

LuK-tutkielma

**Kylpylän huuhteluveden toksisuuden arvioiminen
Daphnia magna -vesikirpuilla**

Johanna Aaltonen ja Julia Ijäs



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Luonnonvarat ja ympäristö

1.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Luonnonvarat ja ympäristö

Aaltonen Johanna ja Ijäs Julia: Kylpylän huuhteluveden toksisuuden
arvioiminen *Daphnia magna* -vesikirpuilla
Kandidaatin tutkielma: 20 s., 1 liitettä (1 s.)
Tutkielman ohjaajat: FT Eeva-Riikka Vehniäinen
FT Elisa Vallius

Joulukuu 2021

Hakusanat: Akuutti toksisuus, jätevesi, klooraus, lisääntyminen

Klooraus on yksi yleisimmistä veden puhdistusmenetelmistä. Puhdistuksen jälkeen veteen jäävä kloori kuitenkin muodostaa herkästi erilaisia sivutuotteita reagoidessaan orgaanisen ja epäorgaanisen aineksen kanssa. Päästessään vesistöihin esimerkiksi puhdistettujen jätevesien mukana, voivat sivutuotteet aiheuttaa haittavaikutuksia vesistölle ja vesieliöille. Tässä LuK-tutkielmassa selvitimme Scandic Hotel Laajavuori -hotellin kylpylän huuhteluveden haitallisuutta ja mahdollisuutta laskea vettä läheiseen Vuorilampeen. Huuhteluvesi on altaiden puhdistusjärjestelmän suodattimien huuhtelusta syntyvää vettä. Altainen vesi on kloorattua, joten huuhteluvesi sisältää jäämiä puhdistukseen käytetystä kloorista. Haitallisuutta tutkittiin *Daphnia magna* -vesikirpuilla tekemällä akuutti toksisuuskoe sekä lisääntymiskoe. Kokeissa huuhteluvedellä todettiin olevan haitallisia vaikutuksia vesikirppujen poikastuotantoon ja sen aloitusajankohtaan. Huuhteluvesi vaikutti myös vesikirppujen liikkumattomuuteen ja kasvuun. Kuolleisuuteen huuhteluveden ei todettu vaikuttavan. Tulokset eivät antaneet yksiselitteistä vastausta siihen, voitaisiinko huuhteluvettä laskea Vuorilampeen.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Natural Resources and Environment

Aaltonen Johanna and Ijäs Julia: Assessing the toxicity of spa's backwash
water using *Daphnia magna*
Bachelor of Science Thesis: 20 p., 1 supplements (1 p.)
Supervisors: PhD Eeva-Riikka Vehniäinen
PhD Elisa Vallius

December 2021

Keywords: Acute toxicity, chlorination, reproduction, wastewater

Chlorination is one of the most commonly used water purification method. However, the chlorine remaining in the water after purification forms easily various by-products when reacting with organic and inorganic matter. When released to water bodies, for example with chlorinated wastewater, the by-products can have harmful effects on the water body and aquatic organisms. In this Bachelor's thesis, we examined the toxicity of Scandic Hotel Laajavuori spa's backwash water. We also explored the possibility of discharging the backwash water to a nearby pond, Vuorilampi. Backwash water is water from the washings of the filters of the pool purification system. Pool water is chlorinated, so the backwash water contains residual chlorine. Toxicity was studied by doing an acute toxicity test and reproduction test using *Daphnia magna* -water fleas. In the study, the backwash water was found to have harmful effects on the reproduction. The backwash water also affected the immobility and growth of daphnia. Mortality was not affected by the backwash water. The results did not provide an unequivocal answer whether the backwash water could be discharged to Vuorilampi.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	4
2.1. Vedenlaatumittaukset.....	5
2.2. Esikoe ja akuutti toksisuuskoe	5
2.3. Lisäntymiskoe	6
2.3 Tilastolliset analyysit	7
3 TULOKSET	8
3.1 Vedenlaatumittaukset ja DOC/TN-määritys	8
3.2 Akuutti toksisuuskoe.....	9
3.3 Lisäntymiskoe	10
3.5 Kuivapainomittaukset	12
4 TULOSTEN TARKASTELU	13
Kiitokset	18
KIRJALLISUUS.....	18
LIITE 1. ESIKOKKEEN TULOKSET	21

1 JOHDANTO

Puhtaan veden saanti on yksi suurimmista haasteista ympäri maailmaa (Sgroi ym. 2018). YK:n kestävän kehityksen toimintaohjelman (Agenda 2030) yksi tavoitteista onkin taata puhtaan juomaveden saanti ja sanitaatio kaikille. Osatavoitteena on parantaa veden laatua muun muassa vähentämällä käsittelemättömän jäteveden määrää sekä lisäämällä vesistöjen suojelua ja ennallistamista. Lisäksi tavoitteena on parantaa veden kierrätystä ja uudelleenkäyttöä (YK Agenda 2030). Kestävän vesihuollon kannalta ja maailmanlaajuisen vesipulan ratkaisussa jätevesien talteenotto ja uudelleenkäyttö ovat tärkeässä roolissa (Sgroi ym. 2018). Ongelmana on kuitenkin veden laatu ja sen turvallisuus (Shevah 2014). Jätevedet voivat aiheuttaa haittaa niin ihmisille kuin vesiekosysteemeillekin. Ne voivat esimerkiksi aiheuttaa elinympäristöjen tuhoutumista ja lisätä vesieliöiden kuolleisuutta (Akpor 2011). Vesien uudelleenkäytön kannalta onkin tärkeää, että jätevedet käsitellään ja puhdistetaan asianmukaisella tavalla (Shevah 2014). Jätevesiä voidaan puhdistaa useilla eri keinoilla. Yleisiä menetelmiä ovat esimerkiksi klooraus, otsonointi ja UV-puhdistus (Da Costa ym. 2014).

Klooraus on yksi yleisimmistä puhdistusmenetelmistä muun muassa sen edullisuuden ja helppokäyttöisyyden vuoksi. Klooripitoisia desinfiointiaineita on useita, joista suosituin on natriumhypokloriitti (NaClO) (Santos ym. 2012). Kloorin käyttö ei kuitenkaan ole täysin ongelmaton. Kloori on alkuaineena hyvin reaktiivinen ja muodostaa helposti yhdisteitä. Vedessä kloori reagoi orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden kanssa, jolloin muodostuu erilaisia sivutuotteita, jotka voivat olla haitallisia (Santos ym. 2012). Sivutuoteryhmiä on useita, ja niiden muodostumiseen vaikuttavat veden sisältämät yhdisteet sekä veden ominaisuudet, kuten lämpötila ja pH (Ilyas ym. 2018). Yleisiä ryhmiä ovat trihalometaanit (THM), haloetikkahapot (HAA) ja haloasetonitriilit (HAN) (Santos ym. 2012).

Yhdisteitä voi kulkeutua vesistöihin puhdistettujen jätevesien mukana, ja niillä voi olla haitallisia vaikutuksia vesieliöihin (Rebelo ym. 2016). Yhdisteillä onkin todettu olevan suuri ekologinen riski jätevesissä (Cui ym. 2021). Kloorilla ja sen yhdisteillä on esimerkiksi todettu olevan karsinogeenisiä, mutageenisia ja toksisia vaikutuksia (Koivunen ym. 2005), joita on tutkittu paljon muun muassa vesikirpuilla. Melo ym. (2019) tutkivat haloetikkahappojen akuutteja ja kroonisia vaikutuksia vesikirppuihin. Tutkimuksessa lisääntymisen todettiin heikkenevän erityisesti toisen sukupolven vesikirpuilla. Kloorauksen on myös todettu vaikuttavan selvästi vesikirppujen (*C. silvestrii* ja *D. similis*) ja seeprakalojen (*D. rerio*) selviytymiseen (Da Costa ym. 2014).

Kloorauksen vaikutuksia on usein arvioitu akuutin toksisuuden avulla. Kloorauksen vaikutuksesta akuutin toksisuuden on havaittu nousevan vesikirpuille (*D. magna*) ja luminesoiville bakteereille tehdyissä kokeissa (Du ym. 2017). Myös Cui ym. (2021) havaitsi esimerkiksi trihalometaanin ja muiden sivutuotteiden vaikuttavan *Daphnia magna* -vesikirppujen liikkuvuuteen akuutin toksisuuden kokeissa. Siitä, mikä pitoisuus klooria on vesieliöille haitallista, on saatu eri tutkimuksissa hieman eriäviä tuloksia. Emmanuel ym. (2004) mukaan kloorilla voi olla suuri akuutti toksisuus vesieliöille jo alle 1 mg/l pitoisuuksilla. Collivignarelli ym. (2017) mittasivat tutkimuksessaan vesikirpuilla (*D. magna*) jäteveden toksisuutta, jolloin EC50-arvoksi eli pitoisuudeksi, jossa puolet vesikirpuista olivat liikkumattomia, saatiin 0,17 mg/l. Da Costa ym. (2014) tutkimuksessa toksisuuden havaittiin nousevan merkittävästi vesikirpuilla (*D. silvestrii*), kun klooria käytettiin 2,5 mg/l. Myös kloorin jatkuvaa altistusta on tutkittu. Brungs (1976) ehdottaa jatkuvan altistuksen klooripitoisuuden rajaksi makeassa vedessä jopa 0,003 mg/l rajaa. Tutkimuksissa on siis saatu eriäviä tuloksia kloorin haitallisuudesta, eikä selkeää rajaa kloorin pitoisuudelle ole.

Vesiekosysteemit ovat erilaisia ympäri maailmaa, ja myös jätevesien koostumus riippuu paljon niiden lähteestä, joten ei voida yksiselitteisesti sanoa, millainen määrä klooria ja sen yhdisteitä on millekin ekosysteemille haitallista. Kloorille ja sen yhdisteille on kuitenkin asetettu joitakin raja-arvoja esimerkiksi Euroopan

parlamentin ja neuvoston direktiiveissä. Taulukossa 1 on esitetty direktiivien 2020/2184 (Ihmisen käyttöön tarkoitettun veden laatu) ja 2008/105/EY (Ympäristölaatumormit vesipolitiikassa) säätämiä raja-arvoja. Kloori ei kuitenkaan ole ainoa aine jätevesissä, joka voi olla haitallinen. Jäteveden haitallisuus tulee tutkia aina tapauskohtaisesti.

Taulukko 1. Kloorin yhdisteille säädettyjä raja-arvoja Euroopan unionin direktiiveissä 2008/105/EY ja 2020/2184.

Yhdiste	Raja-arvo	Direktiivi
Trihalometaanit	yht. 100 µg/l	(2020/2184)
Dikloorimetaanit	20 µg/l	(2008/105/EY)
Trikloorimetaanit	2,5 µg/l	(2008/105/EY)
Haloetikkahapot	yht. 60 µg/l	(2020/2184)
Kloriitti	0,25 mg/l	(2020/2184)
Kloridi	250 mg/l	(2020/2184)

Tässä LuK-tutkielmassa tutkimme klooratun jäteveden vaikutuksia vesikirppuihin (*D. magna*). Tutkimus oli osa CIRCWASTE-osahanketta, jossa tavoitteena oli löytää keinoja Scandic Hotel Laajavuoren kylpylän puhdistusjärjestelmän huuhteluveden uudelleenkäyttöön. Huuhteluvesi on altaiden puhdistusjärjestelmän suodattimien huuhtelusta syntyvää vettä. Scandic Hotel Laajavuorella on käytössä aktiivihiihi- ja hiekkasuodattimet. Tällä hetkellä huuhteluvedet käsitellään vielä jätevedenpuhdistamolla. Puhdistus siellä on kuitenkin kallista ja kuormittaa puhdistamoita, sillä huuhteluvesi on kylpylän puhdistusjärjestelmän käsittelyn jälkeen liian puhdasta jätevedenpuhdistamolle. Jyväskylän yliopiston Ympäristövaikutusten arviointi (ENVS1149-20) -kurssilla mietittiin mahdollisia vaihtoehtoja huuhteluvesien uudelleenkäyttöön. Yksi vaihtoehtoista olisi johtaa vedet läheiseen Vuorilampeen, josta alueella toimiva hiihto- ja laskettelukeskus Laajis voisi hyödyntää vettä edelleen keinolumentuksessa. Ongelmana vaihtoehdossa voi kuitenkin olla huuhteluveden laatu, joka on mahdollisesti haitallista alueen ekosysteemeille. Kylpylän vedet ovat kloorattuja, ja sen

seurauksena huuhteluedet sisältävät myös jäämiä kloorista, joka reagoiessaan orgaanisen aineksen kanssa muodostaa haitallisia sivutuotteita.

Tutkimuksessa arvioimmekin huuhtelueden toksisuutta. Teimme akuutin toksisuustestin sekä lisääntymistestin kylpylän huuhteluedellä ja Vuorilammen vedellä. Kokeissa käytimme koe-eläimenä vesikirppuja (*D. magna*). Tavoitteena oli selvittää, onko huuhteluesi haitallista vesikirpuille, ja millä pitoisuuksilla. Pohdimme myös, voisiko huuhteluvettä laskea Vuorilampeen ilman erillistä puhdistusta jätevedenpuhdistamolla. Hypotesimme oli, että suuret pitoisuudet huuhteluvettä ovat toksisia vesikirpuille, mutta laimentuessaan myös toksisuus laskee. Huuhtelueden laimentumisen seurauksena oletamme, että huuhteluedet voitaisiin laskea Vuorilampeen.

Tutkimuksemme tuottaa tietoa Scandic Hotel Laajavuoren kiertovesihankkeelle ja voi edistää hankkeen etenemistä. Hanke puolestaan antaa arvokasta tietoa kiertoveden uudelleenkäyttömahdollisuuksista.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkimuksessa tehtiin akuutti toksisuuskoe ja lisääntymiskoe sekä niitä edeltävä esikoe. Tutkimuksissa käytettiin vettä Vuorilammesta (62.261 °N, 25.691 °E) sekä huuhteluvettä Scandic Hotel Laajavuoresta. Huuhtelueden vedenlaaturaportin mukaan se sisältää sitoutunutta ja vapaata klooria noin 0,05 mg/l. Tämän lisäksi huuhteluedessä on esimerkiksi typpiyhdisteitä sekä runsaasti bakteereja. Näytteet Vuorilammesta kerättiin 3.5., 10.5., 17.5. ja 19.5. Näytteet kerättiin Vuorilammen pinnasta näytepulloihin, ja niitä säilytettiin kokeiden välissä kylmiössä (noin 4 °C). Huuhteluesinäytteet haettiin kylpylästä 3.5., 10.5. ja 19.5. Näytteet otettiin kaikkien suodattimien huuhteluesien kokooma-altaan purkupuutkesta, josta vedet lähtevät jätevedenpuhdistamolle.

Koe-eläimenä tutkimuksissa käytettiin *Daphnia magna* -vesikirppuja (Straus), jotka toimitettiin lepomunina (ABOATOX Oy, Suomi). Koe-eläimeksi valittiin vesikirput, koska varsinaiset kokeet tehtiin OECD standardiohjeiden (202 ja 211) mukaan, jotka on tehty juuri vesikirppukokeita varten.

2.1. Vedenlaatumittaukset

Ennen kokeiden suoritusta jokaiselle erälle Vuorilammen vettä ja Scandicin huuhteluvettä tehtiin vedenlaatumittaukset JBL ProAquatest Easy 7in1-liuskatestillä, jolla mitattiin näytteistä Cl_2 -pitoisuus, pH, yleis- ja karbonaattikovuus sekä NO_2 - ja NO_3 -pitoisuudet. Lisäksi pH tarkistettiin pH-paperilla. Vesinäytteistä mitattiin myös ammoniakki- (NH_3) ja ammonium- (NH_4^+) pitoisuudet Prodac test NH_3/NH_4 -tippatestillä. Vesinäytteistä määritettiin myös liukoisen orgaanisen hiilen pitoisuus (DOC) ja kokonaistyyppipitoisuus (TN) hiilianalysointilaitteella (TOC-L, Shimadzu, Japani).

2.2. Esikoe ja akuutti toksisuuskoe

Ennen varsinaisia kokeita tehtiin esikoe, jonka tarkoituksena oli testata Vuorilammen veden ja huuhteluveden sopivuutta varsinaisia kokeita varten. Esikokeen perusteella myös päätettiin mitä laimennoksia varsinaisissa kokeissa käytettiin.

Esikoetta varten vesikirppujen lepomunat laitettiin kuoriutumaan 72 h ennen kokeen suoritusta. Kuoriutumisen aloittamiseen käytettiin Microbiotests Daphtoxkit F magna -pakkausta. Pakkauksen mukaan valmistettiin keinotekoinen makeavesi-standardiliuos (KTM), joka sisälsi natriumvetykarbonaattia (NaHCO_3), kalsiumkloridia ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), magnesiumsulfaattia ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) ja kaliumkloridia (KCl). Lepomunat laskettiin mikrosiivilään, ja säilytysliuos huuhdeltiin pois hanavedellä. Huuhdellut lepomunat siirrettiin petrialjoille, joihin lisättiin KTM-liuosta niin, että lepomunat peittyivät. Petrialjoja inkuboitiin 72 h 20–22 °C jatkuvassa valaistuksessa (6000 lux).

Esikoe suoritettiin samalla tavalla kuin varsinainen akuutti toksisuuskoetta, joka tehtiin OECD standardin liikkumattomuustestin (202) mukaan. Esikoetta varten valmistettiin kaksi laimennossarjaa, jossa toisessa huuhteluvettä laimennettiin Vuorilammen veteen ja toisessa KTM-liuokseen. Laimennokset olivat 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 ja 1:128. Laimennosten lisäksi standardinäytteinä oli pelkkää Vuorilammen vettä, Scandicin huuhteluvettä ja KTM-liuosta. Kustakin liuoksesta ja standardista tehtiin kolme rinnakkaista näytettä. Yhteensä näytteitä oli siis 51. Kunkin näytteen tilavuus oli 10 ml, joista jokaiseen näytteeseen lisättiin pipetillä viisi kuoriutunutta vesikirppua. Vesikirppuja altistettiin liuoksille yhteensä 48 h. Vesikirppujen liikkumattomuus tarkistettiin 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua. Liikkumattomuus tarkistettiin heiluttamalla näytepurkkia varovasti, jonka jälkeen liikuntakyvyttömät vesikirput laskettiin. Esikokeen tuloksissa ei ollut merkittävää eroa siinä, käytettiinkö laimennukseen Vuorilammen vettä vai KTM-liuosta. Tämän vuoksi varsinaisiin kokeisiin valittiin käytettäväksi Vuorilammen vettä, koska se mallintaa paremmin todellista tilannetta, jossa huuhteluvesi mahdollisesti laskettaisiin Vuorilammen. Esikokeen tulokset on esitetty Liitteessä 1.

Myös akuuttia toksisuuskoetta varten vesikirput laitettiin kuoritumaan 72 h ennen kokeen aloitusta. Laimennokset pidettiin samana kuin esikokeessa: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 ja 1:128. Laimennosten lisäksi standardinäytteinä oli pelkkää Vuorilammen vettä ja Scandicin huuhteluvettä. Kustakin liuoksesta tehtiin viisi rinnakkaista näytettä. Näytteitä oli yhteensä 45. Muuten koeasetelma oli sama kuin esikokeessa.

2.3. Lisäntymiskoe

Lisäntymiskoe tehtiin OECD standardin lisääntymistestin (211) mukaan. 72 h ennen kokeen aloitusta vesikirput laitettiin kuoritumaan. Koetta varten tehtiin laimennossarja, jossa huuhteluvettä laimennettiin Vuorilammen veteen. Laimennokset olivat: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ja 1:32. Näiden lisäksi standardinäytteenä oli pelkkää Vuorilammen vettä. Jokaista liuosta oli kymmenen rinnakkaista näytettä. Näytteitä oli yhteensä 60 ja yhden näytteen tilavuus oli 50 ml. Kokeen alussa

jokaiseen näytteeseen lisättiin yksi vesikirppu. Vesikirppujen lisääntymistä seurattiin maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin, yhteensä kolmen viikon ajan. Samalla näytteiden vedet vaihdettiin ja vesikirput ruokittiin leväliuoksella. Ruokintaan käytettiin *Scenedesmus sp.* levää. Annettava levämäärä laskettiin leväliuoksen sameuden perusteella. Sameus mitattiin sameusmittarilla (Turb 430 IR, Xylem analytics, USA). Sameusarvoa käytettiin levän hiilipainon määrittämiseen. Hiilipaino laskettiin kaavalla (Kaava 1)

$$y = 1,666x + 1,1471, \quad (1)$$

jossa y = hiilipaino (mg C/l) ja x = sameus (NTU).

Hiilipainon avulla laskettiin tarvittava levämäärä OECD standardin lisääntymistestin (211) ohjeen mukaan. Hiiltä annettiin kokeen neljällä ensimmäisellä ruokintakerralla 0,1 ml ja loppukokeen ajan 0,2 ml vesikirppua kohden. Lisätty levämäärä otettiin huomioon vesien vaihdossa vähentämällä määrä Vuorilammen veden osuudesta.

Vesienvaihdon ja ruokinnan yhteydessä tarkistettiin, onko emokirppu lisääntynyt. Mahdolliset poikaset laskettiin ja merkattiin ylös. Samalla kokeen aikana kuolleet emokirput kirjattiin ylös ja poistettiin kokeesta. Vesienvaihdon yhteydessä ainoastaan emokirput siirrettiin uuteen liuokseen.

Kokeen jälkeen emokirput kuivattiin kuivapainomittausta varten. Näytteistä poistettiin ylimääräinen neste, ne pakastettiin ja lopuksi kuivattiin kylmäkuivurissa (Christ Alpha 2-4, B. Braun Biotech International, Saksa). Ennen punnitusta vesikirppuja säilytettiin eksikaattorissa. Kuivatut vesikirput punnittiin analyysivaa'alla (XP56 Excellence Plus XP Micro Balance, Mettler Toledo, USA).

2.3 Tilastolliset analyysit

Tilastollisiin analyysihin käytettiin IBM SPSS Statistics (28.0) - tilastoanalyysiohjelmaa sekä Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmaa (16.55).

Akuutin toksisuustestin näytteiden liikkumattomuutta testattiin 24 h ja 48 h aikapisteissä Kruskal-Wallis-testillä. Kruskal-Wallis-testi tehtiin myös lisääntymistestin poikasmäärille sekä poikastuotannon aloitusajankohdalle. Lisääntymistestin kuolleisuuden ja laimennoksen välistä riippuvuutta testattiin taas χ^2 -riippumattomuustestillä. Lisääntymistestin vesikirppujen kuivapainojen normaalijakautuneisuus testattiin ensin Kolmogorov-Smirnov-testillä. Aineisto oli normaalijakautunut, joten tilastollista analyysia jatkettiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (1-ANOVA), jonka jälkeen suoritettiin parittaiset vertailut Tukey-paritestillä.

3 TULOKSET

3.1 Vedenlaatumittaukset ja DOC/TN-määritys

Vuorilammen veden ja Scandicin huuhteluveden vedenlaatumittausten tuloksissa ei ollut merkittäviä poikkeavuuksia (Taulukko 2). Vuorilammen vesi ja Scandicin huuhteluvesi olivat ominaisuuksiltaan samankaltaisia eikä eri päivämäärinä otetuissa näytteissä ollut suuria eroja.

Taulukko 2. Vuorilampi- (V) ja Scandic-näytteille (S) tehtyjen vedenlaatumittausten tulokset. Näytteenottopäivämäärä on esitetty lyhenteen alla.

	V	S	V	S	V	V	S
	3.5.	3.5.	10.5.	10.5.	17.5.	19.5.	19.5.
Cl ₂ (mg/l)	0-0,8	1,5	0,8	0,8	0,8	0-0,8	0,8
pH	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
pH (paperi)	6	5,5-6	6	5,5	6	6	5,5-6
Karbonaattikovuus °d	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6	3-6
Yleinen kovuus °d	3-4	>4	<3	<7	<3	<3	<7
NO ₂ (mg/l)	0	0	0	0	0	0	0
NO ₃ (mg/l)	10	10-25	10	25-50	0-10	0-10	10
NH ₃ /NH ₄ ⁺ (mg/l)	0	0	0	0	0	0	0

Vuorilammen vedessä orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuus oli korkeampi kuin Scandicin huuhteluvvedessä. Kokonaistyyppipitoisuus (TN) oli puolestaan Scandicin huuhteluvvedessä Vuorilammen veteen verrattuna korkeampi (Taulukko 3).

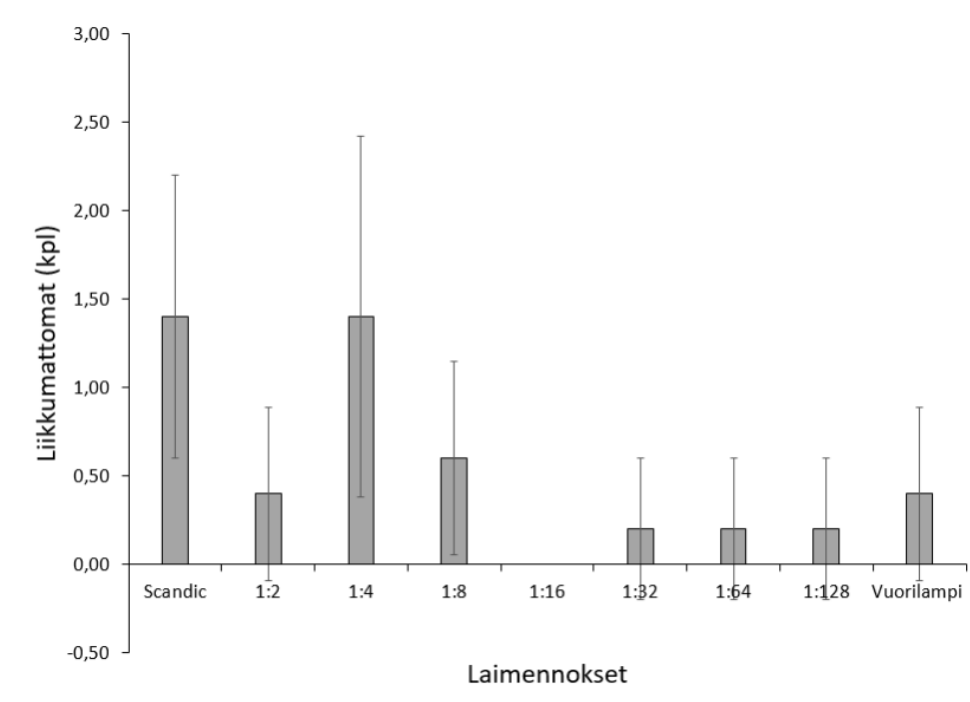
Taulukko 3. Liukoinen orgaaninen hiili- (DOC) ja kokonaistyyppi (TN) -mittausten tulokset 3.5. kerätyille Vuorilampi- ja Scandic-näytteille. Molemmista otettiin kaksi rinnakkaista näytettä. Näytteet suodatettu 0,45 µm kalvon läpi.

	Vuorilampi 1	Vuorilampi 2	Scandic 1	Scandic 2
DOC (mg/l)	6,15	5,96	2,24	2,14
TN (mg/l)	0,61	0,55	1,58	1,52

3.2 Akuutti toksisuuskoee

Akuutissa toksisuuskoeksessa havaittiin eroavaisuuksia vesikirppujen liikkumattomuudessa eri laimennoksissa (Kuva 1). Suurin liikkumattomuus oli standardisarjassa, jossa oli pelkkää Scandicin huuhteluvettä sekä 1:4-laimennossarjassa. Molemmista löytyi yhteensä seitsemän liikkumatonta vesikirppua. Vähiten liikkumattomia vesikirppuja oli 1:16-sarjassa, jossa niitä ei ollut yhtään. Muissa laimennossarjoissa oli yhteensä 1–3 liikkumatonta vesikirppua kokeen lopussa.

Vesikirppujen liikkumattomuuden ja laimennoksen välillä todettiin tilastollisesti merkitsevä ero sekä 24 h aikapisteessä (Kruskal-Wallis, $H = 15,867$, $df = 8$, $n = 45$, $p = 0,041$) että 48 h aikapisteessä (Kruskal-Wallis, $H = 15,949$, $df = 8$, $n = 45$, $p = 0,036$). 1:4-laimennossarja erosi Scandic- ($p = 0,051$), 1:2- ($p = 0,051$) ja 1:16 -sarjoista ($p = 0,051$) parittaisissa vertailuissa 24 h aikapisteessä. 48 h aikapisteessä eli kokeen lopussa ei parittaisissa vertailuissa havaittu eroa ($p > 0,05$) (Kuva 1).



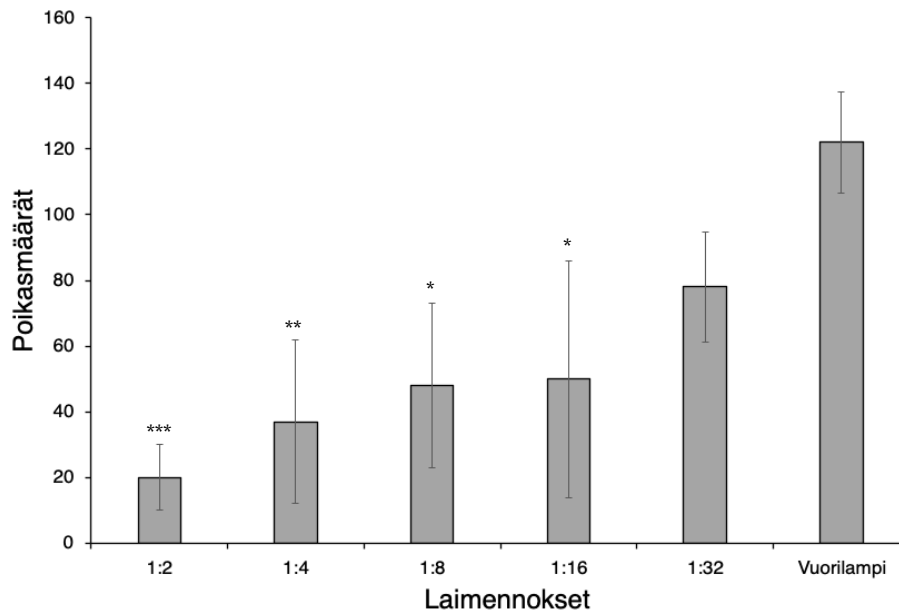
Kuva 1. Akuutin toksisuuskokeen liikkumattomuuden keskiarvot ja keskihajonnat. Vesikirppuja (*D. magna*) altistettiin eri laimennoksissa, joissa Scandicin huuhteluvettä laimennettiin Vuorilammen veteen. 48 h jälkeen liikkumattomat vesikirput laskettiin. Jokaisessa näytteessä oli viisi vesikirppua, ja rinnakkaisia näytteitä oli sarjassa aina viisi ($n = 25$).

3.3 Lisäntymiskoe

Lisäntymiskokeessa havaittiin, että mitä enemmän näytteissä oli Vuorilammen vettä, sitä enemmän poikasia emokirput keskimäärin saivat (Kuva 2). Selvästi eniten poikasia saivat pelkässä Vuorilammen vedessä olleet vesikirput (keskimäärin 122 kpl) ja toiseksi eniten 1:32-laimennoksessa olleet kirput (78 kpl). 1:16-sarjassa poikasia oli keskimäärin 50, 1:8-sarjassa 48 ja 1:4-sarjassa 37. Vähiten poikasia saivat 1:2-sarjan emokirput, jotka saivat keskimäärin vain 20 poikasta. Kokonaispoikasmäärä koko kokeen lopussa oli Vuorilampisarjassa suurin (978) ja pienin 1:2-sarjassa (109).

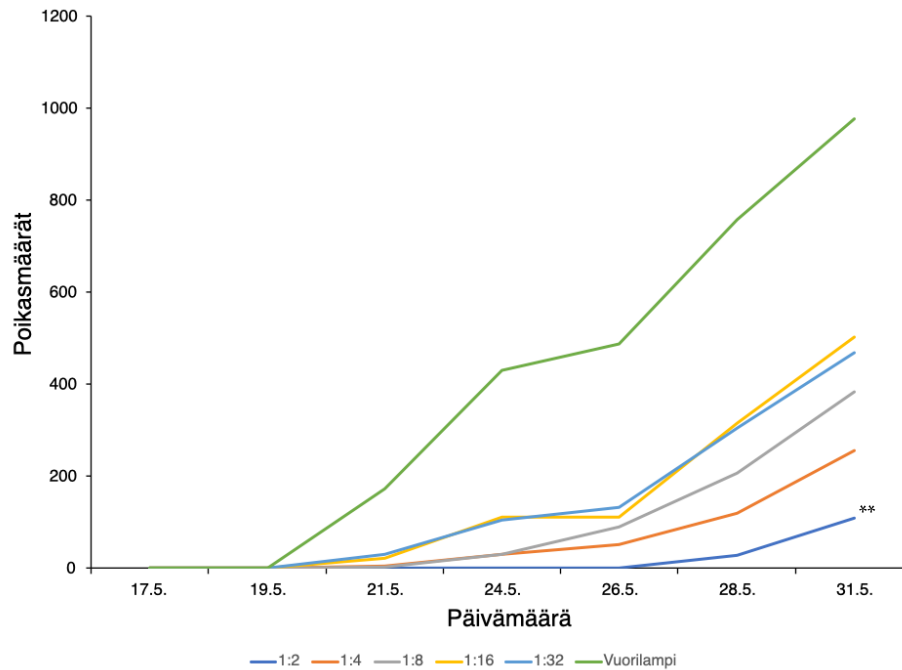
Poikasmäärät erosivat laimennossarjojen välillä tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (Kruskal-Wallis, $H = 26,444$, $df = 5$, $p < 0,001$) (Kuva 2). Laimennosten poikasmäärien parittaisissa vertailuissa eroa oli V (Vuorilampi) ja 1:2 välillä ($p <$

0,001), V ja 1:4 välillä ($p = 0,003$), V ja 1:8 välillä ($p = 0,013$) sekä V ja 1:16 välillä ($p = 0,015$). Muissa laimennoksissa poikasmäärät eivät eronneet toisistaan ($p > 0,05$).



Kuva 2. Vesikirppujen (*D. magna*) lisääntymisen keskiarvo ja keskihajonta eri laimennoksissa kolmen viikon altistuksen jälkeen. Näytteissä Scandicin huuhteluvettä laimennettiin Vuorilammen veteen. Kutakin laimennosta oli 10 rinnakkaista näytettä, jossa jokaisessa oli kokeen alussa yksi emokirppu. *-merkki kertoo laimennoksen eroavan tilastollisesti merkitsevästi Vuorilampi-näytteestä ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Lisääntyminen alkoi suurimmassa osassa näytteitä 21.5., joka oli kokeen 10. päivä. Vuorilampisarjassa lisääntyminen alkoi jo 19.5. (Kuva 3). Poikasmäärien kertyminen oli suhteellisen tasaista kaikissa sarjoissa, paitsi 1:2-sarjassa, jossa havaittiin yksi poikanen 21.5., ja seuraavat poikaset vasta 28.5. Poikastuotannon aloitusajankohta erosi laimennossarjojen välillä (Kruskal-Wallis, $H = 16,040$, $df = 5$, $n = 42$, $p = 0,007$). Parittaisissa vertailuissa eroa oli Vuorilampi- ja 1:2-näytteiden välillä ($p = 0,006$) (Kuva 3).



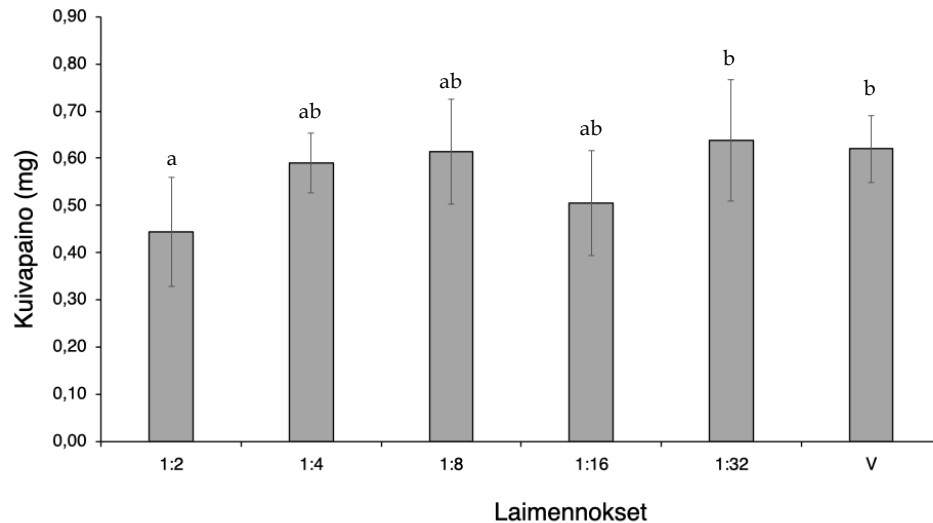
Kuva 3. Vesikirppujen (*D. magna*) kumulatiivinen poikasmäärä kokeen aikana. Päivämäärät ovat poikasmäärien laskentapäivät. *-merkki kertoo laimennoksen eroavan tilastollisesti merkitsevästi Vuorilampi-näytteestä ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

Eniten kuolleisuutta lisääntymiskokeessa oli sarjoissa 1:2, 1:4 ja 1:32, joista kustakin kuoli kokeen aikana neljä emokirppua. Vuorilampi- ja 1:8-sarjoista kuoli molemmista kaksi kirppua. 1:16-sarjassa kaikki emokirput säilyivät hengissä kokeen loppuun asti. Kuolleisuuden ja laimennoksen välillä ei todettu riippuvuutta (χ^2 -testi, $\chi^2 = 6,133$, $df = 5$, $n = 60$, $p = 0,293$).

3.5 Kuivapainomittaukset

Eri laimennoksissa olleiden emokirppujen keskimääräiset kuivapainot erosivat hieman toisistaan (Kuva 4). Keskimäärin pienimpiä emokirput olivat 1:2-laimennossarjassa (0,44 mg) ja suurimpia 1:32-sarjassa (0,64 mg).

Kuivapainojen ja laimennosten välillä todettiin myös tilastollisesti merkitsevä ero (1-ANOVA, $F = 3,395$, $df = 5$, $n = 45$, $p = 0,012$,) (Kuva 4). 1:2-laimennossarja erosi Vuorilampi- ($p = 0,052$) ja 1:32-sarjoista ($p = 0,041$) parittaisissa vertailuissa (Tukey HSD).



Kuva 4. Lisääntymiskokeesta selvinneiden emokirppujen (*D. magna*) kuivapainomittausten keskiarvot ja keskihajonnat eri laimennoksissa, joissa Scandicin huuhteluvettä laimennettiin Vuorilammen (V) veteen. Lisääntymiskokeen alussa jokaista laimennosta oli 10 rinnakkaista näytettä, joissa jokaisessa oli yksi emokirppu. Kokeen edetessä kirppuja kuoli, ja lopussa kuivapainomittauksissa Vuorilampisarjassa oli yhteensä 9 kirppua, 1:2 = 6, 1:4 = 6, 1:8 = 8, 1:16 = 10 ja 1:32 = 6. Laimennokset, joissa on eri kirjain, eroavat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan.

4 TULOSTEN TARKASTELO

Huuhteluveden todettiin pitkällä aikavälillä vaikuttavan vesikirppujen lisääntymiseen ja kasvuun sen pitoisuuden ollessa korkea. Sen sijaan vaikutuksia kuolleisuuteen ei lisääntymiskokeessa havaittu. Akuutissa toksisuuskokeessa laimennosten havaittiin vaikuttavan liikkumattomuuteen, mutta huuhteluvettä ei voida yksiselitteisesti pitää tulosta selittävänä tekijänä.

Huuhteluveden sisältämä kloori voi selittää akuutin toksisuuskokeen tulosta. Liikkumattomuuden ja huuhteluveden pitoisuuden välillä ei kuitenkaan havaittu selkeää yhteyttä, joten ei voida olla varmoja, että nimenomaan huuhteluveden korkea pitoisuus aiheutti vesikirpuissa liikkumattomuutta. Vesikirppujen liikkumattomuus voikin johtua useasta eri tekijästä. Huuhteluvედessä tai

Vuorilammen vedessä on voinut olla muitakin haitallisia yhdisteitä, kuin klooriyhdisteitä, jotka ovat voineet vaikuttaa vesikirppujen liikkuvuuteen sitä heikentävästi. Näytteissä on kuitenkin ollut orgaanisia yhdisteitä, jotka muodostavat reagoidessaan kloorin kanssa erilaisia sivutuotteita (Santos ym. 2012). Vuorilammen vedessä havaittiinkin korkeampi DOC-pitoisuus kuin huuhteluvedessä, mikä voi edistää kloorin haitallisten sivutuotteiden muodostumista. Esimerkiksi Scandic- ja 1:4-laimennossarjan näytteissä, joissa liikkumattomuutta havaittiin eniten, on mahdollisesti voinut olla optimaaliset olosuhteet sivutuotteiden muodostumiselle, jotka ovat voineet aiheuttaa vesikirpuissa haitallisia vaikutuksia. Tulos voi myös olla sattumaa. Vesikirput ovat myös voineet vahingoittua kokeen aikana pipetoinnin seurauksena. Kokeessa olisikin ollut hyvä olla vielä enemmän näytteitä laimennossarjoissa.

Kloorauksen ja sen sivutuotteiden on havaittu vaikuttavan heikentävästi vesikirppujen liikkuvuuteen myös aiemmissa tutkimuksissa. Esimerkiksi sekä Du ym. (2017) että Cui ym. (2021) totesivat tutkimuksissaan akuutin toksisuuden kasvavan veden puhdistuksen jälkeen. Myös Da Costa ym. (2014) totesi akuutissa toksisuuskokeessa kloorauksen vaikuttavan selvästi vesikirppujen (*C. silvestrii* ja *D. similis*) selviytymiseen. Aiempiin tutkimuksiin verrattaessa olisi siis mahdollista, että kloori ja sen sivutuotteet selittäisivät tutkimuksemme tuloksia.

Lisääntymiskokeen perusteella huuhteluveden pitoisuudella todettiin puolestaan olevan selkeä yhteys poikastuotannon määrään ja lisääntymisen aloitusajankohtaan. Laimennoksen huuhteluveden pitoisuuden kasvaessa myös negatiiviset vaikutukset poikastuotannon määrään ja sen alkamisajankohtaan kasvoivat. Myös Melo ym. (2019) totesivat vesikirppujen (*D. magna*) lisääntymisen heikkenevän puhdistuksessa syntyneiden sivutuotteiden (HAA) seurauksena. Tutkimuksessamme emme voi kuitenkaan olla varmoja, mitkä tekijät huuhteluvedessä aiheuttivat haitallisia vaikutuksia vesikirppuihin. Kloori ja sen seurauksena muodostuneet sivutuotteet voivat olla yksi selittävä tekijä lisääntymiseen heikkenemiseen. Tutkimustemme perusteella on kuitenkin mahdotonta tietää, millaisia sivutuotteita näytteissä on mahdollisesti muodostunut,

ja kuinka paljon. Niin kuin akuutin toksisuuskokeen tuloksia, myös lisääntymiskokeen tuloksia voivat selittää myös monet muut tekijät kuin kloori.

Vedenlaatumittausten perusteella Vuorilammen ja huuhteluveden välillä ei ollut merkittäviä eroja, jotka selittäisivät tuloksia. Toisaalta käytetyt testit (JBL ProAquatest Easy 7in1 ja Prodac test NH₃/NH₄) eivät ole ensisijaisesti tarkoitettu laboratorionkokeisiin, joten tulokset ovat lähinnä suuntaa antavia. Scandicilta saadun vedenlaaturaportin mukaan huuhteluvesi sisälsi kuitenkin vapaan kloorin (<0,05 mg/l) lisäksi ainakin typpiyhdisteitä sekä runsaasti bakteereja, jotka voisivat selittää tuloksia. TN-mittausten perusteella huuhteluvedessä todettiin olevan enemmän typpeä kuin Vuorilammen vedessä. Kloorin reagoiessa typpiyhdisteiden kanssa muodostuu typpipitoisia sivutuotteita, jotka ovat usein toksisempia kuin hiilipitoiset sivutuotteet (Ilyas ym. 2018). Huuhteluveden korkeampi typpipitoisuus on voinut siis edistää typpipitoisten sivutuotteiden muodostumista, mikä voisi osaltaan selittää huuhteluveden haitallisuutta sekä akuutissa toksisuuskokeessa että lisääntymiskokeessa. Myös huuhteluveden sisältämät bakteerit voivat olla haitallisia ja vaikuttaa tuloksiin. Vuorilammen korkea DOC-pitoisuus voi myös edistää sivutuotteiden muodostumista. DOC-pitoisuus Vuorilampinäytteissä oli suurempi kuin suositeltu maksimipitoisuus OECD:n (211) ohjeessa. Tutkimuksessa kuitenkin haluttiin testata todellista tilannetta, joten korkeasta DOC-pitoisuudesta huolimatta kokeissa käytettiin Vuorilammen vettä. OECD:n (211) vähimmäiskriteeri poikasmäärälle (min. 60 poikasta) Vuorilampinäytteissä täyttyi kuitenkin.

Huuhteluveden pitoisuudella oli vaikutusta myös lisääntymiskokeen emokirppujen kuivapainoihin. Huuhteluveden pitoisuuden kasvulla laimennoksessa ei kuitenkaan ollut yhtä selkeää yhteyttä emokirppujen kasvuun kuin lisääntymiseen. Emokirput olivat kuitenkin keskiarvoisesti pienimpiä 1:2-näytteissä ja suurimpia 1:32- sekä Vuorilampi-näytteissä. Eroja laimennosten välillä voi myös tasata se, että eri laimennoksissa poikastuotannon määrä vaihteli ja emokirput käyttivät lisääntymiseen eri määrän energiaa. Enemmän poikasia saaneet emokirput käyttivät siis enemmän energiaa lisääntymiseen ja vähemmän

kasvuun. Myöskin se, että vesikirput kuoriututettiin lepomunista, jolloin niiden perimä on vaihteleva, voi vaikuttaa vesikirppujen kasvuun ja peittää allensa muiden tekijöiden vaikutusta. Tämä olisi voitu välttää käyttämällä perimältään samanlaisia vesikirppuja. Huuhteluveden pitoisuudella voidaan siis todeta olevan vaikutusta myös emokirppujen kasvuun.

Sen sijaan kuolleisuuteen lisääntymiskokeessa huuhteluveden pitoisuus ei vaikuttanut. Emokirppujen kuolleisuutta voivat selittää esimerkiksi kirppujen vahingoittuminen pipetoinnin aikana tai kirppujen siirto liian kylmään veteen ruokinnan ja vesienvaihdon yhteydessä. Perimältään erilaisten vesikirppujen käyttäminen voi vaikuttaa myös niiden selviytymiseen. Tilastollisen testin (χ^2 -testi) validiteetti ei myöskään ollut paras mahdollinen, sillä otoskoko oli pieni.

Huuhteluvedellä todettiin siis olevan vaikutusta vesikirppujen liikkumattomuuteen, lisääntymiseen ja kasvuun. On kuitenkin mahdotonta sanoa varmaksi, selittääkö huuhteluveden sisältämä kloori tuloksia vai johtuuko toksisuus veden muista tekijöistä. Huuhteluvedessä vapaata klooria oli vedenlaaturaportin mukaan $<0,05$ mg/l, eli hyvin vähäinen määrä. Alhaista kloorimäärää voivat selittää kylpylän puhdistusjärjestelmän aktiivihiili- ja hiekkasuodattimet. Aiemmissa tutkimuksissa kloorilla on todettu olevan suuri toksisuus jo 1 mg/l pitoisuudella (Emmanuel ym. 2014) ja vesikirpuille (*D. magna*) tehdyissä kokeissa akuutin toksisuuden rajan todettiin olevan 0,17 mg/l (Collivignarelli ym. 2017). Scandicin huuhteluveden klooripitoisuus jää selvästi näiden määritysten alle, joten niiden perusteella huuhteluvesi ei olisi erityisen toksista. Toisaalta jatkuvan altistuksen klooripitoisuuden rajaksi on esitetty 0,003 mg/l pitoisuutta (Brungs 1976), johon verrattuna huuhteluvesi sisältäisi liikaa klooria.

Huuhteluveden klooripitoisuutta on vaikea verrata eri Euroopan unionin direktiiveissä säädettyihin raja-arvoihin (Taulukko 1), sillä niissä raja-arvoja on säädetty vain tietyille kloorin yhdisteille eikä klooripitoisuudelle yleisesti. Tutkimustemme perusteella ei tiedetä minkälaisia ja kuinka paljon mahdollisia

kloorin yhdisteitä muodostuu. Huuhteluveden ja Vuorilammen veden tarkempi kemiallinen analysointi auttaisi selvittämään tarkemmin kloorin roolia tuloksissa.

Lisääntymiskokeen perusteella huuhteluveden vaikutukset olivat sitä pienemmät, mitä enemmän sitä laimennettiin Vuorilammen veteen. Loppupäätelmien kannalta olisikin tärkeää tietää, miten paljon huuhteluvesi todellisuudessa laimenee, jos sitä laskettaisiin Vuorilampeen. Vuorilammen tilavuus ja sinne laskettavan huuhteluveden kokonaismäärä eivät ole tiedossa, joten lopullisen laimennoksen suuruutta ei ole mahdollista laskea. Lisääntymiskokeessa havaittiin jo laimeimmassa sarjassa (1:32) yli puolet pienempi kokonaispoikasmäärä, kuin Vuorilampisarjassa. Jotta poikastuotanto pysyisi Vuorilammessa samalla tasolla huuhteluveden lisäämisen jälkeen, pitäisi huuhteluvettä laimentaa vielä enemmän. Tutkimuksessa olisikin ollut hyvä olla vieläkin enemmän laimennoksia mukana, jotta tiedettäisiin, missä vaiheessa huuhteluveden vaikutukset alkaisivat pienenemään.

Tutkimustemme tulosten perusteella ei voida yksiselitteisesti todeta, voitaisiinko Scandicin huuhteluvettä laskea sellaisenaan Vuorilampeen. Kokeiden perusteella huuhteluvedellä oli haitallisia vaikutuksia, mutta haitallisuuden syitä ei voida varmuudella todentaa. Lisäselvityksiä ja tutkimuksia huuhteluveden vaikutuksista tarvitaankin vielä paljon. Oleellista olisi tietää, paljonko huuhteluvettä lasketaan, ja miten se laimenee Vuorilampeen. Tärkeää on myös selvittää Vuorilammen tarkempi ekologinen tila ja tehdä lisätutkimuksia muilla lajeilla. Tuloksemme antavat kuitenkin jotain suuntaa huuhteluvesien laadusta ja niiden mahdollisista vaikutuksista. Huuhteluvesien laskeminen Vuorilampeen on vain yksi vaihtoehto niiden uudelleenkäytölle. Olisikin myös tärkeää tutkia muita vaihtoehtoja lisää, jotta paras mahdollinen keino huuhteluvesien hyödyntämiseen löydettäisiin.

KIITOKSET

Haluamme kiittää ohjaajiamme Eeva-Riikka Vehniäistä ja Elisa Valliusta hyvistä neuvoista, tuesta ja avusta projektin eri vaiheissa.

Kiitos myös Jyväskylän kaupungille ja Circwaste-hankkeelle, erityisesti Outi Manniselle, vesikirppujen sponsoroinnista ja mahdollisuudesta päästä toteuttamaan mielenkiintoista kandidiprojektia.

Haluamme myös kiittää Scandic Hotel Laajavuoren hotellinjohtaja Janne Pälvimäkeä yhteistyöstä ja hankkeen ideoinnista. Iso kiitos myös ISS:n Risto Närhelle, joka keräsi huuhteluvesinäytteet puolestamme.

Lopuksi haluamme kiittää toisiamme kärsivällisyydestä sekä sujuvasta ja tasapuolisesta yhteistyöstä.

KIRJALLISUUS

- Akpor O.B. 2011. *Wastewater effluent discharge: Effects and treatment processes*. Int. Conf. Chem. Biol. Environ. Eng. 20: 85–91.
- Brungs W.A. 1976. *Effects of Wastewater and Cooling Water Chlorination in Aquatic Life*. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development.
- Collivignarelli M.C., Abbà A., Alloisio G., Gozio E. & Benigna I. 2017. Disinfection in wastewater treatment plants: evaluation of effectiveness and acute toxicity effects. *Sustainability* 9: 1704. doi:10.3390/su9101704.
- Cui H., Chen B., Jiang Y., Tao Y., Zhu X., & Cai, Z. 2021. Toxicity of 17 disinfection by-products to different trophic levels of aquatic organisms: ecological risks and mechanisms. *Environ. Sci. & Technol.* doi: 10.1021/acs.est.0c08796.
- Da Costa J.B., Rodgher S., Daniel L.A. & Espíndola E.L.G. 2014. Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone, and UV radiation. *Ecotoxicology* 23: 1803–1813.
- Direktiivi 2008/105/EY. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2008/105/EY ympäristönlaatuunormeista vesipolitiikan alalla, neuvoston direktiivien 82/176/ETY, 83/513/ETY, 84/156/ETY, 84/491/ETY ja 86/280/ETY muuttamisesta ja myöhemmästä kumoamisesta sekä Euroopan

- parlamentin ja neuvoston direktiivin 2000/60/EY muuttamisesta. EYVL L348/84, 16.12.2008. Saatavissa: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105&from=EN>
- Direktiivi 2020/2184. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2020/2184 ihmisten käyttöön tarkoitettun veden laadusta (uudelleenlaadittu). EYVL L435/1, 16.12.2020. Saatavissa: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=EN>
- Desa, U.N. (2015). RES/70/1. Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development. *Seventieth United Nations General Assembly, New York*, 25.
- Du Y., Lv X., Wu Q., Zhang D., Zhou Y., Peng L. & Hu H. 2017. Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: a review. *J. of Environ. Sci.* 58: 51–63.
- Emmanuel E., Keck G., Blanchard J., Vermande P. & Perrodin Y. 2004. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environ. Int.* 30: 891–900.
- Ilyas H., Masih I. & van der Hoek J.P. 2018. An exploration of disinfection by-products formation and governing factors in chlorinated swimming pool water. *J. Water Health* 16: 861–892.
- Koivunen J. & Heinonen-Tanski H. 2005. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Res.* 39: 1519–1526.
- Melo A., Ferreira C., Ferreira I. & Mansilha C. 2019. Acute and chronic toxicity assessment of haloacetic acids using *Daphnia magna*. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 82: 977–989.
- Microbiotest. Daphtoxkit F magna. Standard operational procedure.
- OECD guideline for testing of chemicals. *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test. 2004. OECD (202).
- OECD guideline for testing of chemicals. *Daphnia magna* Reproduction Test. 2012. OECD (211).
- Rebelo A., Ferra I., Marques A. & Silva M.M. 2016. Wastewater reuse: modeling chloroform formation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23: 24560–24566.
- Santos A. J. M., Miranda M. S. & Esteves da Silva J. C.G. 2012. Chlorine disinfection by-products in swimming pools. Teoksessa: Mangione R. & Carlyle D (toim.). *Chlorine: Properties, applications, and health effects*. Nova Science Publishers, Inc. pp. 161-188.
- Sgroi M., Vagliasindi F.G.A. & Roccaro P. 2018. Feasibility, sustainability, and circular economy concepts in water reuse. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 2: 20–25.

Shevah Y. 2014. Water scarcity, water reuse, and environmental safety. *Pure Appl. Chem.* 86: 1205–1214.

LIITE 1. ESIKOKEEN TULOKSET

Esikoe (5.5.) tulokset 48 h jälkeen

Vuorilampi V	Elossa	Kuollut	S+KTM	Elossa	Kuollut
V A	2	3	1:2 A	4	1
V B	4	1	1:2 B	5	0
V C	3	2	1:2 C	5	0
			1:4 A	5	0
Scandic S	Elossa	Kuollut	1:4 B	4	1
S A	3	2	1:4 C	4	1
S B	5	0	1:8 A	4	0
S C	3	2	1:8 B	4	1
			1:8 C	4	1
KTM	Elossa	Kuollut	1:16 A	3	2
KTM A	5	0	1:16 B	3	2
KTM B	4	1	1:16 C	4	1
KTM C	4	1	1:32 A	4	0
			1:32 B	5	0
			1:32 C	3	2
			1:64 A	5	1
			1:64 B	4	1
			1:64 C	5	0
			1:128 A	5	0
			1:128 B	3	1
			1:128 C	5	0

S+V	Elossa	Kuollut	Näyte	Kuolleet	Kuolleet %
1:2 A	4	1	Vuorilampi	6/15	40,00
1:2 B	5	0	Scandic	4/15	26,67
1:2 C	5	0	KTM	2/15	13,33
1:4 A	5	0	S+KTM 1:2	1/15	6,67
1:4 B	5	0	S+KTM 1:4	2/15	13,33
1:4 C	4	1	S+KTM 1:8	2/14	14,29
1:8 A	5	0	S+KTM 1:16	5/15	33,33
1:8 B	5	0	S+KTM 1:32	2/14	14,29
1:8 C	5	0	S+KTM 1:64	2/16	12,50
1:16 A	5	0	S+KTM 1:128	1/14	7,14
1:16 B	5	0	S+V 1:2	1/15	6,67
1:16 C	5	0	S+V 1:4	1/15	6,67
1:32 A	4	1	S+V 1:8	0/15	0,00
1:32 B	5	0	S+V 1:16	0/14	0,00
1:32 C	5	0	S+V 1:32	1/15	6,67
1:64 A	5	0	S+V 1:64	0/15	0,00
1:64 B	4	0	S+V 1:128	0/15	0
1:64 C	5	0			
1:128 A	5	0			
1:128 B	5	0			
1:128 C	5	0			