia ja harvoin pelkkää asumajätevettä. Jo pelkästään kotitalouksien käyttämistä tuotteista (esim. astian- ja pyykinpesuaineet, kosmetiikkatuotteet, lääkkeet ja siivouskemikaalit) viemäriin päätyy päivittäin tuhansia erilaisia yhdisteitä. Kun mukaan lasketaan vielä viemäriverkkoon mahdollisesti liittyneiden yritys- ja teollisuuskiinteistöjen päästöt (esim. liuotteet, maalit, rasvat ja polttoaineet) ja usein viemäriverkkoon teiltä tai vaikkapa puistoalueilta johdettavat hulevedet (esim. kiintoaines, laskeuma ja ravinteet), muodostaa puhdistamolle saapuva vesi jo kohtuullisen monipuolisen paletin (Henze ym. 2008).

Sen lisäksi että puhdistettava jätevesi voi koostumukseltaan olla hyvinkin kirjavaa, voi jäteveden koostumus vaihdella vuorokauden ajan tai viikonajan mukaan. Jäteveden koostumus voi vaihdella esimerkiksi viemäriverkkostoon liittyneen teollisuuslaitoksen prosessikierron, yritysten aukioloaikojen tai yksittäisten ihmisten päivittäisten toimien mukaan. Jäteveden koostumuksen vaihtelun lisäksi myös puhdistamon kuormitus voi vaihdella paljonkin vuorokauden tai vuodenajan mukaan (Vahtera ym. 2014). Täten jäteveden puhdistusprosessien tehokkuus saattaa kärsiä tai esimerkiksi valtaosa jonkin tietyn haitallisen yhdisteen vuotuisesta kuormituksesta voi ajoittua vaikkapa vain muutamalle loppukevään viikolle.

Jotta puhdistetun jäteveden tarkkailu olisi tehokasta, olisi puhdistamolle saapuvan jäteveden koostumus- ja kuormitusvaihtelut hyvä selvittää tarkoin (kuva 1). Tämä ennen varsinaisen seurannan aloittamista toteutettava alkukartoitus voidaan tehdä käyttäen esimerkiksi puhdistamolla kerättyjä tietoja aikaisempina vuosina käsitellyistä vesimassoista. Suositeltavampi tapa olisi kuitenkin analysoida näytteitä esimerkiksi kuukausittain yhden vuoden ajalta. Näytteenottotiheyden tulisi olla riittävä, jotta mahdollisten päästöpiikkien vaikutukset saadaan selville, mutta toisaalta myös keskimääräisen kuormituksen haitallisuus täytyy selvittää (OSPAR 2005). Päästöpiikit syntyvät kun pitoisuudet jätevesissä ovat mahdollisimman korkealla eli esimerkiksi ”kuivan kauden” aikana tai kun teollisuuden prosessivedet lasketaan viemäriin. Kun vaihtelu tunnetaan riittävän hyvin, voidaan aloittaa näytteenottosuunnitelman laatiminen.



Kuva 1. Viikinmäen puhdistamon kokonaisvirtaama ja keskimääräinen BOD₇ATU-, fosfori- ja typpikuormitus vuosineljänneksittäin vuosina 2012 ja 2013 (Vahtera ym. 2014).

1.5 Näytteenotto

1.5.1 Näytteenottotiheys

Velvoitteet näytteenottotiheydestä eri analyysien osalta vaihtelevat maa- ja toimialakohtaisesti paljonkin. Koska mahdolliset vaihtelut jäteveden koostumuksessa täytyy selvittää, tehdään testejä tavallisesti aluksi tiuhempaan. Toksisten päästöjen lyhytaikaisuudesta ja ajoittaisesta luonteesta johtuen riittävän kattavien näytteiden kerääminen voi kuitenkin olla haastavaa. Täten tulee ottaa useampia näytteitä erikseen määritellyn ajanjakson sisällä, jonka aikana korkeiden pitoisuuksien lasketaan kulkevan puhdistamon läpi. Näin toimittaessa laskee todennäköisyys siihen, ettei kuormituspiikin aikaan käsitellystä jätevedestä saada näytettä. Näytteenoton voidaan todeta onnistuneen, ja testitulosten antavan hyvän kuvan jäteveden haitallisuudesta, mikäli esimerkiksi kolmen kuormituspiikin aikana otetun näytteen toksisuustestitulosten vaihtelu on riittävän vähäistä (Leverett 2006).

Kun jäteveden mahdollinen koostumuksen vaihtelu ja sen mukanaan tuomat riskit ovat selvillä, voidaan päättää säännöllisen tarkkailun mahdollisesta tarpeesta ja tiheydestä. Skotlannissa akuuttien oireiden toksisuustestauksen suositellaan tapahtuvan vähintään neljä kertaa vuodessa (SEPA 2003). Kanadassa akuutteja toksisuustestejä voidaan tehdä vesikirpuilla jopa viikoittain (Vuoristo ym. 2010), mutta voimassa olevan kaivosjätevesiä koskevan lainsäädännön mukaan neljännesvuosittain tehtävät akuutit toksisuustestit riittävät, mikäli edellisen 12 kuukauden aikana toksisia vasteita ei ole havaittu (MMER 2012). COHIBA-projekti (COHIBA 2010b) suositteli ensimmäisen tarkkailuvuoden aikana akuutteja toksisuustestejä tehtävän kuukauden välein ja pitkäaikaisvaikutuksia selvittävän kaksi kertaa vuodessa, kesällä ja talvella. Myöhemmin testitiheyttä voitaisiin vähentää vuosineljänneksiin, mikäli voidaan osoittaa, ettei vaihtelu ole merkittävää. Niissä tapauksissa joissa akuutit toksisuustestit osoittavat jäteveden toksisuuden, ei tulosta välttämättä tarvitse enää varmistaa pitkäaikaisvaikutuksia testaamalla.

1.5.2 Näytteenoton laadunvarmistus

Toksisuustesteissä käytettävät jätevesinäytteet tulee ottaa puhdistamolta lähtevästä jätevedestä. Tällöin ne ovat jo käyneet läpi monipuoliset biologiset, fysikaaliset ja kemialliset puhdistusprosessit, joissa suurin osa haitallisista aineista on jo eliminoitu (Säylä 2015), joskaan mahdollisia lääkejäämiä kohtaan nykyiset puhdistusprosessit eivät kuitenkaan ole tehokkaita (Samaras ym. 2013). Samalla voidaan olla varmoja puhdistusprosessien päättymisestä, jolloin myös testitulokset vastaavat mahdollisimman hyvin todellista tilannetta.

Näytteenotto on toksisuustestauksen vaiheista tarkkuutta vaativin, sillä siinä tehtyjä virheitä ei voida korjata enää myöhemmin. Virheitä voi syntyä systemaattisesti ja satunnaisesti. Näytteenottoon liittyvät systemaattiset virheet pitää pyrkiä minimoimaan valitsemalla sopivat näytteenottovälineet ja -menetelmät. Näytteenottoastioiden ja näytteenottovälineiden laatuun ja puhtauteen on kiinnitettävä huomiota, etteivät näytteet saastu ja suotta aiheuta analyysituloksiin satunnaisvirhettä. Virheet voidaan minimoida käyttämällä esimerkiksi lasi- tai polyeteeniastioita, mitkä ovat kemiallisesti inerttejä, helppoja puhdistaa ja kestävät sekä lämmitystä että pakastamista (OSPAR 2007). Sopiva näytteenottotapa riippuu tutkimuksen tarkoituksesta, mutta yhdyskuntajätevesiasetuksen (VNA 888/2006) mukaan puhdistamolta lähtevästä jätevedestä kerätyt 24 tunnin kokoomänäytteet soveltuvat analyysiin parhaiten, ja niin kertanäytteiden kuin pidemmältä aikaväliltä kerättyjen näytteiden ottamista

tulisi välttää (Leverett 2006). Myös tarvittava näytteiden määrä (tilavuus) pitää selvittää ennen näytteenottoa.

1.5.3 Näytteiden säilytys ja varastointi

Kun näytteet jäädytetään noin 0–5 °C:ksi ja suojataan valolta heti näytteenoton jälkeen, säilyvät ne yleensä koostumukseltaan muuttumattomina ainakin seuraavan 24 tunnin ajan. Kerättyjen näytteiden analyysit tulisikin pyrkiä aloittamaan viimeistään 48 tunnin sisällä näytteenottamisesta, jotta jätevesi pysyisi ominaisuuksiltaan mahdollisimman muuttomana (OSPAR 2007).

Mikäli näytteen tutkiminen 48 tunnin sisällä näytteenottamisesta ei ole mahdollista, tulee näyte laittaa pakkaseen alle -18 °C:een, jotta se säilyisi muuttumattomana (EPA Victoria 2009, Rice ym. 2012). Pakasteessa näytteitä suositellaan säilytettävän alle kaksi viikkoa, mutta pisimmillään säilytystä voidaan jatkaa jopa kaksi kuukautta. Ennen näytteenottoa on kuitenkin hyvä huomioida, että pakastamisen ja sulattamisen on todettu joissain tapauksissa vähentävän näytteiden toksista vastetta, sillä yhdisteitä voi haihtua esimerkiksi näytettä sulatettaessa tai partikkelien koko ja jakauma muuttua (OSPAR 2007).

1.5.4 Näytteiden esikäsittely

Näytteet pyritään hyödyntämään toksisuustesteissä sellaisinaan, mutta toisinaan ne eivät kuitenkaan täytä kaikkia testin vaatimuksia. Vedenlaadun muutoksilla voi kuitenkin olla vaikutusta näytteen sisältämien yhdisteiden toksisuuteen, joten samalla pitää pyrkiä säilyttämään näyte mahdollisimman muuttumattomana. Mikäli näytteet on pakastettu, tulee ne sulattaa ja homogenisoida vasta juuri ennen testiä. Joissain tapauksissa näytteissä oleva kiintoaines häiritsee määrittäviä, milloin se voidaan poistaa esimerkiksi suodattamalla, mutta toisaalta tätä on vältettävä, sillä samalla haitta-aineet voivat tarttua suodattimeen (OSPAR 2007).

Kokeet tulee suorittaa vakioiduissa olosuhteissa, joista pidetään kirjaa. Tästä johtuen myös näytteen ominaisuuksia, esimerkiksi lämpötilaa, liuenneen hapen tai orgaanisten aineiden määrää, pH:ta, kovuutta tai suolapitoisuutta, täytyy toisinaan säätää sopivammiksi. Esimerkiksi ravinteet voivat tehostaa leväkasvua, näytteissä olevat pieneliöt voivat vaikuttaa koe-eläiden selviytymiseen tai bakteerin valontuottokyvyn tutkiminen todella sameasta näytteestä ei välttämättä onnistu (OSPAR 2007). Myös koeympäristön nopeat fysikaalis-kemialliset muutokset voivat vaikuttaa koe-eläinten käyttäytymiseen. Esimerkiksi veden lämpö-

tilan nopean nousemisen aiheuttama stressi voi johtaa koe-eläimen elintoimintojen nopeutumiseen, jolloin koe-eläin myös altistuu yhdisteille tavallista enemmän (ECOTOC 2004). Testituloksia tulkittaessa tulee näytteille mahdollisesti tehdyt muutokset huomioida.

1.6 Testimenetelmät

1.6.1 Toksisuustestit

WEA-menetelmien pääpaino on toksisuustesteissä. Niiden avulla voidaan tutkia esimerkiksi näytteen sisältämien haitallisten aineiden aiheuttamaa akuuttia toksisuutta ja pitkäaikaisvaikutuksia. Jätevesien toksisuutta tutkitaan vesieliöille (kuten bakteereille, kaloille, leville tai äyriäisille) tehtävin kokein. Kokeet paljastavat eri aineiden (myös metaboliatuotteiden) mahdolliset yhteisvaikutukset (Teodorović ym. 2009a), jotka voivat olla toisiaan vahvistavia, vaimentavia tai yhteenlaskettavia. Ne antavat siis kokonaiskuvan jätevesinäytteen mahdollisista ympäristöhaitoista.

Tavallisesti toksisuustestaus aloitetaan lyhytaikaisilla testeillä. Mahdollinen toksinen vaste nähdään nopeasti, ja johtopäätösten tekeminen näytteiden sisältämien aineiden haitallisuudesta on suhteellisen suoraviivaista. Useimmiten kokeet ovat nopeita suorittaa, helppoja toistaa sekä kattavampia ja halvempia, kun niitä verrataan useiden yksittäisten yhdisteiden kemiallisiin analyysiin (OSPAR 2005). Akuuttien toksisuustestien heikko puoli on, että ne osoittavat vain pitoisuudet, jotka ovat testieliöille letaalit eivätkä kaikki näytteiden sisältämät kemikaalit välttämättä ehdi vaikuttaa vielä lyhyiden, alle 72 tunnin mittaisten testien aikana.

Pitkäaikaisvaikutuksia kartoittavat testit ovat lyhytaikaisia testejä herkempiä, joten jäteveden yhdisteiden vaikutuksista voidaan saada entistä realistisempi käsitys. Kroonisten testien avulla voidaan tutkia esimerkiksi haitta-aineiden vaikutusta koe-eläinten kasvuun tai jälkeläisten tuottokykyyn (IPPC 2011). Pitkäaikaisvaikutuksia tutkivien testien huonoina puolina nähdään niiden hinta ja hitaus. Joissain tapauksissa kroonisia vaikutuksia tutkivat testit on havaittu myös liian herkiksi pienille yhdistepitoisuuksille.

Akuutin ja kroonisen toksisuustestauksen lisäksi voidaan näytteistä tutkia haitallisten aineiden pysyvyyttä, bioakkumulaatiota, genotoksisuutta ja vaikutusta hormonitoimintoihin. Jäteveden haitallisten aineiden pysyvyyden (biohajoavuuden) arviointi on tärkeää, sillä nopeasti hajoavat aineet eivät välttämättä ehdi vaikuttaa lainkaan, kun taas pysyvät aineet voivat

kertyä ja levitä laajoillekin alueille. Toisaalta luonnossa myös nopeasti hajoavat aineet voivat osoittautua haitallisiksi, mikäli altistuminen aineille on jatkuvaa. Biohajoavuutta kemialliseen testaamiseen yhdiste kerrallaan on kehitetty useita standarditestejä, mutta esimerkiksi Zahn-Wellensin testi (ISO 9888 1999) ja liunneen orgaanisen hiilen vähenemistesti (ISO 7827 2010) sopivat myös useiden aineiden seoksille.

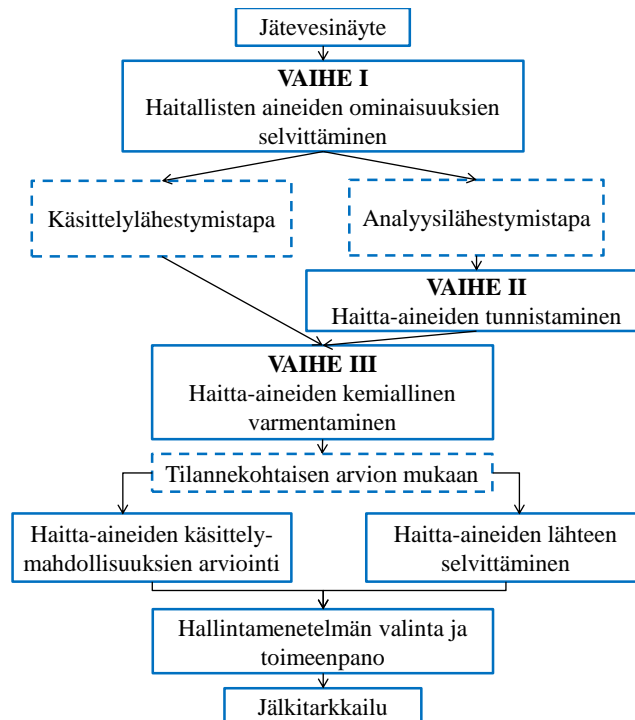
Bioakkumulaatio on ongelmallista, sillä kertyessään ympäristön pienetkin yhdistepitoisuudet voivat aiheuttaa haittavaikutuksia. Yksittäisten yhdisteiden biokertyvyyttä tutkitaan usein kalatestillä, missä kaloja altistetaan pitoisuuksille, joilla ei vielä ole vaikutusta kalan metaboliaan, minkä jälkeen määritetään aineen pitoisuus kalan kudoksista (ECETOC 2004). Jätevesinäytteen bioakkumulaatiopotentiaalia voidaan tutkia esimerkiksi vesi-oktanoli-kertoimen käyttöön perustuvalla kiinteäfaasiuutolla (OSPAR 2007).

Hormonitoimintoihin vaikuttavia (kehitys- ja lisääntymishäiriöitä aiheuttavia) aineita on tutkittu jo pitkään, ja niiden havaitseminen on olemassa olevien biotestien avulla mahdollista. Sekä teollisuus- että yhdyskuntajätevesien tapauksessa erityistä mielenkiintoa herättävät jätevesien sisältämien estrogeenien kaltaisesti toimivat aineet (Eggen ym. 2003, Kaj ym. 2011). Estrogeeni aktivoi maksan vitellogeniinituotannon, jota voidaan käyttää ksenoestrogeenialtistuksen biomarkkerina. Vitellogeniinin määrittämiseen on olemassa standardoitu testi (ISO 23893-3 2013).

Yhdisteiden mahdollisesti aiheuttamia muutoksia DNA:ssa voidaan tutkia genotoksisuustesteillä, joista useat soveltuvat myös jätevesinäytteille. Yksi yleisimmistä menetelmistä mutaagenisyyden selvittämiseksi on Amesin testi, joka perustuu *Salmonella enterica* –bakteerin kykyyn muodostaa pesäkkeitä (ISO 16240 2005). Mahdollisten positiivisten testitulosten tapauksessa on kuitenkin mietittävä hyvin tarkkaan, ovatko muutokset todellisuudessa haitallisia myös luonnossa (ECOTOC 2004). Sama pätee tietysti myös kaikkien muiden tulosten ekstrapolointiin.

Mikäli jätevesinäytteet tietystä paikasta osoittautuvat toistuvasti ympäristölle haitallisiksi, olisi haitalliset aineet kemiallisten analyysien avulla syytä selvittää ja mahdollisuutta päästöjen eliminointiin tutkia. Jätevedessä haittavaikutuksia aiheuttavien yhdisteiden lähde voidaan selvittää suorittamalla TIE-menetelmän (toxicity identification evaluation) mukaisia tutkimuksia (US EPA 1991). Kun haittavaikutuksia aiheuttavat yhdisteet tai ominaisuudet ovat selvillä, voidaan haitallisia päästöjä aiheuttavat prosessit useimmiten paikantaa TRE-

menetelmää (toxicity reduction evaluation) hyödyntäen. Edelleen TRE-menetelmän avulla voidaan tutkia, miten haitallisten päästöjen syntymistä voitaisiin välttää (Hutchings ym. 2004). Vaikka kemiallinen analytiikka on olennainen osa TIE- ja TRE-menetelmiä, voidaan TRE-menetelmästä toksisuustestejä hyödyntämällä tehdä kustannustehokkaampi (COHIBA 2010b). TRE-menetelmää on havainnollistettu kuvassa 2.



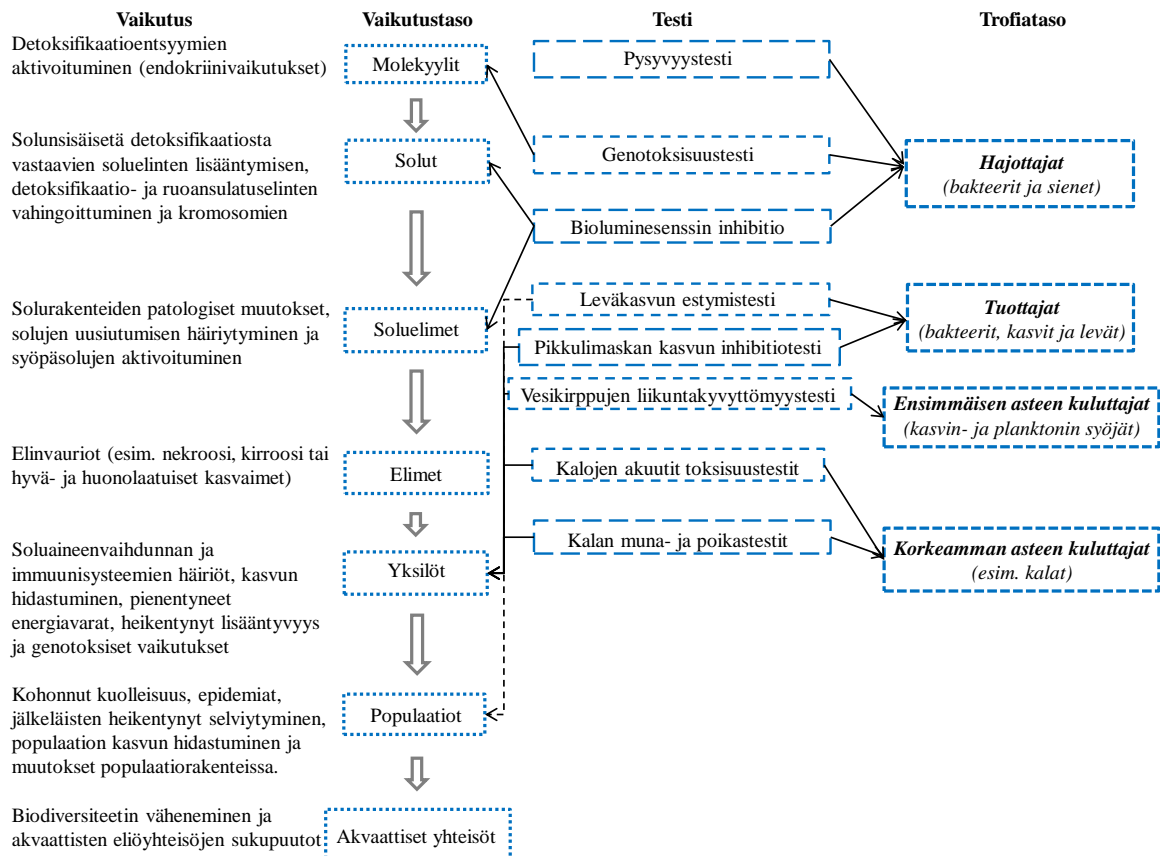
Kuva 2. TRE-menetelmän mukaiset toimenpiteet jäteveden sisältämien haitallisten aineiden vähentämiseksi (US EPA 1991 mukaan).

TIE- ja TRE-menetelmiä on hyödynnetty etenkin teollisuusjätevesien tarkkailussa (IPPC 2011). Yleisen toksisuustarkkailun lisäksi biologisilla testeillä voidaan tarkkailla myös jätevesien puhdistusprosessien tehokkuutta (Smital ym. 2011), ja käyttää testejä prosessien kehittämiseen.

1.6.2 Toksisuustestauksen suunnittelu

Jätevesien haitallisuuden arvioimiseen soveltuvia kokeita on monia erilaisia. Yhtä yksittäistä testiä kaikkien vasteiden mittaamiseen ei ole vaan käytettävät testit ja testieliöt tulee valita tapauskohtaisesti, sillä olosuhteet joihin testit sopivat, ovat usein hyvin tarkoin määriteltyjä eivätkä samat yhdisteet ole kaikille eliöille myrkyllisiä. Toksisuustestit tehdään ensisijaisesti koe-eläinten ehdoilla eli esimerkiksi näytteen pH tai suolapitoisuus tulee säätää sopivaksi. Lisäksi testivalintaa voivat ohjata esimerkiksi laskuvesistön suolapitoisuus, näytteen sameus tai testieliöiden herkkyys (Thomas ym. 2009, Marugán ym. 2012, Ma ym. 2014). Mikäli

tutkittavien näytteiden koostumusta ei tunneta tarkasti, on vaikutuksia suositeltavaa tutkia ainakin muutamille eri trofiatasojen eliöille tehtävillä testeillä (COHIBA 2010b). Eläinkoikeita tulee mahdollisuuksien mukaan välttää, joten testeissä on pyrittävä käyttämään mahdollisimman yksinkertaisia koe-eliöitä. Toksisuustestien suhdetta eri trofiatasoihin on havainnollistettu kuvassa 3.



Kuva 3. Esimerkki joidenkin akvaattisten toksisuustestien suhtautumisesta eri trofiatasoihin ja tutkittavien vasteiden vaikutustasoihin (Thompson ym. 2005 mukaan).

Toksisuustestauksen hyödyntäminen aivan kaikkien jätevesien tarkkailussa ei ole mielekäästä. Tarkkailun piiristä on yleensä poissuljettu pienet määrät (esim. alle 100 m³ vuorokaudessa) jätevettä tuottavat laitokset tai jätevesi, mitä ei lasketa suoraan vesistöön. Myöskään koostumukseltaan yksinkertaisen tai hyvin tunnetun jäteveden tutkiminen toksisuustestien avulla ei tuo lisähyötyä (Leverett 2006).

Menetelmää ei myöskään suositella käytettäväksi testiolosuhteisiin nähden fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan hyvin poikkeavien näytteitä tutkittaessa, sillä koeolosuhteisiin sopiviksi säädettyinä ne eivät toksisuudeltaan välttämättä enää vastaa alkuperäistä jätevettä

(ECOTOC 2004). Esimerkiksi Ra ym. (2008) havaitsivat, ettei kemiallisin menetelmin raskasainepitoisuuksiltaan myrkylliseksi todettu näyte aiheuttanut vastetta toksisuustestissä. Mahdollisina selittäjinä havainnoille pidettiin esimerkiksi robustia koelajia (*Daphnia magna* –vesikirppu), näytteen säätämistä koeolosuhteisiin sopivaksi tai jätevesinäytteen sisältämien yhdisteiden yhteisvaikutuksia.

1.6.3 Lyhytkestoiset toksisuustestit

Lyhytkestoiset toksisuustestit tehdään useimmiten selkärangattomille, leville tai bakteereille. Niillä saadaan nopeasti selkeä kuva jäteveden haitallisuudesta, mutta ekologiselta kannalta ne eivät välttämättä ole kovinkaan relevantteja (Van Dam & Chapman 2001) vaikka toisinaan niiden perusteella arvioidaan jopa pitkäaikaisvaikutuksiakin (Grindon ym. 2006). Testit ovat pisimmillään neljän vuorokauden mittaisia, ja niissä tutkitaan koe-eläiden kuolleisuutta tai vaihtoehtoisesti liikuntakyvyttömyyttä, sillä elottomuuden varmistaminen pienten selkärangattomien tapauksessa on usein hyvin vaikeaa (Van Dam & Chapman 2001). Erilaisia lyhytaikaisia toksisuustestejä on listattu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Esimerkkejä erilaisista lyhytkestoista toksisuusteesteistä (testin nimi, testin kesto, mahdollinen standardi ja lyhyt kuvaus testistä).

Testi	Testi-aika	Standardi	Kuvaus
Vesikirppujen liikuntakyvyttömyys testi	48 h	ISO 6341	Mittaa liikuntakyvyttömiä vesikirppujen prosentuaalista osuutta
Hankajalkais-testi	48 h	ISO 14669	Mittaa jäteveden yhdisteiden aiheuttamaa akuuttia toksisuutta kolmelle hankajalkaislajille
Valobakteeritesti	30 min	ISO 11348	Mittaa <i>Aliivibrio fischeri</i> –bakteerien luminesenssin inhibitiota 15 ja 30 minuuttia altistuksen alkamisesta
Valobakteeritesti sameille näytteille	30 min	ISO 21338	Mittaa <i>Aliivibrio fischeri</i> –bakteerien luminesenssin inhibitiota 15 ja 30 minuuttia altistuksen alkamisesta sameissa näytteissä
Leväkasvun inhibitiotesti	72 h	ISO 8692	Mittaa yksisoluisen viherlevän (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) kasvun inhibitiota lyhytaikaisessa altistuksessa
Bakteerikasvun inhibitiotesti	16 h	ISO 10712	Mittaa <i>Pseudomonas putida</i> –bakteerien kasvua. Ei soveltu sameille vesille
Kalojen akuutti toksisuustesti	4 vrk	ISO 7346 OECD 203	Mittaa kalojen (esim. <i>Oncorhynchus mykiss</i>) kuolleisuutta 24, 48, 72 ja 96 tuntia testin aloittamisesta
Kalan muna- ja poikastesti	4 vrk	ISO 15088	Mittaa jäteveden akuuttia myrkyllisyyttä (esim. saostuminen, sydämen lyöntitiheys, epämuodostumat jne.) seeprakalan munilla ja poikasilla

1.6.4 Tulosten tulkinta ja käyttö

Jotta biotestien tuloksista voitaisiin tehdä hyödyllisiä johtopäätöksiä, pitäisi testien olla luotettavia eli helposti toistettavissa ja antaa todenmukainen kuva näytteiden haitallisuudesta. Käytössä olevista biotesteistä on saatavilla tarkka ohjeistus, missä käydään läpi kaikki testin suorituksen vaiheet liuosten valmistuksesta koejärjestelyiden kautta tulosten tulkitsemiseen saakka. Tarkasta ohjeistuksesta huolimatta testituloksissa on vaihtelua niin eri laboratorioiden kuin myös koe-eläinlajien sisällä ja välillä. Vaihtelu voi johtua esimerkiksi eroista laboratoriohenkilökunnan taitotasoissa, käytettyjen koe-eläinten iästä, kunnosta tai herkkyydestä, näytteen säilytysajasta tai laimennoksissa käytetyn veden koostumuksesta (US EPA 2002). Mittausepävarmuutta voidaan kuitenkin yrittää pienentää testien laadunvalvonnalla ja käyttämällä standardisoituja ja valideja testimenetelmiä (COHIBA 2010b). On kuitenkin

huomattava, että luonnossa on tarkkaan kontrolloituihin laboratoriotesteihin verrattuna useampia muuttujia, joten todellisuudessa vastevaihtelu on vielä mitattuakin suurempaa. Täten esimerkiksi pitkäaikaisten biotestien päätepisteitä ei voida ekstrapoloida suoraan luonnontilaan, sillä niissä ei huomioida muita mahdollisia stressitekijöitä tai esimerkiksi päästöjen laimenemista.

1.6.5 Laadunvalvonta

Kun Yhdysvaltain ympäristönsuojelukeskus pyrki ratifioimaan toksisuustestauksessa käytettäviä testejä, tehtiin laajamittainen kartoitus, missä vertailtiin useita eri akuuttia ja kroonista toksisuutta ilmentäviä testejä. Tutkimuksessa vertailtiin testien onnistumisprosentteja, todennäköisyyksiä antaa väärä positiivinen testituloksia ja määritettyjen raja-arvojen vaihtelua. Tutkimuksen mukaan valtaosa testeistä onnistui hyvin eikä vääriä positiivisia testituloksia juuri saatu. Testien vaihtelua mitattiin tilastollisin menetelmin määrittämällä rinnakkaisten testien tuloksista saaduille raja-arvoille variaatiokerroin, jota käyttämällä voidaan myös verrata eri mittayksiköissä mitattujen muuttujien suhteellista hajontaa toisiinsa nähden. Laboratorioiden sisäinen vaihtelu osoittautui pienemmäksi kuin laboratorioiden välinen vaihtelu. Samoin vaihtelu kroonisen altistuksen testeillä osoittautui pienemmäksi kuin akuutin altistuksen testeillä (US EPA 2001). Näytteiden tutkiminen vaatii testimenetelmien tuntemusta ja huolellisuutta. Laadun varmistamiseksi analyysit tulisi teettää akkreditoitussa laboratoriossa. Sloveniassa suoritetuissa kenttäkokeissa (Cotman & Pintar 2013) havaittiin samasta paikasta samaan aikaan otettujen näytteiden analyysitulosten kemiallisen hapenkulutuksen, kiintoaines- ja sulfaattimäärän suhteen vaihdelleen alle 10 % laboratorion sisäisissä testeissä, mutta laboratorioiden välisissä testeissä miltei 30 %. Toisaalta taas COHIBA-projektiin liittyneen tutkimuksen (COHIBA 2010a) mukaan laboratorioiden välisten vesikirppukokeiden, leväkasvun inhibitiotestien ja valobakteerikokeiden testitulosten vaihtelu oli vähäistä vaikka testejä ei yhtenevin ohjeistuksin suoritettukaan. Samalla kuitenkin korostettiin, että testikriteerien tulee täytyä ja vertailuaineet ottaa kokeisiin mukaan, jotta voidaan varmistaa testien onnistuminen standardien mukaisesti. Testit tulee myös toistaa, mikäli niiden vaatimukset eivät täyty tai mikäli näytteiden havaitaan olevan haitallisia.

Laajassa mittakaavassa toteutettuna toksisuustestaus vaatii paljon laboratoriokapasiteettia ja -henkilöstöä, jotta näytteiden tutkiminen tuoreena olisi sujuvaa. Mikäli laboratorioiden palveluja joudutaan jonottamaan, ei analyysien suhteellista nopeutta voida hyödyntää päätök-

senteossa. Myös näytteiden oikeaoppinen ottaminen, säilöminen ja kuljettaminen vaatii resursseja. Warren-Hicks ym. (2000) havaitsivat laboratorioiden välisen vaihtelun lisäksi myös näytteiden analyysiajankohdan kasvattavan testitulosten vaihtelua.

Biotestien tulosten tulkitseminen edellyttää riittävää kokemusta ja varovaisuutta. Osa testeistä, kuten esimerkiksi jäteveden sisältämien yhdisteiden bioakkumulaatiota tai biohajoavuutta mittaavat testit, ovat toistaiseksi puutteellisia. Mikäli valitut testit ovat tilanteeseen sopimattomia tai väärin tehtyjä ja toistettuja, voivat ne antaa virheellisiä tuloksia ja siten ohjata harhaan. Mikäli testitulokset samasta kohteesta vaihtelevat eri näytteenotto-kerroilla, syy voi olla myös näytteen laadunvaihtelussa. Ennen testituloksista tehtäviä johtopäätöksiä onkin testin eri vaiheet aina näytteenottamisesta koejärjestelyjen läpivientiin ja vertailuaineen aiheuttamaan vasteeseen tarkistettava mahdollisten virheiden varalta. Sarakinos ym. (2000) osoittivat tunnettujen yhdisteiden selittävän toksisuuden vaihtelusta vain osan, joten myöskään haittavaikutuksien aiheuttajista ei pitäisi tehdä hätiköityjä johtopäätöksiä. Lisäksi on huomioitava, ettei testeissä useinkaan käytetä varsinaisessa purkuvesistössä esiintyviä herkempiä lajeja, ja haittavaikutukset voivat peittyä esimerkiksi näytteiden sisältämien ravinteiden takia. Toksisuustestaus ei siis itsessään ratkaise ympäristöongelmia eikä mahdollisia haittavaikutuksia aiheuttavia yhdisteitä saada ilman lisäanalyysijä selville.

1.7 Työn tavoite

Tämän työn tavoitteena oli tutkia kokonaistoksisuuden testauksen soveltuvuutta suomalaisen yhdyskuntajätevesien analysointiin. Biotestien luotettavuutta tarkasteltiin niiden toistettavuutta vertailemalla: koesarjoja ja pitoisuuksia mitattiin useita rinnakkaisia. Tutkimusmenetelmiksi valittiin standardisoidut ja toksisuustestauksessa yleisesti käytössä olevat menetelmät kolmelta eri trofiatasolta: akuuttia toksisuutta testattiin bioluminesenssin inhibitiotestillä (hajottajat) sekä lyhytkestoisella toksisuustestillä (ensimmäisen asteen kuluttajat) ja kroonista toksisuutta kasvun inhibitiotestillä (tuottajat). Mahdollisuuksien mukaan pyrittiin myös määrittämään hyväksyttävän inhibition raja-arvot, joita suuremmat vaikutukset olisivat hälytysmerkinä sille, että näytettä olisi tutkittava tarkemmin herkemmillä testeillä.

Lisäksi työssä tutkittiin näytteiden säilytyksen vaikutuksia toksisuustestauksen tuloksiin. Säilytystavaksi valittiin suositeltu pakastaminen, sillä muut kestäväintimenetelmät voivat mahdollisesti vaikuttaa jäteveden ominaisuuksiin vielä enemmän.

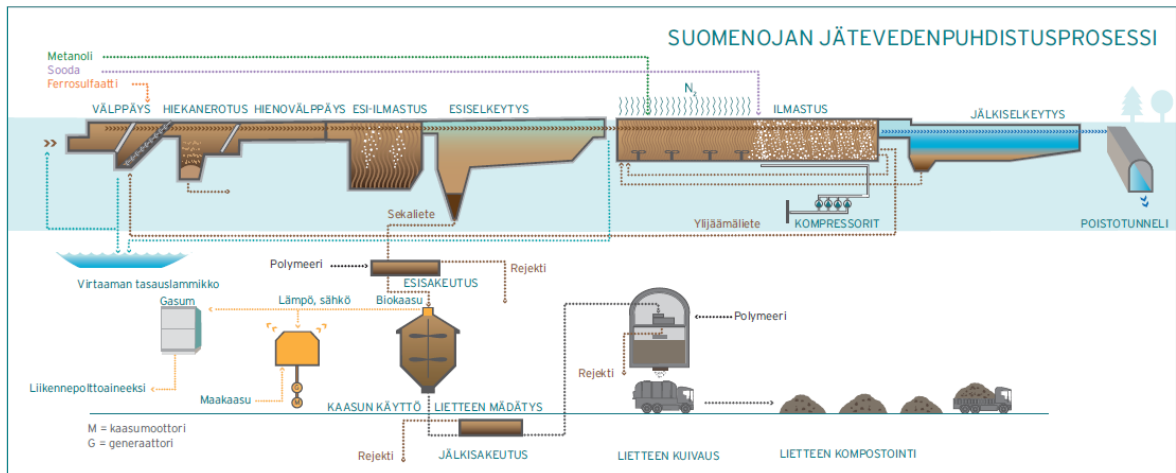
2 AINEISTOT JA MENETELMÄT

2.1 Jätevedenpuhdistamot ja näytteenotto

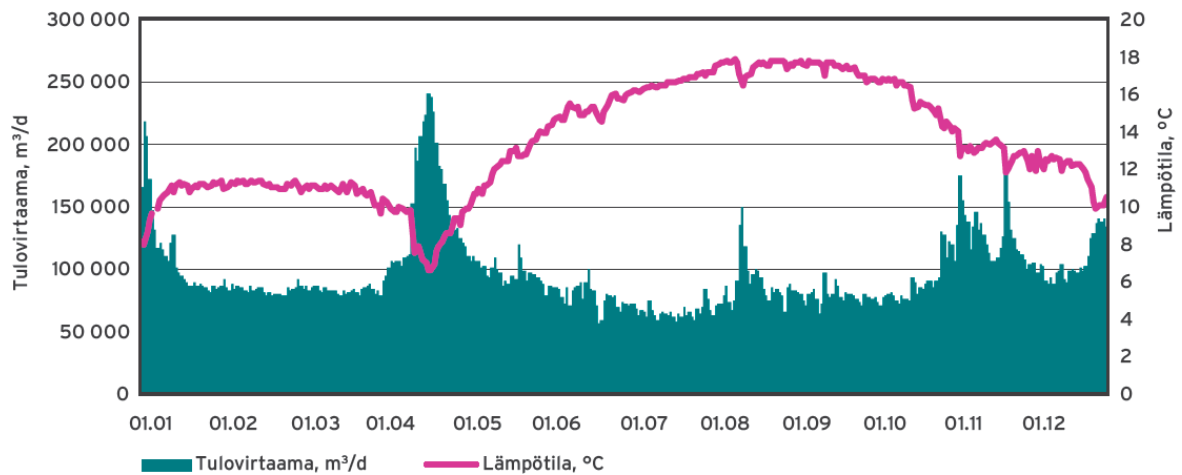
Kokeissa tutkittiin puhdistetusta yhdyskuntajätevedestä otettuja näytteitä kolmelta erikokoiselta etelä-suomalaiselta jätevedenpuhdistamolta: Klaukkalan keskuspuhdistamolta, Suomenojan jätevedenpuhdistamolta ja Viikinmäen jätevedenpuhdistamolta. Nurmijärven Vedden Klaukkalan keskuspuhdistamo on otettu käyttöön vuonna 2005. Kalliopuhdistamossa on kolmelinjainen aktiivilietelaitos, jossa toteutetaan tehokas orgaanisen aineen, fosforin ja tyypin poisto. Klaukkalan puhdistamolla käsitellään Klaukkalan, Röykän ja Rajamäen asukasjätevedet sekä Altia Oyj:n tehdasalueen jätevedet. Se on mitoitettu puhdistamaan 35 000 asukkaan jätevesikuormitus. Puhdistamon keskimääräinen virtaama toisella vuosineljänneksellä oli 7690 m³/d (Nurmijärven Vesi 2014).

Kokeissa tutkittu näyte kerättiin kello 07:00–07:00 6.5.–7.5.2013. Puhdistamon virtaama oli noin 6400 m³. Ilmastetun 20 °C:sen näytteen johtokyky oli 556 µS/m, pH 8,20 ja suolapitoisuus noin 0,03 % (274 ppm). Klaukkalan keskuspuhdistamon toisen vuosineljänneksen keskimääräiset kuormitusparametrit löytyvät taulukosta 2.

Helsingin seudun ympäristöpalvelut –kuntayhtymän (HSY) Suomenojan jätevedenpuhdistamo on Suomen toiseksi suurin. Kyseisen aktiivilietelaitoksen puhdistusprosessi kattaa jäteveden mekaanisen, kemiallisen ja biologisen puhdistuksen. Puhdistusprosessia on havainnollistettu kuvassa 4. Siellä käsitellään yli 310 000 asukkaan jätevedet Espoosta, Kauniaisista, Vantaan länsiosista ja Kirkkonummelta sekä teollisuusjätevesiä. Teollisuusjätevesien osuus puhdistamolle tulevista vesistä on noin kahdeksan prosenttia. Puhdistamon vuorokautinen keskivirtaama 96 737 m³/d ja vuoden suurin vuorokautinen virtaama 240 783 m³/d mitattiin 19.4.2013 (HSY 2014). Puhdistamolle tulevan jäteveden määrän ja lämpötilanvaihtelua vuonna 2013 on havainnollistettu kuvassa 5.



Kuva 4. Suomenojan jätevedenpuhdistusprosessi (HSY 2014).

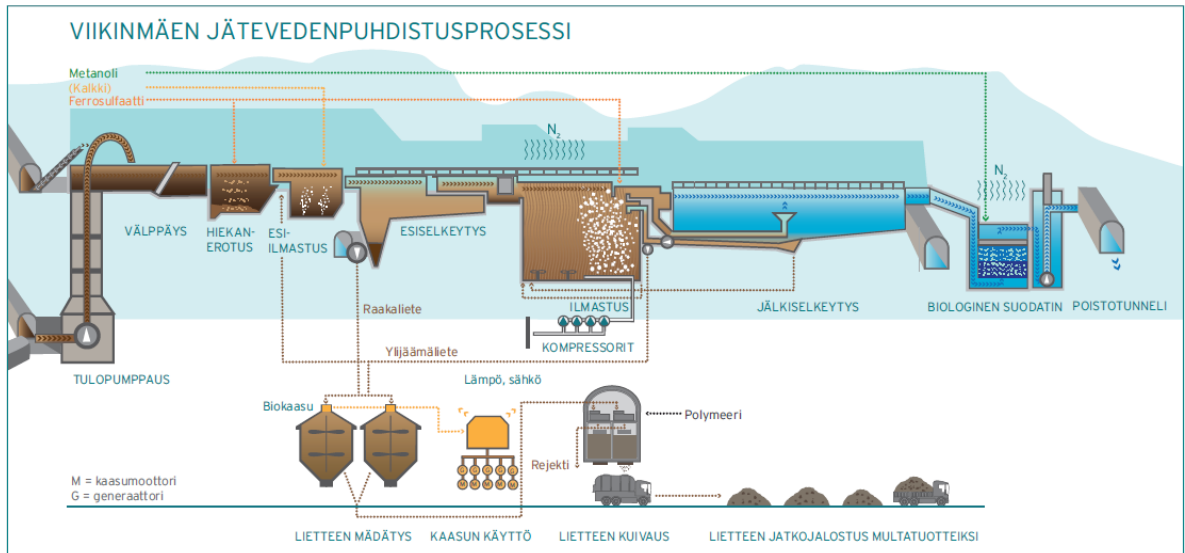


Kuva 5. Jäteveden virtaamat ja lämpötilanvaihtelut Suomenojan puhdistamolla vuonna 2013 (HSY 2014).

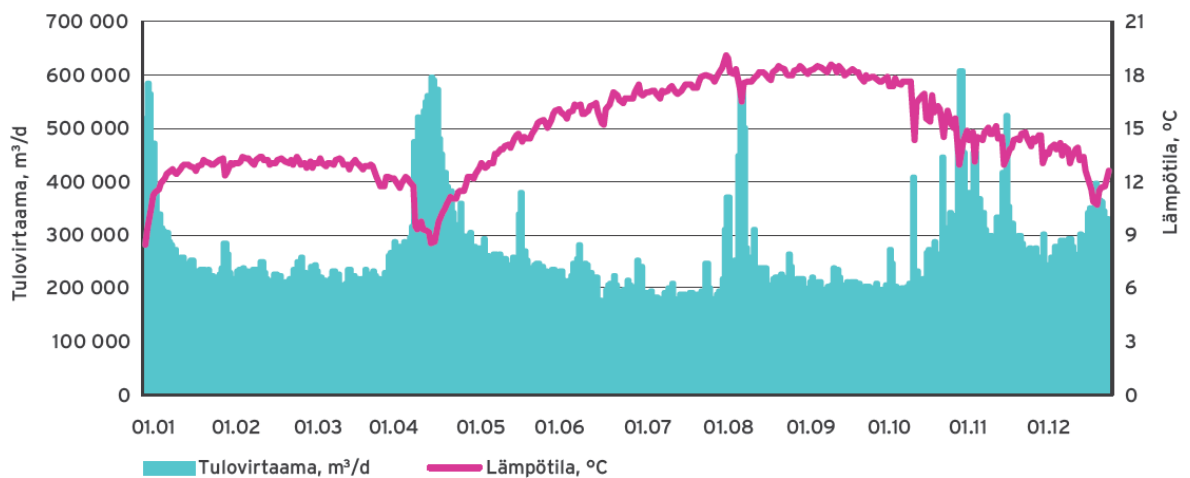
Kokeissa tutkittu näyte kerättiin kello 08:30–08:30 12.5.–13.5.2013. Näytteenoton aikana puhdistamon virtaama oli 94 915 m³. Ilmastetun 20 °C:sen näytteen johtokyky oli 652 μS/m, pH 8,26 ja suolapitoisuus noin 0,03 % (317 ppm). Vesistöön johdetun jäteveden kuormitusparametrit ovat taulukossa 2.

Suomen ja Pohjoismaiden suurin puhdistamo on HSY:n Viikinmäen jätevedenpuhdistamo, Myös Viikinmäellä puhdistusprosessi perustuu aktiivilietemenetelmään, ja puhdistusprosessia on havainnollistettu kuvassa 6. Puhdistamossa käsitellään Helsingin lisäksi myös Vantaan keski- ja itäosien, Keravan, Tuusulan, Järvenpään ja Sipoon eli yhteensä noin 800 000 asukkaan lisäksi alueen teollisuuden jätevedet. Puhdistamolle tulevasta jätevedestä noin 85 prosenttia on yhdyskuntajätevesiä ja loput 15 prosenttia teollisuusjätevesiä. Puhdistamon

vuorokautinen keskivirtaama $263\,875\text{ m}^3/\text{d}$ ja vuoden suurin vuorokautinen virtaama mitattiin 12.4.2013: $608\,022\text{ m}^3/\text{d}$ (HSY 2014). Vuonna 2013 puhdistamolle saapuneen jäteveden määrän ja lämpötilanvaihtelua on havainnollistettu kuvassa 7.



Kuva 6. Viikinmäen jätevedenpuhdistusprosessi (HSY 2014).



Kuva 7. Jäteveden virtaamat ja lämpötilanvaihtelut Viikinmäen puhdistamolla vuonna 2013 (HSY 2014).

Kokeissa tutkittu näyte kerättiin kello 09:00–09:00 20.5.–21.5.2013. Näytteenoton aikana puhdistamon virtaama oli $252\,159\text{ m}^3$. Ilmastetun 20 °C :sen näytteen johtokyky oli $564\ \mu\text{S}/\text{m}$, pH 8,35 ja suolapitoisuus noin 0,03 % (275 ppm). Vesistöön johdetun jäteveden kuormitusparametrit löytyvät taulukosta 2.

Taulukko 2. Klaukkalan, Suomenojan ja Viikinmäen jätevedenpuhdistamoilta vesistöön johdettujen vesien keskimääräiset kuormitusparametrit vuoden 2013 toiselta vuosineljännekseltä (Etelä-Suomen aluehallintovirasto 2013, HSY 2014, Nurmijärven Vesi 2014).

Puhdistamo	BOD _{7ATU} , mg/l	COD _{Cr} , mg/l	Kok. P, mg/l	Kok. N, poisto- teho (%)	SS, mg/l	AVL
Klaukkala	4,1	30,0	0,20	81,0	9,0	38 600
Suomenoja	5,2	46,5	0,29	67,9	5,9	334 995
Viikinmäki	6,8	45,0	0,23	90,0	7,9	1 052 654

Näytteet olivat virtaaman suhteessa kerättyjä 24 tunnin kokoomanäytteitä. Ne pyrittiin säilyttämään mahdollisimman viileässä (alle 10 °C:ssa), joten näytteet kuljetettiin puhdistamoilta polystyreenikylmälaukkuihin pakatuissa viiden litran muovikanistereissa. Ilmatilavuuden osuus pyrittiin minimoimaan täyttämällä kanisterit mahdollisimman täyteen.

Laboratoriossa näytteet sekoitettiin huolellisesti, ja noin puolet muovikanisterin sisällöstä kaadettiin steriileihin kertakäyttöisiin 0,5–1,0 litran polyeteenimuovipulloihin ja pakastettiin -20 °C:een noin viikoksi tulevia tutkimuksia varten. Jäljelle jääneet näytteet alkuperäisessä näytekannisterissa laitettiin jääkaappiin +4 ± 2 °C:een siltä varalta, ettei kaikkia kokeita ei voitu aloittaa näytteen noutopäivänä tai kokeita jouduttiin uusimaan. Näytteissä ei silmä-määräisesti tarkasteltuina havaittu kiintoainejäämiä.

Näytettä ilmastettiin laboratorioilmastimella puolen litran dekanterilaseissa noin kahden tunnin ajan ja samalla sen annettiin lämmitä huoneenlämpötilaan (noin 20 °C). Pakastettujen näytteiden esikäsittely vastasi tuoreiden näytteiden esikäsittelyä, mutta sitä edelsi näytteiden sulattaminen. Pakastetut näytteet sulatettiin alkuperäisissä muovipulloissa, ja sulamisprosessia nopeutettiin haalealla (noin 25 °C) vesihauteella. Esikäsittelyn jälkeen näytteet sekoitettiin hyvin ja niiden pH, suolapitoisuus ja sähkönjohtavuus mitattiin kannettavalla monitoimimittarilla (Multi 340i, WTW GmbH, Saksa). Laitteen happianturi oli epäkunnossa, joten näytteisiin liuenneen hapen määrää ei pystytty määrittämään.

Mukana kokeissa oli myös vertailuaineita niin sanottuina positiivisina kontrolleina, jotta voitiin varmistaa testikittien toimivan ja sekoitussuhteiden olevan varmasti oikeita. Vertailuaineina käytettiin standardien mukaisesti kaliumdikromaattia (K₂Cr₂O₇) ja 3,5-dikloorifenolia (C₆H₄Cl₂O). 3,5-dikloorifenolin (3,5-DCP) puhtaus oli yli 98 % (erä SDK 3769) ja toimittaja

oli Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Puhtausprosentiltaan 99.95–100,05 % kaliumdikromaatin (erä DR14211 HQ) toimitti Aldrich Chemical Company Inc. Vertailukemikaalit olivat jauhemaisessa muodossa, ja ne punnittiin analyysivaa'alla (XS205 DualRange, Mettler Toledo, Sveitsi) kertakäyttöisiä sileäpintaisia polystyreeniveneitä (Sigma-Aldrich, Saksa) apuna käyttäen.

2.2 Menetelmät

2.2.1 Akuutti toksisuustesti valobakteerilla

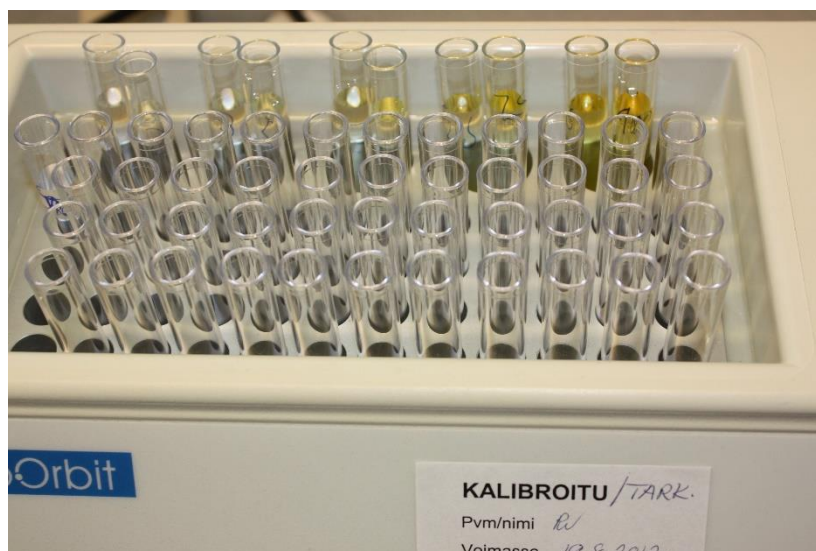
Työssä tutkittiin jätevesinäytteiden aiheuttamaa muutosta *Aliivibrio fischeri* –bakteerin bioluminesenssissa käyttämällä ISO-standardin (ISO 11348-3 2007) mukaista kineettistä Biotox™ -valobakteeritestiä vesinäytteille. *Aliivibrio fischeri* –bakteerin bioluminesenssin inhibiitotesti on nopea ja kustannustehokas vaihtoehto eläin- ja kasvitesteille. Sitä käytetään laajalti potentiaalisesti haitallisten kemikaalien seulonnassa ja ympäristöhaittojen arvioinnissa (Parvez ym. 2006).

Positiivisina kontrolleina käytettiin kaliumdikromaattia ($K_2Cr_2O_7$) ja 3,5-dikloorifenolia ($C_6H_4Cl_2O$). Negatiivisena kontrollina käytettiin 2 % natriumkloridiliuosta (NaCl). Jätevesinäytteistä ja kantaliuoksista tehtiin laimennussarjat ja pyrittiin määrittämään kunkin liuoslaimennoksen aiheuttama inhibitioprosentti, joita käyttäen määritettiin EC_{50} -arvo. EC_{50} -arvo on ainepitoisuus, joka aiheuttaa 50 %:n laskun valontuottotasossa verrattuna nolla- eli kontrollinäytteeseen. Testissä mitataan kontrollin ja näytelaimennosten luminesenssi testin alussa, 15 minuutin ja 30 minuutin kuluttua testin alkamisesta luminometrin avulla.

Työ aloitettiin valmistamalla 20 % NaCl-liuos 1243-500 BioTox™ (Aboatox Oy, lot SD1412, Suomi) liuottamalla kitin NaCl-tabletti 45 ml:an steriiliä ionivapaata vettä (Milli-Q® Integral Water Purification System, Millipore SAS, Ranska) steriilissä 50 ml laboratoriopullossa (Duran®, SCHOTT, Saksa) varovasti lämmittämällä. 2 % NaCl-liuos valmistettiin laimentamalla 20 % NaCl-liuosta 1:10 ionivapaata vettä 100 ml mittapullossa ($100 \pm 0,1$ ml EM Techcolor DIN A, Hirschmann, Saksa). Jätevesinäytteet ja vertailuaineiden kantaliuokset laimennettiin 2 % NaCl-liuoksella kylmähauteessa (1257-202 BioTox Chiller Mini-Refrigerator, BioOrbit, Suomi) jäädytettuihin 5 ml koeputkiin (75×12 mm, PS, SARSTEDT, Saksa) liitteiden 1, 2 ja 3 mukaisesti. Valmiita laimennoksia jäädytettiin kylmähauteessa 15 ± 1 °C:ssa vähintään 15 minuuttia ennen testin aloittamista.

Kutakin pitoisuutta tutkittiin neljänä rinnakkaisena kolmessa rinnakkaisessa laimennossarjassa niin juuri noudetusta kuin säilötystä näytteestäkin sekä positiivisista kontrolleista. Nesteen mittaamiseen käytettiin automaattipipettejä (5–50 µl Finnpiipette Digital, Thermo Scientific, Suomi, 20–200 µl Finnpiipette Digital, Thermo Scientific, Suomi, 200–1000 µl Finnpiipette, Thermo Labsystems, Suomi ja 0,5–5 ml Finnpiipette, Thermo Scientific, Suomi).

Kylmäkuivattu bakteeri lisättiin noin +4 °C-asteiseen rekonstruktio-liuokseen, ja annettiin suspension stabiloitua vähintään 30 minuuttia jääkaapissa +4 ± 2 °C:ssa. Sitten sen annettiin vielä stabiloitua +15 ± 1 °C:ssa kylmähauteessa vähintään 30 minuuttia. Tämän jälkeen testikyveteihin pipetoitiin 250 µl bakteerisuspensiota ja annettiin edelleen stabiloitua vähintään 15 minuuttia ennen kokeen aloittamista (kuva 8).



Kuva 8. Testikyvetit kylmähauteessa juuri ennen kokeen aloittamista.

Testi aloitettiin mittaamalla alkuhetken valontuotto kyveteistä, joissa oli stabiloitunutta bakteerisuspensiota. Mittalaitteena käytettiin luminometriä (FB12 Single Tube Luminometer, Titertek-Berthold (Berthold Detection Systems GmbH), Saksa). Kunkin kyvetin mittauksen jälkeen lisättiin 250 µl sekoitettua näytelaimennosta. Kyvetit sekoitettiin (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA) ja laitettiin takaisin kylmähauteeseen, missä niitä säilytettiin mittausten välillä. Bakteerien valontuotto mitattiin uudelleen tasan 15 ja 30 minuutin kuluttua. Kyvettejä ei sekoitettu uudelleen eri mittauskertojen välillä, sillä näytteiden ei epäilty tuottavan happivajetta. Pipetointi- ja mittausvälit pidettiin sekuntikellon avulla mahdollisimman tasaisina.

Kontrollin valontuotto saattoi vähentyä happipitoisuuden laskiessa inkuboinnin aikana. Tämä huomioitiin laskemalla kontrollille korjauskerroin. Korjauskertoimen avulla myös näytteiden valontuotannon mahdollinen kasvaminen tai väheneminen voitiin ottaa huomioon. Tulokset ilmoitettiin näytteen eri pitoisuuksien aiheuttamina inhibitioprosentteina. Mitäustulosten käsittely tehtiin taulukkolaskentaohjelman (Excel 2013, Microsoft, USA) avulla.

Inhibitioprosentti, I , laskettiin yhtälöllä 1

$$I = 100\% - \left(\frac{IT_{30}}{C_F \cdot IT_0} \right) \cdot 100\% \quad (1)$$

jossa IT_{30} on näytteen luminesenssi altistusajan jälkeen, missä C_F on korjauskerroin ja IT_0 näytteen luminesenssi alkuhetkellä.

Korjauskerroin, C_F , laskettiin yhtälön 2 avulla

$$C_F = \frac{IC_{30}}{IC_0} \quad (2)$$

jossa IC_{30} on kontrollin luminesenssi altistusajan (30 min) jälkeen ja IC_0 kontrollin luminesenssi alkuhetkellä.

2.2.2 Akuutti toksisuustesti vesikirpulla

Työssä tutkittiin puhdistettujen yhdyskuntajätevesien vaikutusta vesikirppuihin akuutissa toksisuustestissä kahden vuorokauden aikana. Positiivisina kontrolleina käytettiin kaliumdikromaattia ($K_2Cr_2O_7$) ja 3,5-dikloorifenolia ($C_6H_4Cl_2O$). Negatiivisena kontrollina työssä käytettiin standardin mukaista keinotekoisista makeaa vettä. Testit tehtiin kansainvälisestä standardiohjeesta (ISO 6341 2012) hieman mukailtua ohjetta seuraten. Testillä pyrittiin määrittämään 48 tunnin EC_{50} -arvo eli pitoisuus, jossa puolet vesikirpuista on liikkumattomia 48 tunnin altistuksen jälkeen. Mikäli oli mahdollista, määritettiin näytteille myös pienin pitoisuus, ts. suurin laimennos, joka immobilisoi kaikki vesikirput ja korkein pitoisuus eli pienin laimennos, joka ei immobilisoi vesikirppuja.

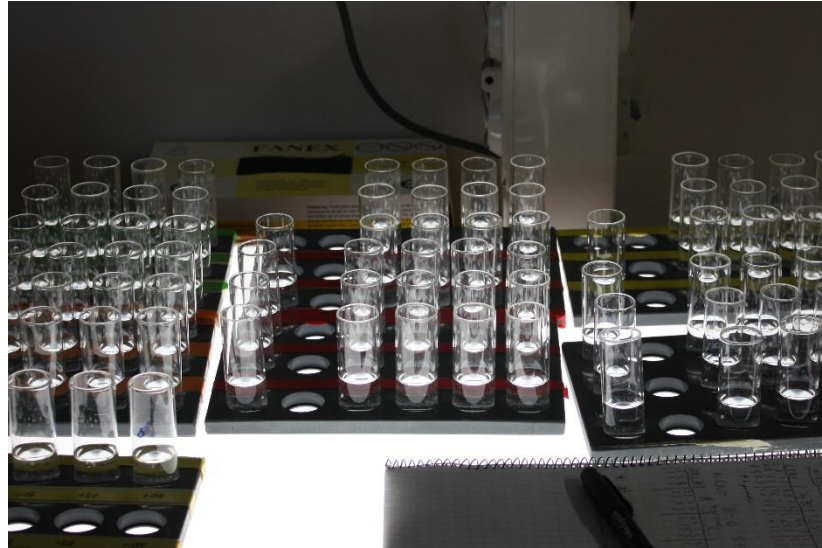
Kokeessa käytetyt vesikirput olivat elävänä syntyneitä *Daphnia magna* –vesikirppujen poikasina. Vesikirppuja kasvatettiin erillisessä kasvatushuoneessa standardin (ISO 10706 2000) mukaan valmistetussa Elendt M7 -vedessä, jota ilmastettiin kahden litran mittapulloissa

kaksi tuntia, jotta voitiin olla varmoja sen saavuttaneen riittävän happisaturaation ($\geq 90\%$; $\geq 8\text{mg/L}$; $20\text{ }^\circ\text{C}$), minkä jälkeen sen pH tarvittaessa säädettiin $7,8 \pm 0,5$ käyttäen 1M NaOH- tai HCl-liuosta. Koetta edeltävänä päivänä kasvatusastioina toimineista litran dekantterilaseista poistettiin munia kantamattomat yksilöt, ja jäljelle jääneet vesikirput ruokittiin leväliuoksella. Veden lämpötila vastasi kasvatushuoneen lämpötilaa eli oli noin $20\text{ }^\circ\text{C}$ astetta. Kasvatusastioille ei järjestetty ylimääräistä valaistusta. Seuraavana aamuna yön aikana syntyneet poikaset kerättiin varovasti pipetoimalla keinotekoisella makealla vedellä täytettyyn kertakäyttöastiaan.

Ilmastettujen jätevesinäytteiden pH:t olivat 6–9, joten niitä ei tarvinnut säätää. Valmistettujen laimennosten pH kuitenkin tarkistettiin. Happisaturaatio oli varmistettu ilmastamalla jo aikaisemmin. Näytteistä, Elendt M7 -vedestä, kaliumdikromaatin ja 3,5-DCP:n kantaliuoksista valmistettiin laimennussarjat koeastioihin liitteiden 4, 5 ja 6 mukaisesti. Nesteiden mittaamiseen käytettiin automaattipipettejä. Laimennossarjoja oli kolme rinnakkaista per puhdistamo sekä juuri noudetusta että säilytystä näytteestä kuten molemmista positiivisista kontrolleistakin. Laimennossarjojen jokaista testipitoisuutta kohti käytettiin 20 vesikirppua; neljä rinnakkaista koeastiaa, joissa jokaisessa viisi vesikirppua 10 ml:ssa testiliuosta.

Kokeen alussa vesikirput siirrettiin varovasti koeastioihin muovisella pasteur-pipetillä, jonka kärki oli katkaistu. Vesikirppujen annettiin uida ulos pipetin kärjestä, jotta ne eivät vahingoittuisi ja jottei testitulavuus muuttuisi. Valaistuksena työssä käytettiin tavallisia loisteputkia. Standardin mukaisesti valaistuksen ja pimeän jakson olisi pitänyt olla suhteessa 16:8, mutta tässä työssä käytettiin tavallisen työpäivän mittaista 10:14 valaistusta. Lisäksi koeastiat peitettiin paperilla mahdollisen kontaminaation minimoimiseksi.

24 tunnin välein kokeen aloituksesta laskettiin jokaisessa koeastiassa liikuntakykyisinä säilyneiden vesikirppujen määrä (kuva 9). Liikuntakyvyttömiksi tai kuolleiksi luettiin eläimet, jotka eivät liikkuneet 15 sekuntiin pienen ärsykkeenkään jälkeen. Samalla koeastioita raviseltiin varovasti, jotta näyte pysyisi paremmin sekoittuneena.



Kuva 9. Vesikirppujen liikkeitä tarkasteltiin kuvassa näkyvän valopöydän päällä.

Havainnot kirjattiin ja tulokset laskettiin taulukkolaskentaohjelman avulla. Tulokset ilmoitettiin näytteen eri pitoisuuksien aiheuttamina kuolleisuusprosentteina. Kuolleisuusprosentit laskettiin yhtälön 3 avulla

$$\frac{n_{48}}{n_0} \cdot 100 \quad (3)$$

jossa n_0 oli vesikirppujen määrä testin alussa ja n_{48} liikuntakykyisten vesikirppujen lukumäärä altistusajan (48 h) jälkeen.

2.2.3 Leväkasvun inhibitiotesti

Työssä tutkittiin yksisoluisen *Pseudokirchneriella subcapitata* -viherlevän kasvua altistettaessa sitä vesiliukoisille aineille 72 tunnin ajan. Testinä käytettiin ISO-standardista (ISO 8692 2004) kuoppalevyille soveltuvaksi muokattua kasvunestymistestiä. Pienemmässä mittakaavassa toteutetuilla levätesteillä saavutetaan ISO 8692 -standardin mukaisesti toteutettuihin testeihin vertailukelpoisia tuloksia (Eisentraeger ym. 2003). Arensbergin ym. (1995) mukaan pienennetyin mittakaavan etuina ovat testiolosuhteiden helppo kontrollointi, hyvä sekoittuminen ja kaasujenvaihto nestepinnan ja ympäröivän ilman välillä. Myös valaistusolosuhteiden yhtenäistäminen koeolosuhteissa on helppoa pienennetyssä mittakaavassa.

Positiivisena kontrollina käytettiin 3,5-dikloorifenolia ($C_6H_4Cl_2O$). Negatiivisena kontrollina käytettiin ionitonta steriiliä vettä. Klorofyllin fluoresenssi määritettiin tunnetussa levätiheydessä, ja levien kasvua mitattiin fluoresenssin muutoksena. Vertaamalla altistetun levän

kasvua altistamattomiin selvitetiin kunkin liuoslaimennoksen aiheuttama inhibitioprosentti. Inhibitioprosentteja hyödynnettiin EC_{50} -arvon määrittämisessä.

Kokeessa käytetty levä kasvatettiin liemiviljelystä SAG 61.81 (Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Göttingenin yliopisto, Saksa) leväkannasta. Jotta testiin saatiin eksponentiaalisesta kasvuvaiheesta olevaa levää, aloitettiin esikasvatus neljä vuorokautta ennen varsinaista testiä. Ennen esikasvatuksen aloittamista valmistettiin väkevä ravintoliuos. Se sekoitettiin steriiliin erlenmeyer-pulloon seuraavasti: 87 ml steriiliä ionitonta vettä, 10 ml varastoliuosta 1, 1 ml varastoliuosta 2, 1 ml varastoliuosta 3 ja 1 ml varastoliuosta neljä. Varastoliuokset valmistettiin liitteiden 7 ja 8 mukaisesti. Esikasvatus tehtiin liuoksessa, mikä valmistettiin väkevästä ravintoliuoksesta 1:10 steriilillä ionittomalla vedellä laimentamalla. Liuosta ilmastettiin vähintään puoli tuntia steriilisuodatetulla ilmalla, minkä jälkeen varmistettiin pH-arvon olevan $8,3 \pm 0,2$ pH-mittarilla (CG842 pH-meter, SCHOTT, Saksa). Tarvittaessa pH säädettiin 1M NaOH:lla tai HCl:lla. Valmista ravintoliuosta säilytettiin 4 °C:ssa ja se uusittiin viikon välein.

Leväsoluteiheyden tuli olla noin 10^4 solua/ml (± 25 %). Tämä varmistettiin Bürker-solulasentakammion avulla mikroskopoimalla. Esikasvatus tehtiin steriloidussa 100 ml Schottin pulloissa. Esikasvatusta inkuboitiin kasvatuskaapissa (Versatile Environmental Test Chamber MRL-350H, SANYO Electric Biomedical Co. Ltd., Japani), minkä lämpötila oli säädetty 21 ± 2 °C, kosteus noin 60 % ja valaistus 7,5 kluxiin. Todelliseksi valaistustehoksi kuitenkin mitattiin 7,1 kluxia kaapin keskeltä ja 8,6 klux seinien vierestä.

Ennen kokeen aloittamista esikasvatuksen solutiheys määritettiin mikroskopoimalla. Soluteiheyden testin alussa tuli olla 8×10^3 solua/ml. Solususpensiosta valmistettiin tiheydeltään 8×10^4 solua/ml, sillä kuoppalevyllä leväsiirros laimeni suhteessa 1:10.

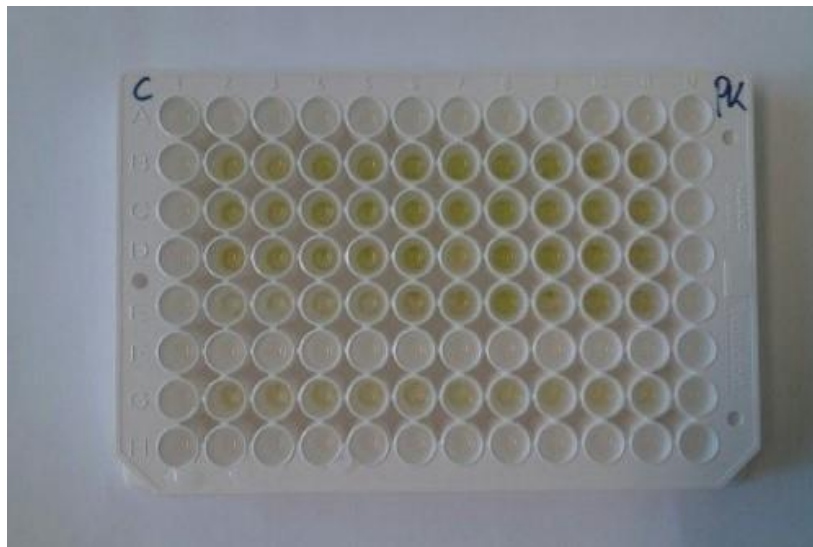
Käytetyt laimennokset valmistettiin erillisiin koeputkiin. Kokeissa tutkitut näytelaimennokset valmistettiin liitteen 9 mukaisesti. Ennen laimentamista näytteet suodatettiin niissä mahdollisesti esiintyvien muiden levien tai mikrobien eliminoimiseksi. Suodattaminen tapahtui huokoskooltaan 0,20 μ m:n steriilillä lasikuituesisuodattimella varustetulla selluloosa-asettaattisuodattimella (Minisart plus (erä 00036103), Sartorius, Saksa) kertakäyttöistä 5 ml:n steriiliä injektioruiskua (Luer-Lok™ (erä 05E05 2010-04), Becton Dickinson, USA) apuna käyttäen. Jokaista pitoisuutta tutkittiin kuutena rinnakkaisena kolmella rinnakkaisella kuoppalevyllä sekä juuri noudetusta että säilytystä näytteestä. Tutkitut vertailuainelaimennokset

valmistettiin liitteen 10 mukaisesti. Eri vertailuainepitoisuuksia tutkittiin kolmena rinnakkaisena kolmella rinnakkaisella levyllä. Testattavia aineita pipetoitiin steriilille kuoppalevyille liitteiden 11 ja 12 mukaisesti. Kuoppien lopputilavuus oli 300 μl , ja nesteiden mittamiseen käytettiin automaattipipettejä.

240 μl näytelaimennosten päälle pipetoitiin 30 μl väkevää ravintoliuosta ja 30 μl leväsiirrosta. Näytteiden taustakuopissa leväsiirros ja kontrollin taustakuopissa näytelaimennos korvattiin vedellä. Kontrollin taustakuoppiin pipetoitiin 270 μl vettä ja 30 μl väkevää ravintoliuosta robotilla (Multidrop 384 type 832, Thermo Electron Corporation, Suomi). Myös testilevyjen pitkien sivujen uloimpiin kuoppiin pipetoitiin vettä haihtumisen vähentämiseksi robotin avulla. Lisäksi jokaisella testikerralla testattiin vertailuainetta yhdellä levyllä.

Valmiit levyt sekoitettiin kevyesti ravistelemalla ja alkutilanteen fluoresenssi mitattiin kuoppalevylukijalla (Victor³ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, Singapore) Wallac-ohjelmistoa (eksitaatio 450 nm, emissio 680 nm, mittausaika 1,0 s, CW-lampun energia 2400 J/cm² ja mittauskorkeus 8 mm) käyttäen. Lopuksi levyt asetettiin kasvatuskaappiin tasoravistelijaan (Titramax 1000, Heidolph, Saksa). Ravistelu nopeus säädettiin kahteensataan kierrokseen minuutissa optimaalisen sekoituksen aikaansaamiseksi.

Levyt mitattiin testin alkuhetkellä sekä yhden, kahden ja kolmen vuorokauden kuluttua kokeen aloittamisesta kuoppalevylukijalla. Ennen jokaista mittausta kuoppalevyjä sekoitettiin kevyesti ravistelemalla (kuva 10). Kuoppalevyn kannet keräsivät paljon vettä jo vuorokauden aikana, mutta niitä ei kuivattu testin aikana, sillä vesikerroksen tiedettiin vähentävän haihtumista tulevana päivinä. Ennen mittauksia kuoppien reunat kuitenkin kuivattiin, jotta kuoppalevylukija tunnisti kuoppalevyn. Mittausten välillä levyt aseteltiin takaisin kasvatuskaappiin tasoravistelijan päälle sattumanvaraisessa järjestyksessä valaistusolosuhteiden mahdollisesti aiheuttamien erojen minimoimiseksi.



Kuva 10. Kuoppien sisältö ei ole ollut täysin tasaisesti sekoittunutta ennen ravistelua.

Mittaustulokset vietiin taulukkolaskentaohjelmaan. Näytteiden tulokset korjattiin vähentämällä niistä vastaavan taustan fluoresenssilukema ja kontrollien tulokset korjattiin vähentämällä kontrollien keskiarvioista taustan keskiarvot. Sen jälkeen tuloksista laskettiin kasvunopeudet ja inhibitioprosentit.

Kasvunopeus, μ , laskettiin yhtälön 4 avulla

$$\mu = \frac{(\ln F_{72} - \ln F_0)}{(t_{72} - t_0)} \quad (4)$$

jossa μ oli kasvunopeus, F_0 fluoresenssilukema testin alussa, F_{72} fluoresenssilukema testin (72 h) jälkeen, t_0 testin alkuhetki ja t_{72} testin loppuhetki (72 h testin alusta).

Kun kasvunopeudet oli määritetty, laskettiin kunkin pitoisuuden aiheuttama inhibitioprosentti, I , yhtälön 5 mukaisesti

$$I = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \cdot 100\% \quad (5)$$

jossa μ_C oli kontrollien kasvunopeuksien keskiarvo ja μ_T kasvunopeus testiainepitoisuudessa.

2.2.4 Ohjelmisto ja tilastolliset menetelmät

Kokonaistoksisuuden testauksen soveltuvuutta suomalaisille yhdyskuntajätevesille tutkittiin biotestien luotettavuutta tarkastelemalla eli niiden toistettavuutta ja rinnakkaisia koesarjoja

vertailemalla. Koesarjoja ja pitoisuuksia mitattiin useita rinnakkaisia. Kerättyä laajaa aineistoa tutkittiin vapaan lähdekoodin R -tilasto-ohjelmalla (versio 3.1.0 ”Spring Dance”). Ohjelmistoa hyödynnettiin myös koetulosten visualisoinnissa.

Merkitsevyytasoksi valittiin 5 %. Aineiston normaalijakautuneisuutta tutkittiin useimmiten Shapiro-Wilkin testillä tarkasteltavien ryhmien pienen koon ($n < 50$) takia, mutta otoskoon riittäessä myös Kolmogorov-Smirnovin testiä käytettiin. Mikäli aineisto ei ollut normaalijakautunut, pyrittiin asia korjaamaan erilaisilla muunnoksilla. Korjaustoimenpiteet eivät kuitenkaan kertaakaan tuottaneet haluttua tulosta, sillä aineisto oli usein kaksihuippuista. Myöskään oikealle tai vasemmalle vinojen jakaumien korjaaminen ei ollut mielekästä, sillä vaikka aineistosta saatiin normaalijakauman mukainen, menetettiin usein suurin osa informaatiosta aineiston luonteen vuoksi. Poikkeavia havaintoja etsittiin sekä visuaalisesti että tilastomatemattisin keinoin outliers –paketin Grubbsin testin avulla. Poikkeavat havainnot käsiteltiin tapauskohtaisesti.

Mikäli vasteet jakautuivat normaalisti, varianssien homogeenisuuden tutkimiseen käytettiin Bartlettin testiä. Muutoin valittiin aineiston normalisuusoletuksen suhteen robustimpi Levenen testi. Varsinainen tilastollinen tarkastelu suoritettiin datan lähtökohdista riippuen joko ANOVA:lla (parametrinen testi useammalle riippumattomalle otokselle), Kruskal-Wallis H –testillä (parametrinon testi useammalle riippumattomalle otokselle), Mann-Whitney U –testillä (parametrinon testi kahdelle riippumattomalle otokselle) tai Studentin t –testillä (parametrinen testi kahdelle riippumattomalle otokselle). Aineiston ei oleteta olevan normaalisti jakautunut tai varianssien yhtä suuria parametrittomia testejä käytettäessä, mutta ne eivät ole yhtä luotettavia kuin parametriset testit.

Levä- ja valobakteeridatan annos-vaste-mallit luotiin ja inhibitiokuvaajat piirrettiin vertailuaineiden osalta drc –paketin (Christian Ritz, Tanska) funktioita hyödyntäen. Käyttäväksi valittiin neliparametrinen log-logistinen malli, sillä se kuvasi dataa parhaiten mahdollisia negatiivisen inhibition arvoja mukaillessaan. EC_{20} -, EC_{50} - ja EC_{80} -arvot määriteltiin ED-funktion avulla. Vesikirppudataa tutkittiin standardin (OECD 2004) ohjeistuksen mukaan probit-analyysin avulla, sillä selitettävä muuttuja oli binäärinen ja probit-mallin hännän on todettu aikaisempien testien perusteella noudattavan logit-mallia paremmin tutkittavan muuttujan jakaumaa. Myös vesikirppudata havainnollistettiin annos-vaste-kuvaajan avulla vertailuaineiden osalta. Jätevesinäytteistä mitattuja vasteita havainnollistettiin annos-vaste-kuvaajin vain bioluminesenssin inhibitiotestin osalta. Muissa testeissä rinnakkaisten mittaustulosten

vaihtelu oli useimmiten niin suurta, että pylväsdiagrammit olivat datan visualisoinnin kannalta havainnollisempia.

3 TULOKSET

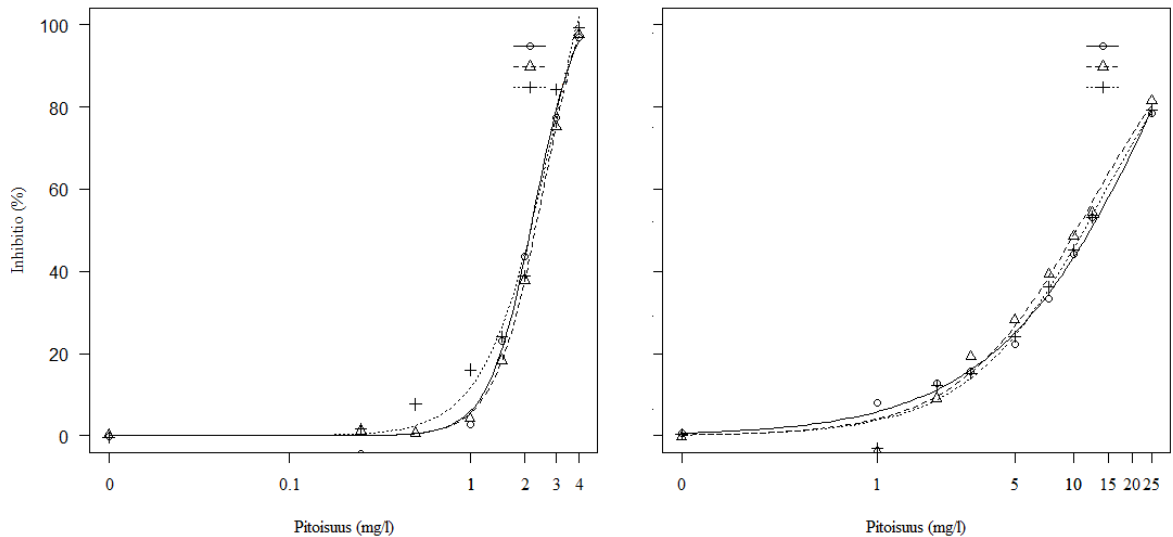
3.1 Akuutti toksisuustesti valobakteerilla

3,5-dikloorifenolin koesarjoista määritettiin EC₅₀-arvoksi $2,43 \pm 0,16$ mg/l ja EC₈₀-arvoksi $3,85 \pm 0,30$ mg/l. Kromaatin (IV) koesarjoista määritettiin EC₂₀-arvoksi $5,32 \pm 1,36$ mg/l, EC₅₀-arvoksi $18,02 \pm 4,99$ mg/l ja EC₈₀-arvoksi $61,05 \pm 18,15$ mg/l. Testitulokset olivat hyväksyttäviä, sillä standardin (ISO 11348-3 2007) mukaan 3,5-dikloorifenolin tulisi aiheuttaa 20–80 % inhibitio pitoisuudessa 3,4 mg/l ja kaliumdikromaatin pitoisuudessa 18,7 mg/l. Mittaustuloksia on havainnollistettu kuvassa 11.

Vaikka vasteen vaihtelu olikin varsin suurta yhdessä kaliumdikromaatin koesarjoista, ei lohko-vaikutus ollut tilastollisesti merkitsevää kumpaakaan kontrolliainetta tutkittaessa. Eri pitoisuuksien sen sijaan todettiin eroavan tilastollisesti erittäin merkitsevästi toisistaan. Koesarjojen sisällä rinnakkaisten mittausten poikkeama vasteiden keskiarvosta oli yleensä alle kolme prosenttia. Myös Hernando ym. (2006) ja Farré ym. (2006) totesivat bioluminesenssin inhibitiotestin hyvän toistettavuuden. Tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 3, missä lohko-vaikutuksella tarkoitetaan mitatun vasteen eroja rinnakkaisten koesarjojen välillä ja pitoisuudella eri pitoisuuksien aiheuttaman vasteen välillä.

Taulukko 3. 3,5-dikloorifenolista ja kaliumdikromaatista valmistettujen koesarjojen aiheuttaman bioluminesenssin inhibition tilastollisen tarkastelun (Kruskall-Wallis H –testi) p-arvot *Aliivibrio fischeri* –bakteerilla.

Selittäjä Yhdiste	Lohko- vaikutus	Pitoisuus
3,5-DCP	0,325	< 0,001
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,963	< 0,001



Kuva 11. Annos-vaste-kuvaaja 3,5-dikloorifenolin (vas.) ja kaliumdikromaatin aiheuttamasta bioluminesenssin inhibitiosta *Aliivibrio fischeri* -bakteerilla.

Valtaosan näytteistä todettiin vain stimuloivan bioluminesenssia, ja yleinen trendi oli stimulaation kasvaminen näytepitoisuuden kasvaessa (kuvat 12, 13 ja 14). Vain Klaukkalan keskuspuhdistamon tuoreesta näytteestä mitattiin pientä valontuotannon inhibitiota. Se oli myös ainoa näyte, missä bioluminesenssin stimulaatio väheni testipitoisuuden kasvaessa.

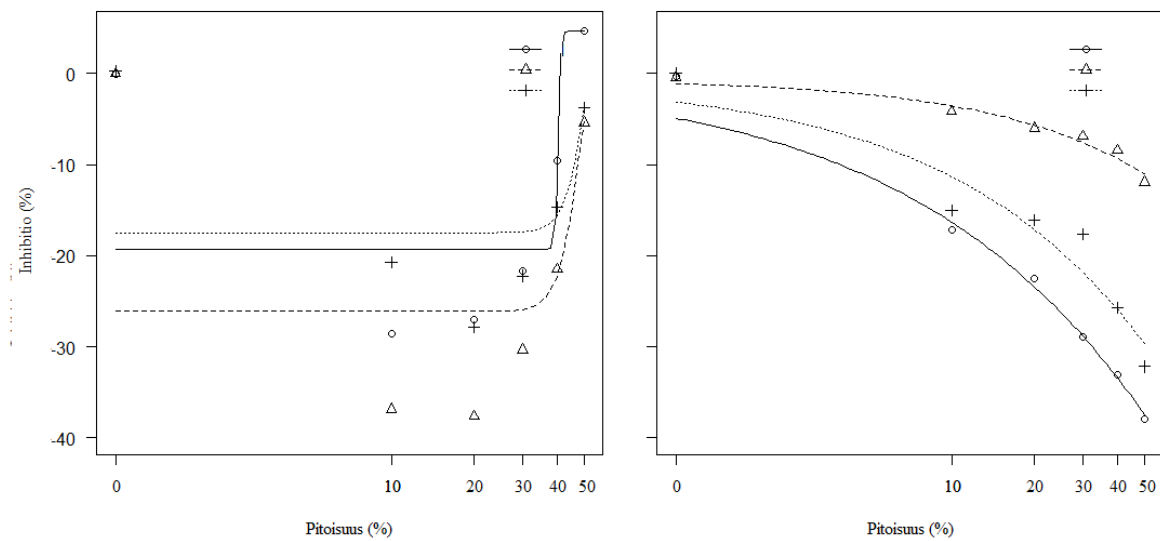
Näytteen pakastamisella ei havaittu olevan tilastollisesti merkittäviä vaikutuksia. Pakastettu Klaukkalan keskuspuhdistamon näytteen kuitenkin todettiin aiheuttavan päinvastaisen vasteen kuin tuore näyte: bioluminesenssin stimulaation todettiin kasvavan näytepitoisuuden kasvaessa. Visuaalisesti tarkasteltuna rinnakkaisten koesarjojen vasteet pakastetusta näytteestä vaikuttivat olevan aavistuksen yhdenmukaisempia kuin tuoreiden näytteiden koesarjojen. Näytteiden tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 4, missä tuoreena tutkittujen näytteiden tulokset ovat rivillä tuore ja pakastettujen näytteiden tulokset rivillä pakastettu. Pakastettujen ja tuoreiden näytteiden aiheuttamien vasteiden vertailu näkyy rivillä molemmat.

Taulukko 4. Klaukkalan keskuspuhdistamon, Suomenojan puhdistamon ja Viikinmäen puhdistamon näytteestä valmistettujen koesarjojen aiheuttaman bioluminesenssin inhibition tilastollisen tarkastelun (Kruskall-Wallisin H –testi) p-arvot *Aliivibrio fischeri* –bakteerilla.

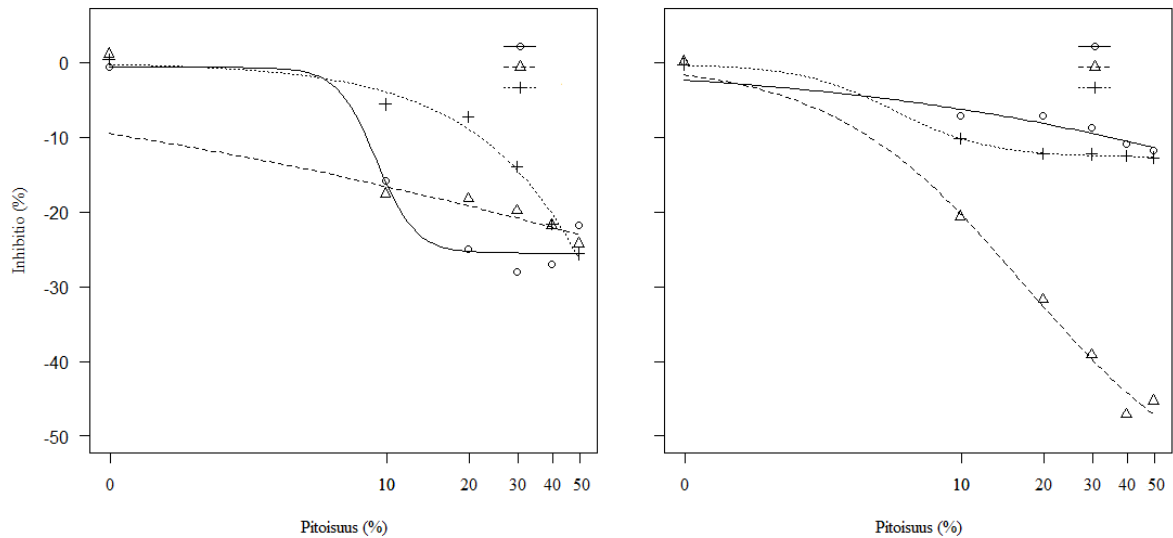
Selittäjä Näyte	Klaukkala		Suomenoja		Viikinmäki	
	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus
Tuore	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Pakastettu	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Molemmat	0,633 ^b		0,112 ^a		0,752 ^b	

^a Mann-Whitney U –testi

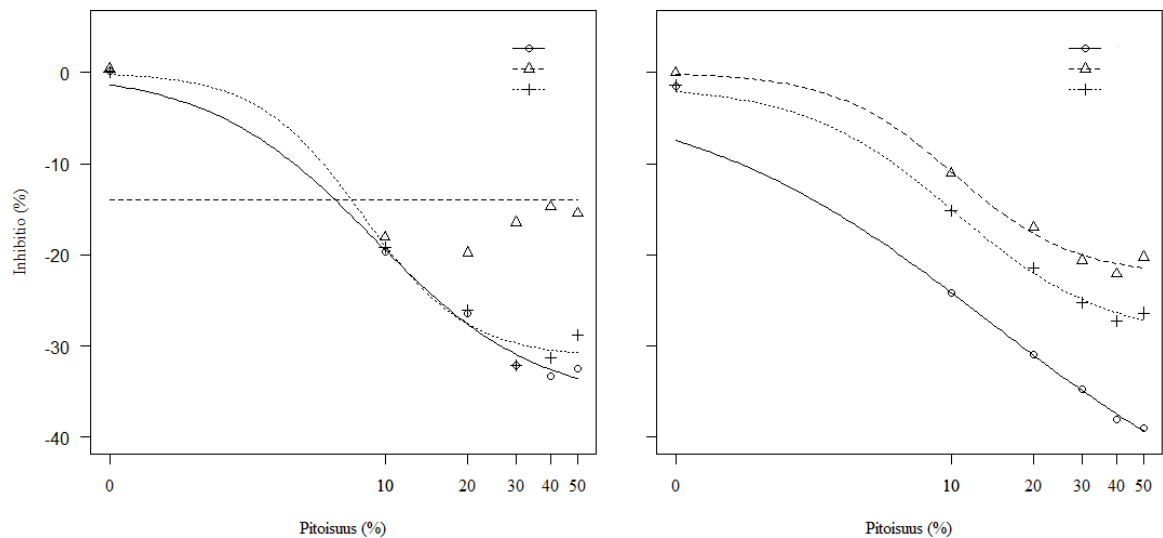
^b Studentin t –testi



Kuva 12. Annos-vaste-kuvaaja Klaukkalan keskuspuhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttamasta bioluminesenssin inhibitiosta *Aliivibrio fischeri* –bakteerilla.



Kuva 13. Annos-vaste-kuvaaja Suomenojan puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttamasta bioluminesenssin inhibitiosta *Aliivibrio fischeri* -bakteerilla.



Kuva 14. Annos-vaste-kuvaaja Viikinmäen puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttamasta bioluminesenssin inhibitiosta *Aliivibrio fischeri* -bakteerilla.

3.2 Akuutti toksisuustesti vesikirpulla

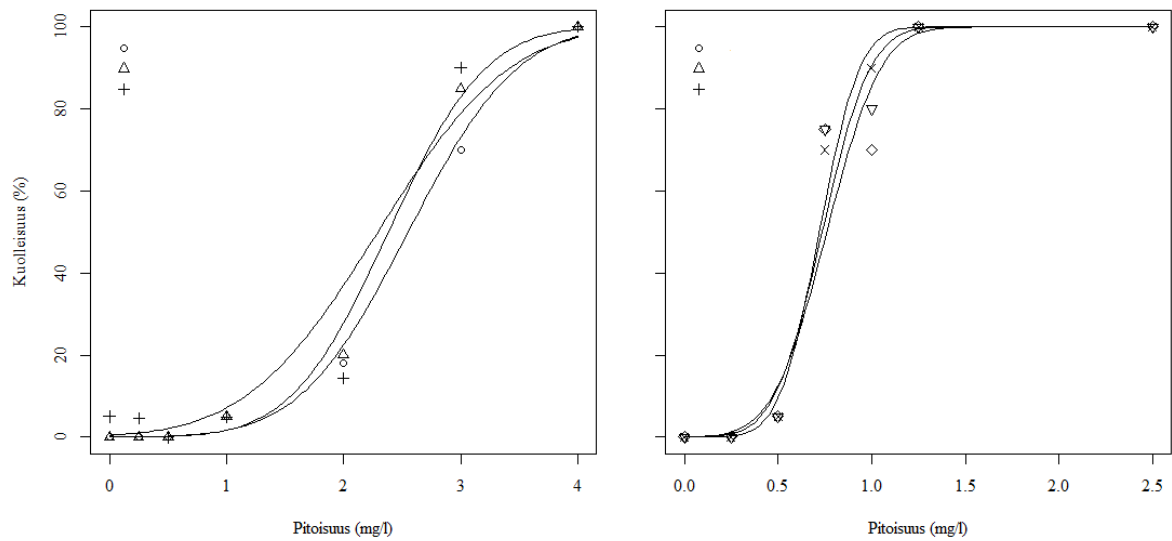
Kromaatin (IV) koesarjoista määritettiin 24h EC₅₀-arvoksi $1,13 \pm 0,05$ mg/l, 48h EC₅₀-arvoksi $0,67 \pm 0,01$ mg/l, LOEC-arvoksi 0,50 mg/l ja NOEC-arvoksi 0,25 mg/l. ISO-standardin (ISO 6341 2012) mukaan kaliumdikromaatin 24h EC₅₀-arvon tulisi olla 0,6–2,1 mg/l, joten tulos saatu arvo oli standardin mukainen.

3,5-dikloorifenolin koesarjoista määritettiin 24h EC₅₀-arvoksi $3,06 \pm 0,06$ mg/l ja 48h EC₅₀-arvoksi $2,58 \pm 0,17$ mg/l. 48h EC₅₀-arvo on samaa suuruusluokkaa kuin Zagorc-Končan ym. (2002) määrittämän arvon 2,8 mg/l kanssa. Pitoisuuksien väliset erot todettiin molempien

kontrolliaineiden suhteen tilastollisesti erittäin merkitseviksi mutta lohkovaikutusta ei havaittu. Kontrolliaineiden tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 5, ja koedata on havainnollistettu kuvassa 15.

Taulukko 5. 3,5-dikloorifenolista ja kaliumdikromaatista valmistettujen koesarjojen aiheuttaman bioluminesenssin inhibition tilastollisen tarkastelun (Kruskall-Wallisin H –testi) p-arvot *Daphnia magna* –vesikirpuilla.

Selittäjä Yhdiste	Lohko- vaikutus	Pitoisuus
3,5-DCP	0,897	< 0,01
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,987	< 0,01



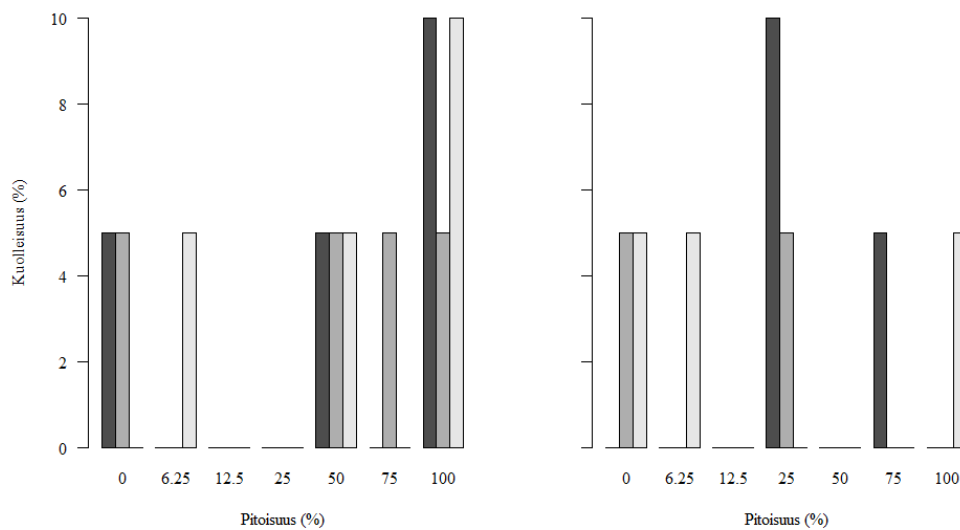
Kuva 15. Annos-vaste-kuvaaja 3,5-dikloorifenolin (vas.) ja kaliumdikromaatin aiheuttamasta kuolleisuudesta akuutissa toksisuustestissä *Daphnia magna* –vesikirpulla.

Ainoastaan Klaukkalan keskuspuhdistamon tuore näyte aiheutti tilastollisesti merkitsevän eron pitoisuuksien välillä, ja Viikinmäen puhdistamon tuore näyte lohkovaikutuksessa. Kuolleisuudessa ei havaittu selkeää trendiä näytepitoisuuden muuttuessa. Näytteen pakastamisella ei ollut tilastollisesti merkitseviä vaikutuksia vesikirpuilla suoritetussa lyhytaikaisessa toksisuustestissä. Näytteiden tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 6. Koedata on havainnollistettu puhdistamokohtaisesti kuvissa 16, 17 ja 18.

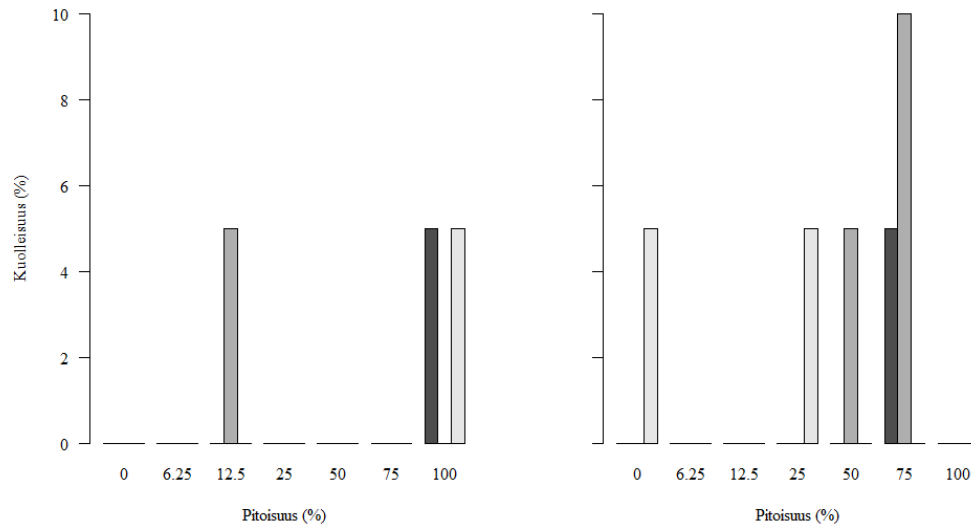
Taulukko 6. Klaukkalan keskuspuhdistamon, Suomenojan puhdistamon ja Viikinmäen puhdistamon näytteestä valmistettujen koesarjojen aiheuttaman kuolleisuuden tilastollisen tarkastelun (Kruskall-Wallisin H –testi) p-arvot *Daphnia magna* –vesikirpuilla.

Selittäjä Näyte	Klaukkala		Suomenoja		Viikinmäki	
	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus
Tuore	0,911	< 0,05	1,000	0,141	< 0,05	0,625
Pakastettu	0,967	0,392	0,662	0,436	0,329	0,740
Molemmat	0,468 ^a		0,450 ^a		0,144 ^a	

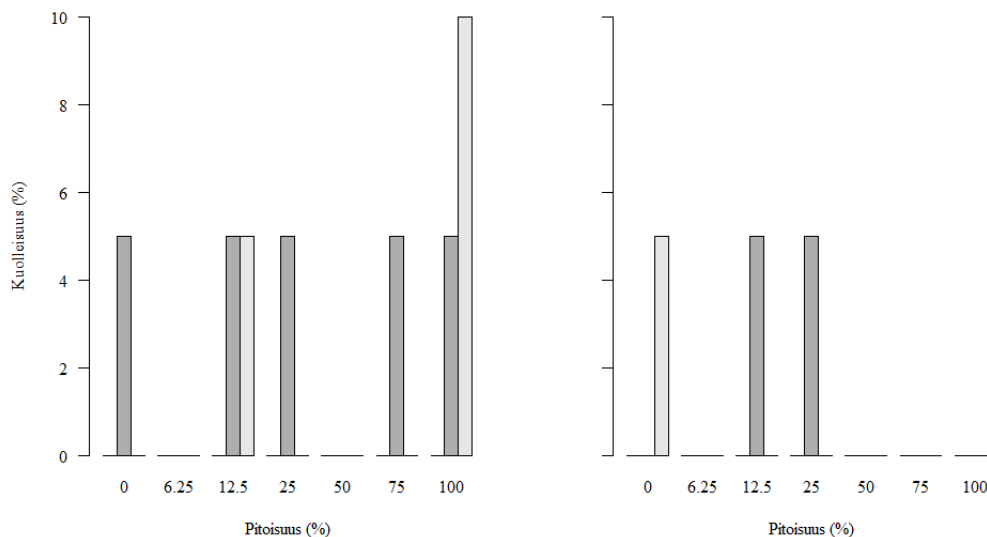
^a Mann-Whitney U –testi



Kuva 16. Klaukkalan keskuspuhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttama kuolleisuus testipitoisuuksittain *Daphnia magna* –vesikirpulla. Vierekkäiset pylväät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.



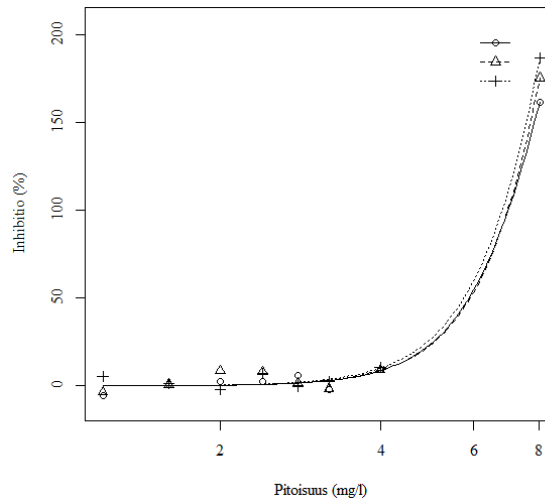
Kuva 17. Suomenojan puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttama kuolleisuus testipitoisuuksittain *Daphnia magna* –vesikirpulla. Vierekkäiset pylväät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.



Kuva 18. Viikinmäen puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttama kuolleisuus testipitoisuuksittain *Daphnia magna* –vesikirpulla. Vierekkäiset pylväät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.

3.3 Leväkasvun inhibiitiotesti

3,5-dikloorifenolin 72h EC₅₀-arvoksi määritettiin $4,50 \pm 0,17$ mg/l. EC₅₀-arvo osuu standardissa (ISO 8692 2004) määritellyn vaihteluvälin $3,38 \pm 1,30$ mg/l yläneljänneeseen. Saatua EC₅₀-arvoa ei kuitenkaan voida pitää täysin luotettavana, sillä koeasetelmassa tutkitut pitoisuudet eivät aiheuttaneet kahta vastetta 10–90 %. Tilastollisessa tarkastelussa (Kruskall-Wallis H –testi) ei havaittu lohko vaikutusta ($p = 0,728$), mutta ero pitoisuuksien välisissä vasteissa oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < 0,001$). Mittaustuloksia on havainnollistettu kuvassa 19.



Kuva 19. Annos-vaste-kuvaaja 3,5-dikloorifenolin aiheuttamasta kasvun inhibitiosta *Pseudokirchneriella subcapitata* –viherlevällä.

Yksi Klaukkalan keskuspuhdistamon tuoreesta näytteestä valmistettu kuoppalevy tuhoutui ennen kolmatta mittauspäivää. Suomenojan puhdistamon näytteiden mittaustuloksista paikannettiin kaksi poikkeavaa havaintoa. Tuoreesta näytteestä mitattiin 40 % pitoisuudessa noin -50 % inhibiatio ja pakastetusta näytteestä 10 % pitoisuudessa noin -25 % inhibiatio. Kyseiset havainnot näkyvät koedatan visualisoinnissa, mutta tilastollisessa tarkastelussa ne jätettiin aineiston ulkopuolelle. Noin -25 % havainnon poistaminen muutti lohko-vaikutuksen tilastollisesti merkitsemättömäksi, mutta noin -50 % havainnon poistaminen ei vaikuttanut tilastollisen tarkastelun tulokseen.

Suomenojan puhdistamon pakastetun näytteen lohko- ja pitoisuusvaikutuksia, ja Viikinmäen puhdistamon pakastetun näytteen lohko-vaikutuksia lukuun ottamatta leväkasvun inhibitiotestissä havaittiin tilastollisesti merkitseviä eroja. Mitatut vasteet siis vaihtelivat niin koesarjojen sisäisesti kuin eri testipitoisuuksien välilläkin. Näytteiden aiheuttama vaste vaihteli noin 10 % leväkasvun inhibitiosta miltei 50 % stimulaatioon. Suurimmassa osassa koesarjoista havaittiin leväkasvua stimuloivia vaikutuksia, mutta stimulaatiossa ei havaittua selvää trendiä näytepitoisuuden muuttuessa.

Näytteen pakastamisen todettiin vaikuttaneen tilastollisesti erittäin merkitsevästi Suomenojan ja Viikinmäen puhdistamojen näytteistä mitattuihin vasteisiin. Suomenojan näytteessä pakastaminen vahvisti suurempien pitoisuuksien aiheuttamaa inhibitiota, kun taas Viikinmäen näytteen havaittiin stimuloivan leväkasvua enemmän kuin ennen pakastusta. Klaukkalan keskuspuhdistamon näytteen aiheuttama vaste ei muuttunut tilastollisesti merkitsevästi

pakastamisesta huolimatta. Näytteiden tilastollisen tarkastelun tulokset ovat taulukossa 7. Puhdistamokohtaisia vasteita on havainnollistettu kuvissa 20, 21 ja 22.

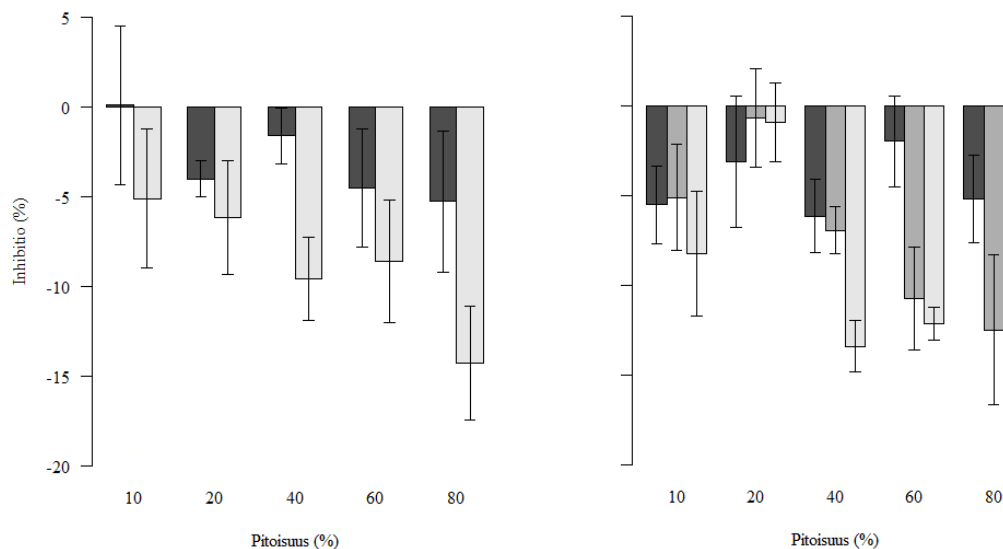
Taulukko 7. Klaukkalan keskuspuhdistamon, Suomenojan puhdistamon ja Viikinmäen puhdistamon näytteestä valmistettujen koesarjojen aiheuttaman kuolleisuuden tilastollisen tarkastelun (Kruskall-Wallis H –testi) p-arvot *Pseudokirchneriella subcapitata* –viherlevällä.

Selittäjä Näyte	Klaukkala		Suomenoja		Viikinmäki	
	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus	Lohko- vaikutus	Pitoisuus
Tuore	< 0,001 ^c	< 0,001 ^c	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,05
Pakastettu	< 0,05	< 0,001	0,174 ^a	0,0604 ^a	0,6493 ^a	< 0,001
Molemmat	0,481 ^c		< 0,001 ^b		< 0,001 ^b	

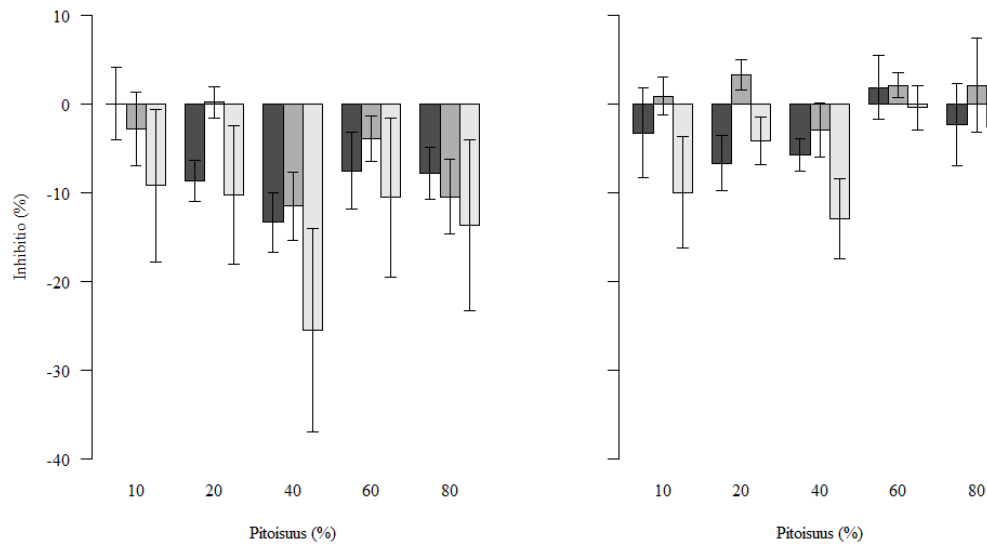
^a ANOVA

^b Mann-Whitney U –testi

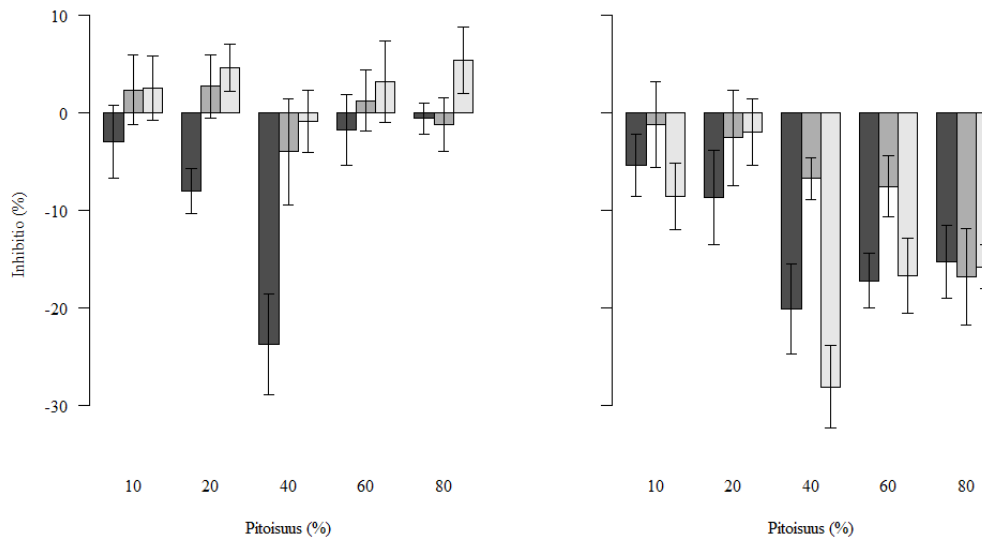
^c Studentin t –testi



Kuva 20. Klaukkalan keskuspuhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttaman kasvun inhibition keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet testipitoisuuksittain *Pseudokirchneriella subcapitata* –viherlevällä. Vierekkäiset pylväävät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.



Kuva 21. Suomenojan puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttaman kasvun inhibition keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet testipitoisuuksittain *Pseudokirchneriella subcapitata* –viherlevällä. Vierekkäiset pylväät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.



Kuva 22. Viikinmäen puhdistamon tuoreen (vas.) ja pakastetun näytteen aiheuttaman kasvun inhibition keskiarvot ja keskiarvon keskivirheet testipitoisuuksittain *Pseudokirchneriella subcapitata* –viherlevällä. Vierekkäiset pylväät kuvaavat rinnakkaisia koesarjoja.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Kokeiden toistettavuus

Yhteistä testituloksille oli vasteen jakautuminen epänormaalisti muutamia leväkasvun inhibi-
bitiotestejä lukuun ottamatta. Myöskään varianssit eivät aina olleet yhtä suuria. Tämän
vuoksi suurin osa tilastollisesti testauksesta tehtiin käyttäen parametrittomia tilastollisia tes-
tejä.

Valtaosan näytteistä havaittiin stimuloivan bioluminesenssia. Samanlaisia havaintoja ovat
tehneet myös Lundström ym. (2010). Escher ym. (2008) totesivat Sveitsissä tekemissään
tutkimuksissa, ettei puhdistetun yhdyskuntajäteveden raakanäytteiden havaittu aiheuttavan
inhibitiota bakteerien bioluminesenssissa. Bioluminesenssin inhibi-
tiotestissä rinnakkaisten koesarjojen havaittiin eroavan tilastollisesti erittäin merkittävästi kaikkien näytteiden osalta.
Koesarjojen sisällä rinnakkaisten mittausten keskiarvojen keskivirheet olivat kuitenkin ko-
keiden pienimmät, ja rinnakkaisten koesarjojen trendit samankaltaiset.

Toksisuustesteissä vesikirpulla merkitsevää lohko-
vaikutusta ei yhtä poikkeusta lukuun otta-
matta havaittu. Tuloksia on kuitenkin tarkasteltava kriittisesti, sillä aineisto oli varsin sup-
pea, näytepitoisuuksien aiheuttama kuolleisuus oli 0–10 %, ja 10 % kuolleisuus nollakont-
rollissa hyväksytään myös standardissa (ISO 6341 2012). Myöskään Mendonça ym. (2013)
eivät havainneet täydelliset puhdistusprosessit läpikäyneen yhdyskuntajäteveden aiheutta-
van toksista vastetta vesikirpuille.

Jätevesinäytteiden havaittiin enimmäkseen stimuloivan leväkasvua. Puhdistetun yhdyskun-
tajäteveden leväkasvuun vaikuttamattomuudesta tai leväkasvua stimuloivista vaikutuksista
on raportoitu aikaisemminkin (Lundström ym. 2010, Harbi ym. 2017). Testitulosten tilastol-
lisessa tarkastelussa havaittiin erittäin merkitseviä lohko-
vaikutuksia. Tulosten tulkinta on
kuitenkin ongelmallista, sillä testissä käytettävä ravintoliuos on varsin niukka. Ravintoliu-
okseen verrattuna yhdyskuntajätevedet ovat ravinnerikkaita (Escher ym. 2008), ja tällöin
näytteiden haittavaikutukset voivat peittyä. Näytteistä valmistettujen rinnakkaisten koesar-
jojen mittaustulosten vaihtelu oli suurinta leväkasvun inhibi-
tiotestissä.

Laimennossarjoissa tutkittiin mahdollisimman suuria jätevesipitoisuuksia koeteknisten rajojen puitteissa. Minkäänlaisia hyväksyttävän inhibition raja-arvoja puhdistetulle yhdyskuntajätevedelle ei näiden kokeiden perusteella voida määrittää, sillä näytteet eivät juurikaan haitallisia vaikutuksia aiheuttaneet. Näytteitä tutkittiin karkeilla testeillä ja oletama oli, ettei toksisuutta pitäisi suurissa määrin havaitakaan. Olisi huolestuttavaa mikäli esimerkiksi EC₅₀-arvojen määrittäminen olisi ollut mahdollista. On myös todettava, että mikään käynteistä testeistä ei sovi aktivoivien vaikutusten mittaamiseen. Tämä kyseenalaistaa toksisuustestien toistettavuuden tilastollisten vertailun mielekkyyden valobakteerien ja viherlevien osalta. Vesikirpulla suoritettuja toksisuustestejä voidaan kuitenkin pitää luotettavina, sillä vesikirppu on todettu aikaisemmissa toksisuustutkimuksissa valobakteeria (Fernández-Alba ym. 2001, Teodorović ym. 2009b) ja leviä (Küster ym. 2005) herkemmäksi koelajiksi.

4.2 Näytteiden säilytyksen vaikutukset

Näytteet olivat pakkasessa -20 °C:ssa 6–8 vuorokautta. Pakastamisen ei havaittu vaikuttavan tilastollisesti merkittävästi jätevesinäytteiden aiheuttamiin vasteisiin kuin leväkasvun inhibiitotestissä. Librato ym. (2009) saivat samankaltaisia tuloksia osoittaessaan, ettei näytteen pakastamisella ollut vaikutusta simpukan alkioille aiheutuneeseen toksiseen vasteeseen. Tulos oli odotettavissa, sillä esimerkiksi Llorca ym. (2014) totesivat suurimman osan antibiooteista säilyvän hyvin ainakin yhden viikon ajan -20 °C:ssa pakastetussa näytteessä. Kirjallisuuskatsauksessa näytteiden pakastamisen -20 °C:een havaittiin sopivaksi säilytystavaksi myös kemiallisia analyysejä varten (McFarland ym. 1995).

Kuten jo aikaisemmin todettiin, on levätesti osoittautunut ravinteiden suhteen hyvin herkäksi. Liuenneiden epäorgaanisten ravinteiden on todettu säilyvän useampia kuukausia, mikäli näyte jäädytetään heti näytteenoton jälkeen ja varastoidaan -20 °C:ssa (Dore ym. 1996). Tämä ei kuitenkaan koske rehevöittävästä vaikutuksistaan tunnettuja fosfaatteja (Chapman & Mostert 1990). Kotlash & Chessman (1998) osoittivat vain vähän typpi- ja fosforiyhdisteitä sisältäneiden näytteiden koostumuksen muuttuvan suhteellisesti enemmän kuin rikkaampien näytteiden, mikäli näytteitä ei jäädytetä ja pakasteta nopeasti näytteenoton jälkeen. Täten Klaukkalan ja Viikinmäen puhdistamoiden näytteistä vielä pakastamisen jälkeenkin mitatut leväkasvua stimuloivat vaikutukset eivät olleet yllättäviä.

4.3 Koejärjestelyjen arviointi

Vertailuaineiden vasteiden osuminen standardien mukaisiin vaihteluväleihin osoitti koejärjestelyiden olleen yleisesti ottaen onnistuneita ainakin varsinaisten kokeiden osalta. Leväkasvun inhibition tutkimustulokset olisivat voineet olla hieman erilaisia, mikäli kasvatuskaapin valaistusolosuhteet olisivat olleet kauttaaltaan standardin mukaiset vaikkakin jo vähäisempikin valaistus sai leväkontrollin solut kasvamaan standardin mukaisesti. Myös vertailuaineella tehtyjen koesarjojen avulla määritetty EC_{50} -arvo olisi ollut luotettavampi, mikäli testeissä olisi ollut useampia suuria pitoisuuksia, sillä tutkitut pitoisuudet eivät aiheuttaneet standardin mukaisesti kahta 10–90 % inhibitiota. Lisäksi yksi leväkasvun inhibition tutkimiseen käytetty kuoppalevy jouduttiin hylkäämään liiallisen läikkymisen takia.

Vesikirppujen akuutissa toksisuustestissä poikettiin suositellusta valorytmistä. Lampert (1989) havaitsi valaistusolosuhteiden vaikuttavan vesikirppujen aktiivisuuteen: niiden todettiin muun muassa siirtyvän lähemmäksi pintaa yön aikana ja pysyttelevän syvemmillä valoisaan aikaan. Mikäli vesikirput mieli saada lisääntymään, auttoi pidempi valoisa aika tähän. Mikäli vesikirput ovat huomattavasti aktiivisempia valoisan aikaan, eivät ne välttämättä altistuneet haitta-aineille yhtä paljoa kuin standardin mukaisissa valaistusolosuhteissa. Valaistuksen lisäksi myös tarjolla olevan ravinnon määrän on havaittu aktivoivan vesikirppuja (Dodson ym. 1997). Kun yhden testin annettiin jatkua viikonlopun yli, havaittiin näytteille altistettujen vesikirppujen kasvaneen suuremmiksi kontrolliastioissa kasvaneisiin verrattuna. Täten voidaan olettaa näytteessä olleiden ravinteiden aktivoineen vesikirppuja, ja samalla kompensoineen valorytmin mahdollisesti aiheuttamaa passivoivaa vaikutusta. Koska kyseessä oli staattinen koe, on mahdollista että varsinkin jätevesinäytteitä tutkittaessa osa vesikirpuille vahingollisista aineista oli painunut koemaljan pohjakerrokseen, jolloin vesikirput eivät välttämättä altistuneet niille kovinkaan paljoa. Lisäksi yksi koeastia menetettiin sen kaaduttua.

Näytteenoton ensimmäinen vaihe tapahtui suositusten mukaan, mutta näytettä noudettaessa ei välttämättä olisi kannattanut käyttää erillisiä muovikanistereita. Sen sijaan näytteet olisi kannattanut pakata suoraan pienempiin muovipulloihin, sillä on mahdollista, että kanistereiden seinämät adsorboivat osan haitallisista yhdisteistä. Myös näytteiden säilyttämiseen käytetyistä muovipulloista on saattanut liueta ylimääräisiä yhdisteitä (Reimann ym. 2007). Pak-

kaamalla näytteet suoraan pienempiin muovipulloihin, olisi pakastettavien näytteiden viilentäminen voitu aloittaa esimerkiksi kuivajään päällä heti jätevedenpuhdistamolla eikä vasta reilun tunnin kuluttua näytteenotosta laboratoriolle saavuttaessa.

Toksisuustestaus suoritettiin standardoituja menetelmiä käyttäen. Koetulokset varsinkin vertailuaineiden osalta vaikuttavat varsin tasalaatuisilta ja loogisilta. Täten virhelähteitä on vaikea lähteä hakemaan. Esimerkiksi leväkasvun inhibitiotestissä kuoppalevyjen jokaisessa kuopassa ei mittaustulosten perusteella ollut täysin samaa määrää nestettä, sillä rinnakkaiset kuopatkaan eivät olleet täysin identtisiä. Tämä johtunee todennäköisemmin vaativaan laboratoriotyöskentelyyn tottumattoman pipetointivirheistä kuin biologisten testien luonnollisesta vaihtelusta.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimustulokset osoittavat toksisuustestauksen soveltuvan suomalaisten puhdistettujen yhdyskuntajätevesien tutkimiseen. Rinnakkaisista koesarjoista mitatut vasteet olivat pääasiassa samansuuntaisia. Suurinta vaihtelu oli leväkasvun inhibitiotestissä. Näytteiden pakastaminen vaikutti tilastollisen tarkastelun perusteella sopivan säilytystavaksi ainakin valobakteereilla ja vesikirpuilla toteutettaviin toksisuustesteihin. Haittavaikutuksia ei juurikaan havaittu, joten raja-arvoja puhdistetun yhdyskuntajäteveden aiheuttamalle hyväksyttävälle inhibitiolle ei näiden kokeiden perusteella voitu määrittää.

Lisätutkimuksille on kuitenkin tarvetta. Yhdyskuntajätevesien laadun ja määrän lisäksi myös puhdistamojen käsittelyprosessit eroavat toisistaan. Täten tuleviin tutkimuksiin tulisivat valita erilaisia puhdistusprosesseja hyödyntäviä jätevedenpuhdistamoja, ja näytteitä olisi hyvä kerätä vaikka kerran kuukaudessa. Tässä pro gradu –työssä käytettyjen menetelmien lisäksi näytteitä tulisi tutkia ainakin kalan muna- ja poikastestillä ja mahdollisia hormonaalisia vaikutuksia indikoivalla testillä. Myös jätevesien sisältämien ravinteiden vaikutuksia testituloksiin tulisi tutkia näytteitä konsentroimalla tai tekemällä kontrolliaineilla lisäyskokeita jätevesiin.

KIITOKSET

Kiitän ohjaajaani Jussi Kukkosta mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta ja Suomen ympäristökeskusta tutkielman mahdollistamisesta. Suuret kiitokset myös Suomen ympäristökeskuksen tutkimus- ja innovaatiolaboratorion henkilökunnalle, erityisesti ohjaajilleni Eija Schultzille ja Markus Sillanpäälle. Kiitän yhteistyöstä myös Helsingin seudun ympäristöpalvelut - kuntayhtymää ja Nurmijärven Vesi -liikelaitosta.

KIRJALLISUUS

- Arensberg, P., Hemmingsen, V. H. & Nyholm, N. 1995: A miniscale algal toxicity test. – *Chemosphere* 30: 2103 – 2115.
- Chapman, P. & Mostert, S. A. 1990: Does freezing of nutrient samples cause analytical errors?. – *South African Journal of Marine Science* 9: 239 – 247.
- COHIBA. 2010a: Ring-test Report of the COHIBA Project WP3: *Daphnia magna* acute toxicity test, algae growth inhibition test and luminescent bacterium test. – Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- COHIBA. 2010b: Whole Effluent Assessment (WEA): Proposed Recommendations for the Use of Toxicity Limits. – Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- Cotman, M. & Pintar, A. 2013: Sampling uncertainty of wastewater monitoring estimated in a collaborative field trial. – *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 51: 71 – 78.
- Directive of the Minister of Environmental Protection. 2006: Ordinance on conditions of waste water entering to water or the ground and on substances particularly harmful for the water environment. – Dz. U. 2006 Nr 137 poz. 984.
- Direktiivi 91/271/ETY: Euroopan yhteisöjen neuvoston direktiivi 91/271/ETY yhdyskuntajätevesien käsittelystä.
- Direktiivi 2008/1/EY: Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi ympäristön pilaantumisen ehkäisemisen ja vähentämisen yhtenäistämiseksi.
- Dodson, S. I., Ryan, S., Tollrian, R. & Lampert, W. 1997: Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. – *Journal of Plankton Research* 19 (10): 1537 – 1552.
- Dore, J., Houlihan, T., Hebel, D., Tien, G., Tupas, L. & Karl, D. 1996: Freezing as a method of sample preservation for the analysis of dissolved inorganic nutrients in seawater. – *Marine Chemistry* 53: 173 – 185.
- ECOTOC. 2004: Whole Effluent Assessment. Technical Report No. 94. Brussels.
- Eggen, R., Bengtsson, B-E., Bowmer, C., Gerritsen, A., Gibert, M., Hylland, K., Johnson, A., Leonards, P., Nakari, T., Norrgren, L., Sumpter, J., Suter, M., Svenson, A. & Pickering, A. 2003: Search for the Evidence of Endocrine Disruption in the Aquatic Environment: Lessons to be Learned from Joint Biological and Chemical Monitoring in the European Project COMPREHEND. – *Pure and Applied Chemistry* 34: 2445 – 2450.
- Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J. & Hahn, S. 2003: Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. – *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3): 346 – 354.

- Environmental Protection Agency. 2010: Final Draft BAT Guidance Note on Best Available Techniques for the Production of Paper Pulp, Paper and Board. –Environmental Protection Agency. Ireland.
- EPA Victoria. 2009: Industrial Waste Resource Guidelines: Sampling and Analysis of Waters, Wastewaters, Soils and Wastes. –Environment Protection Authority Victoria. Melbourne.
- Escher, B. I., Bramaz, N., Quayle, P., Rutishauser, S. & Vermeirssen, E. L. M. 2008: Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. –Journal of Environmental Monitoring 10: 622 – 631.
- Etelä-Suomen aluehallintoviraston päätös 19.3.2013 nro 62/2013/2.
- Farré, M., Martínez, E., Hernando, M. D., Fernández-Alba, A., Fritz, J., Unruh, E., Mihail, O., Sakkas, V., Morbey, A., Albanis, T., Brito, F., Hansen, P.T. & Barceló, D. 2006: European ring exercise on water toxicity using different bioluminescence inhibition tests based on *Vibrio fischeri*, in support to the implementation of the water framework directive. –Talanta (69): 323 – 333.
- Federal Ministry for the Environment, nature Conservation and Nuclear Safety, Germany. 2004: Ordinance on Requirements for the Discharge of Waste Water into Waters (Waste water Ordinance – AbwV). –Federal Law Gazette I.
- Fernández-Alba, A.R., Guil, L. H., López, G. D., Chisti, Y. 2001: Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. –Analytica Chimica Acta 426: 289 – 301.
- Harbi, K., Makridis, P., Koukoumis, C., Papadionysiou, M., Vgenis, T., Kornaros, M., Ntaikou, I., Giokas, S. & Dailianis, S. 2017: Evaluation of a battery of marine species-based bioassays against raw and treated municipal wastewaters. –Journal of Hazardous Materials 321: 537 – 546.
- HELCOM. 2002a: HELCOM Recommendations 23/10: Reduction of Discharges and Emissions from Production and Formulation of Pesticides. –Helsinki Convention.
- HELCOM. 2002b: HELCOM Recommendations 23/11: Requirements for Discharging of Waste Water from the Chemical Industry 1). –Helsinki Convention.
- HELCOM. 2002c: HELCOM Recommendations 23/12: Reduction of Discharges and Emissions from Production of Textiles 1). –Helsinki Convention.
- Helsingin seudun ympäristöpalvelut -kuntayhtymä. 2014: Jätevedenpuhdistus pääkaupunkiseudulla 2013: Viikinmäen ja Suomenojan puhdistamot. –Edita Prima OY. Helsinki.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A. & Brdjanovic, D. 2008: Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design. –IWA Publishing. London.
- Hernan, R. & O'Rourke, K. 2012: Aquatic Toxicity in Ireland 2011. –Enterprise Ireland. Shannon.
- Hernando, M. D., Malato, O., Farré, M., Fernández-Alba, A.R., & Barceló, D. 2006: Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. –Talanta 69 (2): 370 – 376.

- Hutchings, M., Johnson, I., Hayes, E., Girling, A., Thain, J., Thomas, K., Benstead, R., Whale, G., Wordon, J., Maddox, R. & Chown, P. 2004: Toxicity Reduction Evaluation, Toxicity Identification Evaluation and Toxicity Tracking in Direct Toxicity Assessment. –*Ecotoxicology* 13: 475 – 484.
- IPPC. 2011: Best Available Techniques (BAT) Reference Document for Common Waste Water and Waste Gas Treatment/Management Systems in the Chemical Sector. Draft 2. –IPPC. Sevilla.
- IPTS. 2003a. Reference Document on the General Principles of Monitoring. –IPPC. Sevilla.
- IPTS. 2003b: Reference Document on Best Available Techniques in Common Waste Water and Waste Gas Treatment / Management Systems in the Chemical Sector. Institute for Prospective Technological Studies. –IPPC. Sevilla.
- ISO 10706. 2000: Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 16240. 2005: Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water - Salmonella/microsome test (Ames test). –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 23893-3. 2013: Water quality - Biochemical and physiological measurements on fish - Part 3: Determination of vitellogenin. –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 11348-3. 2007: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 6341. 2012: Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 7827. 2010: Water quality - Evaluation of the "ready", "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium - Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC). –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 8692. 2004: Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. –International Organization for Standardization. Geneva.
- ISO 9888. 1999: Water quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Static test (Zahn-Wellens method). –International Organization for Standardization. Geneva.
- Kaj, L., Allard, A., Andersson, H., Hageström, U., Brorström-Lundén, E., Schultz, L., Münne, P., Nakari, T., Schultz, E., Fulara, I., Wypych, J., Kwosek, M., Manko, T. & Czaplicka, M. 2011: WP3 National Report Sweden. –Swedish Environmental Research Institute. Stockholm.
- Kotlash, A. R. & Chessman, B. C. 1998: Effects of water sample preservation and storage on nitrogen and phosphorus determinations: implications for the use of automated sampling equipment. –*Water Research* 32 (12): 3731 – 3737.

- Küster, E., Dorusch, F. & Altenburger, R. 2005: Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna*. –*Environmental Toxicology* 24 (10): 2621 – 2629.
- Lampert, W. 1989: The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. –*Functional Ecology* 3: 21 – 27.
- Leverett, D. 2006: Guidance on the Use of Direct Toxicity Assessment in PPC Impact Assessments. –Environment Agency. London.
- Librato, G., Avezz, F., Losso, C. & Volpi Ghirardini, A. 2009: Influence of storage methods, refrigeration or freezing, on the toxicity of wastewater samples to oyster embryos. –*Environmental Technology* 30: 535 – 541.
- Llorca, M., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S. & Barceló, D. 2014: Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. –*Journal of Chromatography A* 1369: 43 – 51.
- Lundström, E., Adolfsson-Erici, M., Alsberg, T., Björlenius, B., Eklund, B., Lavén, M. & Breitholtz, M. 2010: Characterization of additional sewage treatment technologies: Ecotoxicological effects and levels of selected pharmaceuticals, hormones and endocrine disruptors. –*Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (7): 1612 – 1619.
- Ma, X. Y., Wang, X.C., Ngo, H. H., Guo, W., Wu, M. N. & Wang, N. 2014: Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. –*Science of the Total Environment* 468 – 469: 1 – 11.
- McFarland, M., England, S. & Hamilton, M.C. 1995: Assessment of the Integrity of Chemicals in Environmental Samples Over an Extended Period of Time. –Environment Canada. Vancouver.
- Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S. M., Silva, L., Barbosa, M. & Cunha, M. A. 2013: Ecotoxicological evaluation of wastewater in a municipal WWTP in Lisbon area (Portugal). –*Desalination and Water Treatment* 51 (19 – 21): 4162 – 4170.
- Marugán, J., Bru, D., Pablos, C. & Catalá, M. 2012: Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. –*Journal of Hazardous Materials* 213 – 214: 117 – 122.
- MMER. 2012: FISHERIES ACT: Metal Mining Effluent Regulations. –Minister of Justice. Canada Gazette Part II vol. 139.
- Naturvårdsverket. 2010: Kemisk och biologisk karakterisering av punktsläpp till vatten. Handbok 2010:3 Utgåva 3. –Naturvårdsverket. Stockholm.
- Nurmijärven Vesi. 2014: Toimintakertomus 2013. –Nurmijärven Vesi. Nurmijärvi.
- OECD. 2004: Guidelines for the Testing of Chemicals: Guideline 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test. –Organization for Economic Cooperation and Development. Paris.
- OSPAR. 2005: Whole Effluent Assessment Report. Julkaisu numero 219/2005. Lontoo.
- OSPAR. 2007: Practical Guidance Document on Whole Effluent Assessment. Julkaisu numero 316/2007. Lontoo.
- Parvez, S., Venkataraman, C. & Mukherji, S. 2006: A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. –*Environment International* 32: 265 – 268.

- Pedersen, F., Kristensen, P., Damborg, A. & Christensen, H.W. 1994: Ecotoxicological evaluation of industrial wastewater. –Danish Environmental Protection Agency. Miljöprojekt 254.
- Poikāne, R., Kadīke, S. & Aigards, J. 2011: Proposals for the State Monitoring Programme 2011. –Latvian Institute of Aquatic Ecology.
- Power, E.A. & Boumphrey, R.S. 2004: International Trends in Bioassay Use for Effluent Management. –*Ecotoxicology* 13: 377 – 398.
- Ra, J. S., Lee, B. L., Chang, N. I. & Kim, S. D. 2008: Comparative Whole Effluent Toxicity Assessment of Wastewater Treatment Plant Effluents using *Daphnia magna*. –*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 800 (3): 196 – 200.
- Reimann, C., Grimstvedt, A., Frengstad, B. & Finne, T.E. 2007: White HDPE bottles as source of serious contamination of water samples with Ba and Zn. –*Science of The Total Environment* 374 (2-3): 292 – 296.
- Rice, E.W., Baird, R.B, Eaton, A.D. & Clesceri, L.S. 2012: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22 edition. –American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- Roots, O. & Leisk, Ü. 2012: Proposals for the Estonian State Monitoring Programme 2012. –Estonian Environmental Research Centre.
- Samaras, V.G., Stasinakis, A.S., Mamais, D., Thomaidis, N.S. & Lekkas, T.D. 2013: Bioassays for the Evaluation of Landfill Leachate Toxicity. –*Journal of Hazardous Materials* 477: 248 – 254.
- Santala, E. & Etelämäki, L. 2009: Yhdyskuntien jätevesien puhdistus 2007. –Suomen ympäristökeskuksen raportteja 29/2009. Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- Sarakinos, H. C., Bermingham, N., White, P.A. & Rasmussen, J.B. 2000: Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (1): 63 – 71.
- SEPA. 2003: Direct Toxicity Assessment. –Scottish Environment Protection Agency. Washington, D.C..
- Secretary of State & Welsh Ministers. 2010: The Environmental Permitting (England and Wales) Regulations 2010. –The Stationery Office Limited. UK.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I. Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K. E., Thomas, K. V. & Ahel, M. 2011: Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. –*Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (4): 844 – 851.
- Säylä, J. & Vilpas, R. 2012: Yhdyskuntien jätevesien puhdistus 2010. –Suomen ympäristökeskuksen raportteja 21/2012. Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- Säylä, J. 2015: Yhdyskuntien jätevesien puhdistus 2013. –Suomen ympäristökeskuksen raportteja 34/2015. Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- Teodorović, I., Bečelić, M., Planojević, I., Ivančev-Tumbas, I. & Dalmacija, B. 2009a: The relationship between whole effluent toxicity (WET) and chemical-based effluent quality assessment in Vojvodina (Serbia). –*Environmental Monitoring and Assessment* 158: 381 – 392.

- Teodorović, I., Planojević, I., Knezević, P., Radak, S. & Nemet, I. 2009b: Sensitivity of bacterial vs. acute *Daphnia magna* toxicity tests to metals. –Central European Journal of Biology 4 (4): 482 – 492.
- Thomas, D.J. L., Tyrrel, S., Smith, R. & Farrow, S. 2009: Bioassays for the Evaluation of Landfill Leachate Toxicity. –Journal of Toxicology and Environmental Health Part B 12 (1): 83 – 105.
- Thompson, K. C., Wadhia, K. & Loibner, A. P. 2005: Environmental Toxicity Testing. –A. P. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- US EPA. 1988: Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures. –Environmental Research Laboratory. Duluth, Minnesota.
- US EPA. 1991: Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures. Second Edition. –United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C..
- US EPA. 2001: Final Report: Interlaboratory Variability Study of EPA Short-term Chronic and Acute Whole Effluent Toxicity Test Methods, Vol. 1. –United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C..
- US EPA. 2002: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. –United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C..
- US EPA. 2010: Electronic Code of Federal Regulation. Title 40: Protection of Environment. –U.S. Government Printing Office, Washington, D.C..
- Vahtera, E., Muurinen, J., Räsänen, M. & Pääkkönen, J-P. 2014: Helsingin ja Espoon meri-alueen tila vuonna 2013: Jätevesien vaikutusten velvoitetarkkailu. –Helsingin kaupungin ympäristökeskuksen julkaisuja 6/2014. Helsingin kaupungin ympäristökeskus. Helsinki.
- Van Dam, R.A. & Chapman, J.C. 2001: Direct Toxicity Assessment (DTA) for Water Quality Guidelines in Australia and New Zealand. –Australasian Journal of Ecotoxicology 7: 175 – 198.
- Vasquez, M.I. & Fatta-Kassinos, D. 2013: Is the evaluation of “traditional” physicochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment plants? –Environmental Science and Pollution Research 20: 3516 – 3528.
- VNA 888/2006: Valtioneuvoston asetus yhdyskuntajätevesistä.
- VNA 1022/2006: Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista.
- VNA 343/2009: Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista annetun valtioneuvoston asetuksen muuttamisesta.
- VNA 1818/2009: Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista annetun valtioneuvoston asetuksen muuttamisesta.
- VNA 868/2010: Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista annetun valtioneuvoston asetuksen muuttamisesta.

- Vuoristo, H., Gustafsson, J., Helminen, H., Jokela, S., Londesborough, S., Mannio, J., Mehtonen, J., Mononen, P., Nakari, T., Ojanen, P., Ruoppa, M., Silvo, K. & Sainio, P. 2010: Haitallisten aineiden tarkkailu: päästöt ja vaikutukset vesiin. – Suomen ympäristökeskuksen ohjeita 3/2010. Suomen ympäristökeskus (SYKE). Helsinki.
- Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.R., Moore, D.R.J., Teed, R.S., Baird, R.B., Berger, R., Denton, D.L. & Pletl, J.J. 2000: Assessment of Whole Effluent Toxicity Test Variability: Partitioning Sources of Variability. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (1): 94 – 104.
- WSER. 2012: FISHERIES ACT: Wastewater Systems Effluent Regulations. –Minister of Justice. Canada Gazette Part II vol. 139.
- Ympäristönsuojelulaki 4.2.2000/86.
- Zagorc-Končan, J., Žgajnar Gotvain, A. & Tišler, T. 2002: Hazard identification for 3,5-dichlorophenol in the aquatic environment. –*Cellular & Molecular Biology Letters* 7 (2): 381 – 382.

LIITTEET

Liite 1. Laimennossarjan valmistaminen 100 % jätevedestä akuutissa toksisuustestissä valobakteerilla.

Laimennos testissä, (%)	Laimennos, (%)	Näyte, (ml)	2 % NaCl-liuos, (ml)
50	100	4,0	0,0
40	80	3,2	0,8
30	60	2,4	1,6
20	40	1,6	2,4
10	20	0,8	3,2
CTRL	CTRL	0,0	4,0

Liite 2. Laimennossarjan liuosten valmistaminen 0,1 g/l 3,5-dikloorifenoliliuoksesta akuutissa toksisuustestissä valobakteerilla.

Pitoisuus testissä, (mg/l)	Pitoisuus, (mg/l)	Kantaliuos, (µl)	2 % NaCl-liuos, (ml)
4,0	8,0	320	3,68
3,0	6,0	240	3,76
2,0	4,0	160	3,84
1,5	3,0	120	3,88
1,0	2,0	80	3,92
0,5	1,0	40	3,96
0,25	0,5	20	3,98
CTRL	CTRL	0	4,00

0,1 g/l 3,5-DCP-liuos valmistettiin liuottamalla 0,010 g kiinteää 3,5-DCP:a 100 ml:ksi 2 % NaCl-liuosta.

Liite 3. Laimennossarjan liuosten valmistaminen 0,1 g/l kaliumdikromaattiliuoksesta akuutissa toksisuustestissä valobakteerilla.

Cr ⁶⁺ -pitoisuus testissä, (mg/l)	Cr ⁶⁺ -pitoisuus, (mg/l)	K ² Cr ² O ⁷ -pi- toisuus, (mg/l)	1,0 g/l K ² Cr ² O ⁷ - kantaliuos, (µl)	2 % NaCl, (ml)
25,0	50,0	141,4	566	3,434
12,5	25,0	70,7	283	3,717
10,0	20,0	56,5	226	3,774
7,5	15,0	42,4	170	3,83
5,0	10,0	28,3	113	3,887
3,0	6,0	17,0	68	3,932
2,0	4,0	11,3	45	3,955
1,0	2,0	5,65	23	3,977
CTRL	0	0	0	4,0

1,0 g/l K₂Cr₂O₇-liuos valmistettiin liuottamalla 0,1 g kiinteää K₂Cr₂O₇:a 100 ml:ksi 2 % NaCl-liuosta.

Liite 4. Laimennossarjan valmistaminen 100 % jätevedestä akuutissa toksisuustestissä vesikirpulla.

Laimennos, (%)	Näyte, (ml)	Laimennusvesi, (ml)
100	10,00	0,00
75	7,50	2,50
50	5,00	5,00
25	2,50	7,50
12,5	1,25	8,75
6,25	0,65	9,35
CTRL	0,00	10,00

Liite 5. Laimennossarjan liuosten valmistaminen 0,1 g/l 3,5-dikloorifenoliliuoksesta akuutissa toksisuustestissä vesikirpulla.

Pitoisuus, (mg/l)	Kantaliuos, (μ l)	Laimennusvesi, (ml)
4,0	400	9,60
3,0	300	9,70
2,0	200	9,80
1,0	100	9,90
0,5	50	9,95
0,25	25	9,975
CTRL	0	10,00

0,1 g/l 3,5-DCP-liuos valmistettiin mittapullossa ($200 \pm 0,15$ ml EM Techcolor DIN A, Hirschmann, West Germany) liuottamalla 0,020 g kiinteää 3,5-DCP:a 200 ml:ksi keinotekoista makeaa vettä mittapullossa.

Liite 6. Laimennossarjan liuosten valmistaminen 0,1 g/l kaliumdikromaattiliuoksesta akuutissa toksisuustestissä vesikirpulla.

Pitoisuus, (mg/l)	Kantaliuos, (μ l)	Laimennusvesi, (ml)
2,5	250	9,75
1,25	125	9,875
1,0	100	9,90
0,75	75	9,25
0,5	50	9,95
0,25	25	9,975
CTRL	0	10,00

0,1 g/l $K_2Cr_2O_7$ -liuos valmistettiin mittapullossa liuottamalla 0,020 g kiinteää $K_2Cr_2O_7$:a 200 ml:ksi keinotekoista makeaa vettä.

Liite 7. Varastoliuosten 1 – 3 valmistaminen steriiliin ionivaihdettuun veteen leväkasvun inhibiitotestissä.

Varastoliuos 1		Varastoliuos 2		Varastoliuos 3	
Ainesosa	Määrä	Ainesosa	Määrä	Ainesosa	Määrä
NH ₄ Cl	750 mg	H ₃ BO ₃	64 mg	H ₃ BO ₃	185 mg
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	600 mg	NA ₂ EDTA • 2 H ₂ O	100 mg	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	415 mg
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	900 mg	H ₂ O	1000 ml	ZnCl ₂	3 mg
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	750 mg			CoCl ₂ • 6 H ₂ O	1,5 mg
KH ₂ PO ₄	80 mg			CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0,01 mg
H ₂ O	500 ml			H ₂ O	1000 ml

Valmistetut varastoliuokset steriloidtiin autoklavoimalla 15 minuuttia 121 °C:ssa ja jaettiin 10ml eriin Schott-putkiin.

Liite 8. Varastoliuoksen 4 valmistaminen steriiliin ionivaihdettuun veteen.

Ainesosa	Määrä
NaHCO ₃	5000 mg
H ₂ O	100 ml

Liuos steriilisuodatettiin 10 ml:n erissä steriileihin Schott-putkiin.

Liite 9. Laimennossarjan valmistaminen 100 % jätevesinäytteestä leväkasvun inhibiitotestissä.

Pitoisuus, (%)	Pitoisuus levyllä, (%)	Näyte, (ml)	Steriili vesi, (ml)
100	80	10,00	0,0
75	60	7,50	2,5
50	40	5,00	5,0
25	20	2,50	7,5
12,5	10	1,25	8,75

Liite 10. Laimennossarjan liuosten valmistaminen 0,1 g/l 3,5-dikloorifenoliliuoksesta leväkasvun inhibitiotestissä.

Pitoisuus, (mg/l)	Pitoisuus levyllä, (mg/l)	Kantaliuos, (μ l)	Steriili vesi, (ml)
10,0	8,0	1000	9,00
5,0	4,0	500	9,50
4,0	3,2	400	9,60
3,5	2,8	350	9,65
3,0	2,4	300	9,70
2,5	2,0	250	9,75
2,0	1,6	200	9,80
1,5	1,2	150	9,85

0,1 g/l 3,5-DCP-liuos valmistetaan liuottamalla 0,020 g kiinteää 3,5-DCP:a 200 ml:ksi steriiliä ionitonta vettä.

Liite 11. Kuoppalevyjen pipetointikaavio leväkasvun inhibitiotestissä.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
B	H ₂ O	10%	10%	20%	20%	40%	40%	60%	60%	80%	80%	H ₂ O
C	H ₂ O	10%	10%	20%	20%	40%	40%	60%	60%	80%	80%	H ₂ O
D	H ₂ O	10%	10%	20%	20%	40%	40%	60%	60%	80%	80%	H ₂ O
E	H ₂ O	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	H ₂ O
F	H ₂ O	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	KT	H ₂ O
G	H ₂ O	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

Näytteiden vahvuudet on merkitty taulukkoon prosentteina, näytteen taustafluoresenssi-kuopista käytetään lyhennettä NT, kontrollikuopista K ja kontrollin taustafluoresenssi-kuopista KT.

Liite 12. Kuoppalevyjen pipetointilavuudet (µl) leväkasvun inhibitiotestissä.

	B – D	E	F	G
	Näyte	N. tausta	K. tausta	Kontrolli
Näytettä	240	240	-	-
Ravintoliuosta	30	30	30	30
H ₂ O	-	30	270	240
Leväsiirrosta	30	-	-	30