

LuK-tutkielma

**Mikromuovien ja humuspartikkeleiden vaikutus  
kasviplanktonlajien *Cryptomonas erosa* ja  
*Stephanodiscus sp.* kasvuun**

**Emilia Honkaranta ja Venla Valjakka**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Luonnonvarat ja ympäristö

8.12.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Luonnonvarat ja ympäristö

Emilia Honkaranta ja Venla Valjakka: Mikromuovien ja humuspartikkeleiden vaikutus kasviplanktonlajien *Cryptomonas erosa* ja *Stephanodiscus sp.* kasvuun

Kandidaatin tutkielma: 23 s., 1 liite ([5] s.)

Tutkielman ohjaajat: Dosentti Sami Taipale ja tutkijatohtori Minna Hiltunen  
Joulukuu 2020

---

Hakusanat: Biomuovi, nielulevä, piilevä

Muovijätteen määrä on noussut yhdeksi maailman suurimmista ympäristöongelmista. Muovijätteen kasvava määrä ja sen mahdolliset vaikutukset ympäristöön ja ihmiseen ovat globaali ongelma, sillä muovia ajautuu kaikkiin faaseihin maapallolla. Tässä tutkielmassa keskitytään perinteisen- ja biohajoavan mikromuovin (kooltaan < 10 µm) vaikutuksiin nielulevän ja piilevän kasvuun. Tutkielmassa tarkastellaan myös luonnonpartikkelin (humus) vaikutusta kasviplanktonin kasvuun. Kasviplankton on merkittävä osa ekosysteemejä, sillä se toimii perustuottajana. Aiemmissä tutkimuksissa mikromuovin on todettu alentavan kasviplanktonin kasvua ja haittaavan fotosynteesiä. Tutkimuslajeiksi valittiin nielulevä *Cryptomonas erosa* ja piilevä *Stephanodiscus sp.* Kasviplankton altistettiin viidelle eri käsittelylle: kaksi perinteistä muovia (polyvinyylidikloridi (PVC) ja polypropeeni (PP)) ja kaksi biomuovia (polylaktidi (PLA) ja biomuovipussi) sekä humus. Lisäksi kummastakin kasviplanktonlajista kasvatettiin kontrollinäytteet. Konsentraatioita altistajille oli kolme: 0,1; 1,0 ja 10 mg/l. Kasviplanktonin kasvua mitattiin CASY-solulaskurilla, ja mittauksista laskettiin kasvunopeus ja solumäärien lopputaso. Tutkimuksessa ilmeni, että perinteisillä mikromuoveilla oli vaikutusta kasviplanktonlajien kasvuun, mutta biomuoveilla ei ollut. Tutkimuksessa todettiin PP:n vaikuttavan molempien kasviplanktonlajien kasvuun positiivisesti, ja PVC:n vaikuttavan piilevän kasvuun negatiivisesti. Huomionarvoista oli myös, että humus vaikutti nielulevän kasvuun positiivisesti. Kasviplankton saattoi käyttää mikromuovia kasvualustana ja hyötyä humuksen tarjoamista ravinteista.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

Natural resources and environment

Emilia Honkaranta and Venla Valjakka: Effects of microplastics and humus particles on growth of the phytoplankton species *Cryptomonas erosa* and *Stephanodiscus sp.*

Bachelor of Science Thesis: 23 p. 1 supplement ([5] p.)

Supervisors: Senior lecturer Sami Taipale, Postdoctoral researcher Minna Hiltunen

December 2020

---

Keywords: Bioplastic, cryptophyta, diatom

The amount of plastic waste has become one of the biggest environmental problems in the world. The growing amount of plastic waste and its potential effects on the environment and humans is a global problem, as plastic drifts into all phases on Earth. This study focuses on the effects of conventional and biodegradable microplastics (< 10 µm in size) on the growth of a cryptophyte and a diatom. This study also examines the effect of a natural particle (humus) on phytoplankton's growth. Phytoplankton are an important part of ecosystems as they act as primary producers. In previous studies, microplastics have been detected to reduce phytoplankton's growth and interfere with photosynthesis. Cryptophyte *Cryptomonas erosa* and diatom *Stephanodiscus sp.* were selected as study species. They were exposed to five different treatments: two traditional plastics (polyvinyl chloride (PVC) and polypropylene (PP)) and two bioplastics (polylactide (PLA) and bioplastic bag) and humus. In addition, control samples were grown for both phytoplankton species. There were three concentrations for exposer: 0.1, 1.0 and 10 mg/l. Phytoplankton growth was measured with a CASY -cell counter and the measurements were used to calculate the growth rate and the final number of cells at the end of the experiment. The study indicated that traditional microplastics had an effect on the growth of phytoplankton species, but bioplastics did not. The results showed that PP had a positive effect on the growth of both phytoplankton species, and PVC had a negative effect on diatom's growth. It was also noteworthy that humus had a positive effect on the growth of the cryptophyte. Phytoplankton might have used the microplastics as a substrate and benefit from the nutrients provided by humus.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>5</b>
2.1 Nielulevä ja piilevä .....	5
2.2 Altistajat .....	7
2.3 Altistuskoe .....	8
2.4 Aineiston tarkastelun menetelmät.....	10
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>11</b>
3.1 Piilevä.....	11
3.2 Nielulevä.....	14
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>17</b>
4.1 Vaikuttaako mikromuovi kasviplanktonin kasvuun? .....	17
4.2 Humuksen vaikutus tutkimuslajeihin.....	18
4.4 Johtopäätökset .....	20
<b>KIITOKSET .....</b>	<b>21</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>21</b>
<b>LIITE 1. Kasviplanktonlajien mitatut kasvukuvaajat .....</b>	<b>24</b>

# SANASTO JA LYHENTEET

## SANASTO

<b>Biomuovi</b>	Muovi, joka on osittain tai kokonaan luonnollista alkuperää tai biohajoava
<b>Kasviplankton</b>	Fotosynteettisten mikro-organismien ryhmä, joka elää kokonaan tai osittain vesiympäristössä, missä se toimii ekosysteemin perustuottajana
<b>Mater-Bi</b>	Materiaali, joka sisältää biohajoavaa polyesteriä ja kasvitärkkelystä (maissi)
<b>Mikromuovi</b>	Alle 5 mm kokoiset muovipartikkelit
<b>Humus</b>	Orgaanista, hapanta (pH $\approx$ 4,8) ainesta, joka muodostuu pitkällisen hajoamisen seurauksena.

## LYHENTEET

<b>PVC</b>	Polyvinyylikloridi
<b>PP</b>	Polypropeeni
<b>PLA</b>	Polylaktidi

# 1 JOHDANTO

Yhden aikamme laajimmista ympäristöongelmista on aiheuttanut 1940-luvulla alkanut muovin massatuotanto (Cole ym. 2011). Vuonna 2018 maailman muovintuotanto oli 359 miljoonaa tonnia (PlasticsEurope 2019). Muovia on kaikkialla: ilmassa, vesistöissä, maaperässä ja eliöissä (Silva ym. 2018). Muoviroskan kohtalona on useimmiten meriin päätyminen. WWF:n (2019) raportin mukaan maailman merissä on yli 150 tonnia muovijätettä. Mikäli muovintuotanto jatkuu nykyisellä vauhdilla, on laskettu, että merten muovijätteen määrä kaksinkertaistuu vuoteen 2030 mennessä.

Muovijätteestä puhuttaessa on tärkeää erottaa makro- ja mikromuovit toisistaan. Makromuoveilla tarkoitetaan yli 2,5 cm kokoisia muovipartikkeleita, kuten esimerkiksi muovipulloja, muovipillejä sekä erilaisia muoviverkkoja (Wagner ym. 2018). Makromuovit voivat muokata ympäristöä ja haitata eliöiden selviytymistä, muun muassa aiheuttamalla eliöille liikkumisongelmia ja jopa tiettyjen eliöiden kuolemia. Mikromuovi on useimmiten määritelty alle 5 mm kokoisiksi muovipartikkeleiksi. Vedessä muovi hajoaa hiljalleen pienemmäksi merivirtojen aiheuttaman mekaanisen hajotuksen, eliöiden ja merellä seilaavien alusten dynamiikan sekä UV-säteilyn aiheuttaman hajoamisen myötä (Frias ym. 2019). Näin makromuovista syntyy mikromuovia ja sitäkin pienempää nanomuovia, joka on kooltaan alle 0,1  $\mu\text{m}$  (Wagner ym. 2018).

Mikromuovit voidaan jakaa primäärisiin ja sekundäärisiin mikromuoveihin (Wagner ym. 2018). Primääriset mikromuovit valmistetaan tarkoituksenmukaisesti edellä mainitun kokoisiksi, kun taas sekundääriset mikromuovit muodostuvat isompien muovikappaleiden hajotessa pienemmiksi partikkeleiksi. Primäärisiä mikromuoveja on esimerkiksi useissa kosmetiikkatuotteissa, kuten

kuorintavoiteissa ja hammastahnoissa. Sekundäärisiä mikromuoveja muodostuu esimerkiksi pyykinpesun yhteydessä vaatekuitujen hajotessa.

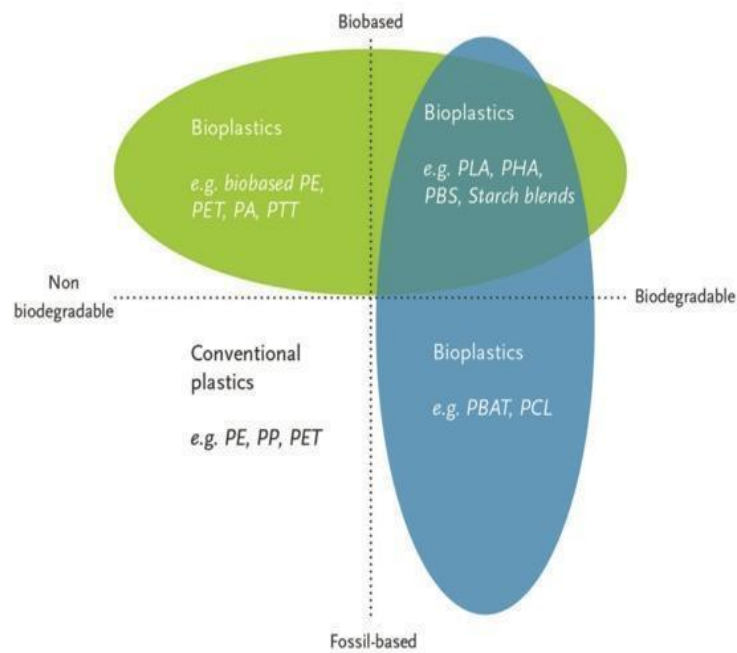
Muovit ovat synteettisiä polymeerejä, jotka valmistetaan polymeroimalla öljystä tai kaasusta uutettuja monomeerejä (Cole ym. 2011). Molekyyliarakenteensa vuoksi ne hajoavat hyvin hitaasti ympäristössä. Batel ym. (2018) totesivat tutkimuksessaan, että päätyessään eliöihin mikromuovit voivat vapauttaa niihin lisättyjä haitallisia aineita, kuten polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä eli PAH-yhdisteitä, ja että mikromuovit voivat toimia myös vektoreina POP-yhdisteille (pysyvät orgaaniset ympäristömyrkyt). Tällä voi olla hyvin toksisia vaikutuksia eliöihin.

Koska eliöt eivät pysty hajottamaan muovia ruuansulatuselimistössään, sitä saattaa kertyä kudoksiin (Cox ym. 2019). Suurin osa kuitenkin kulkeutuu ruuansulatuselimistön läpi ja poistuu eliöstä jätteenä. Mikromuovi voi myös bioakkumuloitua ja rikastua ympäristössä (Xu ym. 2020). Mikromuovia siis päätyy ympäristössä kasviplanktonista ravintoverkossa eteenpäin.

Muoveja on monia erilaisia, ja eri muovilaadut eroavat toisistaan molekyyliarakenteensa suhteen. Yleisimpiä käytettyjä muoveja ovat Suomen Uusiomuovi Oy:n ([www.uusiomuovi.fi](http://www.uusiomuovi.fi), luettu 22.3.2020) mukaan polyeteenitereftalaatti (PET), suurtiheyspolyeteeni (PE-HD), polyvinyylidikloridi (PVC), matalatiheyspolyeteeni (PE-LD), polypropeeni (PP) ja polystyreeni (PS). PVC:tä käytetään esimerkiksi viemäriputkien ja keinoahan materiaalina, PP:tä muun muassa kalvojen ja pakkausrasioiden materiaalina ja PET:tä esimerkiksi muovipullojen ja muovipussien materiaalina.

Muovit voidaan jakaa myös bio- ja perinteisiin muoveihin: perinteiset muovit ovat öljypohjaisia, eivätkä ne ole biohajoavia (European bioplastics 2016). Muovimateriaali luokitellaan biomuoviksi, mikäli se on biopohjainen, biohajoava tai molempia (Kuva 1). Luokittelu perustuu siis muovin alkuperään ja kompostoitavuuteen. Biomuovit voidaan siten jakaa kolmeen luokkaan:

1) biopohjaisiin tai osittain biopohjaisiin muoveihin (esimerkiksi PE, PP ja PET voivat olla biopohjaisia), 2) biopohjaisiin ja biohajoaviin muoveihin (esimerkiksi polylaktidi (PLA), polyhydroksialkonaatti (PHA) ja polybutyleenisukkinaatti (PBS)) ja 3) biohajoaviin muoveihin, jotka ovat fossiilista alkuperää (esimerkiksi polybutyleeni-adipaatti-tereftalaatti (PBAT)).



Kuva 1. Muovien luokittelu (European bioplastics 2016).

Kasvavan muoviongelman myötä muovien ympäristövaikutusten tutkiminen on lisääntynyt runsaasti, mikä viestii tiedon tarpeesta. Tietoa tarvitaan muun muassa siitä, miten mittavat vaikutukset muovilla on eliöihin ja onko muovi ihmiselle terveysriski. Vaikka muovi itsessään ei tuottaisi eliölle haittaa, voi sen yhteisvaikutus muiden aineiden kanssa olla ympäristössä merkittävä.

Koska tutkimusala on uusi, se vaatii vielä yhtenäisten ja vakinaistettujen tutkimusmenetelmien kehittämistä sekä terminologian määrittelyä, jotta tutkimukset olisivat vertailukelpoisia. Lisääntyvä tutkimus aiheesta tuottaa



parempaa tietoa mikromuovin mahdollisista vaikutuksista ympäristöön ja eliöihin. Myös pidempiaikaiselle tutkimukselle on tarvetta, jotta mikromuovien pitkäaikaisvaikutuksia ekosysteemeissä voitaisiin ymmärtää paremmin.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin mikromuovin ympäristövaikutuksia. Käytetyt mikromuovipartikkelit olivat kooltaan alle 10 µm. Kasviplankton valikoitui tutkimuskohteeksi, sillä se kasvaa nopeasti, sitä on helppo käsitellä ja se on herkkä toksisille yhdisteille (Zhang ym. 2017). Lisäksi kasviplankton on merkittävä eliöryhmä ekosysteemeissä, sillä se toimii perustuottajana. Mikromuovin mahdollisesti aiheuttamat muutokset kasviplanktonin rasvahappokoostumuksessa saattavat vaikuttaa primäärikuluttajien ravinnon laatuun, stressin sietokykyyn ja kasvuun (Guschina ym. 2020). Siten mikromuovin vaikutukset voivat ulottua koko ravintoverkkoon (*bottom-up*). Tutkimuksessa selvitettiin myös humuksen vaikutusta kasviplanktonilajien kasvuun, sillä haluttiin tarkastella mikromuovipartikkeleille vertailukohteena ympäristössä esiintyvää luonnonmukaista partikkelia. Humusta esiintyy luonnostaan vesiekosysteemeissä, mihin sitä huuhtoutuu maaekosysteemeistä (Waksman 1936). Humus on määritelmältään orgaanisesta aineksesta mikrobihajotuksen tai käymisen yhteydessä muodostunutta hapanta ainesta (pH ≈ 4,8), joka vaihtelee väriltään keltaruskeasta mustaan.

Tässä tutkielmassa pyrittiin selvittämään biohajoavan ja perinteisen mikromuovin toksista vaikutusta kahden eri kasviplanktonilajin - nielulevän ja piilevän - kasvuun. Tutkimuskysymyksinä olivat:

1. Vaikuttaako mikromuovi kasviplanktonin kasvuun?
2. Onko perinteisten mikromuovien ja biohajoavien mikromuovien vaikutuksissa kasviplanktonin kasvuun eroja?
3. Onko luonnonpartikkeli humuksella vaikutusta kasviplanktonin kasvuun ja eroavatko sen vaikutukset mikromuovin vaikutuksista?

Tutkimushypoteesina oletettiin mikromuovin vaikuttavan kasviplanktonin kasvuun heikentävästi. Tutkimuksen tarkoituksena on myös verrata perinteisten muovien, biomuovien ja luonnonpartikkelin vaikutuksen eroa. Toinen tutkimushypoteesimme oli, että biomuovit ovat toksisempia kasviplanktonille perustuen niiden parempaan biohajoavuuteen ja täten toksisten aineiden biosaatavuuteen. Biomuovien toksisuus on kiinnostavaa, sillä yleinen mielikuva niistä on, etteivät ne ole biohajoavuutensa vuoksi yhtä haitallisia ympäristölle kuin perinteiset muovit. Nollahypoteesina on, ettei mikromuovilla ole vaikutusta kasviplanktonin kasvuun.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Nielulevä ja piilevä

Kasviplankton määritellään fotosynteettisten mikro-organismien ryhmäksi, joka on sopeutunut elämään osittain tai jatkuvasti vesiympäristössä, missä se muodostaa suuren osan pelagisten ravintoverkkojen käytettävissä olevasta orgaanisesta hiilestä (Reynolds 2006). Kasviplankton toimii siis ekosysteemin perustuottajana. Se on kasveihin kuuluva ryhmä, joka sisältää esitumallisia ja aitotumallisia yksisoluisia eliöitä (Sahoo & Seckbach 2015). Kasviplanktonilla on pitkä evoluutiohistoria. Kasviplankton muodosti ilmakehän hapen ja siten mahdollisti nykyisen kaltaisen elämän maapallolle.

Tutkimuslajeiksemme valittiin nielulevä (*Cryptomonas erosa*) ja piilevä (*Stephanodiscus sp.*). Nielulevät ja piilevät ovat yleisesti mikromuovitutkimuksissa käytettyjä kasviplanktonryhmiä ja myös ympäristössä runsaasti esiintyviä. Tutkimuksen leväkannat oli kasvatettu Jyväskylän yliopistolla.

Nielulevät ovat yksisoluisia ja siimallisia levämuotoja (Tikkanen 1986). Kooltaan nielulevät ovat noin 2,5–25 µm. Solut ovat pitkulaisia tai soikeita ja sivulta

katsottuna epäsymmetrisiä, joten niistä pystyy erottamaan selkä- ja vatsapuolen. Vatsapuolen ontelosta ulkonee kaksi eripituista uimasiimaa. Nieluleviltä puuttuu jäykkä soluseinä, mikä vuoksi soluseinä on hyvin ohut. Erityispiirteensä nielulevillä on solun ulkopinnalla olevat valoa taivattavat jyväset, ejektiosomit, jotka toimivat kuin jousi. Ne reagoivat ärsytykseen oikeenemalla ja sinkoamalla solun eteenpäin. Nielulevät ovat mikсотrofeja, eli yhteyttämisen lisäksi ne pystyvät hyödyntämään ympäristön orgaanista hiiltä energianlähteenään. *Cryptomonas*-sukuun kuuluvat lajit ovat etenkin makean veden lajeja, ja niiden osuus suomalaisten vesistöjen kasviplanktonkoostumuksesta on huomattavan suuri. Ne ovat tyypillisiä tummissa ja humuspitoisissa vesissä.

Piilevät vastaavat 20–25 % globaalista perustuotannosta, joten niillä on merkittävä rooli koko biosfäärissä (Sahoo & Seckbach 2015). Piilevät ovat yksisoluisia, mutta ne voivat muodostavat myös kolonioita (Tikkanen 1986). Piileville ominaista on kahdesta puoliskosta koostuva piioksidipitoinen vahva soluseinä, jota kutsutaan frustuliksi. Lisäksi soluseinässä voi olla ulokkeita tai piikkejä, joilla solu pystyy kiinnittymään pintoihin. Piilevää esiintyy runsaasti niin makeissa kuin suolaisissa vesissä, mutta merivedessä niitä esiintyy enemmän. Suomalaisten sisävesien kasviplanktonbiomassasta piilevät muodostavat kuitenkin usein suuren osan. *Stephanodiscus*-sukuun kuuluu noin 20 lajia, joista valtaosa elää makeissa vesissä. Niiden solut ovat kiekkomaisia, ja myös ne voivat muodostaa ketjumaisia kolonioita.

Ennen tutkimusta arvioitiin, että koska nielulevän soluseinä on ohut, se voi ottaa mikromuovia sisäänsä helpommin kuin piilevä, mikä voisi altistaa sen herkemmin mikromuovin mahdollisille haittavaikutuksille. Piilevän paksu soluseinä voi suojata sitä enemmän myös mikromuovin aiheuttamilta mekaanisilta vaurioilta, jotka voivat heikentää kasviplanktonin kasvua merkittävästi.

## 2.2 Altistajat

Nielulevän ja piilevän altistajina käytettiin partikkelimaista ( $< 10 \mu\text{m}$ ) PVC:tä, PP:tä sekä biopohjaista ja -hajoavaa polyesteriä PLA:ta sekä biojätepussin palasia. Mikromuovien vertailukohtana käytettiin luonnonpartikkeli humusta. Biojätepussi on valmistettu MATER-BI®-materiaalista, joka valmistetaan yhdistämällä kasvitärkkelystä ja biohajoavaa polyesteriä (Ruupunen 2014). Kasvitärkkelyksen lähteenä on maissi. Lisäksi materiaali sisältää muun muassa kasviöljyjä. Markkinoija ei paljasta tarkemmin tuotemateriaaleja, mutta luultavimmin biohajoavana polyesterinä on käytetty kuitenkin joko PHA:ta (polyhydroksialkanoaatit) tai PLA:ta.

Kasviplanktonlajeja altistettiin siis biohajoavilla- ja perinteisillä mikromuovipartikkeleilla sekä humuksella. Valitut pitoisuudet (0,1 mg/l, 1,0 mg/l ja 10 mg/l) ovat alhaisempia kuin yleensä mikromuovitutkimuksissa käytetyt, mutta silti paljon suurempia kuin ympäristöstä mitatut pitoisuudet. Esimerkiksi Uurasjärven ym. (2020) tutkimuksessa ilmenneet pitoisuudet (keskimäärin 0,27 mikromuovipartikkelia/ $\text{m}^3$ ) Pohjois-Savossa sijaitsevalla Kallavedellä ovat huomattavasti pienempiä kuin tässä tutkimuksessa käytetyt.

PVC, PP ja PLA saatiin mikromuovipartikkeleiksi raastamalla niistä koostuvat esineet raastinraudalla. PVC raastettiin viemäriputken palasesta ja PP pipettikärkien säilytysrasiasta. PLA:ta raastettiin 3D-tulostetusta PLA-palasesta ja pätkimällä saksilla 3D-tulostukseen käytettävää PLA-lankaa. Sen jälkeen raastetta hajotettiin lisää tehosekoittimella, minkä jälkeen partikkeleista seulottiin  $< 50 \mu\text{m}$  kokoluokka. Humus valmistettiin Kekkilän luonnonturpeesta murskaten sitä huumareella, ja myös siitä seulottiin edellä mainittu kokoluokka. Biojätepussi hajotettiin suoraan tehosekoittimella. Tutkimuksessa käytettiin siis sekundääristä, eli isommista muovikappaleista hajonnutta mikromuovia.

Seuraavaksi partikkelit laitettiin tislattuun veteen vuorokaudeksi, jotta niistä irtosi ylimääräiset aineet. Sen jälkeen partikkelit huuhdeltiin ja eroteltiin sentrifugilla

(MSE Harrier 18/80) kahdesti. Jyväsjärvestä noudettu järvivesi suodatettiin huokoskoon 0,7 µm suodatinpaperilla (Whatman GF/F). Lopuksi mikromuovit laitettiin järviveteen noin viikoksi, jotta partikkelien pinnalle muodostuisi mahdollisimman luonnonmukainen biofilmi.

Humuksen konsentraatio määritettiin suodattamalla. Ennen suodatusta suodatinpapereita kuivatettiin lämpökaapissa vuorokausi, jonka jälkeen ne punnittiin. Seuraavana päivänä järvivedessä lionnut humus suodatettiin huokoskoolla 0,7 µm, jonka jälkeen suodatinpaperit jätettiin jälleen kuivumaan lämpökaappiin, jotta seuraavana päivänä voitiin punnita humuksen kuivapaino ja laskea tarvittavat konsentraatiot.

### **2.3 Altistuskoe**

Kasvatettu kasviplankton jaettiin 50 ml suodatinkorkillisiin pulloihin, minkä jälkeen niihin lisättiin halutut muovi- ja humuskonsentraatiot. Käsittelyjä oli viisi (PVC, PP, PLA, biojätepussi ja humus). Käytimme edellä mainituissa käsittelyissä pitoisuuksia 0,1; 1,0 ja 10 mg/l. Kaikkia kokeessa käytettäviä käsittelyjä testattiin siis näillä kolmella pitoisuudella, ja kaikista kasvatettiin myös kolme replikaattinäytettä. Lisäksi molemmista kasviplanktonlajeista kasvatettiin kolme kontrollinäytettä. Kasvatusoloissa lämpötila oli 20 °C ja valorytmi oli 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää. Valoisuus kasvatushuoneessa oli keskimäärin noin 3,45 kiloluksia. Kasvatusolojen satunnaistamiseksi koepullot aseteltiin hyllylle satunnaiseen järjestykseen (Kuva 2).



Kuva 2. Koepullot kasvatuhuoneessa. © Venla Valjakka

Altistuskoe toteutettiin Jyväskylän yliopiston laboratoriossa. Kokeen arvioitiin kestävän noin 30 päivää riippuen kasviplanktonin kasvunopeudesta. Nielulevä saavuttaa stationäärivaiheen yleensä noin 20 päivässä ja piilevä noin 10 päivässä. Koeyksikköjen solumäärien muutoksia seurattiin solulaskurilla (CASY cell counter, OMNI Life Science), kapillaarikoolla 60  $\mu\text{m}$ .

Solulaskurilla mitatut tulokset kirjattiin Microsoft Excel -ohjelmaan (versio 16.41). Piilevän solumäärää tarkasteltiin kolme kertaa viikossa (ma, ke, pe) ja nielulevää kaksi kertaa viikossa (ma, to) sen hitaamman kasvunopeuden vuoksi. Mikäli kasviplanktonin kasvua ei rajoita mikään ympäristötekijä, solujen lukumäärän logaritmi kasvaa populaatiossa ajan funktiona (Reynolds 2006). Kasvunopeudet eri käsittelyissä määritettiin Reynolds (2006) yhtälöllä, jossa  $\mu$  = kasvunopeus,  $T_x$  = solumäärä lopussa,  $T_0$  = solumäärä alussa ja  $t$  = vaiheiden välisten päivien lukumäärä. Kasvunopeuden avulla voitiin havaita, kuinka monesti solut jakautuivat vuorokauden aikana. Yhtälö siis kuvaa biomassan kasvua, vaikka se havaitaankin solukonsentraation muutoksena.

$$\mu = \ln \left( \frac{\text{solumäärä}_{T_x}}{\text{solumäärä}_{T_0}} \right) / t$$

Koe lopetettiin, kun kasviplanktonilajit olivat saavuttaneet kasvun stationäärivaiheen, jolloin kasvuympäristön resurssit alkoivat ehtyä ja solut varjostaa toisiaan solujen tiheydestä johtuen (Reynolds 2006). Tässäkin vaiheessa solut jakautuivat yhä, mutta hitaammin, ja solujen kuolemat tasoittivat kasvun.

#### **2.4 Aineiston tarkastelun menetelmät**

Kasvunopeus ( $\mu$ ) nielulevälle laskettiin aiemmin mainitun yhtälön avulla valitsemalla solumääräksi alkuvaiheessa kullekin replikaatille ensimmäinen piste nopean kasvun alueelta kuvaajien avulla (Liite 1). Loppupisteeksi kullekin replikaatille valittiin nopean kasvun viimeinen piste. Esimerkiksi nielulevän PVC-käsittelyn konsentraation 1,0 mg/l kasvunopeus laskettiin koepäivien 5 ja 26 väliin osuvista mittauksista jokaiselle replikaatille erikseen (Liite 1, Kuva 6).

Lopputaso solumäärien tiheyksistä ( $T_x$ ) laskettiin jokaiselle replikaatille kuvaajien avulla tasaantuneen kasvun ajalta mitattujen solumäärien keskiarvoksi (Liite 1). Esimerkiksi piilevän PVC-käsittelyn konsentraation 1,0 mg/l replikaatin 3 lopputasoksi laskettiin mittauspäivien 16 ja 23 (näinä päivinä mitattiin replikaatti 3) solumäärien keskiarvo (Liite 1, Kuva 11). Lopputasojen solumääriä eri käsittelyissä havainnollistettiin hajontakuvioiden avulla (Kuva 3 ja Kuva 5). Lopputasojen ja Excel-kuvaajien (Liite 1) avulla voitiin päätellä, oliko käsittelyn vaikutus negatiivinen vai positiivinen.

Yhtälö, jonka avulla kasvunopeudet laskettiin, laskee kulmakertoimen eksponentiaalisen kasvun vaiheelle, joka oli eri pituinen eri käsittelyissä. Näiden kulmakerrointen vertailu ei siis ota huomioon kasviplanktonin solumäärien eroa eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. Tämän vuoksi lopputason määrittäminen oli tärkeää solumäärien vertailun kannalta.

Aineiston tilastollinen analyysi tehtiin IBM SPSS Statistics -tilasto-ohjelmalla (versio 26) ja Excelillä. Tilastolliseen testaamiseen käytettiin varianssianalyysia

(1-suuntainen ANOVA), sillä haluttiin selvittää, erosivatko vastemuuttujien keskiarvot eri käsittelyissä tilastollisesti merkitsevästi. Lisäksi konsentraatioiden vertailuun käytettiin Tukeyn testin parittaisia vertailuja (post-hoc). Varianssianalyysin oletukset ovat, että havaintovirheet ovat normaalisesti jakautuneet, riippumattomat ja niiden varianssit ovat yhtäsuuret. Normaalisuutta testattiin Shapiron-Wilkin testillä ja varianssien yhtäsuuruutta ANOVA:n varianssien yhtäsuuruustestillä. Nielulevän PVC-käsittelyn kohdalla ANOVA:n oletukset eivät toteutuneet, sillä varianssit eivät olleet yhtäsuuret, mikä johtui todennäköisesti aineiston pienestä otoskoosta. Lisäksi nielulevän kasvunopeutta tarkasteltaessa jäännökset eivät noudattaneet normaalijakaumaa PVC-käsittelyssä. Toisaalta nämä erot eivät myöskään olleet tilastollisesti merkitseviä.

## **3 TULOKSET**

### **3.1 Piilevä**

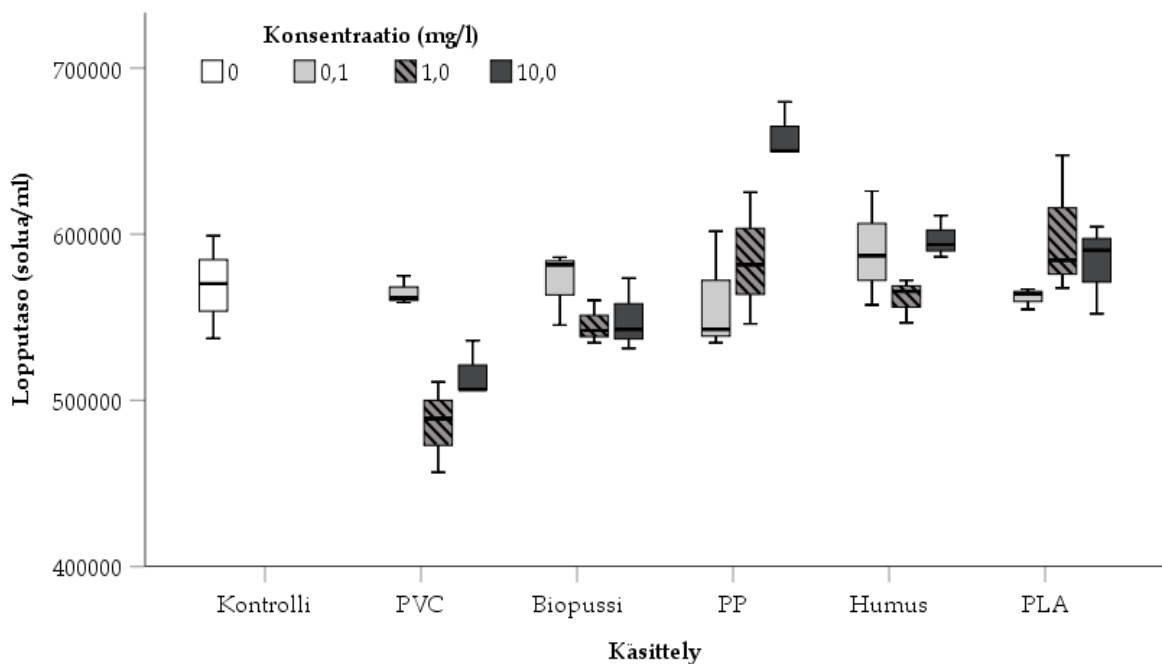
Piilevä ei lähtenyt kasvamaan odotetusti, joten koe lopetettiin sen osalta päivän 21 kohdalla. Piilevän heikon kasvun vuoksi tutkielmasta jätettiin pois sen kasvunopeuden tarkastelu. Piilevän osalta laskettiin siis vain keskimääräinen solumäärän lopputaso jokaisesta käsittelystä ja replikaatista.

Piilevän solumäärä kokeen lopussa erosi merkitsevästi kontrollista PVC- ja PP-käsittelyissä (Taulukko 1, Kuva 3). PVC-käsittelyllä oli heikentävä vaikutus piilevän kasvuun, mikä voitiin päätellä siitä, että kontrollin solumäärä oli lopussa keskimäärin suurempi kuin PVC-käsittelyn konsentraatiossa 1,0 mg/l. Parittaisista vertailuista havaittiin, että PVC-käsittelyn konsentraation 1,0 mg/l solumäärä erosi kontrollista (Taulukko 2). PVC-käsittelyssä parittaisesta vertailusta havaittiin merkitsevä ero solumäärissä lisäksi 0,1 ja 1,0 mg/l väliltä (Taulukko 2), ja lopputasojen solutiheyksien perusteella (Liite 1, Kuva 11) voitiin päätellä



pienemmällä PVC-konsentraatiolla olevan vähemmän negatiivinen vaikutus kasvuun. Merkitsevää eroa ei kuitenkaan löydetty kontrollin ja konsentraation 10 mg/l väliltä, minkä perusteella ei voida olettaa suuremman PVC-konsentraation olevan haitallisempaa kasviplanktonin kasvulle.

PP-käsittelyssä solumäärät erosivat merkitsevästi parittaiten vertailujen perusteella konsentraatiossa 10 mg/l kontrolliin verrattuna (Taulukko 2). Lisäksi PP-käsittelyn kohdalla parittaisista vertailuista havaittiin ero solumäärissä konsentraatioiden 0,1 ja 10 mg/l väliltä (Taulukko 2). PP-käsittelyn vaikutus piilevän kasvuun oli positiivinen, mikä voitiin päätellä lopputasojen solumääriä vertailemalla.



Kuva 3. *Stephanodiscus sp.* -piilevän solumäärät kokeen lopussa kontrolli-, mikromuovi- ja humuskäsittelyssä.

Taulukko 1. *Stephanodiscus sp.* -piilevän eri käsittelyjen solumäärien erot kokeen lopussa verrattuna kontrolliin (ANOVA). Merkitsevät p-arvot on lihavoitu.

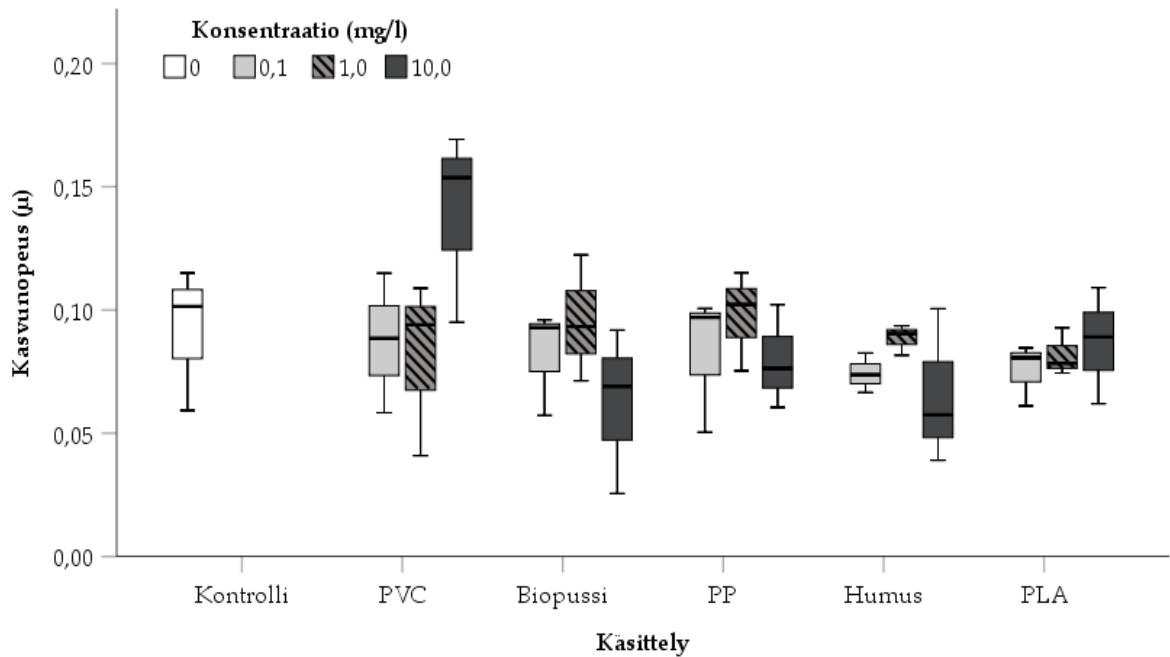
Käsittely	df1, df2	F	p
PVC	3,8	9,352	<b>0,005</b>
PP	3,8	5,965	<b>0,019</b>
PLA	3,8	0,951	0,461
humus	3,8	1,390	0,315
biopussi	3,8	0,984	0,447

Taulukko 2. Parittaiset vertailut *Stephanodiscus sp.* -piilevän solumäärien lopputasojen eroista konsentraatioiden sekä kontrollin välillä (ANOVA post-hoc). Merkitsevät p-arvot on lihavoitu.

Käsittely	Konsentraatio (I)	Konsentraatio (J)	p
STE PVC	kontrolli	0,1	0,997
		1,0	<b>0,009</b>
		10,0	0,084
	0,1	1,0	<b>0,012</b>
		10,0	0,112
		1,0	0,405
STE PP	kontrolli	0,1	0,984
		1,0	0,934
		10,0	<b>0,036</b>
	0,1	1,0	0,788
		10,0	<b>0,022</b>
		1,0	0,081

### 3.2 Nielulevä

Nielulevän altistuskoe kesti lopulta 36 päivää. Nielulevän kasvunopeudet eivät eronneet käsittelyjen välillä tilastollisesti merkitsevästi (Kuva 4, Taulukko 3).



Kuva 4. *Cryptomonas erosa* -nielulevän kasvunopeudet kontrolli-, mikromuovi- ja humuskäsittelyssä.

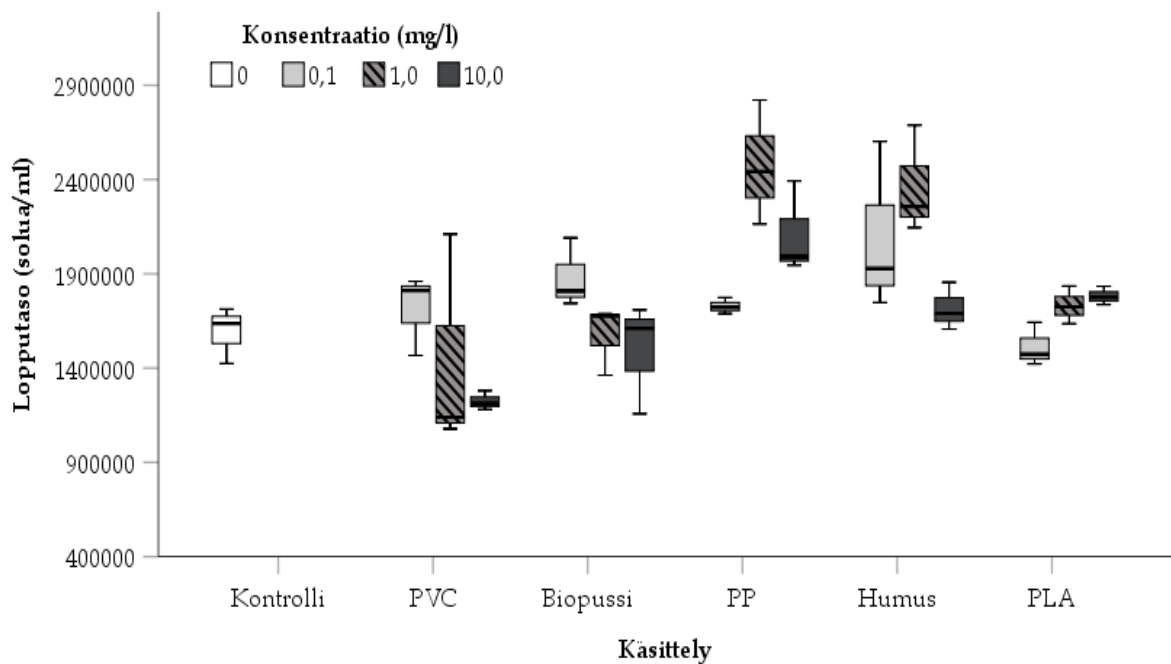
Taulukko 3. *Cryptomonas erosa* -nielulevän eri käsittelyjen kasvunopeuksien erot verrattuna kontrolliin (ANOVA).

Käsittely	df1, df2	F	p
PVC	3,8	1,906	0,207*
PP	3,8	0,331	0,804
PLA	3,8	0,355	0,787
humus	3,8	0,931	0,469
biopussi	3,8	0,869	0,496

\*PVC-käsittelyn kasvunopeuksissa jäännökset eivät noudata normaalijakaumaa.

Nielulevän solumäärä erosi kokeen lopussa merkitsevästi kontrollista käsittelyissä PP ja humus (Taulukko 4, Kuva 5). Parittaisista vertailuista havaittiin, että molempien käsittelyjen kohdalla solumäärät erosivat kontrollista konsentraatiossa 1,0 mg/l (Taulukko 5). PP-käsittelyssä havaittiin solumäärissä ero lisäksi konsentraatioiden 0,1 ja 1,0 mg/l välillä parittaisissa vertailuissa (Taulukko 5).

PP-käsittelyn vaikutus oli positiivinen myös nielulevän tapauksessa, eli sen läsnäolo vaikutti lisäävän kasviplanktonin kasvua. Myös humuksen lisääminen vaikutti positiivisesti nielulevän kasvuun. Humus-käsittelyissä lopputasojen solumäärät olivat muita käsittelyitä suurempia.



Kuva 5. *Cryptomonas erosa* -nielulevän solumäärät kokeen lopussa kontrolli-, mikromuovi- ja humuskäsittelyssä.

Taulukko 4. *Cryptomonas erosa* -nielulevän eri käsittelyjen solumäärien erot kokeen lopussa verrattuna kontrolliin (ANOVA). Merkitsevät p-arvot on lihavoitu.

Käsittely	df1, df2	F	p
PVC	3,8	1,304	0,338*
PP	3,8	9,866	<b>0,005</b>
PLA	3,8	3,855	0,056
humus	3,8	4,625	<b>0,037</b>
biopussi	3,8	1,950	0,200

\*PVC-käsittelyn lopputasoissa varianssit eivät ole yhtä suuret.

Taulukko 5. Parittaiset vertailut *Cryptomonas erosa* -nielulevän solumäärien lopputasojen eroista konsentraatioiden sekä kontrollin välillä (ANOVA post-hoc). Merkitsevät p-arvot on lihavoitu.

Käsittely	Konsentraatio (I)	Konsentraatio (J)	p	
CRY PP	kontrolli	0,1	0,869	
		1,0	<b>0,005</b>	
		10,0	0,078	
	0,1	1,0	<b>0,013</b>	
		10,0	0,225	
		1,0	0,251	
	CRY humus	kontrolli	0,1	0,214
			1,0	<b>0,042</b>
			10,0	0,946
0,1		1,0	0,662	
		10,0	0,422	
		1,0	0,090	

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

### 4.1 Vaikuttaako mikromuovi kasviplanktonin kasvuun?

Perinteisistä muoveista PP vaikutti positiivisesti ja PVC negatiivisesti kasviplanktoniin, mutta biomuoveilla ei havaittu vaikutusta. Tämä oli yllättävää hypoteesimme kannalta, sillä oletimme biomuovien olevan perinteisiä muoveja toksisempia. Hypoteesi pohjautui aiempaan tutkimukseen, jossa Gonzalez-Pleiter ym. (2019) tutkivat biomuovi polyhydroksibutyyraatin (PHB) vaikutusta viherlevä- ja syanobakteerilajiin konsentraatioilla 25, 50 ja 100 mg/l. Tutkimuksessa mikromuovialtistus heikensi kasviplanktonin kasvua huomattavasti (kolmen päivän altistus laski syanobakteerin kasvua jopa 90 % ja viherlevän 95 %).

Kasviplanktonin voidaan olettaa mahdollisesti hyötyneen mikromuovin läsnäolosta, sillä molempien kasviplanktonilajien kohdalla PP-käsittelyn solumäärissä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero kontrolliin verrattuna. Mitä suurempi oli PP-konsentraatio, sitä suurempi oli solumäärä lopussa. Samankaltainen positiivinen vaikutus mikromuovialtistuksesta havaittiin Canniff & Hoang (2018) tutkimuksessa, jossa mikromuovin havaittiin tehostavan kasviplanktonin kasvua. Kasviplankton on saattanut käyttää mikromuovia kasvualustana ja etenkin piilevän tapauksessa muodostaa kolonioita sen avulla. Mikromuovin vaikutukset kasviplanktonin kasvun kannalta eivät ole täten pelkästään negatiivisia.

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu PVC:n olevan toksisempaa kuin PP:n (Wu ym. 2019). Wu ym. (2019) vertailivat tutkimuksessaan PP:n ja PVC:n vaikutusta koelajien *Chlorella pyrenoidosa* - (viherlevä) ja *Microcystis flos-aquae* (syanobakteeri) solujen a-klorofylli-pitoisuuksiin. Havaittiin, että PVC ja PP estivät fotosynteesijärjestelmän toimintaa, mutta PVC:llä oli toksisempi vaikutus kasviplanktonin toimintaan. Myös tässä LuK-tutkielmassa PVC:llä havaittiin PP:tä

toksisempi vaikutus kasviplanktonin kasvuun lopputasojen solumäärien perusteella.

Tämän kokeen tuloksilla ei voida tukea Li ym. (2020) tutkimuksen päätelmää siitä, että mikromuovien pitoisuuden kasvu haittaa suoraan kasviplanktonin kasvu. Aineen toksisuuteen vaikuttaa annoskoko, joten suuremmilla konsentraatioilla mikromuovien myrkyllisyys havaitaan helpommin. Myös pienemmillä konsentraatioilla voi kuitenkin olla tämän tutkimuksen perusteella merkitystä levän kasvuun. Monissa tutkimuksissa käytetyt mikromuovikonsentraatiot ovat keskimäärin välillä 5–100 mg/l (Gonzalez-Pleiter ym. 2019, Guschina ym. 2020, Li ym. 2020). Nämä konsentraatiot ovat huomattavasti suurempia kuin mitä tässä tutkimuksessa käytettiin. Yleisesti tutkimuksissa käytetyt altistuspitoisuudet ovat 2–7 suuruusluokkaa korkeampia (esimerkiksi ng *versus* mg), kuin ympäristöstä mitatut ja usein ne ilmaistaan eri suureilla (Lenz ym. 2016).

Ennen tutkimusta arvioitiin, että kasviplanktonilajien soluseinien rakenteilla voi olla vaikutusta lajien menestykseen, kun ne altistetaan mikromuoville. Piilevän poikkeavan kasvun vuoksi tämän tutkimuksen perusteella ei voida ottaa kantaa siihen, vaikuttaako soluseinän rakenne kasviplanktonin altistamisherkkyyteen.

#### **4.2 Humuksen vaikutus tutkimuslajeihin**

Humus-käsittelyn kasvu ympäristö oli käsittelyistä luonnonmukaisin, sillä muissa käsittelyissä luonnonpartikkeleiden läsnäolo oli vähäisempää suodatetun järviveden vuoksi. Humuksen positiivinen vaikutus kasvuun saattoi johtua muun muassa siitä mahdollisesti irtoavista ravinteista.

Nielulevän kasvuun humuksen lisääminen vaikutti positiivisesti. Solumäärä kokeen lopussa oli huomattavasti suurempi kuin kontrollissa. *Cryptomonas*-suvun lajit viihtyvät etenkin humuspitoisissa vesissä (Tikkanen 1986), mikä tukee päätelmää siitä, että nielulevä hyötyy humuksen läsnäolosta. Humus-käsittelyllä ei

kuitenkaan todettu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta piilevän kasvuun. Piilevää ei juuri esiinny happamissa elinympäristöissä (Comerton & Houghton 1978), mikä voi selittää sen, ettei piilevä hyötynyt humuksen (pH  $\approx$  4,8) läsnäolosta samalla tavalla kuin nielulevä.

Humus toimi myös vertailukohteena mikromuoveille. Luonnonpartikkelina humus toimi ikään kuin toisena kontrollina mikromuovien vaikutuksille. Se ei haitannut kasviplanktonlajien kasvua, vaan edisti tai ei vaikuttanut lainkaan kasvuun. Tästä voitiin päätellä, ettei partikkelien läsnäolo kasvuympäristössä itsessään ollut haitallista, vaan haitallisuuteen vaikutti se, mistä partikkeli koostui. Vaikka kasviplankton hyötyi myös PP:n läsnäolosta, olivat solumäärät lopussa vieläkin suurempia humus-käsittelyissä.

#### **4.3 Tulosten luotettavuus ja virhelähteet**

Piilevän heikko kasvu vaikeutti tulosten tulkintaa ja kasviplanktonlajien välistä vertailua. Oletettavasti käytetty piileväkanta oli jollain tavalla viallinen, sillä myöskään kontrollinäytteet eivät lähteneet kasvamaan.

Liitteen 1 kuvaajista havaittiin kasviplanktonlajista ja käsittelystä riippumatta yhtäläinen notkahdus solumäärissä kokeen alkupäivinä. Tämä todennäköisesti johtui ympäristötekijöiden muutoksesta, kun kasviplankton siirrettiin kasvatusliuoksesta järviveteen, jolloin kasviplankton sopeutui uusiin olosuhteisiin.

Aineisto oli pieni (n = 96). Yksittäistä replikaattia mitattiin levästä riippuen vain 3–4 kertaa kokeen aikana. Lopputasoja määritettäessä replikaattien mittauksia yhdistettiin, jolloin todellisten havaintojen määrä väheni ja hajonta kasvoi. Mikäli koeyksikköjä ja mittauksia olisi ollut enemmän, olisi voitu saada tarkempia tuloksia, jolloin myös tulosten luotettavuus olisi parempi. Samalla myös sattuman vaikutusta saataisiin vähennettyä. Näistä syistä johtuen tulokset eivät ole kovin hyvin yleistettävissä.



Mahdollisia virhelähteitä tutkimuksen toteutuksessa saattoivat olla virheet pipetoinnissa ja solulaskurimittauksissa, esimerkiksi piilevän kontrollin yksittäinen korkea arvo on todennäköisesti tällainen virhe (esimerkiksi Liite 1, Kuva 11). Näytteet saattoivat myös kontaminoitua kokeen aikana ilmassa leijailevien mikromuovihiukkasten (esimerkiksi vaatekuidut) takia. Toisaalta määrien ei pitäisi olla niin suuria, että niiden vaikutus näkyisi tuloksissa. Tällöin kontaminaatio olisi myös havaittavissa kaikissa käsittelyissä.

Yleisesti mikromuovitutkimusten vertailukelpoisuutta hankaloittaa se, että tutkimusten välillä käytetään hyvin erilaisia mittayksiköitä ja -suureita. Siksi menetelmien yhtenäistäminen helpottaisi altistuskokeiden ja ympäristöstä mitattujen konsentraatioiden välistä vertailua, sillä nämä usein ilmaistaan eri suureilla.

#### **4.4 Johtopäätökset**

Nollahypoteesi kumoutui, eli mikromuoveilla oli vaikutusta kasviplanktonlajien kasvuun, vaikkakin vaikutus oli positiivinen PP-käsittelyissä. Ainoastaan PVC vaikutti negatiivisesti kasviplanktonin kasvuun. Toisaalta biomuovit eivät vaikuttaneet kasviplanktonin kasvuun merkitsevästi. Täten toinen hypoteesimme, jonka mukaan biomuovit olisivat toksisempia kasviplanktonin kasvulle, kumoutui. Muoveihin verrattuna humuksella oli suurempi merkitys solumäärien lopputasojen kannalta. Humuksen läsnäollessa kasviplankton pystyi saavuttamaan suuremman solumäärän kasvun loppuvaiheessa verrattuna kaikkiin muihin käsittelyihin, mukaan lukien kontrolliin. Mikromuoveihin verrattuna humuksella ei ollut negatiivista vaikutusta kasviplanktonin kasvuun. Tulosten heikon yleistettävyyden vuoksi laajemmalle tutkimukselle on tarvetta, jotta voitaisiin ymmärtää paremmin mikromuovien monimutkaisia ympäristövaikutuksia.

## KIITOKSET

Haluamme kiittää ohjaajiamme Minna Hiltusta ja Sami Taipaletta tuesta ja avusta tutkimuksemme kaikissa vaiheissa. Erityiskiitokset Minna Hiltuselle suuresta panoksesta avunannossa.

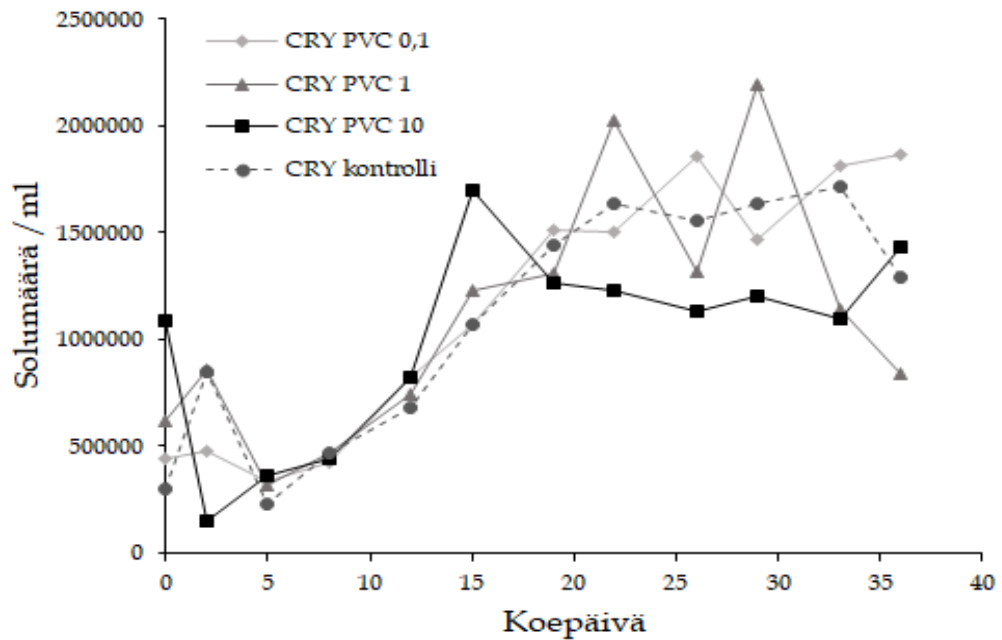
## KIRJALLISUUS

- Batel A., Borchert F., Reinwald H., Erdinger L. & Braunbeck T. 2018. Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environ. Pollut.* 235: 918-930.
- Canniff P.M. & Hoang T.C. 2018. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Sci. Total Environ.* 633: 500-507.
- Cole M., Lindeque P., Halsband C. & Galloway T.S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62: 2588-2597, doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Comerton M., & Houghton J. 1978. The effects of fertilisers on the algal flora of peat. *Royal Irish Acad.* 78, 233-245.
- Cox K.D., Covernton G.A., Davies H.L., Dower J.F., Juanes F. & Dudas S.E. 2019. Human consumption of microplastics. *Envir. Sci. Tech.* 53: 7068-7074, doi: 10.1021/acs.est.9b01517.
- Dahlberg Advisors, de Wit W., Hamilton A. Scheer R., Stakes T., & Allan S. 2019. Solving plastic pollution through accountability. *WWF – World Wide Fund For Nature*, saatavissa <https://wwf.fi/app/uploads/1/9/x/kgijncrqi8qcyxl7ty73qq/final-solving-plastics-pollution-through-accountability-eng.pdf>.
- European Bioplastics. 2018. What are bioplastics? *European Bioplastics*, saatavissa [https://docs.european-bioplastics.org/2016/publications/fs/EUBP\\_fs\\_what\\_are\\_bioplastics.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/2016/publications/fs/EUBP_fs_what_are_bioplastics.pdf).
- European Commission. 2016. Plastic pollution, we can make things better. *European Commission*, saatavissa [https://ec.europa.eu/environment/waste/pdf/plastic\\_waste\\_factsheet.pdf](https://ec.europa.eu/environment/waste/pdf/plastic_waste_factsheet.pdf).
- Frias J. P. G. L. & Nash R. 2019. Microplastics: finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.* 138: 145-147.

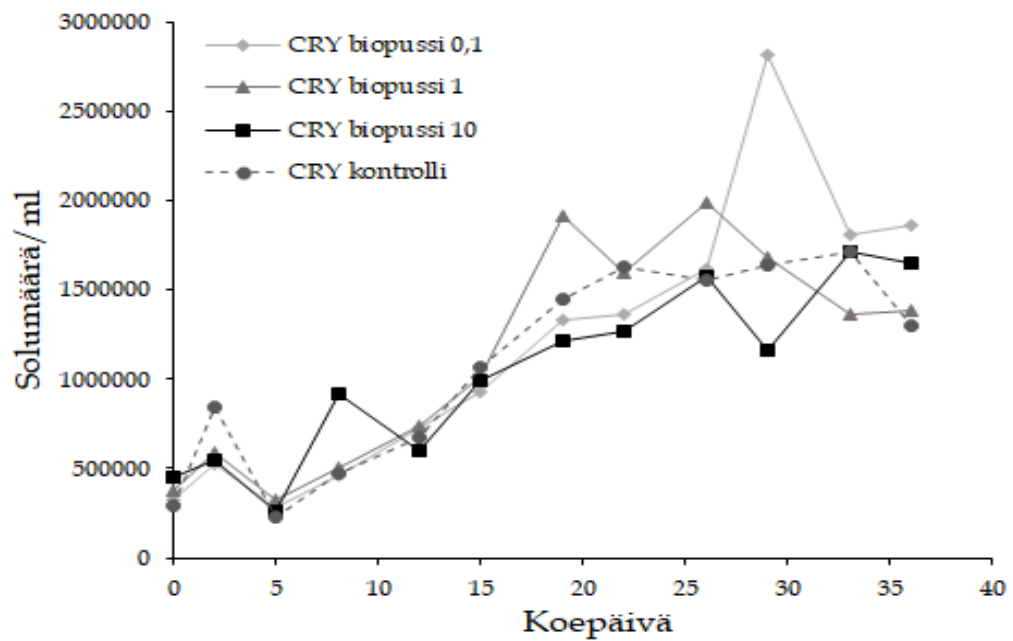
- Gonzalez-Pleiter M., Tamayo-Belda M., Pulido-Reyes G., Amariei G., Leganes F., Rosal R. & Fernandez-Pinas F. 2019. Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. *Environ. -Sci. Nano.* 6: 1382-1392, doi:10.1039/c8en01427b.
- Guschina I.A., Hayes A.J. & Ormerod S.J. 2020. Polystyrene microplastics decrease accumulation of essential fatty acids in common freshwater algae. *Environ. Pollut.* 263: 114425.
- Lenz R., Enders K., & Nielsen T. G. 2016. Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113(29), E4121-E4122, doi:10.1073/pnas.1606615113.
- Li S., Wang P., Zhang C., Zhou X., Yin Z., Hu T., Hu D., Liu C. & Zhu L. 2020. Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.* 714:136767.
- PlasticsEurope. 2019. Plastics - the Facts 2019. *PlasticsEurope*, saatavissa [https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL\\_web\\_version\\_Plastics\\_the\\_facts2019\\_14102019.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf).
- Reynolds C. S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, New York.
- Ruupunen A. 2014. *Luonnonmateriaaliseen kestomuovien relogiset ominaisuudet*. Tampereen teknillinen yliopisto, Teknisten tieteiden tiedekunta, diplomityö.
- Sahoo D. & Seckbach J. 2015. *The Algae World*. Springer, Dordrecht.
- Silva A.B., Bastos A.S., Justino C.I.L., da Costa J.P., Duarte A.C. & Rocha-Santos T.A.P. 2018. Microplastics in the environment: challenges in analytical chemistry - a review. *Anal. Chim. Acta.* 1017: 1-19.
- Suomen Uusiomuovi Oy. *Muovien materiaalimerkit*. [http://www.uusiomuovi.fi/fin/pakkaus\\_kiertaa/muovien\\_kierratys/muovien\\_materiaalimerkit/](http://www.uusiomuovi.fi/fin/pakkaus_kiertaa/muovien_kierratys/muovien_materiaalimerkit/) (luettu 22.3.2020)
- Tikkanen T. 1986. *Kasviplanktonopas*. Gaudeamus, Helsinki.
- Uurasjärvi E., Hartikainen S., Setälä O., Lehtiniemi M. & Koistinen A. 2020. Microplastic concentrations, size distribution, and polymer types in the surface waters of a northern European lake. *Water Environ. Res.* 92: 149-156.
- Wagner M. & Lambert S. 2018. *Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants?* Springer, Cham.
- Waksman S. A. 1936. *Humus*. Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Wu Y., Guo P., Zhang X., Zhang Y., Xie S. & Deng J. 2019. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *J. Hazard. Mater.* 374: 219-227.

- Xu S., Ma J., Ji R., Pan K. & Miao A. 2020. Microplastics in aquatic environments: occurrence, accumulation, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 703: 134699.
- Zhang C., Chen X., Wang J. & Tan L. 2017. Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environ. Pollut.* 220: 1282-1288, doi:10.1016/j.envpol.2016.11.005.

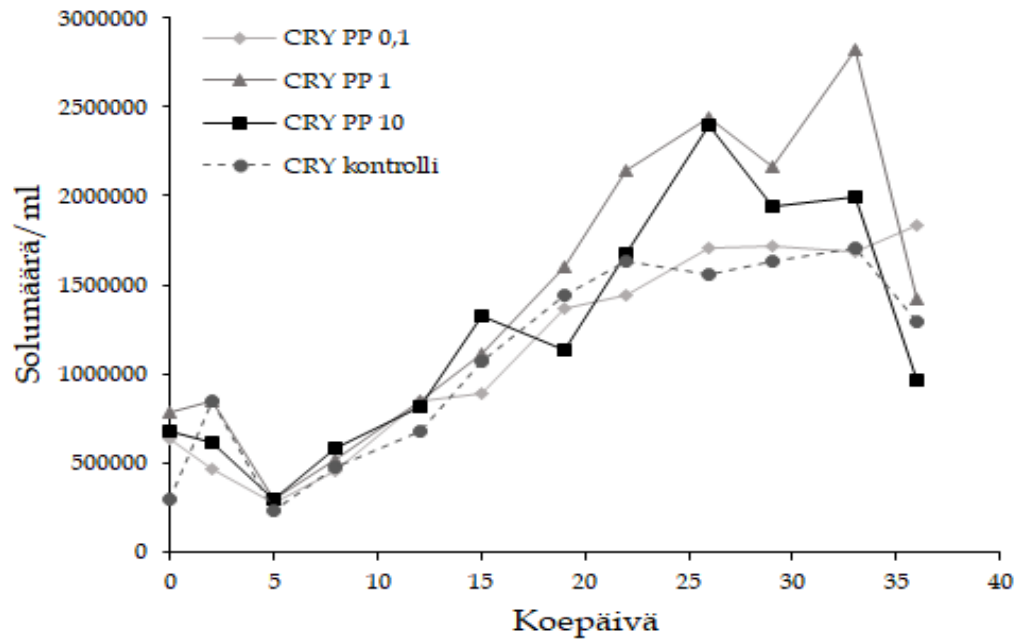
## LIITE 1. KASVIPLANKTONLAJIEN MITATUT KASVUKUVAAJAT



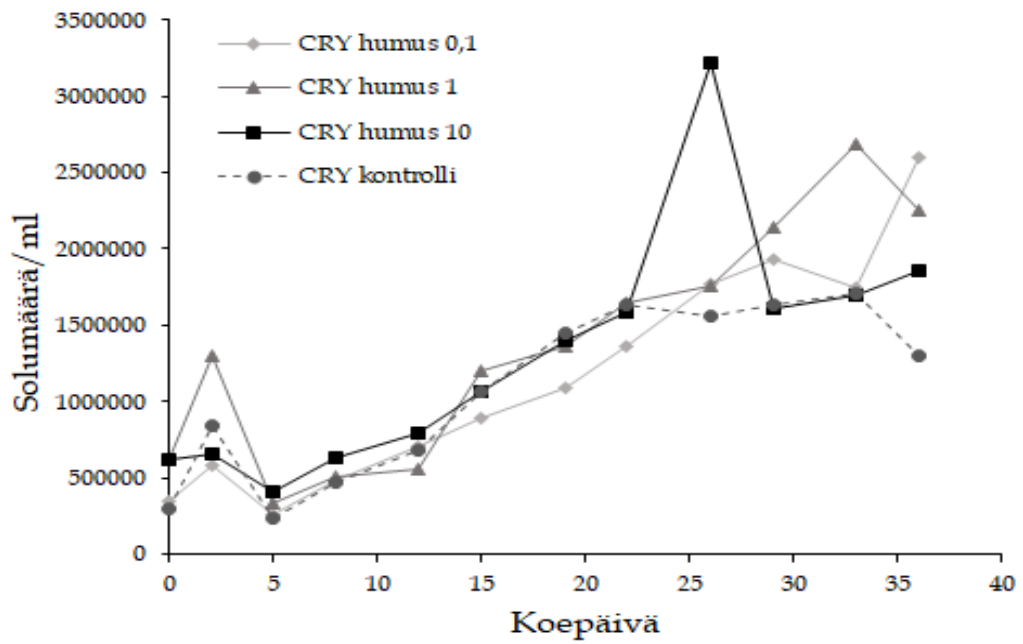
Kuva 6. Nielulevän solunäärän kasvu ajan suhteen PVC-käsittelyssä.



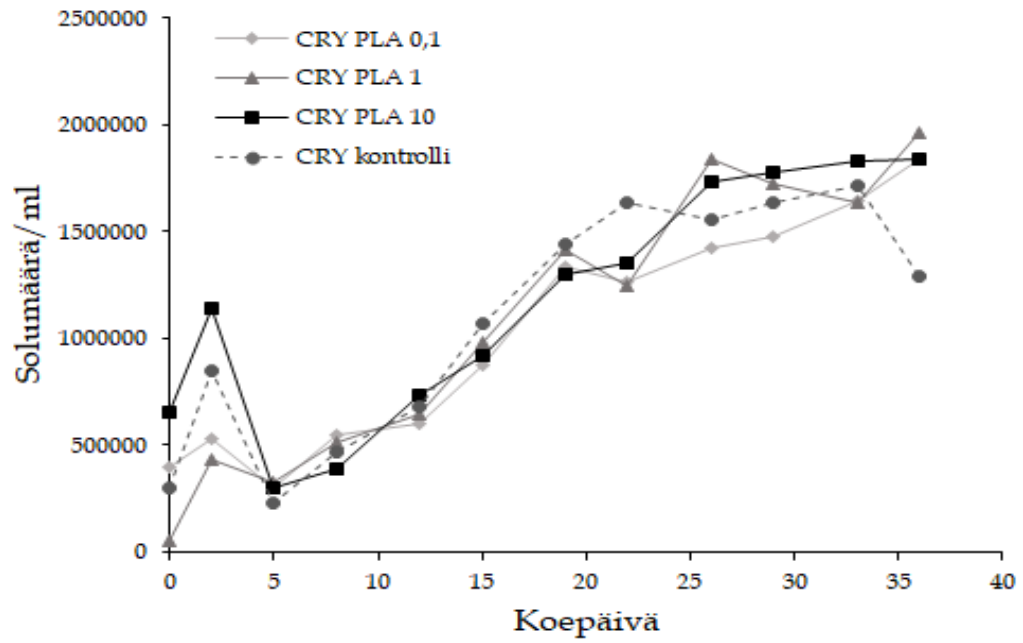
Kuva 7. Nielulevän solunäärän kasvu ajan suhteen biopussi-käsittelyssä.



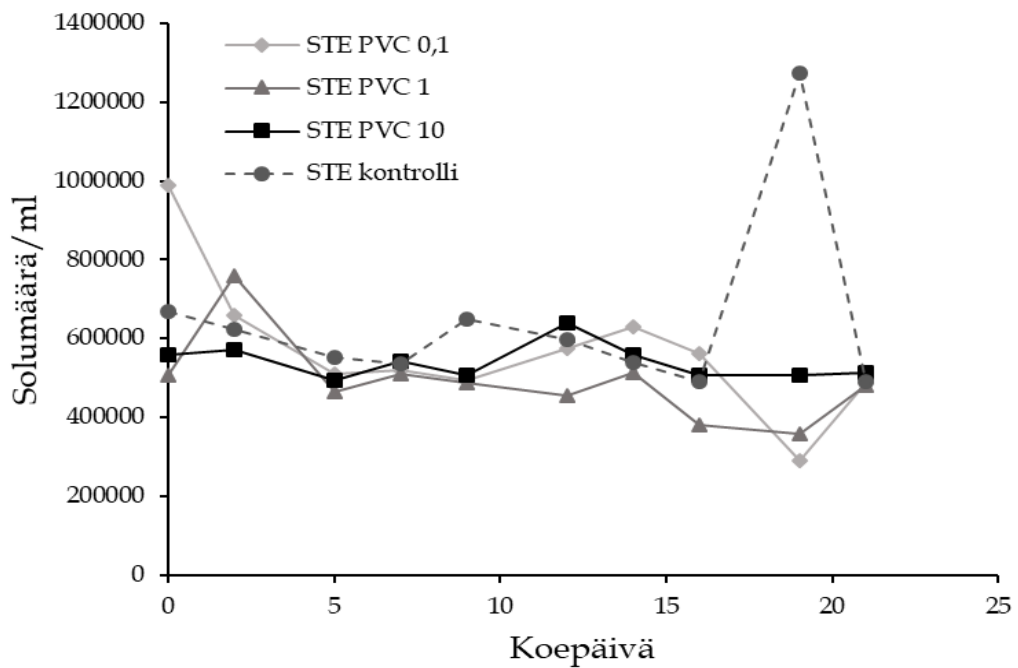
Kuva 8. Nielulevän solumäärän kasvu ajan suhteen PP-käsittelyssä.



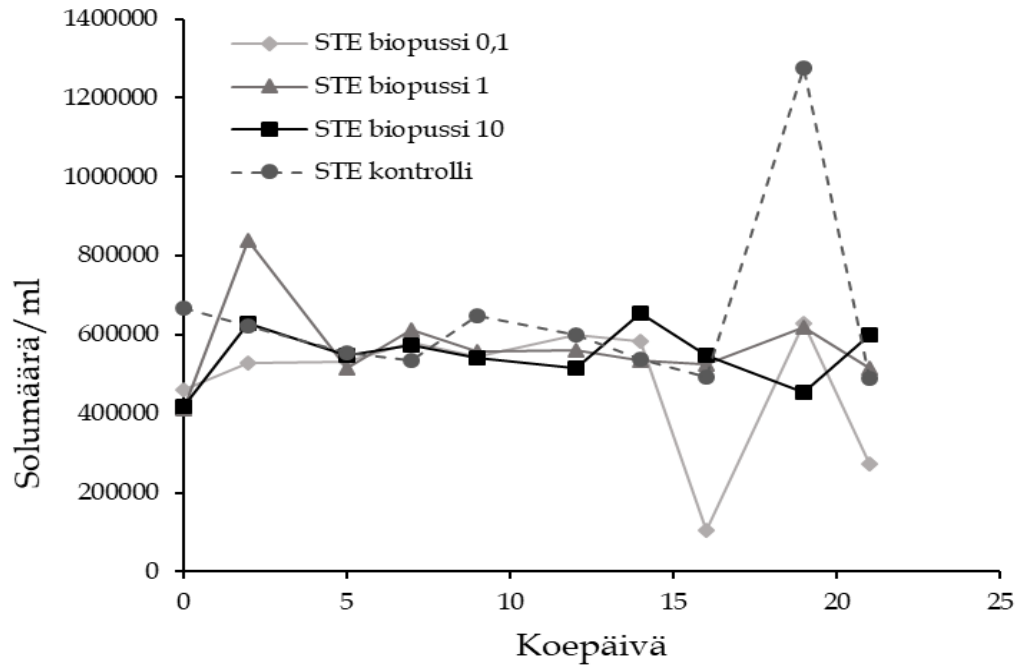
Kuva 9. Nielulevän solumäärän kasvu ajan suhteen humus-käsittelyssä.



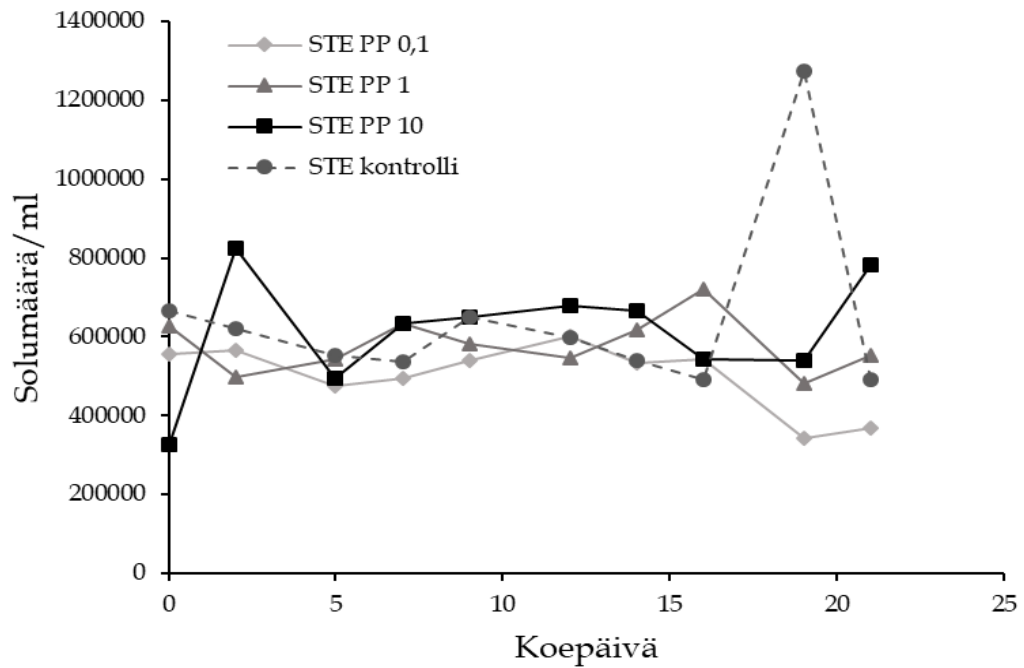
Kuva 10. Nielulevän solumäärän kasvu ajan suhteen PLA-käsittelyssä.



Kuva 11. Piilevän solumäärän kasvu ajan suhteen PVC-käsittelyssä.

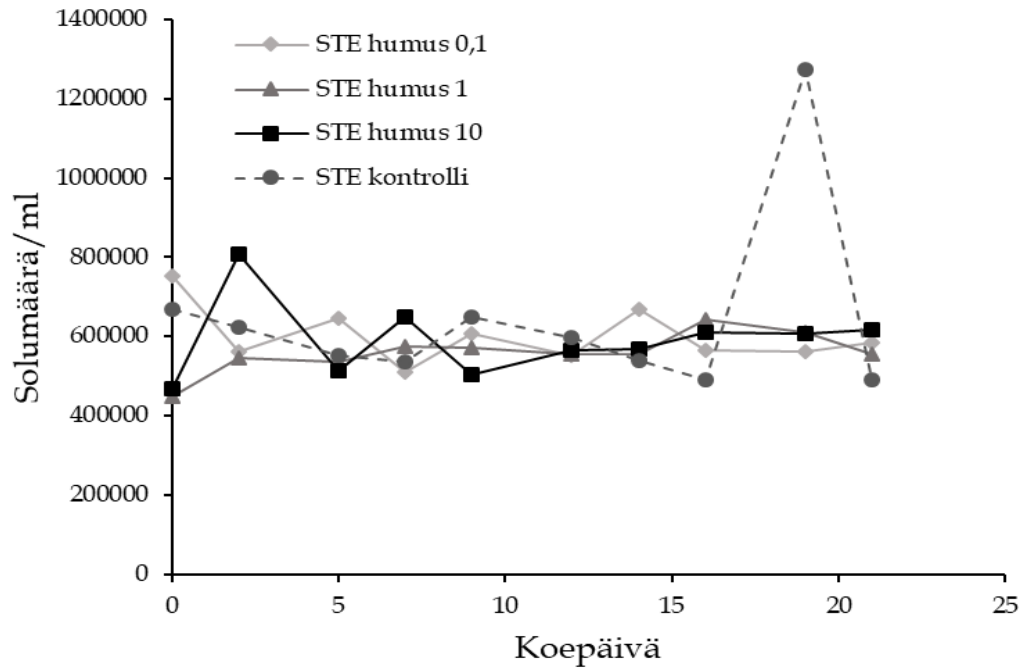


Kuva 12. Piilevän solumäärän kasvu ajan suhteen biopussi-käsittelyssä.

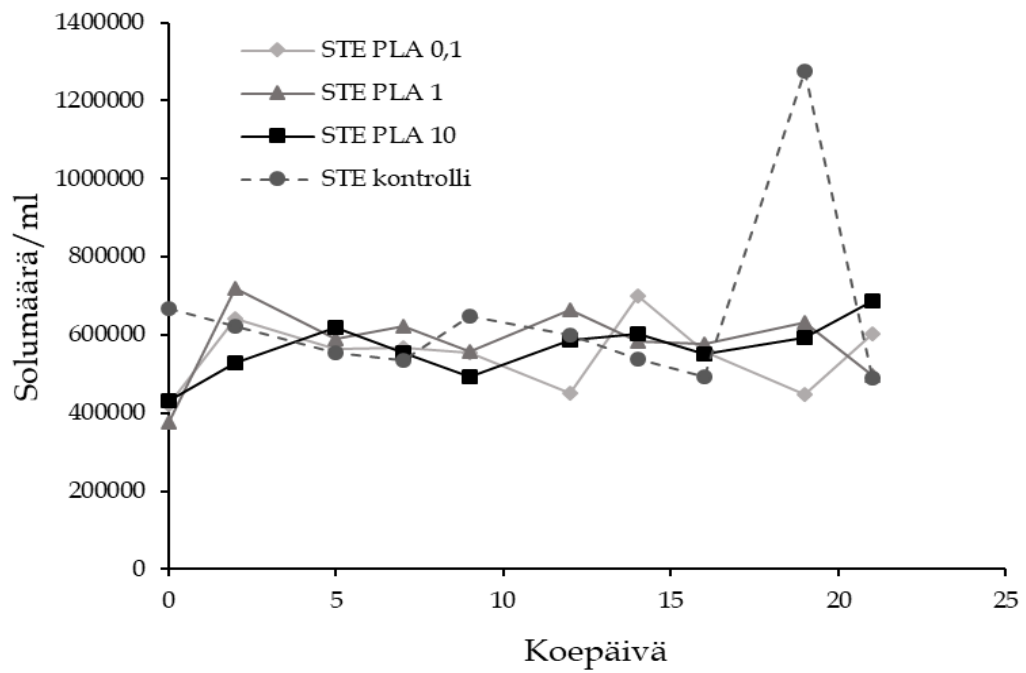


Kuva 13. Piilevän solumäärän kasvu ajan suhteen PP-käsittelyssä.





Kuva 14. Piilevän solumäärän kasvu ajan suhteen humus-käsittelyssä.



Kuva 15. Piilevän solumäärän kasvu ajan suhteen PLA-käsittelyssä.