

# **Pro gradu -tutkielma**

## **Makean veden simpukat kalojen kiertovesikasvatuksen jätevedessä kasvatettujen viherlevien suodattajina**

**Ville Julkunen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötieteet

01.10.2020

Ville Julkunen: Makean veden simpukat kalojen kiertovesikasvatuksen jätevedessä kasvatettujen viherlevien suodattajina  
Pro gradu: 50 s.  
Työn ohjaajat: FT Katja Pulkkinen ja FT Juhani Pirhonen  
Tarkastajat:  
Lokakuu 2020

---

Hakusanat: biosuodatus, kiertotalous, rehevöityminen, suodatusnopeus

Viherlevät sitovat jäteveden ravinteita tehokkaasti. Tutkimukseni tarkoitus oli selvittää kolmen makean veden simpukan (*Anodonta anatina*, *A. cygnea* ja *Unio tumidus*) hyödyntäminen kalanviljelyn jätevedessä kasvatettujen kahden viherlevälajin (*Monoraphidium griffithii* ja *Selenastrum* sp.) ja levien sitomien ravinteiden suodattamiseksi vedestä ja onko eri simpukka- ja leväyhdistelmillä vaikutusta levänsuodatustehokkuuteen tai ravinteiden määrään. Molempia levälajeja varten oli 10 tutkimus- ja 2 kontrolliallasta ja kokeet toistettiin 5 litran altaissa neljästi. Levien sisältämiä nitraattia ja fosfaattia ei vapautunut altaisiin kokeiden aikana. Ammoniumtyypen määrä kasvoi merkitsevästi altaissa, joissa oli *Selenastrum* sp. -levää. Ammoniumtyypen määrä *Selenastrum* sp. -leväaltaissa oli keskimäärin  $0,56 \pm 0,12$  mg/l ja *M. griffithii* -altaissa  $0,14 \pm 0,12$  mg/l. Simpukat suodattivat tehokkaammin *M. griffithii* -levää kuin *Selenastrum* sp. -levää. Yksilötasolla *A. cygnea* -simpukoiden suodatusnopeus n. n. 150 ml/h/yksilö oli korkein. Kokoon suhteutettuna *Anodonta*-suvun simpukat suodattivat *U. tumidus* -simpukoita tehokkaammin *Selenastrum* sp. -levää mutta *M. griffithii* -levän suodatuksessa ei ollut simpukkalajien välisiä merkitseviä eroja. *Anodonta*-suvun simpukoiden suodatusnopeus oli n. 38 mg/h/g molemmilla levälajeilla. *U. tumidus* -simpukoiden suodatusnopeus oli *Selenastrum* sp. -levällä 12 mg/h/g ja *M. griffithii* -levällä n. 32 mg/h/g. Tutkimuksessa havaittiin, että *M. griffithii* -levä soveltui paremmin tutkimusolosuhteisiin, sillä se lisääntyi kokeiden aikana himmeästi valaistussa tutkimustilassa ilman ulkopuolista ravinnelähdettä. Tutkimuksen perusteella järvisimpukoita voitaisiin hyödyntää kalanviljelyn jätevesistä ravinteet puhdistaneiden viherlevien poistamisessa vedestä.

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

Ville Julkunen: Utilization of freshwater mussels as filterers of green microalgae cultivated in RAS effluent  
MSc thesis: 50 p.  
Supervisors: PhD Katja Pulkkinen and PhD Juhani Pirhonen  
Inspectors:  
October 2020

---

Key words: biofiltration, circular economy, eutrophication, filtration rate

Green algae are effective in reducing nutrients from the wastewater. The purpose of this study was to find out if green algae (*Selenastrum* sp. and *Monoraphidium griffithii*) grown in recirculating aquaculture system effluent, and the nutrients it contains, can be removed from the water by using freshwater mussels (*Anodonta anatina*, *A. cygnea* and *Unio tumidus*) and if different combinations of algae and mussel species effects the filtering rate or nutrient concentrations. There were 10 tanks with one mussel and 2 control tanks without mussel for each alga and the tests were conducted 4 times in 5 liter tanks. According to the study, no nitrate or phosphate was released to the test tanks during the experiments. Ammonium concentrations increased significantly in *Selenastrum* sp. tanks. Ammonium levels in tanks containing *Selenastrum* sp. averaged at  $0,56 \pm 0,12$  mg/l and in tanks containing *M. griffithii* at  $0,14 \pm 0,12$  mg/l. Ammonium was found also in the *Selenastrum* sp. control tanks. Individual *A. cygnea* had the highest filtering rate for both algae species at approximately 150 ml/h/individual. Mussels of genus *Anodonta* had the highest size dependent filtering rate for *Selenastrum* sp. algae. Size dependent filtering rate for *M. griffithii* didn't differ significantly between mussel species. Size-dependent filtration rate for both *Anodonta* and algae species was approximately 38 ml/h/g. Size dependent filtration rate for *U. tumidus* was approximately 32 ml/h/g for *M. griffithii* and 12 ml/h/g for *Selenastrum* sp. The study showed that *M. griffithii* was more suited to the environment of the test setup as it could grow in the dimly lit space with no external source of nutrients. According to this study, freshwater mussels could be used to remove nutrient containing green algae from RAS wastewaters.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>4</b>
2.1 Tutkimusjärjestely.....	5
2.1.1 Tutkimuksessa käytettyjen levien kasvatus.....	8
2.2 Esitesti.....	10
2.3 Menetelmät ja mittaukset .....	11
2.3.1 Leväkonsentraation ja ravinnemäärän mittaustekniikka .....	13
2.3.2 Levänsuodatusnopeuden määrittäminen.....	14
2.4 Aineiston tilastollinen käsittely .....	15
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>16</b>
3.1 Leväpitoisuustulokset .....	16
3.2 Suodatusnopeustulokset.....	18
3.3 Ravinnemittaustulokset .....	23
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>25</b>
4.1 Leväpitoisuus .....	25
4.2 Suodatusnopeus.....	26
4.3 Ravinnemittaukset.....	29
4.4 Jatkossa tutkittavaa teollisen puhdistussovelluksen kannalta.....	31
4.4.1 Simpukkapuhdistusjärjestelmän sivuvirtojen hyödyntäminen.....	33
4.4.2 Simpukoiden kasvu laboratorio-olosuhteissa ja kasvattaminen .....	35
<b>5 YHTEENVETO .....</b>	<b>37</b>
<b>KIITOKSET.....</b>	<b>38</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>39</b>

<b>LIITE 1. Suhteelliset leväkonsentraatiot kokeissa 1-4.....</b>	<b>42</b>
<b>LIITE 2. Suodatusnopeudet [ml/h/yksilö] mittauspäivien välillä kokeissa 2-4 ..</b>	<b>44</b>
<b>LIITE 3. Suodatusnopeudet [ml/h/g] mittauspäivien välillä kokeissa 2-4 .....</b>	<b>45</b>

# 1 JOHDANTO

Kiertovesijärjestelmällä (RAS eli recirculating aquaculture system) toimivat kalanviljelylaitokset ovat yleistyneet Suomessa ja maailmalla viime vuosina. Kiertovesijärjestelmän ero perinteiseen läpivirtausvesiviljelylaitokseen on, että kiertovesilaitoksen käyttämä vesi kierrätetään puhdistuslaitteiston kautta takaisin kala-altaisiin. Järjestelmän käyttö mahdollistaa jätevesien käsittelyn ja voi siten ehkäistä muun muassa laitoksen toiminnasta johtuvaa laitoksen alapuolisten vesistöjen ravinnekuorman kasvua ja rehevöitymistä. Lisäksi veden kierrätystä hyödyntävät laitokset kuluttavat vettä huomattavan vähän, ainoastaan 1-2 % perinteisiin läpivirtausvesilaitoksiin verrattuna (Luonnonvarakeskus 2019).

Kiertovesijärjestelmä on mahdollista optimoida siinä kasvatettavien tuotteiden perusteella. Tämä on lisännyt järjestelmien globaalia suosiota. Järjestelmää hyödyntävissä laitoksissa on mahdollista kasvattaa esimerkiksi Suomessa hyvinkin eksoottisia ja kaupallisesti arvokkaita kala- tai äyriäislajeja (Luonnonvarakeskus 2019). Toisaalta järjestelmän pitäminen optimaalisena kasvatettavalle lajille vaatii energiaa ja Suomessa järjestelmät ovatkin yleensä sijoitettu siten, että veden lämpötilan ylläpito onnistuisi jonkun muun teollisuuslaitoksen tuottamalla hukkaenergialla. Energia- ja ylläpitokustannuksia voi pyrkiä rajaamaan myös suunnittelemalla järjestelmä siten, että vesikierron eri prosessivaiheissa vettä käytetään eri tuotteiden, kuten kalojen ja vihannesten, kasvatukseen ja tuotannossa syntyvää biojätettä hyödynnetään energiantuotannossa laitoksen tarpeisiin. Näin toimitaan muun muassa uusikaupunkilaisessa Pieni kalatila (ent. Sybimar Oy) vesiviljelylaitoksessa (Rantanen 2018). Ilman energiakustannusten minimoimista on kiertovesiviljely yleensä liian kallista kannattavaksi. Esimerkiksi imatralainen kuhankasvattamo ajautui konkurssiin, koska suunnitelma läheisen kaatopaikan metaanipäästöjen hyödyntämisestä ilmaisena energianlähteenä ei toiminut (Ojala 2018).

Vaikka RAS-järjestelmää hyödyntävien laitosten vesistöihin saakka päätyvien ravinnepäästöjen on tutkittu olevan normaalia kalanviljelylaitosta pienemmät, johdun kiintoaineen ja ravinteiden konsentroitumisesta pienempään vesimäärään, fosforipäästöt vähenevät kuitenkin vain n. 20 prosenttia ja typpipäästöjen vähentäminen käytössä olevilla järjestelmillä on hyvin haasteellista (Luonnonvarakeskus 2019). Toisaalta ravinteiden poistossa on suuria eroja riippuen käytetystä tekniikasta ja esimerkiksi Schneider ym. (2006) testasivat onnistuneesti mikrobikasvustojen hyödyntämistä typen ja fosforin poistamisessa vedestä. Kokeessa kalanviljelyn jätevedettä puhdistettiin ensin rumpusuodattimella, minkä jälkeen jätevesi ohjattiin aktiivilieteprosessiin mikrobien kasvattamiseksi. Kokeen perusteella kilogrammasta kaloille syötettyä kalanrehua saatiin parhaimmillaan 0,1 kg suodattimen pohjalle laskeutunutta proteiinia, mikrobikasvuston poistaessa samalla 90 % jäteveden epäorgaanisesta tyyppistä ja 80 % jäteveden liuenneesta fosfaatista. Suljetussa järjestelmässä puhdistukseen menevään jätevedeen on konsentroitunut paljon ravinteita. Sen takia niiden talteen ottaminen biologisin keinoin on mahdollista.

Tutkimukseni oli osa vuonna 2017 Jyväskylän yliopistolla alkanutta ”Biologiset ravinnesiepparit” -hanketta. Hankkeessa on tutkittu viherlevien kasvattamista RAS-kalanviljelylaitoksen jätevesissä veteen liuenneiden ravinteiden sitomiseksi. Hankkeessa aiemmin tehdyn tutkimuksen (Stevčić ym. 2019) mukaan viherlevät sitovat ravinteita erittäin tehokkaasti. Oman työni tarkoitus oli tutkia edelleen keinoja ravinnepitoisten viherlevien poistamiseksi vedestä.

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään pikkujärvisimpukan (*Anodonta anatina*), isojärvisimpukan (*Anodonta cygnea*) ja sysijokisimpukan (*Unio tumidus*) kykyä käyttää kiertovesijärjestelmän jätevedestä muun muassa nitraattia sekä fosfaattia sitoneita viherleviä ravinnokseen ja poistaa näin kasviplanktoniin sitoutuneita kalan kasvatusveden ravinteita. Testissä käytetyt viherlevälajit olivat *Selenastrum* sp. ja *Monoraphidium griffithii*. Molemmat levälajit ovat makean veden mikroleviä ja molempien on tutkittu pystyvän poistamaan jäteveden ravinteita tehokkaasti (Stevčić ym. 2019). Lopes-Liman ym. (2014) tutkimuksen mukaan isojärvisimpukat pystyvät valikoimaan suodattamastaan vedestä ravinnokseen käyttämänsä partikkelit ja

suosivan ensisijaisesti viherleviä. Simpukat pystyvät valikoimaan suodattamastaan vedestä ne partikkelit jotka ottavat ruuansulatuskanavaan ja hylkäämään loput niin kutsuttuna valeulosteena (pseudofaeces). Lopes-Liman ym. (2014) tutkimus tehtiin vertaamalla simpukoiden mahojen sisältöä ympäröivän veden leväpitoisuuksiin ja leväryhmien välisiin määräsuhteisiin. Nicholsin ym. (2005) tutkimuksen mukaan makean veden simpukat ovat myös opportunistisia ravinnonhankinnassaan. Ne pystyvät hyödyntämään valeulosteena pohjasedimenttiin siirtämiään orgaanisia partikkeleita pöllyttämällä sedimenttiä ja suodattamalla partikkelit uudelleen, jos ympäröivässä vedessä ei ole riittävästi ravintoa.

Simpukoiden vaikutusta ympäröivän vesialueen vedenlaatuun on selvitetty useissa tutkimuksissa. Stybel ym. (2009) tutkivat simpukoiden hyödyntämistä kaupallisessa biopuhdistusprojektissa. Heidän tutkimuksessaan testattiin jo alueelle levittäytyneen vaeltajasimpukan (*Dreissena polymorpha*) hyödyntämistä veden puhdistamiseen Oderjoen suulla Puolassa. Tutkimuksen perusteella simpukat soveltuvat erittäin hyvin veden ravinteiden vähentämiseen. Simpukoilla ei kuitenkaan ollut sellaista kaupallista arvoa, että niitä olisi tutkimusajankohtana ollut kannattavaa kasvattaa. McLaughlan ja Aldridge (2013) tutkivat vaeltajasimpukoiden hyödyntämistä tekojärvien biologisessa vedenpuhdistuksessa. Heidän tutkimuksensa johtopäätöksenä oli, että simpukoita käyttämällä olisi mahdollista puhdistaa tekojärviä typestä ja fosforista asentamalla järviin köysiä joihin simpukat kiinnittyvät. Toisaalta tutkimuksessa painotettiin vaeltajasimpukan olevan erittäin haitallinen ja tehokkaasti leviävä vieraslaji, joten sen käyttö alueilla joille se ei ole vielä levinnyt olisi erittäin kyseenalaista ja paikasta riippuen myös laitonta.

Tutkimukseni tavoite oli selvittää simpukoiden aiheuttamaa levämäärän muutosta tutkimusalttaissa. Tutkimuksessani pohdittiin edelleen vastausta kysymykseen, voisiko levien ja simpukoiden yhteiskäytöllä poistaa kiertovesijärjestelmällä toimivan kalanviljelylaitoksen jäteveden ravinteet. Tutkimuksessa selvitettiin myös, onko viherlevä- ja simpukkalajien välillä eroja simpukoiden suodatustehokkuudessa. Lisäksi tutkimusaltaiden veteen liuenneet ravinteet mitattiin. Tällä selvitettiin, palau-



tuuko leviin sitoutuneet jäteveden ravinteet koealtaiden veteen simpukoiden käyttäessä leviää ravinnokseen. Muiden muassa Cyrin ym. (2016), Vaughnin ym. (2004), Naddafin ym. (2008), Ajjabin ym. (2018) ja Cuomon ym. (1997) tutkimusten mukaan simpukat tuottavat ympäröivään veteen ravinteita, kuten fosfaattia ja ammoniumtyyppiä. Fosfaatti vapautuisi simpukoiden ravintonaan käyttämistä levistä. Ammoniumtyypen lähde olisi puolestaan altaissa olevat simpukat koska simpukoiden hypo-osmoottinen virtsa koostuu enimmäkseen ammoniakista (katso Vaughn & Hakenkamp 2001, Vaughn ym. 2004, Cyr ym. 2017). Tutkimustulosten perusteella oli tarkoitus pohtia järjestelmän hyödyntämismahdollisuuksia teollisen mittakaavan puhdistusjärjestelmänä.

Tutkimuksen hypoteesina oli, että leväkonsentraatio vähenee simpukoita sisältävissä koealtaissa. Lisäksi hypoteesina oli, että simpukoita sisältävien altaiden ravinnemäärä kasvaa lähtötilanteeseen verrattuna simpukoiden ravinnoksi käyttämistä levistä vapautuvan nitraatin ja fosfaatin, sekä simpukoiden tuottaman ammoniakintakia.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimuksessa käytetyt simpukat haettiin Jyväsjärvestä bio- ja ympäristötieteiden laitoksen läheiseltä rannalta sukeltamalla ja kahlaamalla kesäkuussa 2019. Tutkimuksessa hyödynnettiin Jyväsjärvestä runsaslukuisina löytyviä pikkujärvisimpukkaa (*Anodonta anatina*), isojärvisimpukkaa (*Anodonta cygnea*) ja sysijokisimpukkaa (*Unio tumidus*). Tutkimuksessa käytettäviksi viherlevälajeiksi valittiin *Monoraphidium griffithii* ja *Selenastrum* sp., koska niiden oli tutkittu soveltuvan hyvin poistamaan ravinteita kalanviljelyn jätevesistä (Stevčić ym. 2019). Tutkimuksen osakokeet toistettiin neljä kertaa ja kahdella viimeisellä kerralla selvitettiin leväkonsentraation muutoksen lisäksi myös tutkimusaltaista otettujen vesinäytteiden liukoisten ravinteiden määrän muutos kokeiden aikana.

## 2.1 Tutkimusjärjestely

Kokeet tehtiin tutkimuhuoneessa, jonka lämpötilaa pystyttiin säätelemään. Huoneessa (Kuva 1) oli erilliset ylläpitoaltaat kummankin levälajin testausta varten tarkoitetuille simpukkayksilöille sekä 24 tutkimusallasta varsinaisia testejä varten. Mittauslaboratorioksi valitun huoneen lämpötilaksi säädettiin 17 °C ja sinne säädettiin himmeä valaistus, jossa valoisa aika oli klo 8–22. Käytetyn valaistuksen valotehoa ei mitattu.



Kuva 1. Simpukoiden levänsuodatusmittauksia varten valmisteltu mittauslaboratorio.

Ylläpitoaltaissa oli tutkimuksessa käytettyjen simpukoiden lisäksi myös ylimääräisiä simpukoita siltä varalta, että jokin tutkimussimpukoista olisi kuollut tutkimuksen aikana. Ylläpitoaltaiden tilavuus oli 40 litraa ja niihin järjestettiin porakaivoveden läpivirtaus, jotta simpukoiden tuottama ammoniakki ei kertyisi altaisiin ja aiheuttaisi simpukoille stressiä. Ylläpitoaltaisiin järjestettiin myös veden ilmastus ilmapumpuilla. Ylimääräisiä simpukoita ruokittiin Jyväskylän järvessä haetulla järvi-vesikonsentraatilla. Konsentraatti sisälsi runsaasti järvessä luontaisesti esiintyviä biologisia partikkeleita, joita samalta alueelta haetut simpukat käyttävät ravinnokseen.

Järvivesikonsentraatti tehtiin siivilöimällä 200 litraa järvivettä 50 µm planktonverkon läpi ja sekoittamalla se kymmeneen litraan järvivettä. Ylimääräisiä simpukoita ruokittiin ainoastaan testien aikana, jolloin tutkimussimpukat olivat siirretty ylläpitoaltaista tutkimusaltaisiin. Tällä pyrittiin varmistamaan se, että tutkimuksessa käytetyt simpukat saivat tutkimuksen aikana ravinnokseen ainoastaan tutkittavaa levää.

Simpukkayksilöt merkittiin kaivertamalla niiden kuoriin Dremel Stylo+ monitoimityökalulla kaiverrinterällä yksilöivä koodi (Kuva 2). Koodista ilmeni simpukkayksilön ravinnoksi kokeissa tarkoitettu levälaji, sekä simpukan lajikohtainen numero. Tutkimusaltaiden sijoittelussa vierekkäiset simpukka-altaat sisälsivät eri levää, mutta leväkohtaisten simpukka-altaiden 1 ja 8 vieressä olevissa kontrollialtaissa oli samaa levää, kuin näissä simpukka-altaissa.



Kuva 2. Simpukkayksilön S8Ac3 yksilöivä kaiverrus "S3". Kuvan yksilö on *Selenastrum* sp. -levää suodattaneista *Anodonta cygnea* -lajin simpukoista kolmas.

Tutkimusaltaat merkittiin koodilla (Taulukko 1), josta ilmeni altaassa oleva levälaji ja leväkohtainen järjestysnumero, sekä altaaseen tarkoitettu simpukkalaji ja lajikohtainen järjestysnumero. Kontrollialtaat merkittiin levälajiin viittaavalla kirjaimella M tai S, pienellä c kirjaimella ja vieressä olevan tutkimusaltaan leväkohtaisella numerolla 1 tai 8. Tutkimus- ja kontrollialtaisiin järjestettiin ilmastus paineilmalla. Il-

mastussysteemissä jaettiin paineilmajärjestelmästä tuleva ilmavirta saman mittaisiksi leikatuilla ilmastuskivillä varustetuilla kumiletkuilla kuhunkin altaaseen. Tutkimusaltaiden paikkoja ei vaihdettu mittausten aikana ja koeallasta vastaavalla koodilla merkitty simpukkayksilö oli jokaisessa kokeessa samassa altaassa.

Taulukko 1. Tutkimusaltaiden järjestys. Rivi tutkimushuoneen ovelta katsottuna. Oikeanpuoleinen rivi jatkuu. Lyhenteiden selitteet: M = *Monoraphidium griffithii*, S = *Selenastrum* sp., Aa = *Anodonta anatina*, Ac = *Anodonta cygnea*, U = *Unio tumidus*

Rivi	Testialtaiden järjestys käsittelykoodeittain							
Oik.	S1U1	Sc1	M1U1	Mc1	S2Ac1	M2Ac1	S3Aa1	M3Aa1
Oik. jatkuu	S4U2	M4U2	S5Ac2	M5Ac2	S6Aa2	M6Aa2	S7U3	M7U3
Vas.	S8Ac3	Sc8	M8Ac3	Mc8	S9Aa3	M9Aa3	S10U4	M10U4

Simpukkayksilöiden kuorten ulkomitat mitattiin työntömitalla 1 mm tarkkuudella koesarjojen alussa simpukoiden merkinnän yhteydessä 24.6.2019 sekä kokeiden loppua ennen simpukoiden palauttamista Jyväsjärveen 26.8.2019 (Taulukot 2 ja 3). Kuoren leveys mitattiin umbon eli saranan kohdalta 90 asteen kulmassa, pituus ja korkeus mitattiin ääriarvojen mukaan. Kuoren pituuden alku- ja loppumittaustulosten keskiarvojen perusteella laskettiin arvio simpukkayksilön kuivapainosta Raveran ja Sprocatin (1997) mukaan. *U. tumidus* simpukan kuivapaino määritettiin kaavalla:

$$y = 0,04e^{0,51x} \quad (1)$$

ja *A. anatina* sekä *A. cygnea* lajien kuivapainot kaavalla:

$$y = 0,12e^{0,31x} \quad (2)$$

Kaavoissa  $y$  on kuivapaino (g) ja  $x$  simpukkayksilön kuoren pituus (cm).

Taulukko 2. *Selenastrum* sp. tutkimusaltaiden simpukoiden koot. Lyhenteiden selitteet: Aa = *Anodonta anatina*, Ac = *Anodonta cygnea*, U = *Unio tumidus*

Simpukka	Pituus 24.6. (mm)	Pituus 26.8. (mm)	Laskennallinen kuivapaino (g)
S1U1	65	65	1,10
S4U2	79	79	2,25
S7U3	97	95	5,35
S10U4	68	68	1,28
S2Ac1	92	92	2,08
S5Ac2	120	121	5,03
S8Ac3	114	113	4,05
S3Aa1	85	86	1,70
S6Aa2	91	93	2,08
S9Aa3	95	96	2,32

Taulukko 3. *Monoraphidium griffithii*. tutkimusaltaiden simpukoiden koot. Lyhenteiden selitteet: Aa = *Anodonta anatina*, Ac = *Anodonta cygnea*, U = *Unio tumidus*

Simpukka	Pituus 24.6. (mm)	Pituus 26.8. (mm)	Laskennallinen kuivapaino (g)
M1U1	67	68	1,25
M4U2	70	70	1,42
M7U3	81	82	2,55
M10U4	78	79	2,19
M2Ac1	103	103	2,92
M5Ac2	104	103	2,97
M8Ac3	126	127	6,06
M3Aa1	102	100	2,75
M6Aa2	94	94	2,21
M9Aa3	75	79	1,31

### 2.1.1 Tutkimuksessa käytettyjen levien kasvatustorneissa

Tutkimuksessa käytetyt viherlevät kasvatettiin Ylistönrinteen bio- ja ympäristötieteiden laitoksella olevissa 60 litran levänkasvatustorneissa (Kuva 3). Kasvatustornit olivat kirkkaita pleksilasiliieriöitä, joiden sisähalkaisija 20 cm ja korkeus 2 m. Kasvatustornit oli varustettu pohjassa olevalla tyhjennysventtiilillä. Kasvatusvesi saatiin bio- ja ympäristötieteiden laitoksella olevasta kahdestatoista kalankasvatusaltaasta

koostuvasta tutkimuskokoisesta RAS-järjestelmästä. Järjestelmän kokonaistilavuus on noin 4,5 kuutiometriä. Tutkimuksessa käytetyt levät oli hankittu Norjan veden- tutkimusinstituutin (Norsk institutt for vannforskning, NIVA) kaupallisesti saatavilla olevasta leväkokoelmasta (Norwegian Culture Collection of Algae, NORCCA). *Monoraphidium griffithii* -levän kanta oli NIVA-CHL 8 ja sen alkuperäinen lähde oli Årungen järvi Akershusissa Norjassa. *Selenastrum* sp. -levän kanta oli K1877 (NIVA) ja se oli haettu alkujaan Iso-Ruuhijärvestä Hämeestä. Levien kasvatusta käynnistettiin lisäämällä RAS jätevedettä sisältäviin kasvatustorneihin 400 ml keinotekoisessa levän- kasvatusvedessä maksimitiheyden kasvatettua levää.



Kuva 3. Viherlevän kasvatustornijärjestelmä.

Leväkasvatuskasvatustorneissa oli jatkuva valaistus ja ilmastus. Valaistusteho oli kahdella UVB loisteputkivalaisimella (Valoya Oy, Helsinki; AP67 18 W LED-valaisin) n. 100  $\mu\text{mol}$  fotonia/ $\text{m}^2/\text{s}$ . Ilmastuksen määrää ei mitattu, vaan kriteerinä riittävälle ilmastukselle oli silmämääräinen veden jatkuva sekoittuminen. Levänkasvatustorneista mitattiin leväkonsentraatiot neljän vuorokauden kuluttua kasvatuksen aloittamisesta. Mittauksessa havaittiin, että *Selenastrum*- ja *Monoraphidium*-levien kasvatustorneissa kasvoi pelkästään haluttua levää, eli torneista ei havaittu minkään muun levälajin aiheuttamaa kontaminaatiota.

## 2.2 Esitesti

Tutkimuksen mittaukset aloitettiin selvittämällä, pystyvätkö järvisimpukat suodattamaan vedestä testissä käytettäviä levälajeja. Kokeessa käytettiin pikkujärvisimpukoita, jotka oli sukkellettu Jyväsjärvestä lokakuussa 2018 ja joita oli säilytetty Konneveden tutkimusasemalla. Pilottitestissä käytettiin kahta tutkimusallasta levälajia kohti. Altaista ainoastaan toisessa oli simpukka toisen toimiessa kontrollina. Koe kesti 7 vuorokautta ja levämäärän muutosta seurattiin laskemalla leväsolut mikroskoopilla. Solukonsentraatiot pyrittiin mittaamaan samana päivänä, jona näytteet oli otettu. Jos mittaus kuitenkin siirtyi myöhemmäksi, näytettä sekoitettiin koeputkiravistimella 30 sekunnin ajan, jotta näyteputkina käytettyjen Eppendorf-putkien pohjalle vajonneet leväsolut sekoittuivat näyteveteen.

Testin perusteella pikkujärvisimpukat suodattivat testialtaista molempia levälajeja. Pilottitestin perusteella selvisi myös, etteivät levät kasva merkittävästi koealtaissa, joissa ei ole simpukkaa. Testissä tutkittiin lisäksi eroja mikroskopoimalla ja CASY Electronic Cell Counter and Analyzer (OLS-OMNI Life Science GmbH & Co. Bremen, Saksa) solulaskurilla laskettujen leväkonsentraatioiden välillä. Vaikka mikroskopoimalla ja solulaskurilla mitatut solukonsentraatiot erosivat hieman toisistaan, leväkonsentraatioiden suhteellinen muutos kokeiden aikana oli molemmilla mitausmetodeilla toisiaan vastaava.



### 2.3 Menetelmät ja mittaukset

Mittaussarja koostui neljästä kokeesta (Taulukko 4), joista kahdessa ensimmäisessä mitattiin pelkästään leväkonsentraation muutosta kokeen aikana. Kahdessa viimeisessä kokeessa mitattiin lisäksi veden ravinnepitoisuus.

Ensimmäisessä kokeessa leväkonsentraatio mitattiin kokeen jokaisena päivänä, muissa kokeissa mittauksia ei tehty päivittäin, mutta kuitenkin useita kertoja kokeen aikana. Vesinäytteet pyrittiin ottamaan jokaisena mittauspäivänä klo 12, jotta konsentraatiomuutosten seurannassa pystyttiin käyttämään kokonaisten vuorokausien muutoksia. Näytteiden leväkonsentraatio pyrittiin mittaamaan välittömästi näytteenoton jälkeen. Tapauksissa, joissa tämä ei ollut mahdollista, näytteitä säilytettiin jääkaapissa analysointiin asti ja niitä sekoitettiin ennen analyysiä 30 sekunnin ajan koeputkiravistimella.

Kolmannen ja neljännen osakokeen ravinnemittaukset tehtiin kokeiden alussa ja seitsemäntenä koevuorokautena otetuista näytteistä. Kolmannessa kokeessa seurattavat ravinteet olivat ammonium- ja nitraattityppi sekä fosfaattifosfori, neljännessä kokeessa mitattiin ammoniumtypen määrää yksittäisillä mittauksilla osasta altaita kolmannen osakokeen mittaustulosten varmistamiseksi. Ravinnepitoisuusmäärittämisalunäytteet otettiin kokoomanäytteenä levänkasvatustorneista ennen leväpitoisen veden siirtämistä koealtaisiin. Seitsemännen vuorokauden kokeet tehtiin jokaisesta koealtaasta otetusta konsentraatiomittausnäytteestä.



Taulukko 4. Simpukoiden levänsuodatuskokeen osakokeiden aloituspäivä, paaston pituus ennen koetta (vrk), kokeen kesto (vrk), leväkonsentraatio kokeen alussa ( $\times 10^6$  solua/ml) ja vedestä tehdyt mittaukset kokeen aikana.

Koe	Alkupvm	Paasto (vrk)	Kesto (vrk)	Leväkonsentraatio alussa $\times 10^6$ solua/ml	Mittaukset
1.	24.6.2019	4	7	<i>Selenastrum sp.</i> 9,07 <i>M. griffithii</i> 2,51	Leväkonsentraatio
2.	4.7.2019	3	11	<i>Selenastrum sp.</i> 6,47 <i>M. griffithii</i> 3,40	Leväkonsentraatio
3.	22.7.2019	7	9	<i>Selenastrum sp.</i> 6,63 <i>M. griffithii</i> 2,90	Leväkonsentraatio, NO <sub>3</sub> -N, PO <sub>4</sub> -P, NH <sub>4</sub> -N
4.	7.8.2019	7	7	<i>Selenastrum sp.</i> 6,43 <i>M. griffithii</i> 3,56	Leväkonsentraatio, NH <sub>4</sub> -N

Tutkimuksen kokeet aloitettiin täyttämällä 12 testiallasta *Monoraphidium*-levää ja 12 testiallasta *Selenastrum*-levää sisältävällä vedellä. Altaiden nestetilavuudeksi tuli neljä litraa. Jokaisesta altaasta otettiin leväpitoisen veden lisäämisen jälkeen näytteet leväkonsentraation selvittämiseksi CASY-solulaskurilla sekä mikroskopioimalla, minkä jälkeen koealtaisiin laitettiin kokeiden välillä ylläpitoaltaassa säilytetty simpukka.

Ensimmäisessä kokeessa tutkimusaltaista otettiin näytteet leväkonsentraation mittaamista varten vuorokauden välein ja koetta jatkettiin 7 vuorokautta. Testin perusteella toisen ja kolmannen testin kesto päätettiin jatkaa kymmeneen vuorokauteen. Kokeen jatkamisen perusteena oli seurata, tapahtuuko koealtaissa merkittäviä muutoksia leväpitoisuuksissa vielä viikon seurantajakson jälkeen. Merkittävää leväpitoisuuden muutosta ei kuitenkaan havaittu. Siksi tilastollisissa testeissä käytettiin ainoastaan kunkin osakokeen seitsemää ensimmäistä koepäivää. Ensimmäisen kokeen perusteella koejärjestelyä muokattiin esimerkiksi ilmastusjärjestelyä optimoimalla ja säätämällä siten, että jokaisessa testialtaassa olisi silmämääräisesti tarkastellen mahdollisimman yhtenevä veden ilmastus ja -kierto. Johtuen kokeen aikana ja sen jälkeen tehdyistä muutoksista, ensimmäisen osakokeen tulokset jätettiin pois tilastollisesta tarkastelusta.

Toisen osakokeen päätyttyä päätettiin, että osakokeiden välillä pidetään kokeissa olleita simpukoita seitsemän vuorokautta ilman ravintoa. Tällä oli tarkoitus nopeuttaa simpukoiden suodattamisen aloittamista seuraavassa kokeessa.

Kolmannen osakokeen ravinnemittauksia varten *Selenastrum*- ja *Monoraphidium*-levätornien leväkonsentraatio laimennettiin jätevedellä siten, että molempien kasvatustornien leväkonsentraatio oli mikroskopoimalla laskettuna puoli miljoonaa solua levää/ml. Levätornien veden nitraatti- ja fosfaattipitoisuus mitattiin tornien laimentamisen jälkeen. Levän annettiin kasvaa torneissa neljä vuorokautta, minkä jälkeen levätorneista jälleen mitattiin nitraatti- ja fosfaattipitoisuudet. Sitten leväpitoinen vesi jaettiin tutkimusaltaisiin. Altaista otettiin näytteet leväkonsentraation lähtötason selvittämiseksi ja niihin lisättiin simpukka.

### 2.3.1 Leväkonsentraation ja ravinnemäärän mittaustekniikka

Leväkonsentraation mikroskooppilaskennassa käytettiin Bürkerin laskentaruudukkoa, jossa koko ruudukon pinta-ala on 9 mm<sup>2</sup> ja syvyys 0,1 mm. Tasasivuisen neliön muotoinen ruudukko on jaettu edelleen yhdeksään osaan, jotka on jaettu kuuteentoista pieneen ruutuun. Solukonsentraation mittausta tapahtuu laskemalla tietyistä määrättyä ruudukon ruutuja leväsolut ja laskemalla niistä leväkonsentraatio millilitralle nestettä oheisella kaavalla:

$$\frac{\text{Solua}}{\text{ml}} = \frac{\text{Laskettu solumäärä}}{A (\text{mm}^2) * d (\text{mm}) * \text{Laimennossuhde}} \quad (3)$$

jossa  $A$  on solumäärän laskennassa käytetyn laskentakammio-osuuden pinta-ala ja  $d$  laskentakammion syvyys. Jos näytteessä on paljon leväsoluja, sitä voidaan joutua laimentamaan laskemisen helpottamiseksi. Siinä tapauksessa laimennossuhde on huomioitava leväkonsentraation laskennassa.

CASY-solulaskurissa käytettiin leväkonsentraation selvittämiseksi 60 µm kapillaria ja mittausohjelmaa, jossa *Selenastrum*-suvun levät mitattiin kokoalueella 2,4–3,8 µm ja *Monoraphidium*-suvun levät kokoalueella 3,5–7,5 µm. Mittausalue valittiin leväsolujen koon mukaisesti ja mittalaitteen mittaustuloksena saatiin laitteen

näytteestä havaitsemien partikkelien lukumäärä asetetulta mittausalueelta. Laite laski havaintojen perusteella solukonsentraation vesimillilitraa kohti 120 µl näytteestä.

Ravinnemääritykset tehtiin 0,2 µm suodattimen läpi suodatetuista näytteistä. Määrityksissä käytettiin Hach LASA100 spektrofotometriä (Dr. Bruno Lange GmbH & Co) ja siihen tarkoitettuja ravinnemääritystestikittejä. Käytetyt testisarjat olivat fosfaatille LCK349, nitraatille LCK339 ja ammoniumille LCK304. Ravinnetestisarjojen toimintaperiaate on, että vesinäytteen fosfaatti-, nitraatti- tai ammoniumionit ja testisarjakohtaiset reagenssit reagoivat keskenään. Reaktiossa syntyy väriainetta, jonka väri-intensiteetti pystytään mittaamaan fotometrisellä mittalaitteella. Esimerkiksi fosfaatti-ionit muodostavat molybdaatti- ja antimoni-ionien kanssa prosessissa fosfomolybdeenisinistä.

### 2.3.2 Levänsuodatusnopeuden määrittäminen

Suodatusnopeus selvitettiin sekä simpukkayksilökohtaisesti että jaettuna simpukoiden laskennallisella kuivapainolla. Tämän tarkoituksena oli selvittää, onko suodatusnopeudessa eroja lajien välillä vai johtuvatko erot simpukoiden koosta. Suodatusnopeus määritettiin Bontesin ym. (2007) mukaan:

$$CR = \frac{V}{n \cdot \Delta t} * \left\{ \ln \frac{A_0}{A_t} - \ln \frac{A'_0}{A'_t} \right\}, \quad (4)$$

jossa  $CR$  tarkoittaa suodatettua vesimäärää (Clearance rate),  $V$  on suodatettava tilavuus,  $n$  on joko simpukkayksilöiden määrä tutkimusaltaassa tai tutkimusaltaassa olevan simpukan kuivapaino grammoina,  $\Delta t$  on tutkimusaika mittauksen aloitushetken tunteina,  $A_0$  on käsittelyn levämäärä kokeen alussa,  $A_t$  käsittelyn levämäärä tutkittavalla hetkellä,  $A'_0$  kontrollialtaiden levämäärän keskiarvo kokeen alussa ja  $A'_t$  kontrollialtaiden levämäärän keskiarvo tutkittavalla hetkellä.

Suodatetun veden määrästä  $CR$  pystyttiin laskemaan edelleen suodatetun levän määrä  $IR$  (Ingestion rate) simpukkayksilöittäin ja simpukoiden kuivapainoon suh-

teutettuna. Laskentaan hyödynnettiin Frostin (1972) tutkimuksen kaavaa keskimääräisen levämäärän  $\langle A \rangle$  selvittämiseksi. Keskimääräisen levämäärän selvittämistä varten piti laskea ensin levänkasvuvakio  $k$  kontrollikäsittelyjen levämäärämuutoksen perusteella kaavalla:

$$k = \ln \frac{A'_0/A'_t}{\Delta t} \quad (5)$$

Tämän lisäksi mittausdatasta laskettiin laiduntamisvakio (grazing coefficient)  $g$  kaavalla:

$$g = k - \ln \frac{A_0/A_t}{\Delta t} \quad (6)$$

Kaavasta lasketulla  $g$ :n arvolla oli mahdollista laskea keskimääräinen levämäärä kaavalla:

$$\langle A \rangle = \frac{A_0 * (e^{(k-g)*\Delta t} - 1)}{\Delta t * (k-g)} \quad (7)$$

Suodatetun levän määrä  $IR$  saatiin kertomalla suodatetun veden määrä  $CR$  keskimääräisellä levämäärällä  $\langle A \rangle$ .

## 2.4 Aineiston tilastollinen käsittely

Aineisto analysoitiin käyttäen IBM:n SPSS Statistics (versio 26) ohjelmaa. Ravinmäärän muutosta kokeiden alun ja seitsemännen vuorokauden välillä analysoitiin  $t$ -testillä, leväpitoisuuksien muutosta kaksisuuntaisella toistomittausvarianssianalyysillä ja kontrollikäsittelyjen leväkonsentraatioiden sekä suodatusnopeuksien muutosta yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Tutkimuskäsittelyjen eli simpukkalajien välisten suodatusnopeus- ja leväkonsentraatioerojen parittainen vertailu tehtiin Tukeyn testillä. Tilastollisissa testeissä käytetyt leväkonsentraatiot olivat suhteellisia osuuksia kokeiden lähtötilanteesta. Kokonaismittausdatan tilastollisissa testeissä erotettiin ensimmäinen osakoe muista kokeista, koska kokeen aikana ja sen jälkeen tehtiin muutoksia testialtisiin. Tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona kaikissa testeissä oli 0,05 ja tilastollisen suuntaa-antavuuden raja-arvona 0,10.

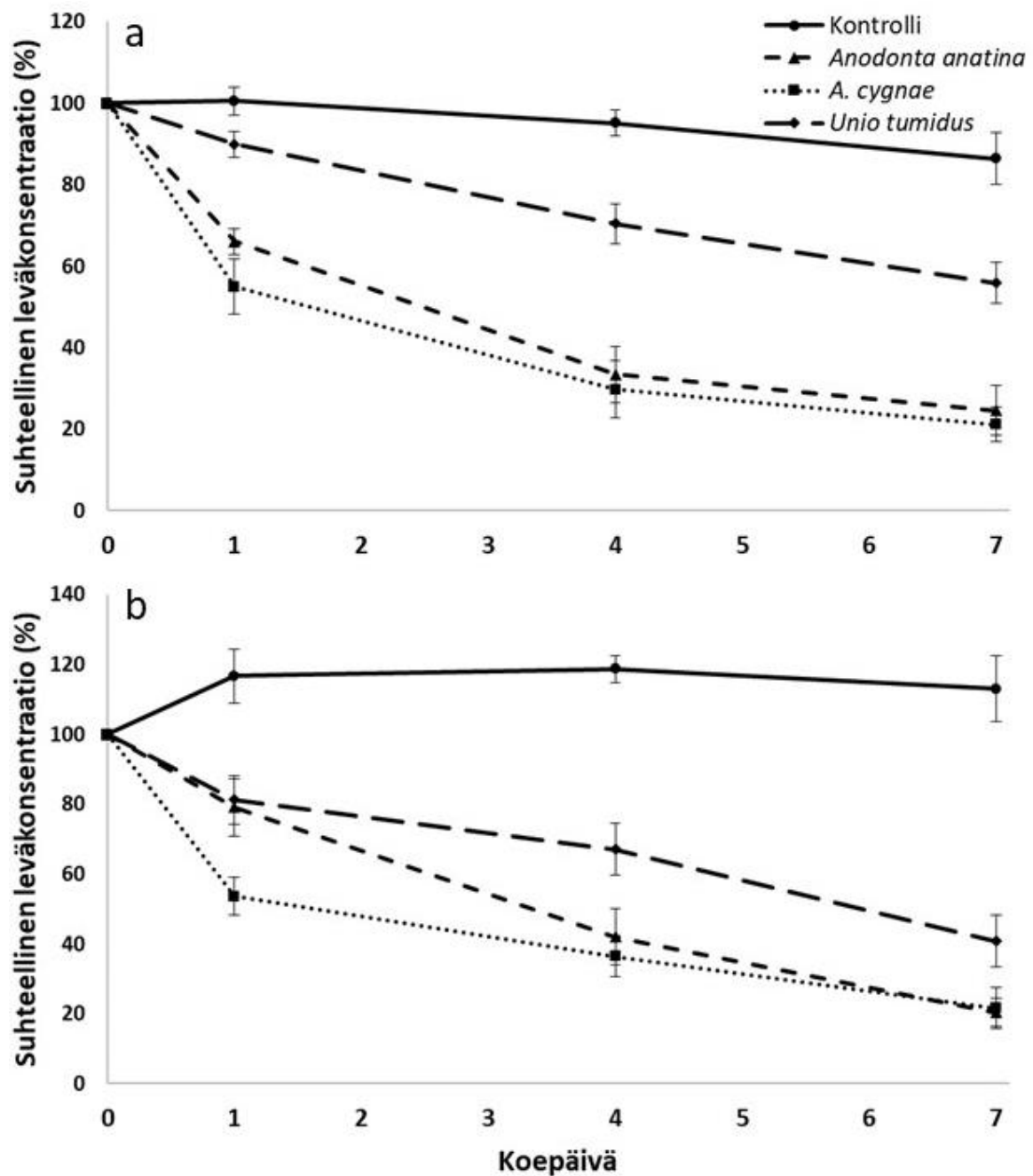
## 3 TULOKSET

### 3.1 Leväpitoisuustulokset

*Selenastrum* sp. -leväkonsentraation muutos (Liite 1) kokeiden 2, 3 ja 4 mittauspäivinä 1, 4 ja 7 oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausvarianssianalyysi within subject effects,  $F=49,585$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ). Ajan ja käsittelyjen, eli eri simpukkalajien ja kontrollien, yhteisvaikutus ei ollut tilastollisesti merkitsevä, eli keskimääräiset muutokset olivat kaikissa käsittely- ja kontrollialtaissa saman suuntaisia ( $F=1,953$ ,  $df=6$ ,  $p=0,086$ ). Käsittelyjen väliset erot olivat merkitseviä (between subject effects,  $F=30,309$ ,  $df=3$ ,  $p<0,001$ ). Molemmissa järvisimpukkalajeja sisältäneissä tutkimusaltaissa oli merkitsevästi pienempi *Selenastrum* sp. -leväpitoisuus verrattuna sekä sysijokisimpukka-altaisiin (Tukey,  $p<0,001$ ) että kontrollialtisiin (Tukey,  $p<0,001$ ), eivätkä ne eronneet toisistaan merkitsevästi (Tukey,  $p=0,507$ ). Lisäksi sysijokisimpukoita sisältäneiden tutkimusaltaiden leväpitoisuus oli merkitsevästi kontrollialtaita pienempi (Tukey,  $p=0,029$ ) (Kuva 4a).

Leväkonsentraatiot muuttuivat 7 vuorokauden aikana *Monoraphidium griffithii* -levää sisältäneissä koe- ja kontrollialtaissa (Liite 1) kokeissa 2, 3 ja 4 merkitsevästi ajan kuluessa (toistomittausvarianssianalyysi within subject effects,  $F=49,327$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ) Erot olivat merkitseviä myös ajan ja käsittelyjen yhdistelmänä ( $F=5,531$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ). Käsittelyjen väliset erot olivat merkitseviä (between subject effects,  $F=22,494$ ,  $df=3$ ,  $p<0,001$ ). *Anodonta*-suvun simpukkalajien välillä ei ollut merkitsevää eroa (Tukey,  $p=0,507$ ). Isojärvisimpukoita sisältäneiden altaiden leväkonsentraatio oli merkitsevästi pienempi verrattaessa sekä kontrollialtaiden että sysijokisimpukka-altaiden leväkonsentraatioihin (Tukey,  $p<0,01$ ). Pikkujärvisimpukka-altaiden leväkonsentraatio oli kontrollialtaiden konsentraatiosta merkitsevästi pienempi (Tukey,  $p<0,01$ ) ja sysijokisimpukka-altaiden konsentraatiota tilastollisesti suuntaa-antavasti pienempi (Tukey,  $p=0,054$ ). Lisäksi sysijokisimpukka-altaiden leväpitoisuus oli merkitsevästi kontrollialtaita pienempi (Tukey,  $p < 0,01$ ) (Kuva 4b).

Verrattaessa kontrollialtaiden leväkonsentraatioita käytettyjen levälajien välillä, havaittiin *M. griffithii* -altaiden leväkonsentraation olevan suuntaa-antavasti *Selenastrum* sp. -levää sisältäneiden altaiden leväkonsentraatiota korkeampi kokeiden ensimmäisenä vuorokautena ja merkittävästi korkeampi kokeiden neljäntenä ja seitsemäntenä vuorokautena (1 vrk ANOVA,  $F=4,363$ ,  $df=1$ ,  $p=0,063$ , 4 vrk ANOVA,  $F=31,335$ ,  $df=1$ ,  $p<0,001$ , 7 vrk ANOVA,  $F=8,326$ ,  $df=1$ ,  $p=0,016$ ) (Kuvat 4a ja 4b).



Kuva 4. *Selenastrum* sp. (a) ja *Monoraphidium griffithii* (b) -levien suhteellinen pitoisuus verrattuna lähtötilanteeseen koe- ja kontrollialtaissa (mittausten keskiarvo  $\pm$  s.e.) osakokeissa 2-4

kontrollialtaissa (n=2) ja simpukka-altaissa (*Anodonta anatina* n=3, *A. cygnea* n=3, *Unio tumidus* n=4).

### 3.2 Suodatusnopeustulokset

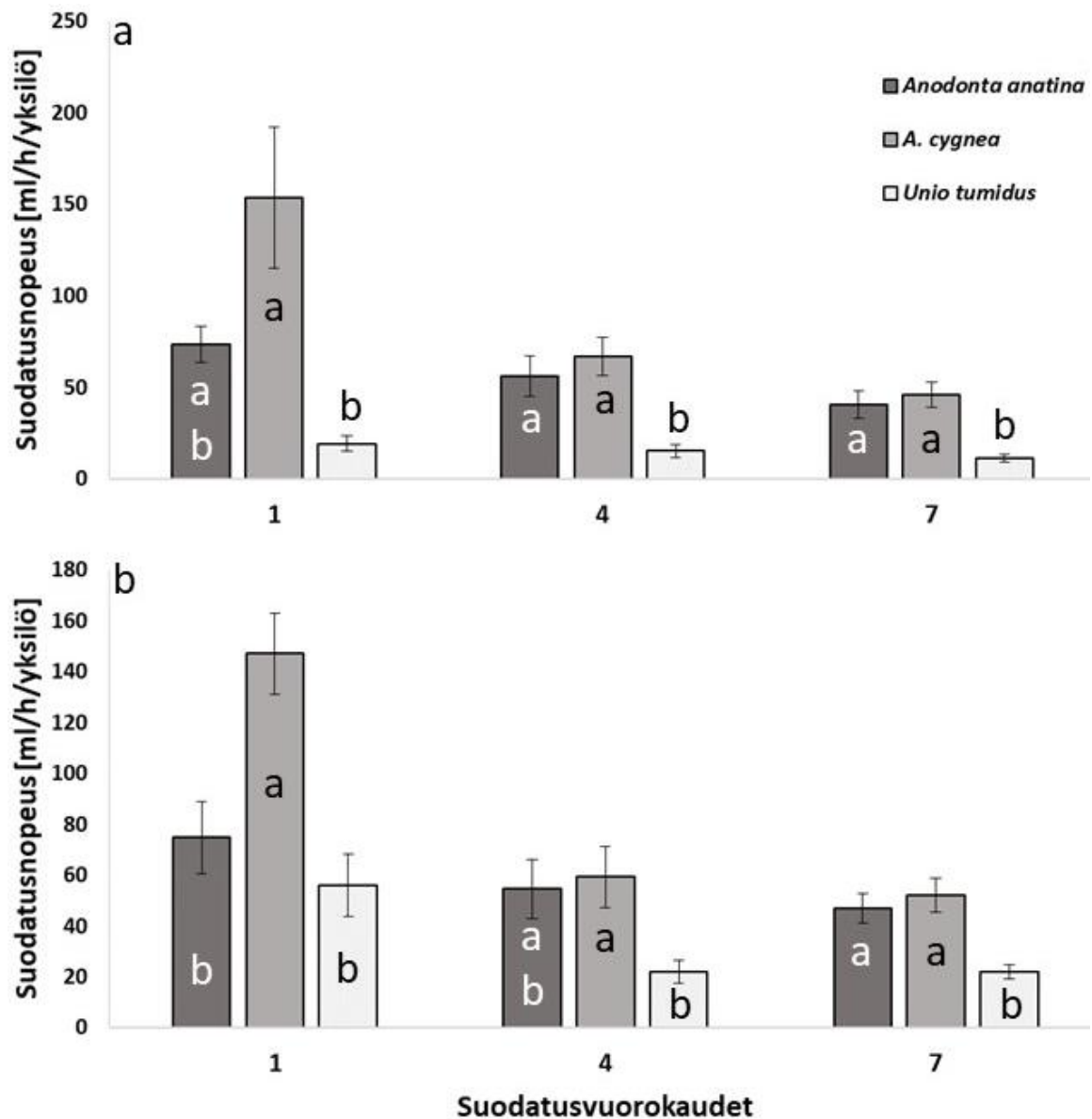
*Selenastrum* sp. -levää suodattaneiden simpukoiden yhden, neljän ja seitsemän vuorokauden keskimääräiset yksilökohtaiset suodatusnopeudet (ml/h/yksilö) (Liite 2) erosivat tilastollisesti merkitsevästi simpukkalajeittain (1 vrk ANOVA,  $F=9,540$ ,  $df=2$ ,  $p=0,001$ , 4 vrk ANOVA,  $F=10,423$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ , 7 vrk ANOVA,  $F=11,221$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ). Isojärvisimpukka suodatti ensimmäisen koevuorokauden aikana merkitsevästi enemmän koealtaiden leväpitoista vettä verrattuna sysijokisimpukkaan (Tukey,  $p<0,001$ ). Ero iso- ja pikkujärvisimpukan ensimmäisen vuorokauden suodatusnopeudessa oli tilastollisesti suuntaa antava (Tukey,  $p=0,055$ ). Ensimmäisen vuorokauden suodatusnopeuksien yksilökohtaisissa *Selenastrum* sp. -levän suodatusnopeuksissa ei ollut merkitsevää eroa pikkujärvisimpukan ja sysijokisimpukan välillä (Tukey,  $p=0,202$ ). Neljän ja seitsemän vuorokauden suodatusnopeuksissa ei ollut merkitseviä eroja iso- ja pikkujärvisimpukoiden välillä (4 vrk Tukey,  $p=0,694$ , 7 vrk Tukey,  $p=0,804$ ). Sekä iso- (4 vrk Tukey,  $p=0,001$ , 7 vrk Tukey,  $p=0,001$ ) että pikkujärvisimpukan (4 vrk Tukey,  $p=0,006$ , 7 vrk Tukey,  $p=0,003$ ) neljän ja seitsemän vuorokauden keskimääräiset yksilö- ja tuntikohtaiset suodatusnopeudet olivat merkitsevästi suurempia verrattuna sysijokisimpukkaan (Kuva 5a).

*Monoraphidium griffithii* -levää suodattaneiden simpukoiden yhden, neljän ja seitsemän vuorokauden keskimääräiset yksilökohtaiset suodatusnopeudet (Liite 2) erosivat merkitsevästi simpukkalajeittain (1 vrk ANOVA,  $F=10,508$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ , 4 vrk ANOVA,  $F=4,754$ ,  $df=2$ ,  $p=0,017$ , 7 vrk ANOVA,  $F=10,106$ ,  $df=2$ ,  $p=0,001$ ). Isojärvisimpukka suodatti ensimmäisen koevuorokauden aikana merkitsevästi enemmän leväpitoista vettä verrattuna sysijokisimpukkaan (Tukey,  $p<0,001$ ) ja pikkujärvisimpukkaan (Tukey,  $p=0,007$ ). Pikkujärvisimpukan ja sysijokisimpukan ensimmäisen vuorokauden suodatusnopeuksien välillä ei ollut merkitsevää eroa (Tukey,  $p=0,634$ ). Neljän ja seitsemän vuorokauden suodatusnopeuksissa ei ollut merkitsevää eroa iso- ja pikkujärvisimpukoiden välillä (4 vrk Tukey,  $p=0,944$ , 7 vrk Tukey,

$p=0,788$ ). Sysijokisimpukan neljän vuorokauden yksilö- ja tuntikohtainen keskimääräinen suodatusnopeus oli merkitsevästi pienempi kuin isojärvisimpukalla (Tukey,  $p=0,027$ ) ja tilastollisesti suuntaa antavasti pienempi kuin pikkujärvisimpukalla (Tukey,  $p=0,057$ ). Sysijokisimpukoiden seitsemän vuorokauden keskimääräinen yksilö- ja tuntikohtainen suodatusnopeus oli merkitsevästi pienempi sekä iso- (Tukey,  $p=0,001$ ) että pikkujärvisimpukkaa (Tukey,  $p=0,006$ ) (Kuva 5b).

Verrattaessa yksilökohtaisia levänsuodatusnopeuksia simpukkalajeittain levälajien välillä havaittiin sysijokisimpukoiden yhden ja seitsemän vuorokauden suodatusnopeuden olevan merkitsevästi nopeampi suodatettaessa *Monoraphidium griffithii* -levää, kuin *Selenastrum* sp. -levää (1 vrk ANOVA,  $F=7,493$ ,  $df=1$ ,  $p=0,012$ , 7 vrk ANOVA,  $F=7,500$ ,  $df=1$ ,  $p=0,012$ ). Sysijokisimpukan neljän vuorokauden tuntikohtainen suodatusnopeus ei eronnut merkitsevästi levälajien välillä. Iso- ja pikkujärvisimpukan leväkohtaiset yhden, neljän eikä seitsemän vuorokauden yksilö- ja tuntikohtaiset suodatusnopeudet eivät eronneet merkitsevästi toisistaan (Kuvat 5a ja 5b).





Kuva 5. *Selenastrum* sp. (a) ja *Monoraphidium griffithii* (b) -levien yhden, neljän ja seitsemän vuorokauden yksilökohtaisten suodatusnopeuksien keskiarvot [ml/h/yksilö] simpukkalajeittain (*Unio tumidus* n=4, *Anodonta cygnea* ja *A. anatina* n=3) osakokeissa 2-4. Viiksikuvaaja ilmaisee keskiarvon keskivirheen. Y-akselin asteikko vaihtuu eri kuvissa mittaustulosten perusteella. Kirjaimet palkkien sisällä (a, b) kertovat ryhmät joissa erot eivät olleet merkitseviä.

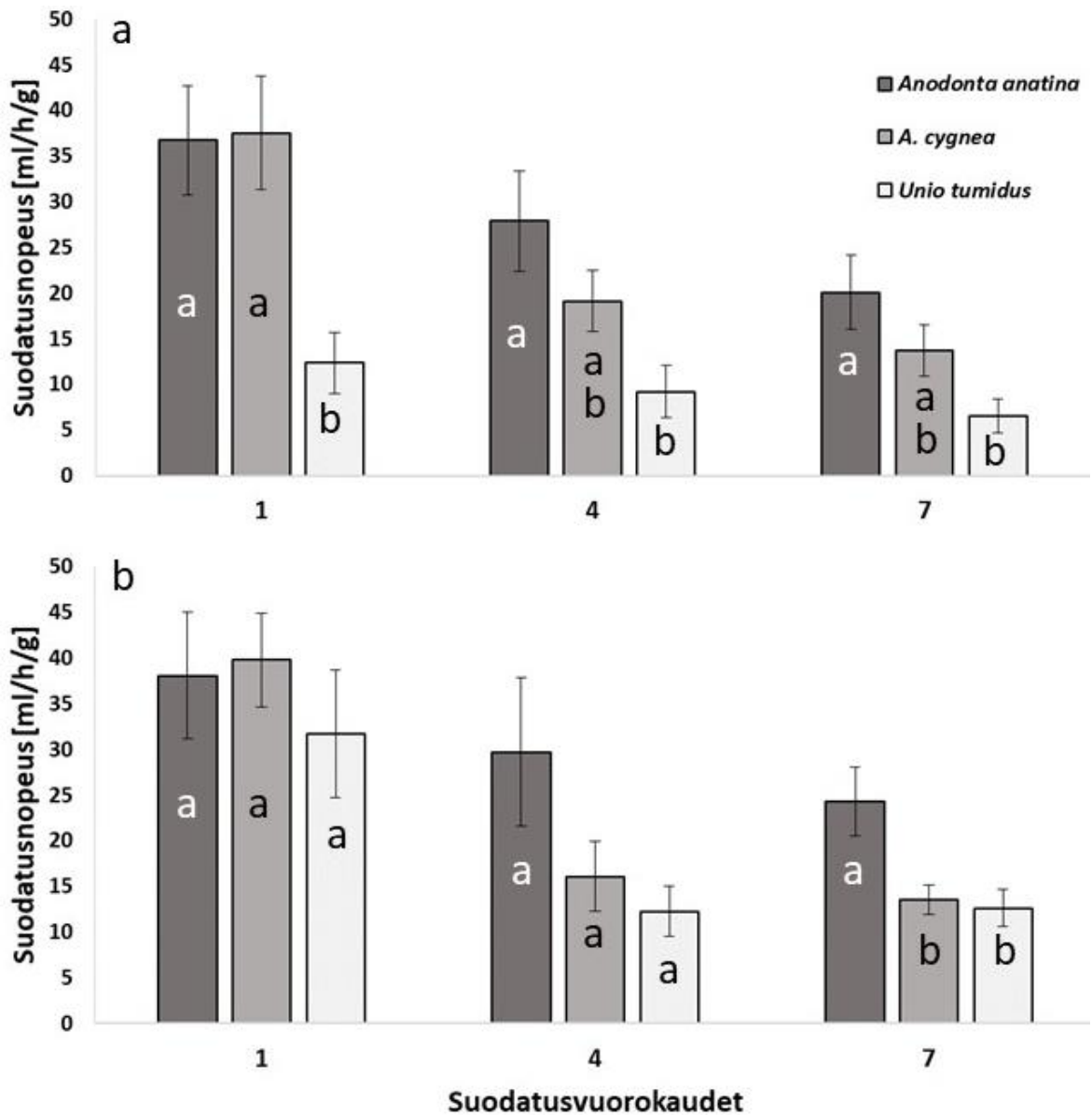
*Selenastrum* sp. -levää suodattaneiden simpukoiden kuorenpituuden perusteella laskettuun kuivapainoon suhteutettu suodatusnopeus (ml/h/g) (Liite 3) erosi tilastollisesti merkitsevästi simpukkalajeittain ensimmäisenä mittauspäivänä (ANOVA,  $F=7,788$ ,  $df=2$ ,  $p=0,002$ ). *Anodonta*-suvun lajien välillä ei havaittu eroa (Tukey,  $p=0,995$ ), mutta sysijokisimpukoiden ensimmäisen vuorokauden suodatusnopeus oli merkitsevästi matalampi verrattuna sekä pikkujärvisimpukkaan (Tukey,  $p=0,008$ ) että isojärvisimpukkaan (Tukey,  $p=0,006$ ). Myös neljän (ANOVA,  $F=5,370$ ,

df=2, p=0,011) ja seitsemän (ANOVA, F=5,260, df=2, p=0,012) vuorokauden suodatusnopeuksissa oli merkitseviä simpukkalajikohtaisia eroja. Lajien kokoon suhteutettu suodatusnopeus oli sysijokisimpukalla merkitsevästi matalampi verrattuna pikkujärvisimpukkaan neljän (Tukey, p=0,008) ja seitsemän (Tukey, p=0,009) vuorokauden tuntikohtaisessa, kokoon suhteutetussa suodatusnopeudessa. Isojärvisimpukka ei eronnut neljän ja seitsemän vuorokauden kokoon suhteutetussa suodatusnopeudessa merkitsevästi pikkujärvisimpukasta (4 vrk Tukey, p=0,342, 7vrk Tukey, p=0,345), eikä myöskään sysijokisimpukasta (4 vrk Tukey, p=0,212, 7vrk Tukey, p=0,219) (Kuva 6a).

*Monoraphidium griffithii* -levää suodattaneiden simpukoiden kokoon suhteutettu suodatusnopeus (Liite 3) ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi simpukkalajeittain ensimmäisenä mittauspäivänä (ANOVA, F=0,399, df=2, p=0,675). Neljän vuorokauden suodatusnopeuksissa oli simpukkalajien välillä tilastollisesti suuntaa antava ero (ANOVA, F=2,930, df=2, p=0,071). Pikkujärvisimpukan suodatusnopeus oli tilastollisesti melkein merkitsevästi korkeampi, kuin sysijokisimpukan suodatusnopeus (Tukey, p=0,065). Pikku- ja isojärvisimpukan suodatusnopeuksien välillä ei ollut merkitsevää eroa (Tukey, p=0,290). Myöskään isojärvisimpukan ja sysijokisimpukan välillä ei ollut merkitsevää eroa neljän vuorokauden keskimääräisessä suodatusnopeudessa (Tukey, p=0,863). Seitsemän vuorokauden keskimääräisessä kokoon suhteutetussa tuntikohtaisessa suodatusnopeudessa oli sen sijaan merkitsevä ero simpukkalajien välillä (ANOVA, F=5,591, df=2, p=0,009). Pikkujärvisimpukan seitsemän vuorokauden keskimääräinen suodatusnopeus oli merkitsevästi korkeampi verrattuna sekä isojärvisimpukkaan (Tukey, p=0,031) että sysijokisimpukkaan (Tukey, p=0,012). Sysijokisimpukan ja isojärvisimpukan suodatusnopeuksien välillä ei ollut merkitsevää eroa (Tukey, p=0,971) (Kuva 6b).

Verrattaessa simpukoiden kokoon suhteutettuja levänsuodatusnopeuksia simpukkalajeittain levälajien välillä havaittiin ensimmäisen vuorokauden suodatusnopeuden olevan sysijokisimpukoilla merkitsevästi matalampi suodatettaessa *Selenastrum* sp. -levää, kuin *Monoraphidium griffithii* -levää (ANOVA, F=5,659, df=1, p=0,026). Neljän vuorokauden tuntikohtaisessa suodatusnopeudessa ei ollut merkitsevää

eroa (ANOVA,  $F=0,553$ ,  $df=1$ ,  $p=0,465$ ), mutta seitsemän vuorokauden suodatusnopeudessa ero oli merkitsevä (ANOVA,  $F=4,615$ ,  $df=1$ ,  $p=0,043$ ). Pikku- ja isojärvisimpukalla *M. griffithii* -levän tuntikohtainen suodatusnopeus ei eronnut merkitsevästi *Selenastrum* sp. -levän suodatusnopeudesta (Kuvat 6a ja 6b).



Kuva 6. *Selenastrum* sp. (a) ja *Monoraphidium griffithii* (b) -levien yhden, neljän ja seitsemän vuorokauden simpukan kuivamassakohtaisten suodatusnopeuksien keskiarvot [ml/h/g] simpukalajeittain (*Anodonta anatina* n=3, *A. cygnea* n=3, *Unio tumidus* n=4) osakokeissa 2-4. Viiksiluuaaja ilmaisee keskiarvon keskivirheen. Kirjaimet palkkien sisällä (a, b) kertovat ryhmät joissa erot eivät olleet merkitseviä.

### 3.3 Ravinnemittaustulokset

Nitraattitypen määrä ei muuttunut kokeiden aikana *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä koe- tai kontrollialtaissa (Taulukko 5, *t*-testi,  $n=12$ ,  $p=0,944$ ), joskin sysijokisimpukka-altaissa nitraattitypen määrä oli vähentynyt tilastollisesti suuntaa antavasti (*t*-testi,  $n=4$ ,  $p=0,063$ ). *Monoraphidium griffithii* -levää sisältäneissä altaissa nitraattitypen määrä oli niin vähäinen, että mittaustulokset jäivät molemmilla mittauskerroilla alle käytettävissä olevien testikittien luotettavan mittausrajan 0,23 mg/l.

Taulukko 5. Nitraattitypen pitoisuuksien käsittelykohtaiset keskiarvot kolmannen osakokeen alussa (d0) ja seitsemän mittauspäivän jälkeen (d7) *Selenastrum* sp. -koealtaissa.

Levälaji	Käsittely	n	NO <sub>3</sub> -N d0	NO <sub>3</sub> -N d7	Pitoisuuksien eron <i>p</i> -arvo
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>A. anatina</i>	3	1,91 mg/l	2,02 mg/l	0,220
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>A. cygnea</i>	3	1,91 mg/l	2,13 mg/l	0,220
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>U. tumidus</i>	4	1,91 mg/l	1,66 mg/l	0,063
<i>Selenastrum</i> sp.	Kontrolli	2	1,91 mg/l	1,89 mg/l	0,636
<i>Selenastrum</i> sp.	Yhteensä	12	1,91 mg/l	1,91 mg/l	0,944

Fosfaattifosforin määrä oli molemmilla levälajeilla kaikissa koe- ja kontrollialtaissa alle käytössä olleiden testikittien luotettavan mittausrajan 0,05 mg/l.

Ammoniumtypen määrä lisääntyi merkitsevästi kaikissa *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä koe- ja kontrollialtaissa kolmannen osakokeen aikana (Taulukko 6, *t*-testi,  $n=12$ ,  $p<0,001$ ). Pitoisuuden lisääntyminen vaihteli käsittelyittäin.

*Monoraphidium griffithii* -levää sisältäneissä altaissa ei tapahtunut tilastollisesti merkitsevää ammoniumtypen määrän muutosta (Taulukko 7, *t*-testi,  $n=12$ ,  $p=0,391$ ). Yksittäisistä käsittelyistä sysijokisimpukka-altaissa (*t*-testi,  $n=4$ ,  $p=0,006$ ) ja kontrol-

lialtaissa ( $t$ -testi,  $n=2$ ,  $p=0,018$ ) ammoniumtypen määrä oli vähentynyt merkitsevästi. Iso- ja pikkujärvisimpukka-altaissa ammoniumtypen määrä ei ollut muuttunut merkitsevästi.

Taulukko 6. Ammoniumtypen pitoisuuksien käsittelykohtaiset keskiarvot kolmannen osakkeen alussa (d0) ja seitsemän mittauspäivän jälkeen (d7) *Selenastrum* sp. -koealtaissa. Merkitsevät erot tummennettu.

Levälaji	Käsittely	n	NH <sub>4</sub> -N d0	NH <sub>4</sub> -N d7	Pitoisuuksien eron <i>p</i> -arvo
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>A. anatina</i>	4	0,01 mg/l	1,09 mg/l	<b>0,024</b>
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>A. cygnea</i>	3	0,01 mg/l	0,59 mg/l	<b>0,003</b>
<i>Selenastrum</i> sp.	<i>U. tumidus</i>	3	0,01 mg/l	0,27 mg/l	<b>0,008</b>
<i>Selenastrum</i> sp.	Kontrolli	2	0,01 mg/l	0,27 mg/l	<b>0,002</b>
<i>Selenastrum</i> sp.	Yhteensä	12	0,01 mg/l	0,55 mg/l	<b>&lt;0,001</b>

Taulukko 7. Ammoniumtypen pitoisuuksien käsittelykohtaiset keskiarvot kolmannen osakkeen alussa (d0) ja seitsemän mittauspäivän jälkeen (d7) *Monoraphidium griffithii* -koealtaissa. Merkitsevät erot tummennettu.

Levälaji	Käsittely	n	NH <sub>4</sub> -N d0	NH <sub>4</sub> -N d7	Pitoisuuksien eron <i>p</i> -arvo
<i>M. griffithii</i>	<i>A. anatina</i>	4	0,09 mg/l	0,17 mg/l	0,258
<i>M. griffithii</i>	<i>A. cygnea</i>	3	0,09 mg/l	0,33 mg/l	0,281
<i>M. griffithii</i>	<i>U. tumidus</i>	3	0,09 mg/l	0,03 mg/l	<b>0,006</b>
<i>M. griffithii</i>	Kontrolli	2	0,09 mg/l	0,02 mg/l	<b>0,018</b>
<i>M. griffithii</i>	Yhteensä	12	0,09 mg/l	0,14 mg/l	0,391

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

### 4.1 Leväpitoisuus

Yhtenä tutkimuksen hypoteeseista oli, että leväkonsentraatio pienenee simpukoita sisältävissä altaissa ja tutkimustulokset tukivat tätä hypotesia. Tutkimustulosten (Kuva 4, Liite 1) perusteella kaikki kokeessa käytetyt simpukkalajit suodattivat molempia kokeessa käytettyjä levälajeja. Tämä havaittiin levänkonsentraation tilastollisesti merkitsevästä pienenemisestä verrattuna kontrollialtaisiin kokeiden edetessä.

Tulosten perusteella *Anodonta*-suvun simpukat vähensivät tutkimusaltaiden levää sysijokisimpukoita tehokkaammin, ja isojärvisimpukoita sisältäneissä altaissa leväkonsentraatio väheni hieman nopeammin kokeiden alussa verrattuna pikkujärvisimpukka-altaisiin. Kokeiden edetessä iso- ja pikkujärvisimpukoita sisältäneissä koealtaissa leväkonsentraatiot muuttuivat toisiaan vastaaviksi. Pikkujärvisimpukat vähensivät molempia levälajeja yhtä tehokkaasti. Sysijokisimpukat vähensivät *M. griffithii* -levää merkitsevästi *Selenastrum* sp. -levää enemmän.

Leväpitoisuus kasvoi *M. griffithii* -levää sisältäneissä kontrollialtaissa, mutta pieneni *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä kontrollialtaissa. Tämä osoittaa, että *M. griffithii* -levä pystyy lisääntymään koetilassa ja -altaissa olevissa olosuhteissa, toisin kuin *Selenastrum* sp. -levä.

Kokeen aikana havaittiin melko suurta vaihtelua altaiden leväkonsentraatiossa eri kokeiden, eri päivien ja eri simpukkayksilöiden välillä. Kokonaisuutena katsottuna vaikuttaisi kuitenkin siltä, että isojärvisimpukat vähensivät levää koealtaista erittäin tehokkaasti jo ensimmäisenä koepäivänä. Ensimmäisen koepäivän jälkeen leväpitoisuus pääsi kasvamaan etenkin *M. griffithii* -levää sisältäneissä altaissa. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että simpukat säästivät energiaa olemalla suodattamatta odottaessaan ympäröivän veden ravintopitoisuuden kasvamista. Lepovaiheessa simpukoiden kuoret olivat suljettuina kun suodattavilla simpukoilla kuori on raollaan ja molemmat sifonit, eli sisään- ja ulossuodatusputket näkyvillä. Pikkujärvi-

simpukoiden kohdalla sama kehitys oli hieman hitaampaa ja siinä oli enemmän yksilökohtaista vaihtelua. Tyypillisesti pikkujärvisimpukoita sisältäneissä altaissa leväkonsentraatio oli vähentynyt erittäin pieneksi kolmanteen koepäivään mennessä. Sysijokisimpukoita sisältäneissä altaissa ei ollut havaittavissa samanlaista nopeaa leväpitoisuuden alenemista, niissä leväpitoisuus väheni tasaisesti kokeen kuluessa.

Simpukoiden suodatusnopeuden testaamiseksi käytetyt kokeet ovat erilaisia riippuen käytettävissä olevista tiloista, mittausmetodeista ja työvälineistä. Siitä johtuen tämän kokeen leväkonsentraatiotuloksia ei voi suoraan verrata muihin tutkimuksiin, niillä pystytään ainoastaan havainnoimaan suuntaa antavasti eroja käsittelyjen välillä. Leväkonsentraatiomuutoksista lasketut suodatusnopeudet ovat sen sijaan yleisesti tutkimuksessa käytettyjä ja siten muihin tutkimuksiin vertailukelpoisia tuloksia.

## 4.2 Suodatusnopeus

Tämän työn leväkonsentraatiomuutosten perusteella lasketut leväpitoisen veden suodatusnopeudet olivat erittäin matalia verrattuna julkaistuihin tutkimuksiin jokisimpukoiden (Unionidae) heimoon kuuluvien lajien suodatusnopeuksista. Tutkimukseni *Anodonta*-suvun järvisimpukoiden kuivapainoon suhteutettu suodatusnopeus oli molemmilla levälajeilla 35-40 ml/h/g. Sysijokisimpukoiden suodatusnopeus oli *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä koealtaissa 12 ml/h/g ja *M. griffithii* -levää sisältäneissä altaissa 30 ml/h/g. Esimerkiksi Krygerin ja Riisgårdin (1988) tutkimuksessa pikkujärvisimpukan ja sysijokisimpukan kuivapainoon suhteutetuksi suodatusnopeudeksi oli saatu noin 1000 ml/h/g. Bontesin ym. (2007) tutkimuksessa pikkujärvisimpukoiden koetulosten perusteella arvioidut maksimaaliset suodatusnopeudet olivat levälajista riippuen noin 200-500 ml/h/g. Puschin ym. (2001) tutkimuksessa pikkujärvisimpukoiden suodatusnopeus oli 170-620 ml/h/g ja sysijokisimpukoilla 150-480 ml/h/g.

Oman tutkimukseni matalat suodatusnopeudet voivat johtua eroista tutkimusaltaissa sekä mittausajoissa verrattuna muihin tutkimuksiin. Krygerin ja Riisgårdin

(1988) tutkimuksessa tutkimusaltaiden pohjalle on järjestetty sedimenttikerros, mihin simpukat voivat kaivautua. Suodatusnopeuden laskemiseksi käytetyt leväkonsentraatiomittaukset ajoitettiin siten, että simpukoiden annettiin kaivautua altaiden pohjasedimenttiin ja aloittaa suodatus ennen vesinäytteiden ottamista. Vesinäytteet otettiin kahdella imuletkulla, jotka oli asetettu 2-4 mm simpukoiden sisäänotto- ja hylkyaukkojen yläpuolelle ja näytteenottoaika oli 30 minuutista 2 tuntiin. Bontesin ym. (2007) tutkimuksessa tutkimusaltaiden pohjilla ei ollut sedimenttiä. Tutkimuksessa mitattiin suodatusnopeutta samoin kuin omassa tutkimuksessani, mutta vesinäytteet otettiin 60 minuutin kuluttua siitä hetkestä, kun tutkimusaltaan simpukan havaittiin aloittavan veden suodattaminen. Omassa tutkimuksessani otettiin ensimmäiset vesinäytteet leväkonsentraation mittaamiseksi ennen simpukoiden lisäämistä altaaseen ja 24 tunnin kuluttua simpukoiden altaisiin lisäämisestä. Tutkimusaltaideni tilavuus oli niin pieni, että esimerkiksi Krygerin ja Riisgårdin (1988) mittaamalla maksimaalisilla suodatusnopeuksilla tutkimusaltaan simpukka olisi ehtinyt suodattaa altaan vesimäärän moninkertaisesti tutkimukseni näytteenottojen välillä. Havaitsin oman tutkimukseni aikana, että tutkimusaltaiden vesi saattoi kirkastua läpinäkyväksi yksittäisissä altaissa kahden tunnin aikana. Koska suodatusnopeus lasketaan leväkonsentraatioeroista mittaushetkien välissä, on mahdollista, että kokeeni simpukat suodattivat ainakin hetkellisesti huomattavasti nopeammin vettä kuin mittaustulosteni perusteella on laskettavissa.

Isojärvisimpukoilla tehtyjä lajikohtaisia tutkimuksia suodatusnopeudesta on vähemmän kuin pikkujärvisimpukoilla ja sysijokisimpukoilla tehtyjä kokeita. Moëzzi ym. (2013) tutkivat sinkin ja kromin vaikutusta isojärvisimpukoiden suodatusnopeuteen. Tutkimuksessa kahden tunnin aikana viidentoista minuutin välein mitatut isojärvisimpukoiden suodatusnopeudet olivat enimmillään n. 200 ml/h/g, eli muihin tutkimuksiin verrattuna matalia. Toisaalta tutkimuksessa simpukoilla ei ollut ympäröivässä vedessä suodatettavaa ravintoa, vaan tutkimuksessa käytettyjä, vesieliöille haitallisia sinkkiä ja kromia eri konsentraatioissa. Täten on mahdollista, että kokeen simpukat eivät suodattaneet ympäröivän koeveden partikkeleita niin nopeasti kuin fysiologisesti olisi mahdollista. Oman tutkimukseni perusteella iso-



ja pikkujärvisimpukoiden kokoon suhteutetut suodatusnopeudet eivät eroa merkittävästi toisistaan.

Leväpitoisuusmuutosten perusteella laskettu yksilö- ja kuivapainokohtainen suodatusnopeus (Kuvat 5 ja 6, Liitteet 2 ja 3) pieneni huomattavasti kokeiden edetessä lähes kaikissa käsittelyissä, eli simpukka- ja levälajien yhdistelmissä. Sysijokisimpukoiden *Selenastrum* sp. -levän suodatusnopeus ei hidastunut kokeen edetessä, mutta se oli erittäin matala koko kokeen ajan. Kokeen simpukoista pikkujärvisimpukat ylläpitivät kokoon suhteutettua suodatusnopeutta parhaiten seitsemän vuorokauden ajan molemmilla levälajeilla. Molempien järvisimpukkalajien tapauksessa suodatusnopeuden hidastuminen johtui todennäköisesti koealtaiden leväpitoisuuden laskemisesta niin matalaksi, että simpukat lakkasivat suodattamasta vettä. Lurmanin ym. (2014) mukaan pikkujärvisimpukat pystyvät havainnoimaan ympäröivän veden ravintopitoisuuden ja hidastamaan elintoimintojaan, mukaan lukien veden suodatusta sekä erittäin runsaasti että erittäin vähän ravintoa sisältävissä ympäristöissä säästääkseen energiaa. Kokoon suhteutetun suodatusnopeuden lajikohtaiset erot voivat johtua myös osittain simpukoiden herkkyydestä ympäristön vaihteluihin. Lorenz ym. (2013) tutkivat neljää eri makean veden simpukkalajia ja vertasivat niiden reagointia ympäristön häiriötekijöihin. Tutkimuksessa pikkujärvisimpukat ja vaeltajasimpukat reagoivat merkittävästi sysijokisimpukkaa ja soukkojokisimpukkaa (*U. pictorum*) vähemmän ohi ajaneisiin moottoriveneisiin. Reagointia mitattiin kuoren sulkemisena. Vaikka sysijokisimpukat ja samoin tutkimuksessa olleet soukkojokisimpukat jatkoivatkin keskimäärin nopeammin suodatusta kuoren sulkemisen jälkeen, niistä selvästi suurempi osa reagoi populaatiotasolla häiriöön ja lisäksi niiden häiriönkestotaso, oli merkittävästi matalampi verrattuna pikkujärvisimpukoihin. Sysijokisimpukoiden herkempi reagointi ympäristön häiriötekijöihin voi olla yksi selittävä tekijä siinä, että niiden suodatusnopeus oli järvisimpukoita matalampi omassa tutkimuksessani.

### 4.3 Ravinnemittaukset

Yksi tutkimukseni hypoteeseista oli, että simpukat palauttavat osan suodattamiensa viherlevien sitomista RAS-järjestelmän jäteveden nitraatista ja fosfaatista takaisin veteen. Perusteena hypoteesille oli muun muassa Cyrin ym. (2016), Vaughnin ym. (2004), Naddafin ym. (2008), Ajjabin ym. (2018) ja Cuomon ym. (1997) tutkimukset, joiden mukaan simpukat tuottavat ympäröivään veteen etenkin fosfaattia ja ammoniumtyyppiä. Mittaustulosten perusteella viherlevien sitomaa fosfaattia ja nitraattia ei kuitenkaan vapautunut veteen 7 vuorokauden kokeiden aikana (Taulukko 5). Havainto oli yllättävä, joskin hyvin positiivinen, sillä se tarkoittaa, että systeemi mahdollistaa ravinteiden poistamisen käytännössä kokonaan jätevedestä ilman että ravinteet palaavat veteen. Useimmissa ensimmäisen ja seitsemännen vuorokauden mittauksissa ravinnemäärät olivat lisäksi niin pienet, että ravinnepitoisuudet jäivät analyysikittien määrittämissä alarajien alapuolelle. Ainoastaan *Selenastrum* sp. -levää sisältäneiden altaiden nitraattipitoisuus oli niin suuri että sen pystyi mittaamaan luotettavasti analyysikiteillä (Taulukko 5), mistä voidaan päätellä *Selenastrum* sp. -levän soveltuvan *Monoraphidium griffithii* -levää huomattavasti enemmän nitraatin sitomiseen jätevedestä. Toisaalta *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä altaissa nitraattipitoisuus ei lisääntynyt kokeen aikana.

Tutkimuksessani oletettiin ammoniumtyyppinä mitatun ammoniakkin pitoisuuden kasvavan simpukoita sisältäneissä altaissa, koska simpukoiden hypo-osmoottinen virtsa koostuu enimmäkseen ammoniakista (Vaughn & Hakenkamp 2001, Vaughn ym. 2004, Cyr ym. 2017). Ammoniumtyyppimittauksista selvisi, että *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä altaissa ammoniumtyypin pitoisuus lisääntyi (Taulukko 6), mutta *M. griffithii* -levää sisältäneissä altaissa pitoisuus pysyi samalla tasolla kuin kokeiden alussa (Taulukko 7). Lisäksi havaittiin, että *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä altaissa ammoniumtyypin määrä kasvoi myös kontrollialtaissa. Koska mittauksia tehtiin ainoastaan kolmannesta osakokeesta ja yksittäisillä ravinnemäärämittauksilla neljännessä osakokeesta, havainto olisi perusteltua vahvistaa lisäkokeilla. Havainnon perusteella voidaan kuitenkin alustavasti olettaa *M. griffithii*-levän pysty-

vän hyödyntämään ammoniumtyyppiä ravinteena. Oletusta tukee se, että *M. griffithii*-levän konsentraatio kasvoi kontrollialtaissa ja osassa tutkimusaltaista kokeiden aikana. *Selenastrum* sp.-levän altaiden ammoniumtyppi myös kontrollikäsittelyissä saattaa viitata siihen, että ainakin osa leväsoluista kuoli koejaksojen aikana ja ammoniumtyppi olisi syntynyt osittain levää hajottaneiden mikrobien metaboliatuotteena. *Selenastrum* sp.-levän heikompaa menestymistä tutkimusolosuhteissa verrattuna *M. griffithii* -levään tukee havainto leväkonsentraatioeroista kontrollialtaissa (Kuva 4).

Cyr ym. (2016) tutkivat uusiseelantilaisten *Echyridella menziesii* simpukan tuottamia ravinteita. Tutkimuksen mukaan simpukat tuottivat keskimäärin 0,4 mg/kuivapaino g/vrk ammoniumtyyppiä ja 0,1 mg/kuivapaino g/vrk fosfaattia. Tutkimuksen näytteet otettiin simpukoiden aloitettua suodattamisen koealtaissa ja 30 minuuttin kuluttua suodattamisen aloittamisesta. Vaughn ym. (2004) tutkivat kahden pohjois-amerikkalaisten jokisimpukkalajin ravinteiden tuottamista. *Amblema plicata* simpukkayksilöt tuottivat keskimäärin 0,7 mg/vrk ammoniumtyyppiä ja 0,4 mg/vrk fosfaattia. *Actinonaias ligamentina* simpukat tuottivat tutkimuksen mukaan 1,5 mg/vrk ammoniumtyyppiä ja 1,1 mg/vrk fosfaattia. Naddafi ym. (2008) tutkivat vaeltajasimpukoiden tuottavan 0,54-3,58 mg/kuivapaino g/vrk ammoniumtyyppiä ja 0,06-0,57 mg/kuivapaino g/vrk fosfaattia. Myös Ajjabin ym. (2018) ja Cuomon ym. (1997) tutkimusten mukaan simpukat tuottavat merkittäviä määriä ammoniumtyyppiä ympäröivään veteen, joskin kyseisissä tutkimuksissa on selvitetty nimenomaisesti välimerensinisimpukan (*Mytilus galloprovincialis*) kasvattamojen vaikutusta veden ammoniakkipitoisuuteen sekä punalevän (*Gracilaria verrucosa*) käyttöä ammoniakki sitomiseksi vedestä. Tutkimuksissa simpukoiden tuottamat ravinteet mitattiin levänkasvun eroina verrattuna levänkasvatusaltaisiin tai -vesialueisiin, joilla ei ole simpukoita. Ajjabin ym. (2018) tutkimuksessa selvitettiin myös laboratorio-olosuhteissa simpukka-altaiden fosfaattimäärän muutokset verrattuna altaisiin, joissa oli simpukoita ja punalevää. Molempien tutkimusten tuloksena oli, että tutkimuksessa käytetyt sinisimpukat tuottavat ravinteita jotka lisäävät punalevän kasvua ja lisäksi Ajjabin ym. (2018) tutkimuksen perusteella sekä ammoniakki-

että fosfaattipitoisuus kasvoivat merkittävästi altaissa, joissa oli pelkästään simpukoita, joskin altaiden fosfaattipitoisuus alkoi nousta vasta 7 vuorokauden kuluttua kokeiden aloittamisesta.

Kaikkien ylläolevien tutkimusten perusteella voidaan todeta, että simpukat tuottavat veteen ravinteita, joista osa syntyy simpukoiden metaboliatuotteena ja osa vapautuu simpukoiden ravinnokseen käyttämistä orgaanisista partikkeleista. Kyseisten ravinteiden määrä ei kuitenkaan lisääntynyt oman tutkimukseni tutkimusaltaissa, pois lukien ammoniumtyypen lisääntyminen *Selenastrum* sp. -levää sisältäneissä altaissa. Tutkimustulosteni perusteella on mahdollista, että kokeessani käytetyt viherlevät pystyvät hyödyntämään altaisiin vapautuvan nitraatin ja fosfaatin, ja että *M. griffithii* -levä pystyy lisäksi hyödyntämään ammoniumtyyppiä ravinteena ja poistamaan sen altaista.

#### **4.4 Jatkossa tutkittavaa teollisen puhdistussovelluksen kannalta**

Tutkimukseni perusteella on selvää, että järvisimpukoita on mahdollista hyödyntää viherlevien sitomien ravinteiden poistamiseksi vedestä. Lisäksi tutkimuksen perusteella selvisi, että *Monoraphidium griffithii* -levän ja *Anodonta*-suvun simpukoiden yhteiskäytöllä saatiin paras suodatustehokkuus ilman ravinteiden palaamista tutkimusaltaiden veteen. Vaikka tutkimustulosten perusteella laskettu suodatusnopeus ei eronnut merkittävästi *Anodonta*-suvun lajeilla eri levälajien välillä, esimerkiksi tutkimusallasveden ravinnemittausten ja altaiden leväkonsentraatioiden trendien perusteella, *M. griffithii* selviää ja jopa lisääntyy tutkimustilan kaltaisissa himmeästi valaistuissa ja viileissä tiloissa. Tutkimuksissa havaittu *M. griffithii* -levän kyky käyttää veteen vapautuvaa ammoniumtyyppiä ravinteena mahdollistaisi järjestelmän huoltovapauden, sillä levä lisääntyisi ilman ulkoista ravinnelähdettä ja toisaalta poistaisi altaista simpukoillekin haitallista ammoniakkia.

Leväkonsentraatiomittaustuloksista lasketut suodatusnopeudet olivat erittäin matalia verrattuna useisiin aiempiin tutkimuksiin järvisimpukoiden suodatusnopeudesta. Todennäköinen syy tälle on liian harva leväkonsentraatiomittausväli yhdessä

simpukoille epäluonnollisen ympäristön kanssa. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella ei järjestelmän voitaisi katsoa olevan käytännöllinen. Suurimmallakin tutkimuksesta saadulla yksittäisellä suodatusnopeudella n. 400 ml/h, mikä oli n. kymmenkertainen suodatusnopeus mittausteni perusteella laskettuun pikku- ja isojärvisimpukoiden suodatusnopeuksien keskiarvoon nähden, vesikuutiometrin suodattamiseen tarvittaisiin vuorokaudessa yli 100 simpukkayksilöä. Krygerin ja Riisgårdin (1988) tutkimustulosten perusteella vesikuutiometrin suodattamiseen vuorokaudessa riittäisi ainoastaan kymmenen keskimääräistä pikkujärvisimpukkaa. Pidän tärkeänä tämän tutkimuksen uusimista suuremmissa mittakaavassa siten, että simpukoille järjestetään tutkimusaltaisiin luontaisenkaltaisen pohjamateriaali, mihin ne voivat kaivautua. Lisäksi leväkonsentraation seuraaminen tapahtuisi useammin, esimerkiksi tunnin välein otettavista näytteistä ensimmäisenä koepäivänä. Esimerkiksi Kryger ja Riisgård (1988) aloittivat suodatusnopeuden mittaamisen vasta simpukoiden kaivauduttua pohjasedimenttiin ja avattua kuoren suodattamista varten. Myös Bontesin ym. (2007) ja Cyrin ym. (2016) tutkimuksissa suodatusnopeusmittaukset aloitettiin vasta simpukoiden avattua kuorensa. Kaikissa edellä mainituissa tutkimuksissa näytteenottoaikaväli on ollut myös omaan tutkimukseeni verrattuna lyhyt, enimmillään 2 tuntia. Näytteenoton pitäisi tapahtua myös mahdollisimman vähän simpukoita häiriten, sillä Lorenzin ym. (2013) mukaan simpukat sulkevat kuorensa häiriintyessään ja lopettavat samalla suodatuksen. Tasaisen ja pitkäkestoisen suodatusnopeuden selvittämiseksi tutkimusaltaiden tilavuus tulisi olla niin suuri, etteivät tutkimuksessa käytetyt simpukat pystyisi suodattamaan vettä kirkkaaksi muutamassa tunnissa, kuten tässä kokeessa havaittiin visuaalisesti joidenkin koealtaiden kohdalla tapahtuvan.

Käytännön sovelluksen kehittäminen vaatisi lisää tutkimusta simpukoiden optimaalisesta ylläpidettävästä suodatusnopeudesta keinotekoisessa ympäristössä. Jotta järjestelmä voisi toimia kaupallisesti, simpukoiden pitäisi pystyä suodattamaan merkittävästi tässä tutkimuksessa testattua suurempia vesimääriä puhtaaksi levästä. Lisäksi käytännön sovellusta varten simpukoita tulisi olla myös kaupallisesti hankittavissa, mitä varten suomalaisten järvisimpukoiden kasvattamisesta

olisi tehtävä tutkimus. Vaihtoehtoisesti voisi selvittää, onko makean veden simpukoita saatavilla kaupallisesti biopuhdistuskäyttöön ja soveltuisivatko ne Suomessa käytettäväksi. Esimerkiksi vaeltajasimpukoita on testattu biopuhdistuskäytössä, mutta kyseessä on äärimmäisen haitallinen ja aggressiivisesti leviävä vieraslaji, jonka levittäminen uusille alueille missä sitä ei vielä esiinny ei tule kyseeseen jo lainsäädännönkin takia (McLaughlan & Aldridge 2013, Stybel ym. 2008).

#### 4.4.1 Simpukkapuhdistusjärjestelmän sivuvirtojen hyödyntäminen

Tässä tutkimuksessa ei tutkittu simpukoiden läpi kulkeneen ja altaiden pohjille tiiviiksi massaksi pakkautuneen leväkonsentraatin ravinnepitoisuutta. Oletettavaa on, että suurin osa levien sitomista ravinteista on kuitenkin säilössä tiiviissä levämässä. Kaupallisessa sovelluksessa paksun levämässän talteenotto ja hyödyntäminen lannoitteena saattaisi tuoda sivutulovirtoja. Tutkimuksesta saatavan *M. griffithii* -levätiivisteiden ravinnepitoisuutta tulisi tutkia. Lisäksi eri levälajien soveltuvuutta lannoitteeksi olisi tutkittava. Uysal ym. (2015) tutkivat *Chlorella vulgaris*-viherlevän soveltuvuutta ravinteeksi maissille (*Zea mays*) ja vehnälle (*Triticum spp.*). Tutkimuksen perusteella viherlevän käyttö lannoitteena lisäsi molempien kasvien tuottavuutta 30 päivän koejakson aikana, minkä lisäksi se lisäsi maan orgaanisen aineksen kokonaismäärää ja vedenpidätyskykyä. Vanajavesikeskuksen (2020) koordinoimassa hankkeessa testattiin erilaisissa jätevesissä kasvatettujen mikrolevien (mm. *Chlorella sp.*) hyödyntämistä westerwoldin raiheinän (*Lolium multiflorum ssp. westerwoldicum*) ja kasvihuonekurkun (*Cucumis sativus*) kasvatuksessa. Kasvatustutkimusten mukaan levämässän lannoitevaikutus oli levänkasvatusvedestä riippuen 5-45 % kaupallisen väkilannoitteen lannoitevaikutuksesta.

Sicuro ym. (2010) tutkivat pikkujärvisimpukan ja Välimeren alueella esiintyvän *Unio mancus* simpukan ravintoarvoja ja hyödyntämistä kalanrehuna. Tutkimuksen mukaan simpukat soveltuivat hyvin kasvatettavien kirjolohien (*Oncorhynchus mykiss*) ravinnoksi. Simpukoiden ravintoarvot vastasivat kaupallista kalanrehua ja koikeessa ei havaittu eroja kalojen ruokailukäyttäytymisessä vertailtaessa simpukoista

tehtyä rehua ja kaupallista kalanrehua. McLaughlan ym. (2014) tutkivat vaeltajasimpukoiden käyttöä kananrehuna. Tutkimuksen mukaan vaeltajasimpukat kelpasivat hyvin ruuaksi kanoille. Kuorineen rehuna käytettyjen simpukoiden proteiinipitoisuus oli kaupallista kananrehua pienempi, mutta toisaalta simpukoilla ruokituille kanoille ei tarvinnut tarjota erikseen kalsiumpitoista ravintolisää. Kuorittujen simpukoiden ravintoarvo vastaisi kaupallista kananrehua, mutta simpukoiden kuorimisen pitäisi tapahtua edullisesti ja helposti suuressa mittakaavassa, jotta kuorittuja simpukoita olisi taloudellisesti järkevää käyttää. Galimany ym. (2017) tutkivat Yhdysvaltain itärannikolla kasvatettavien sinisimpukoiden (*Mytilidae*) heimon kuuluvien *Geukensia demissa*-simpukoiden kykyä suodattaa vedestä typpeä sitoneita partikkeleita. Tutkimuksen perusteella yhden täyden 6x6 m kasvatuslautan simpukoiden kudoksiin ja kuoriin sitoutuisi kuuden kuukauden kasvatusjakson aikana 62,6 kg typpeä. Laskenta perustui kokeeseen, minkä mukaan yksittäisten simpukoiden kudosten typpimäärä kasvoi kokeen aikana simpukoiden jalassa 2% ja muissa pehmytkudoksissa 6%. Stybelin ym. (2009) tutkimuksessa oli laskettu, että kasvattamalla Oderin suistoalueella 101,5 km<sup>2</sup> alueella vaeltajasimpukoita, vedestä olisi mahdollista poistaa pelkästään simpukoihin sitoutuneena 6,5 tonnia typpeä vuosittain. Laskelmassa huomioitiin ainoastaan simpukoiden kudoksiin sitoutunut typpi, ei simpukoiden suodattamia ja sedimentoimia typpipitoisia orgaanisia ravintopartikkeleita. Typen määrä vastaa kymmentä prosenttia Oderjoen valuma-alueen typpikuormituksesta. Spångberg ym. (2013) tutkivat Itämeren sinisimpukoiden (*Mytilus trossulus*) hyödyntämistä lannoitteena. Tutkimuksen mukaan simpukoiden avulla on mahdollista siirtää vesistöistä rehevöitymistä aiheuttavia ravinteita tehokkaasti maalla kasvatettavaan kasveihin. Lisäksi simpukoiden kuoret nostavat maaperän pH:ta.

Simpukoiden kuoria on mahdollista hyödyntää muun muassa lannoitteena ja veden tai maaperän happamuudensäädössä. Galimany ym. (2017) mukaan simpukoiden suodattaman ravinnon tyypestä sitoutuu simpukoiden kuoriin, kuorten sisältäessä noin kolmanneksen simpukoissa olevasta tyypestä. Simpukankuoret koostuvat pääosin kalsiumkarbonaatista (CaCO<sub>3</sub>). Good ym. (2014) tutkivat simpukan

kuorista tehdyn murskeen hyödyntämistä hulevesien puhdistamisessa. Tutkimuksen mukaan biologiseen suodatuskenttään sekoitettu kuorimurske tehosti muun muassa raskasmetallien sitoutumista huomattavasti. Metallien talteenoton tehostuminen johtui siitä, että simpukoiden kuorista vapautuneet kalsiumionin nostivat veden kovuutta ja pH:ta, mikä puolestaan ehkäisee metallien liukenemistä.

#### 4.4.2 Simpukoiden kasvu laboratorio-olosuhteissa ja kasvattaminen

Tässä kokeessa oli tarkoitus selvittää lisäksi simpukoiden kasvua kokeiden aikana. Kokeessa käytettyjen simpukoiden pituudet mitattiin simpukoiden kuivapainojen laskemiseksi (Taulukot 2 ja 3) kokeiden alussa ja lopussa. Osalla yksilöistä kasvua ei tapahtunut lainkaan tai toinen mittaustulos oli ensimmäiseen mittaukseen verrattuna pienempi. Lisäksi havaittu kasvu vaikutti olleen pelkästään kuorta peittävää pehmeää pintakerrosta, mikä kasvoi ulospäin simpukoiden kuorten saranoista katsottuna. Johtuen vähäisestä tutkimusdatasta ja epävarmoista tuloksista, simpukoiden kasvun tarkastelua ei sisällytetty tutkimuksen varsinaisiin tuloksiin.

Simpukoiden kasvun seuraamisesta laboratorio-olosuhteissa on erittäin vähän tutkimusta. Taskinen (1998) tutki imumatojen (*Rhipidocotyle fennica* ja *R. campanula*) vaikutusta simpukoiden kasvuun ja havaitsi, että tutkimusaltaissa olleiden simpukoiden kasvu oli huomattavan vähäistä verrattuna luonnossa eläneisiin kontrollisimpukoihin. Taskisen (henkilökohtainen tiedonanto 12.6.2020) mukaan simpukat häiriintyvät helposti käsittelemisestä ja näin ollen etenkin lyhytkestoiset ja siten tiheää käsittelyä vaativat koetilanteet voivat aiheuttaa havaittavia negatiivisia vaikutuksia simpukoiden ruokailuaktiivisuuteen ja siten myös kasvuun. Sicuro ym. (2015) tutkivat pikkujärvisimpukan ja Välimeren alueella elävän *Unio mancus* simpukan kasvattamista Italiassa Piedmontin alueella Aviglianajärvässä sijainneissa häikeissä. Simpukat olivat tutkimuksessa muuten rauhassa, ainoa tutkimuksen aiheuttama häiriötekijä oli kuukausittainen kasvatusalustoiden puhdistaminen ulosteesta. Tutkittujen simpukoiden kasvu ei eronnut kontrollina käytetystä luonnonpopulaatiosta.



Jotta Suomessa luonnonvaraisena esiintyviä makean veden simpukoita voitaisiin hyödyntää kaupallisessa biopuhdistusjärjestelmässä, tulisi järjestelmässä käytettävien simpukoiden kasvattamismahdollisuudet selvittää kokeella. Iso- ja pikkujärvisimpukat ovat generalisteja sekä asuinympäristönsä että toukkavaiheen isäntäkalojen suhteen. Lisäksi iso- ja pikkujärvisimpukoiden toukkavaihe kestää ainoastaan muutamia viikkoja, veden lämpötilasta riippuen. Sicuron (2015) mukaan makean veden simpukoiden kasvatus on keskittynyt pääasiassa helmisimpukoiden kasvatamiseen Aasiassa ja biologisen monimuotoisuuden suojelemiseksi Pohjois-Amerikassa. Makean veden simpukoiden kasvatus on Sicuron (2015) mukaan ollut Euroopassa hyvin pienimuotoista.

*Anodonta*-suvun simpukoiden kasvattamisessa olisi mahdollista hyödyntää esimerkiksi Barnhartin (2006) kehittämää ämpärikasvatusjärjestelmää, missä kasvatettiin pohjois-amerikkalaisten jokisimpukoiden poikasia kahdesta sisäkkäisestä ämpäristä rakennetuissa järjestelmissä, joiden vesitilavuus oli 18 litraa. Yksi järjestelmä koostui seitsemästä kasvatusputkesta, joissa oli yhteensä 14000 isäntäkaloista 1-2 vuorokautta ennen kokeen alkua irrottautunutta simpukan nuoruusvaihetta. Kokeissa järjestettiin simpukoiden ruokinta ja veden sisäinen kierto, minkä lisäksi vesi vaihdettiin viikottain. Barnhartin (2006) kokeessa oli yhteensä 5 simpukkalajia, joista kaikki kasvoivat kokeiden aikana. Kahdella lajilla (*Lampsilis siliquoidea* ja *L. reeveiana*) simpukoista oli kahden kuukauden kasvatuksen jälkeen elossa yli 95%. Wächtlerin ym. (2001) mukaan sekä iso- että pikkujärvisimpukoiden glokidiumtoukkien koko ja toukkavaiheen jälkeisten nuorten simpukoiden kasvunopeus ovat vastaavia verrattuna *Lampsilis*-suvun simpukoihin. Myös Taskisen (henkilökohtainen tiedonanto 22.9.2020) mukaan järjestelmä olisi todennäköisesti käytettävissä sellaisenaan iso- ja pikkujärvisimpukoiden kasvattamiseen, johtuen *Anodonta*- ja *Lampsilis*-suvun simpukoiden fysiologisesta samankaltaisuudesta.

Taskisen (henkilökohtainen tiedonanto 22.9.2020) mukaan iso- ja pikkujärvisimpukoiden loisvaiheen isäntäkalana olisi mahdollista käyttää kaupallisesti saatavilla olevia taimenenpoikasia (*Salmo trutta*), joista irtautuvat suodatuskykyiset nuoret simpukkayksilöt on mahdollista ottaa talteen kala-altaista. Simpukoiden loisinta ei

ole vahingollista terveille taimenenpoikasille ja kaloja voitaisiin hyödyntää normaalisti simpukoiden irtaannuttua niistä. Esimerkiksi Modesto ym. (2018) kuvaa simpukoiden loisintatapaa foreettiseksi, eli simpukoiden glokidiumtoukat hyödyntävät kalaisäntää lähinnä spatiaaliseen leviämiseen, ravinnon ottamisen tai suojautumisen petoja vastaan ollessa toissijaista. Kalojen avulla leviäminen on huomattavan nopea tapa kolonisoida uusia alueita ja monimuotoistaa eri simpukkapopulaatioiden geenejä. Wächtlerin ym. (2001) mukaan simpukoiden hiilipitoisuus kasvaa simpukkalajista riippumatta kalaisännässä ollessa, eli simpukat ottavat isäntäeliöstä myös ravintoa. Otetun ravinnon määrä riippuu simpukkalajista. Osalla lajeista loisvaihe kestää ainoastaan joitakin tunteja eikä kasvua tapahdu juurikaan ja toisaalta esimerkiksi jokihelmisimpukan (*Margaritifera margaritifera*) loisvaihe voi kestää useita kuukausia, glokidiumtoukan koon kasvaessa moninkertaiseksi. Wächtlerin ym. (2001) mukaan iso- ja pikkujärvisimpukoiden glokidiumtoukkien ulkomitat eivät muutu loisvaiheen aikana, mutta kaloista irtaantuvien simpukoiden hiilipitoisuus on noin kolminkertainen, kasvaen keskimäärin 1 µg, verrattuna simpukoista vapautuviin glokidiumtoukkiin. Iso- ja pikkujärvisimpukoiden loisvaihe kestää keskimäärin 2 viikkoa.

## 5 YHTEENVETO

Kaikki tutkimuksessa käytetyt simpukkalajit suodattivat molempia kokeessa käytettyjä levälajeja. Tutkimuksen perusteella järvisimpukkalajit (*Anodonta* sp.) suodattivat kumpaakin kokeessa käytettyä viherlevää sysijokisimpukoita tehokkaammin. *Monoraphidium griffithii* -levä vaikuttaisi tämän tutkimuksen perusteella soveltuvan *Selenastrum* sp. -levää paremmin ravinteiden poistamiseen tutkimusjärjestelyn kaltaisissa olosuhteissa, sillä simpukat suodattivat *M. griffithii* -levää *Selenastrum* sp. -levää tehokkaammin, se menestyi kontrollialtaissa paremmin, eivätkä ammonium-typen pitoisuudet nousseet sitä sisältäneissä koealtaissa.

Tutkimuksen perusteella simpukoita hyödyntämällä olisi mahdollista poistaa kiertovesiviljelylaitoksen jätevedessä kasvatettuja ja jätevedestä ravinteita poistaneita viherleviä. Jatkossa olisi tärkeää tutkia systeemin käyttökelpoisuutta isommassa mittakaavassa. Simpukoita hyödyntävän biosuodatusjärjestelmän käytännöllisyyden kannalta olisi tutkittava, onko suomalaisten makean veden simpukoiden kasvattaminen teollisessa mittakaavassa mahdollista. Koska järjestelmän olisi oltava taloudellisesti kannattava, simpukkasuodatusjärjestelmän sivuvirtojen, eli sekä simpukoiden että viherlevien soveltuvuus kaupallisesti hyödynnettäväksi olisi selvitettävä. Simpukoiden pehmytkudoksia voisi käyttää rehuna eri tuotantoeläimille, esimerkiksi kaloille ja siipikarjalle. Simpukoiden kuoria on mahdollista hyödyntää muun muassa vedenpuhdistuksessa ja kalsiumlisänä siipikarjalle. Simpukoita ja simpukoiden ulosteena järjestelmän pohjaan sedimentoituvaa viherlevää on mahdollista hyödyntää lannoitteena.

## **KIITOKSET**

Haluan kiittää työni ohjaajia FT Juhani Pirhosta ja FT Katja Pulkista korvaamattomasta tuesta työni aikana. Haluan kiittää myös työni tutkimuksellisessa osuudessa apuna olleita Čedomir Stevčićiä ja Anniina Nikalia, sekä teknistä tukea tarjonnutta Juha Ahosta. Kiitän lisäksi professori Jouni Taskista tuesta simpukoihin liittyneissä kysymyksissä. Maa- ja Vesitekniikan tuki Ry:tä haluan kiittää saamastani apurahasta.

Tutkimukseni on osa Juhani Pirhosen hallinnoimaa Biologiset ravinnesiepparit -hanketta.

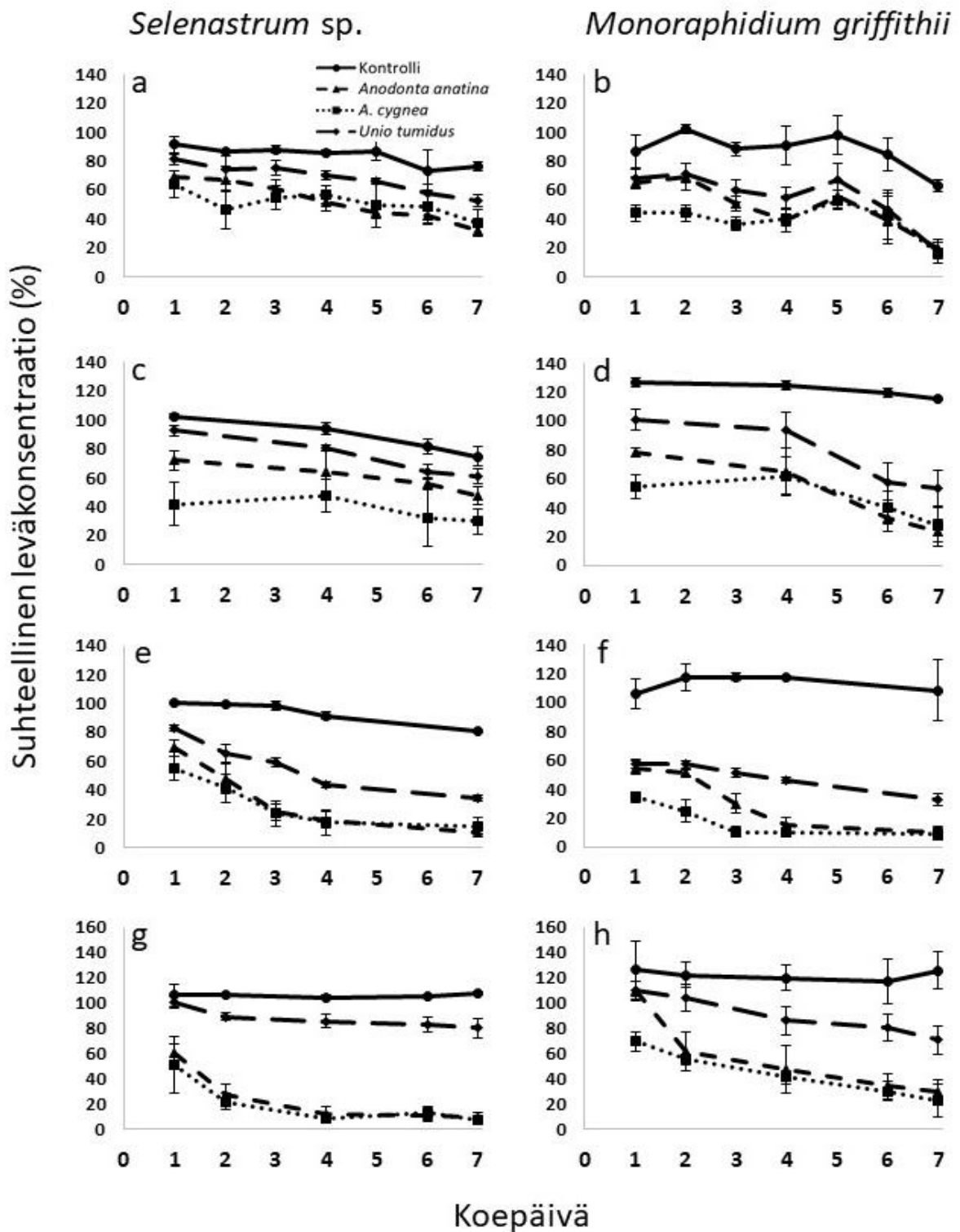
## KIRJALLISUUS

- Ajjab L.C., Abaab M. & Segni R. 2018. The red macroalga *Gracilaria verrucosa* in co-culture with the Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*: productivity and nutrient removal performance. *Aquac. Int.* 26: 253-266.
- Barnhart M.C. 2006. Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture* 254: 227-233.
- Bontes B.M., Verschoor A.M., Pires L.M.D., van Donk E. & Ibelings B.W. 2007. Functional response of *Anodonta anatina* feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria, differing in shape, size and toxicity. *Hydrobiologia* 584: 191-204.
- Cuomo V., Merrill J., Palomba I., Maio L.D., Gargiulo M., Cuomo A. & Sebastio C. 1997. Mariculture with seaweed and mussels for marine environmental restoration and resources production. *Int. J. Environ. Stud.* 52: 297-310.
- Cyr H., Collier K., Clearwater S., Hicks B. & Stewart S. 2017. Feeding and nutrient excretion of the New Zealand freshwater mussel *Echyridella menziesii* (Hyriidae, Unionida): Implications for nearshore nutrient budgets in lakes and reservoirs. *Aquat. Sci.* 79: 557-571.
- Frost B.W. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.* 6: 805-815.
- Galimany E., Wikfors G.H., Dixon M.S., Newell C.R., Meseck S.L., Henning D., Li Y. & Rose J.M. 2017. Cultivation of the ribbed mussel (*Geukensia demissa*) for nutrient bioextraction in an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 51: 13311-13318.
- Good J., O'Sullivan A., Wicke D. & Cochrane T. 2014. pH buffering in stormwater infiltration systems—sustainable contaminant removal with waste mussel shells. *Water Air Soil Pollut.* 225: 1-11.
- Kryger J. & Riisgård H.U. 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia* 77: 34-38.
- Lopes-Lima M., Lima P., Hinzmann M., Rocha A. & Machado J. 2014. Selective feeding by *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1771): The effects of seasonal changes and nutritional demands. *Limnologia* 44: 18-22.
- Lorenz S., Gabel F., Dobra N. & Pusch M.T. 2013. Modelling the effects of recreational boating on self-purification activity provided by bivalve mollusks in a lowland river. *Freshw. Sci.* 32: 82-93.
- Luonnonvarakeskus 2019. Kalan kiertovesikasvatus. <https://www.luke.fi/tietoa/luonnonvaroista/kalat-ja-kalatalous/kalanviljely/kalan-kiertovesikasvatus/> (luettu: 6.4.2019)

- Lurman G., Walter J. & Hopperel H.H. 2014. Seasonal changes in the behaviour and respiration physiology of the freshwater duck mussel, *Anodonta anatina*. *J. Exp. Biol.* 217: 235-243.
- McLaughlan C. & Aldridge D.C. 2013. Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs. *Water Res.* 47: 4357-4369.
- McLaughlan C., Rose P. & Aldridge D. 2014. Making the best of a pest: The potential for using invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) biomass as a supplement to commercial chicken feed. *Environ. Manage.* 54: 1102-1109.
- Modesto V., Ilarri M., Souza A.T., Lopes-Lima M., Douda K., Clavero M. & Sousa R. 2018. Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish Fish.* 19: 244-259.
- Moëzzi F., Javanshir A., Eagderi S., Poorbagher H. & Sallaki M. (2013). Evaluation of bivalve clearance rate (CR) as a physiological indicator of heavy metal toxicity in freshwater mussel, *Anodonta cygnea* (Linea, 1876). *Sci. J. Anim. Sci.* 2: 89-94.
- Naddafi R., Pettersson K. & Eklöv P. 2008. Effects of the zebra mussel, an exotic freshwater species, on seston stoichiometry. *Limnol. Oceanogr.* 53: 1973-1987.
- Nichols S.J., Silverman H., Dietz T.H., Lynn J.W. & Garling D.L. 2005. Pathways of food uptake in native (Unionidae) and introduced (Corbiculidae and Dreissenidae) freshwater bivalves. *J. Great Lakes Res.* 31: 87-96.
- Ojala H. (3.3.2018). Kun kuhasta ovat jäljellä vain muistot – Kurkisuon kuhankasvattamosta ei riittänyt varoja edes konkurssiin. *Etelä-Saimaa*, s. 18.
- Pusch M., Siefert J. & Walz N. 2001. Filtration and respiration rates of two Unionid species and their impact on the water quality of a lowland river. Teoksessa Bauer G. & Wächtler K. (toim.), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida* (s. 317-326). Berliini: Springer.
- Rantanen K. (2018). Kyllä, kaloja voidaan viljellä suljetussa tilassa keskellä kaupunkia. *Tekniikan maailma.* 4: 87.
- Ravera O. & Sprocati A.R. 1997. Population dynamics, population, assimilation and respiration of two fresh water mussels: *Unio mancus*, Zhadin and *Anodonta cygnea* Lam. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 56: 113-130.
- Schneider O., Sereti V., Machiels M.A., Eding E.H. & Verreth J.A. 2006. The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. *Water Res.* 40: 2684-2694.
- Sicuro B., Mioletti S., Abete M., Amedeo S., Panini E. & Forneris G. 2010. Potential utilisation of farmed freshwater mussels (*Anodonta anatina* and *Unio mancus*) in Italy. *Cuba. J. Agric. Sci.* 44: 409-414.
- Sicuro B. 2015. Freshwater bivalves rearing: a brief overview. *Int. Aquat. Res.* 7: 93-100.

- Sicuro B., Panini E. & Forneris G. 2015. A floating cage system for rearing freshwater mussels *Anodonta anatina* and *Unio mancus* in Piedmont region (NW Italy). *Iran. J. Fish. Sci.* 14: 754-766.
- Spångberg J., Jönsson H. & Tidåker P. 2013. Bringing nutrients from sea to land – mussels as fertiliser from a life cycle perspective. *J. Clean. Prod.* 51: 234-244.
- Stevčić Č., Pulkkinen K. & Pirhonen J. 2019. Screening of microalgae and LED grow light spectra for effective removal of dissolved nutrients from cold-water recirculating aquaculture system (RAS) wastewater. *Algal Res.* 44, 101682 doi:10.1016/j.algal.2019.101681.
- Stybel N., Fenske C. & Schernewski G. 2009. Mussel cultivation to improve water quality in the Szczecin Lagoon. *J. Coast. Res.* 56: 1459-1463.
- Taskinen J. 1998. Influence of trematode parasitism on the growth of a bivalve host in the field. *Int. J. Parasitol.* 28: 599-602.
- Uysal O., Uysal F.O. & Ekinici K. 2015. Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. *Eur. J. Sustain. Dev.* 4: 77-82.
- Vanajavesikeskus. 2020. *Leväsiapparei – Ravinteet talteen ja kiertoon luonnonmukaisesti (LeväRaki)*. Hankkeen loppuraportti. Vanajavesikeskus, saatavissa [https://www.vanajavesi.fi/2018/wp-content/uploads/2020/05/LOPPU-RAPORTTI\\_31.3.2020.pdf](https://www.vanajavesi.fi/2018/wp-content/uploads/2020/05/LOPPU-RAPORTTI_31.3.2020.pdf).
- Vaughn C. & Hakenkamp C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 46: 1431-1446.
- Vaughn C., Gido K. & Spooner D. 2004. Ecosystem processes performed by Unionid mussels in stream mesocosms: Species roles and effects of abundance. *Hydrobiologia* 527: 35-47.
- Wächtler K., Dreher-Mansur M.C. & Richter T. 2001. Larval types and early postlarval biology in naiads (Unionoida). Teoksessa Bauer G. & Wächtler K. (toim.), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida* (s. 93-125). Berliini: Springer.

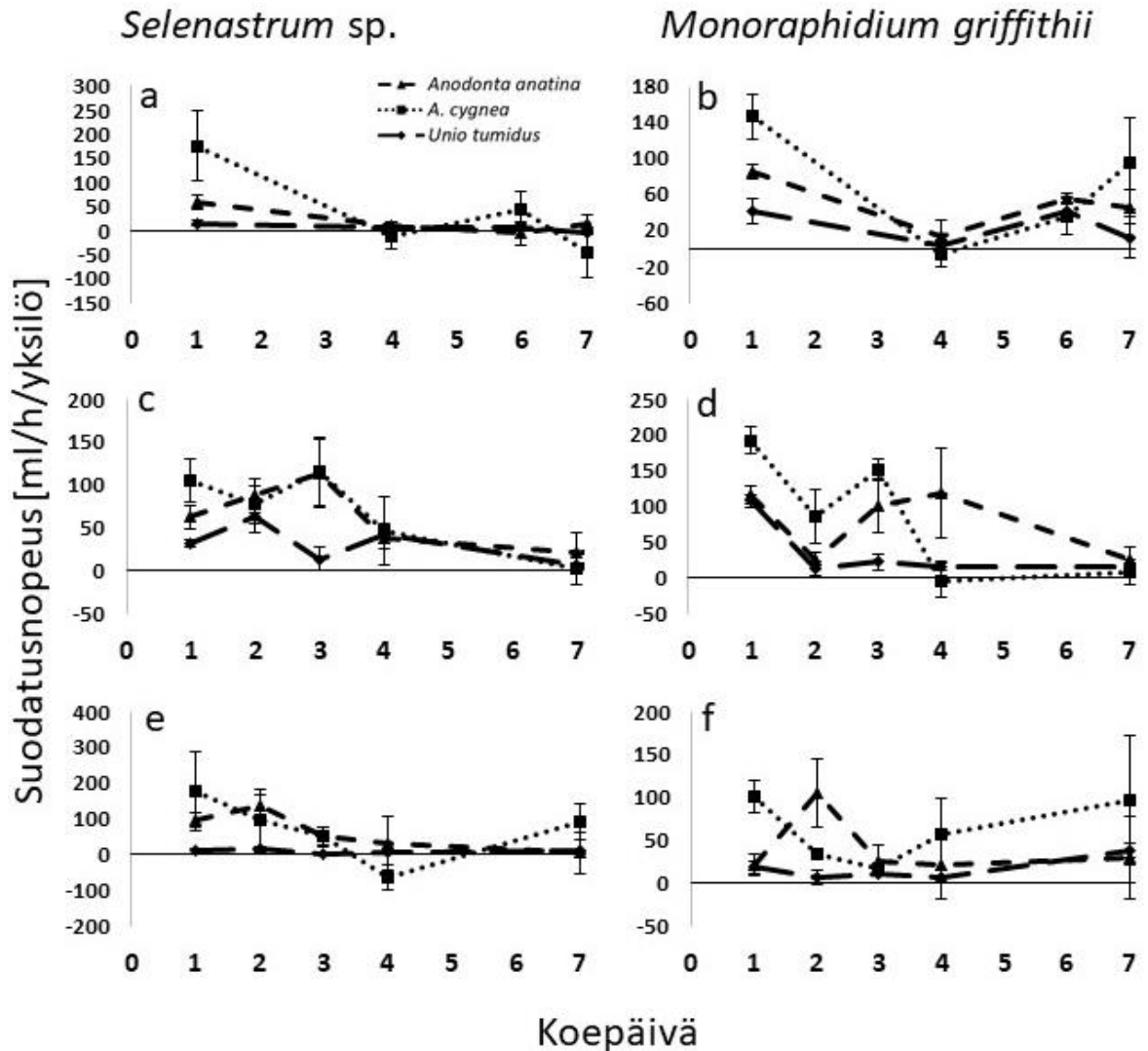
LIITE 1. SUHTEELLISET LEVÄKONSENTRAATIOT KOKEISSA  
1-4



*Selenastrum* sp. (a, c, e, g) ja *Monoraphidium griffithii* (b, d, f, h) viherlevämäärän suhteellinen pitoisuus verrattuna lähtötilanteeseen (100%) (keskiarvo  $\pm$  s.e.) kontrollialtaissa (n=2) ja simpukka-altaissa (*Anodonta anatina* n=3, *A. cygnea* n=3, *Unio tumidus* n=4) osakokeissa 1 (a, b), 2 (c, d) 3 (e, f) ja 4 (g, h) koejaksojen seitsemän ensimmäisen vuorokauden aikana. Y-akselin asteikko vaihtuu eri kuvissa mittaustulosten perusteella.

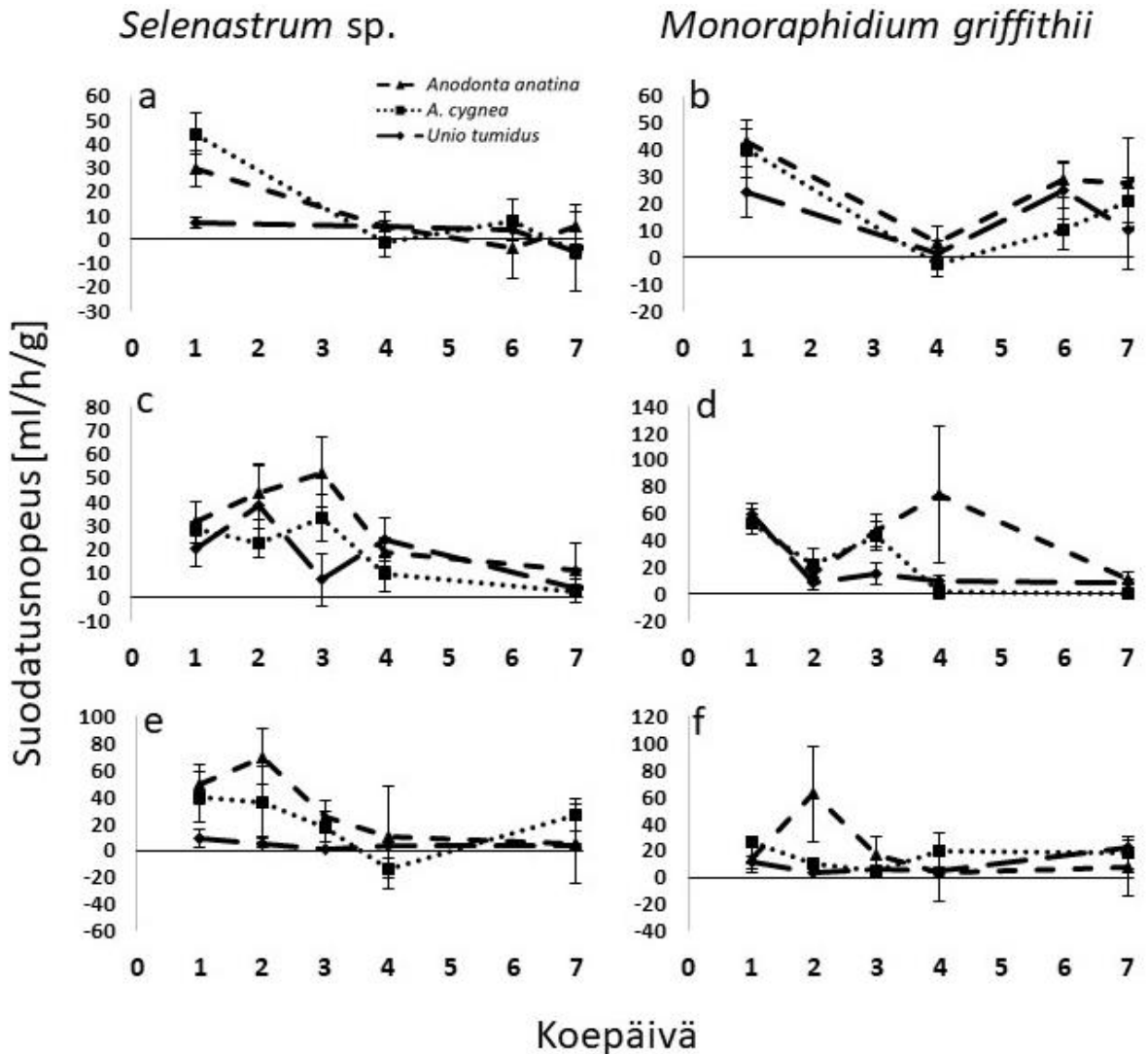


## LIITE 2. SUODATUSNOPEUDET [ML/H/YKSILÖ] MITTAUSPÄIVIEN VÄLILLÄ KOKEISSA 2-4



Simpukoiden yksilökohtaiset suodatusnopeudet (keskiarvo  $\pm$  s.e.) *Selenastrum sp.* (a, c, e) ja *Monoraphidium griffithii* (b, d, f) -leväaltaissa osakokeissa 2 (a, b), 3 (c, d) ja 4 (e, f) mittauspäivien välillä koejaksojen seitsemän ensimmäisen vuorokauden aikana. Suodatusnopeus kertoo simpukoiden suodattaman vesimäärän simpukakayksilöä kohti tunnissa (ml/h/yksilö) Käsittelyjen lukumäärät levälajikohtaisesti *Unio tumidus* n=4, *Anodonta cygnea* ja *A. anatina* n=3. Y-akselin asteikko vaihtuu eri kuvissa mittaustulosten perusteella.

LIITE 3. SUODATUSNOPEUDET [ML/H/G] MITTAUSPÄIVIEN VÄLILLÄ KOKEISSA 2-4



Simpukoiden kokoon suhteutetut suodatusnopeudet (keskiarvo  $\pm$  s.e.) *Selenastrum* sp. (a, c, e) ja *Monoraphidium griffithii* (b, d, f) -leväaltaissa osakokeissa 2 (a, b), 3 (c, d) ja 4 (e, f) mittauspäivien välillä koejaksojen seitsemän ensimmäisen vuorokauden aikana. Suodatusnopeus kertoo simpukoiden suodattaman vesimäärän kuivapainoyksikköä kohti tunnissa (ml/h/g) Käsittelyjen lukumäärät levälajikohtaisesti *Unio tumidus* n=4, *Anodonta cygnea* ja *A. anatina* n=3. Y-akselin asteikko vaihtuu eri kuvissa mittaustulosten perusteella.