

**Lindaani- ja kylmäältistuksen vaikutukset
painoon ja lisääntymiseen metsälierolla
*Dendrobaena octaedra***

Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötieteiden pro gradu -tutkielma
Leena Sivula
11. toukokuuta 2003

Tiivistelmä

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

SIVULA, LEENA: Lindaani- ja kylmäältistuksen vaikutukset painoon ja lisääntymiseen metsälierolla *Dendrobaena octaedra*

Pro gradu -tutkielma, 39 s.

Ohjaajat: FT Esko Martikainen, prof. Aimo Oikari

Tarkastajat: FT Esko Martikainen, prof. Aimo Oikari

Toukokuu 2003

Avainsanat: *D. octaedra*, lindaani, kylmänsieto, yhdysvaikutus

Pohjoiset olosuhteet, kuten alhaiset lämpötilat, voivat vaikuttaa vierasaineiden ympäristökohtaloon ja toksisuuteen. Vierasaineen aiheuttama stressi ja ilmastostressi, kuten alhainen lämpötila tai kuivuus, voivat yhdessä muodostaa ekologisen pullonkaulan. Mahdollisesti esiintyvä synerginen yhdysvaikutus voi vielä pahentaa tilannetta. Tässä tutkielmassa on selvitetty, onko alhaisen lämpötilojen ja vierasainealtistuksen aiheuttamilla stresseillä synergistä yhdysvaikutusta. Yhdysvaikutuksella tarkoitetaan alhaisen lämpötilan ja kemikaali-altistuksen välistä vuorovaikutusta. Synerginen yhdysvaikutus voi olla tulosta esimerkiksi vierasaineen kylmänsietomekanismeja häiritsevästä vaikutuksesta tai alhaisen lämpötilan vaikutuksesta vierasaineiden toksisuuteen.

Mallikemikaalina käytetty lindaani eli γ -heksakloorisykloheksaani on lierolle toksinen insektisidi. Testilajina käytetty metsäliero *Dendrobaena octaedra* tulee toimeen mm. happamissa metsämaissa. Sen kylmänsietokyky perustuu alijäähtymiseen. Metsäliero voikin selvitä hengissä jopa $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa.

Kokeessa käytettiin viittä lindaanipitoisuutta 0, 5, 10, 20 ja 50 mg/kg (kuivapaino) sekä neljää altistuslämpötilaa 1 (kontrolli), -1 -3 ja $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kussakin lämpötila-pitoisuus -yhdistelmässä oli 15 lieroa. Lindaani altistuksen alettua lierot sopeutettiin neljän viikon aikana $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilaan, minkä jälkeen ne siirrettiin suoraan altistuslämpötiloihin neljäksi vuorokaudeksi. Vastemuuttujina käytettiin painomuutosta sekä lisääntymistä. Lisääntymiskokeessa laskettiin kunkin yksilön tuottamien munakoteloiden määrä.

Kaikki lierot lämpötiloissa -3 ja $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuolivat. Tämä johtui ilmeisesti siitä, että lierot siirrettiin liian nopeasti $1\text{ }^{\circ}\text{C}$:sta altistuslämpötiloihin. Lämpötiloista 1 ja $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ saatujen tulosten perusteella, ei havaittu synergistä yhdysvaikutusta lindaani- ja kylmäältistuksen välillä. Erityisesti lisääntymiskokeissa vaihtelu oli suurta, minkä vuoksi munakoteloiden tuoton käyttäminen vastemuuttujana osoittautui epäluotettavaksi menetelmäksi.

Abstract

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ

Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

SIVULA, LEENA: Effects of Lindane and Low Temperature on weight and reproduction of Earthworm *Dendrobaena octaedra*

Pro gradu -thesis, 39 p.

Supervisor: Dr. Esko Martikainen, prof. Aimo Oikari

Examiners: Dr. Esko Martikainen, prof. Aimo Oikari

May 2003

Key words: *D. octaedra*, lindane, cold-hardiness, synergic effect

The boreal conditions, such as low temperatures, can affect the environmental fate and the toxicity of contaminants. The objective of this thesis was to study if there is a combined effect of pollution and cold stress. Lindane i.e. γ -hexachlorocyclohexane, was chosen as the model chemical. Lindane is an insecticide known to be harmful to earthworms. The test species was earthworm *Dendrobaena octaedra*. It can survive in harsh conditions such as in acidic soils of boreal coniferous forests. *D. octaedra* is a freeze avoiding species that is able to survive by supercooling even at temperatures as low as -6 °C.

Temperature and chemical stress can together form an ecological bottleneck. This effect can be even more serious if these two forms of stress have synergic interactions. The synergic effect can result, for instance, from disturbance of the cold hardiness mechanism of an organism or cold temperatures can change the toxicity of a contaminant.

In the experiment, lindane was mixed in natural soil. The concentrations used were 0, 5, 10, 20 and 40 mg/kg (DW). There were 15 earthworms in each combination of temperature and concentration. Four exposure temperatures were used: 1 (control), -1 , -3 , and -5 °C. During four week period earthworms were acclimated to 1 °C after which they were directly transferred to the exposure temperatures. Body weight changes and reproduction (number of cocoons) were used as end points.

At the temperatures -3 and -5 °C the mortality was 100%, which was probably due to the too fast decrease of the temperature when earthworms were transferred to the exposure temperatures. The results obtained from the remaining temperatures showed no synergic responses between the effects of temperature and lindane. The results varied quite much. Especially the results from the reproduction test were unreliable, because of relatively high variance. Therefore, the counting of cocoons proved to be an unreliable end point.

Sisällysluettelo

1	Johdanto	6
2	Lindaani	7
2.1	Lindaanin käyttö	7
2.2	Lindaanin kulkeutuminen	8
2.3	Lindaanin toksisuus	8
2.3.1	Vaikutusmekanismit ja oireet lieroilla	8
2.3.2	Lindaanin detoksikaatio ja biokertyminen lieroihin	9
2.3.3	Vaikutukset luonnossa	10
3	Metsäliero <i>Dendrobaena octaedra</i>	10
4	Lierojen kylmänsietomekanismit	11
4.1	Solun ulkopuolisten ruumiinnesteiden jäätymistä sietävät lajit	12
4.2	Ruumiinnesteiden alijäähtymiseen turvautuvat lajit	13
4.3	Kylmäaklimaatien solutason mekanismit	15
5	Kemikaali- ja kylmästressin yhdysvaikutukset	15
5.1	Lämpötilan vaikutus vierasaineiden ympäristökohtaloon	17
5.2	Lämpötilan ja vierasaineen yhdysvaikutukset eliössä	17
6	Aineisto ja menetelmät	19
6.1	Koe-eläimet	19
6.2	Kokeissa käytetty maa	19
6.3	Koepitoisuudet ja -lämpötilat	20
6.4	Painonmuutosten mittaaminen	21
6.5	Lisääntymiskyvyn mittaaminen	21
6.6	Tilastollinen käsittely	22
7	Tulokset	22
7.1	Kuolleisuus	22
7.2	Lierojen alkupainot ja niiden vaikutus lisääntymiskokeeseen	23
7.3	Kontrolli ja heksaanikontrolli	23
7.4	Painonmuutokset	24
7.5	Lisääntyminen	26
7.6	Yhdysvaikutukset	26
8	Tulosten tarkastelu	30
8.1	Kuolleisuus	30
8.2	Heksaanikontrolli	31
8.3	Lierojen painon väheneminen kokeen aikana	31

8.4	Lisääntyminen	32
8.5	Lierojen alkupainojen vaikutus koetuloksiin	34
8.6	Yhdysvaikutukset	35
	Kiitokset	35
	Lähdeluettelo	35
	A Aineisto	40

1 Johdanto

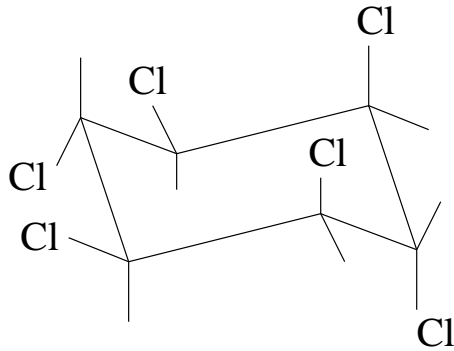
Vierasaineiden ympäristöhaittoja pyritään selvittämään toksisuustestien avulla. Testiolosuhteet pyritään saamaan luonnonolosuhteiden kaltaisiksi, mutta kuitenkin siten, että ne ovat hallittavissa. Standardoiduissa maaperäeliöillä tehtävissä toksisuustesteissä olosuhteet, esimerkiksi lämpötila ja orgaanisen aineen pitoisuus, vastaavat lähinnä Keski-eurooppalaisia olosuhteita. Maaperän olosuhteet boreaalisella havumetsävyöhykkeellä ovat kuitenkin huomattavan erilaiset kuin nämä testiolosuhteet.

Boreaaliselle havumetsävyöhykkeelle ovat tyypillisiä: alhaiset ääri- ja keskilämpötilat, suuret vuotuiset lämpötilaerot, hitaasti hajoava karike, korkea orgaanisen aineen pitoisuus maaperässä, maan happamuus ja pohjoiseen ympäristöön sopeutuneet lajit. Näiden erityisolojen huomioon ottaminen riskiarvioinnissa vaatii tuntemusta niiden vaikutuksista vierasaineiden toksisuuteen, hajoamiseen ja kulkeutumiseen (Haimi & Salminen 1996, Luotola ym. 2001). Tässä tutkielmassa on pyritty selvittämään alhaisen lämpötilan vaikutusta toksisuuteen.

Lindaani on tällaiseen tutkimukseen soveltuva malliaine. Se on lieroille toksinen insektisidi, jonka vaikutuksia ja ympäristökohtaloa on tutkittu paljon (Turnbull 1996, Lock ym. 2002).

Metsäliero *Dendrobaena octaedra* valittiin testilajiksi sen ekologisen merkityksen sekä hyvän alhaisten lämpötilojen sietokyvyn vuoksi. Metsäliero on pohjoisen havumetsävyöhykkeen tärkeä hajottajaeliö. Sen elinympäristöjä eivät ole viljellyt maat, vaan karut ja happamat metsämaat. Aikuinen metsäliero selviää hengissä jopa jäätyneessä maaperässä (Holmstrup & Zachariassen 1996).

Tarkoituksena oli metsälieroa testilajina käyttäen selvittää, onko alhaisilla lämpötiloilla ja lindaanilla yhdysvaikutuksia ja ovatko mahdollisesti esiintyvät yhdysvaikutukset luonteeltaan synergisiä. Synerginen yhdysvaikutus tarkoittaa sitä, että stressorien väliset vuorovaikutukset lisäävät haitallisia vaikutuksia stressorien esiintyessä yhdessä verrattuna niiden esiintymiseen yksinään. Esiintyessään yhtä aikaa stressoreista ainakin toinen voimistaa toisen haitallista vaikutusta eliölle. Käytettäessä stressoreina lindaani- ja kylmäaltistusta synerginen yhdysvaikutus voisi olla seurausta siitä, että lindaanialtistus vaikuttaisi metsälieron kylmänsietomekanismeihin tai alhainen lämpötila lindaanin toksisuuteen.



Kuva 1: γ -1,2,3,4,5,6-heksakloorisykloheksaani eli lindaani

2 Lindaani

2.1 Lindaanin käyttö

1,2,3,4,5,6, -heksakloorisykloheksaani esiintyy kahdeksana eri isomeerinä: α , β , γ , δ , ϵ , η ja θ , joista α -HCH esiintyy kahtena enantiomeerinä. Lindaaniksi kutustaan γ -isomeeriä (kuva 1). Torjunta-aineena on käytetty sekä teknistä -HCH:a että lindaania. Tekninen HCH on eri HCH isomeerien seos, jossa γ -HCH:ta on vain 8-15%. Lindaani on lähes puhdasta γ -HCH:ta, siinä γ -isomeeria on yli 90%. Kumpaakin käytetään hedelmien, vihannesten ja riisin tuhohyönteisten torjuntaan, viljan peittaukseen sekä ihmisten ja eläinten ulkoloisten torjuntaa (Li ym. 1996, Turnbull 1996, Willett ym. 1998, Walker ym. 1999).

Isomeereistä vain γ toimii insektisidinä (Willett ym. 1998). Kun tämä havaittiin, teknisen HCH:n käyttö kiellettiin useissa maissa. Lindaania on käytetty pitkään ja käytetään edelleen sekä teollistuneissa maissa että kehitysmaissa. Teknistä HCH:a käytetään yhä yleisesti torjunta-aineena esimerkiksi Intiassa, Kiinassa, Afrikassa ja Etelä-Amerikassa (Li ym. 1996, Turnbull 1996, Walker ym. 1999). Suomessa lindaanin käyttö torjunta-aineena on kielletty vuonna 1984 maa- ja metsätalousministeriön päätöksellä (MMp265/1984) ja torjuntaainelautakunnan päätöksellä (TALp1987) (Vesi- ja ympäristöhallitus 1993).

Kun käytetyn teknisen HCH:n sisältämän lindaanin ja käytetyn lindaanin määrät lasketaan yhteen, niiden suurimpia käyttäjämaita vuonna 1980 olivat Kiina (2174,6 t/a) ja Intia (3376,5 t/a). Vuonna 1990 Lindaanin käyttö on ollut runsasta sekä teollisuus- että kehitysmaissa. Kiinan ja Intian lisäksi Ranska, Italia, Nigeria, Kanada, Honduras ja Yhdysvallat käyttivät kukin yli 100 tonnia lindaania vuodessa. Myös entisen Neuvostoliiton alueella lindaanin käyttö on luultavasti ollut runsasta, mutta tältä alueelta käytöstä on vain vähän tilastoja (Li ym. 1996).

2.2 Lindaanin kulkeutuminen

Suomen sadevesissä on havaittavia pitoisuuksia lindaania, vaikka sitä ei täällä enää käytetä (Hirvi & Rekolainen 1995). Lindaani onkin tyypillinen globaalin tislautumisilmiön pohjoisille alueille kuljettava kemikaali. Päiväntasaajan lähetyvillä, jossa lämpötila ovat korkeita, torjunta-aineet haihtuvat. Napojen lähellä alhaiset lämpötilat aiheuttavat vierasaineen laskeutumista. Kääntöpiirien alueella haihtuminen ja laskeuma riippuvat mm. vuodenajasta (Turnbull 1996, Walker ym. 1999).

Haihtuminen ja ilmakulkeuma ovat merkittävimmät torjunta-aineiden siirtymismekanismit. Ilmakehässä olevasta torjunta-ainemäärästä 90% on peräisin levityksestä sekä levityksen jälkeisestä haihtumisesta. Levityksen jälkeen 40-90% käytetystä aineesta saattaa haihtua. Torjunta-aineista 10% pääsee ilmaan valmistuslaitoksilla ja käsittelyn sekä loppusijoituksen yhteydessä. Ilmavirtojen mukana torjunta-aineet voivat kulkeutua pitkiäkin matkoja ja laskeutua maan pinnalle, kasvillisuuteen ja vesistöihin (Turnbull 1996, Liikanen 1998, Walker ym. 1999).

Suomessa sadeveden torjunta-ainepitoisuuksia on seurattu vuosina 1991-1992. Tällöin lindaani oli kaikkein useimmin sadevesissä esiintyvä torjunta-aine (Hirvi & Rekolainen 1995). Torjunta-aine pitoisuuksia on mitattu ilmasta, sadevedestä, pintavesistä, sedimenteistä, kasvillisuudesta ja eri eliöistä (Turnbull 1996). Maaperän torjunta-ainepitoisuuksista ei kuitenkaan yleensä ole saatavilla mittaustuloksia tai edes arvioita.

Tärkeimmät torjunta-aineen haihtumista säätelevät ympäristötekijät ovat maaperän kosteus ja lämpötila. Erittäin kylmissä olosuhteissa, etenkin maaperän jäätyessä, haihtuminen on hyvin vähäistä. Levityksen jälkeen seuraa ensin nopea haihtumisen vaihe, joka olosuhteista ja aineesta riippuen kestää päivästä viikkoon. Toisessa vaiheessa haihtuminen jatkuu hitaampana läpi kasvukauden. Kun maaperän torjunta-ainepitoisuus on hyvin pieni tai olosuhteet ovat haihtumiselle epäedulliset, kuten talven tultua, haihtumista ei tapahdu enää juuri lainkaan. Torjunta-aineiden haihtuminen levityksen jälkeen vähenee myös siksi, että aineet sitoutuvat yhä tiukemmin maaperään (Liikanen 1998).

2.3 Lindaanin toksisuus

2.3.1 Vaikutusmekanismit ja oireet lieroilla

Heksakloorisykloheksaanit vaikuttavat voimakkaasti keskushermostoon. γ -HCH:lla on keskushermostoa stimuloiva vaikutus, kun taas. α , β , δ -isomeerit toimivat depressantteina. γ -HCH vaikuttaa kompetitiivisesti inhiboimalla γ -aminobutyryrihapon (GABA) reseptoreihin rotalla. α - ja δ -isomeerit inhiboivat

GABA- reseptoria 15-30 kertaa huonommin kuin γ -HCH. β -HCH:lla ei havaittu lainkaan GABA-reseptoria inhiboivaa vaikutusta. β - ja γ -HCH:n on myös todettu vaikuttavan lisääntymiseen ja endokriinijärjestelmään nisäkkäillä ja kaloilla (Willett ym. 1998).

Lindaanin toksisuutta on tutkittu useilla lierolajeilla. Useimmiten näissä annos-vaste tarkasteluissa vastemuuttujana on käytetty kuolleisuutta. Lisäksi on kuvattu lindaanin aiheuttaman akuutin toksisuuden oireita. Stenersen (1979) kuvailee akuutin lindaanimyrkytyksen oireiksi lieroilla jäykkyyden, kivaantumiskyvyn menettämisen sekä pakoreaktion heikentymisen, jolloin madot eivät koskettaessa tai valaistessa pakene, vaan kiertyvät paikallaan kokoon. Hans ym. (1990) puolestaan kuvailee oireiksi kasaan kiertymisen ja liikkeiden hidastumisen, kun liero kastettiin liuokseen, jonka lindaanipitoisuus oli 10 ppm. Pitoisuudella 25 ppm limaneritys kasvoi ja esiintyi rajua liikehdintää. Pitoisuutta edelleen lisättäessä (50ppm) esiintyi voimakasta limaeritystä, pallomaisia turvonneita alueita clitellumin etupuolella ja jaokkeiden välisiä kuroumia clitellumin takapuolella olevassa ruumiissa. Pitoisuudessa 100 ppm havaittiin vaahtoamista ja värin menetystä sekä kuolema kahden tunnin sisällä.

Lindaani on lieroille kroonisesti toksista (Lock ym. 2002). Alhaiset pitoisuudet maassa (5mg/kg kuivapaino) eivät näyttäisi aiheuttavan *E. fetidalla* oireita neljän viikon altistusajalla, mutta kasvu hidastuu, jos altistus jatkuu tätä pidempään (Viswanathan ym. 1988).

2.3.2 Lindaanin detoksikaatio ja biokertyminen lieroihin

E. fetidalla on havaittu lindaanin biotransformaation tapahtuvan dehydrokloorinaatiotuotteen (γ - 2,3,4,5,6 -pentakloorisykloheksaani-1-eeni) kautta. Kahdeksan viikon kokeen aikana polaarittomien metaboliittien määrä laski 20% ja samaan aikaan polaaristen metaboliittien määrä kasvoi. Tämän katsottiin osoittavan, että lieroilla on toiminnallisia detoksikaation mekanismeja lindaanille (Viswanathan ym. 1988).

Insektisidien detoksikaatio tapahtuu lieroilla ilmeisesti glutathionikonjugaation avulla. Glutathioni-S-trasferaasit (GST) ovat entsyymejä, jotka katalysoivat elektrofiilisten aineiden konjugoitumista glutathionin SH-ryhmään. GST:n on arveltu osallistuvan insektisidien toksisuutta vähentävään dealkylointiin, dearylointiin ja dehalogenaatioon (Hans ym. 1993). GST-aktiivisuuden nousu altistettaessa vierasaineelle on havaittu ainakin kuudella Lumbricidae -heimon lierolajilla (Stenersen ym. 1979). Hans ym. (1993) havaitsi, että GST-aktiivisuus nousi altistuksen alkuvaiheessa ja väheni altistuksen jatkuessa, kun lieroja (*Pheretima posthuma*) altistettiin 1-4 viikkoa lindaanille. On mahdollista, että lierot absorboivat takaisin joitakin GST:n avulla syntyviä metaboliitteja ja si-

ten, muista eliöistä poiketen, niihin kerääntyä polaarisia metaboliitteja (Hans ym. 1993).

Lindaani ja muut HCH:t voivat jossain määrin kertyä maaperään ja lieroihin. Hernández ym. (1992) määrittä kokeellisesti lindaanin bioakkumaaltioker-toimeksi maaperästä lieroon 42. Testilajina käytettiin *Lumbricus terrestris*. Viswanathan (1988) puolestaan esittää, että lindaani kertyy lieroihin yli 2-kertaisiksi pitoisuuksiksi ympäristön pitoisuuksiin verrattuna. Bioakkumulaa-tiokertoimet, jotka ovat yhtä suurempia, voivat aiheuttaa haitallisia vaikutuk-sia eliöstölle.

2.3.3 Vaikutukset luonnossa

Insektisidien on todettu kenttäkokeissa vaikuttavan haitallisesti lieroihin (Edwards & Brown 1982, Heimbach 1997, Wang ym. 2000). Eri lajien kuollei-suus ja kannan palautuminen vaihtelevat. Tämä voidaan selittää lajien erilai-sella käyttäytymisellä ja herkkyydellä vierasaineille. Käyttäytyminen voi vai-kuttaa altistumistasoon esimerkiksi erilaisten ruokailutapojen vuoksi, mutta myös siihen, miten nopeasti eri lajit palaavat saastuneelle alueelle pitoisuu-den laskettua alle kuolettavan tason. Insektisidit voivat vaikuttaa myös liero-jen lajisuhteisiin ja muuttaa siten normaalia maaperän eliöyhteisön toimintaa (Edwards & Brown 1982).

Lieroilla esimerkiksi lindaanin aiheuttamat hermotoiminnan lievät häiriöt ei-vät laboratorio-olosuhteissa näytä olevan kuolettavia, vaikka ne jatkuisivatkin pitkään. Luonnossa pitkään jatkuva liikkumattomuus ja kankeus voivat kui-tenkin olla kohtalokkaita (Stenersen 1979).

Arvioitaessa vierasaineen aiheuttamaa ekologista riskiä lasketaan PEC- (Pre-dicted Environmental Concentration) ja PNEC- (Predicted No Effect Consent-ration) arvot. Jos PEC/PNEC -suhde on suurempi kuin yksi, on mahdollista, että vierasaineella on vaikutuksia luonnossa. Lindaanille PNEC arvo on ve-siympäristössä määritetty (Girling ym. 2000). Maaperässä esiintyvistä lindaa-nipitoisuuksista (PEC) tai maaperäeliöille turvallisista lindaanipitoisuuksista ei kuitenkaan tätä tutkielmaa varten tehdyn kirjallisuuskatsauksen perusteella ole esitetty arvioita.

3 Metsäliero *Dendrobaena octaedra*

Metsäliero on pohjoisen havumetsävyöhykkeen tärkeä hajottajaeliö, sillä se pystyy tulemaan toimeen monenlaisessa ympäristössä, kuten happamassa ha-vumetsäkarikkeessa. Metsäliero vaikuttaa mm. metsämaan rakenteeseen, or-gaanisen aineen määrään ja mikrobiaktiivisuuteen (McLean & Parkinson

1997). Metsäliero ruokailee maan pinnalla olevassa karikkekerroksessa, jossa myös suurimpien insektisidipitoisuuksien voidaan olettaa olevan (Addison 1996).

Yleisesti maaperäekotoksikologisessa testaamisessa käytetty lierolaji on *Eisenia fetida* (tunkioliero). Se soveltuu hyvin testilajiksi, sillä sitä on helposti saatavilla, sen kasvattaminen laboratorio-olosuhteissa on helppoa ja sen lisääntymissykli on lyhyt. *E. fetidan* käyttö onkin yleensä perusteltua, sillä saatujen tulosten on todettu korreloivan hyvin muilla lajeilla saatuihin tuloksiin (Heimbach 1985). *E. fetida* on kuitenkin valittu testilajiksi lähinnä käytännöllisyyden eikä ekologisen merkityksen vuoksi. *E. fetidan* luonnolliset elinympäristöt ovat varsin suppeita, niissä on muuta ympäristöä enemmän orgaanista ainetta sekä korkeampi lämpötila (esim. kompostit) (Spurgeon & Weeks 1997).

Metsälieron hyvä alhaisten lämpötilojen sieto oli syynä sen valintaan testilajiksi tässä tutkimuksessa. *E. fetida* viihtyy varsin korkeissa lämpötiloissa, eikä siedä jäätymistä lainkaan. Sen sijaan aikuisten metsälierojen on havaittu selviävän hengissä jopa -6 °C :n lämpötiloista (Holmstrup, julkaisematon).

Metsäliero on obligatorisesti partenogeneettinen laji (Terhivuo & Saura 1990). Partenogeneettisyys helpottaa lisääntymiskokeiden toteuttamista, sillä yhteen koeastiaan voidaan laittaa vain yksi metsäliero. Näin saadaan selville kunkin yksilön tuottamien munakoteloiden määrä keskimääräisten tuottojen sijasta. Tämä helpottaa tulosten tilastollista käsittelyä.

4 Lierojen kylmänsietomekanismit

Lierot ovat levittäytyneet kaikkialle boreaaliselle vyöhykkeelle. Niitä tavataan jopa alueilla, joilla vallitsee ikirouta. Kylmänsietomekanismeilla on siis keskeinen osa niiden selviytymisessä. Lierot ovat semiterrestisiä eläimiä, sillä niillä on monia yhteisiä fysiologisia piirteitä makeanveden eliöiden kanssa. Esimerkiksi lierojen ruumiinnesteiden sulamislämpötila on korkea, $-0,4\text{ °C}$. Kesällä aktiivisilla terrestisillä niveljalkaisilla vastaava lämpötila on $-0,8\text{ °C}$ (Holmstrup & Zachariassen 1996).

Lierojen morfologiset ja fysiologiset keinot säädellä kutikulan lävitse kulkevaa vettä ovat hyvin rajalliset. Siksi ne voivat säilyä aktiivisina vain jos maaperässä on riittävästi vettä saatavilla. Kuivuuden yllättäessä ne kaivautuvat syvemmälle tai suotuisampiin mikrohabitaatteihin (Holmstrup & Zachariassen 1996). Osmoottisesta gradientista ja läpäisevästä kutikulasta johtuu, että liero absorboi vettä kosteasta ympäristöstään. Kuten makean veden eläimet, lierokin erittävät suuria määriä laimeaa (hypotonista) virtsaa ja käyttävät ener-

giaa ionien reabsorptioon estääkseen tärkeiden suolojen erittymisen virtsaan (Holmstrup & Zachariassen 1996).

Eliöt voidaan jakaa kylmänsietomekanismiensa mukaan kahteen pääryhmään. Niihin, jotka sietävät jäätymistä jossain määrin, ja niihin, jotka kuolevat, kun jääkiteitä muodostuu eläimen sisälle. Jäätymistä sietävät lajit pyrkivät suojautumaan mekanismein, jotka vähentävät jääkiteiden solurakennetta vahingoittavaa vaikutusta. Jäätymistä välttävät lajit sen sijaan pyrkivät välttämään jään muodostumista ruumiiseen käyttäytymisen tai ruumiinnesteiden alijäähtymisen avulla (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup & Zachariassen 1996, Willmer ym. 2000).

Useimmat hierolajit kuten *D. octaedra* ovat jäätymistä välttäviä lajeja. Aikuiset hierot selviävät kylmistä olosuhteista pääasiassa käyttäytymisen avulla eli kaivautumalla routarajan alapuolelle (Holmstrup & Zachariassen 1996).

4.1 Solun ulkopuolisten ruumiinnesteiden jäätymistä sietävät lajit

Jään muodostumisessa toimii jäätyamisen aloittavia tekijöitä, joiden ympärille vesimolekyylit tiivistyvät. Nämä tekijät voivat olla jääkiteitä, ruoka- tai mineraalipartikkeleita tai eliön tuottamia INA-yhdisteitä (Ice Nucleating Agents) (Holmstrup & Zachariassen 1996). Hyönteisillä INA:t ovat 75–800 kDa painoisia erittäin hydrofiilisiä proteiineja tai lipoproteiineja (Zachariassen & Lundheim 1995). Useimmat selkärangattomat, jotka kestävät jäätymistä, keräävät INA-yhdisteitä solun ulkopuolisiin ruumiinnesteisiinsä. Lisäksi ne tuottavat erilaisia jäätymiseltä suojaavia aineita (Holmstrup & Zachariassen 1996, Willmer ym. 2000).

Jäätyamisen aiheuttamat vauriot johtuvat jäätymistä kestäville lajeille jääkiteiden kasvusta liian suuriksi, jolloin ne vahingoittavat solurakenteita. Kun solun ulkopuoliset jäätyminen aloittavat tekijät puuttuvat (Ice Nucleating Agents, INAs), jäätyminen todennäköisesti alkaa solun sisällä tai suolistossa. Jään muodostumisen vuoksi solun sisäinen osmolaliteetti kasvaa, mikä johtaa veden sisään virtaukseen. Solu tai suolisto turpoaa ja lopulta vahingoittuu (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup & Zachariassen 1996).

Kun jää muodostuu solun ulkopuolelle, nousee osmolaliteetti siellä. Tämän seurauksena vesi virtaa soluista ja suolistosta niiden ulkopuolelle. Solut kutistuvat kunnes osmoottinen tasapaino vallitsee niiden sisä- ja ulkopuolen välillä. Tällöin kummassakaan tilassa nesteet eivät ole alijäähtyneitä. Jäätyminen indusoiminen solun ulkopuolelle INA-yhdisteiden avulla vähentää jäätyminen todennäköisyyttä solun sisällä. Elimistön suljetut osat, kuten solut, sietävät paremmin kutistumista kuin turpoamista, minkä vuoksi osmoottinen tasapaino voidaan saavuttaa ilman soluvaurioita (Zachariassen & Lundheim 1995,

Holmstrup & Zachariassen 1996).

Solujen kutistumisella on kriittinen piste, jolloin solu on kutistunut pienimpään mahdolliseen tilaan, joka ei vielä aiheuta vaurioita. Jos solu edelleen kutistuu, voi aiheutua soluvaurioita ja solun kalvojen fuusioitumista ja siten solun hajoaminen. Ongelmaksi voivat muodostua suolojen ja muiden haitallisten molekyylien korkeat konsentraatiot, jotka aiheuttavat makromolekyylien tuhoutumista rehydraatiossa (Holmstrup & Zachariassen 1996).

Solu sisäisiä, jäätymiseltä suojaavia aineita on kahdenlaisia. Kolligatiiviset eli määrällisesti vaikuttavat suoja-aineet esiintyvät suurina pitoisuuksina (0,2–2 M). Ne nostavat ruumiinnesteiden osmoottista konsentraatiota siten, että vain osa ruumiissa olevasta vedestä voi muuttua jääksi solujen ulkopuolella. Koska jäätyvän veden osuus pienenee, vähenee myös toksisten aineiden konsentraatio. Kolligatiiviset suoja-aineet ovat tavallisimmin polyoleja tai sokereita. Ne ovat suurissakin pitoisuuksissa eliöille vaarattomia ja metabolisesti reagoimattomia. Glyseroli(C₃) on yleisin tällainen aine, mutta myös sorbitolia (C₆) ja ribitolia (C₅) esiintyy. Jäätymiseltä suojaavat aineet voivat myös suojata solun kalvoja. Tällaisten aineiden pitoisuudet ovat tavallisesti alle 0,2 M. Ne korvaavat veden vähentyessä rakenteellisen veden ja siten estävät kalvojen fuusioitumista ja proteiinien denaturoitumista. Trehaloosi, proliini, sorbitoli ja mannitoli ovat yleisimpiä suoja-aineita. Myös aminohapoilla voi olla suojaava vaikutus. Suoja-aineet voivat esiintyä erilaisina kombinaatioina tai erikseen (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup & Zachariassen 1996, Willmer ym. 2000).

Glyserolilla on monia solua suojaavia vaikutuksia. Glyserolin kertyminen vähentää muodostuvan jään määrää alijäähtymislämpötilasta riippumatta ja siten estää haitallisen korkeiden suolapitoisuuksien muodostumista. Koska glyseroli pääsee helposti solukalvon lävitse, se voi kertyä solun ulkopuolelle ja näin vähentää solusta ulos virtaavan veden määrää. Näin glyseroli alentaa lämpötilaa, jossa kutistumisen kriittinen piste saavutetaan. Glyserolilla on myös proteiineja stabiloiva vaikutus, mutta erityisen hyvin proteiineja stabiloii trehaloosi (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup & Zachariassen 1996).

Siperialainen lierolaji *Eisenia nordenskioldi* on ainoa jäätymistä kestävä lierolaji. Muut lierolajit ovat ilmeisesti jäätymistä vältteleviä, mutta aihetta on tutkittu melko vähän (Holmstrup ym. 1999).

4.2 Ruumiinnesteiden alijäähtymiseen turvautuvat lajit

Jäätymistä välttävät lajit turvautuvat ruumiinnesteiden alijäähtymiseen. Alijäähtymisen avulla ne estävät vahingoittavien jääkiteiden syntyä. Veden jäätyminen riippuu lämpötilasta, ajasta, tilavuudesta ja läsnä olevista INA-yhdis-

teistä. Jos vedestä poistetaan kaikki INA:t voidaan se helposti alijäähdyttää $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tai jopa $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Willmer ym. 2000). Saavuttaakseen alijäähtyneen tilan eliöt poistavat INA- yhdisteitä. Lisäksi ne tuottavat polyoleja sekä THF-yhdisteitä (Thermal Hysteresis Factors). Tällä tavoin ne pyrkivät laskemaan sekä ruumiinnesteiden sulamispistettä että alijäähtymispistettä (lämpötila, jossa alijäähtynyt vesi jäätyy) (Zachariassen & Lundheim 1995).

Liuos, jolla on sama tilavuus ja osmolaliteetti kuin hyönteisten ruumiinnesteillä kesällä, jäätyy $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Nämä hyönteiset kuitenkin jäätyvät jo $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Tämä johtuu jäätymistä aloittavista tekijöistä, joita hyönteisissä on. Pelkääntään poistamalla näitä tekijöitä voi hyönteinen alentaa alijäähtymispistettään $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:een ilman ruumiinnesteiden osmolaliteetin muutosta (Zachariassen & Lundheim 1995).

Polyolien tuottaminen alkaa syksyllä. Hyönteisillä ruumiinnesteiden osmolaliteetin on mitattu nousevan jopa 3000–4000 milliosmooliin keskitalveen mennessä. Polyolien kerääntyminen johtaa alijäähtymispisteen sekä sulamispisteen laskuun. Alijäähtymispiste laskee kuitenkin yli kaksi kertaa niin paljon kuin sulamispiste. Näin hyönteiset voivat laskea alijäähtymispisteensä jopa $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Glyseroli on tärkein tuotetuista polyoleista. Glyserolia valmistetaan glykogeeneistä, ja kaikki glykogeenivarastot voidaankin käyttää polyolien valmistukseen. Hyönteiset käyttävät myös muita polyoleja: sorbitolia, mannitolia, etyleeniglykolia ja treiotolia (Zachariassen & Lundheim 1995).

Alijäähtynyt tila ei ole vakaa, vaan jäätyminen tapahtuu ennemmin tai myöhemmin spontaanisti. Hyönteiset pyrkivätkin stabiloimaan alijäähtynyttä tilaan erittämällä jäätymistä estäviä THF-yhdisteitä. THF:t ovat peptidejä tai glykopeptidejä, jotka alentavat ruumiinnesteiden sulamispistettä. Näiden yhdisteiden avulla sulamispistettä voidaan alentaa useita celsiusasteita. Nämä aineet eivät kuitenkaan alenna alijäähtymispistettä (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup & Zachariassen 1996).

D. octaedrana ja *D. rubidan* on havaittu selviävän hengissä jäätyneessä maassa, jonka lämpötila on $0\text{ }^{\circ}\text{C}$:sta $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Koska nämä lajit eivät kestä jäätymistä ja niiden ruumiinnesteiden sulamispiste on $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, täytyy niiden selvitä alijäähtyneessä tilassa (Holmstrup & Zachariassen 1996). Suurimman uhan aiheuttaa maaperässä oleva jäätynyt vesi; kun liero joutuu kosketuksiin jään kanssa se jäätyy nopeasti. Tätä kutsutaan inokultaiiviseksi jäätymiseksi. Lierojen lepokammiot, joissa ne tyhjentävät ruuansulatuskanavansa ja kääpetyvät kokoon, voivat vähentää inokultatiivisen jäätymisen riskiä. Lepokammioon tyhjennetty ruuansulatuskanavan sisältö voi edesauttaa alijäähtymistä, sillä ruokapartikkelit ja maa voivat toimia jäätymisen aloittavina tekijöinä. Näin jääkiteet muodostuvat lieron ulkopuolelle ja jääkiteiden muodostumisen todennäköisyys lieron sisällä pienenee (Holmstrup & Zachariassen 1996).

4.3 Kylmäaklimaatiossa solutason mekanismit

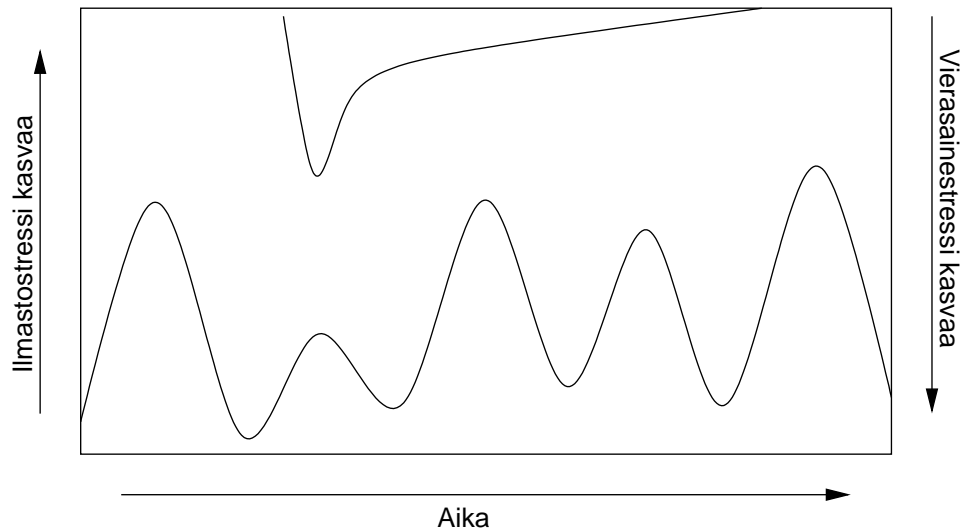
Kylmäaklimaatiossa vaikuttaa kaksi solutason mekanismia: homeoviskoosinen adaptaatio ja soluliman- ja kalvoproteiinien synteesin muutokset. Homeoviskoosiseksi adaptaatioksi kutsutaan ilmiötä, jossa solukalvoissa tapahtuu muutoksia lämpötilan muuttuessa. Lämpötilan laskiessa solukalvojen juoksevuus ensin vähenee, mutta eliön alkaessa tuottaa tyydyttymättömiä kalvolipidejä juoksevuus jälleen paranee. Lämpötila siis vaikuttaa solukalvojen juoksevuutta pienentävästi ja eläimen tuottamat tyydyttymättömät kalvolipidit juoksevuutta lisäävästi. Vastaavasti lämpötilan noustessa solukalvot ensin muuttuvat juoksevammiksi ja jälleen jäykemmiksi. Homeoviskoosinen adaptaatio perustuu rasvahappoihin ja steroleihin vaikuttavien entsyymien (saturaasit ja desaturaasit) synteesin muutoksiin. Homeoviskoosinen adaptaatio pyrkii pitämään solukalvojen juoksevuuden samanlaisena lämpötilan vaihdellessa (Lagerspetz 1995, Willmer ym. 2000).

Homeoviskoosisen adaptaation on todettu vaikuttavan ionien passiiviseen kulkeutumisen solukalvojen lävitse. Se saattaa myös vaikuttaa kalvoproteiinien, esimerkiksi kuljettajaproteiinien sekä ionikanavien ja reseptorimolekyylien, kykyyn muuttaa konformaatiotaan (Lagerspetz 1995).

Toinen solutason mekanismi on lämpötilan indusoima muutos soluliman ja solukalvon proteiinien syntetisoinnissa. Lämpötila vaikuttaa osittain kompensovasti tyypillisesti glykolyysissä, heksoosimonofosfaattikierrossa, sitruunahappokierrossa sekä elektronien siirrossa toimiviin entsyymeihin. Entsyymejä, joiden aktiivisuus laskee lämpötilan laskiessa ovat puolestaan peroksisomaaliset, lysosomaaliset ja typpiaineenvaihdunnan entsyymit. Entsyymit, jotka toimivat katabolian välituotteiden hajotuksessa vähenevät, kun lämpötila laskee. Kylmäaltistuksen jatkuessa näiden katabolian välituotteiden määrä yleensä laskee. Joissakin tapauksissa lämpötila-aklimaatiossa tiedetään vaikuttavan eri isoentsyymien suhteelliseen aktiivisuuteen ja synteesiin (Lagerspetz 1995). Eliö voi esimerkiksi kompensoida lämpötilan aiheuttamaa entsyymiaktiivisuuden vähenemistä lisäämällä entsyymien määrää (Willmer ym. 2000).

5 Kemikaali- ja kylmästressin yhdysvaikutukset

Sekä kemikaali-altistus että alhaiset lämpötilat aiheuttavat fysiologista stressiä. Stressoreiden välillä voi olla myös vuorovaikutuksia. Yksi stressoreiden välisten vuorovaikutusten muoto ovat synergiset yhdysvaikutukset. Esimerkiksi kemikaali-altistus voi heikentää niitä mekanismeja, joiden avulla eliö sietää alhaisia lämpötiloja tai alhainen lämpötila voi lisätä kemikaalin toksisuutta eliölle.



Kuva 2: Kemikaalstressin ja ilmastostressin aiheuttama ekologinen pullonkaula. Ylempi käyrä kuvaa yksittäistä kemikaalialtistusta. Alempi käyrä taas vuosittain toistuvaa ilmastosta aiheuttamaa stressiä, joka johtuu esimerkiksi kuivuudesta tai lämpötilan vaihtelusta (Holmstrup ym. 2000).

Yhdysvaikutusten tutkimisessa käytetään yleensä summamallia (Bauer & Römbke 1997, Holmstrup ym. 2000). Tällöin oletetaan, että jos yhdysvaikutusta ei esiinny, eri tekijöiden vaikutus tukittavaan vastemuuttujaan summautuu. Tällöin stressoreiden vaikutus yhdessä on yhtä suuri kuin, jos laskettaisiin yhteen stressoreiden vaikutukset niiden esiintyessä erikseen. Varianssianalyysiä käytetään havaitsemaan tällaisia yhdysvaikutuksia. Varianssianalyysin avulla saadaan selville kunkin stressorin vaikutus yksinään eli päävaikutukset sekä yhdysvaikutustermi, joka kuvaa poikkeamaa summamallista. Jos yhdysvaikutus on synerginen, on stressoreiden vaikutus yhdessä selkeästi suurempi kuin niiden yksittäisten vaikutusten summa (Zar 1996).

Eliö voi tietyssä ympäristössä sietää vain tietyn määrän stressiä. Maaperäeliöillä luonnollista stressiä aiheuttavat esimerkiksi alhainen lämpötila talvella ja kuivuus kesällä. Nämä vuotuisesti toistuvat stressorit sekä vierasaineiden mahdollisesti aiheuttama stressi yhdessä voivat aiheuttaa ekologisen pullonkaulan, joka voi rajusti vähentää populaation kokoa (kuva 2). Synergiset vaikutukset lisäävät pullonkaulan muodostumisen todennäköisyyttä (Holmstrup ym. 2000).

Kylmä- ja kemikaalialtistuksen oletetaan usein aiheuttavan synergisiä yhdysvaikutuksia. Näiden synergististen yhdysvaikutusten oletetaan monissa tapauksissa vaikuttavan merkittävästi populaation elinkelpoisuuteen luonnossa.

Sekä synergisten vaikutusten yleisyyttä että näiden vaikutusten merkitystä populaatioiden elinkelpoisuuteen on kuitenkin tutkittu melko vähän (Zachariassen & Lundheim 1995, Holmstrup ym. 2000).

5.1 Lämpötilan vaikutus vierasaineiden ympäristökohtaloon

Vierasaineen ympäristökohtalo riippuu lämpötilasta, sillä alhaisessa lämpötilassa vierasaineen biohajoaminen on hitaampaa. Tämä pidentää altistusaikaa. Keväällä tai kesällä eliön habitaattiin joutuessaan vierasaine hajoaa nopeasti ja sen vaikutukset kestää vähemmän aikaa kuin syksyllä habitaattiin joutuvan vierasaineen. Kun vierasaine alhaisemman lämpötilan vuoksi hajoaa hitaammin, eliöt ovat alttiina vierasaineelle kauemmin. Tästä syystä vaikutukset voivat kylmänä vuodenaikana olla suurempia kuin lämpimänä (Holmstrup ym. 2000).

Aineen ympäristökohtaloa voidaan ennustaa vesi-oktanolin -jakosuhteen (K_{ow}) avulla. K_{ow} avulla voidaan päätellä, miten vierasaine jakaantuu eri kompartmentteihin kuten maaperään, veteen ja eliöön. K_{ow} saadaan, kun tutkittavan aineen pitoisuus sekä n-oktanolissa ja vedessä määritetään. Lindaania rakenteellisesti lähellä olevan heksaklooribentseenin oktanolivesi-jakosuhteen on todettu muuttuvan lämpötilan mukaan. Esimerkiksi lämpötilassa 25 °C $\log K_{ow}$ heksaklooribentseenille on $5,46 \pm 0,02$ ja lämpötilassa 5 °C $5,74 \pm 0,04$ (Bahadur ym. 1997). Kylmemmissä lämpötiloissa suurempi osuus heksaklooribentseenistä on siis oktanolijakeessa. Muutos on pieni, mutta tarkoittaa sitä, että kylmemmissä heksaklooribentseeni on rasvaliukoisempaa (Opperhuizen ym. 1988, Bahadur ym. 1997).

5.2 Lämpötilan ja vierasaineen yhdysvaikutukset eliössä

Lämpötila vaikuttaa siihen, miten nopeasti aine kulkeutuu elimistöön ja toisaalta eritetään pois sieltä. Vierasaineen kertyminen eliöön voi riippua lämpötilasta. Lämpötilan nousu nopeuttaa yleensä sekä aineiden ottoa elimistöön että niiden metaboliaa ja erityistä. Lämpötilan nousu voi joko pienentää tai suurentaa vierasaineen pitoisuutta eliössä. Lopputulos riippuu siitä lisääkö lämpötilannousu kummankin prosessin nopeutta yhtä paljon vain nopeutuuko toinen enemmän. Sama pätee myös lämpötilan laskiessa (Holmstrup ym. 2000).

Alhainen lämpötila voi vaikuttaa eliön kykyyn tuottaa ja akkumuloida suojaavia yhdisteitä. Vierasaineen detoksikaatio kuluttaa suoja-aineiden synteesissä tärkeää glykogeenivarastoa. Toisaalta vierasaine voi vaikuttaa glykogeenin hajotuksessa toimiviin entsyymeihin ja siten estää suoja-aineiden synteesiä (Holmstrup ym. 2000).

Jäätymistä välttäville lieroille inokulatiivinen jäätyminen on suuri riski. Ne jäätyvät, jos joutuvat kosketuksiin maaperässä olevan jään kanssa. Jos vierasaineella on veden pintajännitystä alentava vaikutus, kuten joillakin pestisideillä ja jätevesilietteellä, voi riski inokulatiiviseen jäätymiseen kasvaa. Lieroilla alhaiset lämpötilat aiheuttavat eläimen kuivumista, mikä lisää hypo-osmoottisen shokin riskiä. Hypo-osmoottinen shokki aiheutuu jään sulaessa, kun vettä taas on runsaasti saatavilla. Solut voivat tällöin turvota tai jopa hajota. Vierasaineet voivat pahentaa hypo-osmoottisen shokin vaikutuksia (Holmstrup ym. 2000).

Kylmäsietomekanismit voivat voimistaa vierasaineen vaikutusta. Raskasmetallit voivat sitoutua jäätymistä estävien peptidien ja INA:n hydrofilisiin ja negatiivisesti varautuneisiin ryhmiin, jotka ovat toiminnallisesti tärkeitä. Tämä vähentää INA:n kykyä järjestää vesimolekyylejä jään kaltaiseen muotoon ja näin vähentää niiden tehoa muodostaa jääkiteitä solun ulkopuolelle. Samanlaisia negatiivisia toiminnallisissa ryhmiä on THF:llä ja glykopeptideillä, joiden toiminta voi myös estyä (Zachariassen & Lundheim 1995).

Toksiset aineet voivat inhiboida entsyymejä ja niiden synteesiä. Toksinen aine voi vähentää tai estää jäätymiseltä estävien proteiinien tuottamista. Proteiinisynteesiin vaikuttava vierasaine voi myös vaikuttaa sellaisten entsyymien synteesiin, jotka toimivat jäätymiseltä estävien aineiden, kuten polyolien ja sokereiden synteesissä. Kokeellista tietoa tästä ei ole olemassa (Zachariassen & Lundheim 1995). Lämpötila ja lämpötila-aklimoituminen voivat vaikuttaa tiettyjen detoksikaatioissa toimivien proteiinien synteesiin ja toimintaan. Näitä proteiineja ovat ”mixed-function” oksygenaasit, metallotionit ja stressiproteiinit, kuten lämpöshokkiproteiinit (Lagerspetz 1995).

Lämpötila, lämpötila-aklimaatio ja vierasaineet vaikuttavat solun kalvoihin. Solun kalvorakenteet ovat potentiaalinen kohde, jossa vierasaineiden ja alhaisen lämpötilan yhteisvaikutus voidaan havaita. Vierasaineet vaikuttavat kylmänkestävyyteen muuttamalla solun kalvojen stabiilisuutta ja läpäisevyyttä. Kalvojen kyky läpäistä esimerkiksi Na^+ ja K^+ ioneja voi muuttua (Lagerspetz 1995).

Vierasaineet voivat myös estää kylmäsietomekanismien toimintaa. Lisäksi ekotoksisista vaikutuksista palautuminen voi olla hidasta tai jopa mahdotonta alhaisissa lämpötiloissa. Tämä johtuu kylmäsietomekanismien aiheuttamista metabolisista kustannuksista, joiden lisäksi resursseja ei riitä ekotoksisista vaikutuksista toipumiseen (Lagerspetz 1995).

6 Aineisto ja menetelmät

6.1 Koe-eläimet

Kokeessa käytetyt metsälierot kerättiin kesän 2001 aikana kahdelta Jyväskylässä sijaitsevalta metsäalueelta. Ennen kokeen alkua lieroja säilytettiin metsästä kerätyssä karikkeessa, 20 °C:ssa ja pimeässä. Lierot olivat sukukypsiä eli niillä oli selvästi erottuva clitellum. Viikko ennen kokeen alkua lieroja siirrettiin puhtaaseen multa, joka oli samanlaista kuin kokeessa käytetty. Ennen koeastioihin siirtoa lieroja varovaisesti huuhdeltiin vesijohtovedellä ja kuivatettiin nopeasti paperipyyhkeeseen, jotta multa ei siirtynyt niiden mukana. Koetta ennen ja sen aikana metsälieroja ruokittiin lehmänlannalla, joka oli kuumentettu (60 °C yön yli) sekä hienonnettu siten, että lieroja pystyivät hyvin käyttämään sitä ravinnoksi. Lieroja ruokittiin lämpötilan ollessa yli 1 °C kerran viikossa lisäämällä kuhunkin koeastiaan mullan päälle n. kaksi gramma lantaa. Koska lanta oli kuivaa, lisättiin myös 1-2 pisaraa tislattua vettä lannan päälle. Lantaa lisättiin kaikkiin astioihin saman verran riippumatta siitä paljonko edellisestä annoksesta oli syöty, näin ravintoa oli jatkuvasti saatavilla.

6.2 Kokeissa käytetty maa

Toksisuus- ja lisääntymiskokeissa käytetty multa oli peräisin lähellä Jyväskylää sijaitsevalta pellolta, jota on viljelty ilman torjunta-aineita useita vuosia. Martikainen & Krogh (1999) ovat käyttäneet tutkimuksessaan samasta pellostosta peräisin olevaa multa, jolloin myös mullan koostumus on selvitetty. Maan orgaanisen aineksen pitoisuus oli 8,6% (Martikainen & Krogh 1999). Mullan rakennetta homogenisoitiin seulomalla se 2 mm:n seulan läpi. Seulotua multa kuumentettiin yön yli 60 °C:ssa, jotta siinä olevat eliöt kuolisivat. Käsitelty multa säilytettiin lasipurkeissa huoneen lämpötilassa. Mullan kuiva-ainepitoisuus määritettiin ennen kokeen alkua (105 °C, 12 h).

Kokeessa käytetty maa kontaminoitiin lindaanilla ISO 11268-1 -standardin mukaisesti. Eri pitoisuudet lindaania lisättiin multa aloittaen pienimmästä pitoisuudesta eli 0 mg/kg. Heksaaniin liuotettu lindaani sekoitettiin lasiastiassa 2,5 kg multa (kuiva-ainepitoisuus 98,2%). Tislattua vettä lisättiin siten, että kuiva-ainepitoisuudeksi tuli 74%. Kuhunkin noin yhden desilitran suuruiseen muoviastiaan laitettiin kuiva-aineena laskettuna noin 30 g multa. Astiat jätettiin avonaisina vetokaappiin yli 12 tunniksi, jotta heksaani haihtui pois. Astioihin lisättiin painonvähennyksen verran tislattua vettä, jonka jälkeen kuhunkin astiaan laitettiin yksi metsäliero, ja astia suljettiin kannella. Muovisiin kansiin oli tehty ilmanvaihtoa varten reiät, joihin oli laitettu pumpulia estämään lierojen karkaaminen koeastiasta. Kokeessa käytetyllä lyhyellä kontaktiajalla pyrittiin mallintamaan tilannetta, jossa vierasainetta joutuu luontoon juuri ennen pakkasten alkamista, mikä mahdollisesti lisää vierasaineen vaikutuksia.

Taulukko 1: Käytetyt konsentraatio-lämpötilayhdistelmät sekä kussakin käsittelyssä olleiden lierojen määrä (kpl). Heksaanikontrolliin (h_0) lisättiin saman verran puhdasta heksaania kuin mihin lindaani muissa pitoisuuksissa oli liuotettu.

Lämpötila (°C)	Konsentraatio (mg/kg)					
	0_h	0	5	10	20	40
1	15	15	15	15	15	15
-1	15	15	15	15	15	15
-3	15	15	15	15	15	15
-5	15	15	15	15	15	15

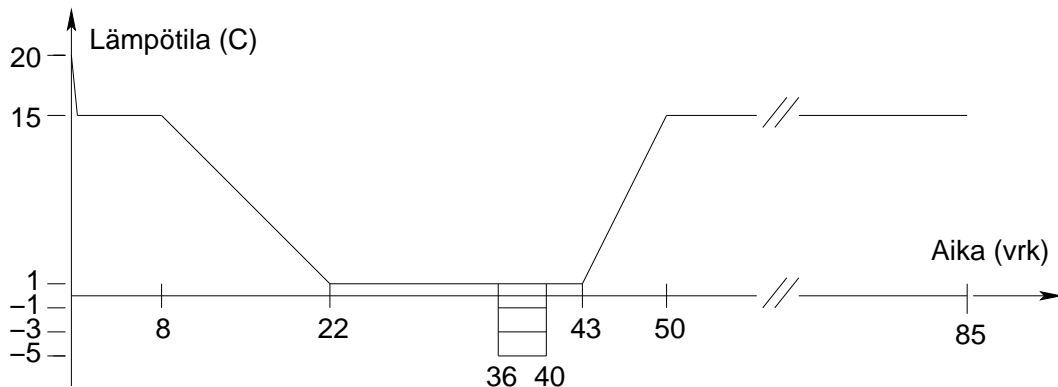
Kokeen alussa ja lopussa kaikista käsittelyistä mitattiin pH. Tällä varmistettiin, etteivät mahdolliset pH:n muutokset vaikuttaneet tuloksiin.

6.3 Koepitoisuudet ja -lämpötilat

Kokeessa käytetty puhdas γ -HCH saatiin Jyväskylän yliopiston kemian laitokselta. γ -HCH liuotettiin ennen multaan lisäämistä pieneen määrään heksaania, sillä lindaani ei liukene veteen (Nikunen 1991). Heksaania oli kussakin käsittelyssä sama määrä, lukuun ottamatta kontrollia, jossa ei ollut lainakaan heksaania. Käytetyt pitoisuudet valittiin esikokeiden perusteella siten, että ne noudattivat likimain geometristä sarjaa. Käytetyt lindaanipitoisuudet olivat 0, 5, 10, 20, 40 mg/kg (kuivapaino).

Lämpötilat valittiin esikokeiden sekä M. Holmstrupilta (The National Environmental Research Institute, Tanska) saatujen tietojen perusteella. Käsittelylämpötiloja oli kolme: -1, -3 ja -5 °C. Kasvatuskaappien lämpötiloja tarkkailtiin kokeen aikana ja ne vaihtelivat korkeintaan $\pm 0,5^\circ\text{C}$ asetetusta lämpötilasta. Kontrollilämpötilana käytettiin 1 °C:a. Jokaisessa lämpötilassa oli kussakin lindaanipitoisuudessa 15 koetta, 15 kontrollikoetta ja 15 heksaanikontrollikoetta. Kussakin kokeessa oli yksi liero (taulukko 1).

Viikkoa ennen kokeen alkua lämpötila laskettiin 20 °C:sta 15 °C:een. Kokeen alettua lämpötilaa laskettiin 14 vuorokauden aikana 15 °C:sta 1 °C:een. Tämän jälkeen lämpötila pidettiin 14 vuorokauden ajan 1 °C:ssa. Koeastiat siirrettiin suoraan altistuslämpötiloihin neljäksi vuorokaudeksi. Kylmäaltistuksen päätyttyä koeastiat siirrettiin sulamaan kolmen vuorokauden ajaksi 1 °C:een (kuva 3).



Kuva 3: Koetta ennen ja sen aikana tehdyt lämpötilan muutokset. Lindaanialtistus alkoi 8:nä vuorokautena, jolloin lierot siirrettiin koeastioihin. Kylmäaltistus alkoi kokeen 36:nä vuorokaudesta, jolloin lierot siirrettiin kylmäaltistustiloihin. Kylmäaltistuksen jälkeen koeastiat siirrettiin kolmeksi vuorokaudeksi sulamaan 1 °C:n, minkä jälkeen eloon jääneet lierot punnittiin ja siirrettiin puhtaaseen multa. Lisäntymiskoe kylmäaltistuksesta eloon jääneillä yksilöillä aloitettiin 50:nä vuorokautena. Kokeen kokonaiskesto oli 85 vuorokautta.

6.4 Painonmuutosten mittaaminen

Lierojen alkupaino punnittiin ennen koeastioihin laittoa. Kylmäkäsittelyn päätyttyä, kun kokeen alkamisesta oli kulunut 35 vuorokautta, lierot eroteltiin käsin mullasta ja elävät yksilöt punnittiin. Elävinä pidettiin yksilöitä, jotka liikkuivat tai reagoivat kosketukseen käsiteltäessä. Tämä punnitustulos on ns. välipaino. Myös lisäntymiskokeen jälkeen elävät yksilöt punnittiin. Tästä punnitustuloksesta on käytetty nimitystä loppupaino.

Painonmuutokset (pm) laskettiin välipaino (vp) jaettuna alkupainolla (ap) ($pm = vp/ap$), sillä tämä lisäsi tulosten normaaliutta verrattuna alku- ja välipainon erotukseen. Samalla saatiin painonmuutos muotoon, jossa se vähenee monotonisesti konsentraation kasvaessa. Käytetyn lineaarisen interpolointi ohjelma edellyttää tiedon syöttämistä tällaisessa muodossa (Nordberg-King 1993). Painonmuutokset (pm) on esitetty siten, että kun $pm < 1$ liero on kasvanut, kun $pm = 1$ paino on pysynyt samana ja kun $pm > 1$ paino on vähentynyt.

6.5 Lisäntymiskyvyn mittaaminen

Lisäntymiskykyä tutkittiin siirtämällä kukin elossa selvinnyt yksilö uuteen koeastiaan, jossa oli puhdasta multaa kuivapainona noin 30 g. Lisäntymistestiä varten lämpötila nostettiin seitsemän vuorokauden aikana takaisin 15 °C:een, joka on metsälieroille suotuisa lisäntymislämpötila.

Lisääntymiskoe kesti viisi viikkoa (35 vrk). Kunkin yksilön tuottamien munakoteloiden määrä laskettiin kokeen loputtua seulomalla maa veden kanssa yhden millimetrin seulan lävitse eli ns. märkäseulontamenetelmällä.

6.6 Tilastollinen käsittely

Varianssianalyysin avulla verrattiin kylmä- ja kemikaalialtistuksen vaikutuksia kasvuun ja lisääntymiseen sekä selvitettiin stressoreiden välillä mahdollisesti esiintyviä yhdysvaikutuksia.

Aineistosta laskettiin annosvastesuhdetta kuvaavia tunnuslukuja eri lämpötiloissa painonmuutosten ja munakoteloiden tuoton perusteella (EC, Effective concentration). Laskemisessa käytettiin lineaarista interpolointiohjelmaa (ICp) (Nordberg-King 1993). Kaikki muut tilastolliset analyysit tehtiin käyttäen R 1.4.1 -tilasto-ohjelmaa (Ihaka & Gentleman 1996).

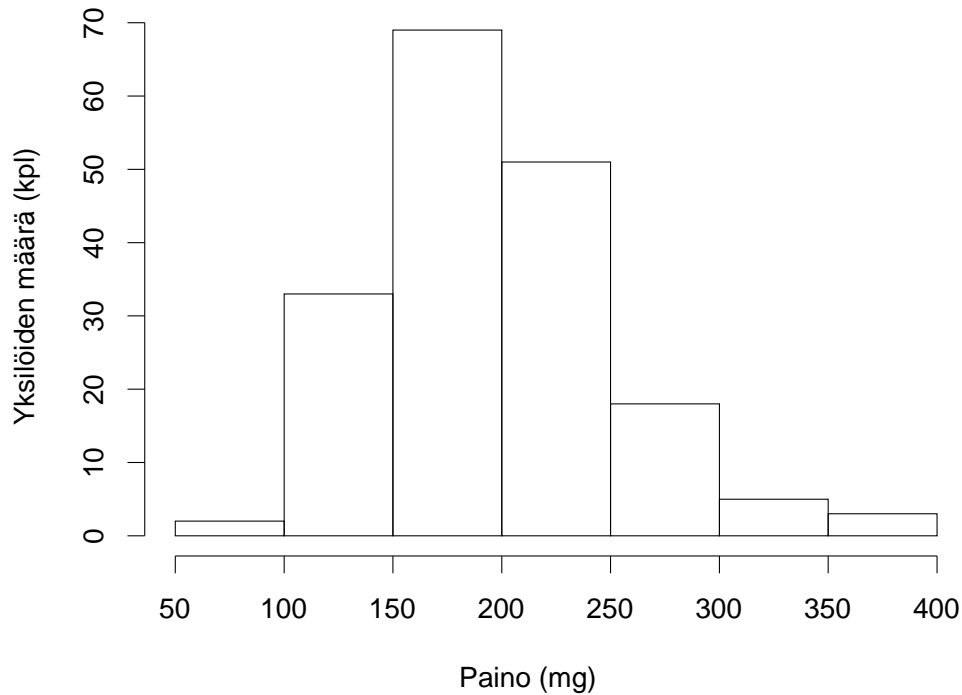
7 Tulokset

7.1 Kuolleisuus

Kokeen aikana kaikki lierot lämpötiloissa -3 °C ja -5 °C kuolivat, minkä vuoksi nämä lämpötilat jätettiin tarkastelun ulkopuolelle. Myös lämpötiloissa 1 °C ja -1 °C esiintyi kuolleisuutta. Kuoltuaan lierot hajoavat nopeasti, minkä vuoksi kylmäaltistuksen jälkeen punnittiin vain elossa olevat yksilöt. Kuolleisuudesta johtuen saman käsittelyn saaneiden lierojen määrä vaihteli. Kussakin käsittelyssä olleiden yksilöiden määrät ilmenevät taulukosta 2. Kontrollikäsitelyssä (0 mg/kg lindaania, 1 °C) kuoli neljä lieroa 15:sta, mikä oli yhtä paljon kuin käsittelyssä, jossa oli alhaisin lämpötila ja korkein lindaanipitoisuus (40 mg/kg , -1 °C).

Taulukko 2: Elävien yksilöiden määrä 15:sta kussakin käsittelyssä olleista metsälieroista. Kussakin käsittelyssä lieroja altistettiin lindaanille 35 vrk, joista alhaisille lämpötiloille 4 vuorokautta (kuva 3). Heksaanikontrollissa (0_h) on käytetty heksaania, mutta ei lindaania.

Lämpötila (°C)	Lindaanipitoisuus (mg/kg)					
	0_h	0	5	10	20	40
1	15	11	14	14	13	13
-1	13	13	12	14	14	11
-3	0	0	0	0	0	0
-5	0	0	0	0	0	0



Kuva 4: Kylmä- ja lindaanialtistuksessa käytettyjen metsälierojen alkupainot 50g tarkkuudella esitettynä.

7.2 Lierojen alkupainot ja niiden vaikutus lisääntymiskokeeseen

Lierojen alkupainot olivat välillä 92-363 mg (kuva 4). Kaikkien kokeessa käytettyjen lierojen ($n=300$) alkupainojen keskiarvo oli 197. Lämpötiloissa $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuolleiden lierojen ($n=24$) alkupainot vaihtelivat välillä 115-220 mg, keskipainon ollessa 169 mg.

Lierojen alkupainon ei yhtä käsittelyä lukuun ottamatta havaittu vaikuttavan tuotettujen munakoteloiden määrään. Taulukossa 3 on esitetty kunkin lämpötila-pitoisuus -yhdistelmän sisällä alkupainon ja munakoteloiden lukumäärän korrelaatiokertoimet (r), 95% luotettavuusrajat sekä p -arvo. Käsitelystä, jossa lindaanipitoisuus oli 10 mg/kg ja $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ havaittiin alkupainon ja munakoteloiden välillä tilastollisesti merkitsevä korrelaatio ($P < 0,05$).

7.3 Kontrolli ja heksaanikontrolli

Heksaanikontrollia ja kontrollia verrattiin toisiinsa kummassakin lämpötilassa painonmuutosten ja munakoteloiden tuoton perusteella. Parittaisissa vertailuissa havaittiin lämpötilassa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ tilastollisesti merkitsevä ero ($P < 0,05$), kun käytetty vastemuuttuja oli painonmuutos (taulukko 4). Painonmuutos lämpötilassa $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ oli heksaanikontrollissa keskimäärin 34% ja kontrollissa 32%

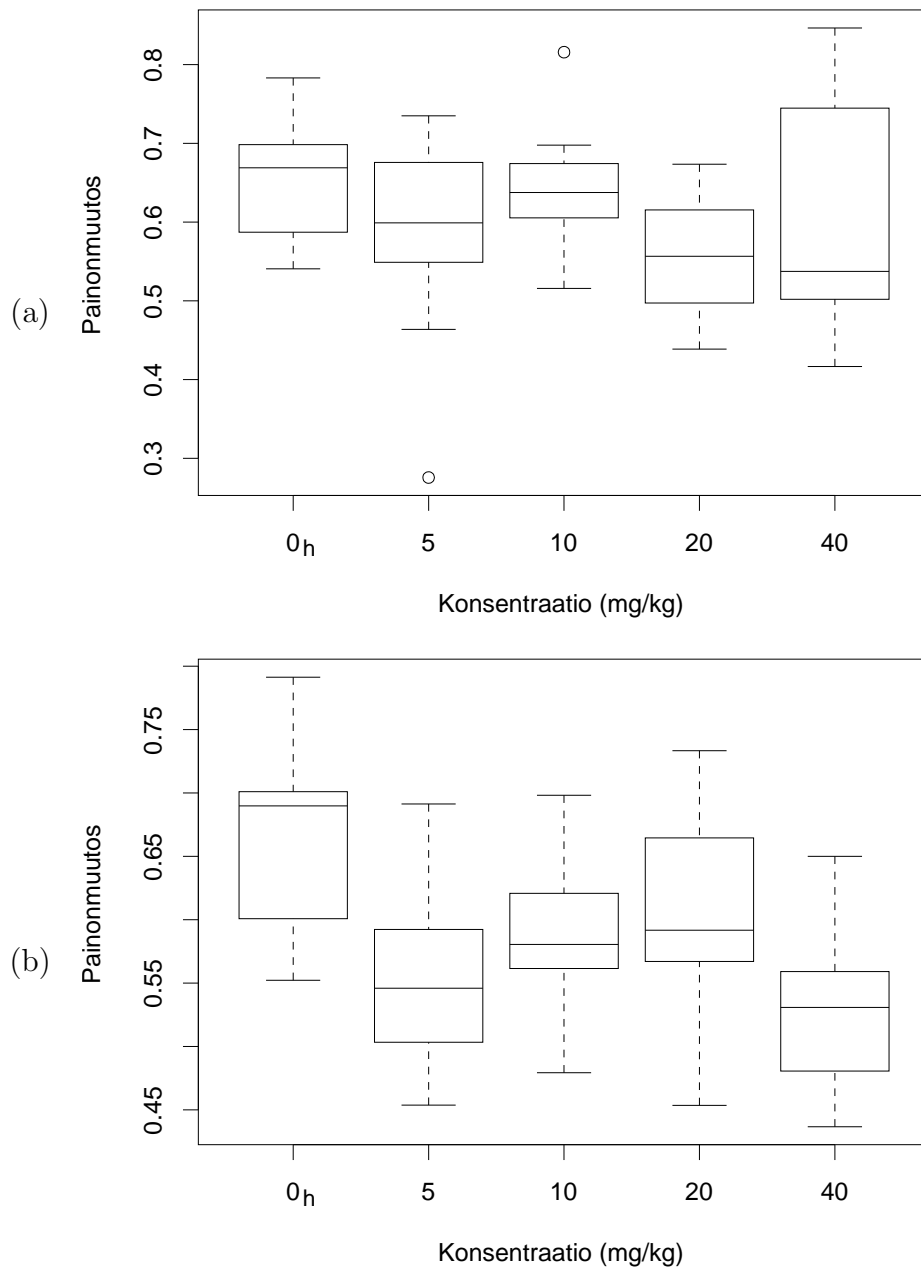
Taulukko 3: Lierojen alkupainojen ja 35 vuorokauden aikana tuottamien munakoteloiden määrästä kussakin käsittelyssä lasketut (Pearson) korrelaatiokertoimet (r), niitä vastaavat p-arvot sekä 95% luotettavuusrajat. Vain yhdessä käsittelyssä alkupainojen ja munakoteloiden tuoton välillä on tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$) korrelaatio siten, että alkupainoltaan suuremaat yksilöt olivat tuotaneet enemmän munakoteloita. Heksaanikontrollia on merkitty 0_h .

Lämpötila (°C)	Lindaanipitoisuus (mg/kg)	r	p-arvo	Luotettavuusrajat
1	0_h	0,0823	0,771	-0,4489 0,5704
	0	-0,0838	0,767	-0,5715 0,4477
	5	-0,2513	0,431	-0,7212 0,3769
	10	-0,5379	0,039	-0,8233 -0,0354
	20	0,1752	0,549	-0,3918 0,6458
	40	0,1061	0,756	-0,5273 0,6637
-1	0_h	0,5147	0,087	-0,0840 0,84039
	0	-0,1873	0,540	-0,6692 0,4056
	5	-0,1289	0,690	-0,6544 0,4805
	10	-0,280	0,3127	-0,6927 0,2715
	20	-0,053	0,8574	-0,5676 0,4915
	40	-0,004	0,99	-0,6026 0,5971

($P > 0,05$). Lämpötilassa -1 °C oli heksaanikontrollissa keskimäärin 34% ja kontrollissa 25% ($P < 0,012$). Laskettaessa EC-arvoja käytettiin kontrollien sijasta heksaanikontrolleja. Syitä oli useita. Lämpötilassa -1 °C havaittiin painonmuutoksen perusteella heksaanin vaikuttavan koetuloksiin. Jotta heksaanin vaikutus ei tulisi näkyviin lasketuissa EC-arvoissa päädyttiin tässä lämpötilassa käyttämään heksaanikontrolleista saatuja tuloksia. Lämpötilassa 1 °C kontrollipitoisuudessa (0mg/kg) kuolleisuus oli 4/15. Tässä lämpötilassa kontrollin ja heksaanikontrollin välillä ei havaittu merkitsevää eroa. Koska, kuolleisuus kontrollissa oli suurta, käytettiin kuitenkin tässäkin lämpötilassa heksaanikontrollia EC-arvojen laskemiseen.

7.4 Painonmuutokset

Lierojen painonmuutokset elossa selvinneillä yksilöillä vaihtelivat samankin käsittelyn sisällä suuresti. Erityisen suurta yksilöiden välinen vaihtelu oli lämpötilassa 1 °C pitoisuudessa 40 mg(lindaania)/kg (kuva 5). Punnitustulosten pe-



Kuva 5: Kylmä- ja lindaanialtistuksesta hengissä selvinneet lierot punnittiin ja punnitustulos jaettiin alkupainolla. Mitä enemmän paino on vähentynyt sitä pienemmän lukuarvon painonmuutos saa. Kuvaaajassa on esitetty ylhäältä alaspäin: pienin havaittu painonmuutos, alakvartiili, mediaani, yläkvartiili ja suurin havaittu painonmuutos. Kuvien kontrolli on heksaanikontrolli (0_h). a) Lämpötilassa 1 °C (n=69) b) Lämpötilassa -1 °C (n=64).

Taulukko 4: Kun vastemuuttujana käytettiin painonmuutosta, heksaanikontrollin ja kontrollin välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ($P < 0,05$, Mann-Whitney) yhdessä käsittelyssä. Tässä käsittelyssä painonmuutos heksaanikontrollissa oli suurempi kuin kontrollissa. Munakoteloiden tuoton perusteella vastaavaa eroa ei havaittu.

Vastemuuttuja	lämpötila (°C)	p-arvo
Painonmuutos	1	0.486
	-1	0.012
Lisääntyminen	1	0.164
	-1	0.433

rusteella laskettiin painonmuutosten EC-arvoja. Koska lindaanin pitoisuudet olivat pieniä, pystyttiin interpolointimenetelmällä laskemaan EC-tunnuslukuja vain EC₂₅:een saakka. Interpolointimenetelmällä saadut EC-tunnusluvut sekä niihin liittyvät 95% luotettavuusrajat, keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty taulukossa 5.

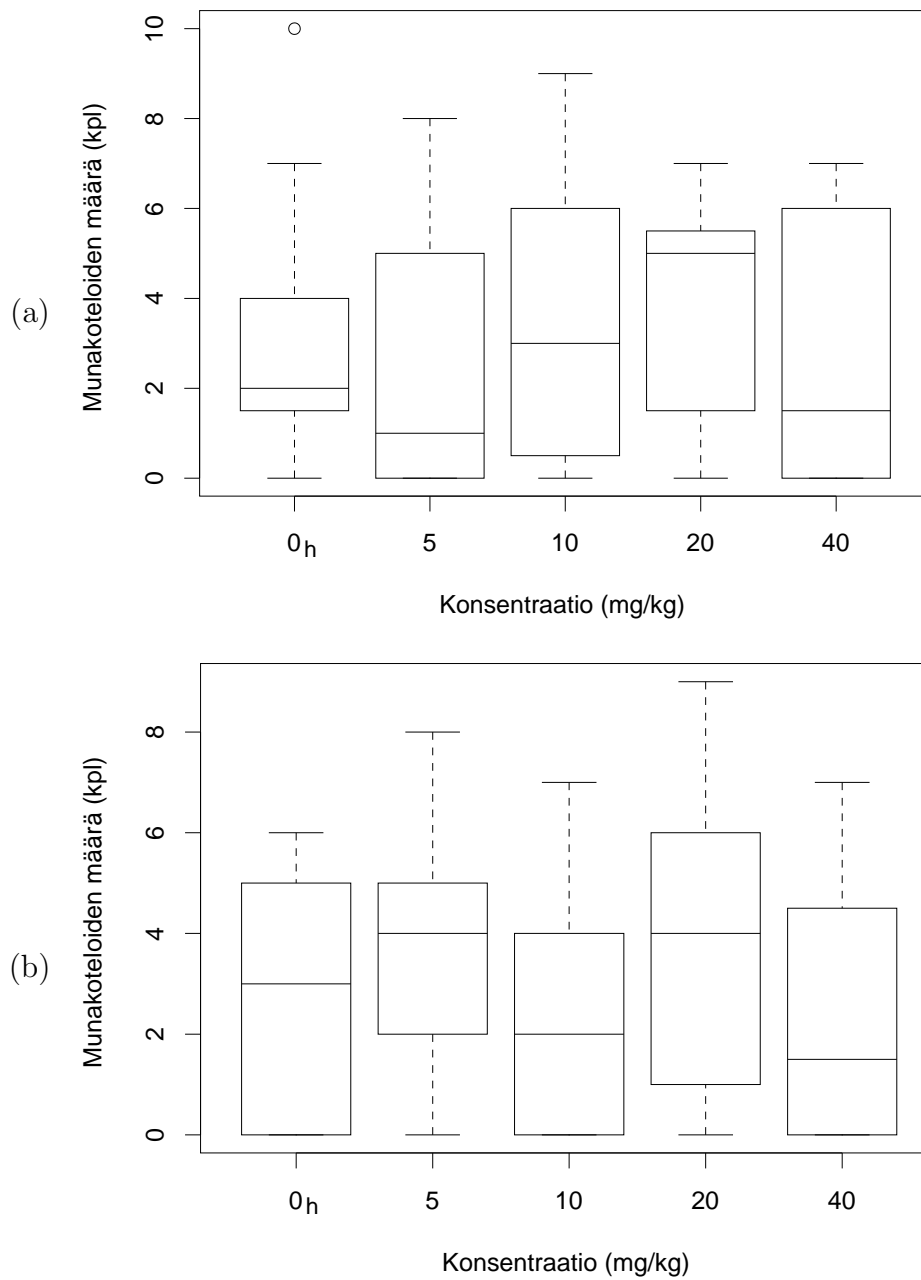
7.5 Lisääntyminen

Tuotettujen munakoteloiden määrät eri konsentraatioissa, kummassakin käsittely lämpötilassa, on esitetty kuvassa 6. Suuren hajonnan vuoksi käsittelyjen välillä ei havaittu eroja.

Munakoteloiden tuoton perusteella laskettiin EC-arvot, mutta 95% luotettavuusrajoja ei voitu laskea tulosten suuren hajonnan vuoksi (Taulukko 6). Lisääntymiskykyensä säilyttäneinä hieroina pidettiin sellaisia yksilöitä, jotka olivat tuottaneet vähintään yhden munakotelon lisääntymiskokeen aikana. Taulukossa 7 on esitetty lisääntymiskykyisten yksilöiden osuus kussakin käsittelyssä (lisääntymiskykyiset/kaikki käsittelyssä olleet).

7.6 Yhdysvaikutukset

Painonmuutosten ja munakoteloiden tuoton perusteella tehdyissä varianssianalyysissä ei havaittu lindaani- ja kylmäaltistuksen yhdysvaikutusta. Tilastollisesti merkitsevä vaikutus oli painonmuutoksen perusteella ainoastaan lindaanikäsittelyllä (taulukko 8). Kun varianssianalyysi tehtiin munakoteloiden tuoton perusteella, ei millään käsittelyllä havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta (taulukko 9).



Kuva 6: Munakoteloiden tuotto lisääntymiskokeen (35vrk) aikana (3). Lisääntymiskoe suoritettiin lindaani- ja kylmäaltistuksen jälkeen, joksi ajaksi lierot siirrettiin puhtaaseen multa 15 °C:een ja niitä ruokittiin. Kuvissa on ilmoitettu suurin ja pienin munakoteloiden tuotto yksilöä kohti kussakin käsittelyssä sekä yläkvartiili, mediaani ja alakvartiili. Kontrolli on heksaanikontrolli (0_h) a) Lämpötilassa 1 °C (n=69) b) Lämpötilassa -1 °C (n=64) .

Taulukko 5: Painonmuutoksen perusteella lasketut EC- (Effective Concentration) estimaatit. Laskemisessa käytettiin lineaarista interpolointimenetelmää (Nordberg-King 1993). Sarakkeessa x on ilmoitettu prosentteina se osuus koe-eläimistä, joihin laskettu EC-arvo vaikuttaisi. Lisäksi EC-estimaatille on ilmoitettu luottamusväli, keskiarvo ja keskihajonta.

Lämpötila °C	x	EC _x	Luottamusväli (95%)	Keskiarvo	Keskihajonta
1	1	0,71	0,38 10,23	1,52	2,28
1	5	3,56	–	5,30	4,30
1	10	15,01	–	12,74	5,10
–1	1	0,43	0,29 1,59	0,55	0,34
–1	5	2,17	1,58 8,88	2,89	3,40
–1	10	4,34	2,94 32,67	9,34	9,70
–1	15	27,95	–	25,14	8,80
–1	20	39,37	–	34,18	4,08

Taulukko 6: Lisääntymiskokeessa kussakin käsittelyssä tuotettujen munakoteloitten perusteella lasketut EC- (Effective Concentration) estimaatit. Laskemisessa käytettiin lineaarista interpolointimenetelmää (Nordberg-King 1993). Sarakkeessa x on ilmoitettu prosentteina se osuus koe-eläimistä, joihin laskettu EC-arvo vaikuttaisi. Lisäksi EC-estimaatille on ilmoitettu keskihajonta ja keskiarvo. Lisääntymiskokeen perusteella ei EC-estimaateille pystytty antamaan luottamusväliä.

Lämpötila °C	x	EC _x	Keskiarvo	Keskihajonta
1	1	1,17	4,99	7,89
–1	1	5,79	7,98	6,95
–1	5	8,93	10,63	8,49
–1	10	23,37	16,18	10,14
–1	15	28,01	19,17	10,33
–1	20	32,64	21,14	10,19
–1	25	37,28	25,10	10,54

Taulukko 7: Lisääntymiskykyisten yksilöiden määrä kussakin käsittelyssä olleiden lierojen määrästä. Lisääntymiskoe suoritettiin lindaani- ja kylmäältistuksen jälkeen. Lindaani- ja kylmäältistuksen aikana tapahtuneen kuolleisuuden vuoksi koe-eläinten määrät olivat eri suuria. Lisääntymiskokeen ajaksi (35 vrk) lierot siirrettiin puhtaanseen multaan ja niitä ruokittiin. Heksaanikontrollia on merkitty 0_h .

Lämpötila (°C)	Lindaanipitoisuus (mg/kg)					
	0_h	0	5	10	20	40
1	13/15	6/11	9/14	11/14	10/12	9/13
-1	9/13	7/13	11/12	8/14	11/14	7/11

Taulukko 8: Käytettäessä painonmuutosta vastemuuttujana varianssianalyysissä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ($P < 0,05$) vain lindaani käsittelyjen välillä. Lämpötilan aiheuttamia vaikutuksia tai lämpötilan ja lindaanin yhteisvaikutuksia ei havaittu. Lyhenteet: df=vapausasteet; SS=neliösumma; MS=keskineliö; F=testisuure F ja P=p-arvo .

Vaihtelulähde	df	SS	MS	F	P
Lindaani	1	0,19913	0,19913	19,8560	< 0,001
Lämpötila	1	0,00036	0,00036	0,0357	0,8503
Yhdysvaikutus	1	0,02631	0,02631	2,6237	0,1073
Virhevaihtelu	155	1,55447	0,01003		

Taulukko 9: Käytettäessä munakoteloiden tuottoa vastemuuttujana ei havaittu varianssianalyysin avulla tilastollisesti merkitseviä eroja minäkään käsittelyjen välillä, lindaani- ja kylmäkäsittelyillä ei myöskään havaittu olevan yhdysvaikutuksia. Lyhenteet ovat samat kuin Taulukossa 8.

Vaihtelulähde	df	SS	MS	F	P
Lindaani	1	0.47	0.47	0.0594	0.8078
Lämpötila	1	0.23	0.23	0.0295	0.8639
Yhdysvaikutus	1	0.22	0.22	0.0280	0.8673
Virhevaihtelu	152	1198.85	7.89		

8 Tulosten tarkastelu

Aikuisten metsälierojen paino ja lukumäärä ovat alhaisimpia keväällä. Suurimmillaan ne ovat heinä- ja elokuussa ja kumpikin vähenee syksyä kohti. Arvioita metsälieron luonnollisesta kuolleisuudesta ei ole. Osa metsälieroista kuitenkin talvehtii aikuisina (Uvarov 1995). Tässä tutkielmassa saatujen tulosten perusteella sekä kylmä- että lindaanialtistus aiheuttavat rajua painon vähenemistä. Nämä tekijät vaikuttavat myös metsälieron lisääntymiskykyyn. Pohjoisessa ympäristössä kemikaalstressi voi siis muodostaa talven aiheuttaman ilmasto-stressin kanssa ekologisen pullonkaulan, jolla on haitallisia vaikutuksia metsälieron populaatioon. Ekologisen pullonkaulan vaikutusta lisäävää synergistä yhdysvaikutusta kylmä- ja lindaanialtistuksen välillä ei havaittu.

8.1 Kuolleisuus

Kokeen aikana tapahtui ei-toivottua kuolleisuutta. Ainakin osa kuolleisuudesta saattoi johtua liian nopeasta lämpötilanmuutoksesta. Käsittelylämpötiloihin siirto tapahtui suoraan 1 °C:sta. Jos lämpötilaa olisi laskettu hitaammin muutaman vuorokauden aikana, olisivat lierot mahdollisesti paremmin pystyneet välttämään inokulatiivisen jäätyminen esimerkiksi lepokammioiden avulla. Lämpötilan hitaampi alentaminen vastaisi myös paremmin olosuhteita luonnossa. Luonnossa kostean maan suuri lämpökapasiteetti ja alapuolisesta maasta tuleva lämpö hidastavat maaperän lämpötilan laskua (Holmstrup & Zachariassen 1996). Lämpötilassa 1 °C kuolleisuus ei voinut johtua lämpötilan liian nopeasta laskusta. Lämpötiloissa 1 ja -1 °C havaittiin kaikkien kuolleiden lierojen olevan alkupainoltaan keskikokoisia tai pieniä. Tämä viittaa siihen, että lierojen alkupainot vaikuttivat niiden selviytymiseen näissä lämpötiloissa.

Kuolleisuus kontrolleissa ei saisi ylittää kymmentä prosenttia (ISO 1993). Lämpötilassa 1 °C kontrollin kuolleisuus oli 27% , mutta 0% heksaanikontrollissa. Lämpötilassa -1 °C kuolleisuus sekä kontrollissa että heksaanikontrollissa oli 13%. Selvää syytä suuren kuolleisuuteen kontrollissa lämpötilassa 1 °C ei havaittu. Lierojen käsittely kuten huuhtelu ja siirtely on voinut vahingoittaa joidakin kokeessa olleita yksilöitä, vaikka kaikki vahingoittuneeksi havaitut yksilöt poistettiin. Käsittelyssä oli saman määrä alkupainoltaan pieniä yksilöitä (<160mg) kuin muissakin käsittelyissä (3/15).

Kuolleisuuden perusteella ei voitu laskea LC-arvoja kahdesta syystä. Kuolleisuus kontrolleissa aiheutti sen, ettei probit-menetelmää voitu käyttää (Finney 1971). Koetta suunniteltaessa ei ollut tarkoitus käyttää kuolleisuutta vaste-muuttujana, minkä vuoksi konsentraatiot oli valittu siten, etteivät ne tappaisi lieroja kuin korkeintaan alhaisimpaan lämpötilaan yhdistettynä.

Kuolleisuus vaikutti siihen, että varianssianalyysiä tehdessä käsittelyryhmät

eivät olleet yhtä suuria. Tämä ei estä varianssianalyysin suorittamista, mutta heikentää tulosten luotettavuutta (Ranta ym. 1991, Zar 1996).

8.2 Heksaanikontrolli

Painonmuutoksen perusteella havaittiin, että lämpötilassa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ heksaanikontrolli ja kontrollikäsitteily erosivat tilastollisesti toisistaan. On kuitenkin syytä olettaa, että kyseessä on tyypin I tilastollinen virhe (Zar 1996). Heksaanin käyttö on ISO-standardin mukaista (ISO 1993). Heksaanin annettiin haihtua yli 12 tuntia koeastioista. Ero havaittiin toisessa alhaisen lämpötilan kontrollissa, mutta kolmessa muussa kontrolliparissa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa. Heksaanikontrolleissa kuolleisuus oli pienempää kuin kontrolleissa. Tämän perusteella heksaani ei vaikuttanut koetuloksiin.

8.3 Lierojen painon väheneminen kokeen aikana

Jos painonmuutosta mittaavassa kokeessa esiintyy kuolleisuutta, voivat tulokset olla harhaanjohtavia. Usein erityisesti korkeissa pitoisuuksissa suurin osa lieroista kuolee, mutta muutamat selviytyneet yksilöt pystyvät jopa kasvattamaan painoaan. Tämän vuoksi painonmuutosta ei tulisi käyttää vastemuuttujana, jos kuolleisuus käsittelyssä ylittää 15% (Kokta 1992, Kula 1997). Ilmeisesti tämän vuoksi lämpötilassa $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ korkeimmassa lindaanipitoisuudessa (40mg/kg) esiintyy suurta hajontaa, kun vastemuuttujana käytettiin painon vähenemistä (kuva 5). Kuolleisuus vaihteli käsittelyissä 0–27% välillä, joten tulosten luotettavuus voi kärsiä jonkin verran.

Painon vähenemä ei saisi olla kontrolleissa 20% suurempi (ISO 1993). Tämä kriteeri ei täyttynyt yhdenkään kontrollin osalta. Painon raju väheneminen on kuitenkin tyypillistä alhaisille lämpötiloille altistetuilla lieroilla (Uvarov 1995). Kontrollien painonvähenemät olivat noin 30%. Jäätymistä välttäville lierolajeille on tyypillistä, että kylmäältistus aiheuttaa 10–30% painonmenetyksen, joka johtuu veden ulosvirtauksesta (Holmstrup ym. 1999). Tämän suuruusluokan painonmenetystä voi *D. octaedralla* pitää luonnollisena lämpötilan alenemisen seurauksena (Uvarov 1995).

Taulukossa 10 on kirjallisuudesta löytyneitä akuutteja (7-14vrk) LC_{50} -arvoja. Koska tässä tutkielmassa saadun aineiston perusteella ei saatu laskettu LC -arvoja, ei vertailua voitu suorittaa. Huomattavaa on, että vaikka LC -arvoja oltaisiin pystyttykin laskemaan, olisi vertailu silti ollut vaikeaa mm. erilaisten altistusajkojen, vastemuuttujien, lämpötilojen ja orgaanisten aineiden pitoisuuksien vuoksi. Vaikka lindaanin toksisuutta lieroille on tukittu melko paljon, on tulosten soveltaminen pohjosiin olosuhteisiin miltei mahdotonta.

Taulukko 10: Lindaanin LC₅₀-arvoja eri lierolajeilla testattuna. Taulukossa on esitetty tutkimukset, joissa lindaani on sekoitettu testisubstraattiin. Lierolajit: AC, *Allobophora chlorotica*; EF, *Eisenia fetida*; LT, *Lumbricus terrestris*; LR, *Lumbricus rubellus* ja PP, *Pheretima posthuma*.

Laji	Lämpöt. °C	Kesto (vrk)	Org. pit.(%)	LC ₅₀ mg/kg (kuivapaino)	Lähde
AC	15	7	hyvin vähän	49,8	(Fayolle 1979)
EF	22	14	10	136	(Haque & Ebing 1983)
LT	15	14	10,9	113	(Haque & Ebing 1983)
LR	15	14	10,9	117	(Haque & Ebing 1983)
EF	22	14	10	59	(Heimbach 1985)
PP	25	14	10	40–78	(Hans ym. 1990)
EF				135	(Högger & Ammon 1994)
EF	20	14	10	165(150–180)	(Lock ym. 2002)
EF	20	14	4,8	399(337–486)	(Lock ym. 2002)
EF	20	14	1,5	78.5(62,4–95,4)	(Lock ym. 2002)

Painonmuutosten avulla saatiin parhaiten laskettua EC-estimaatit ja niille luotettavuusraajat. Taulukossa 11 on lindaanin kroonisia EC- arvoja (21–35 vrk) (Lock ym. 2002). Taulukossa 11 olevat EC₁₀-arvot, joiden orgaanisen aineen pitoisuus on 10%, ovat parhaiten vertailukelpoisia tässä tutkielmassa saatujen EC₁₀-arvojen kanssa. Lämpötilassa 1 °C tulokset ovat samaa suuruusluokkaa. Sen sijaan lämpötilassa –1 °C saatu EC₁₀ arvo on huomattavasti pienempi. Se on lähinnä vertailukelpoinen Lock ym. (2002) tutkimuksen niihin EC₁₀-arvoihin, joissa käytetyn maan orgaanisen aineksen pitoisuus on ollut hyvin pieni(1,5%). Vertailua hankaloittaa se, että käytetyt lierolajit ja vastemuuttajat eivät ole samoja. Painonmuutosten perusteella lindaani on toksisempi alhaisemmassa lämpötilassa. Saman toksisen vaikutuksen kuin lämpötilassa –1 °C aikaansaamiseen lämpötilassa 1 °C tarvitaan 3,5-kertainen pitoisuus lindaania. Tulos viittaisi siihen, että lindaani ja kylmäaltistuksen välillä olisi summamallista poikkeava synerginen yhdysvaikutus. Jos tällainen yhdysvaikutus on olemassa se on liian pieni, jotta se voitaisiin havaita varianssianalyysin avulla.

8.4 Lisääntyminen

Munakoteloiden tuoton perusteella ei saatu laskettua EC₁₀-arvoa kontrollilämpötilassa. Lämpötilassa –1 °C saatu estimaatti oli suurempi kuin yksikään

Taulukko 11: Lindaamin krooninen toksisuus. Esitetyt tulokset ovat Lock ym. (2002) tutkimuksesta paitsi *D. octaedralla* saadut tulokset, jotka ovat tästä tutkielmasta. Lierolajit: EF=*Eisenia foetida*, LR=*Lumbricus rubellus* ja DO=*Dendrobaena octaedra*. Vastemuuttujat: j=juveniilien lkm, c=munakoteloiden lkm, cf=cocoon fertility, j/f=juveniileja munakoteloita kohden, g=kasvu ja p=painonmuutos. Muut käytetyt lyhenteet: NOEC=No Observed Effect Concentration, LOEC=Lowest Observed Effect Concentration, EC=Effective Concentration ja NEC=No Effect Concentration.

Laji	Orgaanisen aineen pitoisuus (%)	Lämpötila (°C)	aika (vrk)	vaste- muuttuja	NOEC	LOEC	EC ₁₀	EC ₅₀	NEC
EF	10	20	21	c	10	18	11,5	25,9	10
EF	4,8	20	21	c	18	32	15,7	30,2	13,5
EF	1,5	20	21	c	3,2	5,6	2,38	6,51	2,83
EF	10	20	21	j	10	18	7,74	15,2	9,82
EF	4,8	20	21	j	18	32	11,7	23,3	14
EF	1,5	20	21	j	5,6	10	2,83	6,32	2,32
EF	10	20	21	cf	18	32	15,9	28,9	13
EF	4,8	20	21	cf	18	32	22,5	49	27,2
EF	1,5	20	21	cf	10	18	9,97	1,9	15,3
EF	10	20	21	j/f	18	32	22,5	35,8	32
EF	4,8	20	21	j/f	32	56	17,8	38,4	25,5
EF	1,5	20	21	j/f	10	18	11,8	13,4	11,2
LR	5,7	20	42	g	12	30			
DO	8,6	1	35	p			15,0		
DO	8,6	-1	35	p			4,3		
DO	8,6	1	35	c			-		
DO	8,6	-1	35	c			23,4		

Taulukossa 11 esitetyistä EC_{10} -arvoista. Koska yksilöiden samassa käsittelyssä tuottamien munakoteloiden määrät vaihtelivat paljon (kuva 6), ei EC -arvoille saatu laskettua luottamusvälejä. Lisäksi keskihajonta kaikille saaduille estimaateille oli melko suuri verrattuna painonmuutoksen perusteella saatujen estimaattien keskihajontaan (taulukot 5 ja 6). Tämän vuoksi munakoteloiden tuoton perusteella laskettuja EC -arvoja ei voida pitää luotettavina.

Lisääntymiskykyensä säilyttäneiden yksilöiden määrät vaihtelevat jo kontrolli käsittelyjen sisällä 86:sta 53:een prosenttiin (Taulukko 7). Ryhmien välillä on vaikea tehdä vertailuja lisääntymiskykyisten yksilöiden määrässä, sillä kuolleisuuden vuoksi eri käsittelyissä oli eri määrät lieroja (11–15 kpl). Lisäksi alkupainot ovat voineet vaikuttaa lisääntymiskykyensä säilyttäneiden yksilöiden määrään.

Kontrollikäsittelyssä lämpötilassa $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ korkein saavutettu lisääntymisnopeus oli 9,6 munakotelo/yksilö/kuukausi. *D. octaedran* maksimaaliseksi lisääntymisnopeudeksi laboratorio-olosuhteissa tasaisessa $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa on arvioitu 8,8 munakotelo/yksilö/kuukausi (Uvarov 1995). Lisääntymiskokeesta saatujen tulosten suuren vaihtelun syynä eivät luultavasti olleet epäedulliset olosuhteet vaan lierojen heterogeeninen tausta.

8.5 Lierojen alkupainojen vaikutus koetuloksiin

Käytettyjen lierojen alkupainojen vaihtelu oli melko suurta, mikä johtui saatavilla olevien lierojen vähyydestä. Lämpötiloissa 1 ja $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuolleet lierit olivat pieni- ja keskikokoisia. Kuolleisuutta olisi mahdollisesti voitu pienentää jos pieniä yksilöitä ei olisi käytetty.

Lierojen alkupainojen ei havaittu vaikuttavan niiden tuottamien munakoteloiden määrään eri käsittelyryhmien sisällä. Sen sijaan oli havaittavissa, että sellaiset yksilöt, jotka lisääntymiskokeen päätyttyä olivat pudottaneet painoaan runsaasti tai jopa kuolleet, olivat usein tuottaneet myös runsaasti jälkeläisiä. Toisaalta, jotkin kemikaali- ja kylmäältistuksesta selvinneet yksilöt eivät allokoineet resurssejaan lainkaan lisääntymiseen, vaan niiden paino saattoi jopa kasvaa lisääntymiskokeen aikana. Tällaisia tuloksia on ennekin havaittu lieroilla suoritetuissa toksisuuskokeissa (Kokta 1992, Bouché 1992, Kula 1997). Ilmiön syyt ovat kuitenkin epäselviä (Kula 1997). Selityksen voisi antaa tässä tapauksessa lierojen heterogeeninen tausta. Lierojen sukukypsyuden merkinä käytettiin selvästi erottuvaa clitellumia. Tästä huolimatta mukana on voinut olla nuoria yksilöitä, joiden lisääntymisen alkaminen mahdollisesti viivästyivät altistusstressoreiden vuoksi. Nuoret yksilöt ovat allokoineet lisääntymiskokeen aikana resursseja kasvuun lisääntymisen sijasta. Tämä heikentää munakoteloiden tuoton luotettavuutta vastemuuttujana.

Laboratoriossa kasvatettu synkronoitu viljelmä olisi luultavasti vähentänyt tulosten vaihtelua. Lisäksi tulisi varmentua paremmin siitä, että kaikki testissä käytettävät lierot ovat lisääntymiskykyisiä (Kokta 1992). Kokta (1992) esittää, että lisääntymiskokeiden tuloksia voitaisiin parantaa valitsemalla yksilöitä joiden paino vaihtelisi jopa vähemmän kuin ISO 11268 -standardissa esitetty 300-600mg (*E. fetida*). Metsälieroille, joka on pienempi, vastaava väli voisi olla 100-300mg. Esimerkiksi Uvarov (1995) on tutkimuksessaan käyttänyt metsälieroja, joiden alkupainot vaihtelivat 140-300mg.

8.6 Yhdysvaikutukset

Lindaani- ja kylmäältistuksen välillä ei havaittu summamallista poikkeavaa synergistä yhdysvaikutusta varianssianalyysin avulla. Yhdysvaikutuksen havaitsemiseen ovat kuitenkin voineet vaikuttaa tulosten suuri vaihtelu ja esiintynyt kuolleisuus. Synerginen yhdysvaikutus olisi lisännyt todennäköisyyttä sille, että populaatio kärsii lindaani- ja kylmäältistuksen vaikutuksista. Alhaisen lämpötilan ja kemikaalialtistuksen yhdysvaikutuksen olemassaolo on kuitenkin osoittautunut vaikeaksi kokeellisesti todistaa (Martikainen & Krogh 1999, Holmstrup ym. 2000). Lindaani- ja kylmäältistuksen aiheuttavat lieroille merkittävää stressiä ja yhdessä esiintyessään ne voivat olla kohtalokkaita ilman yhdysvaikutustakin.

Lämpötilan on todettu vaikuttavan lieroilla tehtyjen toksisuustestien tuloksiin, joskin maaperän kosteuden on todettu oleva tärkein yksittäinen vaikuttava tekijä (Bauer & Römbke 1997). Alhainen lämpötila samoin kuin kuivuus vaikuttavat lieroihin siten, että ne menettävät huomattavan osan ruumiissa olevasta vedestä (Holmstrup ym. 1999). Koska kuivuuden ja alhaisen lämpötilan vaikutukset ovat samankaltaisia voidaan päätellä, että myös alhaisen lämpötilan vaikutus testituloksiin on merkittävä ja se tulisi ottaa huomioon riskiarvioinnissa. Jotta turvakertoimia voitaisiin määrittää, olisi kuitenkin saatava lisää tuloksia alhaisissa lämpötiloissa suoritetuista toksisuuskokeista.

Kiitokset

Tutkielman kokeellinen osuus tehtiin 1.9–30.11.2001 välisenä aikana Jyväskylän yliopiston ympäristöntutkimuskeskuksessa.

Kiitokset FT Esko Martikaiselle hyvistä neuvoista ja innostavasta ohjauksesta kaikissa työn vaiheissa. Kiitokset prof. Aimo Oikarille rakentavista kommentteista sekä kokeellisen osuuden suunnitteluvaiheessa että kirjoitustyön loppuvaiheessa. Kiitos FT Jari Haimille avusta ja erityisesti hyvien matomaiden paljastamisesta. Kiitos FM Kati Laitiselle avusta lierojen keräämisessä ja kokeellisen osuuden toteuttamisessa.

Lähdeluettelo

- Addison J., 1996. Safety testing of tebufenozide, a new molt-inducing insecticide, for effects on nontarget forest soil invertebrates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 33:55–61.
- Bahadur N., Shiu W.-Y., Boocock D. & Mackay D., 1997. Temperature dependence of octanol-water partition coefficient for selected chlorobenzenes. *J. Chem. Eng. Data*, 42:685–688.
- Bauer C. & Römbke J., 1997. Factors influencing the toxicity of two pesticides on three lumbricid species in laboratory tests. *Soil Biol. Biochem.*, 29(3/4): 705–708.
- Bouché M., 1992. Earthworm species and ecotoxicology studies. Teoksessa Greig-Smith P., Becker H., Edwards P. & Heimbach F., (toim.), *Ecotoxicology of earthworms*, ss. 20–35. Intercept.
- Edwards P. & Brown S. M., 1982. Use of grassland plots to study the effect of pesticides on earthworms. *Pedobiologia*, 24:145–150.
- Fayolle L., 1979. Consequences de l'apport de contaminants su les lombriciens iii. essais de laboratoire. *Doc Pe ´dozool*, 1:34–65. (Ref. Lock ym. 2002).
- Finney D., 1971. *Probit analysis*. Cambridge university press, 3 painos. 333 s.
- Girling A., Tattersfield L., Mitchell G., Crossland N., Pascoe D., Blockwell S., Maund S., Taylor E., Wenzel A., Janssen C. & Jüttner I., 2000. Derivation of predicted no-effect concentrations for lindane, 3,4-dichloroaniline, atrazine, and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46:148–162.
- Haimi J. & Salminen J., 1996. Kemikaalien haittavaikutukset terrestisessä ympäristössä -tutkimus ja testimenetelmien kehittäminen erityisesti suomalaiselle maaperälle. *Suomen ympäristö*, 53.
- Hans R., Gupta R. & Beg M., 1990. Toxicity assessment of four insecticides to earthworm, *Pheretima posthuma*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 358–364.
- Hans R., Khan M., Farooq M. & Beg M., 1993. Glutathione-s-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. *Soil Biol. Biochem.*, 25:509–511.
- Haque A. & Ebing W., 1983. Toxicity determination of pesticides to earthworms in the soil substrate. *Z. PflKrankh. PflSchutz*, 90:395–408. (Ref. Heimbach 1985).
- Heimbach F., 1985. Comparison of laboratory methods, using *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*, for the assesment of the hazard of chemicals to earthworms. *Z. PflKrankh. PflSchutz*, 92(2):186–193.
- Heimbach F., 1997. Field tests on the side effects of pesticides on earthworms:influence of plot size and cultivation practices. *Soil. Biol. Biochem.*, 29(3/4):671–676.
- Hernández L., Fernández M. & González M., 1992. Organochlorine pollutants

- in water, soil, and earthworms in the Guadalquivir river, Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49:192–198.
- Hirvi J.-P. & Rekolainen S., 1995. Pesticides in precipitation and surface water in Finland. Teoksessa *Pesticides in precipitation and surface water, Tema-Nord1995:558*, ss. 12–18. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark.
- Holmstrup M. & Zachariassen K. E., 1996. Physiology of cold hardiness in earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A(2):91–101.
- Holmstrup M., Costanzo J. P. & Lee Jr R. E., 1999. Cryoprotective and osmotic responses to cold acclimation and freezing in freeze-intolerant earthworms. *J. Comp. Physiol. B.*, 169:207–214.
- Holmstrup M., Bayley M., Sjørnsen H., Hojer R., Bosksen S. & Friis K., 2000. Interaction between environmental pollution and cold tolerance of soil invertebrates: a neglected field of research. *CryoLetters*, 21:309–314.
- Högger C. H. & Ammon H. U., 1994. Testing the toxicity of pesticides to earthworms in laboratory and field tests. *IOBC wprs Bull.*, 17(10):157–178.
- Ihaka R. & Gentleman R., 1996. R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3):299–314.
- ISO, 1993. Iso 11268-1 soil quality - effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. International standard.
- Kokta C., 1992. Measuring effects of chemicals in the laboratory: Effect criteria and endpoints. Teoksessa Greig-Smith P., Becker H., Edwards P. & Heimbach F., (toim.), *Ecotoxicology of earthworms*, ss. 55–62. Intercept.
- Kula C., 1997. Endpoints in laboratory testing with earthworms: experience with regard to regulatory decision for plant protection products. Teoksessa Shephard S., Bembridge J., Holmstrup M. & Posthuma L., (toim.), *Advances in earthworm ecotoxicology*. SETAC.
- Lagerspetz K., 1995. Mechanism of thermal acclimation in relation to ecotoxicology. Teoksessa Munawar M. & Luotola M., (toim.), *The Contaminants in the Nordic Ecosystem: the Dynamics and Fate*, ss. 85–94. SPC Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Li Y.-F., McMillan A. & Scholtz T., 1996. Global HCH usage with 1°x 1° longitude/latitude resolution. *Environ. Sci. Technol.*, 30:3525–3533.
- Liikanen A., 1998. Torjunta-aineiden käyttäytyminen ilmakehässä - lähteet, kulkeutuminen ja poistumismekanismit. *Suomen ympäristö*, 196:72 s.
- Lock K., De Schamphelaere K. & Janssen C., 2002. The effect of lindane on terrestrial invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42:217–221.
- Luotola M., Nakari T. & Walls M., 2001. Pohjoisten ympäristöolojen vaikutus kemikaalien käyttäytymiseen ja myrkyllisyyteen. *Suomen ympäristö*, 450.
- Martikainen E. & Krogh P., 1999. Effects of soil organic matter content and temperature on toxicity of dimethoate to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomiidae). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(5):865–872.

- McLean M. & Parkinson D., 1997. Changes in structure, organic matter and microbial activity in pine forest soil following the introduction of *Dendrobaena octaedra* (oligochaeta, lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.*, 29(3/4): 537–540.
- Nikunen E., 1991. *Environmental properties of chemicals*. Ministry of the environment, Helsinki. 1084 s.
- Nordberg-King T. J., 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration(icp) approach (version 2.0). Technical Report 03–93, National effluent toxicity Assesment Center (USEPA).
- Opperhuizen A., Serné P. & Van der Steen J., 1988. Thermodynamics of fish/water and octan-1-ol/water partitioning of some chlorinated bezenes. *Environ. Sci. Technol.*, 22(3):286–292.
- Ranta E., Rita H. & Kouki J., 1991. *Biometria - tilastotiedettä ekologeille*. Yliopistopaino, 3 painos. 569 s.
- Spurgeon D. & Weeks J., 1997. Evaluation of factors influencing results from laboratory toxicity tests with earthworms. Teoksessa Shepapr S., Bembridge J., Holmstrup M. & Posthuma L., (toim.), *Advances in earthworm ecotoxicology*, ss. 15–25. SETAC.
- Stenersen J., 1979. Action of pesticides on earthworms. part i: The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. *Pestic. Sci.*, 10:66–74.
- Stenersen J., Guthenberg C. & Mannervik B., 1979. Glutathione s-transferases in earthworms (lumbricidae). *Biochem. J.*, 181:47–50.
- Terhivuo J. & Saura A., 1990. Allozyme variation in parthenogenetic *Dendrobaena octaedra* (oligochaeta: Lumbricidae) populations of eastern fennoscandia. *Pedobiologia*, 34:113–139.
- Turnbull A., 1996. Chlorinated pesticides. Teoksessa *Chlorinated organic micropollutants*, ss. 113–135. Cambridge: The Royal society of chemistry.
- Uvarov A., 1995. Responses of an earthworm species to constant and diurnally fluctuating temperature regimes in laboratory microcosms. *Eur. J. Soil Biol.*, 31(2):111–118.
- Vesi- ja ympäristöhallitus, 1993. *Vesi- ja ympäristöhallituksen päätös kiellytyistä tai voimakkaasti rajoitetuista kemikaaleista N:o 680/1993*. Edita Oy.
- Viswanathan R., Ray S., Scheunert I. & Korte F., 1988. Investigation on accumulation and biotrasformation by earthworms of lindane occurring as soil contaminant. Teoksessa Abbou R., (toim.), *Hazardous waste - detection, control, treatment. Part A.*, ss. 759–765. Elsevier.
- Walker K., Vallero D. A. & Lewis R. G., 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, 33:4373–4378.
- Wang Z.-Z., Zhang Y.-M., Guo Y.-C. & Li Z.-W., 2000. Effect of organophosphorus pesticide pollution on soil animals. *J. Environ. Sci.*, 12(1):47–56.

- Willett K., Ulrich E. & Hites R., 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.*, 32:2197–2207.
- Willmer P., Stone G. & Johnston I., 2000. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science. 644 s.
- Zachariassen K. & Lundheim R., 1995. Effects of environmental pollutants on the cold-hardiness of arctic and boreal ectothermic animals. Teoksessa Munawar M. & Luotola M., (toim.), *The Contaminants in the Nordic Ecosystem: the Dynamics and Fate*, ss. 71–83. SPC Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Zar J., 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey. 662 s.

A Aineisto

Taulukossa: mk, munakoteloiden lukumäärä; pit, lindaaninpitoisuus (mg/kg); lt, lämpötila (°C); k, yksilö kuollut; t, yksilö ei mukana lisääntymiskokeessa ja h, heksaanikontrolli.

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
1	115	k			h	-1
2	168	121	124	0	h	-1
3	227	171	214	1	h	-1
4	128	111	140	0	h	-1
5	218	163	79	9	h	-1
6	197	143	118	0	h	-1
7	245	216	176	5	h	-1
8	189	119	k	t	h	-1
9	110	94	185	0	h	-1
10	138	102	83	0	h	-1
11	183	131	102	8	h	-1
12	182	119	127	1	h	-1
13	120	87	k	1	h	-1
14	187	164	157	1	h	-1
15	149	99	k	t	h	-1
16	145	k		t	h	1
17	143	k		t	h	1
18	192	137	136	1	h	1
19	350	340	239	2	h	1
20	278	181	63	0	h	1
21	185	k		t	h	1
22	329	217	189	4	h	1
23	267	144	90	3	h	1
24	232	164	158	12	h	1
25	204	151	143	k	h	1
26	269	167	167	k	h	1
27	185	120	128	6	h	1
28	213	k		t	h	1
29	137	94	k		h	1
30	363	160	148	0	h	1
301	185	96	75	4	5	-1
302	239	128	80	2	5	-1

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
303	313	177	175	1	5	-1
304	227	103	66	2	5	-1
305	192	91	k	4	5	-1
306	162	112	60	5	5	-1
307	275	153	79	6	5	-1
308	170	101	k	5	5	-1
309	144	k			5	-1
310	258	138	187	8	5	-1
311	205	100	63	5	5	-1
312	261	175	216	2	5	-1
313	193	114	92	0	5	-1
314	209	k			5	-1
315	174	k			5	-1
316	174	111	192	1	5	1
317	219	148	98	8	5	1
318	117	86	62	0	5	1
319	131	90	101	0	5	1
320	204	112	75	6	5	1
321	234	138	151	5	5	1
322	189	138	110	1	5	1
323	156	43	k	0	5	1
324	187	98	116	1	5	1
325	198	k			5	1
326	213	136	k	5	5	1
327	208	123	104	0	5	1
328	206	123	142	1	5	1
329	213	128	65	6	5	1
330	179	83	k	0	5	1
331	245	k			5	-3
332	134	k			5	-3
333	176	k			5	-3
334	145	k			5	-3
335	158	k			5	-3
336	101	k			5	-3
337	188	k			5	-3
338	229	k			5	-3
339	150	k			5	-3

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
340	206	k			5	-3
341	167	k			5	-3
342	210	k			5	-3
343	212	k			5	-3
344	175	k			5	-3
345	194	k			5	-3
346	158	k			5	-5
347	207	k			5	-5
348	205	k			5	-5
349	117	k			5	-5
350	189	k			5	-5
351	173	k			5	-5
352	187	k			5	-5
353	107	k			5	-5
354	176	k			5	-5
355	228	k			5	-5
356	192	k			5	-5
357	183	k			5	-5
358	158	k			5	-5
359	300	k			5	-5
360	308	k			5	-5
361	118	k			0	-1
362	167	k			0	-1
363	194	136	113	1	0	-1
364	128	94	64	3	0	-1
365	268	148	130	6	0	-1
366	139	110	102	5	0	-1
367	251	142	132	4	0	-1
368	243	146	k	0	0	-1
369	195	121	64	6	0	-1
370	183	127	k	6	0	-1
371	158	109	83	3	0	-1
372	200	116	134	0	0	-1
373	170	130	k	0	0	-1
374	315	218	221	0	0	-1
375	206	132	54	4	0	-1
376	253	151	k	2	0	1

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
377	352	230	88	10	0	1
378	185	131	k	0	0	1
379	212	166	122	5	0	1
380	169	116	89	4	0	1
381	204	134	228	1	0	1
382	137	77	k	4	0	1
383	178	132	106	2	0	1
384	171	98	k	4	0	1
385	175	119	101	2	0	1
386	228	157	149	3	0	1
387	145	97	98	2	0	1
388	239	138	113	7	0	1
389	192	147	138	0	0	1
390	135	73	41	1	0	1
391	208	k			0	-3
392	234	k			0	-3
393	271	k			0	-3
394	163	k			0	-3
395	288	k			0	-3
396	174	k			0	-3
397	187	k			0	-3
398	134	k			0	-3
399	192	k			0	-3
400	189	k			0	-3
401	138	k			0	-3
402	176	k			0	-3
403	188	k			0	-3
404	205	k			0	-3
405	146	k			0	-3
406	161	k			0	-5
407	199	k			0	-5
408	188	k			0	-5
409	147	k			0	-5
410	195	k			0	-5
411	162	k			0	-5
412	246	k			0	-5
413	165	k			0	-5

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
414	240	k			0	-5
415	266	k			0	-5
416	283	k			0	-5
417	114	k			0	-5
418	198	k			0	-5
419	177	k			0	-5
420	219	k			0	-5
421	262	181	176	0	10	-1
422	179	92	75	3	10	-1
423	356	221	k	0	10	-1
424	228	135	143	0	10	-1
425	178	118	62	5	10	-1
426	298	170	161	0	10	-1
427	217	118	k	7	10	-1
428	220	k			10	-1
429	219	140	63	2	10	-1
430	161	94	k	0	10	-1
431	243	150	eli	4	10	-1
432	227	131	143	2	10	-1
433	183	103	132	1	10	-1
434	121	58	k	0	10	-1
453	130	73	53	5	10	-1
435	222	155	97	4	10	-1
436	174	107	51	5	10	1
437	309	198	92	0	10	1
438	230	127	124	3	10	1
439	152	124	93	6	10	1
440	217	143	65	7	10	1
441	146	87	79	0	10	1
442	232	160	161	0	10	1
443	208	109	50	7	10	1
444	215	150	95	6	10	1
445	193	k			10	1
446	264	167	103	9	10	1
447	190	98	k	3	10	1
448	240	153	181	1	10	1
449	178	117	135	1	10	1

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
450	133	83	91	1	10	1
451	248	k			10	-3
452	141	k			10	-3
454	174	k			10	-3
455	220	k			10	-3
456	224	k			10	-3
457	137	k			10	-3
458	118	k			10	-3
459	209	k			10	-3
460	357	k			10	-3
461	555	k			10	-3
462	308	k			10	-3
463	399	k			10	-3
464	146	k			10	-3
465	133	k			10	-3
466	217	k			10	-5
467	171	k			10	-5
468	218	k			10	-5
469	165	k			10	-5
470	180	k			10	-5
471	142	k			10	-5
472	215	k			10	-5
473	156	k			10	-5
474	268	k			10	-5
475	178	k			10	-5
476	153	k			10	-5
477	141	k			10	-5
478	169	k			10	-5
479	213	k			10	-5
480	182	k			10	-5
481	234	152	k	5	20	-1
482	158	105	64	9	20	-1
483	224	136	141	0	20	-1
484	264	180	133	7	20	-1
485	195	143	127	5	20	-1
486	282	168	167	0	20	-1
487	129	75	k	0	20	-1

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
488	198	136	92	6	20	-1
489	213	109	75	7	20	-1
490	172	78	107	4	20	-1
491	170	k			20	-1
492	190	113	k	4	20	-1
493	218	127	k	4	20	-1
494	141	83	k	4	20	-1
495	187	99	k	3	20	-1
496	164	93	126	1	20	1
497	145	79	41	2	20	1
498	183	91	103	6	20	1
499	248	142	93	6	20	1
500	208	128	76	5	20	1
501	122	54			20	1
502	196	86	k	0	20	1
503	194	108	72	7	20	1
504	178	88	k	5	20	1
505	212	123	45	1	20	1
506	98	66	43	5	20	1
507	197	103	135	0	20	1
508	198	k			20	1
509	177	k			20	1
510	92	60	46	2	20	1
511	180	k			20	-3
512	180	k			20	-3
513	300	k			20	-3
514	231	k			20	-3
515	160	k			20	-3
516	176	k			20	-3
517	195	k			20	-3
518	134	k			20	-3
519	219	k			20	-3
520	182	k			20	-3
521	194	k			20	-3
522	223	k			20	-3
523	146	k			20	-3
524	163	k			20	-3

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
525	232	k			20	-3
526	234	k			20	-5
527	145	k			20	-5
528	192	k			20	-5
529	201	k			20	-5
530	111	k			20	-5
531	266	k			20	-5
532	189	k			20	-5
533	158	k			20	-5
534	100	k			20	-5
535	331	k			20	-5
536	171	k			20	-5
537	223	k			20	-5
538	192	k			20	-5
539	183	k			20	-5
540	279	k			20	-5
541	145	k			40	-1
542	157	86	k	2	40	-1
543	300	195	206	0	40	-1
544	229	112	76	7	40	-1
545	216	95	61	6	40	-1
546	122	k			40	-1
547	151	k			40	-1
548	180	85	109	0	40	-1
549	300	131	162	5	40	-1
550	276	153	177	1	40	-1
551	282	158	200	0	40	-1
552	187	k			40	-1
553	144	74	94	4	40	-1
554	219	131	121	1	40	-1
555	147	82	118	0	40	-1
556	136	69	k	4	40	1
557	167	k			40	1
558	202	171	113	5	40	1
559	216	90	53	2	40	1
560	159	112	85	1	40	1
561	235	126	181	1	40	1

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
562	156	80	k	7	40	1
563	176	k			40	1
564	135	106	189	0	40	1
565	168	72	k	0	40	1
566	184	146	k	5	40	1
567	232	125	105	7	40	1
568	236	123	149	0	40	1
569	114	56	k	0	40	1
570	156	104	79	7	40	1
571	225	k			40	-3
572	154	k			40	-3
573	176	k			40	-3
574	201	k			40	-3
575	137	k			40	-3
576	161	k			40	-3
577	250	k			40	-3
578	110	k			40	-3
579	290	k			40	-3
580	164	k			40	-3
581	189	k			40	-3
582	130	k			40	-3
583	233	k			40	-3
584	188	k			40	-3
585	121	k			40	-5
586	139	k			40	-5
587	248	k			40	-5
588	321	k			40	-5
589	120	k			40	-5
590	376	k			40	-5
591	147	k			40	-5
592	171	k			40	-5
593	278	k			40	-5
594	172				40	-5
595	187	k			40	-5
596	157	k			40	-5
597	171	k			40	-5
598	189	k			40	-5

numero	alkupaino	välipaino	loppupaino	mk	pit	lt
599	184	k			40	-5
600	187	k			40	-5