

**Pro gradu -tutkielma**

**Fluoranteenin vaikutukset vesikirpun (*Daphnia magna*) kasvuun, lisääntymiseen ja sydämensykkeeseen eri lämpötiloissa**

**Emilia Honkaranta**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

29.03.2023

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Ympäristötiede

Emilia Honkaranta: Fluoranteenin vaikutukset vesikirpun (*Daphnia magna*)  
kasvuun, lisääntymiseen ja sydämensykkeeseen eri  
lämpötiloissa  
Pro gradu -tutkielma: 40 s., 4 liitettä ([4] s.)  
Työn ohjaajat: Dosentti FT Eeva-Riikka Vehniäinen ja tutkijatohtori  
Minna Hiltunen  
Tarkastajat: Yliopistonlehtori FT Katja Pulkkinen ja Dosentti FT Eeva-  
Riikka Vehniäinen

Maaliskuu 2023

---

Hakusanat: *Cladocera*, eläinplankton, ilmaston lämpeneminen, PAH-yhdisteet

Polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH-yhdisteitä) esiintyy kaikkialla ympäristössä. Ne syntyvät epätäydellisen palamisen seurauksena, esimerkiksi vulkaanisessa toiminnassa sekä fossiilisten polttoaineiden poltossa. PAH-yhdisteet ovat biokertyviä, pysyviä ja eliöille haitallisia yhdisteitä. Eräs yleisesti esiintyvä karsinogeeninen PAH-yhdiste on fluoranteeni. Tässä tutkimuksessa selvitettiin fluoranteenin (10, 20, 40 ja 80 µg/l) toksisuutta vesikirpuille eri lämpötiloissa (18, 20 ja 22 °C). Lisääntymiskokeessa seurattiin *Daphnia magna*- lajin kuolleisuutta, lisääntymistä ja kasvua. Vesikirppujen sydämensykkettä tutkittiin kolmella eri koeasetelmalla videoimalla sydäntä, kun vesikirppu altistettiin fluoranteenille. Tulokset osoittivat, että fluoranteenialtistus vaikutti haitallisesti *Daphnia magna* - lajin kasvuun lisääntymiseen ja sydämensykkeeseen. Lämpötilan noustessa poikuekoot kasvoivat, poikastuotanto aloitettiin keskimäärin aiemmin ja vesikirppuemot saavuttivat suuremman ruumiinkoon. Suurimmat erot havaittiin yleensä 18 ja 22 °C lämpötilakäsittelyjen välillä. Fluoranteenialtistus nosti vesikirppujen sydämensykkettä 15 sekunnin altistuksen jälkeen, mutta kroonisessa altistuksessa vaikutuksia ei havaittu, mikä viestii suojamekanismin käynnistymisestä haitta-aineita vastaan. Vain muutaman asteen lämpötilaeroilla havaittiin yhdysvaikutuksia fluoranteenialtistuksen kanssa, mikä herättää huolen lämpenevien vesiekosysteemien tulevaisuudesta ja lajien sopeutumisesta muuttuviin olosuhteisiin haitta-aineiden myötävaikutuksessa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science  
Environmental Sciences

Emilia Honkaranta: Effects of fluoranthene on water flea's (*Daphnia magna*) growth, reproduction, and heart rate at different temperatures

MSc thesis: 40 p., 4 appendices ([4] p.)

Supervisors: Docent PhD Eeva-Riikka Vehniäinen and postdoctoral researcher Minna Hiltunen

Inspectors: Senior lecturer PhD Katja Pulkkinen and Docent PhD Eeva-Riikka Vehniäinen

March 2023

---

Keywords: *Cladocera*, climate warming, PAH compounds, zooplankton

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants. They are generated in incomplete combustion, e.g., in volcanic activity and the burning of fossil fuels. PAHs are bioaccumulative, persistent and harmful to living organisms. One common, carcinogenic PAH compound is fluoranthene. This study investigated the toxicity of fluoranthene (10, 20, 40 and 80 µg/L) to water fleas at different temperatures (18, 20 and 22 °C). The reproduction test monitored the mortality, reproduction, and growth of the *Daphnia magna*. The heart rate of water fleas was studied with three different experimental setups by videotaping the heart when the water flea was exposed to fluoranthene. The results showed that exposure to fluoranthene had adverse effects on growth, reproduction, and heart rate of *Daphnia magna*. As the temperature rose, on average the number of offspring increased, clutch production started earlier, and parent animals reached a larger body size. The biggest differences were generally observed between the 18 and 22 °C temperature treatments. Fluoranthene exposure increased the heart rate of *Daphnia* after 15 seconds of exposure, but no effects were observed in chronic exposure, which signals the start of the protective mechanism against harmful substances. Only a few degrees of temperature differences were found to have combined effects with fluoranthene exposure, which raises concerns about the future of warming water ecosystems and the adaptation of species to changing conditions with the contribution of harmful substances.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
1.1 PAH-yhdisteet.....	1
1.2 Haitta-aineen toksisuuteen vaikuttavia tekijöitä.....	4
1.3 Tutkimuslaji.....	5
1.3 Tutkimuksen tarkoitus.....	7
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....</b>	<b>8</b>
2.1 Akuutin toksisuuden määrittäminen.....	8
2.2 Lisääntymiskoe.....	9
2.3 Sydämensyke.....	12
2.4 Tilastolliset analyysit.....	14
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>14</b>
3.1 Akuutti toksisuus.....	14
3.2 Kuolleisuus ja lisääntyminen.....	15
3.2.1 Selviytyminen.....	15
3.2.2 Lisääntyminen.....	17
3.3 Kasvu.....	25
3.4 Sydämensyke.....	28
3.4.1 Lisääntymiskokeen syke.....	28
3.4.2 Akuutti sykekoe.....	29
3.4.3 Välittömän vaikutuksen sykekoe.....	31
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>34</b>
<b>KIITOKSET.....</b>	<b>40</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>41</b>

<b>Liite 1. Altistusliuosten happitoisuus ja pH-arvot.....</b>	<b>46</b>
<b>Liite 2. Vesikirppujen kuolleisuusprosentit lisääntymiskokeessa.....</b>	<b>47</b>
<b>Liite 3. Vesikirppujen kumulatiivinen poikastuotanto .....</b>	<b>48</b>
<b>Liite 4. Vesikirppujen keskimääräinen koko (mm) .....</b>	<b>49</b>

## SANASTO JA LYHENTEET

### SANASTO

**DNA-addukti** DNA-segmentti, johon on sitoutunut karsinogeeninen yhdiste kovalenttisella sidoksella

### LYHENTEET

**EC<sub>50</sub>-arvo** Aineen pitoisuus, jolla vaste havaitaan 50 %:ssa yksilöitä tietyn altistusajan kuluttua (engl. *effective concentration 50 %*)

**ADAM-liuos** Keinotekoinen makea vesi eläinplaktonin viljelyä varten (engl. *Artificial Daphnia Medium*)

**DMSO** Dimetyylisulfoksidi

**PAH-yhdiste** Polysyklinen aromaattinen hiilivety

# 1 JOHDANTO

## 1.1 PAH-yhdisteet

Polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH-yhdisteet) päätyy jatkuvasti ympäristöön luonnollisen toiminnan ja etenkin ihmistoiminnan myötä. PAH-yhdisteitä vapautuu epätäydellisen palamisen seurauksena, muun muassa metsäpaloissa, vulkaanisessa toiminnassa ja fossiilisten- sekä biopolttoaineiden poltossa (Baek ym. 1991, Douben 2003). Niitä voi päätyä vesistöihin myös teollisuus- ja vedenkäsittelylaitoksista, hule- ja sulamisvesien, sekä öljyonnettomuuksien seurauksena (Douben 2003).

PAH-yhdisteitä luokitellaan niiden alkuperän perusteella. Öljyperäiset PAH-yhdisteet, eli raakaöljy ja sen sivutuotteet luokitellaan alkuperältään petrogeenisiksi. Polttoperäiset PAH-yhdisteet, määritellään puolestaan pyrogeenisiksi. Luonnollisen orgaanisen aineen kemiallisesta tai biologisesta muuttumisesta syntyneet PAH-yhdisteet luokitellaan diageneettisiksi. PAH-yhdisteiden synteesi onnistuu joiltakin mikro-organismeilta ja kasveilta, joten tällaisista biologisista prosesseista peräisin olevia PAH-yhdisteitä kutsutaan biogeenisiksi (Neff 1979, Abdel-Shafy ym. 2016).

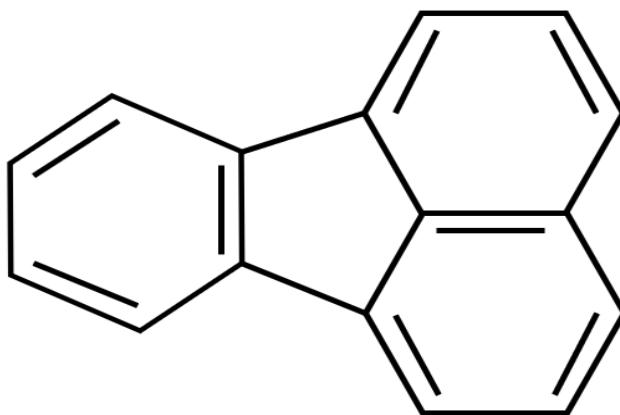
PAH-yhdisteet siirtyvät vesistöihin valumana maaperästä tai laskeumana ilmakehästä. Ilmavirtojen mukana PAH-yhdisteet voivat ajautua kauas alkulähteeltään. Vesistöissä PAH-yhdisteet ovat vahvassa vuorovaikutuksessa sedimenttien hiilen kanssa, joten niitä kertyy sedimentteihin, missä ne voivat säilyä pitkiä aikoja (Douben 2003). PAH-yhdisteet hajoavat ympäristössä etenkin mikrobitoiminnan myötä, mutta hajoaminen voi tapahtua myös kemiallisesti tai fotolyysin kautta (Bumpus 1989).

PAH-yhdisteet määritellään POP-yhdisteiksi (pysyvät orgaaniset ympäristömyrkyt). Muiden POP-yhdisteiden tavoin PAH-yhdisteet ovat

ominaisuuksiltaan hydrofobisia, lipofiilisiä ja biokertyviä, heikosti haihtuvia ja huonosti veteen liukenevia (Douben 2003).

Useat PAH-yhdisteet eivät ole suoraan vaarallisia eliöille. Niiden myrkyllisyyden aiheuttaa eliön metabolia, jonka myötä PAH-yhdiste muuttuu (biotransformaatio). Haitta-aineen poistamiseksi elimistö pyrkii muuttamaan sitä poolisemmaksi. Biotransformaatio johtaa metaboliitteihin, jotka voivat muodostaa kovalenttisia sidoksia DNA:n, RNA:n ja proteiinien kanssa, mikä aiheuttaa genotoksisia ja karsinogeenisiä vaikutuksia, sillä solu ei pysty enää jakaantumaan normaalisti (Neff 1979, Nikinmaa 2014). DNA:han sitoutuvat karsinogeeniset yhdisteet muodostavat DNA-addukteja. DNA-adduktin muodostuminen johtuu kovalenttisesta sitoutumisesta reaktiivisten elektrofiilisten aineiden ja DNA:n sekä proteiinien nukleofiilisten kohtien välillä (Lakshman ym. 2000, Muñoz ja Albores 2011). PAH-yhdiste sitoutuu DNA:n emäkseen (yleensä guanosiniiniin), mikä estää DNA:n normaalin replikaation ja lisää mutaatioiden määrää (Nikinmaa 2014).

Yli sadasta tunnetusta PAH-yhdisteestä 16 kpl listattiin 70-luvulla merkittäviksi toksisten ominaisuuksien ja saatavilla olevien analyttisten menetelmien vuoksi. Vaikka listassa voisi olla päivittämisen varaa, löytyy sieltä karsinogeenisyyttä ja DNA-addukteja aiheuttavia yhdisteitä, kuten fluoranteeni (Douben 2003, Keith 2014). Fluoranteeni ( $C_{16}H_{10}$ ) on kemialliselta rakenteeltaan kolmesta aromaattisesta renkaasta koostuva PAH-yhdiste (Kuva 1), jonka vesiliukoisuus on  $260 \mu\text{g}/\text{l}$  ja molekyylipaino on  $202,25 \text{ g}/\text{mol}$  (Tani ym. 2021).



Kuva 1. Fluoranteenin kemiallinen rakenne.



Renkaiden lukumääränsä puolesta fluoranteeni luokitellaan kevyeksi PAH-yhdisteeksi, LMW-PAH-yhdisteeksi, joilla on 2–3 aromaattista rengasta (Patel ym. 2020). Fluoranteeni on yleinen PAH-yhdiste; sitä esiintyy sekä polttoperäisissä, että öljyperäisissä PAH-seoksissa (Xu ym. 2011). Ympäristöstä mitatut fluoranteenipitoisuudet vaihtelevat kirjallisuudessa. Esimerkiksi pohjois-Kreikassa on mitattu fluoranteenia liuenneena sadeveten 0,014–0,054 µg/l, ja Portlandissa puolestaan 0,048 µg/l (Douben 2003). Kaupunkialueen hulevesiin liunneen fluoranteenin pitoisuus on havaittu Tanskassa vaihtelevan 0,005–0,019 µg/l välillä (Birch ym. 2012) ja Pariisissa 0,013–0,018 µg/l (Zgheib ym. 2011). Näiden ns. taustapitoisuuksien lisäksi ympäristön fluoranteenipitoisuus voi olla merkittävästi suurempi esimerkiksi öljypäästön tai -onnettomuuden seurauksena. Koreassa raportoitiin 12547000 litran öljyonnettomuuden jälkeen, että meriveden PAH-yhdistepitoisuudet liikkuivat 1,5–7310 µg/l välillä (Kim ym. 2010, Kim ym. 2013). Öljyllä saastuneilta alueilta on sedimentistä mitattu muun muassa 105–565 ng/g fluoranteenia (Lee ym. 1981, Boehm ym. 1998, Schonauer ym. 2014).

Fluoranteenilla on havaittu olevan toksisia vaikutuksia vesieliöihin, kuten katkoihin, hyönteisiin ja vesikirppuihin (Suedel ja Rodgers Jr 1996, Tani ym. 2021). Fluoranteenin toksisuuspotentiaaliin on havaittu vaikuttavan vahvasti sen altistuminen valolle ja etenkin UV-valolle. Clement ym. (2000) havaitsivat, että pimeässä fluoranteenin myrkyllisyys *Daphnia magna*-lajille oli alhaista (EC<sub>50</sub>-arvo oli 185–205 µg/l, eli pitoisuus, jolloin puolet testatuista oli liikkumattomia 48 tunnin jälkeen), mutta myrkyllisyys kasvoi merkittävästi kahden tunnin UV-valoaltistuksen aikana, jolloin EC<sub>50</sub>-arvoksi saatiin 80–85 µg/l. Vesikirppujen osalta tutkimuksia on tehty fluoranteenin akuuteista vaikutuksista, mutta kroonisista- tai lisääntymisvaikutuksista ei ole juuri tietoa (Clement ym. 2000).

PAH-yhdisteet vaikuttavat selkärangkaisilla muun muassa sydämen toimintaan. PAH-yhdisteille altistuminen voi muuttaa sydämen toimintaan liittyvien avainproteiinien ilmentymistä ja altistuksella on lisäksi suora vaikutus sydämen ionikanaviin, kuten Vehniäinen ym. (2019) havaitsivat altistaessaan kirjolohien sydänsoluja PAH-yhdisteille. Useiden PAH-yhdisteiden, erityisesti yli neljän

renkaan yhdisteiden on osoitettu häiritsevän ionien liikettä jänniteohjattujen ionikanavien, kuten  $\text{Ca}^{2+}$ - ja  $\text{K}^{+}$ -ionikanavien, läpi kalojen soluissa (Incardona 2017). Fenantreeni, fluoranteeni ja fluoreeni vaikuttivat  $\text{Ca}^{2+}$ -ionikanavien aktiivisuuteen seeprakalan luustolihaskudoksissa, mikä todennäköisesti muuttaa sydänlihansolujen supistumispotentiaalia ja aiheuttaa epämuodostuneita elimiä kalan alkiossa (Porges 2019). Fluoranteenin on lisäksi havaittu hidastavan kirjolohen poikasten pulssia, ja pidentävän aktiopotentiaalia kirjolohen sydänlihassoluissa (Vehniäinen julkaisematon). PAH-yhdisteiden vaikutuksia vesikirpun sydämen toimintaan ei tunneta. Ionikanavat ovat kuitenkin hyvin samankaltaisia eri eliöissä, joten samankaltaisia vaikutuksia voitaisiin odottaa löytyvän.

## 1.2 Haitta-aineen toksisuuteen vaikuttavia tekijöitä

Aineen toksisuuteen vaikuttavat monet eri tekijät. Muun muassa aineen liukoisuus ja pitoisuus, aineen transformaatio sekä vuorovaikutus muiden aineiden kanssa ovat ominaisuuksia, joilla on merkitystä myrkyllisyyden kannalta. Aineen ominaisuuksien lisäksi ympäristön abioottiset ja bioottiset tekijät muokkaavat aineen toksisuuspotentiaalia eliöille. Abioottisista tekijöistä tärkeimpiä vesiympäristössä ovat happipitoisuus, lämpötila, pH, ja saliniteetti (Nikinmaa 2013). UV-säteilyn on myös havaittu vaikuttavan haitta-aineiden toksisuuteen, sillä se voi muuttaa molekyyliin korkeamman energian tilaan. Muun muassa PAH-yhdisteet ovat myrkyllisempiä vesikirpuille UV-säteilyn läsnä ollessa (Huovinen ym. 2001). Bioottisista tekijöitä lajien väliset suhteet, kuten kilpailu ja saalistus vaikuttavat eliön kokemaan stressiin ja voivat siten altistaa eliötä herkemmin haitta-aineille (Nikinmaa 2013).

Huoli ilmastonmuutoksesta on kasvava. Ilmaston lämpenemisen tiedetään johtavan myös vesien lämpötilan nousuun. Ilmastonmuutos tulee siten vaikuttamaan myös akvaattisiin ekosysteemeihin (Patra ym. 2015). Wagner ja Benndorf (2007) ovat osoittaneet, että jopa kahden asteen lämmön nousu lyhyinä, mutta kriittisinä kausina voi aiheuttaa *Daphnia*-populaatiodynamiikkaa

häiritsevien tekijöiden (esim. ravinnonsaatavuuden tai saalistajapaineen) yhteensattuman ja siten horjuttaa ravintoverkon toimintaa. Ympäristön lämpötilalla on merkittävä rooli myös haitta-aineen toksisuudessa, sillä se vaikuttaa eliön metabolian nopeuteen. Eliössä tapahtuvat kemialliset reaktiot nopeutuvat lämpötilan kasvaessa, sillä reaktioiden vaatima aktivaatioenergian tarve laskee. Aineenvaihdunnan kiihtyessä myös detoksifikaatioprosessit nopeutuvat. Myös solukalvon läpivirtaama kasvaa, kun lämpötila nousee, jolloin haitta-aineita voi päästä eliöön enemmän (Nikinmaa 2013).

Veden lämpötilan on havaittu vahvistavan kemikaalien toksisuutta muun muassa makean veden kaloilla (Patra ym. 2015). Ilmaston lämpenemisen vaikutuksista PAH-yhdisteiden toksisuuteen tiedetään kuitenkin hyvin vähän. Zhang ym. (2020) havaitsivat tutkimuksessaan lämpenemisen lisäävän pyreenin (PAH-yhdiste) aiheuttamaa liikkumattomuutta *Daphnia magna* -lajille. Lämpötilan nousu lisäsi myös pyreenin biokertymistä vesikirppuihin. Ilmastonmuutoksen ollessa hyvin ajankohtainen ja tärkeä tutkimuskohde, haluttiin tässä tutkimuksessa selvittää, voiko ilmastonmuutoksen aiheuttamalla lämpötilan nousulla olla PAH-yhdisteiden toksisuutta tehostavia vaikutuksia.

### 1.3 Tutkimuslaji

Tutkimuslajiksi valikoitui vesikirppu *Daphnia magna*, joka toimii usein ekotoksikologisissa kokeissa mallilajina muun muassa sen helpon käsittelyn ja kasvatuksen, sekä syklisen partenogeneettisen elinkaaren vuoksi (Seda ja Petrusek 2011). Vesikirput ovat noin 0,5–6 mm kokoisia planktonäyriäisiä (Kuva 2). Naaraat erottuvat koiraista suuremman koon ja pienempien pään raajojen puolesta.



Kuva 2. *Daphnia magna* naaras kuvattuna mikroskoopin linssin läpi.

Vesikirput ovat suodattajia, eli ne saavat ravintonsa suodattamalla vedestä suspendoituneita ravintoaineita ja partikkeleja. Vesikirpuilla on avoin verenkierto ja niiden sydän sijaitsee selkäpuolella. Huoneenlämmössä (20 °C) sydän lyö keskimäärin 200 kertaa minuutissa ja syke hidastuu sitä alemmissa lämpötiloissa (Ebert 2005). *Daphnia magna* -lajin lämpötilaoptimi kasvulle ja lisääntymiselle liikkuu 15–25 °C välillä, mutta populaatioissa esiintyy geneettisiä eroja lämpötilavaihteluun sopeutumisessa (Mitchell ja Lampert 2000, Goss ja Bunting 1983).

*Daphnia*-suku sisältää yli 100 makean veden planktonlajia ja suvun levinneisyys kattaa koko maailman. Suurin osa lajeista elää avovesillä. *Daphnia*-vesikirput ovat läpikuultavia, mutta niiden väri mukautuu suodatettuun ravintoon. Esimerkiksi viherlevällä ruokitut vesikirput ovat sävyiltään vihertäviä tai kellertäviä, kun taas bakteeriravintoa saaneet vesikirput punertavat (Ebert 2005).

Aikuiset naaraat lisääntyvät ensisijaisesti partenogeneettisesti. Naaras voi tuottaa diploidisia munia, joista kehittyy emon klooneja, ja naaras voi tuottaa myös diploidisia aseksuaalisia munia, joista kehittyy koiraita. Lisäksi naaras voi tuottaa haploidisia munia, jotka vaativat hedelmöittämisen. Naaraat tuottavat poikueita 3–4 päivän välein kuolemaansa asti. Poikuetuotanto alkaa noin 5–10 vuorokauden ikäisillä naarailla 20 °C lämpötilassa. Yksittäisen poikueen kokoon vaikuttavat monet asiat, kuten ravinto ja lämpötila. *Daphnia magna* -lajilla poikueen koko voi olla yli 100 poikasta otollisissa olosuhteissa. Epäotollisissa olosuhteissa vesikirput lisääntyvät seksuaalisesti, jolloin ne usein tuottavat lepomunia, jotka kuoriutuvat olosuhteiden parantuessa. Naaraiden elinikä laboratorio-olosuhteissa voi olla yli kaksi kuukautta (Ebert 2005).

PAH-yhdisteiden vaikutuksia selkärangattomiin on tutkittu verrattain vähän, vaikka niillä on suuri merkitys ekosysteemin toimivuuden kannalta. Vesikirpulla on avainlajin rooli ekosysteemeissä, mikä tekee siitä tärkeän tutkimuskohteen (Seda ja Petrussek 2011). Juuri keskeinen rooli ravintoverkon primäärituottajien ja sekundäärikuluttajien välisessä energiavirrassa tekee *Daphnia*-suvusta keskeisen etsittäessä vastauksia myös ilmaston lämpenemisen vaikutuksiin planktonyhteisöihin ja koko ekosysteemiin, sillä se indikoi ravintoverkon prosesseja ylhäältä alaspäin (*top-down*) sekä alhaalta ylöspäin (*bottom-up*) (Gyllström ym. 2005, Persson ym. 2007).

### 1.3 Tutkimuksen tarkoitus

Tämä tutkimus koostui kahdesta osasta; lisääntymiskokeesta ja sydämen sykkeen tutkimisesta.

Tutkimuksen tarkoituksena oli vastata seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

1. Vaikuttaako fluoranteenialtistus *Daphnia magna* -lajin yksilöiden kasvuun?
2. Vaikuttaako fluoranteenialtistus *Daphnia magna* -lajin yksilöiden lisääntymiseen?
3. Vaikuttaako fluoranteenialtistus *Daphnia magna* -lajin yksilöiden sydämensykkeeseen?

#### 4. Onko lämpötilalla vaikutusta fluoranteenialtistuksen toksisuuspotentiaaliin?

Nollahypoteesina oli, ettei fluoranteenilla tai lämpötilalla ole vaikutusta vesikirppujen kasvuun, lisääntymiseen eikä sydämensykkeeseen. Vastahypoteesina oli, että fluoranteenilla tai/ja lämpötilalla on vaikutusta vesikirppujen kasvuun, lisääntymiseen ja sydämensykkeeseen. Tutkimushypoteesina oletettiin lisäksi, että lämpötilan nousu vaikuttaa fluoranteenin toksisuuteen sitä vahvistavasti. Tutkimuskysymyksiin pyrittiin vastaamaan suorittamalla kokeellinen työ.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Akuutin toksisuuden määrittäminen

Akuutti toksisuus kuvaa aineen myrkyllisyyttä lyhyen ajan kuluttua altistuksesta. Fluoranteenin akuutin toksisuuden määrittäminen perustui Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestön standardimenetelmään *Daphnia magna* -lajin akuuteista liikkumattomuuskokeista (OECD 2004). Kokeella selvitetään, kuinka moni vesikirppu kokee vasteen (liikkumattomuus) 48 tunnin aikana, kun ne altistetaan haitta-aineelle eri pitoisuuksilla. Akuutin toksisuuskokeen perusteella pyrittiin varmistamaan, etteivät valitut konsentraatiot ole liian korkeita, eli varsinaisen lisääntymiskokeen kuolleisuus pyrittiin pitämään alhaisena. Koetta varten kasvatettiin vesikirppuja, joiden alle 24 tunnin ikäisiä poikasia altistettiin fluoranteenille.

Kirjallisuuden perusteella altistuskonsentraatioiksi valikoitui 10, 100 ja 1000 µg/l. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin viisi replikaattia. Altistuspitoisuuskohtaiset kantaliuokset käsittelyille valmistettiin fluoranteenin vahvasta kantaliuoksesta (26,4 mg/ml) laimentaen sitä dimetyylisulfoksidiliuoksella (DMSO). Altistusliuokset valmistettiin kantaliuoksista 50 ml mittapulloihin lisäämällä 5,6 µl vastaavaa kantaliuosta ADAM-liuokseen (*engl. Artificial Daphnia Medium*), (Klüttgen ym. 1994). Lisäksi tehtiin kontrollikäsittely, johon lisättiin vastaava

määrä vain DMSO:ta. Altistusliuokset pipetoitiin pumpetin ja yhdeksän millilitran lasipipetin avulla tuikepulloihin.

Koe alkoi, kun vesikirput siirrettiin tuikepulloihin altistusliuoksiin. Jokaiseen pulloon lisättiin vesikirput yksitellen ADAM-liuoksesta automaattipipetillä (200 µl), jolloin viiden vesikirpun siirtämisestä liuoksen tilavuus lisääntyi yhdellä millilitralla. Koe suoritettiin 20 °C lämpötilassa.

Kun kokeen aloittamisesta oli kulunut 24 tuntia, laskettiin liikkuvien ja liikkumattomien yksilöiden määrä tuikepulloista. Liikkumattomaksi määriteltiin yksilöt, jotka eivät liikkuneet 15 sekuntiin pullon kevyestä liikuttelusta huolimatta. Laskenta toistettiin 48 tunnin kuluttua kokeen aloittamisesta ja tulokset kirjattiin Microsoft Exceliin (versio 16.41). Kokeen jälkeen voitiin laskea fluoranteenille 48 tunnin EC<sub>50</sub>-arvo (engl. *effective concentration 50 %*), eli pitoisuus, jolla vaste havaitaan 50 %:ssa yksilöitä. EC<sub>50</sub>-arvo laskettiin IBM SPSS- ohjelman (versio 28.0.0.0) probit-analyysin avulla.

## 2.2 Lisääntymiskoe

Esikoe suoritettiin osana Minna Hiltusen tutkimuksen esikoetta. Esikokeen tarkoituksena oli löytää sopivat konsentraatiot varsinaiseen lisääntymiskokeeseen. Esikokeessa fluoranteenin konsentraatiot olivat 10, 20, 40, ja 80 µg/l ja lämpötila oli kokeen aikana 20 °C. Konsentraatiot valittiin aiempien tutkimusten perusteella. Esikoe suoritettiin samoin menetelmin kuin varsinainen lisääntymiskoe, mutta kokeen kesto oli fluoranteenikäsittelyjen osalta vain kymmenen vuorokautta.

Esikokeen ja akuutin toksisuuden EC<sub>50</sub>-arvon perusteella lisääntymiskokeen fluoranteenipitoisuuksiksi valittiin samat, kuin esikokeessa: 10, 20, 40 ja 80 µg/l. Näitä konsentraatioita testattiin kolmessa eri lämpötilassa; 18, 20 ja 22 °C:ssa. Lämpötilaskaala sisältyi vielä OECD:n suositusväliin standardikokeen lämpötilasta (OECD 2012). Jokaiselle lämpötilalle tehtiin myös kontrollikäsittely, jossa vesikirppuja kasvatettiin vain kasvatusliuoksessa (ns. puhdaskontrolli), sekä liuotinkontrolli (DMSO), jossa vesikirppuja kasvatettiin 0,005 % dimetyylisulfoksidiliuoksessa. Liuotinkontrolli tehtiin, koska fluoranteeni ei ole

vesiliukoinen, joten altistusliuosten valmistukseen täytyi käyttää liuotinta. Jokaista pitoisuutta ja lämpötilaa kohden altistettiin 13 yksilöä eli yhteensä koeyksiköitä oli 234 kpl. Lisäntymiskokeen menetelmä (21 vuorokautta) perustui Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestön standardimenetelmään *Daphnia magna* -lajin lisääntymiskokeista (OECD 2012).

Korkeimmalle lämpötilakäsittelylle (22 °C) valmistettiin lämpöhaudeallas, jossa koeyksiköt ja kasvatuserä pidettiin kokeen ajan (Kuva 3). Allas täytettiin vedellä ja lämpötilaa ylläpidettiin riippu-termostaatin avulla (Lauda E100). Alemmat lämpötilakäsittelyt voitiin pitää erillisissä huoneissa suoraan kyseisissä lämpötiloissa.



Kuva 3. Koeasetelma 22 °C:een lämpöhaudealtaassa.

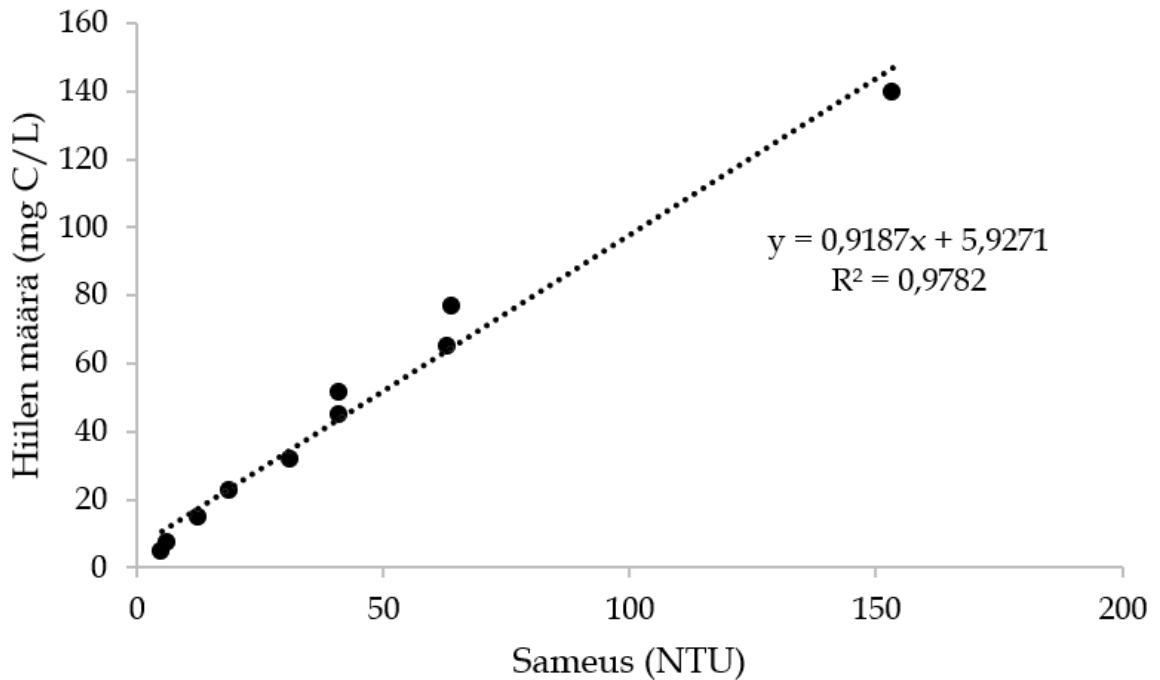
Koetta varten kasvatettiin vesikirppujen emoja ADAM-liuoksessa 20 °C lämpötilassa ja poikaset siirrettiin oikeisiin lämpötiloihin kokeen alkaessa. Vesikirppujen kanta oli DK-35-9 (eristetty pohjois-Saksasta), jota on kasvatettu laboratoriossa yli 10 vuotta. Emoille syötettiin viherlevää (*Acutodesmus sp.*) ja niiltä poistettiin poikaset säännöllisesti.



Litran dekantterilaseihin valmistettiin jokaiselle käsittelylle altistusliuos, jota varten oli laskettu tarvittavan levän ja ADAM-liuoksen määrä. Altistuspitoisuudet oli laimennettu fluoranteenin kantaliuoksesta, jonka konsentraatio oli 26,4 (mg/ml) ja jokaista pitoisuutta lisättiin omiin dekantterilaseihin 28 µg/l. Valmista altistusliuosta mitattiin lasisella mittalasilla 40 ml kasvatusputkeen. Jokaiseen putkeen siirrettiin yksi alle 24 tunnin ikäinen vesikirppu. Kontrolliputkien täyttöön käytettiin automaattiannostelijaa (VWR Volupette). Altistusliuos vaihdettiin kolme kertaa viikossa (ma, ke, pe). Samalla laskettiin poikasmäärä ja kuolleisuus. Uusien poikueiden ilmaantumista havainnoitiin päivittäin 8. päivän jälkeen. Valorytmi oli 16 h valoa ja 8 h pimeää. Kasvatustilojen lämpötiloista pidettiin kirjaa päivittäin. Vedestä mitatut keskilämpötilat ja niiden keskihajonnat kokeen aikana olivat  $18 \pm 0,1$ ;  $20,1 \pm 0,4$ ;  $22,1 \pm 0,2$  °C (n = 21).

Vesikirppuja ruokittiin kolmesti viikossa viherlevällä (*Acutodesmus sp.* -kanta oli kasvatettu Jyväskylän yliopistolla). OECD suosittelee päivittäisen hiilen määräksi 0,10–0,20 mg C vesikirppua kohden (OECD 2012). Ensimmäisen viikon ajan hiilen määrä oli 0,10 mg C, jonka jälkeen määrä nostettiin 0,20 mg C.

Koska viherleväliuoksen tiheys vaihtelee, oli ennen ruokintaa laskettava lisättävän viherlevän (hiilen) määrä. Hiilen määrä voitiin määrittää laskukaavan ja mitatun viherlevän sameuden (*engl. turbidity (NTU)*) perusteella. Laskukaavan muodostamiseksi selvitettiin viherlevän kuivapaino. Viherleväliuosta suodatettiin tyhjiöpainepumpun (MilliporeSigma™ WP6122050 Chemical Duty Vacuum Pressure Pump) avulla suodatinpaperille, joiden huokoskoko oli 0,7 µm (Whatman GF/F). Samalla mitattiin suodatetun nesteen tilavuus (ml) ja sameus (NTU) WTW Turb-sameusmittarilla (WTW Turb® 430 IR Portable Turbidity Meter). Suodatinpaperit olivat punnittu ja kuivatettu 60 °C:ssa, jotta niistä saatiin poistettua ilmankosteus. Suodatuksen jälkeen suodatinpaperit laitettiin takaisin lämpökaappiin 60 °C:seen ja seuraavana päivänä ne punnittiin. Viherlevän hiilipitoisuudeksi oletettiin aiempien tutkimusten perusteella 52 % kuivapainosta. Sameuden ja kuivapainon perusteella voitiin muodostaa kuvaaja (Kuva 4), jonka suoran yhtälöllä voitiin määrittää tarvittavan levän määrä jokaisena ruokintapäivänä.



Kuva 4. *Acutodesmus sp.* -viherlevän hiilen määrä verrattuna viherlevän sameuteen.

Kokeen 17. päivänä altistusliuoksista mitattiin happipitoisuus ja pH, kun vesikirput oli siirretty uusiin liuoksiin (Liite 1, Taulukko 1). Liuosten hapen määrä mitattiin vedenlaatumittarilla (Professional Plus, YSI) ja pH-arvo pH-mittarilla (Seven Easy, Mettler Toledo).

Elossa säilyneiden vesikirppujen koko mitattiin kokeen viimeisenä päivänä (päivä 21). Mittaaminen suoritettiin mikroskoopilla (Optika, Prodi, suurennos 60x(3x20)), jonka okulaarissa olevan mitta-asteikon avulla voitiin mitata vesikirpun pituus millimetreinä.

### 2.3 Sydämensyke

Vesikirppujen sydämensykyttä tutkittiin kolmella kokeella. Lisääntymiskokeen 11. päivänä vesikirput olivat kasvaneet tarpeeksi suuriksi, jotta sydämensykkeen pystyi erottamaan mikroskoopilla. 20 ja 22 °C käsittelyistä kuvattiin muut paitsi fluoranteenin korkein altistuspitoisuus (80 µg/l), sillä kyseisen pitoisuuden yksilöt

eivät olleet tarpeeksi suuria kuvausta varten. Käsittelyistä kuvattiin jokaisesta kahdeksan vesikirppua ( $n = 80$ ). Vesikirppujen sydämensykyttä kuvattiin mikroskoopin linssin läpi videokameralla (Canon Legria FS200). Videolta voitiin mitata myös vesikirppujen koko, sillä mikroskoopin okulaarin mitta-asteikko näkyi videokuvassa.

Sydämensykkeen toinen koe oli akuutin toksisuuden koe. Kokeessa 7-9 päivän ikäisiä vesikirppuja altistettiin kolmelle fluoranteenikonsentraatiolle; 10, 40 ja 80  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Näitä verrattiin liuotinkontrolliin (DMSO). Replikaatteja jokaiselle käsittelylle oli 15 kpl ( $n = 60$ ). Altistusliuokset valmistettiin pulloihin, joihin mitattiin mittalasilla 200 ml ADAM-liuosta ja 10  $\mu\text{l}$  jokaista pitoisuutta omiin pulloihinsa. Myös DMSO:ta pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$ . Pulloista pipetoitiin 9,5 ml altistusliuosta tuikepulloihin. Vesikirput siirrettiin pipetillä yksitellen 1,5 minuutin välein tuikepulloihin 0,5 ml tilavuudessa. Tunnin kuluttua altistuksen aloittamisesta aloitettiin kuvaamaan vesikirppujen sydämensykyttä. Kuvaamiseen kului keskimäärin 1,5 minuuttia per yksilö, jolloin kaikkien vesikirppujen altistus oli yhtä pitkä. Kuvaamisen jälkeen vesikirppu siirrettiin takaisin tuikepulloon. Kuvaus toistettiin kolmen ja 24 tunnin kuluttua altistuksen aloittamisesta.

Haluttiin lisäksi selvittää, onko fluoranteenialtistuksella välitön vaikutus vesikirppujen sydämensyккеeseen, joten kolmantena tehtiin vielä lyhyt altistuskoe. Kokeessa verrattiin 80  $\mu\text{g}/\text{l}$  fluoranteenipitoisuutta DMSO-liuotinkontrolliin. 10-14 vuorokauden ikäisiä vesikirppuja kuvattiin ensin ilman mitään altistusta. Sitten objektilasille lisättiin 500  $\mu\text{l}$  DMSO- tai fluoranteenialtistusliuosta, joka poistettiin 15 sekunnin kuluttua ja vesikirppu kuvattiin uudestaan. Molemmissa käsittelyissä otos oli 15 yksilöä.

Kuvatut videot siirrettiin OpenShot-videoeditoriin (Open Shot Video Editor, versio 2.6.1), jossa videoiden nopeutta pystyttiin hidastamaan ja ruudut numeroimaan. Hidastetulta videolta voitiin ruutu kerrallaan laskea sydämenlyönnit. Videosta merkattiin ruudun numero Microsoft Exceliin sydämen ollessa täysi. Jokaisesta videosta merkattiin 31 tällaista ruutua. Videokamera tuotti

25 ruutua/sekunti, joten lyöntien välisten ruutujen erotuksen avulla voitiin määrittää keskimääräinen lyöntinopeus minuuttia kohti.

## 2.4 Tilastolliset analyysit

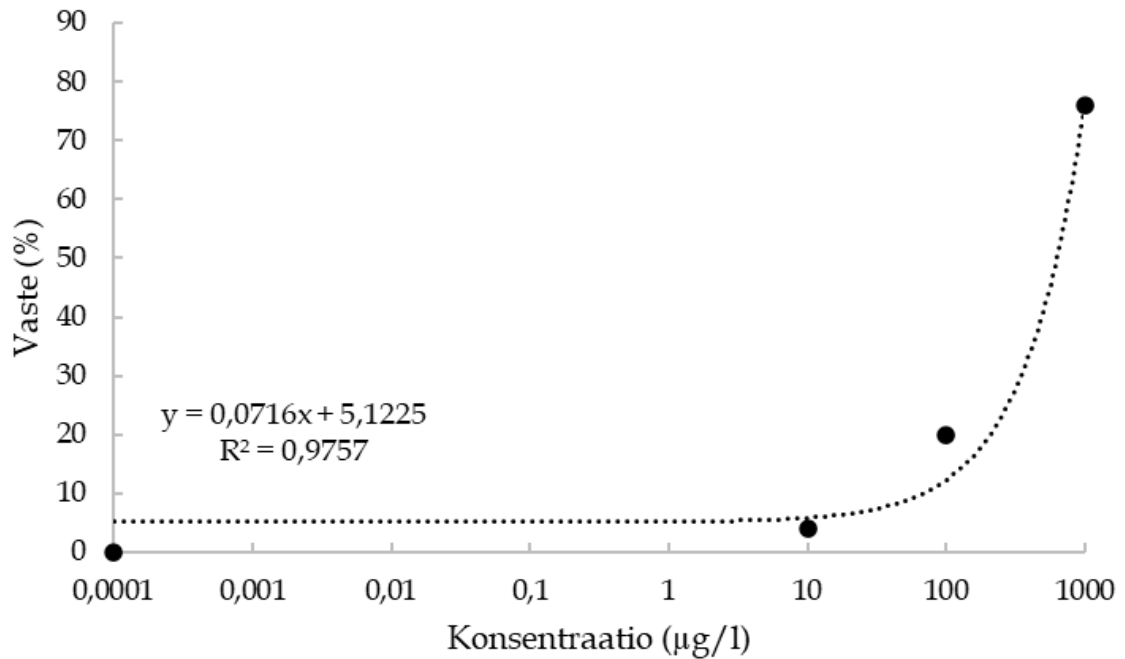
Sekä lisääntymiskokeen, että sykekokeiden tulosten tilastollinen testaaminen tehtiin IBM SPSS- ohjelmalla (versio 28.0.0.0) käyttäen varianssianalyysiä (2-suuntainen ANOVA ja 1-suuntainen ANOVA) tai Kruskall-Wallis-testiä. Tulos oli tilastollisesti merkitsevä, mikäli se alitti raja-arvon 0,05.

Lisääntymiskokeen kuolleisuuden ja käsittelyn välistä riippuvuutta testattiin riippumattomien otosten  $\chi^2$ -testillä. Käsittelyjen mahdollisia eroja vesikirppujen poikastuotannossa ja poikastuotannon aloitusajankohdassa tutkittiin Kruskall-Wallis-testillä, sillä kaksisuuntaisen ANOVA:n oletukset eivät täytyneet. Vesikirppujen kasvua tutkittiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä. Mikäli muuttujien yhteisvaikutus oli merkitsevä, molemmat muuttujat testattiin vielä erikseen yksisuuntaisella varianssianalyysillä tai Kruskall-Wallis- testillä. DMSO- tai fluoranteenialtistuksen välitöntä vaikutusta sykkeeseen tutkittiin Kruskall-Wallis -ja T-testin avulla. Parittainen vertailu tehtiin Tukeyn testillä (ANOVA) tai Dunn-testillä (Kruskall-Wallis).

## 3 TULOKSET

### 3.1 Akuutti toksisuus

Akuuttia toksisuutta ei havaittu vesikirpun poikasissa vielä 24 tunnin jälkeen. Probit-analyysin mukaan vesikirppujen immobilisaatio ylitti 50 %, kun altistusta oli kestänyt 48 tuntia ( $X^2(13) = 19,22, p = 0,116$ ). Fluoranteenin 48 tunnin  $EC_{50}$ -arvoksi saatiin 330,5  $\mu\text{g/l}$ , 95 % CI [138,6, 1123,6], (Kuva 5).



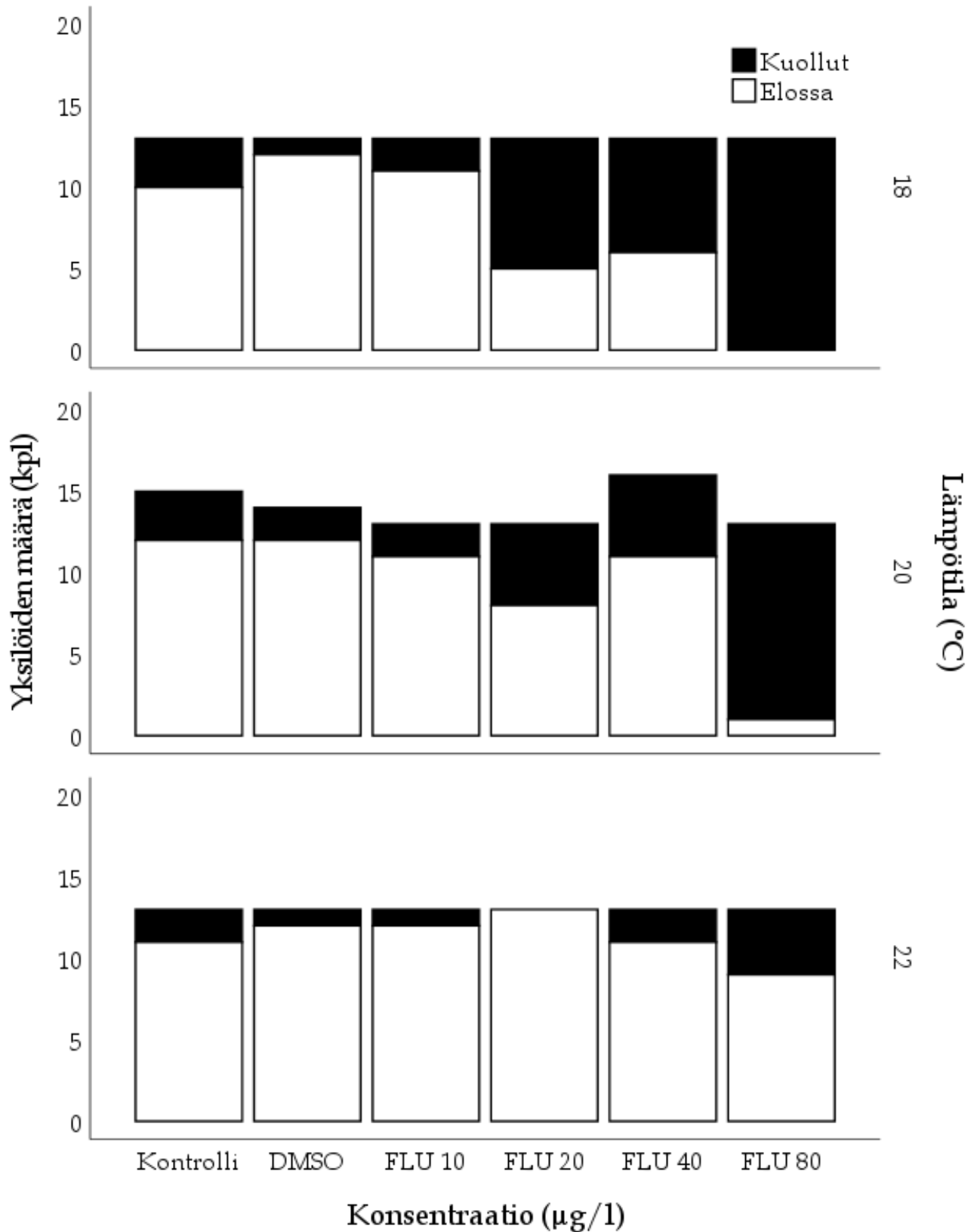
Kuva 5. Vesikirppujen immobilisaatio (vaste) suhteessa fluoranteenkonsentraatioon (µg/l) kymmenkantisella logaritmisella asteikolla. Altistuksen kesto oli 48 tuntia. Kontrollia (ei fluoranteenialtistusta) kuvaa pitoisuus 0,0001 µg/l.

## 3.2 Kuolleisuus ja lisääntyminen

### 3.2.1 Selviytyminen

Ensimmäisen viikon aikana havaittiin kuolleisuutta etenkin 18 °C lämpötilassa, jossa korkeimmassa fluoranteenipitoisuudessa (80 µg/l) oli ensimmäisen viikon jälkeen elossa vain kaksi yksilöä. Lisääntymiskokeen loppuun asti selviytyi 167 yksilöä (Kuva 6).

Suurimmassa altistuspitoisuudessa 18 ja 20 °C lämpötiloissa lähes kaikki vesikirput kuolivat (Liite 2). Vähäisintä kuolleisuus oli 22 °C lämpötilassa, jossa kokeen loppuun asti säilyi elossa 87 % yksilöistä (vrt. 20 °C lämpötilassa elossa säilyi 65 % ja 18 °C lämpötilassa 56 % yksilöistä).



Kuva 6. Lisäntymiskokeen aikana selvinneiden ja kuolleiden yksilöiden määrä (kpl) käsitteittäin eri lämpötiloissa. Keskimmaisessa, 20 °C lämpötilassa oli suurempi määrä yksilöitä kokeen alussa (kontrollit ja fluoranteenipitoisuus 40 µg/l), sillä käsitellyt olivat yhteisiä Minna Hiltusen toksisuuskokeen kanssa.

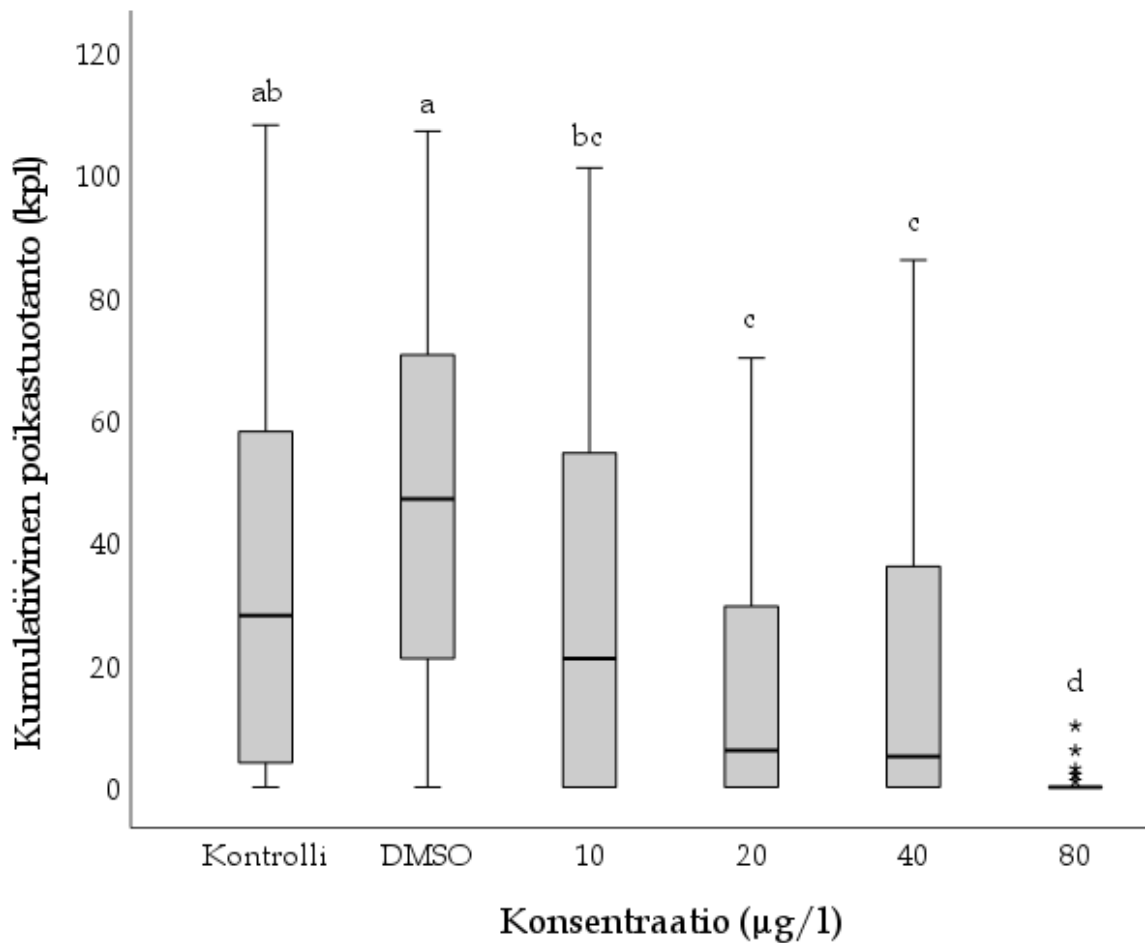
Riippumattomien otosten  $\chi^2$ -testin mukaan kuolleisuuden ja altistuskonsentraation välillä havaittiin riippuvuutta ( $X^2(5, N = 240) = 51,79, p < 0,001$ ). Testin perusteella fluoranteenikonsentraation vaikutus kuolleisuuteen oli suuri (*Cramer's V* = 0,465), eli pitoisuuden kasvaessa kuolleisuus oli suurempaa. Myös altistuslämpötilalla oli vaikutusta kuolleisuuteen ( $X^2(2, N = 240) = 18,48, p < 0,001$ ), kuolleisuus väheni lämpötilan kasvaessa, mutta lämpötilan vaikutus ei ollut yhtä suuri (*Cramer's V* = 0,277).

### 3.2.2 Lisääntyminen

Eniten poikasia syntyi 22 °C lämpötilassa, missä emot tuottivat keskimäärin 48 ( $\pm 34$ ) poikasta kokeen aikana (vrt. 18 °C:ssa keskimäärin 19  $\pm 20$  ja 20 °C:ssa keskimäärin 33  $\pm 25$ ). Jokaisessa käsittelyssä poikasten määrä kasvoi lämpötilan noustessa (Liite 3).

Suurin keskimääräinen poikasmäärä saavutettiin puhdaskontrollikäsittelyssä (72  $\pm 24$  poikasta 22 °C:ssa). Korkeimmassa fluoranteenikonsentraatiossa puolestaan saatiin vähiten poikasia (20 °C:ssa ei ollut lainkaan poikasia ja 22 °C:ssa keskimäärin 2,7  $\pm 3$ ).

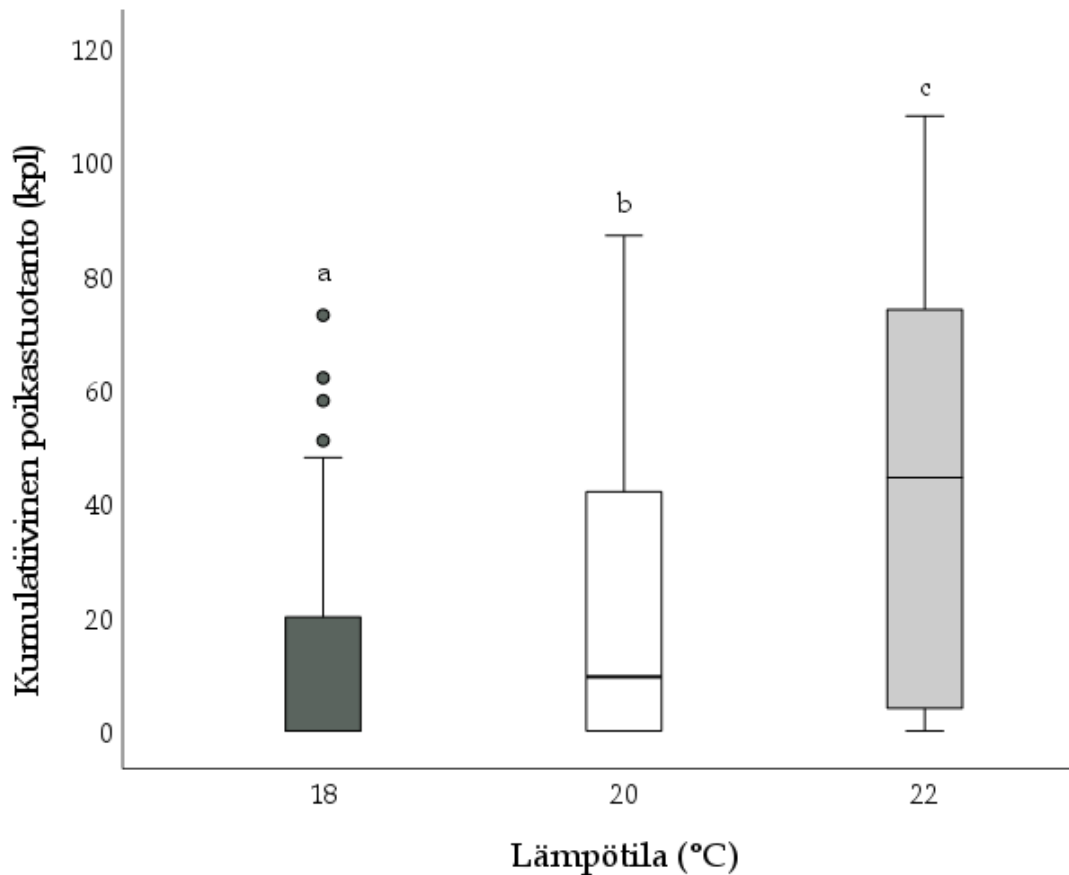
Käsittelyjen välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero altistuskonsentraation suhteen (Kruskall-Wallis,  $X^2(5, 167) = 30,91, p < 0,001$ ). Parittaisesta vertailusta havaittiin, että poikastuotannossa suurin fluoranteenikonsentraatio (80  $\mu\text{g/l}$ ) erosi kaikista muista konsentraatioista ja kontrollikäsittelyistä ( $p < 0,05$ ), eli pitoisuuden kasvaessa poikastuotanto pieneni. Fluoranteenipitoisuudet 40 ja 20  $\mu\text{g/l}$  erosivat lisäksi molemmista kontrolleista ( $p < 0,05$ ), mutta eivät toisistaan, eivätkä 10  $\mu\text{g/l}$  pitoisuudesta ( $p > 0,05$ ). Pienin fluoranteenikonsentraatio (10  $\mu\text{g/l}$ ) erosi DMSO-kontrollista ( $p = 0,026$ ), muttei puhdaskontrollista ( $p = 0,223$ ). Kontrollit eivät eronneet toisistaan ( $p = 0,328$ ), (Kuva 7).



Kuva 7. Vesikirppujen poikasten kumulatiivinen summa (kpl) altistuskonsentraation mukaan ( $\mu\text{g/l}$ ). Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Tähtisymboli kuvaa äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

Kruskall-Wallis-testin perusteella lämpötilan noustessa poikasten määrä kasvoi ( $X^2(2, 167) = 22,85, p < 0,001$ ). Alimpaan lämpötilaan verrattuna poikasmäärä oli noin kaksinkertainen korkeimmassa lämpötilassa. Parittaisen vertailun perusteella kaikki lämpötilakäsittelyt erosivat toisistaan. Alin lämpötila, 18 °C erosi tilastollisesti merkittävästi 22 °C:sta ( $p < 0,001$ ), (18-20 °C,  $p = 0,01$ , 20-22 °C,  $p = 0,026$ ), (Kuva 8).



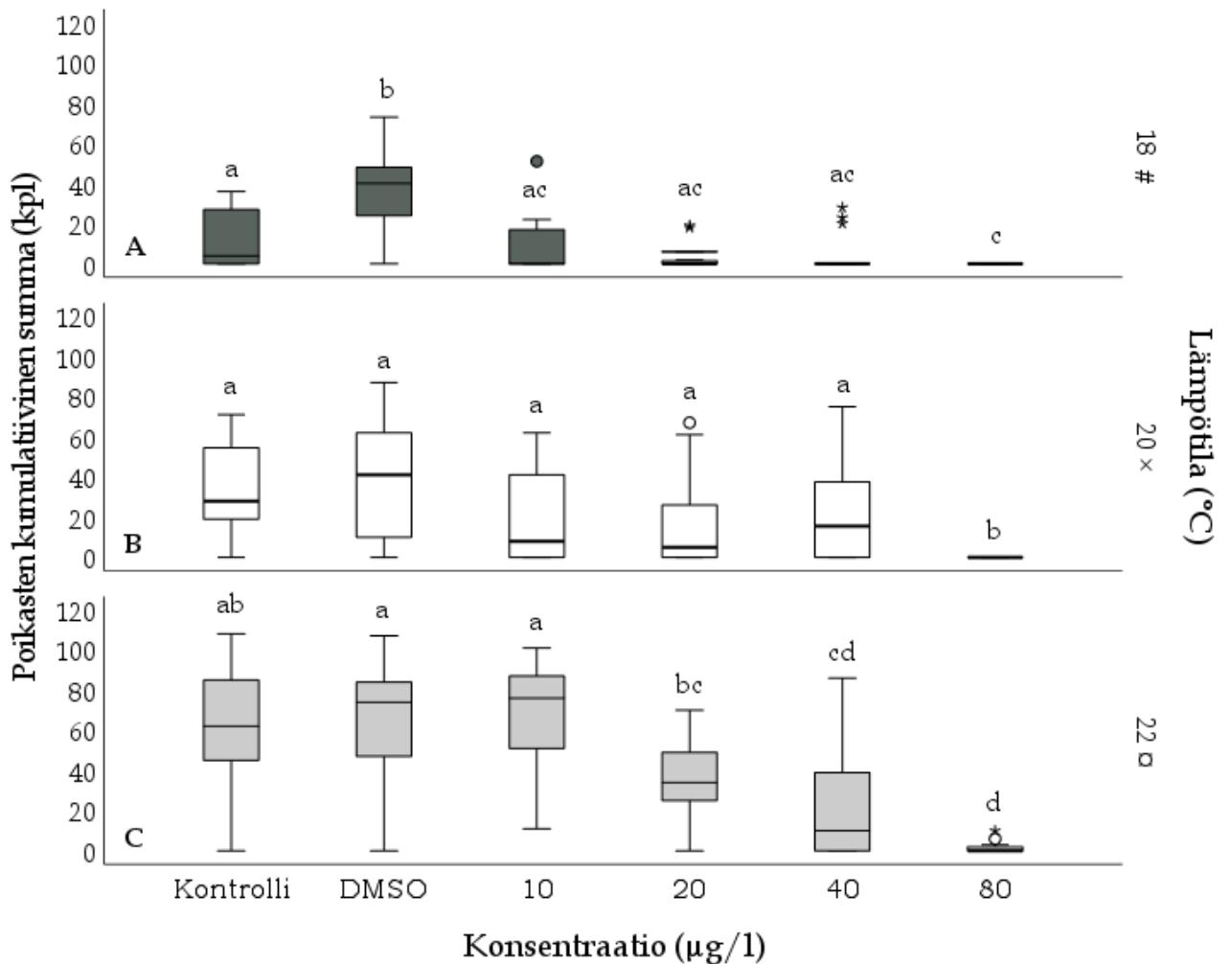


Kuva 8. Vesikirppujen poikasten kumulatiivinen summa altistuslämpötilan (°C) mukaan. Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia havaintoja.

Lämpötilan ja altistuspitoisuuden suhdetta tarkasteltiin vielä erikseen Kruskal-Wallis-testillä testaamalla jokaista lämpötiläkäsittelyä erikseen. Alimmassa lämpötiläkäsittelyssä (18 °C) parittainen vertailu osoitti, että suurimman konsentraation (80 µg/l) poikasmäärä erosi puhdaskontrollista ( $p = 0,011$ ) ja DMSO-käsittelystä ( $p < 0,001$ ) (Kuva 9 A). Myös 40, 20 ja 10 µg/l fluoranteenipitoisuuksien poikasmäärät erosivat DMSO-käsittelystä ( $p < 0,001$ ), eli niiden kumulatiivinen poikastuotanto oli alhaisempi kuin kontrolleissa. Alimman lämpötilan käsittelyssä myös kontrollit erosivat toisistaan ( $p = 0,007$ ).

Keskimmäisessä lämpötiläkäsittelyssä (20 °C) parittainen vertailu osoitti eron suurimman konsentraation (80 µg/l) ja kaikkien muiden käsittelyjen välillä ( $p < 0,05$ ), eli suurimmassa pitoisuudessa saatiin selvästi vähiten poikasia muihin käsittelyihin verrattuna (Kuva 9 B). Suurimman pitoisuuden kuolleisuusprosentti on kuitenkin merkittävä.

Korkeimmassa lämpötilassa (22 °C) parittaisen vertailun perusteella havaittiin, että poikasmäärä pieneni pitoisuuden kasvaessa (Kuva 9 C). Suurimman pitoisuuden poikasmäärä erosi tilastollisesti merkitsevästi kaikista käsittelyistä ( $p < 0,05$ ) paitsi 40 µg/l pitoisuudesta. 40 µg/l erosi poikasmäärältään puhdaskontrollista ( $p = 0,006$ ), DMSO-käsittelystä ( $p = 0,003$ ), sekä pienimmästä fluoranteenipitoisuudesta ( $p < 0,001$ ). Pitoisuudella 20 µg/l havaittiin ero DMSO-käsittelyyn ( $p = 0,045$ ), sekä 10 µg/l käsittelyyn ( $p = 0,016$ ). Pienimmässä pitoisuudessa ei havaittu eroa kontrolleihin, eivätkä kontrollikäsittelyt eronneet poikasmäärässä toisistaan.

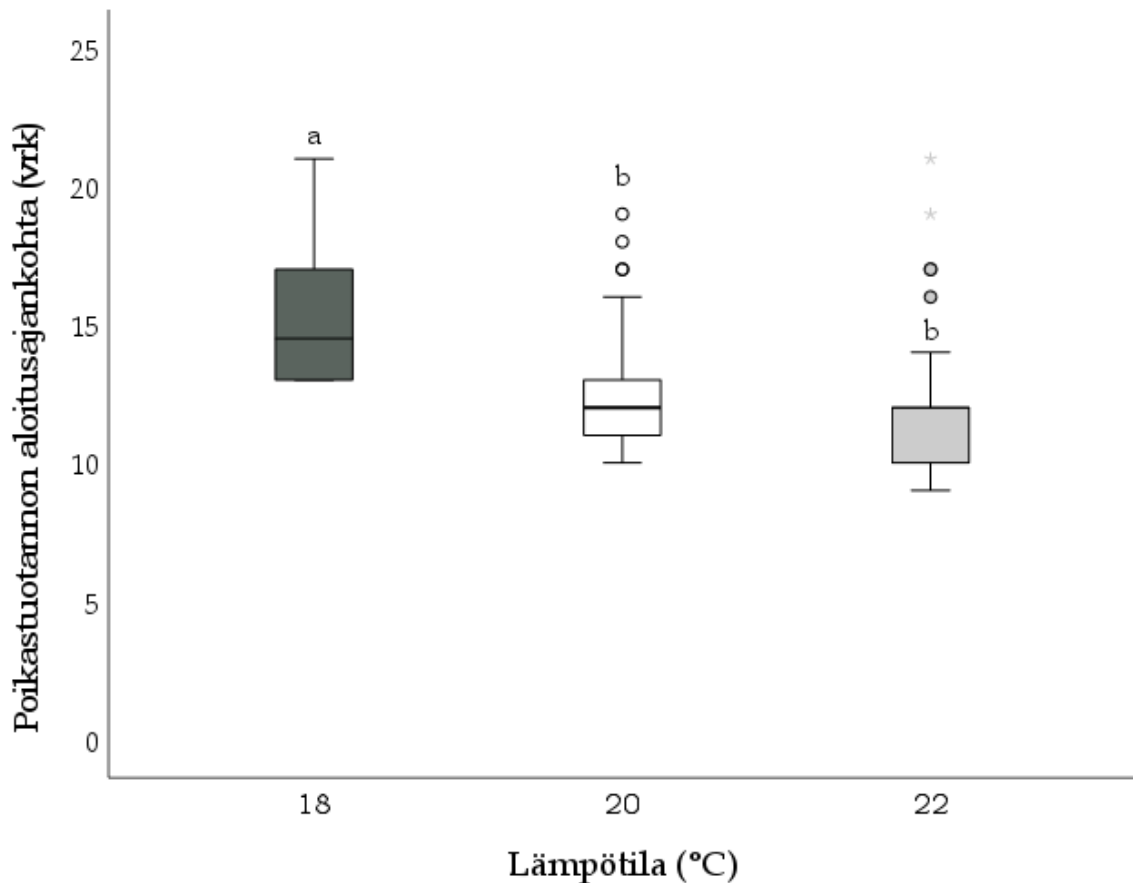


Kuva 9. Poikasten kumulatiivinen summa emoa kohden lisääntymiskokeen aikana fluoranteenikäsittelyissä ja kontrolleissa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A (18 °C), B (20 °C) ja C (22 °C), jotka erottavat lämpötilakäsittelyt. Sama kirjain tai symboli (×, # ja ◻) kuvassa tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

Ensimmäiset poikaset ilmaantuivat korkeimmassa lämpötilassa kokeen 9. päivänä, jolloin poikasia havaittiin molemmissa kontroleissa ja  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  fluoranteenikäsittelyssä. Keskimäärin poikasia alettiin tuottaa lämpötilakäsittelyittäin seuraavasti:  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa  $15,6 \pm 2,6$ ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa  $12,7 \pm 2,2$  ja  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa  $11,6 \pm 2,4$  vuorokautta.

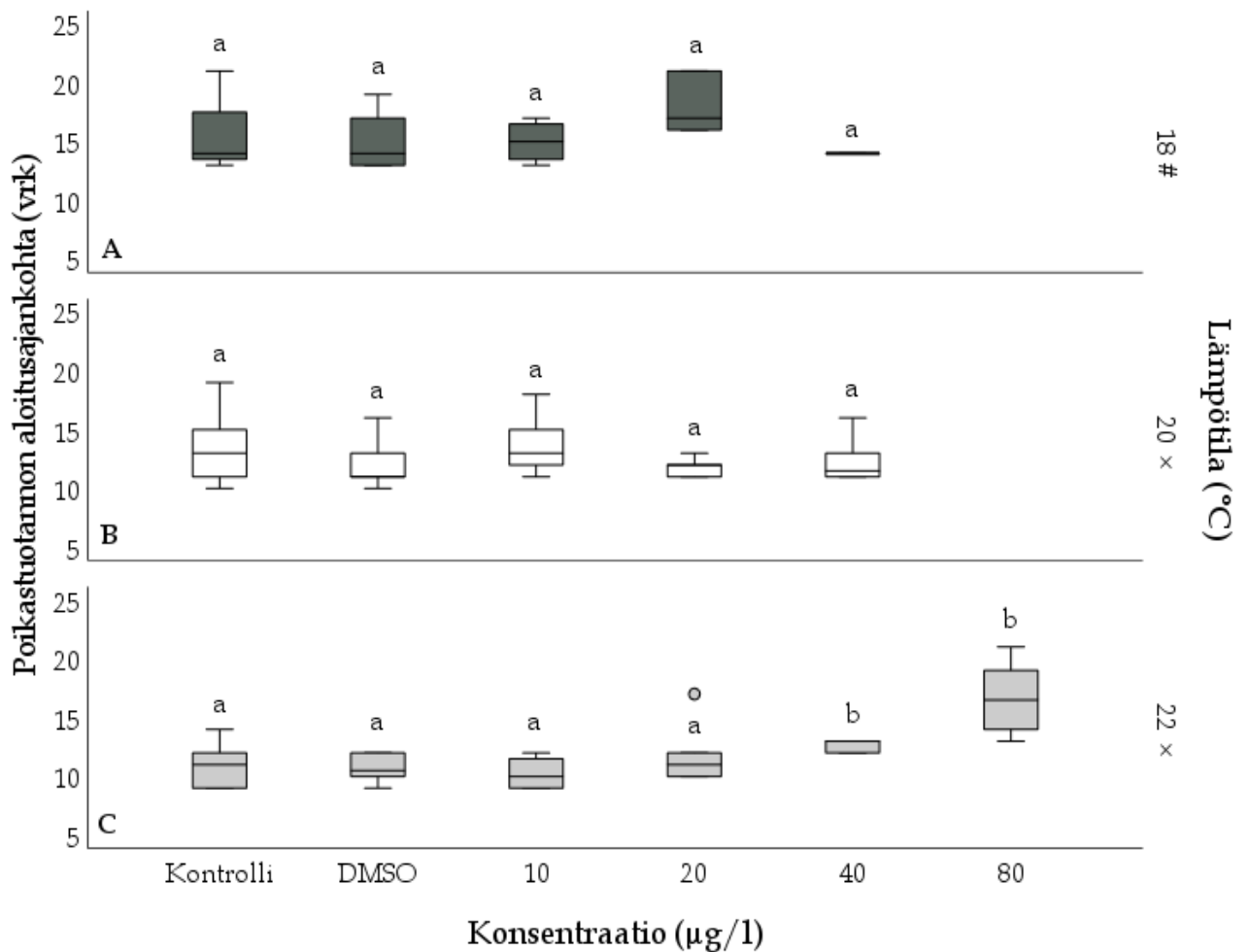
Poikastuotannon aloitusajankohdan jakautuneisuutta, eli päivää, jolloin vesikirput alkoivat tuottaa poikueita, testattiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä. Analyysiin sisältyivät vain yksilöt, jotka tuottivat poikasia lisääntymiskokeen aikana ja selviytyivät kokeen loppuun asti. Altistuslämpötilan ja altistuskonsentraation yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä ( $F_{8,124} = 2,597, p = 0,012$ ), mutta ryhmien varianssien erot olivat Levenen testin perusteella liian suuria, jolloin testin luotettavuus kärsi.

Kruskall-Wallis-testin perusteella altistuskonsentraatiolla ei ollut vaikutusta poikastuotannon aloitukseen ( $X^2(5, 140) = 10,90, p = 0,053$ ). Altistuslämpötila kuitenkin vaikutti poikastuotannon aloitusajankohtaan (1-ANOVA,  $F_{2,137} = 28,22, p < 0,001$ ). Parittaisesta vertailusta havaittiin, että  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ :een käsittely erosi  $20$  ja  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ :sta ( $p < 0,001$ ) eli poikastuotanto alkoi korkeammassa lämpötilassa keskimäärin aiemmin (Kuva 10). Korkeimmat lämpötilakäsittelyt ( $20$  ja  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) eivät puolestaan eronneet toisistaan poikastuotannon aloituksen suhteen ( $p = 0,061$ ).



Kuva 10. Vesikirppujen poikastuotannon aloitusajankohta vuorokausina suhteessa altistuslämpötilaan (°C). Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

Koska 2-ANOVA antoi viitteitä siitä, että lämpötilalla ja altistuskonsentraatiolla voi olla yhdysvaikutusta, lämpötilan ja altistuskonsentraation yhteyttä poikastuotannon aloitukseen tarkasteltiin vielä testaamalla jokaista lämpötilaa erikseen Kruskal-Wallis-testillä. Alimmassa lämpötilassa fluoranteenialtistuksella ei ollut vaikutusta poikastuotannon aloitukseen ( $X^2(4, 30) = 5,59, p = 0,232$ ), (Kuva 11 A). Myöskään keskimmaisessä lämpötilassa ei havaittu eroja ( $X^2(4, 48) = 3,986, p = 0,408$ ), (Kuva 11 B). Korkeimmassa lämpötilassa fluoranteenialtistus viivästytti poikastuotannon aloitusta ( $X^2(5, 62) = 29,45, p < 0,001$ , Kuva 11 C). Parittaisesta vertailusta selvisi, että kontrolli, liuotinkontrolli, sekä 10 ja 20  $\mu\text{g/l}$  fluoranteenikäsittelyt erosivat 40 ja 80  $\mu\text{g/l}$  käsittelyistä ( $p < 0,05$ ), eli fluoranteenialtistuksen kasvaessa poikastuotanto alkoi myöhemmin.

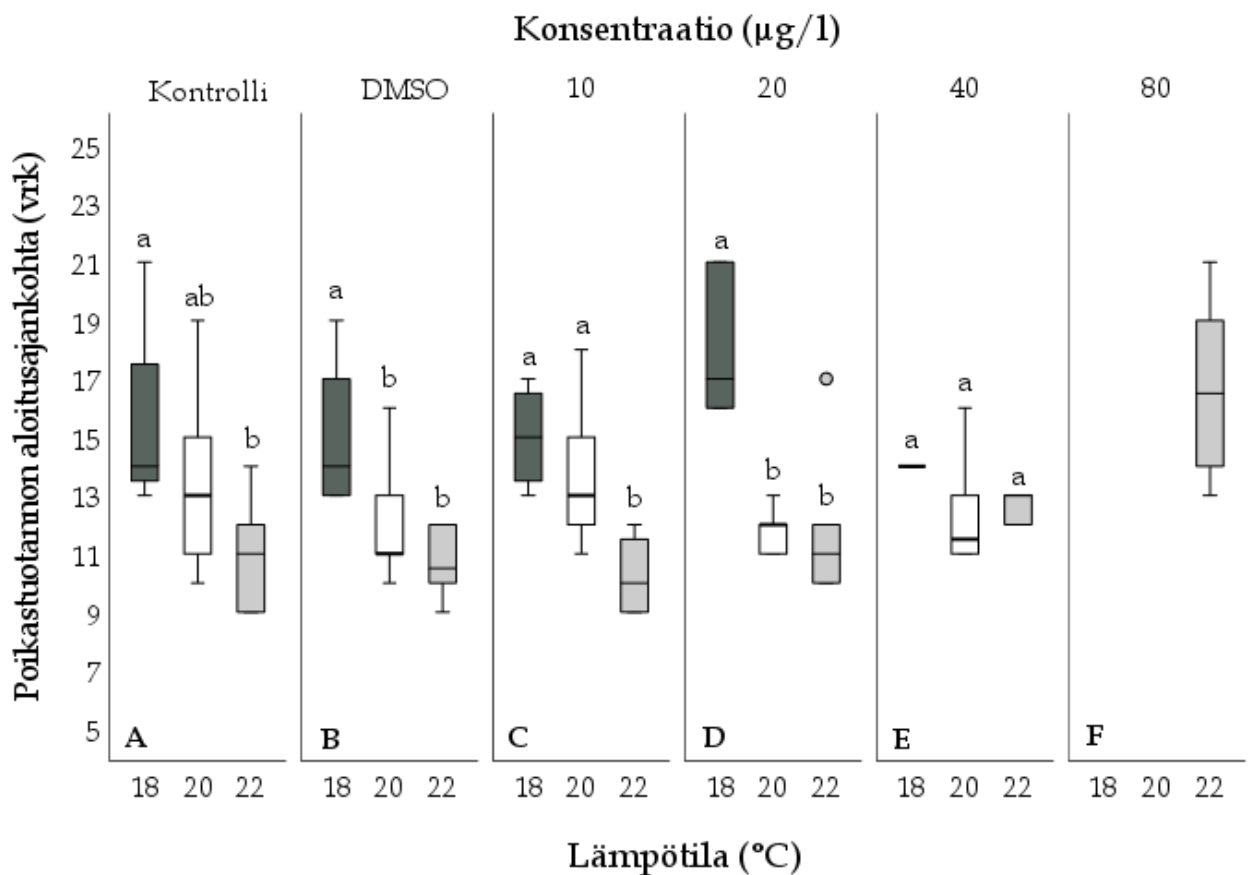


Kuva 11. Poikastuotannon aloitusajankohta (vrk) lisääntymiskokeessa eri fluoranteenikäsittelyissä ja kontrolleissa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A (18 °C), B (20 °C) ja C (22 °C), jotka erottavat lämpötiläkäsittelyt. Sama kirjain tai symboli (× ja #) kuvassa tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli puolestaan kuvastaa poikkeavaa havaintoa.

Lämpötilan vaikutusta emojen poikastuotannon aloitukseen tarkasteltiin vielä testaamalla jokaista altistuspitoisuutta sekä kontrolleja erikseen. Puhdaskontrollivesikirpuilla lämpötilan havaittiin vaikuttavan aloitusajankohtaan (1-ANOVA,  $F_{2,27} = 7,91$ ,  $p = 0,002$ ). Parittaisen vertailun mukaan puhdaskontrollissa poikastuotanto alkoi myöhemmin 18 °C lämpötilassa kuin 22 °C:ssa ( $p = 0,001$ ). Myös liuotinkontrollissa lämpötila vaikutti poikastuotannon aloitukseen (Kruskall-Wallis,  $X^2(2, 34) = 19,53$ ,  $p < 0,001$ ), missä alimmassa lämpötilassa poikastuotanto viivästyi verrattuna 20 ja 22 °C lämpötiloihin ( $p < 0,01$ ). Samanlainen tulos saatiin

20 µg/l fluoranteenipitoisuudesta (1-ANOVA,  $F_{2,20} = 23,91$ ,  $p < 0,001$ ), jossa parittaisen vertailun mukaan jälleen alimmassa lämpötilassa poikastuotanto viivästy verrattuna 20 ja 22 °C lämpötiloihin ( $p < 0,001$ ).

Fluoranteenipitoisuudessa 10 µg/l lämpötila vaikutti poikastuotannon aloittamiseen (1-ANOVA,  $F_{2,22} = 13,85$ ,  $p < 0,001$ ). Korkein lämpötilakäsittely erosi muista lämpötiloista ( $p \leq 0,001$ ), eli korkeimmassa lämpötilassa poikastuotanto alkoi aiemmin kuin muissa lämpötiloissa. Fluoranteenipitoisuudessa 40 µg/l lämpötilalla ei havaittu vaikutusta (Kruskall-Wallis,  $X^2(2, 22) = 5,36$ ,  $p = 0,069$ ). Korkeimmassa pitoisuudessa (80 µg/l) lämpötilan vaikutusta ei voitu testata, sillä kyseisessä käsittelyssä syntyi poikasia vain 22 °C lämpötilassa (Kuva 12).



Kuva 12. Poikastuotannon aloitusajankohta (vrk) lisääntymiskokeessa eri lämpötiloissa ja altistus-konsentraatioissa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A-F, jotka erottavat altistus-konsentraatiot. Sama kirjain kuvassa tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli puolestaan kuvastaa poikkeavaa havaintoa.

### 3.3 Kasvu

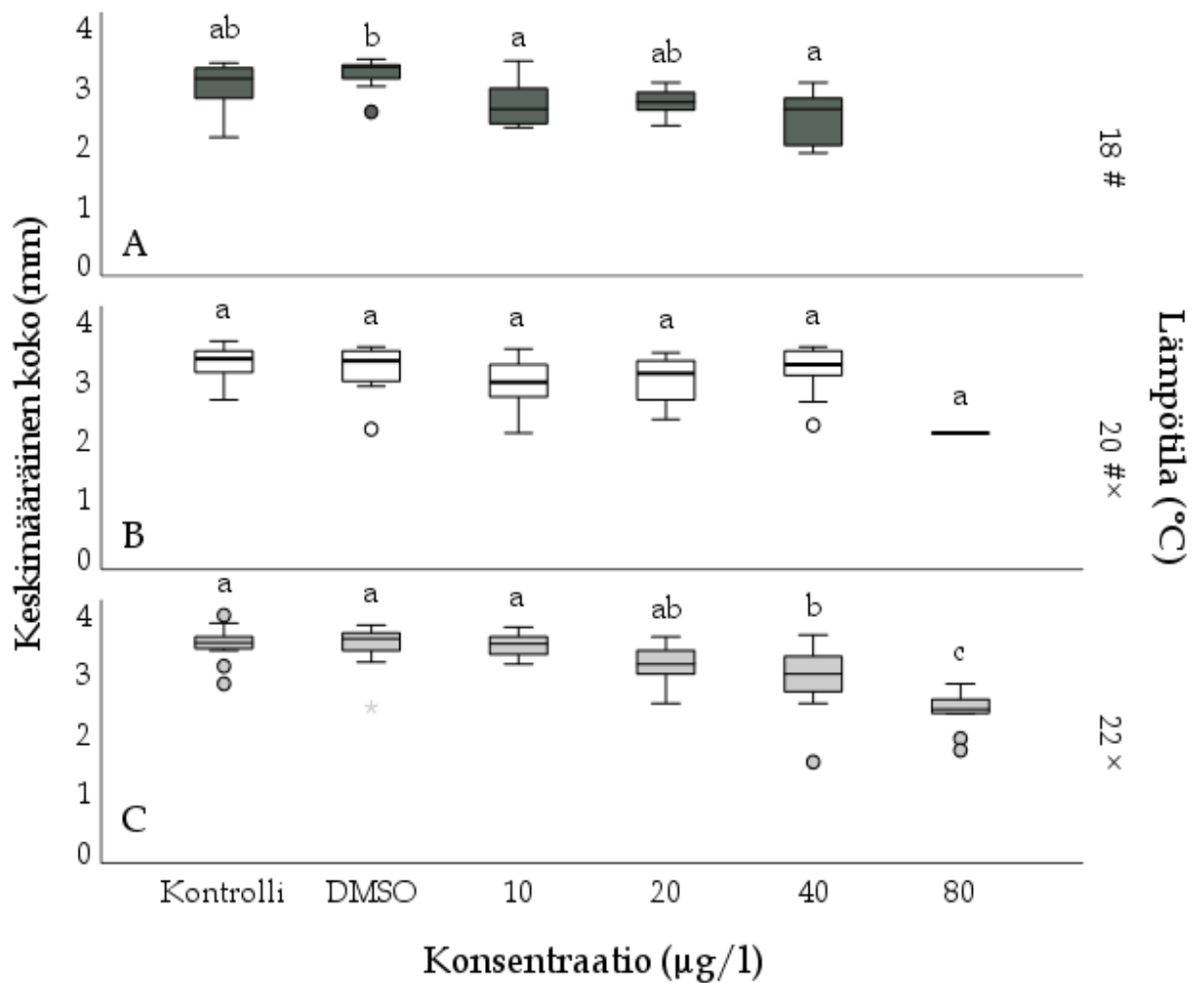
Vesikirput kasvoivat 21 vrk aikana suurimmiksi DMSO-käsittelyissä ( $3,3 \pm 0,4$  mm). Pienin keskimääräinen ruumiinkoko saavutettiin suurimmassa fluoranteenipitoisuudessa ( $2,3 \pm 0,4$ ). Korkeammassa lämpötilassa vesikirput kasvoivat keskimäärin suuremmiksi ( $18^\circ\text{C}$ :  $2,9 \pm 0,4$ ;  $20^\circ\text{C}$ :  $3,1 \pm 0,4$  ja  $22^\circ\text{C}$ :  $3,2 \pm 0,5$  mm), (Liite 4).

Altistuskonsentraatiolla ja -lämpötilalla oli tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus vesikirppujen kasvuun (2-ANOVA,  $F_{9,145} = 2,00$ ,  $p = 0,043$ ), samoin konsentraatiolla ( $F_{5,145} = 10,27$ ,  $p < 0,001$ ) ja lämpötilalla ( $F_{2,145} = 16,99$ ,  $p < 0,001$ ) yksin.

Jokaista lämpötilaa testattiin jälleen erikseen mahdollisten pitoisuuksien välisten erojen selvittämiseksi. Alimmassa lämpötilassa vesikirppujen koko erosi tilastollisesti merkitsevästi käsittelyjen välillä (1-ANOVA,  $F_{4,34} = 5,18$ ,  $p = 0,002$ ). Parittaisen vertailun (Tukey) mukaan alimmassa lämpötilassa DMSO-käsittelyn vesikirppujen koko erosi  $10 \mu\text{g/l}$  fluoranteenipitoisuudesta ( $p = 0,03$ ) sekä  $40 \mu\text{g/l}$  pitoisuudesta ( $p = 0,003$ ), (Kuva 13 A). DMSO-käsittelyssä vesikirput olivat keskimäärin suurempia (keskimitta  $3,1$  mm), kuin kyseisissä fluoranteenialtistuksissa ( $10 \mu\text{g/l}$ : keskimitta  $2,7$  mm ja  $40 \mu\text{g/l}$ : keskimitta  $2,5$  mm).

Keskimmäisessä lämpötilassa konsentraatiolla oli vaikutusta vesikirppujen kokoon (1-ANOVA,  $F_{5,49} = 2,52$ ,  $p = 0,041$ ), mutta suurin konsentraatio täytyi jättää analyysin ulkopuolelle pienen otannan ( $n = 1$ ) vuoksi. Tällöin pitoisuuksien välillä ei havaittu vaikutusta vesikirppujen kokoon (1-ANOVA,  $F_{4,49} = 1,48$ ,  $p = 0,22$ ), (Kuva 13 B).

Korkeimmassa lämpötiläkäsittelyssä altistuskonsentraatiolla havaittiin olevan vaikutusta vesikirppujen kasvuun (1-ANOVA,  $F_{5,62} = 13,56$ ,  $p < 0,001$ ). Parittaisen vertailun perusteella suurimmalla fluoranteenipitoisuudella altistetut vesikirput olivat keskimäärin pienempiä kuin muissa käsittelyissä (verrattuna kontrolleihin,  $10$  ja  $20 \mu\text{g/l}$  fluoranteenipitoisuuteen  $p < 0,001$ ; verrattuna  $40 \mu\text{g/l}$  pitoisuuteen  $p = 0,019$ ). Myös  $40 \mu\text{g/l}$  fluoranteenipitoisuudessa kasvaneet vesikirput olivat keskimäärin pienempiä kuin kontrolleissa ja  $10 \mu\text{g/l}$  fluoranteenipitoisuudessa kasvaneet ( $p < 0,05$ ), (Kuva 13 C).



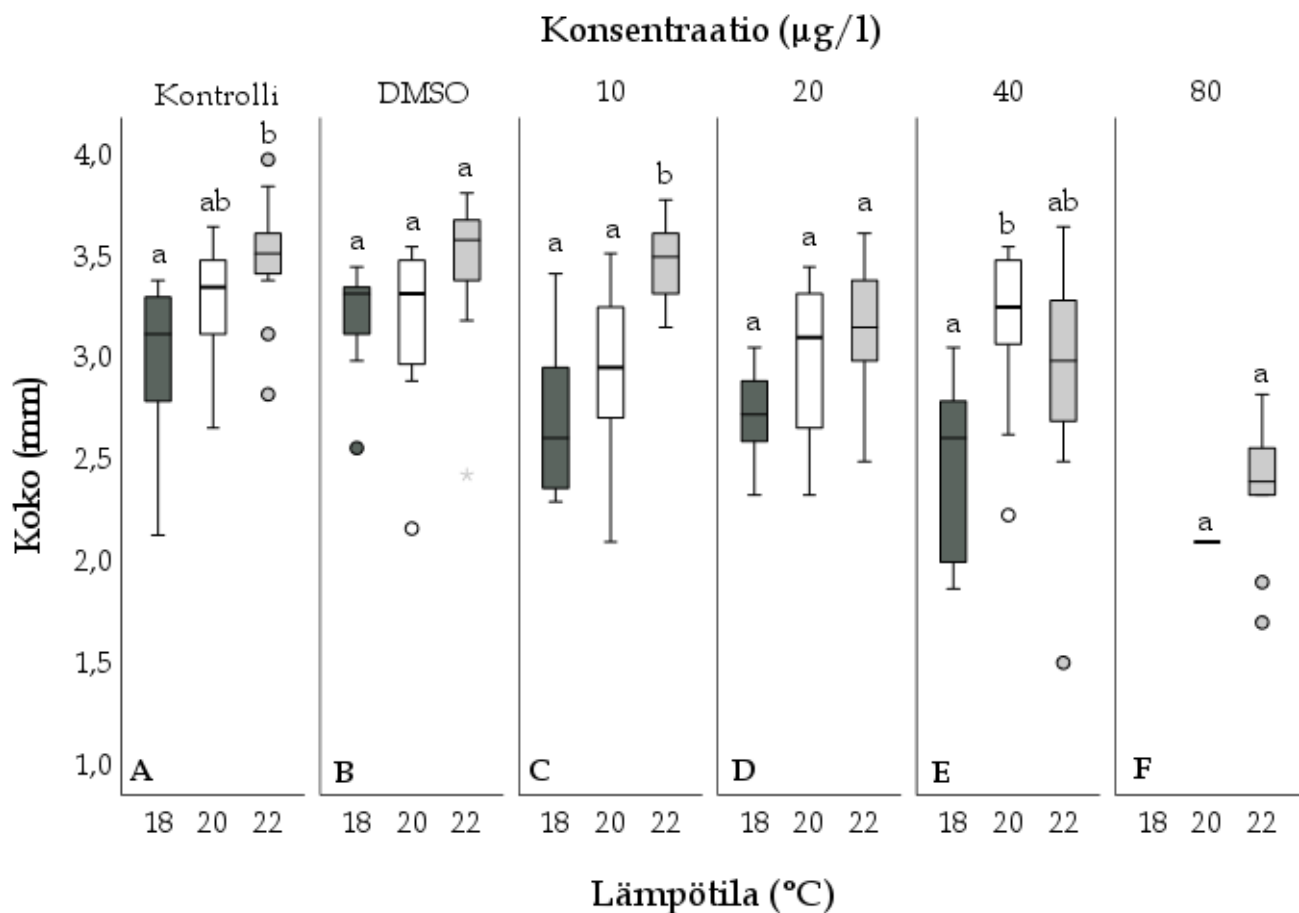
Kuva 13. Vesikirppujen keskimääräinen koko (mm) eri altistuskonsentraatioissa ja lämpötiloissa lisääntymiskokeen lopussa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A (18 °C), B (20 °C) ja C (22 °C), jotka erottavat lämpötilakäsittelyt. Sama kirjain tai symboli (× ja #) tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

Lämpötilan vaikutusta vesikirppujen kasvuun tarkasteltiin jälleen testaamalla jokaista altistuspitoisuutta sekä kontrolleja erikseen. Kontrollikäsittelyssä havaittiin lämpötilakäsittelyjen välillä tilastollisesti merkitsevä ero (1-ANOVA,  $F_{2,28} = 4,87$ ,  $p = 0,015$ ). Parittaisen vertailun perusteella puhdaskontrollivesikirppujen koot erosivat 18 °C ja 22 °C välillä ( $p = 0,011$ ). Liuotinkontrollissa (DMSO) lämpötila ei vaikuttanut vesikirppujen kasvuun (1-ANOVA,  $F_{2,33} = 2,47$ ,  $p = 0,10$ ).

Alimmassa fluoranteenipitoisuudessa, 10 µg/l, lämpötilan noustessa vesikirppujen koko kasvoi (Kruskall-Wallis,  $X^2(2, 31) = 15,76$ ,  $p < 0,001$ ). Parittaisen vertailun



mukaan ero koossa oli suuri 18 °C ja 22 °C välillä ( $p < 0,001$ ). Ero havaittiin myös 20 °C ja 22 °C ( $p = 0,003$ ), mutta ei 18 °C ja 20 °C välillä ( $p = 0,344$ ). Myös 40 µg/l fluoranteenipitoisuudessa altistettujen vesikirppujen koot erosivat eri lämpötilakäsittelyissä (1-ANOVA,  $F_{2,25} = 3,43$ ,  $p = 0,048$ ). Ero havaittiin parittaisen vertailun perusteella 18 °C ja 20 °C lämpötilakäsittelyjen välillä ( $p = 0,038$ ). Muissa fluoranteenipitoisuuksissa lämpötila ei vaikuttanut vesikirppujen kokoon (20 µg/l: 1-ANOVA,  $F_{2,23} = 3,06$ ,  $p = 0,067$  ja 80 µg/l: Kruskal-Wallis,  $X^2(1, 10) = 0,76$ ,  $p = 0,383$ ), (Kuva 14).



Kuva 14. Vesikirppujen keskimääräinen koko (mm) eri lämpötiloissa ja altistuskonsentraatioissa lisääntymiskokeen lopussa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A-F, jotka erottavat altistuskonsentraatiot. Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

### 3.4 Sydämensyke

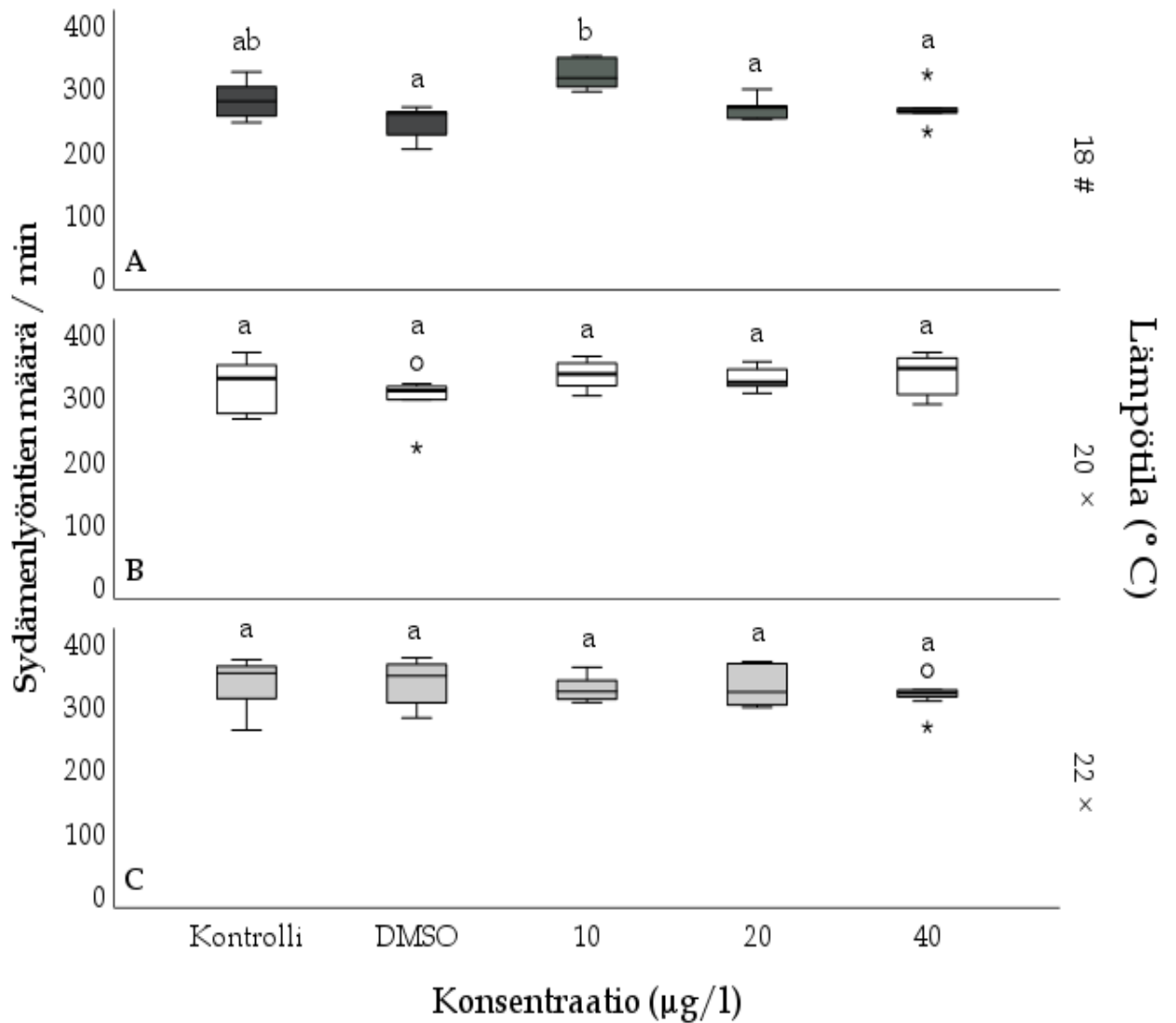
#### 3.4.1 Lisääntymiskokeen syke

Vesikirppujen sydämensyke oli keskimäärin alhaisimmillaan 18 °C:ssa ( $275,3 \pm 34,7$  lyöntiä/min). Nopeinta syke oli lisääntymiskokeen korkeimmassa lämpötilassa ( $327,7 \pm 31,7$ ).

Altistuskonsentraatiolla ja -lämpötilalla ei havaittu yhdysvaikutusta lisääntymiskokeen 11. päivänä kuvattujen vesikirppujen sydämenlyöntien määrään (2-ANOVA,  $F_{8,89} = 1,98$ ,  $p = 0,058$ ). Testin mukaan muuttujilla havaittiin kuitenkin yksin tilastollisesti merkitsevä vaikutus (altistuskonsentraatio  $F_{4,89} = 3,08$ ,  $p = 0,02$  ja altistuslämpötila  $F_{2,89} = 27,73$ ,  $p < 0,001$ ).

Altistuslämpötilan osalta Post-hoc parittaisesta vertailusta (Tukey) havaittiin, että 18 °C erosi tilastollisesti 20 ja 22 °C:sta ( $p < 0,001$ ). 20 ja 22 °C-käsittelyt eivät puolestaan eronneet toisistaan ( $p = 0,713$ ), (Kuva 15). Alimmassa lämpötilassa sydämenlyöntien määrä oli keskimäärin alhaisempi kuin sitä korkeammassa lämpötiloissa. Post-hoc parittainen vertailu altistuskonsentraatioista paljasti tilastollisesti merkitsevän eron DMSO-kontrollin ja pienimmän fluoranteenipitoisuuden, 10 µg/l, välillä ( $p = 0,012$ ). Muut käsittelyt eivät eronneet toisistaan tilastollisesti.

Yksisuuntaisella varianssianalyysillä tarkasteltiin lämpötilakäsittelyjä erikseen. Alimman lämpötilakäsittelyn parittaisessa vertailussa havaittiin, että sydämenlyöntien määrä 10 µg/l fluoranteenipitoisuudessa erosi DMSO-käsittelystä ( $p > 0,001$ ), 20 µg/l pitoisuudesta ( $p = 0,019$ ) sekä 40 µg/l pitoisuudesta ( $p = 0,013$ ), (Kuva 15 A). Pienimmässä pitoisuudessa sydämensykkeen nopeus oli keskimäärin korkeampi. Muissa lämpötiloissa ei havaittu eroja sydämenlyöntien määrässä (Kuva 15 B ja C).



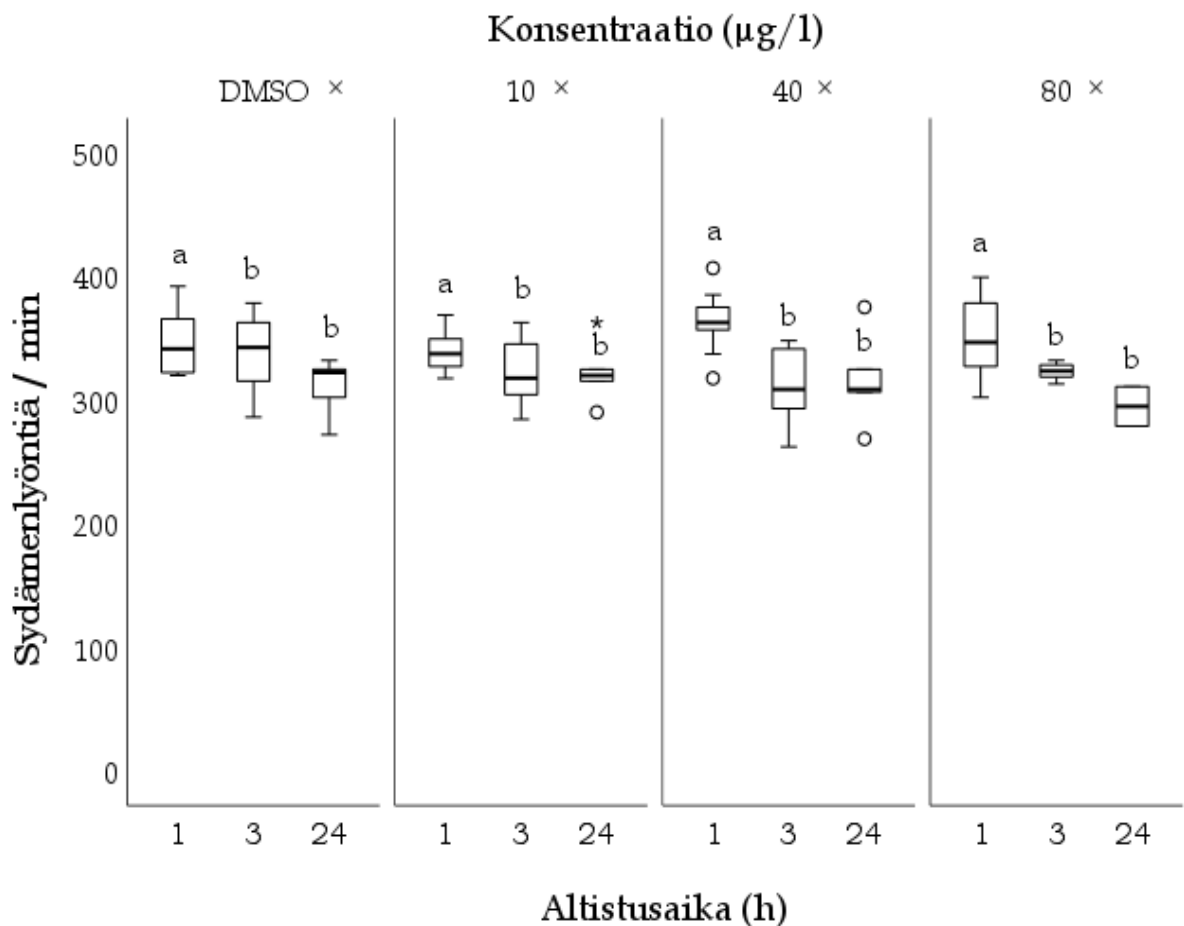
Kuva 15. Vesikirppujen sydämenlyöntien määrä minuuttia kohden lisääntymiskokeen 11. päivänä eri käsittelyissä ja lämpötiloissa. Kuvapaneeli on jaettu kuviin A (18 °C), B (20 °C) ja C (22 °C), jotka erottavat lämpötilakäsittelyt. Sama kirjain tai symboli (× ja #) tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

### 3.4.2 Akuutti sykekoe

Vesikirppujen sydämensyke oli keskimäärin nopeinta tunnin kuluttua altistuksen aloittamisesta ( $350,2 \pm 27,0$  lyöntiä/min). Kolmen tunnin kuluttua sydän löi keskimäärin  $323,1 \pm 25,8$  kertaa minuutissa. Hitainta sydämensyke oli 24 tunnin kuluttua ( $314,0 \pm 28,2$ ).

Tunnin kestäneellä fluoranteenialtistuksella ei ollut vaikutusta sydämenlyönteeseen (1-ANOVA,  $F_{3,34} = 1,37$ ,  $p = 0,269$ ). Kolmen tunnin fluoranteenialtistuksella ei havaittu vaikutusta Kruskal-Wallis- testillä ( $X^2(3, 38) = 3,29$ ,  $p = 0,350$ ). Myöskään 24 tunnin fluoranteenialtistuksella ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja sykkeeseen käsittelyjen välillä (1-ANOVA,  $F_{3,13} = 0,46$ ,  $p = 0,725$ ).

Yksisuuntaisella toistettujen mittausten varianssianalyysillä tarkasteltiin koko akuutin kokeen dataa, jolloin Post-hoc testinä käytettiin Bonferronin testiä ( $n = 93$ ). Altistuskonsentraatiolla ei havaittu vaikutusta sydämenlyönteeseen (*Wilksin Lambda*,  $F_{3,81} = 0,396$ ,  $p = 0,756$ , osittainen  $\eta^2 = 0,014$ ). Altistusajalla puolestaan havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero ( $F_{2,81} = 14,61$ ,  $p = 0,001$ , osittainen  $\eta^2 = 0,265$ ), eli sykkeet poikkesivat mittauskertojen välillä toisistaan (Kuva 16). Osittaisen  $\eta^2$  perusteella ero oli suuri.

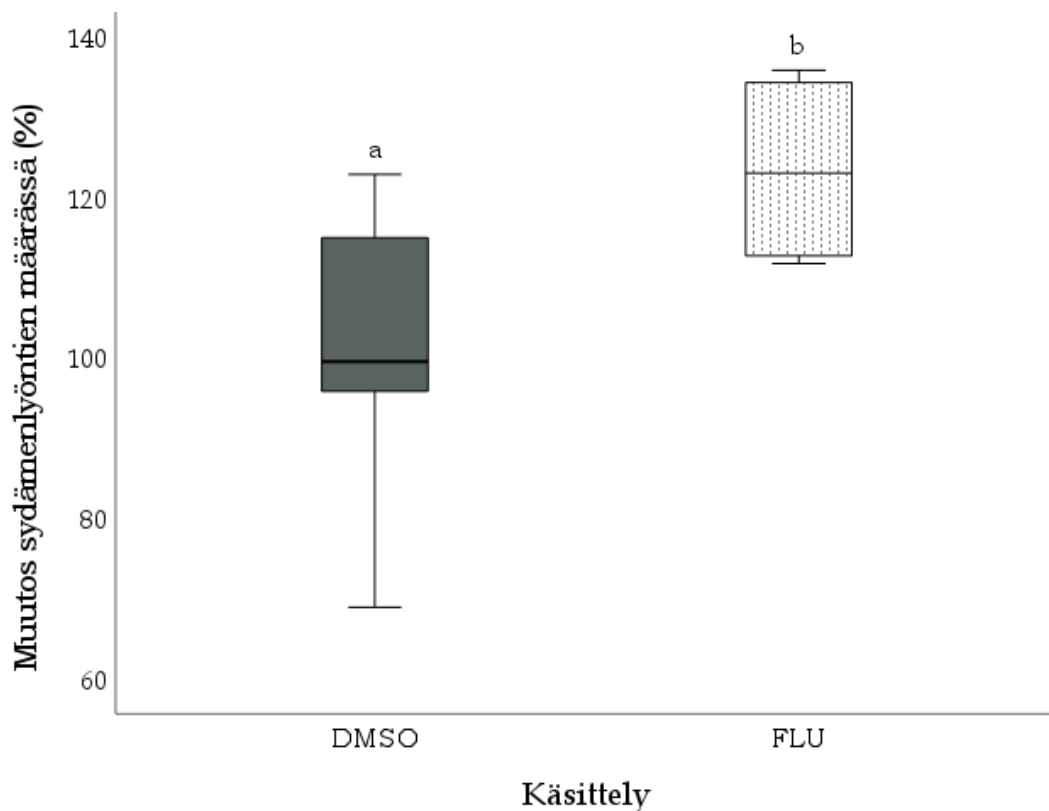


Kuva 16. Vesikirppujen sydämenlyöntien määrä minuuttia kohden 1,3 ja 24 tunnin kuluttua altistuksesta eri fluoranteenipitoisuuksille. Sama kirjain tai symboli (×) tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia, ja tähtisymboli äärimmäisen poikkeavia havaintoja.

Bonferronin testin parittaisen vertailun mukaan tunnin altistus erosi tilastollisesti merkitsevästi kolmen ja 24 tunnin altistuksesta ( $p < 0,001$ ) sydämenlyöntien määrässä. Tunnin altistuksessa sydämenlyöntitiheys oli keskimäärin nopeampi kuin myöhemmissä mittauskerroissa. Kolmen ja 24 tunnin altistusmittaukset eivät puolestaan eronneet toisistaan ( $p = 0,723$ ). Kaksisuuntaisella varianssianalyysillä altistuskonsentraation ja -ajan yhdysvaikutuksella ei havaittu tilastollisesti merkitsevää vaikutusta sydämen sykkeeseen ( $F_{6,81} = 1,55, p = 0,171$ ).

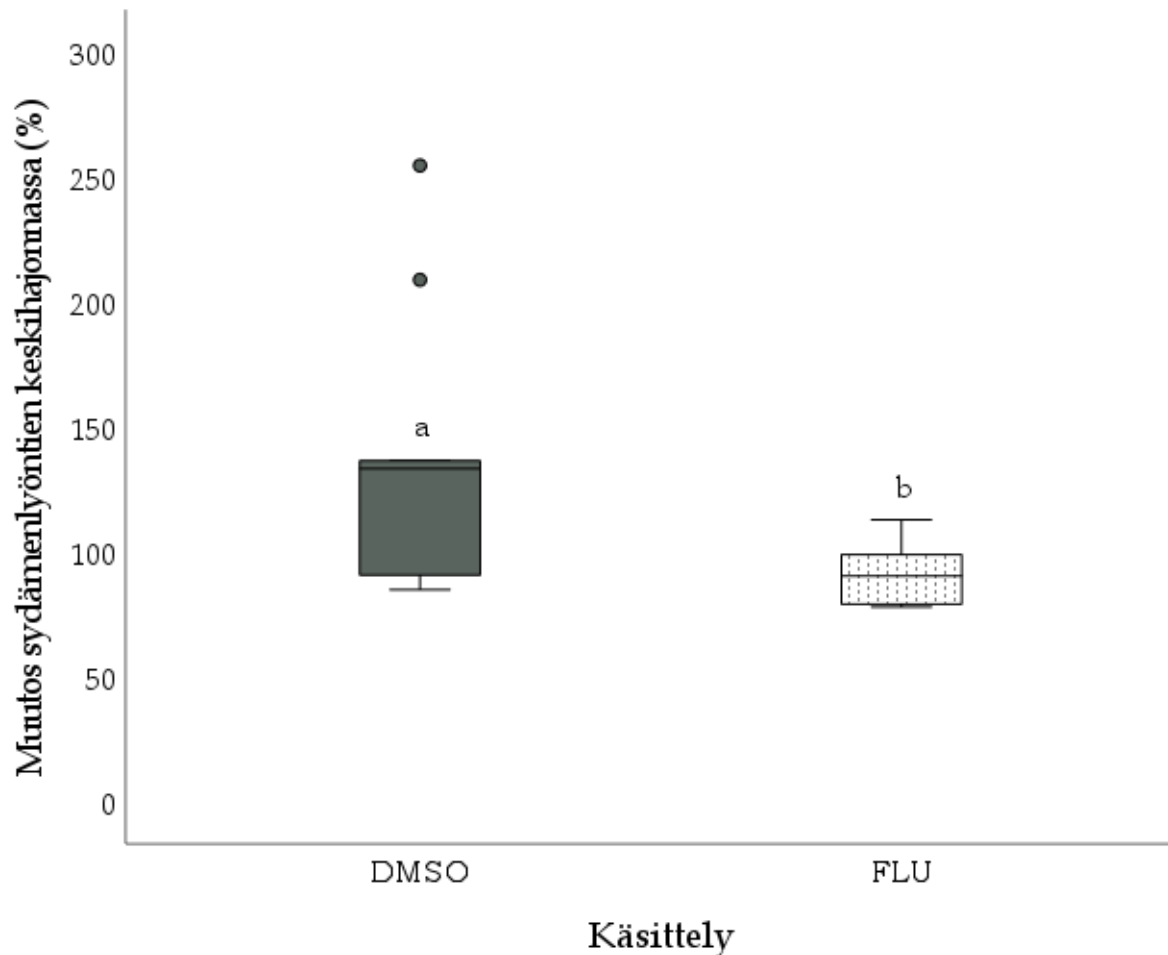
### 3.4.3 Välittömän vaikutuksen sykekoe

Vesikirppujen sydämensyke kiihtyi 15 sekunnin DMSO-altistuksen jälkeen vain hiukan ( $2,1 \pm 15,7 \%$ ). Fluoranteenialtistuksessa sydämenlyöntien määrä kasvoi puolestaan enemmän ( $23,3 \pm 11,0 \%$ ). Vesikirppujen sydämenlyöntien prosentuaalinen muutos 15 sekunnin altistuksen jälkeen erosi merkitsevästi DMSO- ja fluoranteenikäsittelyjen välillä (Kruskall-Wallis,  $X^2(1, 16) = 5,69, p = 0,017$ ), (Kuva 17).



Kuva 17. Prosentuaalinen muutos vesikirppujen sydämenlyöntien määrässä 15 sekunnin DMSO- ja fluoranteenialtistuksen jälkeen. Fluoranteenipitoisuus oli  $80 \mu\text{g/l}$ . Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa.

Fluoranteenialtistus lisäsi sydämenlyöntien määrää. Kun verrattiin prosentuaalista muutosta käsittelyjen sydämenlyöntien keskihajonnassa (ennen altistusta ja 15 sekuntia altistuksen jälkeen) havaittiin, että ne erosivat merkitsevästi ( $X^2(1, 16) = 4,71, p = 0,030$ ), eli sydämenlyöntien määrässä havaittiin epätasaisuutta (Kuva 18).

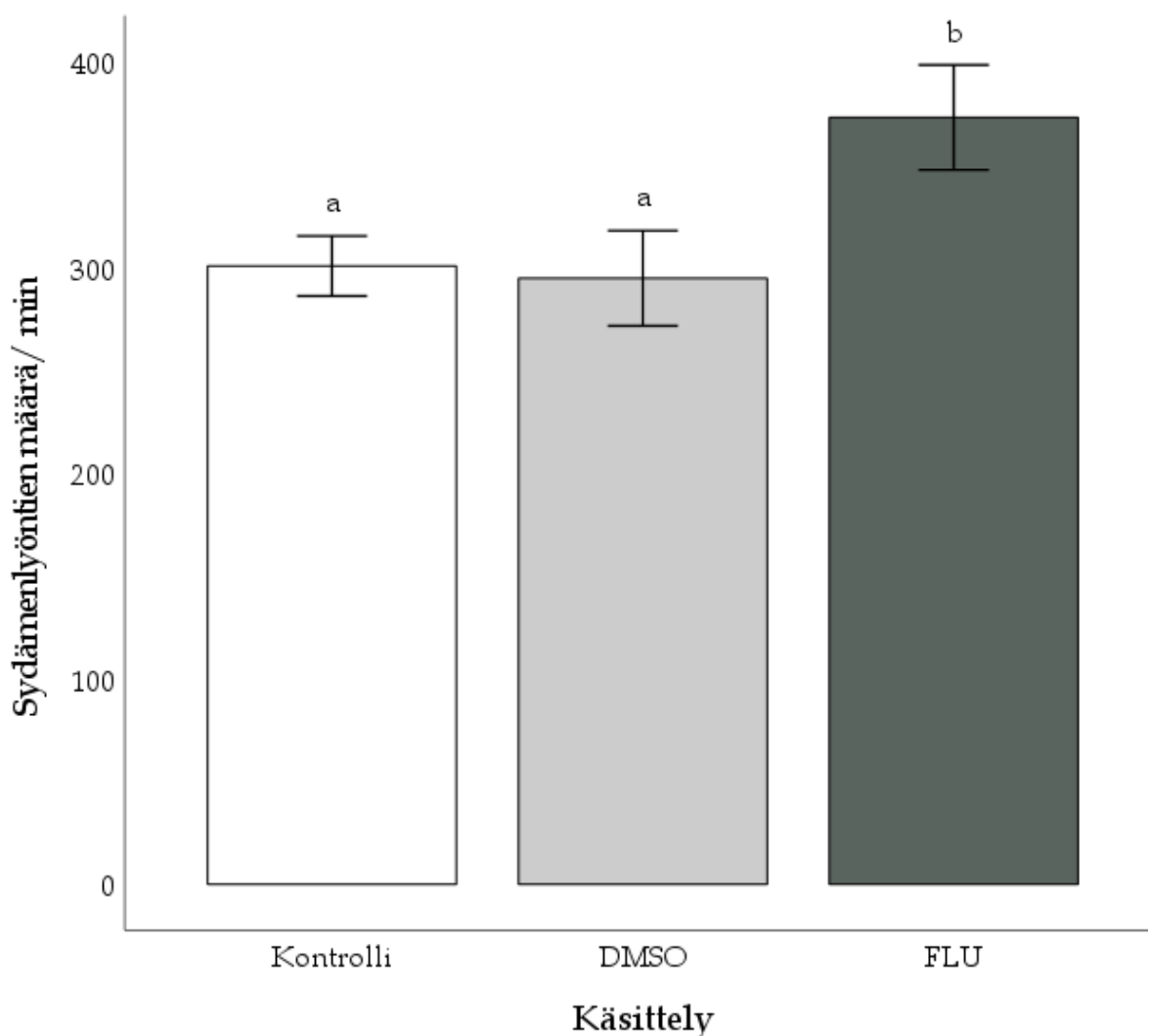


Kuva 18. Prosentuaalinen muutos vesikirppujen sydämenlyöntien keskihajonnassa 15 sekunnin DMSO- ja fluoranteenialtistuksen jälkeen. Fluoranteenipitoisuus oli  $80 \mu\text{g/l}$ . Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia havaintoja.

T-testillä arvioitiin käsittelyn ja kontrollin välillä mahdollisesti esiintyviä eroja. DMSO-käsittelyssä keskimääräinen ero sykkeessä oli pieni (ennen altistusta  $M = 298,15, sd = 29,52$  ja altistuksen jälkeen  $M = 294,60, sd = 30,01$ ).

T-testin perusteella sykkeessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa kontrollin ja DMSO-altistuksen välillä ( $t = 0,253$ ,  $df = 16$ , ja  $p = 0,804$ , 95 % CI [-26,23, 33,33]).

Keskimääräinen ero kontrolli- ja fluoranteenikäsittelyllä oli kohtalainen (ennen altistusta  $M = 303,57$ ,  $sd = 26,49$  ja altistuksen jälkeen  $M = 372,74$ ,  $sd = 27,58$ ). Verrattaessa T-testillä sydämenlyöntien määrää ennen fluoranteenialtistusta ja sykkettä altistuksen jälkeen, havaittiin, että fluoranteenialtistus lisäsi sykkeen nopeutta ( $t = -4,785$ ,  $df = 12$ , ja  $p < 0,001$ , 95 % CI [-100,66, -37,66]), (Kuva 19).



Kuva 19. Vesikirppujen sydämenlyöntien määrä minuutissa kontrollikäsittelyssä ja 15 sekunnin DMSO- tai fluoranteenialtistuksen jälkeen. Sama kirjain tarkoittaa, ettei käsittelyiden välillä ole tilastollista eroa.

#### 4 TULOSTEN TARKASTELU

Tämä tutkimus osoitti, että fluoranteenialtistus vaikutti haitallisesti *Daphnia magna* -lajin yksilöiden kasvuun, lisääntymiseen ja sydämensykkeeseen, joten nollahypoteesi kumoutui ja vastahypoteesi jäi voimaan. Altistuslämpötilalla oli myös vaikutusta, erityisesti poikastuotannon aloituksen, poikasten määrän ja vesikirppujen kasvun suhteen. Suurimmat erot havaittiin yleensä 18 ja 22 °C lämpötilakäsittelyjen välillä. Kokeen korkein lämpötila vaikutti olevan kasvun ja lisääntymisen kannalta suotuisin lämpötila juuri tämän kannan vesikirpuille. Lagerspetz (2000) on osoittanut, että *Daphnia magna*-laji sietää jopa 13–25 °C lämpötilaskaalaa, joten on huomionarvoista, että vain muutamalla asteen lämpötilaerolla oli vaikutusta vesikirppujen lisääntymiseen ja kasvuun.

Yksi tutkimushypoteesi oli, että lämpötilan nousu vaikuttaa fluoranteenin toksisuuteen sitä vahvistavasti. Kun tarkasteltiin kuolleisuutta, vaikutti tilanne kuitenkin päinvastaiselta, sillä alimmassa lämpötilassa havaittiin eniten kuolleisuutta. Poikasten siirtäminen uuteen lämpötilaan 20 °C:een lämpötilasta kokeen alussa saattoi aiheuttaa niille stressiä, mikä voisi osaltaan selittää ensimmäisen viikon kuolleisuutta. Tässä tutkimuksessa lämpötilaskaala pysytteli kuitenkin vesikirppujen optimilämpötila-alueella, joten lisätutkimukselle on tarvetta korkeammassa lämpötiloissa.

Lämpötilan ja fluoranteenin toksisuuspotentiaalinen yhteys oli yhtenä tutkimuskysymyksenä. Lämpötilan voisi sanoa vaikuttavan fluoranteenialtistuksen toksisuuspotentiaaliin, sillä tämän tutkimuksen perusteella alemmassa lämpötilassa vesikirput olivat herkempiä fluoranteenille, mikä näkyi suurempana kuolleisuutena. Tutkimus löysi lisäksi lämpötilan ja fluoranteenipitoisuuden yhdysvaikutuksia liittyen vesikirppujen kasvuun ja poikastuotannon aloitusajankohtaan, mikä osoittaa yhteyden näiden kahden muuttujan välillä. Kohotetun lämpötilan on havaittu vaikuttavan esimerkiksi eräiden lääkeaineiden akuuttiin toksisuuteen vesikirpuille sitä vahvistaen (Kim ym. 2010). Myös pyreenin toksisuuden on havaittu kasvavan lämpötilan noustessa liuenneen orgaanisen aineksen läsnä ollessa (Zhang ym. 2020). *Daphnia magna*-lajin suodatuskapasiteetin



on puolestaan havaittu heikentyvän äkillisissä lämpötilan muutoksissa ja tämä negatiivinen vaikutus on erityisen vahva silloin, kun eliö elää lämpimimmissä olosuhteissa. Vesikirput kuitenkin sopeutuvat uusiin lämpötiloihin (11–25 °C) noin viikossa (Müller ym. 2018). Näin ollen lämpötilan yhteys eliön metaboliaan ja elintoimintoihin on kiistaton, mutta yhteys haitta-aineisiin vaatii vielä lisäselvityksiä.

Fluoranteenin akuutin toksisuuden 48 tunnin EC<sub>50</sub>-arvo (330,5 µg/l) osoittautui keskimääräiseksi kirjallisuuteen verrattuna. Luottamusväli oli kuitenkin suuri, minkä vuoksi konsentraatioita olisi syytä valita enemmän luotettavamman EC<sub>50</sub>-arvon selvittämiseksi. Lisääntymiskokeen konsentraatioihin verrattuna akuutin toksisuuden arvo oli kuitenkin melko suuri, sillä lisääntymiskokeessa kuolleisuus oli suurta kokeen alussa jo 80 µg/l fluoranteenipitoisuudessa. Muissa tutkimuksissa fluoranteenin 24 tunnin EC<sub>50</sub>-arvoksi *Daphnia magna* -lajille on saatu muun muassa 0,19 ja 780 µg/l (Wernersson ja Dave 1998, Šepič ym. 2013). Siten fluoranteenin toksisuus vesikirpuille vaihtelee, mutta pienikin pitoisuus voi olla haitallinen etenkin kehitysvaiheessa oleville poikasille.

Muita PAH-yhdisteitä tarkasteltaessa on havaittu aromaattisten renkaiden määrän lisäävän yhdisteen toksisuutta. Ha ym. (2019) testasivat eri PAH-yhdisteiden akuuttia toksisuutta *Daphnia magna* -lajille. EC<sub>50</sub>-arvoiksi (24 h) saatiin: tolueenille 8125 µg/l, naftaleenille 7924,5 µg/l, fluoreenille 1347,9 µg/l, fenantreenille 457,6 µg/l ja pyreenille 57,7 µg/l. Fluoranteeni onkin moneen muuhun PAH-yhdisteeseen verrattuna hyvin myrkyllinen. Ha ym. (2019) mukaan PAH-yhdisteiden myrkyllisyys usein aliarvioidaan, mikäli kokeet ovat lyhytkestoisia, sillä tällöin hydrofobisilla PAH-yhdisteellä ei ole tarpeeksi aikaa kertyä eliöön.

Fluoranteenialtistuksella havaittiin selvä vaikutus vesikirppujen kasvuun; mitä suurempi fluoranteenipitoisuus, sen pienemmiksi vesikirput jäivät. Olmstead ja LeBlanc (2005) havaitsivat tutkimuksessaan samanlaisen trendin: fluoranteenialtistus hidasti *Daphnia magna*-lajin yksilöiden kasvunopeutta altistuspitoisuuden ollessa 10–100 µg/l, jolloin pitoisuuden kasvaessa kasvunopeus heikkeni. Tässä tutkimuksessa lämpötilan vaikutus vesikirppujen kasvuun oli myös

merkittävä, sillä selvä ero havaittiin 18 ja 22 °C välillä useissa eri altistuskäsittelyissä, myös puhdaskontrollissa. Tätä tukee ns. lämpötila-koko sääntö, jonka mukaan ektotermiset eliöt kasvavat hitaammin alhaisemmissa lämpötiloissa, mutta kypsyessään ne saavuttavat suuremmalla ruumiinkoon (Atkinson 1995). Alemmassa lämpötilassa olevat yksilöt voivat saavuttaa suhteellisen suuren ruumiinkoon pidentämällä kasvua ja viivästyttämällä lisääntymistä (Angilletta ym. 2004). Tämän tutkimuksen tulokset osittain tukevat tätä teoriaa, sillä kokeen alimmassa lämpötilassa vesikirppujen lisääntyminen alkoi keskimäärin hiukan myöhemmin kuin korkeimmassa lämpötilassa. Alimman lämpötilan yksilöt vaikuttivat kypsyvän hitaammin, joten on mahdollista, että suurempi ruumiinkoko olisi voitu saavuttaa, mikäli koe olisi kestänyt pidempään.

Lämpötilan kasvaessa myös vesikirppujen tuottamien poikasten kokonaismäärä kasvoi ja poikastuotanto alkoi aiemmin. Fluoranteenialtistus puolestaan vähensi poikasten määrää ja viivästytti poikastuotannon aloittamista. Aiempien tutkimusten perusteella tämä ei ollut yllättävää, sillä PAH-yhdisteiden ja sitä sisältävien ainesosien on havaittu heikentävän vesikirppujen lisääntymistä ja viivästyttävän poikastuotannon aloittamista (Feldmannova ym. 2006, Blewett ym. 2017). Finger ym. (1985) tutkimuksessa fluoreenilla (0,125 µg/l) altistettujen vesikirppujen poikastuotanto oli kokeen 14. päivänä 44 % alhaisempaa kuin kontrollikäsittelyssä.

Wan ym. (2021) toteuttamassa tutkimuksessa lisääntymiskokeen kontrollissa ensimmäiset vesikirppujen poikaset ilmaantuivat  $6,30 \pm 0,19$  päivää kokeen aloittamisesta, mihin verrattuna poikastuotannon aloitus viivästyti käsittelyssä ( $6,94 \pm 0,11$  päivää), jossa vesikirppuja altistettiin seokselle, joka sisälsi syanobakteerien tuottamaa mikrokystiini-LR:ää (1250 µg/l) ja fenantreenia (PAH-yhdiste, pitoisuus 50 µg/l). Jos verrataan tämän tutkimuksen tuloksia Wan ym. (2021) tuloksiin, alkoi poikastuotanto paljon myöhemmin myös kontrolleissa, sillä ensimmäiset poikaset havaittiin vasta 9. päivänä. Wan ym. (2021) kokeessa lämpötila oli 25 °C, mikä voi vaikuttaa tähän eroon, sillä tässä tutkimuksessa havaittiin, että korkeammassa lämpötilassa ensimmäiset poikaset syntyivät aiemmin.

Finger ym. (1985) lisääntymiskokeen lopussa fluoreenilla altistetut emot olivat tuottaneet keskimäärin 60,6 poikasta, kun taas kontrollissa poikasmäärä oli keskimäärin 76,6 kpl, eli fluoreeni ei vähentänyt kumulatiivista poikasmäärää. Wan ym. (2021) tutkimuksessa kontrolliyksilöiden kumulatiivinen poikastuotanto 21 vuorokauden aikana oli noin 125 poikasta per emo ja mikrokystiini-LR-fenantreeniseos ( $\geq 250 + 10 \mu\text{g}/\text{l}$ ) laski poikastuotantoa merkittävästi (noin 70 poikasta per emo). Fluoranteeni vaikuttaisi kuitenkin olevan haitallisempi kuin fluoreeni ja fenantreeniseos, sillä se viivytti poikastuotannon aloitusta jopa usealla päivällä ja vähensi poikasmäärää jo pienillä pitoisuuksilla.

Fluoranteenilla havaittiin välitön vaikutus vesikirppujen sydämensykkeeseen 15 sekunnin altistuksen jälkeen. Sydämenlyöntien keskihajonnat fluoranteeni- ja DMSO-altistusten välillä erosivat toisistaan, mikä voi puolestaan viestiä rytmihäiriöistä. Muun muassa kalan alkioilla on havaittu epäsäännöllisiä rytmihäiriöitä, kun ne ovat altistuneet PAH-yhdisteitä sisältävälle raakaöljylle (Incardona ym. 2014).

Välittömän vaikutuksen tulosta tukivat eri aikapisteinä tehdyn sykekokkeen tulokset. Tunnin kestänyt mittauskerta erosi kolmen ja 24 tunnin mittauskerroista, sillä tunnin altistuksen jälkeen syke oli hiukan korkeampi. Vesikirppu saattoi kokea stressireaktion, mutta sopeutui muuttuneisiin olosuhteisiin tuntien kuluessa. Lisääntymiskokeen 11. päivänä mitatuista sykkeistä ei myöskään havaittu merkittävää korrelaatiota fluoranteenialtistuksen ja sykkeen välillä, mikä tukee päätelmää sopeutumisesta fluoranteenialtistukseen. Alimmassa testilämpötilassa syke oli keskimäärin alhaisempi kuin korkeammassa lämpötiloissa. Ebert (2005) mukaan vesikirppujen sydämensyke hidastuu lämpötilan laskiessa, joten tulos oli looginen. Kontrollikäsittelyjen keskimääräinen syke 20 °C lämpötilassa (noin 320 lyöntiä/min) ei eronnut suuresti aiemmin mainitusta keskimääräisestä 200 lyönnistä minuutissa. Vaihtelu yksilöiden sykkeissä voi nimittäin olla suurta, kuten Corotto ym. (2010) havaitsivat kokeessaan, jossa vesikirppujen sydämensyke ( $n = 72$ ) vaihteli välillä 91–521 lyöntiä/minuutti.

PAH-yhdisteiden vaikutuksia sydämensykkeeseen on selvitetty muun muassa simpukoilla. Puhtaalta ja saastuneelta paikalta kerätyt sinisimpukat (*Mytilus edulis* L.) altistettiin bentso(a)pyreenille (100 µg/l) kolmen tunnin ajan. Vain saastuneelta paikalta kerättyjen sinisimpukoiden sydämensyke kohosi altistuksen aikana. Akuutti vaste viesti fysiologista sopeutumista saastuneeseen ympäristöön (Halldórsson ym. 2008). Kohonnut sydämensyke välittömän vaikutuksen kokeessa voisi siten olla vesikirpulle hyödyllinen stressireaktio, joka auttoi sietämään haitta-ainetta. Päätelmä on looginen tunnin kohonneen syketuloksen ja kolmen ja 24 tunnin tasaantuneen sykkeen tuloksen kanssa.

Tutkimustulosten luotettavuuteen vaikuttivat muun muassa mahdolliset virheet mittaustarkkuuksissa ja poikasten laskennassa. Kokeen ensimmäisenä vesienvaihtopäivänä havaittiin, että yhdessä putkessa oli kaksi kirppua, joista toinen oli kuollut ja se poistettiin (käsittely: 20 °C, fluoranteenipitoisuus 20 µg/l, replikaatti kolme). Kyseinen yksilö ei kuitenkaan selvinnyt kokeen loppuun, eli valinnalla ei ollut merkittävää vaikutusta tuloksiin. Vesikirppujen käsittelyllä saattoi olla vaikutusta niiden kasvuun ja kuolleisuuteen. Merkittävä kuolleisuusprosentti vaikutti osaltaan tuloksiin pienentämällä otosta. Myös sydämenlyöntien erottaminen oli ajoittain hankalaa, millä on vaikutusta tuloksiin. Jatkotutkimuksissa olisi syytä käyttää hiukan suurempia vesikirppuja, noin kahden viikon ikäisiä, jotta sydämenlyönnit olisivat paremmin erotettavissa.

OECD:n lisääntymiskokeen standardin mukaan koe on luotettava, mikäli kontrolliemojen kuolleisuus ei ylitä 20 % ja emot tuottavat kokeen lopussa keskimäärin 60 poikasta. Koetilan lämpötila ei saa muuttua kokeen aikana yli kahta astetta. Tässä kokeessa lämpötila pysyi tasaisena. Kokeen lopussa ainoastaan korkeimmassa lämpötilassa emot ylsivät 60 poikasen poikueisiin, mistä voidaan päätellä, että kyseinen kanta pärjää paremmin hiukan korkeammassa lämpötilassa ja jatkokokeet olisi myös syytä suorittaa 22 °C lämpötilassa 20 °C sijaan. Poikueita alettiin tuottaa korkeimmassa lämpötilassa keskimäärin aiemmin, minkä vuoksi myös poikuekoko oli suurimmillaan korkeimmassa lämpötilassa. Esikokeeseen verrattuna vesikirppujen kehitys vaikutti viivästyneeltä, minkä vuoksi

tavoitepoikuekokoa ei saavutettu. Tähän saattoi vaikuttaa lämpötilan muutos tai yksinkertaisesti sattuma.

Kaiken kaikkiaan korkein lämpötila vaikutti jopa suojaavan vesikirppuja fluoranteenin haittavaikutuksilta, päinvastoin kuin oletettiin. On mahdollista, että kyseiselle kannalle korkein lämpötila oli suotuisin, mikä auttoi kestäämään fluoranteenia paremmin. Patra ym. (2015) havaitsivat tutkimuksessaan, että lämpimän veden kalalajeilla endosulfaani oli myrkyllisintä noin 30 °C:ssa, jonka jälkeen myrkyllisyys laski lämpötilan ollessa 35 °C. Lämmön nousu ei siten ole suoraan verrannollinen myrkyllisyyden kanssa, vaan myrkyllisyyteen vaikuttavat monet muutkin tekijät. Lajin sopeutumisen kannalta globaali lämmön nousu voi tarjota hetkellisiä hyötyjä, mikäli laji sietää tai suosii korkeampia lämpötiloja, mutta sopeutuminen lämpötilan vaihteluihin voi kuitenkin osoittautua ongelmalliseksi.

Kun tarkastellaan ekosysteemiä laajemmin, voi nouseva lämpötila olla merkittävä tekijä paitsi yksittäisen lajin menestymisen kannalta, mutta myös biologisten vuorovaikutusten valossa. Korkeassa lämpötilassa (25 °C) planktonpopulaatioon kohdistuvan saalistuspaineen on havaittu kasvavan, mikä vaikuttaa negatiivisesti populaatiokokoon (Beisner ym. 1997). Vesikirpuille myrkyllinen syanobakteeri puolestaan menestyy lämpimissä vesissä ja heikentää vesikirppujen kasvua ja lisääntymistä (Paerl ja Huisman 2008, Dao ym. 2010). Lisäksi vesikirppujen herkkyyden syanobakteereille ja niiden toksiinille on havaittu kasvavan merkittävästi lämpötilan noustessa (Claska ja Gilbert 1998). Kasvihuonekaasupäästöjen aiheuttaman otsonikerroksen palautumisen hidastuminen puolestaan altistaa eliöitä haitalliselle UV-säteilylle, mikä voi vahvistaa haitta-aineiden, kuten fluoranteenin, toksisuutta (Shindell ym. 1998, Huovinen ym. 2001).

Ympäristön lämpötilan nousu muuttaa ympäristöolosuhteita, mikä vaikuttaa eliön kykyyn sopeutua ympäristössä esiintyviin haitta-aineisiin. Esimerkiksi tässä tutkimuksessa havaitut muutokset kasvussa ja poikastuotannossa vaikuttavat myös yksilön kelpoisuuteen ja voivat aiheuttaa muutoksia pitkällä aikavälillä koko populaatioon. Ilmaston lämpenemisen aiheuttamat takaisinkytkennät, kuten

rehevöityminen ja otsonikerroksen hidastunut palautuminen muokkaavat yksittäisen haitta-aineen lisäksi vesiekosysteemien toimintaa ja mutkistavat entisestään vaikutusten arviointia. Tämä luo tarpeen laajemmille tutkimuksille, jotta voimme ymmärtää paremmin lämmön nousun vaikutuksia vesiekosysteemeihin ja selvittää mekanismin, joka muuttaa eliön herkkyyttä haitta-aineille lämpötilan muuttuessa.

## **KIITOKSET**

Haluan kiittää ohjaajiani Eeva-Riikka Vehniäistä ja Minna Hiltusta kaikesta avustuksesta ja ohjauksesta tämän pro gradu- tutkielman teon parissa.

## KIRJALLISUUS

- Abdel-Shafy H. I., & Mansour M. S. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petro.* 25: 107-123.
- Angilletta Jr M. J., Steury T. D., & Sears M. W. 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44: 498-509.
- Atkinson D. 1995. Effects of temperature on the size of aquatic ectotherms: Exceptions to the general rule. *J. Therm. Biol.* 20: 61-74.
- Baek S., Field R., Goldstone M., Kirk P., Lester J. & Perry R. 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water air soil poll.* 60: 279-300.
- Beisner B. E., McCauley E., & Wrona F. J. 1997. The influence of temperature and food chain length on plankton predator prey dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 586-595.
- Birch H., Mayer P., Lützhøft H. C. H., & Mikkelsen P. S. 2012. Partitioning of fluoranthene between free and bound forms in stormwater runoff and other urban discharges using passive dosing. *Water res.* 46: 6002-6012.
- Blewett T. A., Delompré P. L., He Y., Folkerts E. J., Flynn S. L., Alessi D. S., & Goss G. G. 2017. Sublethal and reproductive effects of acute and chronic exposure to flowback and produced water from hydraulic fracturing on the water flea *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 51: 3032-3039.
- Boehm P.D., Page D.S., Gilfillan E.S., Bence A.E., Burns W.A. & Mankiewicz P.J. 1998. Study of the Fates and Effects of the Exxon Valdez Oil Spill on Benthic Sediments in Two Bays in Prince William Sound, Alaska. 1. Study Design, Chemistry, and Source Fingerprinting. *Environ. Sci. Technol.* 32: 567-576.
- Bumpus J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.* 55: 154-158.
- Claska M. E., & Gilbert J. J. 1998. The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biol.* 39: 221-232.
- Clement B., Muller C., & Verrhiest G. 2000. Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (cladocera). *Polycycl. Aromat. Comp.* 20: 259-274.
- Corotto F., Ceballos D., Lee A., & Vinson L. 2010. Making the most of the *Daphnia* heart rate lab: optimizing the use of ethanol, nicotine & caffeine. *Am. Biol. Teach.* 72: 176-179.
- Dao T.S., Do-Hong L.-C. & Wiegand C. 2010. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon.* 55: 1244-1254.

- Douben P. E. 2003. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. John Wiley & Sons, Inc, Bedford.
- Ebert D. 2005. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. Bethesda, US.
- Feldmannova M., Hilscherová K., Maršálek B., & Bláha L. 2006. Effects of N-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons on survival, reproduction, and biochemical parameters in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.* 21: 425-431.
- Finger S. E., Little E. F., Henry M. G., Fairchild J. F. & Boyle T. P. 1985. Comparison of laboratory and field assessment of fluorene-Part I: effects of fluorene on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. In: Boyle T. P (ed.), *Validation and predictability of laboratory methods for assessing the fate and effects of contaminants in aquatic ecosystems*, ASTM, Philadelphia. pp. 120-133.
- Goss L. B. & Bunting D. L. 1983. *Daphnia* development and reproduction: responses to temperature. *J. Therm. Biol.* 8: 375-380.
- Gyllström M., Hansson L. A., Jeppesen E., Criado F. G., Gross E., Irvine K., ... & Moss B. 2005. The role of climate in shaping zooplankton communities of shallow lakes. *Limnol. Oceanogr.* 50: 2008-2021.
- Ha H., Park K., Kang G. & Lee S. 2019. QSAR study using acute toxicity of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* through exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology.* 28: 333-342.
- Halldórsson H.P., De Pirro M., Romano C., Svavarsson J. & Sarà G. 2008. Immediate biomarker responses to benzo[a]pyrene in polluted and unpolluted populations of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) at high-latitudes. *Environ. Int.* 34: 483-489.
- Huovinen P. S., Soimasuo M. R., & Oikari A. O. J. 2001. Photoinduced toxicity of retene to *Daphnia magna* under enhanced UV-B radiation. *Chemosphere.* 45: 683-691.
- Incardona J.P. 2017. Molecular Mechanisms of Crude Oil Developmental Toxicity in Fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73: 19-32.
- Incardona J.P., Gardner L.D., Linbo T.L., Brown T.L., Esbaugh A.J., Mager E.M., Stieglitz J.D., French B.L., Labenia J.S., Laetz C.A., Tagal M., Sloan C.A., Elizur A., Benetti D.D., Grosell M., Block B.A. & Scholz N.L. 2014. Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *P. Natl. A. Sci.* 111: E1510-E1518.
- Kim M., Hong S.H., Won J., Yim U.H., Jung J.-H., Ha S.Y., An J.G., Joo C., Kim E., Han G.M., Baek S., Choi H.-W. & Shim W.J. 2013. Petroleum hydrocarbon contaminations in the intertidal seawater after the Hebei Spirit oil spill – Effect of tidal cycle on the TPH concentrations and the chromatographic characterization of seawater extracts. *Water res.* 47: 758-768.
- Kim J., Park J., Kim P.-G., Lee C., Choi K. & Choi K. 2010. Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH,



- and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. 19: 662–669.
- Kim M., Yim U.H., Hong S.H., Jung J.-H., Choi H.-W., An J., Won J. & Shim W.J. 2010. Hebei Spirit oil spill monitored on site by fluorometric detection of residual oil in coastal waters off Taean, Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 383–389.
- Klüttgen B., Dülmer U., Engels M., & Ratte H. T. 1994. ADaM, an artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Water res.* 28: 743-746.
- Lagerspetz K. Y. 2000. Thermal avoidance and preference in *Daphnia magna*. *J. Therm. Biol.* 25: 405-410.
- Lakshman M.K., Kole P.L., Chaturvedi S., Saugier J.H., Yeh H.J.C., Glusker J.P., Carrell H.L., Katz A.K., Afshar C.E., Dashwood W.-M., Kenniston G. & Baird W.M. 2000. Methyl group-induced helicity in 1, 4-dimethylbenzo [c] phenanthrene and its metabolites: synthesis, physical, and biological properties. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 12629–12636.
- Lee R.F., Dornseif B., Gonsoulin F., Tenore K. & Hanson R. 1981. Fate and effects of a heavy fuel oil spill on a Georgia salt marsh. *Mar. Environ. Res.* 5: 125–143.
- Keith L.H. 2014. The Source of U.S. EPA’s Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*.
- Mitchell S. E. & Lampert W. 2000. Temperature adaptation in a geographically widespread zooplankter, *Daphnia magna*. *J. Evolution. Biol.* 13: 371-382.
- Müller M.F., Colomer J. & Serra T. 2018. Temperature-driven response reversibility and short-term quasi-acclimation of *Daphnia magna*. *PLOS ONE*. 13: e0209705.
- Muñoz B. & Albores A. 2011. DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons: mechanisms and markers. In: Chen C. (ed.), *Selected topics in DNA repair*, InTech, Rijeka. pp. 125–143.
- Neff J. M. 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Biol. Conserv.* 18:1.
- Nikinmaa M. 2014. *An introduction to aquatic toxicology*. Academic Press Inc, Waltham.
- OECD. 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD. 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Olmstead A. W. & LeBlanc G. A. 2005. Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: predictive modeling of sublethal toxicity. *Aquat. Toxicol.* 75: 253-262.
- Paerl H.W. & Huisman J. 2008. Blooms like it hot. *Science*. 320: 57–58.
- Patel A. B., Shaikh S., Jain K. R., Desai C., & Madamwar D. 2020. Polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, toxicity, and remediation approaches. *Front. Microbiol.* 2675.

- Patra R., Chapman J., Lim R., Gehrke P., & Sunderam R. 2015. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 1809–1817.
- Persson J., Brett M. T., Vrede T., & Ravet J. L. 2007. Food quantity and quality regulation of trophic transfer between primary producers and a keystone grazer (*Daphnia*) in pelagic freshwater food webs. *Oikos*. 116: 1152-1163.
- Porges J. 2019. Polyaromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated Metabolites Target Ion Channels in Zebrafish (*Danio rerio*). Thesis (Undergraduate). *California State University*.
- Schonauer K.T., Hart R.J. & Antweiler R.C. 2014. The presence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and inorganic elements in water and lakebed materials and the potential for bioconcentration in biota at established sampling sites on Lake Powell, Utah and Arizona. *U.S. Geological Survey Open-File Report 2013–1299*. <http://dx.doi.org/10.3133/ofr20131299>
- Seda J. & Petrusek A. 2011. *Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *J.Limnol.* 70: 337-344.
- Šepič E., Bricelj M., & Leskovšek H. 2003. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere*. 52: 1125-1133.
- Shindell D. T., Rind D., & Loneragan P. 1998. Increased polar stratospheric ozone losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations. *Nature*. 392: 589-592.
- Suedel B. C. & Rodgers Jr J. H. 1996. Toxicity of Fluoranthene to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, and *Stylaria lacustris* in. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 132-138.
- Tani K., Watanabe H., Noguchi M., Hiki K., Yamagishi T., Tatarazako N. & Yamamoto H. 2021. Toxicity assessment of typical polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in water-only and sediment–water exposure systems. *Sci. Total. Environ.* 784: 147156.
- Vehniäinen E. R., Haverinen J., & Vornanen M. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons phenanthrene and retene modify the action potential via multiple ion currents in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cardiac myocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 38: 2145–2153.
- Wagner A., & Benndorf J. 2007. Climate-driven warming during spring destabilises a *Daphnia* population: a mechanistic food web approach. *Oecologia*. 151: 351-364.
- Wan X., Cheng C., Gu Y., Shu X., Xie L. & Zhao Y. 2021. Acute and chronic toxicity of microcystin-LR and phenanthrene alone or in combination to the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotox. Environ. Safe.* 220: 112405.
- Wernersson A.-S. & Dave G. 1998. Effects of different protective agents on the phototoxicity of fluoranthene to *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 120: 373–381.

- Xu H.X., Wu H.Y., Qiu Y.P., He G., Zhang J. & Wu J.C. 2011. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenicum* from activated sludge. *Biodegradation*. 22: 335–345.
- Zhang Q., Wang H., Xia X., Bi S., Lin H., & Chen J. 2020. Elevated temperature enhances the bioavailability of pyrene to *Daphnia magna* in the presence of dissolved organic matter: Implications for the effect of climate warming. *Environ. Pollut.* 266: 115349.
- Zgheib S., Moilleron R., Saad M., & Chebbo G. 2011. Partition of pollution between dissolved and particulate phases: what about emerging substances in urban stormwater catchments? *Water Res.* 45: 913–925.

## LIITE 1. ALTISTUSLIUOSTEN HAPPITOISUUS JA pH-ARVOT

Taulukko 1. Lisääntymiskokeen 17. päivänä vanhoista altistusliuoksista mitatut keskimääräiset happipitoisuudet (%) ja pH-arvot vaihteluväleineen. N kuvaa näytteiden määrää. FLU C1 = 10 µg/l, FLU C2 = 20 µg/l, FLU C3 = 40 µg/l, FLU C4 = 80 µg/l fluoranteenia.

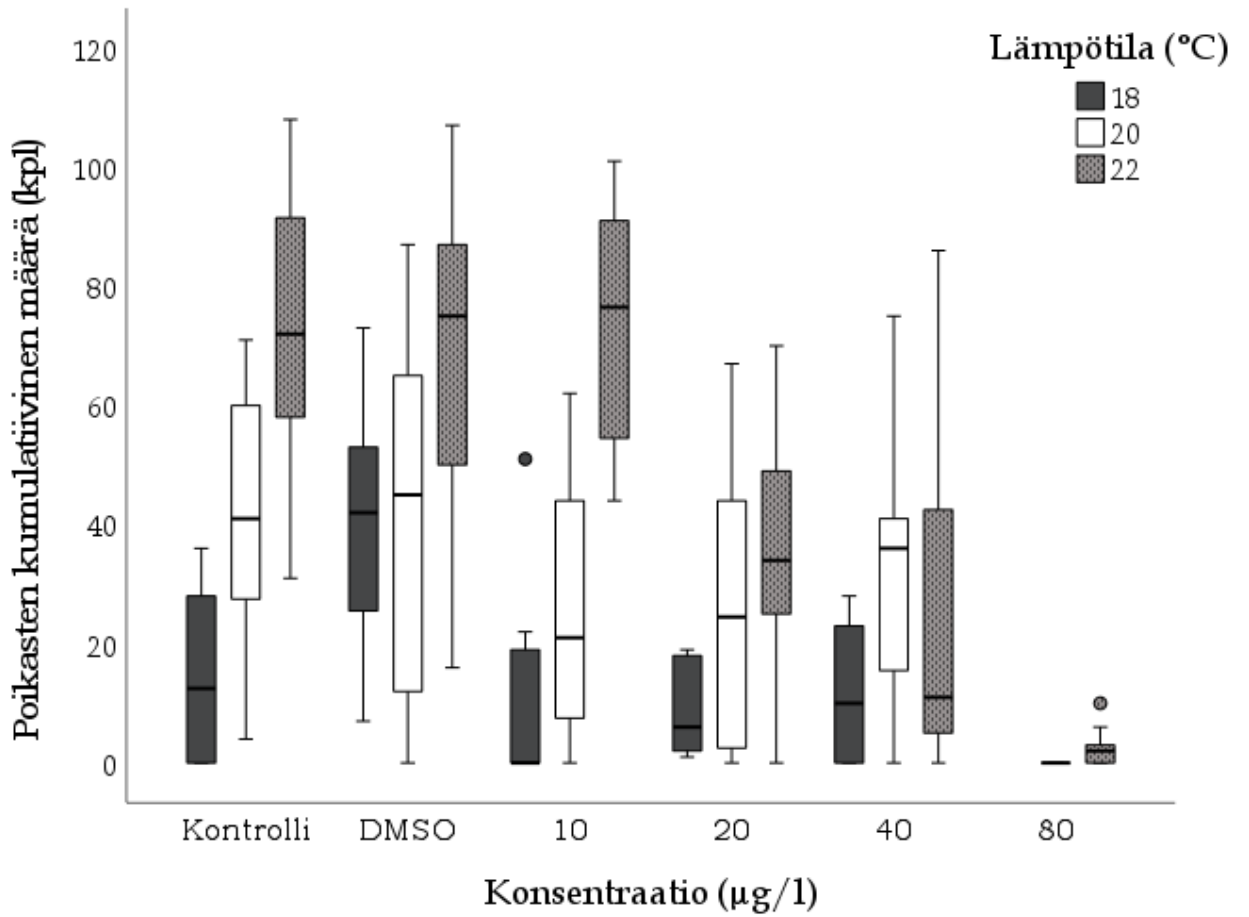
Käsittely	Lämpötila (°C)	Happipitoisuus (%)	pH-arvo	N
<b>Kontrolli</b>	18	83 [83]	9,3 [9,2, 9,3]	2
<b>DMSO</b>	18	82,3 [82,83]	8,3 [7,9, 8,6]	3
<b>FLU C1</b>	18	84 [84]	8,2 [8,2]	2
<b>FLU C2</b>	18	83,5 [82,85]	8,1 [7,9, 8,3]	2
<b>FLU C3</b>	18	81,5 [81,82]	7,9 [7,9]	2
<b>Kontrolli</b>	20	88 [86,90]	9 [9,0]	3
<b>DMSO</b>	20	90 [88,92]	9,2 [9,1, 9,3]	3
<b>FLU C1</b>	20	87,3 [87,88]	9 [8,9, 9,1]	3
<b>FLU C2</b>	20	89,3 [85,95]	9,0 [9,0, 9,1]	3
<b>FLU C3</b>	20	96 [90,104]	9,1 [9,1]	3
<b>FLU C4</b>	20	100 [100]	9,2 [9,2]	1
<b>Kontrolli</b>	22	77,7 [76,81]	8,2 [7,9, 8,5]	3
<b>DMSO</b>	22	80 [78,82]	8,1 [7,9, 8,2]	3
<b>FLU C1</b>	22	83 [81,86]	7,9 [7,9, 8,0]	3
<b>FLU C2</b>	22	85,7 [85,86]	8,2 [8,1, 8,3]	3
<b>FLU C3</b>	22	87 [86,88]	8,4 [8,4]	3
<b>FLU C4</b>	22	91 [89,93]	8,6 [8,5, 8,6]	3

## LIITE 2. VESIKIRPPUJEN KUOLLEISUUSPROSENTIT LISÄÄNTYMISKOKEESSA

Taulukko 2. Vesikirppujen kuolleisuusprosentti käsittelyittäin lisääntymiskokeen lopuksi. FLU C1 = 10 µg/l, FLU C2 = 20 µg/l, FLU C3 = 40 µg/l, FLU C4 = 80 µg/l fluoranteenia.

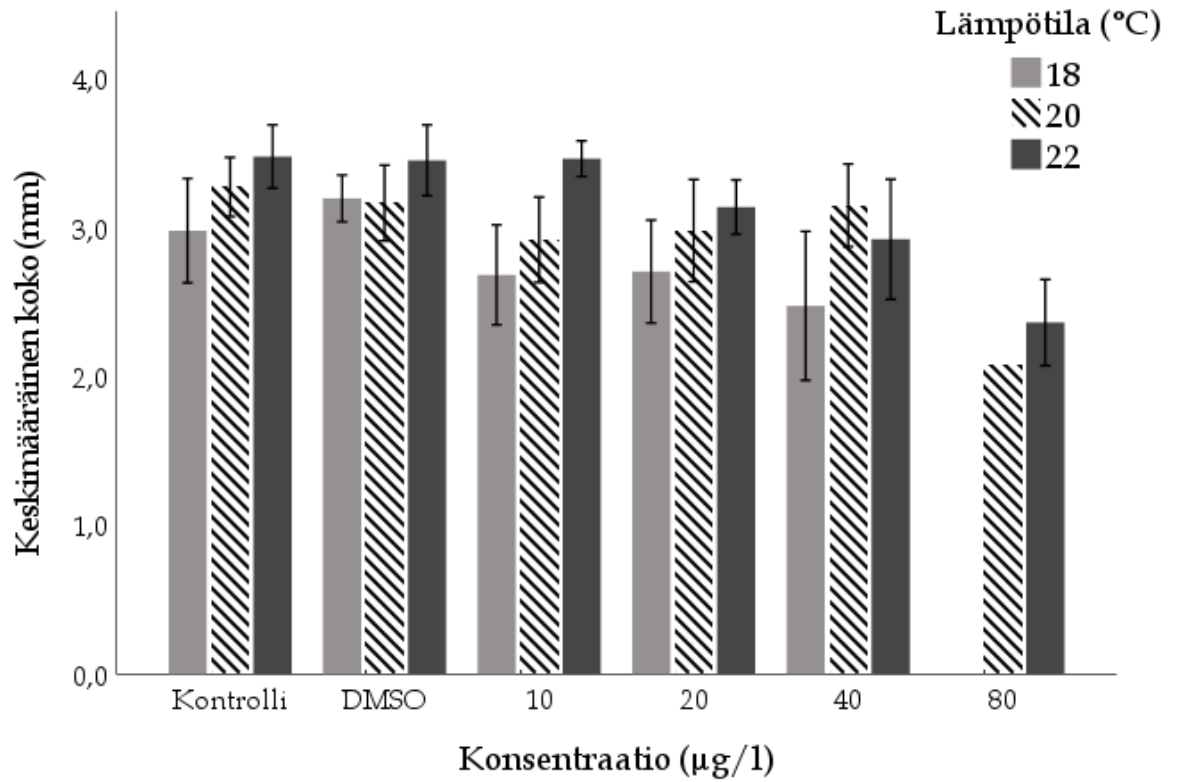
Lämpötila (°C)	Kontrolli	DMSO	FLU C1	FLU C2	FLU C3	FLU C4	Yht.
18	23	8	15	62	54	100	44
20	20	14	15	38	31	92	35
22	15	8	8	0	15	31	13

### LIITE 3. VESIKIRPPUJEN KUMULATIIVINEN POIKASTUOTANTO



Kuva 20. Poikasten kumulatiivinen summa (kpl) emoa kohti lisääntymiskokeen lopuksi altistuslämpötilan (°C) ja -käsittelyn mukaan. Ympyräsymboli kuvaa poikkeavia havaintoja.

#### LIITE 4. VESIKIRPPUJEN KESKIMÄÄRÄINEN KOKO (MM)



Kuva 21. Vesikirppujen keskimääräinen koko (mm) eri altistuskonsentraatioissa ja lämpötiloissa lisääntymiskokeen lopussa. Janat kuvaavat 95 % luottamusväliä.