

Pro gradu -tutkielma

**Nikkelin kertyminen täplärapuun (*Pacifastacus
leniusculus*) kahdessa eri lämpötilassa**

Sami Ojala



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

15.7.2017

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

OJALA SAMI, O.S.: Nikkelin kertyminen täplärapuun (*Pacifastacus leniusculus*) kahdessa eri lämpötilassa

Pro gradu: 23 s.

Työn ohjaajat: FT Anna Karjalainen, Prof. Juha Karjalainen,

Tarkastajat: FT Hanna Arola, FT Anna Karjalainen

Heinäkuu 2017

Hakusanat: aineenvaihduntataso, akkumulaatio, Decapoda, ekotoksikologia, nikkelikloridi

TIIVISTELMÄ

Kaivostoiminnan aiheuttamat metallipäästöt ovat maailmanlaajuinen ympäristöongelma. Kaivospäästöjen takia metalleja pääsee luontoon ja eliöstöön biosaatavassa vesiliukoisessa muodossa kuten sulfaatteina tai klorideina. Nikkeli on bioakkumuloituva eliöille haitallinen metalli, jota käytetään teollisuuden raaka-aineena ympäri maailmaa. Tässä tutkielmassa tarkasteltiin nikkelin kertymistä täplärapuun (*Pacifastacus leniusculus*) laboratorio-olosuhteissa kahdella 14 vrk:n altistuskokeella eri nikkeli-altistuspitoisuuksilla kahdessa eri lämpötilassa (7 ja 17 °C). Eri testilämpötiloilla pyrittiin selvittämään, onko nikkelin kertyminen riippuvaista vaihtolämpöisen täpläravun aineenvaihduntatasosta. Kokeiden kontrollihavainnoista poikkeavia nikkeli-pitoisuuksia täpläravuista otetuissa näytteissä havaittiin jo 0,01 ja 0,09 mg Ni l⁻¹ altistuspitoisuuksissa. Altistustasolla 7,7 mg Ni l⁻¹ nikkelin kertyminen täplärapuun oli huomattavaa, ja suurimmat nikkeli-pitoisuudet mitattiin täplärapujen kiduksista. Lämpötilalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta täpläravun kidusten, maksahaiman, pyrstölihaksen, sukupuolirauhasen ja ruoansulatuskanavan nikkelikertymiin. Lämpötilan vaikutuksen havaitsemista häiritsi suuri rapuyksilöiden välinen vaihtelu nikkelin kertymisessä. Ravuille on myös ominaista suuri yksilöiden välinen aineenvaihduntatason vaihtelu. Kokeiden perusteella nikkeli kertyy nopeasti täplärapuun ja voi näin bioakkumuloitua ravintoketjuissa trofiatasolta toiselle varsinkin tilanteissa, joissa nikkelin ympäristöpitoisuus on kohonnut luonnontilaiseen ympäristöpitoisuuteen nähden moninkertaiseksi.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

Aquatic Science

OJALA SAMI, O.S.: Nickel accumulation in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) at two different temperatures

Master of Science Thesis: 23 p.

Supervisors: Dr. Anna Karjalainen, Prof. Juha Karjalainen

Inspectors: Dr. Hanna Arola. Dr. Anna Karjalainen

July 2017

Key Words: accumulation, Decapoda, ecotoxicology, metabolic rate, nickel chloride

ABSTRACT

Metal emissions caused by industrial mining activities are a world-wide environmental problem. In these emissions metals are often in the form of sulfide or chloride which are readily bioavailable to biota. Nickel (Ni) is a hazardous metal for biota and it is used as a raw material in metal industry world-wide. In this thesis Ni accumulation in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) was studied with two 14-d experiments in different Ni exposure concentrations and at two different water temperatures (7 ja 17 °C). The aim was to compare Ni accumulation at two different water temperatures in order to examine if the accumulation is dependent on the metabolic rate of an ectothermic invertebrate. Measured Ni concentrations of signal crayfish differed from control treatment already at the exposure concentrations 0.01 and 0.09 mg Ni l⁻¹. At 7.7 mg Ni l⁻¹ concentration nickel accumulation in signal crayfish was high, and the highest concentrations were measured from the gill samples. Ni concentrations of gills, hepatopancreas, digestive tract, tail muscle or gonad did not differ statistically significantly between two temperatures. It is characteristic for crayfish to have great variance in metabolic rate between individuals. Thus, the high variance in Ni accumulation between the exposed crayfish individuals prevented the observation of the temperature effect. Based on this study Ni accumulates rapidly in signal crayfish and therefore can bioaccumulate from trophic level to another especially in situations where nickel concentration greatly exceeds its typical background levels.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA	6
2.1. Täpläravun elinkierron piirteet	6
2.2. Täpläravun koko, kasvu ja aktiivisuus	6
2.3. Täpläravun soveltuvuus metallien kertymisen seurannan apuna	7
2.4. Nikkelin tuotanto ja esiintyminen ympäristössä	7
2.5. Veden lämpötilan mahdolliset vaikutukset nikkelin kertymiseen	8
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	8
3.1. Koejärjestelyt	8
3.2. Kokeiden toteutus	9
3.3. Kokeiden seuranta	11
3.4. Aineiston käsittely	13
4. TULOKSET	14
5. TULOSTEN TARKASTELU.....	17
Kirjallisuus.....	19
Liitteet.....	24

1. JOHDANTO

Suomessa purovesien nikkelpitoisuus on ollut vuosina 1990, 1995, 2000 ja 2006 tehtyjen mittausten perusteella keskimäärin välillä 0,41–0,70 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Tenhola & Tarvainen 2008). Kaivostoiminta voi kuitenkin muuttaa nikkelin ympäristöpitoisuuksia monikymmenkertaisiksi (Wright ym. 2015). Heinäkuussa 2014 Harjavallassa Norilsk Nickel Oy:n tehtaalla sattunut onnettomuus on tähän mennessä Suomen suurin yksittäinen nikkelpäästö, kun Kokemäenjokeen pääsi laitevian takia jätevettä, joka sisälsi muun muassa 66 tonnia nikkelisulfaattia (Anonyymi 2016b). Päästön jälkeen korkein jokivedestä mitattu nikkelpitoisuus oli yli 8 mg l^{-1} (Anonyymi 2016b). Nikkeli sekoitti simpukoiden kalsiumaineenvaihdunnan ja aiheutti toksisuudellaan suurta kuolleisuutta Kokemäenjoen simpukkapopulaatioissa (Anonyymi 2016b). Nikkelin on havaittu toimivan eliöiden kalsiumaineenvaihdunnassa vastavaikutteisesti ja tukkivan erityyppisiä kalsiumkanavia (McFarlane & Gilly 1998, Lee ym. 1999). Nikkelin haitallisuutta vesieliöille, biosaataavuutta ja toksisia vaikutusmekanismeja on tutkittu moniin muihin metalleihin verrattuna vähän (Keithly ym. 2004). Raskasmetallit, joihin nikkeli kuuluu, voivat kertyä ravintoverkoissa aiheuttaen terveystarpeiden esimerkiksi monille vesieläimille ja ihmisille (Desi ym. 1998). Biesenger & Christensen (1972) sekä Wong ym. (1993) ovat todenneet nikkelin vaikuttavan haitallisesti useiden vesieliölajien selviytymiseen, kasvuun ja lisääntymiseen.

Bioindikaattori on eliölaji tai -ryhmä, jonka avulla voidaan tutkia erilaisia bioindikaattorin elinympäristössä tapahtuvia muutoksia, kuten saastumista. Ravut täyttävät Phillips & Rainbow (1993) ja Rainbow (1995) mukaan bioindikaattoreille määritetyt kriteerit. Ravut sopivat metallien ympäristöpitoisuuden bioindikaattoreiksi, koska ne sietävät metallikontaminaatioita hyvin (Chambers 1995, Alcorlo ym. 2006, Suárez-Serrano ym. 2010) ja akkumuloivat metalleja elinympäristönsä pitoisuudesta sekä altistusajasta riippuvaisesti (Schmitt ym. 2006, Allert ym. 2009). Lisäksi rapujen biomassassa on tarpeeksi suuri metallianalytiikkaan ja niiden pyydystämiseen sekä tunnistamiseen on helppoa. Pieni elinalue saattaa tehdä ravuista alueellisesti tarkemman bioindikaattorin verrattuna kaloihin (Kuklina ym. 2014).

Täpläräpu (*Pacifastacus leniusculus*) on tyypillinen viileän veden rapulaji, joka panostaa kasvuun lämpimän veden aikoina. Täpläräpu kasvaa parhaiten, kun kasvukauden lämpötila on 20–25 °C (Firkins & Holdich 1993), mutta se pystyy sopeutumaan jopa 33 °C lämpötilaan (Becker ym. 1975, Rutledge & Pritchard 1981). Veden lämpötilalla on suora vaikutus vaihtolämpöisten vesieliöiden metaboliaan ja happitasoon (Viswanathan & Murti 1989). Vaihtolämpöisillä ravuilla metaboliasta aiheutuva lämmöntuotto on vähäistä ja ruumiin lämmönjohtokyky korkea, ja siksi niiden ruumiinlämpötila noudattaa melko tarkasti veden lämpötilaa (Lagerspetz & Vainio 2006). Rand & Petrocelli (1985) mukaan biokemiallisten reaktioiden määrä usein kaksinkertaistuu vaihtolämpöisen eliön elimistössä, kun lämpötilaa nostetaan eliön sietämällä lämpötila-alueella 10 °C.

Tämän työn tavoitteena oli tutkia nikkelin kertymistä täpläräpuun laboratorioolosuhteissa altistuspitoisuudeltaan Harjavallan nikkelpäästön kaltaisessa altistustilanteessa ja selvittää onko veden lämpötilalla vaikutusta nikkelin kertymiseen täpläräpuun. Lisäksi tavoitteena oli vertailla täpläräpujen kiduksiin, maksahaimaan, ruoansulatuskanavaan, pyrstölihakseeseen ja sukupuolirauhaseen kertyneitä nikkeliäkuormia sekä arvioida nikkelin ravintoverkkokertymisen potentiaalia tilanteissa, joissa nikkelin ympäristöpitoisuus kohoaa yli saastumattoman veden tason. Lämpötilavaikutuksen odotettiin näkyvän tuloksissa lämpötilan aiheuttaman aineenvaihduntavaikutuksen takia siten, että täpläräpuihin kertyisi enemmän nikkeliä 17 °C kuin 7 °C lämpötilassa. Nikkelin

on aiemmin raportoitu kertyvän heikosti valkoiseen lihaskudokseen (Alikhan & Zia 1989, Anderson ym. 1997, Naqvi ym. 1998), joten pyrstölihakseen arveltiin kertyvän nikkeliä vähiten.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1. Täpläravun elinkierron piirteet

Täpläravut pystyvät elämään laajalla lämpötila-alueella ja siksi niitä on helppo käyttää koelajina tutkimuksissa, joissa halutaan selvittää lämpötilan vaikutuksia tutkittuun ilmiöön. Täplärapu kasvaa parhaiten, kun kasvukauden lämpötila on 20–25 °C (Firkins & Holdich 1993), mutta se pystyy sopeutumaan jopa 33 °C lämpötilaan (Becker ym. 1975, Rutledge & Pritchard 1981). Rapujen lisääntymisen käynnistymistä säätelevät hormonit, jotka aktivoituvat päivän pituuden ja veden lämpötilan muutoksista (Dubé & Portelance 1992). Täpläravut parittelevat Suomessa loppusyksyllä lokakuun aikana (Savolainen ym. 1996), jolloin pintavesien lämpötila on usein koko Suomessa alle 10 °C.

Ravut ovat herkkiä veden happamuudelle. Happamuus voi aiheuttaa ravuille välitöntä kuolleisuutta, vaikuttaa haitallisesti lisääntymiseen ja häiritä kalsiumaineenvaihduntaa (France 1983). Häiriintynyt kalsiumaineenvaihdunta heikentää rapujen kuorta ja siten lisää rapuihin kohdistuvan predaation ja kannibalismien riskiä (France 1987). Malley (2011) havaitsi *Orconectes virilis* -ravun kuoren kalkkeutumisen olevan hitaampaa pH:ssa 5 kuin pH:ssa 6 tai 6,7, ja kalsiumin sisäänoton vähentyvän pH:ssa 5,7 ja loppuvan kokonaan pH:ssa 4.

Täpläravut ovat ruoanhankinnassaan opportunistisia ja kaikkiruokaisia eli omnivoreja. Siksi ne toimivat tärkeinä energian siirtäjinä eri trofiatasojen välillä virtavesien ja järvien ravintoverkoissa (Momot ym. 1978, Goddard 1988, Guan & Wiles 1998). Masonin (1975) mukaan aikuinen täplärapu käyttää ravinnokseen 55 % enemmän kasveja kuin nuori alle vuoden ikäinen täplärapu. Täpläravut ovat myös kannibaaleja. Kannibalismien on todettu lisääntyvän täplärapujen koon kasvaessa (Guan & Wiles 1998). Paastotuksen on raportoitu lisäävän rapujen aggressiivisuutta (Hazlett ym. 1975). Hazlett ym. (1975) totesivat paastotettujen rapujen liikkuvan ruokittuja enemmän ensimmäisen koeviikon aikana, mutta vähemmän toisen viikon aikana. Paastottamista vaativissa tutkimuksissa on syytä huomioida mahdollinen paaston aiheuttama aggressiivisen käyttäytymisen lisääntyminen ja täplärapujen taipumus kannibalismiin.

2.2. Täpläravun koko, kasvu ja aktiivisuus

Jatkuvasta kuoren sisällä tapahtuvasta pehmytkudosten kasvusta huolimatta, suurin osa rapujen kasvusta tapahtuu sykäyksittäin kuorenvaihtojen yhteydessä (Lowery 1988; Aiken & Waddy 1992, Ackefors ym. 1995). Mikäli täplärapujen kuorenvaihtoa halutaan välttää kokeen aikana, kannattaa kokeeseen valikoida täysikasvuisia rapuyksilöitä. Ensimmäisellä kasvukaudellaan täplärapu saattaa vaihtaa kuorta 11 kertaa (Mason 1963). Neljännessä ikävuodesta eteenpäin täplärapu vaihtaa kuorta useimmiten vain kerran vuodessa (Shimizu & Goldman 1983). Lämpötila, ruoan saatavuus (Lowery & Holdich 1988) ja yksilöiden ikä (Shimizu & Goldman 1983) vaikuttavat täplärapujen kuorenvaihtofrekvenssiin.

Täplärapujen selkäkilven maksimipituus on tyypillisesti 50–60 mm ja maksimipaino 60–110 g (Abrahamsson 1971, Flint 1975, Shimizu & Goldman 1983, Lewis & Horton 1997). Täysikasvuisten täplärapujen elinmassat ovat siten tarpeeksi suuria aineiden

kertymisen elinkohtaiseen analysointiin. Tässä tutkielmassa haluttiin arvioida nikkelin kertymistä täplärapujen eri elimiin ja siksi kokeissa käytettiin täysikasvuisia rapuyksilöitä (kaikki ravut olivat yli 10 cm pitkiä).

Pienen elinpiirin ansiosta täplärapujen voidaan ajatella ilmentävän tarkasti juuri sen lähiympäristön tilaa, josta ne on pyydetty. Keski-Suomessa Karisjärvellä toteutetussa tutkimuksessa 75 % merkityistä täplärapuista liikkui merkinnän jälkeen alle 100 m etäisyydelle vapautuspaikasta 15 kuukauden aikana (Kirjavainen & Westman 1999). Myös virtavesiolosuhteissa täplärapu voi olla todella paikallinen. Berry Creek -joella (Yhdysvallat, Oregonin osavaltio) tehdyissä merkintätutkimuksissa 147 täplärapua liikkuivat vuodessa keskimäärin noin 50 m etäisyydelle vapautuspaikasta (Mason 1975).

Tutkijat ovat havainneet täplärapujen liikkuvan ravinnonhaussa (Abrahamsson 1983), etsiessään uutta reviiiriä (Flint 1977, Abrahamsson 1983), pakoillessaan valoa merkinnän ja vapauttamisen jälkeen (Flint 1977) sekä lisääntymisaikana etsiessään parittelukumppania (Abrahamsson 1983). Koska täpläravut liikkuvat normaaleissa olosuhteissa hyvin vähän, lyhytaikaisissa laboratorioskokeissa ei tarvita liikkumistiloiltaan suuria altaita rapuille.

2.3. Täpläravun soveltuvuus metallien kertymisen seurannassa

Ravut täyttävät bioindikaattoreille määritetyt kriteerit (Phillips & Rainbow 1993, Rainbow 1995). Ravut voivat ilmentää raskasmetallien määrää ympäristössä, koska raskasmetallit kertyvät rapujen kudoksiin altistusajasta ja ympäristöpitoisuudesta riippuvaisesti (Schmitt ym. 2006, Allert ym. 2009). Metallien kertymistä rapuihin voidaan tutkia korkeissa altistuspitoisuuksissa, koska ravut eivät ole herkkiä metallikontaminaatioille (Chambers 1995, Alcorlo ym. 2006, Suárez-Serrano ym. 2010). Täpläravut ovat helposti tunnistettavia ja pyydystettäviä sekä erittäin paikallisia. Ravut voivat olla paikallisuutensa ansiosta alueellisesti tarkempia bioindikaattoreita, kuin esimerkiksi kalat (Kuklina ym. 2014). Ravuilla on melko yksinkertainen anatomia, ja suurin osa niiden elimistä on massoiltaan suurehkoja, minkä takia metallien kertymistä pystytään vertailemaan elimittäin helpommin rapuilla kuin esimerkiksi simpukoilla (Brittle ym. 2016).

Ravuista siirtyy energiaa suoraan ravintoketjujen ylimmille trofiatasoille saakka. Petokalat vaikuttavat saalistuksellaan makeanveden rapupopulaatioihin eniten, mutta ravut voivat olla myös tärkeä ravinnonlähde esimerkiksi monille lintulajeille (Senra & Alés 1992) sekä nisäkkäille, kuten saukoille (*Lutra lutra*) (Delibes & Adrian 1987), minkeille (*Neovison vison*) (Smal 1991) ja ihmisille. Täplärapu on Suomen kolmesta rapulajista taloudellisesti merkittävin. Vuodesta 2006 vuotuinen täplärapusaalis on ollut yli 75 % kokonaisrapusaaliista (Anonyymi 2012). Ravustus liittyy enimmäkseen vapaa-aikaan, mutta täplärapu luokiteltiin kuitenkin vuonna 2010 ammattikalastajien kolmanneksi tärkeimmäksi saalislajiksi Suomessa muikun (*Coregonus albula*) ja kuhan (*Sander lucioperca*) jälkeen (Anonyymi 2012). Täpläravun kautta kulkeva ravintoketju voi olla todella lyhyt ja siksi täplärapu on hyödyllinen monitorointilaji.

Vesiympäristöjen metallikontaminaatioiden biomonitoroinnissa tulisi käyttää monipuolisesti vesistöissä eläviä lajeja. Täplärapu on sukunsa yleisin rapulaji maailmassa. Yleisyytensä ja laajan levinneisyytensä takia täpläravusta on olemassa paljon tutkimustietoa (Lewis 2002). Siitä huolimatta nikkelin kertymistä täplärapuihin on tutkittu todella vähän.

2.4. Nikkelin tuotanto ja esiintyminen ympäristössä

Nikkelin käyttö ruostumattoman teräksen valmistuksessa käynnisti nikkelin tuotannon nopean kasvun maailmanlaajuisesti 1950-luvulla (Grundwell ym. 2011). Tuotantomäärä on noussut vuosien 1950–2010 välisenä aikana yli miljoonalla tonnilla (Kuck 2010). Nikkeliä louhitaan lateriittimalmista, josta saatavaa ferronikkeliä käytetään suoraan metallien valmistukseen, sekä sulfidimalmista, josta jalostetulla korkealaatuisella nikkelillä, voidaan esimerkiksi niklata tai värjätä metalleja (Grundwell ym. 2011).

Lateriittikaivoksia on lähinnä trooppisilla alueilla kuten Filippiineillä ja Indonesiassa sekä Etelä-Afrikassa. Sulfidikaivoksia on pääasiassa Kanadan pohjoisosissa ja Siperiassa. Vaikka nikkeliä esiintyy vain tietyissä paikoissa, sitä hyödynnetään teollisuuden raaka-aineena ympäri maailmaa. Esimerkiksi Afrikassa ja Australiassa louhittua nikkeliä on kuljetettu jalostettavaksi Suomeen ja Kiinaan. (Grundwell ym. 2011).

Nikkeliä on normaalisti vesistöissä hyvin pieninä pitoisuuksina. Tenhola & Tarvainen (2008) seurasivat purovesien nikkelipitoisuuksia Suomessa vuosina 1990, 1995, 2000 ja 2006. Suurin purovedestä mitattu nikkelipitoisuus oli vuoden 2000 mittauksissa $0,70 \mu\text{g l}^{-1}$ purovettä. Kaikkien seurantavuosien keskimääräiset nikkelipitoisuudet vaihtelivat välillä $0,41\text{--}0,70 \mu\text{g l}^{-1}$ purovettä. Kaivostoiminta voi kuitenkin muuttaa nikkelin ympäristöpitoisuuksia vesiekosysteemeissä monikymmenkertaisiksi (Wright ym. 2015). Teollisuuden päästöjen mukana metallit voivat päätyä luontoon ja eliöstöön biosaatavassa muodossa, kuten erittäin vesiliukoisina sulfaatteina tai klorideina (Wase & Forster 1997).

2.5. Veden lämpötilan vaikutukset nikkelin kudokertymiseen

Veden lämpötila vesistöissä muuttuu lähinnä vuodenaikojen vaihtelun, mutta myös ilmastomuutoksen takia ja siksi erilaisten lämpötilojen vaikutusta aineiden kertymiseen ja haitallisuuteen on mielekästä tutkia. Koska vaihtolämpöisillä ravuilla aineenvaihdunnasta johtuva lämmöntuotto on vähäistä ja ruumiin lämmönjohtokyky korkea, niiden ruumiinlämpötila noudattaa melko tarkasti veden lämpötilaa (Lagerspetz & Vainio 2006). Siksi veden lämpötilalla on havaittu olevan suora vaikutus vaihtolämpöisten vesieliöiden aineenvaihdunta- ja happitasoon (Viswanathan & Murti 1989).

Vesieliöt muuttuvat usein aktiivisemmiksi, kun veden lämpötila nousee niiden sietämällä lämpötila-alueella. Lämpötilan ja aktiivisuustason noustessa vedenkierto hengityselinten ja ruoansulatuskanavan läpi lisääntyy, jolloin kaikkien (tarpeellisten ja haitallisten) aineiden sisäänottomäärä voi kasvaa, ja haitallisten aineiden kertyminen kudoksiin saattaa lisääntyä (Hutchins ym. 1996a). Lämpötilan aiheuttamat aineenvaihdunnalliset vaikutukset vaihtolämpöisissä vesieliöissä, kuten ravuissa, voivat muuttaa haitallisten aineiden kertymismäärää koko vesieliöyhteisöön (Hutchins ym. 1996b).

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Koejärjestelyt

Kokeissa käytetyt täpläravut (*Pasifastacus leniusculus*) pyydettiin Vesantojärvestä (Vesanto, ETRS-TM35FIN-tasokoordinaatisto: noin N6974, E4763) syyskuussa 2015. Rapuja sopeutettiin Jyväskylän yliopiston laboratorio-olosuhteisiin kahdessa altaassa $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ porakaivovedessä kuusi viikkoa, minkä jälkeen suoritettiin esikoe pitoisuusalueen testaamiseksi. Esikokeen aloituksen jälkeen toisen ylläpitoaltaan veden lämpötila laskettiin

1 °C päivässä 17 °C:sta noin 12 °C:een. Rapuja sopeutettiin alempaan lämpötilaan kaksi viikkoa. Ylläpitoaltaissa rapuja ruokittiin kalalla, kalanrehulla ja perunalla.

Muiden metallijäämien poistamiseksi kaikki kokeissa käytetty lasivälineistö liotettiin hapossa (10 % HNO₃) vähintään kuuden tunnin ajan. Liotuksen jälkeen välineistö huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä ennen käyttöä. Akvaariot ja niiden lasikannet sekä muoviset saavit pestiin astianpesuaineella ja huuhdeltiin vesijohtovedellä. Pesun jälkeen akvaarioita liotettiin vesijohtovedessä noin 24 tuntia. Preparointivälineistö ja lämpömittari desinfioidiin asetonilla ja alkoholilla ennen jokaista käyttökertaa.

Kidevedellisestä nikkelikloridiheksahydraatista (NiCl₂ × 6H₂O, puhtaus ≥ 95 %, Sigma Aldrich) ja ultrapuhtaasta vedestä (SG Euro-60 Reverse Osmosis system, toimittaja HyXo Oy) valmistettiin esikoea varten kolme kantaliuosta, joita laimentamalla tavoiteltiin altistusvesien nikkelpitoisuuksia 0,1 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ ja 10 mg l⁻¹. Lämpötilakoea varten valmistettiin 250 ml kantaliuosta, jonka tavoitteellinen nikkelpitoisuus oli 8,8 g l⁻¹. Altistusvesi (tavoitepitoisuus 8 mg Ni l⁻¹) tehtiin 30 l saaviin pipetoimalla lasipipetillä 20 ml:aa kantaliuosta 22 l:aan porakaivovettä. Porakaivoveden määrä mitattiin 5 ja 2 l:n mittapulloilla. Vettä sekoitettiin lasisauvalla. Kontrolliveteen pipetoitiin edellä mainitussa suhteessa (20 ml / 22 l porakaivovettä) ultrapuhdasta vettä kantaliuoksen sijaan.

Kokeissa käytetty porakaivovesi käy läpi vedenkäsittelyjärjestelmän, jolla vedestä poistetaan pääasiassa siinä esiintyvää mangaania ja rautaa. Porakaivosta lähdettyään vesi kulkee esisuodattimen läpi, jonka jälkeen se kulkee paisuntasäiliöön. Mangaania ja rautaa suodatetaan vedestä suolaelvytteisesti ioninvaihtoon perustuen. Ioninvaihdon jälkeen porakaivovesi kulkee vielä kalkkikivisuodattimien läpi ja päättyy lopulta kylmä- ja lämminvesisäiliöihin, joista vettä johdetaan allashuoneisiin.

Ennen esikokeen alkua vesien pH säädettiin natriumhydroksidilla neutraaliksi (pH 7). Lämpötilakokeessa vesien pH:ta ei säädetty. Lämpötilakokeessa kylmää huonetta varten valmistetut vedet siirrettiin huoneeseen vedenvaihtoa edeltävänä päivänä, jotta uuden veden lämpötila ehti laskea huoneen lämpötilan tasolle. Nikkeliä käsiteltiin suljetussa tilassa. Käsiteltäessä käytettiin kaasuja suodattavaa puolinaamaria ja suojavaatetusta.

Kontaminaatioiden välttämiseksi kontrolli- ja altistusakvaarioiden välille jätettiin tarpeeksi tilaa. Akvaarioiden välille asetettiin pahiset näköesteet. Ilmastussysteemi rakennettiin ilmapumppuun liitetystä silikoniletkusta. Ilma johdettiin pääletkusta jokaiseen akvaarioon erikseen neulan, silikoniletkupätkän ja lasipipetin yhdistelmällä. Valot säädettiin ajastimella kummassakin kokeessa 8 h valoa 16 h pimeää -valorytmiin. Valon intensiteetti akvaarioiden veden pinnan tasolla oli ennen kokeita tehtyjen mittausten perusteella 80–90 lx.

3.2. Kokeiden toteutus

Esikokeen tarkoituksena oli selvittää millä altistuspitoisuudella saavutetaan analytiikalle (ICP-MS) riittävä nikkelikertymä täpläravun kudoksiin. Esikoe aloitettiin 22.10.2015 (-1 / 14 vrk) yhdessä huoneessa ja lämpötilassa, kolmella eri altistuspitoisuuskäsittelyllä ja yhdellä kontrollikäsittelyllä (3 rapua ja akvaariota kussakin käsittelyssä). Varsinainen lämpötilavaikutuskoe aloitettiin lämpimässä huoneessa 22.11.2015 (-1 / 14 vrk) ja kylmässä huoneessa päivää myöhemmin. Lämpötilakokeessa kummassakin koehuoneessa oli 8 akvaariota, joista puolet oli kontrolleja (0 mg Ni l⁻¹) ja puolet altistuskäsittelyitä (8 mg Ni l⁻¹). Kokeiden alkaessa kaikkiin akvaarioihin kaadettiin 5 l vettä ja ilmastus käynnistettiin. Seuraavana päivänä (0 / 14 vrk) täpläravut poimittiin

haavilla ylläpitoaltaista siten, että satunnaisesti valittu rapu pyydystettiin pakoilusta huolimatta. Täpläravut punnittiin ja niiltä mitattiin selkäkilven suurin leveys työntömitalla sekä kokonaispituus mitalla ravun otsapiikistä (*rostrum*) yhteen puristetun pyrstön uloimpaan kohtaan asti. Mittausten jälkeen ravut laitettiin omiin akvaarioihinsa porrastetusti kokeiden lopettamiseen kuuluva aika huomioituna, jotta rapujen altistus aika olisi aina mahdollisimman sama.

Vettä vaihdettiin akvaarioiden 5 l:n kokonaistilavuudesta 2,5 l päivinä 1, 2, 4, 6, 8, 10 ja 12 kummassakin kokeessa, jotta nikkelpitoisuus pysyisi mahdollisimman tasaisena. Vedenvaihtojen yhteydessä käytetyistä vesistä sekä uudesta vedestä otettiin happopestyihin LDPE (low density -polyeteeni) -näytepulloihin noin 100 ml:n vesinäytteet, jotka kestävästi 1 ml:lla typpihappoa (väkevyys 67–69 %, Romil-SpA H566, Romil Ltd). Uusista ja vanhoista vesistä otettiin suodattamattomia ja suodatettuja näytteitä. Suodatettuja näytteitä otettiin ennen molempien kokeiden alkua ja kokeiden aikana muutamien vedenvaihtojen yhteydessä nikkelikloridin vesiliukoisuuden arvioimiseksi. Liukoisien pitoisuuden määrittämistä varten otetut näytteet suodatettiin näytepulloihin ruiskusuodattimen (0,45 µm, Whatman GD / XP) läpi. Kaikki näytteet säilöttiin pimeässä kylmahuoneessa (4–6 °C), kunnes näytteet pakattiin kylmälaukkuihin ja lähetettiin analysoitavaksi Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksen (KVVY ry.) akkreditoituun laboratorioon, jossa jokaisesta vesinäytteestä määritettiin nikkelpitoisuus induktiivisesti kytketyllä plasmamassaspektrometri (ICP-MS) ja induktiivisesti kytketyllä optisella plasmaemissiospektrometri (ICP-OES) -laitteilla. Molempien kokeiden alussa otetuista vesinäytteistä määritettiin nikkelpitoisuuden lisäksi magnesiumin, mangaanin, raudan, kuparin, kaliumin, kalsiumin ja natriumin pitoisuudet (Liite 1).

Vanhoista käytetyistä vesistä, satunnaisista akvaarioista otettiin myös vesinäytteet erillisiin dekanterilaseihin päivinä 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ja 14 ja näytteistä mitattiin veden happipitoisuus (YSI ProODO, YSI Ltd) ja pH (VWR pHenomenal pH 1000 L, VWR International). Veden lämpötilaa tarkkailtiin läpi kokeiden mittaamalla lämpötila mittarilla suoraan satunnaisesti valitusta akvaariosta. Molemmissa kokeissa mitattiin myös ammoniumionin (NH₄⁺) määrä joka toisena vedenvaihtopäivänä dekanterilaseihin otetuista vesinäytteistä. Esikokeen lopussa otettiin myös vesinäyte veteen liunneen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuuden määrittämiseksi.

Rapuja ruokittiin kokeiden aikana yhden kerran kokeen seitsemäntenä päivänä. Jokaiseen akvaarioon laitettiin esikokeessa kaksi rehupellettiä (Hercules LP OPTI, Raisio Oyj), jolloin annostaso ± S.D. oli 11,2 ± 1,8 mg g⁻¹. Varsinaisessa lämpötilakokeessa pellettien määrä pudotettiin yhteen per akvaario, jolloin annostaso puoliintui. Syömättömäksi jääneet rehupelletit poistettiin akvaarioista lappoimulla seuraavana päivänä vedenvaihdon yhteydessä.

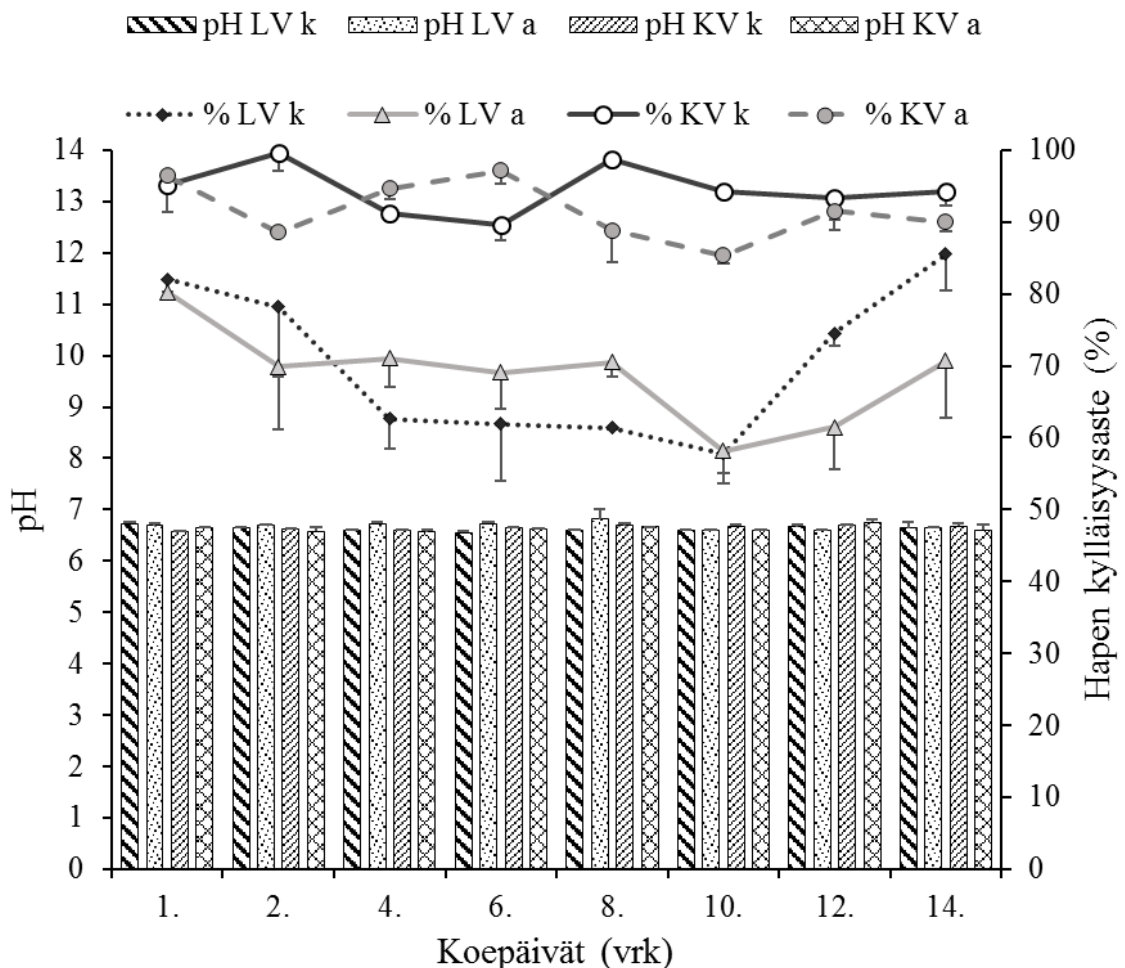
Kokeet lopetettiin 14 vrk:n altistusajan jälkeen porrastetusti Anna Karjalaisen kanssa työskennellen parityöskentelyyn suunnitellun aikataulun mukaisesti. Ravut nostettiin akvaarioista kaksi kerrallaan erillisiin astioihin puhtaaseen veteen. Ravut punnittiin ja niiltä mitattiin pituus mitalla sekä selkäkilven leveys työntömitalla. Ravuilta otettiin myös hemolymfa-näytteet pyrstölihaksen keskiosasta ventraalipinnalta Eppendorf-putkiin mahdollisia tulevia analyyskejä varten. Hemolymfa-näytteet pakastettiin (-18 °C) välittömästi näytteenoton jälkeen.

Mittausten ja verinäytteenoton jälkeen ravut lopetettiin 30 min pakastuksella (-18 °C). Lopetuksen jälkeen täpläravuilta preparoitiin kidukset, ruoansulatuskanava, maksahaima, sukupuolirauhanen ja pyrstölihas erillisiin Minigrip-pusseihin, jotka oli etukäteen tyhjännetty. Sydänlihaksista tehtiin sydämen pienen massan takia

käsittelyryhmäkohtainen kokoomanäyte. Näytteet punnittiin (Mettler-Toledo AG204, Mettler-Toledo Ltd) ja säilöttiin erillisissä pusseissaan pakastimessa (-18 °C). Kidus-, ruoansulatuskanava-, pyrstölihas-, maksahaima-, sukupuolirauhas- ja sydänlihäsäilytysnäytteet lähetettiin (yksi lähetys viikossa) analysoitavaksi Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistykselle pakastettuina kylmälaukuissa. Näytteistä määritettiin kuiva-ainepitoisuudet sekä nikkelpitoisuudet ICP-MS ja ICP-OES -laitteilla KVVY:n akkreditoituilla menetelmillä. Esikokeessa näytteistä määritettiin nikkelpitoisuuden lisäksi natriumin, kalsiumin, kaliumin, magnesiumin, raudan, kuparin, arseenin, lyijyn, alumiinin, mangaanin ja sinkin pitoisuudet (Liite 2).

3.3. Kokeiden seuranta

Esikokeen ravuista 6 oli naaraita ja 6 koiraita. Lämpötilakokeessa molemmissa kontrolliryhmissä oli 1 naaras ja loput 14 rapua olivat koiraita. Lämpötilakokeessa rapujen keskipituus \pm S.D. oli ennen koetta tehtyjen mittausten perusteella 114 ± 6 mm, selkälilven keskileveys \pm S.D. oli 29 ± 2 mm ja rapujen keskipaino \pm S.D. oli $55,7 \pm 11,3$ g.

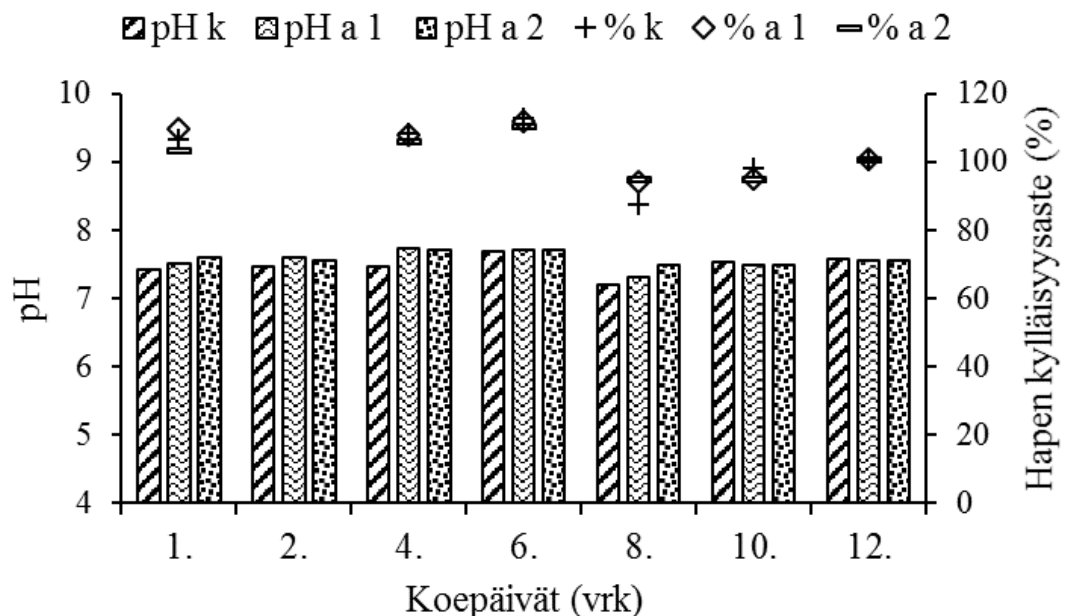


Kuva 1. Lämpötilakokeen aikana vedenvaihtopäivinä tehtyjen pH-mittausten keskiarvot + S.E. (pylväät, $n = 2$ / käsittely / vrk) ja happipitoisuusmittausten keskiarvot - S.E. (merkit, $n = 2$ / käsittely / vrk) käsittelyryhmittäin (LV k = lämpimän veden kontrolliryhmä, KV k = kylmän veden kontrolliryhmä, LV a = lämpimän veden altistusryhmä ja KV a = kylmän veden altistusryhmä).

Esikoe tehtiin yhdessä koehuoneessa, josta mitattujen veden lämpötilojen ($n = 5$) keskiarvo \pm S.D. oli $17,4 \pm 0,1$ °C. Lämpötilakokeessa täplärapuja pidettiin kahdessa koehuoneessa, joihin säädettiin eri huonelämpötilat. Lämpötilakokeen aikana tehtyjen veden lämpötilamittausten ($n = 12$ / huone) keskiarvot \pm S.D. olivat $17,3 \pm 0,1$ °C ja $6,7 \pm 0,3$ °C.

Esikokeessa happipitoisuusmittausten ($n = 22$) hapen kylläisyysasteen keskiarvo \pm S.D. oli $102,2 \pm 6,7$ % ja pH-mittausten ($n = 26$) keskiarvo \pm S.D. oli $7,57 \pm 0,14$ (Kuva 2). Lämpötilakokeen aikana tehtyjen happipitoisuusmittausten ($n = 32$ / lämpötila) perusteella hapen kylläisyysasteen keskiarvo \pm S.D. oli kylmässä vedessä $93,1 \pm 4,6$ % ja lämpimässä vedessä $69,7 \pm 10,1$ % ja pH-mittausten ($n = 32$ / lämpötila) keskiarvo \pm S.D. oli kylmässä vedessä $6,64 \pm 0,07$ ja lämpimässä vedessä $6,65 \pm 0,09$ (Kuva 1).

Ilmastus säädettiin lämpötilakokeessa letkunkiristimien avulla hyvin pienelle tehokkuudelle, koska esikokeessa havaittiin hapen ylikyllästyneisyyden aiheuttavan pH:n nousua. Esikokeen kuudentena päivänä ilmastustehokkuutta pienennettiin, mikä näkyi hapen kylläisyysasteen laskuna alle sadan prosentin ja pH:n laskuna lähemmäs neutraalia kahdeksannen päivän mittauksissa. Ilmastus kuitenkin tehostui esikokeen lopussa uudelleen, koska letkunkiristimet eivät pysyneet säädetyllä kireydellä ja hapen kylläisyysaste nousi jälleen yli sadan prosentin ja pH kasvoi. (Kuva 2).



Kuva 2. Esikokeen aikana vedenvaihtopäivinä tehtyjen pH- ja happipitoisuusmittausten tulokset (1 mittaus / käsittelyryhmä / vrk) käsittelyryhmittäin (k = kontrolliryhmä, a 1 = altistusryhmä $0,1 \text{ mg Ni l}^{-1}$ ja a 2 = altistusryhmä 10 mg Ni l^{-1}).

Lämpötilakokeessa käytetyistä vesistä otettujen suodattamattomien näytteiden ($n = 24$ / ryhmä) kokonaisnikkelipitoisuuksien keskiarvot \pm S.D. olivat lämpimän veden altistusryhmässä $7,67 \pm 0,11 \text{ mg l}^{-1}$ ja kylmän veden altistusryhmässä $7,66 \pm 0,11 \text{ mg l}^{-1}$. Käyttämättömistä vesistä otettujen suodattamattomien näytteiden ($n = 5$ / ryhmä) kokonaisnikkelipitoisuuksien keskiarvot \pm S.D. olivat lämpimän veden altistusryhmässä $7,76 \pm 0,09 \text{ mg l}^{-1}$ ja kylmän veden altistusryhmässä $7,74 \pm 0,05 \text{ mg l}^{-1}$. Kaikissa kontrolliryhmien vesinäytteissä kokonaisnikkelipitoisuus alitti määritystarkkuuden alarajan $0,004 \text{ mg l}^{-1}$. Esikokeen perusteella suodatettujen näytteiden nikkelpitoisuudet olivat

keskimäärin 98,5 % suodattamattomien näytteiden nikkelpitoisuuksista, joten kokeissa käytetyn nikkelikloridin voitiin olettaa olevan näissä koeolosuhteissa lähes täysin veteen liukenevaa.

Molemmissa kokeissa määritettiin nikkelin lisäksi natriumin, kaliumin, kalsiumin, magnesiumin, raudan ja mangaanin pitoisuudet kokeissa käytetystä porakaivovedestä (Liite 1). Esikokeen alussa porakaivovedestä määritettiin myös rikin, sinkin, strontiumin, lyijyn, alumiinin, arseenin ja kadmiumin pitoisuudet (Liite 1). Lämpötilakokeen alussa otettujen suodatettujen vesinäytteiden perusteella kokeissa käytetty porakaivovesi sisälsi vesiliukoisena 40 mg l⁻¹ natriumia, 0,69 mg l⁻¹ kaliumia, 0,63 mg l⁻¹ kalsiumia, 0,05 mg l⁻¹ magnesiumia, 0,0018 mg l⁻¹ rautaa ja < 1 µg l⁻¹ mangaania.

3.4. Aineiston käsittely

Tilastollisissa analyyseissä käytettiin aineistona täpläravuista preparoitujen elin- ja kudospäytteen nikkelpitoisuuksia mg kg⁻¹ tuore- ja kuivamassaa. Tuoremassoina käytettiin kokeiden jälkeen Jyväskylän yliopistolla tehdyistä punnituksista saatuja tuloksia. Näytteiden kuivamassat (n_{km}) laskettiin tuoremassojen ja Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistyksellä tehtyjen määritysten kuiva-ainepitoisuustietojen perusteella yhtälöllä

$$n_{km} = n_{ka\%} \times n_{tm},$$

jossa n_{km} = näytteen kuivamassa, $n_{ka\%}$ = näytteen kuiva-ainepitoisuus ja n_{tm} = näytteen tuoremassa.

Altistus- ja lämpötiläkäsittelyiden vaikutusta ravuista otettujen näytteiden nikkelikertymiin (mg kg⁻¹ näytteiden tuore- ja kuivamassaa) tutkittiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä. Varianssianalyysillä arvioidaan yhden tai useamman riippumattoman muuttujan vaikutusta riippuvaan muuttujaan vertailemalla perusjoukkojen odotusarvojen yhtäsuuruutta. Ryhmittelymuuttujina olivat lämpötiläkäsittely (7 ja 17 °C) ja nikkelialtistuskäsittely (kontrolli ja nikkelialtistus). Selittävinä muuttujina käytettiin näytteiden nikkelpitoisuuksia mg kg⁻¹ tuore- ja kuivamassaa. Kaksisuuntaisen varianssianalyysin oletuksiin kuuluu vertailtavien ryhmien riippumattomuus, vastemuuttujan normaalijakautuneisuus ja varianssien yhtäsuuruus. Nikkelpitoisuuksille tehtiin logaritmimuunnos, koska se lisäsi vasteen homoskedastisuutta (varianssien yhtäsuuruutta) käsittelyryhmien välillä.

Nikkelikuormien vertailemiseksi eri kudosten välillä aineistosta laskettiin jokaiselle rapuyskilölle näytteiden massaosuuksilla painotettu nikkelpitoisuus ja viiden näytteen kokonaisnikkelpitoisuus mg:na kuivamassa- ja tuoremassakilogrammaa kohti. Näytteiden kokonaisuudessa (m_{kok}) laskettiin kaavalla

$$m_{kok} = m_{kidus} + m_{rsk} + m_{hp} + m_{lihas} + m_{sp},$$

jossa m_{kidus} = kidusten massa, m_{rsk} = ruoansulatuskanavan massa, m_{hp} = maksahaiman massa, m_{lihas} = pyrstölihaksen massa ja m_{sp} = sukupuolirauhasen massa. Näytteiden massaosuudet kokonaisuudesta (α_n) saatiin käyttämällä kaavaa

$$\alpha_n = m_n \div m_{kok},$$

jossa m_n = näytteen massa. Massaosuuksien avulla pystyttiin laskemaan näytekohdaiset nikkelpitoisuudet ja siten myös viiden näytteen kokonaisnikkelpitoisuus (Ni_{kok}) yhtälöllä

$$Ni_{kok} = \alpha_{kidus} \times Ni_{kidus} + \alpha_{rsk} \times Ni_{rsk} + \alpha_{hp} \times Ni_{hp} + \alpha_{lihas} \times Ni_{lihas} + \alpha_{sp} \times Ni_{sp},$$

jossa Ni = nikkelpitoisuus (mg kg^{-1}) ja parametrejä selittävät alaindeksit tulkitaan samoin kuin yllä olevissa kaavoissa.

Yhdellä nikkelille altistetulla ravulla havaittiin preparoinnin aikana toisessa kiduksessa runsaasti kuollutta tummunutta kudosta, mutta näytteeseen päätettiin kuitenkin poimia koko elin. Tämä todennäköisesti aiheutti yli kymmenkertaisen nikkelimäärän ravun kidusnäytteessä verrattuna muihin saman käsittelyryhmän kidusnäytteiden tuloksiin ja siksi tämä havainto poistettiin aineistosta. Lisäksi aineistosta poistettiin yhden nikkelille altistetun ravun sukupuolirauhasen havainto, koska sen nikkelpitoisuus oli moninkertainen muiden sukupuolirauhashavaintoihin verrattuna. Tämän hyvin todennäköisen virrehavainnon virhelähdettä ei tiedetä. Kontrolliryhmissä oli useita nikkelpitoisuushavaintoja, jotka alittivat määrittystarkkuuden alarajan $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$. Näiden havaintojen kohdalle arvottiin luvut tasajakaumasta $0,0001$ ja $0,05$ väliltä. Näytteiden kuivamassaan suhteutetusta aineistosta jouduttiin jättämään pois kaksi kontrolliryhmän havaintoa, koska nikkelpitoisuuksien (mg kg^{-1} kuivamassaa) laskemiseen tarvittujen näytteiden kuiva-ainepitoisuudet puuttuivat. Aineistoa käsiteltiin Microsoft Excel 2016 -ohjelmalla, ja tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 24 -ohjelmalla.

4. TULOKSET

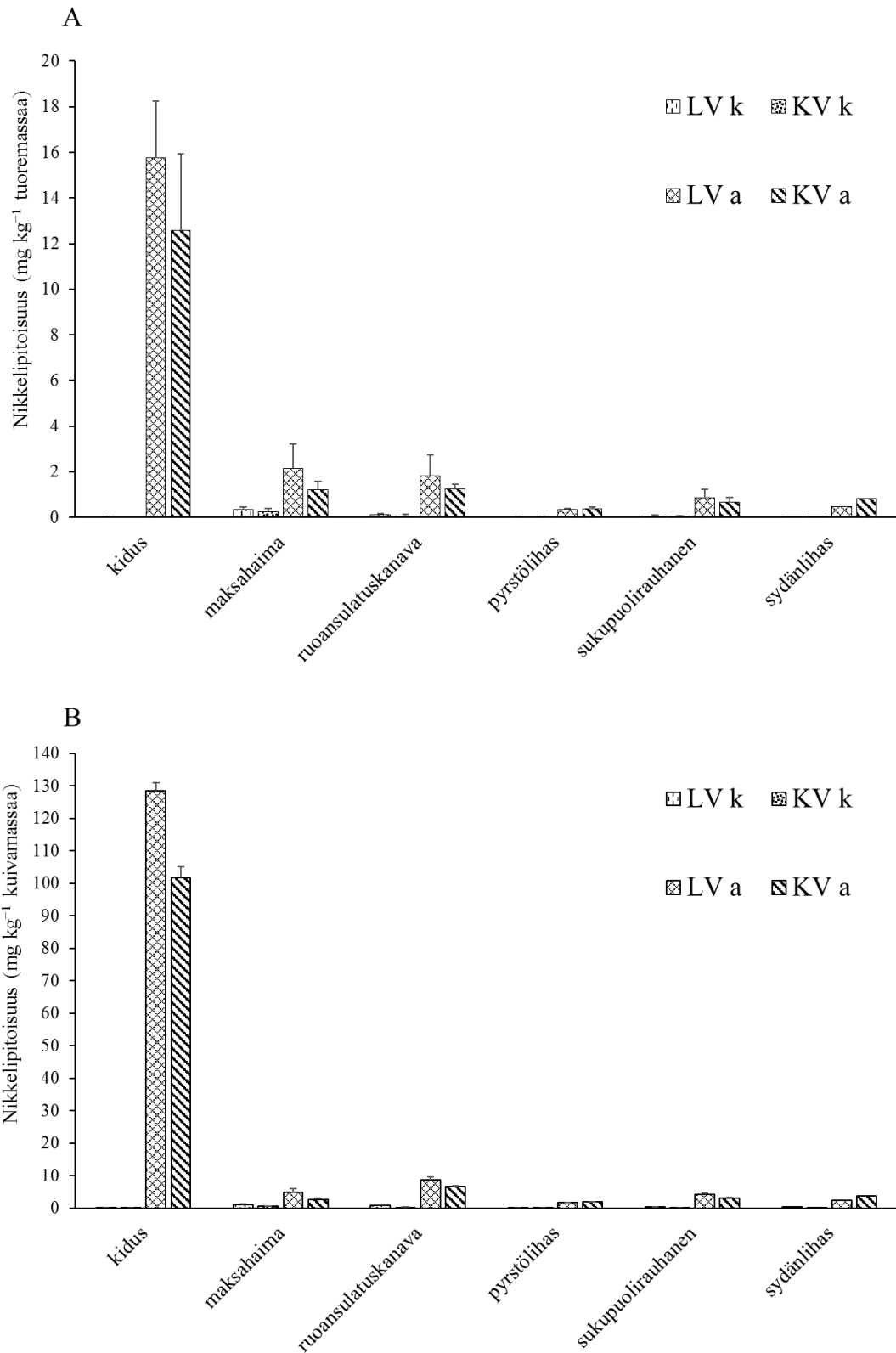
Varsinaisessa lämpötilakokeessa ero täpläravuista otettujen näytteiden nikkelpitoisuuksissa (mg kg^{-1} näytteiden tuore- ja kuivamassaa) nikkelille altistettujen ryhmien ja kontrolliryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä kaikkien testattujen elinten osalta ja pyrstölihas mukaan lukien. Lämpötilakäsittelyllä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta täplärapujen elinten ja pyrstölihaksen nikkelpitoisuuksiin (mg kg^{-1} näytteiden tuore- ja kuivamassaa). (Taulukko 1).

Taulukko 1. Lämpötilan ja nikkeli-altistuksen vaikutus täpläravuista otettujen näytteiden nikkelpitoisuuksiin mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaan (a) ja kuivamassaan (b) suhteutettuna: kaksisuuntaisen varianssianalyysin tulokset (n = havaintojen lukumäärä käsittelyryhmissä yhteensä, F-testisuureen arvot ja p-arvot).

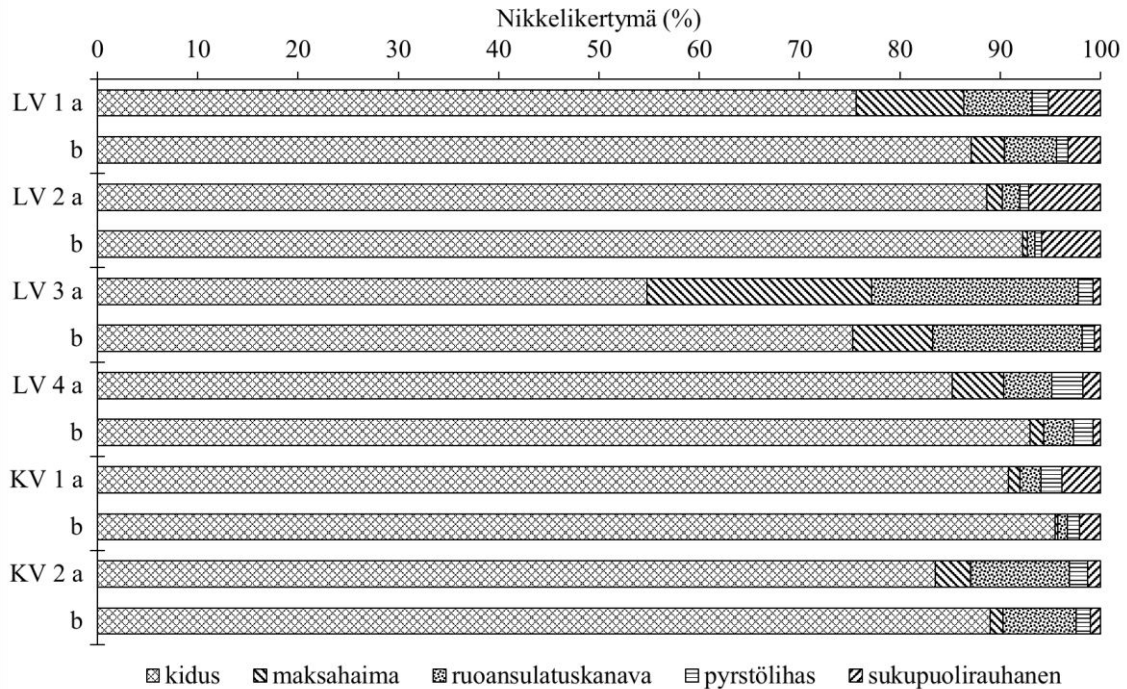
Näyte	n	Altistuskäsittely		Lämpötilakäsittely	
		$F_{1,11}$	p	$F_{1,11}$	p
Kidus a	15	465,122	< 0,001	0,917	0,357
Kidus b	15	1020,141	< 0,001	2,165	0,167
Maksahaima a	16	7,421	0,017	0,725	0,410
Maksahaima b	16	6,698	0,023	0,909	0,358
Pyrstölihas a	16	78,656	< 0,001	0,159	0,696
Pyrstölihas b	16	137,826	< 0,001	0,078	0,784
Ruoansulatuskanava a	15	14,263	0,003	0,323	0,580
Ruoansulatuskanava b	15	19,545	0,001	0,506	0,490
Sukupuolirauhanen a	14	10,485	0,008	0,086	0,774
Sukupuolirauhanen b	14	13,698	0,003	0,037	0,850

Nikkeliä kertyi keskimäärin eniten täplärapujen kiduksiin ja vähiten pyrstölihaksen tuore- ja kuivamassaan suhteutettuna (Kuva 3). Suurin vesipitoisuus oli kiduksissa, joissa nikkelikertymät olivat n. 8 kertaa suurempia kuivamassaan kuin tuoremassaan

suhteutettuna (Kuva 3). Täplärapujen kiduksiin, maksahaimaan, ruoansulatuskanavaan ja sukupuolirauhaseen kertyi nikkeliä keskimäärin enemmän lämpimän kuin kylmän veden altistuksessa tuore- ja kuivamassaan suhteutettuna (Kuva 3). Kontrolliryhmien osalta maksahaimasta otetut näytteet olivat ainoita, joissa ei esiintynyt yhtäkään nikkelpitoisuuden määrittystarkkuuden ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) alittanutta havaintoa, joten kontrolliryhmissä nikkelin taustapitoisuus oli keskimäärin suurin maksahaimassa (Taulukko 2 & Kuva 3).



Kuva 3. Täpläruvuista mitattujen nikkelpitoisuuksien (mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaa A ja kuivamassaa B) ryhmäkeskiarvot ($n = 4$ / pylväs, poikkeus: KV a kidus ja sukupuolirauhanen $n = 3$ / pylväs) + S.E. ja sydänlihaksista otettujen kokoomanäytteiden nikkelpitoisuudet (mg kg^{-1} sydänlihaksen tuoremassaa A ja kuivamassaa B) lämpötilakokeen eri käsittelyryhmissä (LV k = lämpimän veden kontrolliryhmä, KV k = kylmän veden kontrolliryhmä, LV a = lämpimän veden altistusryhmä ja KV a = kylmän veden altistusryhmä).

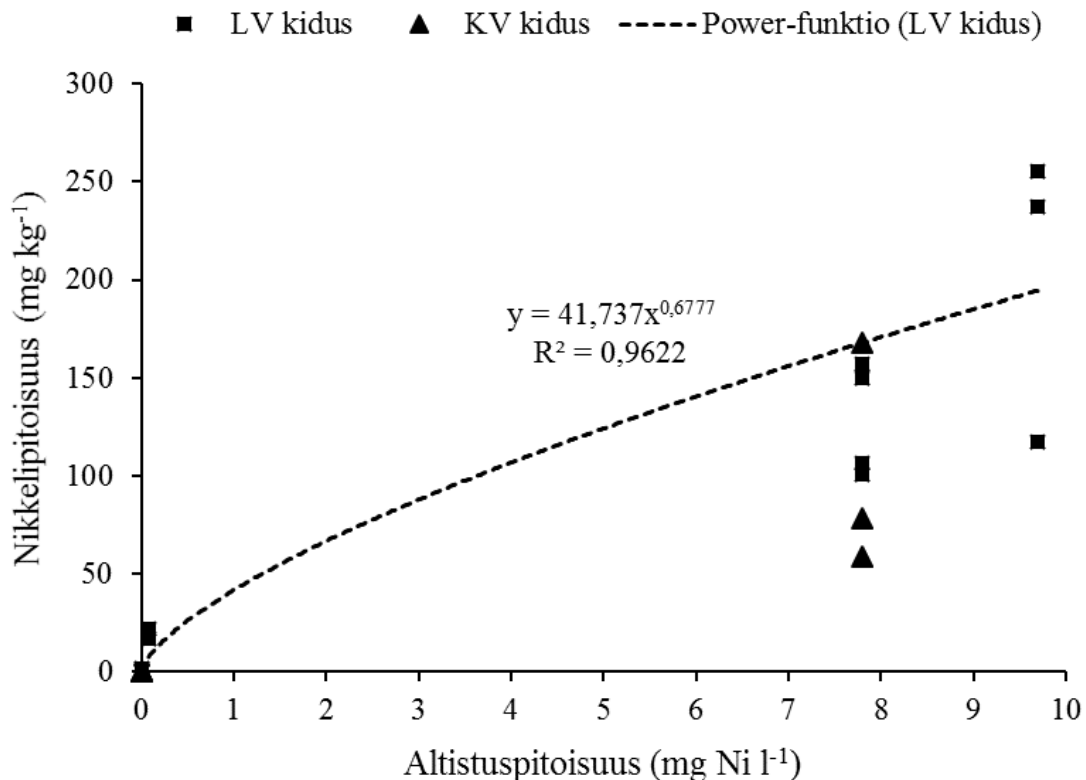


Kuva 4. Täplärapuyksilöistä preparoitujen näytteiden nikkelikertymä (%) (mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaa a ja kuivamassaa b) näytteiden kokonaiskertymästä lämpötilakokeen nikkelialtistusryhmissä (lämpimän veden altistusryhmän rapuyksilöt LV 1–4 ja kylmän veden altistusryhmän rapuyksilöt KV 1–2). Kaaviosta on jätetty pois kaksi kylmän veden altistusryhmän rapuyksilöä, koska niiltä puuttui nikkelipitoisuushavaintoja.

Taulukko 2. Täplärapujen kidus- (Kidus), maksahaima- (Mh), ruoansulatuskanava- (Rsk), pyrstölihas- (Lihäs) ja sukupuoliirauhasnäytteistä määritetyt nikkelipitoisuudet (mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaa) molempien kokeiden kontrolliryhmissä (LV e 1–3 = lämpimän veden kontrolliryhmä esikokeessa, LV v 1–4 = lämpimän veden kontrolliryhmä lämpötilakokeessa ja KV v 1–4 = kylmän veden kontrolliryhmä lämpötilakokeessa). Tähdellä (*) merkittyjen näytteiden nikkelipitoisuudet alittivat määritystarkkuuden alarajan $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$.

Täplärapuyksilö	Kidus	Mh	Rsk	Lihäs	Sp
LV e 1	*	0,10	*	*	*
LV e 2	*	0,16	*	*	*
LV e 3	*	0,55	0,07	*	*
LV v 1	*	0,19	0,08	*	0,06
LV v 2	*	0,43	0,28	*	0,15
LV v 3	0,06	0,74	0,10	*	*
LV v 4	*	0,13	*	*	*
KV v 1	*	0,66	0,22	*	*
KV v 2	*	0,12	*	*	0,10
KV v 3	*	0,13	*	*	0,10
KV v 4	*	0,10	*	*	*

Näytteiden kokonaisnikkelipitoisuuksien perusteella nikkeliä kertyi varsinaisen lämpötilakokeen aikana enemmän täplärapujen kiduksiin kuin pyrstölihakseeseen, ruoansulatuskanavaan, sukupuolirauhaseen ja maksahaimaan yhteensä. Kidusten nikkelikertymien %-osuudet nikkelin kokonaiskertymistä olivat $79,78 \pm 13,30 \%$ (keskiarvo \pm S.D., mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaa) ja $88,68 \pm 7,20 \%$ (keskiarvo \pm S.D., mg kg^{-1} näytteiden kuivamassaa). Pienimmät nikkelikertymien %-osuudet nikkelin kokonaiskertymistä mitattiin pyrstölihaksista: $1,84 \pm 0,75 \%$ (keskiarvo \pm S.D., mg kg^{-1} näytteiden tuoremassaa) ja $1,25 \pm 0,42 \%$ (keskiarvo \pm S.D., mg kg^{-1} näytteiden kuivamassaa). Lämpötilalla ei havaittu olevan vaikutusta näytteiden kokonaisnikkelikertymien %-osuuksiin. (Kuva 4).



Kuva 4. Molempien kokeiden nikkelpitoisuushavainnot (mg kg^{-1} kidusnäytteiden kuivamassaa) täplärapujen kiduksista. Lämpimän veden havaintoihin on sovitettu power-funktio (LV = lämmin vesi ja KV = kylmä vesi).

5. TULOSTEN TARKASTELU

Lämpötilalla ei ollut tämän tutkimuksen perusteella tilastollisesti merkitsevää vaikutusta nikkelin kertymiseen täpläravun kiduksiin, maksahaimaan, ruoansulatuskanavaan, pyrstölihakseeseen ja sukupuolirauhaseen. Nikkeliä oli kuitenkin kertynyt keskimäärin enemmän täplärapujen kiduksiin, ruoansulatuskanavaan ja maksahaimaan lämpimän veden altistuksen kuin kylmän veden altistuksen aikana. Aineenvaihduntatason merkitys kertymisessä osoittautui kuitenkin oletettua vähäisemmäksi. Toisaalta, kun esikokeesta ja lämpötilakokeesta saadut kidusten nikkelpitoisuudet (mg Ni kg^{-1} kuivamassaa) yhdistettiin (Kuva 4), kylmän veden altistusryhmän pitoisuudet olivat keskimäärin lämpimän veden altistusryhmiä alhaisempia. Nikkelin kertymistä täplärapuun tulisi tutkia useammalla eri altistuspitoisuudella, jotta nikkelin kertymisen ennustaminen eri altistustasoilla tarkentuisi. Mahdollisen lämpötilan

aiheuttaman aineenvaihdunnallisen vaikutuksen havaitseminen vaatisi enemmän toistoja tutkituista lämpötilakäsittelyistä, koska rapuilla on havaittu taipumusta suureen yksilöiden väliseen aineenvaihduntatason vaihteluun (Oliveira ym. 2003).

Tehdyissä kokeissa nikkeliä kertyi nikkeli-altistusryhmissä selkeästi voimakkaimmin täplärapujen kiduksiin, mikä oli odotettu tulos lyhytkestoisessa kokeessa, korkeahkossa altistuspitoisuudessa. Rapujen kidukset ovat jatkuvasti kosketuksissa veteen ja toisaalta ravun verenkiertoon. Rapujen kiduskudokset vastaavat esimerkiksi aineiden kulkeutumisesta vedestä verenkiertoon ja päinvastoin sekä hemolymfan suodattamisesta ja jäteaineiden poistosta (Vogt 2002). Kidusten on osoitettu olevan rapuilla elin, jossa raskasmetallien aiheuttamat vaikutukset näkyvät ensimmäisenä (Torreblanca ym. 1989, Naqvi ym. 1998). Tämä tulos on myös linjassa aiemmin rapuilla tehtyjen nikkeli-altistuskokeiden kanssa. Khan & Nugegoda (2003) tutkivat nikkelin kertymistä jappiravun (*Cherax destructor*) elimiin eri altistuspitoisuuksissa laboratorio-olosuhteissa 21 vuorokauden altistusajanjaksolla. Tutkimustulosten perusteella nikkeliä kertyi tilastollisesti merkitsevästi enemmän jappirapujen kiduksiin kuin maksahaimaan 25 mg l^{-1} ja 50 mg l^{-1} nikkeli-altistuspitoisuuksissa.

Joki- ja täplärapuilla tehdyissä tutkimuksissa nikkelin on havaittu akkumuloituvan voimakkaammin rapujen maksahaimaan kuin lihaskudokseen (Jorhem ym. 1994, Mackevičienė 2002). Mackevičienė (2002) havaitsi nikkelin kertyvän voimakkaammin jokirapujen maksahaimaan kuin lihaskudokseen kasvatusolosuhteissa, joissa nikkeliä oli läpivirtaavassa vedessä vain $0,36 \mu\text{g l}^{-1}$. Myös tässä tutkielmassa kontrolliryhmien nikkeli-pitoisuudet olivat maksahaimassa korkeimmat.

Tässä tutkielmassa nikkelin kertymistä täplärapuun arvioitiin kiduksiin, maksahaimaan, ruoansulatuskanavaan, sukupuolirauhaseen, pyrstölihakseeseen ja sydänlihakseeseen kertyneen nikkelin perusteella. Metallit voivat absorboitua vedestä rapujen kalkkikuorille ja nostaa siten metallin kokonaiskertymismäärää yksilössä (Güner 2010). Kertymisen kannalta huomattavampaa on kuitenkin metallien kulkeutuminen ravinnon (ruoansulatuskanavan) tai kidusten kautta hemolymfaan, josta ne voivat imeytyä hivenaineina soluihin (Güner 2010). Ylimääräinen metalli varastoituu väliaikaisesti tai pysyvästi yleensä detoksikaatioon (myrkyllisten aineiden muuntamiseen vaarattomaan tai vaarattomampaan muotoon) erikoistuneisiin elimiin kuten maksahaimaan (Güner 2010). Ylimääräinen metalli voi poistua näistä detoksikaatiovarastoista ja muualta ravun elimistöstä aineenvaihduntareaktioiden kautta (Güner 2010). Biomonitoroinnin kannalta olisi tärkeää selvittää kuinka nopeasti nikkeli poistuu rapujen kiduksista altistuksen päätyttyä ja toisaalta, kasvaako nikkeli-pitoisuus altistuksen päättymisen jälkeen nikkeliä varastoivissa elimissä.

Rapuilla metallien detoksikaatiosta vastaa maksahaiman lisäksi myös eläimen päässä sijaitseva virtsarakosta ja siihen liitoksissa olevasta rauhasesta koostuva elin (antennal gland). Kokeessa, jossa metalleja injektointiin *Orconectes propinguis* -ravun hemolymfaan, havaittiin rapuille hyödyllisen hivenmetallin raudan varastoituvan maksahaiman lysosomeihin, mutta rapuille hyödyttömän lyijyn todettiin imeytyvän antennal gland -elimeen ja poistuvan ravun elimistöstä sitä kautta (Roldan & Shivers 1987). Siksi antennal gland -elimen vaikutus nikkelin kertymiseen täplärapulla olisi syytä tutkia.

Tässä tutkimuksessa nikkeliä kertyi vähiten täplärapujen pyrstölihakseeseen. Monien metallien on todettu kertyvän heikosti valkoiseen lihaskudokseen (Alikhan & Zia 1989, Anderson ym. 1997, Naqvi ym. 1998). Kuklina ym. (2014) pyydystivät jokirapuja (*Astacus astacus*) kolmesta tsekkiläisestä tekojärvestä ja määrittivät rapujen nikkeli-pitoisuudet maksahaimasta ja lihaskudoksesta. Kahdessa kolmesta testatusta tekojärvestä nikkeliä oli

kertynyt tilastollisesti merkitsevästi enemmän jokirapujen maksahaimaan kuin lihaskudokseen. Tutkimuksessa havaittiin myös, että nikkeliä oli akkumuloitunut vähemmän rapujen lisäksi pyydystettyjen valkolihaisten kalojen lihaskudokseen verrattuna jokiravuilta testattujen elinten (lihas ja maksahaima) keskiarvokertymään.

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira on esittänyt nikkelin saannille korkeimman siedettävän päivittäisen raja-arvon elinikäisen altistuksen aikana (TDI = tolerable daily intake) $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ ihmisen ruumiinpainoa (Anonyymi 2016b). Jotta raja-arvo ylittyisi, 50 kg painavan ihmisen tulisi syödä tämän tutkielman lämpötilakokeessa nikkelille altistettujen rapujen pyrstölihaksia 46 kpl päivässä ja 90 kg painavan henkilön 83 kpl. Laskennassa ei huomioitu muusta ravinnosta assimiloituvaa nikkeliä, ihmisten yksilökohtaisia eroja nikkelin assimiloitumisessa eikä toisaalta rapujen keittämisen vaikutusta pyrstölihasten nikkeliipitoisuuteen. Esimerkiksi rapuja ravinnokseen hyödyntävät kalalajit syövät ravut kokonaisina ja siksi nikkelin kertymistä vesistöjen ravintoverkoissa voitaisiin arvioida täplärapujen avulla tarkemmin, jos nikkelin kertyminen määritettäisiin kokonaisilla ravuilla.

Toteutettujen kokeiden perusteella voidaan todeta, että nikkeliä kertyy täplärapuihin huomattavasti altistustasolla $7\text{--}9 \text{ mg Ni l}^{-1}$. Kontrolliolosuhteista poikkeavia nikkeliipitoisuuksia täpläravuissa havaittiin esikokeessa jo altistustasoilla $0,01$ ja $0,09 \text{ mg Ni l}^{-1}$. Siksi nikkelillä on potentiaalia kertyä täpläravuista ravintoketjujen ylemmille trofiatasoille varsinkin tilanteissa, joissa veden nikkeliipitoisuus nousee ihmistoiminnan seurauksena luonnolliseen ympäristöpitoisuuteen nähden moninkertaiseksi.

Kirjallisuus

- Abrahamsson S.A.A. 1971. Density, growth and reproduction in populations of *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* in an isolated pond. *Oikos*. 22: 373–380.
- Abrahamsson S. 1983. Trappability, locomotion, and diet pattern of activity of the crayfish *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus* Dana. *Freshwater crayfish* 5: 239–253.
- Ackefors H., Gydemo R. & Keyser P. 1995. Growth and moulting in confined juvenile noble crayfish *Astacus astacus* (L.) (Decapoda, Astacidae). *Freshwater crayfish* 10: 396–409.
- Aiken D.E. & Waddy S.L. 1992. The growth process in crayfish. *Rev. Aquat. Sci.* 6: 335–381.
- Alcorlo P., Otero M., Crehuet M., Baltanas A. & Montes C. 2006. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as an indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci. Total Environ.* 366: 380–390.
- Allert A.L., Fairchild J.F., DiStefano R.J., Schmitt C.J., Brumbaugh W.G. & Besser J.M. 2009. Ecological effects of lead mining on Ozark streams: in-situ toxicity to woodland crayfish (*Orconectes hylas*). *Ecotox. Environ. Safe.* 72: 1207–1219.
- Alikhan M.A. & Zia S. 1989. Nickel uptake and regulation in a copper-tolerant decapod, *Cambarus bartoni* (Fabricius) (Decapoda, Crustacea). *B. Environ. Contam. Tox.* 42: 94–102.
- Anderson M.B., Reddy P., Preslan J.E., Fingerman M., Bollinger J., Jolibois L., Maheshwarudu G. & George W.J. 1997. Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotox. Environ. Safe.* 37: 267–272.
- Anonyymi 2012. Kansallinen rapustrategia 2013–2022. http://mmm.fi/documents/1410837/1724545/trm2012_10_Kansallinen_rapustrategia_2013-2022.pdf. Haettu 19.10.2016.
- Anonyymi 2016a. Norilsk Nickel Harjavalta Oy 5.–6.7.2014 tapahtuneen nikkeli päästön vaikutusten selvittäminen: loppuraportti 2015.

http://www.elykeskus.fi/documents/10191/4932689/Norilsk+Nickel_loppuraportti2015_13012016_KVVY.pdf . Haettu 19.10.2016.

- Anonyymi 2016b. Vierasaineiden saantirajat. <https://www.evira.fi/yhteiset/vierasaineet/tietoa-vierasaineista/kalan-ymparistomyrkyt/vierasaineiden-saantirajat/> . Haettu 16.5.2017.
- Becker C.D., Genoway R.G. & Merrill J.A. 1975. Resistance of the north-western crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) to elevated temperatures. *T. Am. Fish Soc.* 2: 374–387.
- Biesinger K.E. & Christensen G.M. 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Board Can.* 29: 1691–1700.
- Brittle S.W., Paluri S.L.A., Foose D.P., Ruis M.T., Amato M.T., Lam N.H., Buttigieg B., Gagnon Z.E. & Sizemore I.E. 2016. Freshwater crayfish: a potential benthic-zone indicator of nanosilver and ionic silver pollution. *Environ. Sci. Technol.* 50: 7056–7065.
- Chambers M.G. 1995. The effect of acute cadmium toxicity on marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) (Family Parastacidae). *Freshwater crayfish* 10: 209–220.
- Delibes M. & Adrián I. 1987. Effects of crayfish introduction on otter (*Lutra lutra*) food in the Donana National Park, SW Spain. *Biol. Conserv.* 42: 153–159.
- Desi I., Nagymajtenyi L. & Schuiz H. 1998. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *J. Appl. Toxicol.* 18: 63–70.
- Dubé P. & Portelance B. 1992. Temperature and photoperiod effects of ovarian maturation and egg laying of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Aquaquulture* 102: 161–168.
- Firkins I. & Holdich D.M. 1993. Thermal studies with three species of freshwater crayfish. *Freshwater crayfish* 9: 241–248.
- Flint R.W. 1975. Growth in a population of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* from a subalpine lacustrine environment. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 2433–2440.
- Flint R.W. 1977. Seasonal activity, migration and distribution of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in Lake Tahoe. *Am. Midl. Nat.* 97: 280–292.
- France R.L. 1983. Response of the crayfish *Orconectes virilis* to experimental acidification of a lake with special reference to the importance of calcium. *Freshwater crayfish* 5: 98–111.
- France R.L. 1987. Calcium and trace metal composition of crayfish (*Orconectes virilis*) in relation to experimental lake acidification. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 107–113.
- Goddard J.S. 1988. Food and feeding. Teoksessa: Holdich D.M. & Lowery R.S. (toim.), *Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Croom Helm, Lontoo, s. 146–166.
- Grundwell F.K., Moats M.S., Ramachandran V., Robinson T.G. & Davenport W.G. 2011. *Extractive metallurgy of nickel, cobalt and platinum-group metals*. Elsevier, Oxford.
- Guan R. & Wiles P.R. 1998. Feeding ecology of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in a British lowland river. *Aquaquulture* 169: 177–193.
- Güner U. 2010. Bioaccumulation of some heavy metals on freshwater crayfish. Teoksessa: El Nemr A. (toim.), *Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution*. Nova Science Publishers, New York, s. 479–493.
- Hazlett B., Rubenstein D. & Rittschof D. 1975. Starvation, energy reserves, and aggression in the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 28: 11–16.
- Holdich D.M., Harlioğlu M.M. & Firkins I. 1997. Salinity adaptations of crayfish in British water with particular reference to *Austroprotopotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus*, and *Pacifastacus leniusculus*. *Estuar. Coast. Shelf S.* 44: 147–154.

- Hutchins D.A., Teyssié J.-L., Boisson F., Fowler S.W. & Fisher N.S. 1996a. Temperature effects on uptake and retention of contaminant radionuclides and trace metals by the brittle star *Ophiothrix fragilis*. *Mar. Environ. Res.* 41: 363–378.
- Hutchins D.A., Stupakoff I. & Fisher N.S. 1996b. Accumulation of radionuclides by sea stars: implications for contaminated northern waters. *Mar. Biol.* 125: 701–707.
- Jorhem L., Engman, J., Sundström, B. & Thim, A.M. 1994. Trace elements in crayfish: regional differences and changes induced by cooking. *Arch. Environ. Con. Tox.* 26: 137–142.
- Keithly J., Brooker J.A., DeForest D.K., Wu B.K. & Brix K.V. 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella Azteca*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 691–696.
- Khan S. & Nuggeoda D. 2003. Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* accumulates and depurates nickel. *B. Environ. Contam. Tox.* 70: 308–314.
- Kirjavainen J. & Westman K. 1999. Natural history and development of the introduced signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in a small, isolated Finnish lake, from 1968 to 1993. *Aquat. Living Resour.* 12: 387–401.
- Kuck P.H. 2010. *Nickel mineral commodity summaries*. United States Geological Survey, Washington DC.
- Kuklina I., Kouba A., Buřič M., Horká I., Ďuriš Z & Kozák P. 2014. Accumulation of heavy metals in crayfish and fish from selected Czech reservoirs. *BioMed Research International* 2014: 1–9.
- Lagerspetz K.Y.H. & Vainio L.A. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biol. Rev.* 81: 237–258.
- Lee J.H., Gomora J.C., Cribbs L.L. & Perez-Reyes E. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys. J.* 77: 3034–3042.
- Lewis S.D. 2002. *Pacifastacus*. Teoksessa: Holdich D.M. (toim.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Nottingham, s. 511–540.
- Lewis S.D. & Horton H.F. 1997. Life history and population dynamics of signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in Lake Billy Chinook, Oregon. *Freshwater crayfish* 11: 34–53.
- Lowery R.S. 1988. Growth, moulting and reproduction. Teoksessa: Holdich D.M. & Lowery R.S. (toim.), *Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Croom Helm, Lontoo, s. 83–113.
- Lowery R.S. & Holdich D.M. 1988. *Pacifastacus leniusculus* in North America and Europe, with details of the distribution of introduced and native crayfish species in Europe. Teoksessa: Holdich D.M. & Lowery R.S. (toim.), *Freshwater crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Croom Helm, Lontoo, s. 283–308.
- Mackevičienė G. 2002. Bioaccumulation of heavy metals in noble crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues under aquaculture conditions. *Ekologija* 2: 79–82.
- Malley D.F. 2011. Decreased survival and calcium uptake by the crayfish *Orconectes virilis* in low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 364–372.
- Mason J.C. 1963. *Life history and production of the crayfish, Pacifastacus leniusculus trowbridgii (Stimson), in a small woodland stream*. Pro gradu -tutkielma, Oregonin osavaltion yliopisto.
- Mason J.C. 1975. Crayfish production in a small woodland stream. *Freshwater crayfish* 2: 449–479.
- McFarlane M.B. & Gilly W.F. 1998. State-dependent nickel block of a high-voltage-activated neuronal calcium channel. *J. Neurophysiol.* 80: 1678–1685.
- Momot W.T., Growing H. & Jones P.D. 1978. The dynamics of crayfish and their role in ecosystems. *Am. Midl. Nat.* 99: 10–35.

- Naqvi S., Devalraju I. & Naqvi N. 1998. Copper bioaccumulation and depuration by red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *B. Environ. Contam. Tox.* 61: 65–71.
- Oliveira G.T., Fernandes F.A., Bond-Buckup G., Bueno A.A. & Silva R.S.M. 2003. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aegliidae). *Memoirs of Museum Victoria* 60: 59–62.
- Phillips D.J.H. & Rainbow P.S. 1993. *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Applied Science Publishers, Barking.
- Rainbow P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 183–192.
- Rand G.M. & Petrocelli S.R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- Roldan B.M. & Shivers R.R. 1987. The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinguus*) hepatopaneas and antennal gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 201–214.
- Rutledge P.S. & Pritchard A.W. 1981. Scope of activity in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Am. J. Physiol.* 240: 87–92.
- Savolainen R., Westman K. & Pursiainen M. 1996. Fecundity of Finnish noble crayfish, *Astacus astacus* L., and signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in various natural habitats and in culture. *Freshwater crayfish* 11: 319–338.
- Schmitt C.J., Brumbaugh W.G., Linder G.L. & Hinck J.E. 2006. A screening-level assessment of lead, cadmium, and zinc in fish and crayfish from Northeastern Oklahoma, USA. *Environ. Geochem. Hlth.* 28: 445–471.
- Senra A. & Alés E.E. 1992. The decline of the white stork *Ciconia ciconia* population of western Andalusia between 1976 and 1988: causes and proposals for conservations. *Biol. Conserv.* 61: 51–57.
- Shimizu S.J. & Goldman C.R. 1983. *Pacifastacus leniusculus* (Dana) production in the Sacramento River. *Freshwater crayfish* 5: 210–228.
- Smal C.M. 1991. Population studies on feral American mink *Mustela vison* in Ireland. *J. Zool.* 244: 233–249.
- Suarez-Serrano A., Alcaraz C., Ibáñez C. & Trobajo C. 2010. *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 280–286.
- Sunderman F.W. Jr., Dingle B., Hopper S.M. & Swift T. 1988. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. *Am. J. Ind. Med.* 14: 257–266.
- Tenhola M. & Tarvainen T. 2008. *Purovesien ja orgaanisten purosedimenttien alkuainepitoisuudet Suomessa vuosina 1990, 1995, 2000 ja 2006*. Tutkimusraportti. Geologian tutkimuskeskus.
- Torreblanca A., Del Ramo J., Arnau J.A. & Diaz-Mayans J. 1989. Cadmium, mercury, and lead effect on gill tissue of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biol. Trace Elem. Res.* 21: 243–247.
- Viswanathan P.N. & Murti C.R.K. 1989. Effects of temperature and humidity on ecotoxicology of chemicals. Teoksessa: Bourdeau P., Haines J.A., Klein W. & Murti C.R.K. (toim.), *Ecotoxicology and climate*. John Wiley & Sons, New York, s. 139–154.
- Vogt G. 2002. *Functional anatomy*. Teoksessa: Holdich D.M. (toim.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science, Nottingham, s. 53–151.
- Wase J. & Forster C. 1997. *Biosorbents for metal ions*. Taylor & Francis, Lontoo.

- Wong C.K., Chu K.H., Tang K.W., Tam T.W. & Wong L.J. 1993. Effects of chromium, copper and nickel on survival and feeding behaviour of *Metapenaeus ensis* larvae and post larvae (Decapoda: Penaeidae). *Mar. Environ. Res.* 36: 63–78.
- Wright I.A., McCarthy B., Belmer N. & Price P. 2015. Subsidence from an underground coal mine and mine wastewater discharge causing water pollution and degradation of aquatic ecosystems. *Water Air Soil Pollut.* 226: 348.

LIITTEET

Liite 1. Esikokeen alussa puhtaasta porakaivovedestä otetuista vesinäytteistä määritetyt joidenkin alkuaineiden liukoiset pitoisuudet ja kokonaispitoisuudet kahdesta rinnakkaisnäytteestä A ja B. Tähdellä (*) merkittyjen aineiden pitoisuudet alittivat määritystarkkuuden.

Alkuaine	Yksikkö	Liukoinen pitoisuus		Kokonaispitoisuus	
		A	B	A	B
Na (natrium)	mg l ⁻¹	38	38	38	38
K (kalium)	mg l ⁻¹	0,56	0,56	0,56	0,56
Ca (kalsium)	mg l ⁻¹	0,73	0,73	0,73	0,73
S (rikki)	mg l ⁻¹	8,0	7,7	7,7	7,7
Mg (magnesium)	mg l ⁻¹	0,6	0,6	0,6	0,6
Zn (sinkki)	mg l ⁻¹	2,2	2,0	3,9	5,1
Cu (kupari)	µg l ⁻¹	2,5	2,4	2,5	2,3
Sr (strontium)	µg l ⁻¹	0,76	0,73	0,75	0,72
Al (alumiini)*	µg l ⁻¹	< 10	< 10	< 10	< 10
Mn (mangaani)*	µg l ⁻¹	< 1	< 1	< 1	< 1
Pb (lyijy)*	µg l ⁻¹	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8
Ni (nikkeli)*	µg l ⁻¹	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
As (arseeni)*	µg l ⁻¹	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Cd (kadmium)*	µg l ⁻¹	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08

Liite 2. Esikokeen täplärapujen kidus- (Kidus), maksahaima- (Mh), ruoansulatuskanava- (Rsk) ja pyrstölihasnäytteistä (Lihäs) määritetyt eri alkuaineiden keskimääräiset pitoisuudet (g tai mg kg⁻¹ näytteiden tuoremassaa). Keskiarvo (± S.D.) on laskettu vain määritystarkkuuden ylittäneiden pitoisuuksien perusteella. Kohdissa, joihin on merkitty määritysraja, ei ollut yhtäkään määritystarkkuuden alarajan ylittänyttä havaintoa.

Alkuaine	Yksikkö	Kidus	Mh	Rsk	Lihäs
Ca (kalsium)	g kg ⁻¹	0,64 ± 0,19	0,23 ± 0,05	17,7 ± 5,16	0,19 ± 0,05
Na (natrium)	g kg ⁻¹	2,46 ± 0,25	1,23 ± 0,26	2,28 ± 0,13	1,07 ± 0,18
K (kalium)	g kg ⁻¹	1,04 ± 0,18	2,45 ± 0,37	1,67 ± 0,14	3,21 ± 0,27
Mg (magnesium)	g kg ⁻¹	< 0,5	< 0,5	0,58 ± 0,10	< 0,5
Fe (rauta)	mg kg ⁻¹	76,9 ± 31,3	85,5 ± 74,6	12,9 ± 4,53	1,59 ± 0,33
Mn (mangaani)	mg kg ⁻¹	12,4 ± 13,5	9,50 ± 9,23	97,5 ± 29,4	1,68 ± 0,58
Zn (sinkki)	mg kg ⁻¹	4,55 ± 1,41	43,7 ± 10,7	19,3 ± 1,01	15,0 ± 2,14
Cu (kupari)	mg kg ⁻¹	20,6 ± 6,02	13,9 ± 13,8	3,12 ± 1,34	2,88 ± 1,12
As (arseeni)	mg kg ⁻¹	0,11 ± 0,08	0,43 ± 0,14	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,04
Al (alumiini)	mg kg ⁻¹	8,08 ± 7,32	< 2,5	3,45 ± 0,24	< 2,5
Pb (lyijy)	mg kg ⁻¹	0,15 ± 0,07	< 0,01	0,09 ± 0,12	< 0,01