

Pro gradu -tutkielma

**Tiesuolan (NaCl) vaikutukset jokihelmisimpukan
(*Margaritifera margaritifera*) poikasten kasvuun,
aktiivisuuteen ja selviytymiseen**

Ripsa Soininen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede

29.5.2024

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötieteen maisteriohjelma

Soininen Ripsa R. B. Tiesuolan (NaCl) vaikutukset jokihelmisimpukan
(*Margaritifera margaritifera*) poikasten kasvuun,
aktiivisuuteen ja selviytymiseen
Pro gradu tutkielma: 29 s., 2 liitettä
Työn ohjaajat: Professori Juha Karjalainen, Professori Jouni
Taskinen ja FM Heini Hyvärinen
Tarkastajat: Matti Leppänen, Jouni Salonen
5/2024

Hakusanat: makeanveden simpukka, suolapitoisuus, toksisuustesti

Jokihelmisimpukka eli raakku on yksi pohjoisen pallonpuoliskon uhanalaisimmista lajeista. Lajin suojelun kannalta on tärkeää ymmärtää lajin uhanalaisuuden syitä, joita ovat muun muassa isäntäkalojen puute, jokien patoaminen ja ojitus, rehevöityminen, saastuminen ja helmenkalastus. Makeiden vesien suolaantumisen viimemain vuosikymmenten aikana tullut uhka vesiekosysteemeille, sillä korkeiden suolapitoisuuksien on huomattu olevan haitallisia vesieliöille. Tiesuolan vaikutuksia raakkuun ei tunneta hyvin. Tämän tutkimuksen tavoitteena on tutkia kokeellisesti tiesuolana käytetyn natriumkloridin pitkäaikaisaltistuksen vaikutusta raakun poikasten kasvuun, aktiivisuuteen ja selviytymiseen pehmeässä vedessä. Noin vuoden ikäisiä poikasia altistettiin 28 päivän ajan kymmenelle eri käsittelylle: kontrolli ja yhdeksän eri natriumkloridipitoisuutta (200–4400 mg/l). Poikaset laitettiin 6-kuoppalevyille, joissa oli suodatettuun Konneveden järviveteen valmistetut suolaliuokset ja ruokaliuosta. Altistuskokeen aikana seurattiin poikasten kuolleisuutta ja aktiivisuutta. Aktiivisuutta mitattiin tarkkailemalla poikasten liikkumista kahdeksana tarkkailukertana kokeen aikana. Poikasten kasvua mitattiin punnitsemalla niiden tuore- ja kuivamassa kokeen lopussa. Pitkäaikainen natriumkloridialtistus vaikutti merkittävästi poikasten kuolleisuuteen. Simpukoiden LC10-natriumkloridipitoisuus oli 1886 mg/l ja LC50-pitoisuus 1994 mg/l. Natriumkloridi vähensi merkittävästi poikasten aktiivisuutta. EC10-pitoisuus oli 1082 mg/l ja EC50 1970 mg/l. Pitkäaikainen altistuminen natriumkloridille vaikutti merkittävästi myös poikasten kuivamassan kasvuun. Natriumkloridi aiheutti jokihelmisimpukoissa kuolleisuutta matalammassa pitoisuuksissa kuin muilla makean veden simpukoilla on havaittu.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Master's Degree Programme in Environmental Science,

Soininen Ripsa R. B. Effects of road salt (NaCl) on freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) juvenile growth, activity and survival

MSci Thesis 29 p., 2 appendices

Supervisors: Professor Juha Karjalainen, Professor Jouni Taskinen and MSc Heini Hyvärinen

Reviewers:

5/2024

Keywords: freshwater mussel, salt concentration, toxicity test

Freshwater pearl mussel (FPM) is one of the most endangered species in the northern hemisphere. To protect this threatened species, it is important to understand why FPM populations are declining. That are, for example the lack of host fishes, river damming and drainage, riverbed siltation, eutrophication, pollution and pearl fishing. Salinization of freshwater has become a threat to aquatic ecosystems in the last decades. High salt concentrations can be toxic to aquatic organisms. Information on the effects of de-icing salts on freshwater pearl mussels is lacking. This study aims to explore the effects of chronic exposure to sodium chloride on the growth, activity and viability of FPM juveniles in soft freshwater. One year old juveniles were kept in different saline solutions for 28 days and are exposed to ten different treatments: control and nine sodium chloride concentrations (200-4400 mg/l). The juveniles were kept in 6-wellplates that contained filtered Lake Konnevesi water with NaCl and commercial algae mix. During the exposure the mortality and activity of the juveniles was observed. Activity was rated based on their movement during each observation period during the experiment. Growth was measured fresh weight and dry weight of the juveniles at the end of the experiment. Chronic exposure to sodium chloride significantly affected mortality of the juveniles. LC10 concentration for sodium chloride was 1886 mg/l and LC50 concentration was 1994 mg/l. Sodium chloride exposure reduced the activity of the FPM juveniles. EC10 was 1082 mg/l and EC50 1970 mg/l. Chronic exposure to sodium chloride also significantly affected the growth of dry weight in the juveniles. Sodium chloride was lethal to FPM in lower concentrations compared to other freshwater mussels.

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	1
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	4
	2.1 Krooninen toksisuuskoe	4
	2.2 Altistusluokat	5
	2.3 Data-analyysi.....	6
3	TULOKSET	7
4	TULOSTEN TARKASTELU	12
	4.1 Natriumkloridin vaikutus jokihelmisimpukan poikasiin.....	12
	4.2 Vesistöjen kloridipitoisuudet	16
	4.3 Käytettyjen muuttujien vertailu	18
5	PÄÄTELMÄT	19
	KIITOKSET	20
	KIRJALLISUUSLUETTELO	21
	LIITE 1. POIKASTEN AKTIIVISUUDEN MUUTOKSET NATRIUMKLORIDIALTISTUKSEN AIKANA	30
	LIITE 2. PARITTAINEN VERTAILUN P-ARVOT JOKIHELMISIMPUKOIDEN KUIVAMASSASSA (A) JA VESIPITOISUUSSA (B) ERI NATRIUMKLORIDIPITOISUUKSIEN VÄLILLÄ	31

SANASTO JA LYHENTEET

Sanasto

Lyhenteet

EC50/EC20/EC10 - vaikuttava pitoisuus (effective concentration), tilastollisesti tai graafisesti arvioitu pitoisuus, jonka odotetaan aiheuttavan yhden tai useamman määritellyn vaikutuksen 50/20/10 prosentille eliöryhmästä määritellyissä olosuhteissa.

LC50/LC20/LC10 - letaali eli tappava pitoisuus (lethal concentration) Tilastollisesti tai graafisesti arvioitu pitoisuus, jonka odotetaan olevan tappava 50/20/10 prosentille eliöryhmästä määritellyissä olosuhteissa.

NOEC - Pienin pitoisuus, joka ei eroa tilastollisesti merkitsevästi kontrollista.

1 JOHDANTO

Makeanveden simpukat tarjoavat useita tärkeitä ekosysteemipalveluita osallistumalla muun muassa ravinteiden kiertoon, veden puhdistukseen ja sedimentin muovaukseen (Vaugh & Hakenkamp 2001, Howard & Cuffey 2006, Spooner & Vaugh 2006, Boeker ym. 2016, Lummer ym. 2016, Lopes-Lima 2017, Vaugh ym. 2018). Makeanveden simpukoiden populaatiot ovat pienentyneet voimakkaasti ja ovat yksi uhanalaisimmista taksonomisista ryhmistä (Bogan ym. 1993, Strayer 2004, Geist 2011, Lopes-Lima ym. 2017, 2018). Jokihelmisimpukkaa (*Margaritifera margaritifera*) eli raakua pidetään jokiekosysteemin indikaattori- ja avainlajina (Geist 2010), mutta myös niiden populaatiot ovat pienentyneet voimakkaasti sen koko esiintymisalueella (Bauer 1988, Young ym. 2001, Cosgrove ym. 2000, Simon ym. 2015, Denic & Geist 2017, Oulasvirta ym. 2017). Raakku on luokiteltu maailmanlaajuisesti erittäin uhanalaiseksi (Moorkens ym. 2017) ja Euroopassa äärimäisen uhanalaiseksi (Cuttelod ym. 2011). Populaatioiden pienenemiseen on vaikuttanut esimerkiksi jokien patoaminen ja ojitus, jokipohjan liettyminen, rehevöityminen, luonnollisten elinympäristöjen häviäminen, vieraslajit, isäntäkalojen vähäisyys tai puuttuminen, saasteet sekä helmenkalastus (Young & Williams 1983, Bauer 1988, Cosgrove & Hastie 2001, Geist & Aueswald 2007, Degerman ym. 2009, Geist 2010, Österling ym. 2010, Österling & Hödberg 2014, Lummer ym. 2016, Lopes-Lima 2017, Salonen ym. 2016). Raakku on herkkä sen elinympäristössä tapahtuville abioottisille muutoksille (Bauer 1988, Geist 2010, Geist & Auerswald 2007, Österling 2008), minkä vuoksi populaatioiden pienenemisen on ajateltu johtuvan esimerkiksi elinympäristöjen huononemisesta (Bauer 1988).

Raakun elinkierto on monimutkainen, mikä tekee siitä haavoittuvaisen ihmisen aiheuttamille nopeasti tapahtuville muutoksille, jotka vaikuttavat makeanveden ekosysteemeihin (Simon ym. 2015). Raakulla on toukkavaihe, jonka se viettää loisena kiinnittyneenä lohikaloiden, taimenen (*Salmo trutta*) tai lohen (*Salmo salar*), kiduksiin (Salonen ym. 2016, 2017). Glokidium-toukat kehittyvät ja kasvavat kalojen kiduksissa rakkulan sisällä useita kuukausia (Hastie & Young 2003, Österling 2008, Salonen ym. 2017). Niiden irtauduttua kalan kiduksista alkaa poikasvaihe, jonka raakut viettävät kaivautuneena joen pohjasedimenttiin (Bauer 1988). Poikasvaihetta on pidetty kriittisimpänä vaiheena raakun elinkiertoa (Bauer 1988, Geist & Auerswald 2007, Geist 2010). Raakun poikasten määrän on huomattu vähenevän monissa raakkupopulaatioissa. Monissa populaatioissa poikasia ei välttämättä ole havaittu lainkaan (Young ym. 2001, Österling ym. 2010, Simon ym. 2015, Olofsson 2017). Raakkujen on kuitenkin huomattu kykenevän tuottamaan glokidium-toukkia ja isäntäkaloiden infektiot ovat onnistuneet (Hastie ym. 2000b, Jungbluth 2011, Oulasvirta ym. 2017), eli näyttäisi siltä, että raakut eivät selviä poikasvaiheessa. Joen pohjan laatu on yksi tärkeimmistä tekijöistä, joka vaikuttaa poikasten selviytymiseen (Hastie ym. 2000a, Geist & Auerswald 2007, Österling ym. 2010). Kuolleisuutta poikasilla aiheuttaa esimerkiksi liian hieno sedimentti ja joen

pohjan liettyminen sekä näiden aiheuttama hapen puute (Bauer 1988, Hastie ym. 2000a, Geist & Auerswald 2007, Österling ym. 2010, Hyvärinen ym. 2022).

Saasteiden on todettu olevan yksi merkittävimpiä uhkia makeanveden simpukoille (Bauer 1988, Bogan 1993, Young ym. 2001, Strayer ym. 2004, Cope ym. 2008, Lopes-Lima ym. 2018). Makeanveden simpukoiden on useiden tutkimusten perusteella todettu olevan yksi herkimpiä makeanveden lajeja monille saasteille, kuten metalleille sekä ioneille, kuten kloridi, sulfaatti, nitraatti ja kalium (Bringolf ym. 2007, Wang ym. 2007, 2010, 2017, 2018a, 2018b, 2024, Cope 2008, Gillis 2011, 2022, Salerno ym. 2018, 2020). Raakut elävät osittain pohjasedimenttiin hautautuneena ja hankkivat ruokansa suodattamalla jokivettä. Raakut voivat siis altistua saasteille pintaveden ja sedimentin kautta (Cope ym. 2008). Raakkujen herkkydestä saasteille tiedetään vähän etenkin sen varhaisissa elinvaiheissa. Raakun poikasilla on tehty vain vähän ekotoksikologisia kokeita (Taskinen ym. 2011, Belamy ym. 2020, 2022, 2023, Karjalainen ym. 2023). Makeanveden simpukoiden varhaisten elinvaiheiden on todettu olevan yksi suolalle herkimmistä ryhmistä (Gillis 2011, Noguire ym. 2015, Roy ym. 2015, Prosser ym. 2017, Wang ym. 2018a). Makeita vesiä uhkaa suolaantuminen muun muassa kaivostoiminnan, jätevesien ja tiesuolauksen seurauksena (Tunquist 2004, Dailey ym. 2014, Cañedo-Argüelles ym. 2013, 2019), minkä takia olisi tärkeää selvittää suolojen vaikutus myös raakkuihin.

Tiesuolan aiheuttamaa suolaantumista tapahtuu alueilla, joissa on kylmä talvi ja tarvitaan teiden talvikunnossapitoa (Findlay & Kelly 2011, Cañedo-Argüelles ym. 2013). Teiden jäänpoistossa suositaan kloridipitoisia suoloja, joista natriumkloridi (NaCl) on eniten käytetty (Evans & Frick 2001). Useissa tutkimuksissa sisävesien kloridipitoisuuksien on todettu kohonneen tiesuolauksen seurauksena (Thunqvist 2004, Kaushal ym. 2005, Kelly ym. 2008, Novotny ym. 2008, Corsi ym. 2015). Kloridipitoisuudet vesistöissä ovat normaalisti 0–100 mg/l, mutta pitoisuudet ovat useimmin alle 20 mg/l (Fay & Shi 2012). Suolaantumisen seurauksena on kuitenkin havaittu monien vesistöjen kloridipitoisuuksien nousseen huomattavasti suuremmiksi (Koryak ym. 2001, Kaushal ym. 2005, Kelly ym. 2008, Novotny ym. 2008, Corsi ym. 2015, Dugan ym. 2017, Kelly ym. 2019, Gillis ym. 2022). Esimerkiksi Milwaukee-joessa mitattiin tutkimusajanjakson (1980–2010) lopussa talvisin yli 140 mg/l kloridipitoisuuksia ja kesäisin noin 100 mg/l (Corsi ym. 2015). Samassa tutkimuksessa huomattiin Menomee- ja Kinnickinnic-joissa kloridipitoisuuksien nousevan talvisin yli 500 mg/l ja kesäisin vähän alle 200 mg/l (Corsi ym. 2015). Tiesuolan aiheuttama kuormitus on suurinta talvella ja keväällä, jolloin suolojen päätyminen vesistöihin on suurimmillaan lumen ja jään sulamisen seurauksena (Blasius & Merritt 2002, Kelly ym. 2008, Corsi ym. 2015, Mullaney ym. 2009). Talvisin vesistöjen kloridipitoisuudet saattavat nousta jopa yli 1000 mg/l (Kaushal ym. 2005, Todd & Kaltenecker 2012). Valumavesissä kloridipitoisuudet ovat olleet jopa yli 8000 mg/l (Gillis ym. 2022). Tiesuolauksen seurauksena kloridia voi päätyä myös pohjavesiin (Thunquist 2004, Corsi ym. 2015), josta sitä voi vapautua pintavesiin. Tutkimuksissa on havaittu kloridia vapautuvan pohjavesistä pintavesiin vuodenajasta riippumatta (Kelly ym. 2008, Roy ym. 2015, Kelly ym. 2019).

Vesistöjen suolaantuminen voi muuttaa akvaattisten eliöyhteisöjen rakennetta ja toimintaa (Corsi ym. 2010, Brown & Yan 2015, Hintz ym. 2017, Jones ym. 2016, Zao ym. 2021) sekä vähentää akvaattisten ekosysteemien monimuotoisuutta (Gonçalves ym. 2007, Cañedo-Argüelles ym. 2012, 2013). Useissa tutkimuksissa on huomattu kohonneiden kloridipitoisuuksien vaikuttavan negatiivisesti akvaattisten eliöiden kasvuun, käyttäytymiseen, lisääntymiseen ja selviytymiseen (Blasius & Merritt 2002, Sarma ym. 2006, Gonçalves ym. 2007, Corsi ym. 2010, Gillis 2011, Mahrosh ym. 2014, Brown & Yan 2015, Roy 2015, Jones ym. 2016, Hintz & Relyea 2017, Sikoriski 2021, Gillis 2022). Esimerkiksi vesikirpuilla ja rataseläimillä on havaittu, etteivät ne pysty lisääntymään tai selviytymään yli 5000 mg/l suolapitoisuuksissa (Sarma ym. 2006). Vesikirpuilla natriumkloridialtistuksen huomattiin myös vaikuttavan niiden uimiseen (Sikorski 2021). Suolojen on havaittu lisäävän makeanveden simpukoiden poikasten ja glolidium-toukkien kuolleisuutta (Bringolf ym. 2007, Gillis 2011, Nogueira ym. 2015, Roy ym. 2015, Prosser ym. 2017, Salerno ym. 2018, 2020, Wang ym. 2018a, Belamy ym. 2020, Gillis ym. 2022). Makeanveden simpukoilla on aiemmissa toksisuuskokeissa saatu LC50-kloridipitoisuuksia 1740–3442 mg/l ja EC50-kloridipitoisuuksia 911–3092 mg/l (Bringolf ym. 2007, Prosser ym. 2017, Wang ym. 2017, 2018a, Salerno ym. 2018, 2020, Belamy ym. 2020, Gillis ym. 2022). Belamy ym. (2020) havaitsi akuutissa toksisuuskokeessa raakun poikasilla EC50-pitoisuuksia 960–1600 mg/l natriumkloridille. Suolalle altistumisen on havaittu vaikuttavan muun muassa simpukoiden suodatus- ja hautautumiskäyttäytymiseen sekä liikkumiseen (Hartmann ym. 2016, Salerno ym. 2018, Belamy ym. 2023). Suolapitoisuuden kasvu voi aiheuttaa simpukoilla vaurioita kudoksissa, mikä voi heikentää elintärkeitä toimintoja kuten ruuansulatusta, saasteiden poistoa elimistöstä ja ionisäätelyä (Rogers ym. 2018).

Tämän tutkielman tavoitteena on tutkia tiesuolana käytetyn natriumkloridin (NaCl) vaikutuksia raakun poikasten kasvuun, aktiivisuuteen ja kuolleisuuteen eri pitoisuuksissa. Ekotoksikologisia tutkimuksia on tehty raakuille vähän, minkä vuoksi olisi tärkeä tehdä tutkimusta saasteiden roolista raakkupopulaatioiden häviämiseksi. Myös suojelun kannalta on tärkeää löytää raja-arvoja suolapitoisuuksille, jossa raakut selviävät luonnossa. Raakun poikasvaihe on kriittisimpiä vaiheita raakun elinkiertoa ja siinä kuolleisuus on suurta (Geist & Auerswald 2007, Geist 2010), mitkä ovat yksi tärkeimpiä syitä, jonka takia tiesuolan vaikutuksia nimenomaan poikasiin pitäisi tutkia. Aiempien tutkimusten perusteella hypoteesina on, että natriumkloridi lisää jokihelmisimpukoiden kuolleisuutta (Prosser ym. 2017, Wang ym. 2017, 2018a, Salerno ym. 2018, 2020, Belamy ym. 2020, Gillis ym. 2022) sekä vaikuttaa negatiivisesti aktiivisuuteen (Cope ym. 2008, Belamy ym. 2023) ja kasvuun (Corsi ym. 2010, Hintz & Relyea 2017, Wang ym. 2018b, 2024).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Kokeessa käytetyt raakun poikaset oli kasvatettu Konneveden tutkimusasemalla osana jokihelmisimpukoiden keinokasvatusohjelmaa (LIFE Revives). Loisivaiheessa glokidium-toukille oli käytetty isäntäkalana taimenta ja lohta. Poikasvaiheessa niitä kasvatettiin tekojoessa Buddensiek-levyillä. Simpukoiden alkuperäinen elinympäristö on Isojoki Länsi-Suomessa (EPOELY 1472 2022, ELY-keskus, Seinäjoki, Suomi).

2.1 Krooninen toksisuuskoee

Vuoden ikäisiä raakun poikasia altistettiin kymmenelle eri käsittelylle: kontrolli, laskennalliset natriumkloridipitoisuudet 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2800, 3600 ja 4400 mg/l. Krooninen altistuskoe tehtiin 120 jokihelmisimpukan poikaselle syyskuussa 2023. Poikasia ei akklimoitu ennen koetta, sillä tekojoessa, jossa poikasia kasvatettiin, veden lämpötila oli 17,1 °C:sta, mikä oli lähes sama lämpötila kuin koetilassa. Poikasten elossa olo varmistettiin pari tuntia ennen kokeen aloitusta seuraamalla niiden jalan liikettä. Poikasten pituus mitattiin mikroskooppikameran (Olympus DP23, Olympus, Japani) ja cellSens Entry -tietokoneohjelman (versio cellSense Entry 3.2) avulla. Poikaset pipetoitiin omiin kuoppiinsa 6-kuoppalevyille, joihin lisättiin 10 ml altistusliuosta. Jokaista käsittelyä varten tehtiin 12 toistoa, eli jokaiseen pitoisuuteen altistettiin 12 poikasta kukin omassa kuopassaan. Lisäksi otettiin 30 poikasen otos, joka mitattiin ja punnittiin analyysivaa'alla 0,00001 g tarkkuudella. Tuoremassa mitattiin ensin asettamalla poikaset käsipaperille ylimääräisen veden poistamiseksi, jonka jälkeen ne siirrettiin punnittuihin foliokuppeihin. Foliokupit laitettiin 48-kuoppalevyille, joissa ne laitettiin uuniin 24 tunniksi 60 °C:ssa. Tämän jälkeen punnittiin simpukoiden kuivamassa. Tuore- ja kuivamassan avulla laskettiin simpukoiden vesipitoisuus.

$$\text{Vesipitoisuus} = (\text{Tuoremassa} - \text{Kuivamassa}) / \text{Tuoremassa}$$

Koe tehtiin ASTM:n (2022) standardin mukaan kokeen pituuden, kuolleisuuden määrittelyn ja poikasten ruokinnan osalta. Kokeessa oli mahdollista vertailla uuden ASTM:n (2022) standardin mukaisia tuloksia aiempaan ASTM:n (2013) standardin mukaisiin tuloksiin. Koe kesti 28 päivää, jonka aikana altistusliuokset vaihdettiin kaksi kertaa viikossa. Ennen vedenvaihtoa kuoppalevyiltä mitattiin lämpötila ja happipitoisuus, johon käytettiin PreSens Microx 4 Trace -mittaria (happisensori Oxygen Dipping Probe DP-PSt3 ja lämpötilasensori Pt100 Temperature Senso, PreSens, Saksa). Kuoppalevyillä veden lämpötila oli kokeen aikana keskimäärin 17,6 (SD ± 1) °C. Lämpötila koetilassa ei ollut tasainen kokeen aikana viallisen lämmitysjärjestelmän takia. Happipitoisuus oli kokeen aikana keskimäärin 8,7 (SD ± 0,3) mg/l. Happimittauksissa ei otettu huomioon nesteen suolapitoisuutta, mutta kokeessa käytetyt suolapitoisuudet eivät olleet niin korkeita, että ne olisivat vaikuttaneet merkittävästi happimittauksiin.

Vedenvaihdon yhteydessä seurattiin poikasten kuolleisuutta ja aktiivisuutta. Kuoppalevyt olivat huoneenlämmössä tarkastelun aikana. Aktiivisuudesta kirjattiin ylös yksi neljästä vaihtoehdosta havainnointihetken perusteella: 1) jalka/kuori liikkuu; 2) kuori kiinni; 3) liikkumaton, jalka ulkona, ei reagoi kosketukseen eli kuollut tai 4) avonainen kuori, jossa ei jalkaa (jalka on hajonnut) eli kuollut. Kuolleisuus määriteltiin ASTM:n (2022) uuden standardin mukaan. Vanhan ASTM:n (2013) standardin perusteella liikkumaton simpukka laskettaisiin kuolleeksi. Kuori kiinni olleita poikasia seurattiin viisi minuuttia tai siihen asti, että havaittiin jalan tai kuoren liikettä. Jokaiselle yksilölle laskettiin aktiivisuusfrekvenssi koko kokeen ajalta siten, että jalan tai kuoren liikkeestä (kohta 1) sai yhden aktiivisuushavainnon per seuranta-ajankohta ja kohdat 2–4 tarkoittavat ei-aktiivista havaintoa (tai kuollutta simpukkaa), jotka kirjattiin nollahavaintona per seuranta-ajankohta. Seuranta-ajankohtia oli yhteensä kahdeksan eli kokeen ajalta yhteenlaskettu aktiivisuusfrekvenssi vaihteli nollan ja kahdeksan väliltä.

Kokeen lopussa poikasten elossa säilyminen tarkastettiin. Elossa säilyneet poikaset mitattiin uudelleen ja niiden tuore- ja kuivamassa punnittiin.

2.2 Altistusliuokset

Altistusliuokset valmistettiin suodatettuun (tangentialinen suodatus Millipore Pellicon & Durapore GVOO 0.22 µm-suodatin) Konneveden järviveteen liuottamalla niihin natriumkloridia (Natriumkloridi 99,5–100,5 %, AnalaR NORMAPUR ACS, VWR, USA). Kontrolliliuoksissa käytettiin pelkästään suodatettua järvivettä. Liuoksiin lisättiin kaupallista levävalmisteseosta Nanno 3600 (60 µl/l) ja Shellfish Diet 1800 (30 µl/l) (Reed Mariculture, USA). Altistusliuokset säilytettiin noin 5 °C:ssa liuosten säilymistä varten. Liuosten lämpötila nousi liuoksia valmisteltaessa vedenvaihtoa varten, ja oli simpukoita siirrettäessä noin 14 °C:ta, mutta lämpötila on voinut olla kokeen edetessä alhaisempi vedenvaihdon nopeutuessa.

Kokeen alussa, puolivälissä ja lopussa altistusliuoksista otettiin vesianalyysinäytteet, joista mitattiin veden kovuus sekä natrium- ja kloridipitoisuudet (Taulukko 1). Vesianalyysit teetettiin KVVY:n laboratorioissa (Tampere, Suomi). Vedenkovuus oli 0,14 mmol/l (laskennallinen Ca ja Mg -kovuus) eli vesi oli pehmeää. Liuoksista mitattiin myös pH (Seven Easy, Mettler Toledo, USA; Orion, Thermo scientific, USA), joka oli kokeen aikana keskimäärin 6,8 (SD ± 0,1), ja sähkönjohtavuus (Radiometer, Tanska; Taulukko 1).

Taulukko 1. Vesianalyysin tuloksista lasketut kloridi- ja natriumpitoisuudet ja natriumkloridi-pitoisuudet (\pm SD, n = 3) sekä mitatut sähkönjohtavuudet eri käsittelyissä.

Laskennallinen natriumkloridi- pitoisuus (mg/l)	Mitattu kloridi- pitoisuus (mg/l)	Mitattu natrium- pitoisuus (mg/l)	Mitattu natriumkloridi- pitoisuus (mg/l)	Sähkönjohtavuus (mS/m)
Kontrolli	9 \pm 10	8 \pm 3	17 \pm 13	0,08
200	120 \pm 0	87 \pm 4	207 \pm 4	0,47
400	243 \pm 15	160 \pm 10	403 \pm 21	0,83
800	480 \pm 0	317 \pm 6	797 \pm 6	1,57
1200	717 \pm 15	467 \pm 6	1183 \pm 21	2,19
1600	960 \pm 17	620 \pm 26	1580 \pm 44	2,96
2000	1200 \pm 0	777 \pm 25	1977 \pm 25	3,59
2800	1700 \pm 0	1100 \pm 0	2800 \pm 0	4,84
3600	2100 \pm 0	1450 \pm 71	3450 \pm 71	6,45
4400	2600 \pm 0	1650 \pm 71	4250 \pm 71	7,53

2.3 Data-analyysi

Aktiivisuus- ja kuolleisuusaineistolle tehtiin ei-parametrinen Kruskal-Wallis testi ja parittainen vertailu (Conoverin testi) SPSS-tilasto-ohjelmalla (versio 28.0.1.1, IBM SPSS Statistics). Tuore- ja kuivamassa-aineisto sekä vesipitoisuusaineistolle tehtiin yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA) Tukey post hoc -analyysillä. Aineistoa käsiteltiin Microsoft Excel -ohjelmalla. Aineiston normalisuus varmistettiin visuaalisesti. Tuoremassa- ja vesipitoisuusaineistosta poistettiin yksi arvo käsittelyistä 1600 ja 2000 mg/l, sillä ne olivat huomattavasti suuremmat verrattuna muihin arvoihin. Pituusaineistoa ei käytetty tilastoanalyysissä mittauksissa tapahtuneen mittaus- tai kalibrointivirheen takia.

Vesianalyysin tuloksista laskettiin altistusjakson keskiarvot natriumkloridipitoisuuksille EC- ja LC-pitoisuuksien laskemiseksi. EC- ja LC-pitoisuudet laskettiin RStudiolla (R versio 4.2.2) drc-paketilla (Ritz ym. 2015). Akaike Information Criteria eli AIC:n avulla valittiin mallit pitoisuuksien laskemiseksi LL.2, LL.3, LL.3u, LL.5, L.3, L.4, L.5, LL.4, LN.4, W1.3, W1.4 ja W2.4 -funktioiden väliltä (Ritz ym. 2015). Funktio, jolla oli pienin AIC, tarkasteltiin visuaalisesti, jotta nähtiin, kuinka hyvin vastekäyrä kuvasi dataa. Funktio, jolla oli pienin AIC-arvo ja jonka vastekäyrä asettui hyvin visuaalisesti datan kanssa, valittiin. LC-pitoisuuden laskemiseksi valittiin kaksiparametrinen log-logistinen funktio (LL.2) ja EC-pitoisuuden laskemiseksi valittiin logistinen malli (L.3).

3 TULOKSET

Krooninen natriumkloridialtistus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi raakun poikasten kuolleisuuteen (Kruskal-Wallis $H = 106,141$, $df = 9$, $p < 0,001$). Kaikki poikaset kuolivat kolmessa suurimmassa pitoisuudessa (Taulukko 2). Kontrollissa 100 % poikasista oli elossa kokeen lopussa. LC10-pitoisuus natriumkloridille oli 1886 mg/l ja LC50 oli 1994 mg/l. Taulukossa 3 ovat LC-arvojen 95 %:n luottamusvälit ja LC-pitoisuudet kloridille.

Taulukko 2. Raakun poikasten kuolleiden määrä ja kuolleisuusprosentti eri natriumkloridipitoisuuksissa kroonisen altistuksen jälkeen.

Laskennallinen pitoisuus (mg/l)	N	Kuolleet	Kuolleisuus (%)
Kontrolli	12	0	0
207	12	0	0
403	12	0	0
797	12	0	0
1183	12	0	0
1580	12	0	0
1977	12	5	41,7
2800	12	12	100
3450	12	12	100
4250	12	12	100

Taulukko 3. LC- ja EC-pitoisuudet ja niiden 95 % luottamusvälit (mg/l) natriumkloridille ja kloridille 28 päivän kroonisessa natriumkloridialtistuksessa raakun poikasille. LC-pitoisuudet laskettu kuolleisuuden ja EC-pitoisuus aktiivisuusfrekvenssin mukaan.

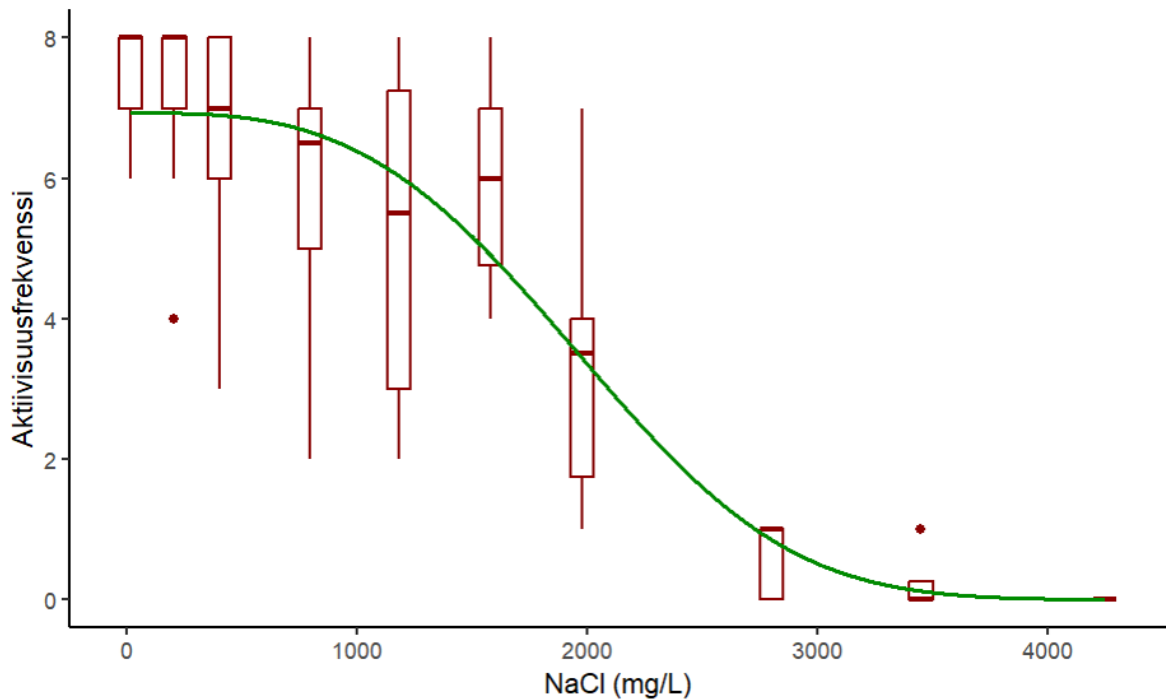
	LC10	LC20	LC50
Natriumkloridi	1886 (1337-2435)	1925 (1606-2244)	1994 (1873-2115)
Kloridi	1144 (820-1469)	1168 (980-1357)	1210 (1139-1282)
	EC10	EC20	EC50
Natriumkloridi	1082 (757-1398)	1374 (1099-1649)	1970 (1800-2141)
Kloridi	657 (466-848)	834 (667-1001)	1195 (1092-1300)

Kuolleisuuden määrittelytapa vaikuttaa merkittävästi tuloksiin poikasten kuolleisuudesta (Taulukko 4). Vanhan ASTM:n (2013) standardin mukaista kuolleisuuden määrittely tapaa käyttäen kuolleisuus olisi 33 % kontrollissa ja 83 % 2000 mg/l käsittelyssä.

Taulukko 4. Kuolleisuusprosenttien vertailu vanhan ASTM:n (2013) standardin ja kokeessa käytetyn uuden ASTM:n (2022) standardin välisistä kuolleisuuden määrittämisistä.

Laskennallinen pitoisuus (mg/l)	ASTM 2013 kuolleisuus (%)	ASTM 2022 kuolleisuus (%)
0	33	0
200	17	0
400	75	0
800	75	0
1200	67	0
1600	83	0
2000	83	41,7
2800	100	100
3600	100	100
4400	100	100

Krooninen natriumkloridialtistus vaikutti tilastollisesti merkitsevästi poikasten aktiivisuuteen (Kruskal-Wallis $H = 92,736$, $df = 9$, $p < 0,001$). Aktiivisuus oli suurinta pienissä pitoisuuksissa ja pienintä suurissa pitoisuuksissa (Kuva 1). Aktiivisuudessa oli merkittäviä eroja pitoisuuksien välillä (parittainen vertailu Conoverin testillä, $p < 0,05$, Taulukko 5). Suurimmissa pitoisuuksissa, 2000–4400 mg/l, aktiivisuus oli merkittävästi pienempää verrattuna muihin pitoisuuksiin. Kontrollissa ja 200 mg/l käsittelyissä aktiivisuusfrekvenssin vaihteli 6 ja 8 välillä, kun taas suurimmissa pitoisuuksissa aktiivisuusfrekvenssi oli joko 0 tai 1. Aktiivisuudessa oli lähes merkitsevä ero 1200 ja 1600 mg/l käsittelyiden ja kontrollin välillä (Conoverin testi $p = 0,061$ ja $p = 0,063$, Taulukko 5). EC10-pitoisuus natriumkloridille oli 1082 mg/l ja EC50-arvo 1970 mg/l. EC-arvojen 95 % luottamusvälit ja vastaavat pitoisuudet kloridille löytyvät Taulukosta 3. NOEC-pitoisuus, eli pienin pitoisuus, joka ei eroa tilastollisesti merkitsevästi kontrollista, natriumkloridille oli 1580 mg/l. Poikasten aktiivisuus vaihteli altistuskokeen aikana niissä pitoisuuksissa, joissa yksilöt säilyivät elossa kokeen loppuun asti (Liite 1).



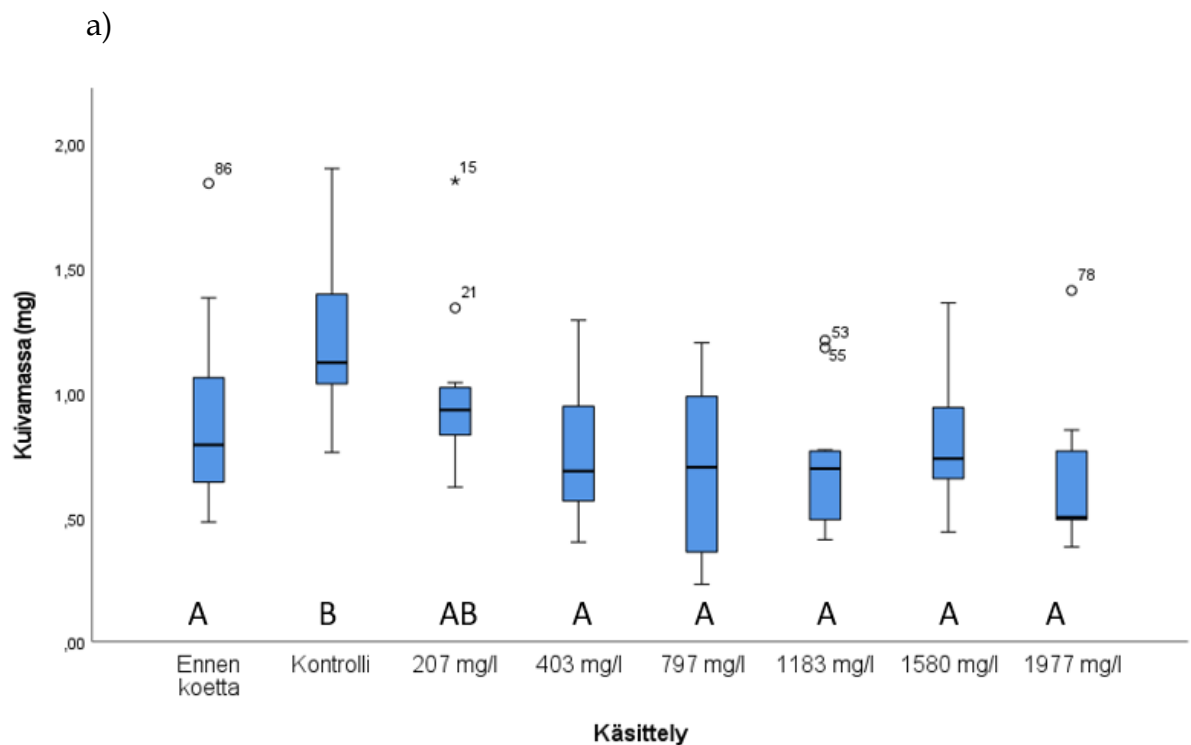
Kuva 1. Kroonisen natriumkloridialtistuksen vaikutus jokihelmisimpukan poikasten aktiivisuuteen mitattuna kokeen 8 havaintoajankohdan yhteenlaskettuna aktiivisuusfrekvenssinä.

Taulukko 5. Parittaisen vertailun p-arvot (oikealla ylhäällä) ja testisuureen arvo (vasemmalla alhaalla) Conoverin-testillä raakun poikasten aktiivisuusfrekvenssi eri natriumkloridipitoisuuksissa. Tilastollisesti merkitsevät ($p < 0,05$) tulokset on lihavoitu.

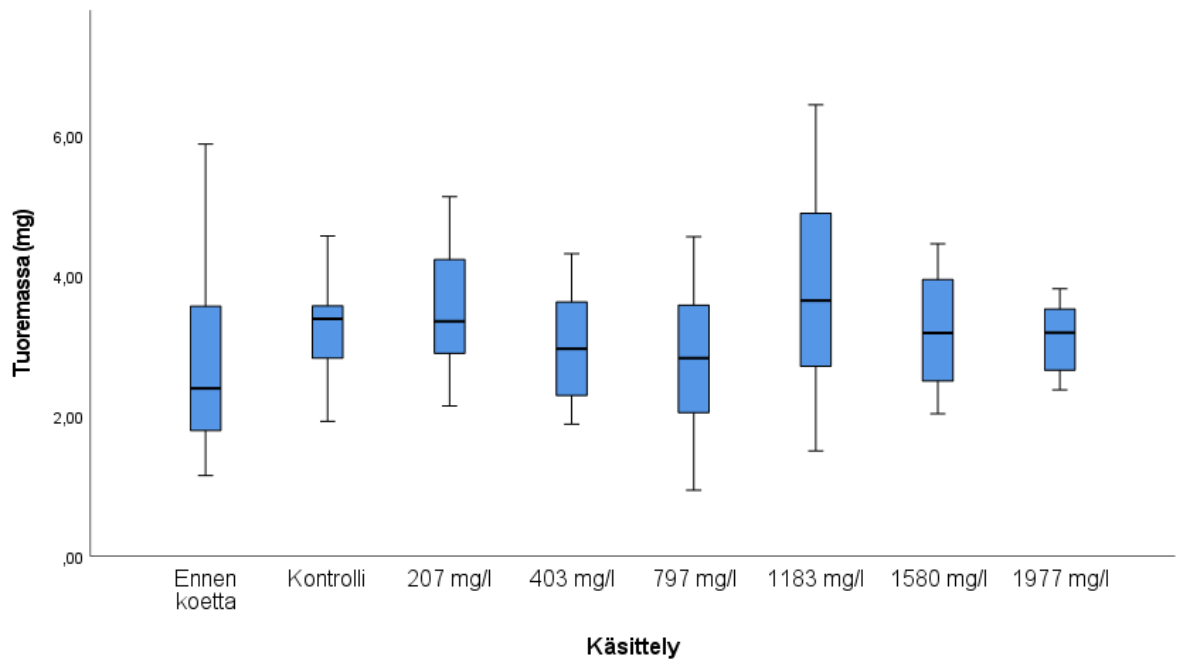
Natrium- kloridipi- toisuus mg/l	Kontrolli	207	403	797	1183	1580	1977	2800	3450	4250
Kontrolli	-	0,919	0,341	0,139	0,061	0,063	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
207	1,417	-	0,395	0,169	0,076	0,078	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
403	13,333	11,917	-	0,599	0,355	0,363	0,014	<0,001	<0,001	<0,001
797	20,708	19,292	7,375	-	0,69	0,701	0,055	<0,001	<0,001	<0,001
1183	26,292	24,875	12,958	5,583	-	0,988	0,129	<0,001	<0,001	<0,001
1580	26,083	24,667	12,750	5,375	0,208	-	0,125	<0,001	<0,001	<0,001
1977	47,583	46,167	34,250	26,875	21,292	21,500	-	0,072	0,024	0,009
2800	72,792	71,375	59,458	52,083	46,500	46,708	25,208	-	0,643	0,417
3450	79,292	77,875	65,958	58,583	53,000	53,208	31,708	6,500	-	0,728
4250	84,167	82,750	70,833	63,458	57,875	58,083	36,583	11,375	4,875	-

Natriumkloridi vaikutti tilastollisesti merkitsevästi simpukoiden kuivamassaan (ANOVA $F = 3,957$, $df = 7$, $p < 0,001$, Kuva 3a). Kontrollissa poikaset olivat kasvaneet merkitsevästi enemmän muihin käsittelyihin, paitsi 200 ja 1600 mg/l pitoisuuksiin, verrattuna (Liite 2, Tukeyn parittaiset vertailut pitoisuuksien välillä). Muissa käsittelyissä poikaset olivat 17–43 % pienempiä verrattuna kontrolliin. Muut pitoisuudet eivät eronneet merkittävästi ennen koetta mitatuista poikasista. Muiden käsittelyiden välillä ei ollut merkitseviä eroja (Liite 2).

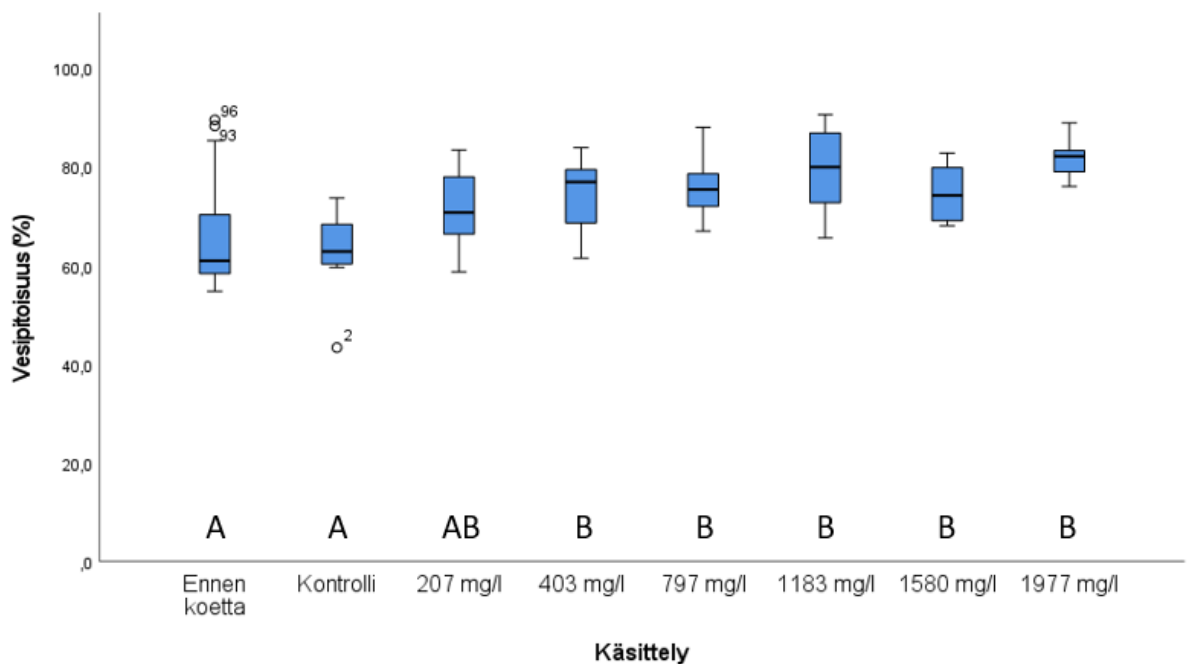
Natriumkloridilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta tuoremassaan (ANOVA $F = 1,569$, $df = 7$, $p = 0,153$, Kuva 3b). Natriumkloridi vaikutti merkitsevästi vesipitoisuuteen (ANOVA $F = 8,785$, $df = 7$, $p < 0,001$, Kuva 3c). Käsittelyiden välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja (Liite 2). Kontrolli erosi merkitsevästi yli 400 mg/l pitoisuuksista. Kontrollissa vesipitoisuus oli 11–23 % pienempi verrattuna muihin pitoisuuksiin. Vesipitoisuus kasvoi natriumkloridipitoisuuden kasvaessa, mutta käsittelyiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.



b)



c)



Kuva 3. Kroonisen natriumkloridialtistuksen vaikutukset jokihelmsimpukan poikasten a) kuivamassaan, b) tuoremassaan ja c) vesipitoisuuteen. Ennen koetta ryhmä on ennen koetta punnittu satunnaisotos (n = 30). Kirjaimet kuvaavat käsittelyiden välisiä eroja. Samalla kirjaimella merkittyjen käsittelyiden välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kuiva- tai tuoremassassa tai vesipitoisuudessa (vrt. Liite 2).

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Natriumkloridin vaikutus jokihelmisimpukan poikasiin

Raakkujen herkkyydestä saasteille tiedetään vähän, sillä niillä ei ole tehty monia toksisuuskokeita, todennäköisesti johtuen lajin uhanalaisuudesta ja monimutkaisesta elinkierrosta. Tässä kokeessa havaittiin kroonisen natriumkloridialtistuksen vaikuttavan vuoden ikäisten raakun poikasten selviytymiseen, aktiivisuuteen ja kasvuun. Raakun poikaset kuolivat suurimmissa pitoisuuksissa (3450 ja 4250 mg/l) ensimmäisten päivien aikana. LC50-pitoisuus tässä kokeessa oli 1994 mg/l ja EC50-pitoisuus 1970 mg/l. Aiemmassa raakun poikasille tehdyssä akuutissa (96 h) natriumkloriditoksisuuskokeessa EC50-pitoisuus, joka laskettiin kuolleisuudesta ja liikkumattomuudesta, vaihteli 960 ja 1600 mg/l pitoisuuksien välillä poikasten iästä riippuen. Nuoremmat poikaset (10 kk) olivat herkempiä suolalle verrattuna vanhempiin poikasiin (22 kk) (Belamy ym. 2020). 28 päivän kroonisessa tutkimuksessa kuolleisuutta havaittiin suuremmissa pitoisuuksissa (1977 mg/l) ja EC50, joka laskettiin aktiivisuusfrekvenssistä, oli myös suurempi (1970 mg/l). Tässä tutkimuksessa vuoden ikäiset poikaset kestivät suurempia natriumkloridipitoisuuksia kuin 22 kuukauden ikäiset poikaset Belamy ym. (2020) kokeessa. Toisella *Margaritifera*-sukuun kuuluvalla simpukkalajin (*Margaritifera falcata*) viikon ikäisille poikasille tehdyssä akuutissa natriumkloriditoksisuuskokeessa EC50, joka laskettiin kuolleisuudesta ja liikkumattomuudesta, oli 1576 mg Cl⁻/l (Wang ym. 2017), mikä taas on suurempi pitoisuus kuin tässä kokeessa (EC50 1195 mg Cl⁻/l). Belamy ym. (2020) ja Wang ym. (2017) kokeet olivat akuutteja toksisuuskokeita, mikä voi vaikuttaa erilaisiin EC50- ja LC50-pitoisuuksiin ja samoin eri muuttujat, joilla EC laskettiin. Tämän kokeen alussa poikaset olivat epäaktiivisempia matalammissa pitoisuuksissa, eli EC50 olisi voinut olla matalampi, jos koe olisi ollut akuutti tai lyhytaikainen krooninen (7 d) koe. Poikaset ovat todennäköisesti kokeen alussa vältelleet suolalle altistumista sulkemalla kuorensa, mikä vähentyi kokeen edetessä, jolloin poikaset ovat voineet sopeutua altistusliuoksille. Sopeutuminen on voinut siis vaikuttaa poikasten aktiivisuuden lisääntymiseen kokeen edetessä.

Muilla makeanveden simpukoilla on havaittu LC50-kloridipitoisuuksia 1740 ja 3442 mg/l välillä ja EC50-kloridipitoisuuksia 911 ja 3092 mg/l välillä. Esimerkiksi alle viikon ikäisillä *Lampsilis siliquoidea* -simpukan poikasilla on raportoitu LC50-kloridipitoisuudeksi 2653–3442 mg/l akuutissa toksisuuskokeessa (Prosser ym. 2017) ja EC50-kloridipitoisuudeksi on taas raportoitu 1893–2246 mg/l, mikä laskettiin kuolleisuudesta ja liikkumattomuudesta (Wang ym. 2017). Saman lajin neljän kuukauden ikäisillä poikasilla taas on raportoitu matalampia LC50-kloridipitoisuuksia, 1917–2782 mg /l (Bringolf ym. 2007, Salerno ym. 2018). Salerno ym. (2018) laskivat poikasille EC50-kloridipitoisuudet hautautumisen ja suodatuksen perusteella, jotka olivat 1736 ja 1703–2003 mg/l. 7–15 kuukauden ikäisillä poikasilla havaittiin LC50-pitoisuuksia 1810–2366 mg Cl⁻/l 7–21 päivän mittaisessa kroonisessa kokeessa (Prosser ym. 2017). Gillis ym. (2022)

tutkimuksessa *Lampsis fasciola*- lajin selviytyminen yli vuoden ikäisillä poikasilla vaihteli 33–60 % niiden altistuessa teiden valumaveden eri laimennoksille. Seitsemän päivän altistuksessa LC50-pitoisuus oli 2140 mg Cl⁻/l. Toksisuuteen on kuitenkin voinut vaikuttaa muut valumavedessä olleet aineet, kuten kalium (Gillis ym. 2022). Salerno ym. (2020) raportoivat samalla lajilla noin vuoden ikäisillä poikasilla matalampia LC50-pitoisuuksia (1740 mg Cl⁻/l). Bringolf ym. (2007) raportoivat *Villosa delumbis* -lajilla LC50-kloridipitoisuudeksi 5230 mg/l. Wang ym. (2017) tutkimuksessa testattiin useiden eri kemikaalien vaikutusta eri simpukkalajeilla. Kloridin vaikutusta testattiin natriumkloridilla, jolla EC50-pitoisuudeksi saatiin *Amblema neislerii* -lajilla 1038 mg Cl⁻/l, *Utterbackia imbecillis* -lajilla 1657 mg Cl⁻/l ja *Megaloniaias nervosa* -lajilla 1398 mg Cl⁻/l (Wang ym. 2017). Rogers ym. (2023) havaitsivat, että 100 % *Villosa iris*-lajin vuoden ikäisistä poikaista kuoli 1662,5 mg Cl⁻/l pitoisuudessa. Tässä kokeessa saatiin vastaavia tuloksia, sillä samassa pitoisuudessa (1650 mg Cl⁻/l) kaikki poikaset kuolivat ensimmäisten päivien aikana. Tämän kokeen tulosten perusteella voitaisiin todeta samoin kuin Belamy ym. (2020) tutkimuksessa, että raakun poikaset vaikuttaisivat olevan herkempiä natriumkloridille verrattuna muihin makeanveden simpukkalajeihin. LC- ja EC-kloridipitoisuudet (1210 ja 1195 mg/l) olivat huomattavasti alhaisempia kuin suurimmalla osalla muista makeanveden simpukkalajeista.

Veden kovuuden on todettu vaikuttavan kloridin toksisuuteen parantaen lajien kestävyyttä kloridille (Elphick ym. 2011, Gillis 2011, Soucek ym. 2011, Prosser ym. 2017, Wang ym. 2018a). Soucek ym. (2011) havaitsi kokeessaan *Ceriodaphnia dubia* -vesikirpuilla veden kovuuden kasvun vähentävän kloridin toksisuutta. LC50-kloridipitoisuus vaihteli 977 ja 1836 mg/l välillä veden kovuuden ollessa 0,61–17,3 mmol/l. Wang ym. (2018a) tutkimuksessa viikon ikäisiä *L. siliquioidea* poikasiasia altistettiin natriumkloridille ja niiden EC50-kloridipitoisuus vaihteli 911 ja 3091 mg/l välillä riippuen veden kovuudesta, joka vaihteli 1,1 ja 6,5 mmol/l välillä. Tässä tutkimuksessa vesi oli pehmeä (0,14 mmol/l), mikä on tyypillistä boreaalisen vyöhykkeen pintavesissä. Tämä on todennäköisesti vaikuttanut siihen, että raakkuihin vaikuttaneet pitoisuudet olivat matalampia kuin muilla simpukkalajeilla tehdyissä tutkimuksissa, joissa vesi on ollut kovempaa.

Tässä tutkimuksessa huomattiin jokihelmisimpukan poikasten aktiivisuuden vähenevän natriumkloridipitoisuuden kasvaessa. Aktiivisuuteen natriumkloridi vaikutti merkittävästi vasta 1977 mg/l pitoisuus. Simpukoiden on havaittu reagoivan muuttuvaan ympäristöön välttelemällä altistumista sulkemalla kuorensa (Pynnönen & Huebner 1995, Cope ym. 2008, Hartmann ym. 2016). Kuoren kiinni pitäminen voi suojata simpukoita ympäristön aiheuttamalta stressiltä, kuten veden saastumiselta, ja säästää samalla suuria määriä energiaa sekä hidastaa aineenvaihduntaa (Ortmann & Grieshaber 2003). Hartmann ym. (2016) huomasivat aikuisten pikkujärvisimpukoiden (*Anodonta anatina*) sulkevan kuorensa tiukasti altistuessaan natriumkloridille. Korkeissa natriumkloridipitoisuuksissa simpukoilla kuoren huomattiin olevan useammin kiinni kuin kontrollissa ja matalissa pitoisuuksissa (Hartmann ym. 2016). Raakun poikasilla havaittiin vastaava käytöstä kroonisessa altistuskokeessa. Hartmann ym. (2016) päättelivät tulostensa perusteella, että simpukat sulkevat kuorensa välttääkseen suolapulssien haitalliset vaikutukset riippuen pulssin pituudesta. Myös poikasilla on havaittu

vastaavaa käytöstä (Wang ym. 2007), mutta ei ole tietoa, kuinka kauan ne pystyvät välttämään altistusta ennen kuin hapenpuutteen ja kuona-aineiden kertymisen aiheuttamat vaikutukset ovat haitallisia (Prosser ym. 2017). Raakun poikaset ovat siis todennäköisesti olleet korkeammassa natriumkloridipitoisuuksissa epäaktiivisia välttääkseen altistumista natriumkloridille, ja olleet varovaisia aktivoituessaan suola-altistuksessa. Hartmann ym. (2016) havaitsivat, että altistetuilla simpukoilla aktivoituminen kesti pidempään verrattuna kontrolliin. Raakun poikasilla on voinut olla tässä kokeessa samanlaista käytöstä kokeen alussa, jossa aktiivisuus oli alhaista, mutta todennäköisen sopeutumisen myötä aktiivisuus kasvoi kokeen edetessä.

Belamy ym. (2023) tutkimuksessa 2- ja 3-vuotialla raakun poikasilla havaittiin samanlaisia tuloksia kuin tässä kokeessa, eli poikasten aktiivisuus laski suolapitoisuuden kasvaessa. Altistetut poikaset eivät liikkuneet yhtä paljon kontrolliin verrattuna, sillä niiden kulkemat reitit olivat rajoittuneimpia. Liikkuminen vähentyi jopa kolmenkertaisesti 24 tunnin aikana (Belamy ym. 2023). Myös kroonisessa kokeessa aktiivisuus laski ensimmäisten vuorokausien aikana samoissa pitoisuuksissa (800 ja 1200 mg/l), mutta kokeen edetessä aktiivisuus kuitenkin kasvoi (Liite 1). Aktiivisuudessa ei ollut merkitseviä eroja samojen pitoisuuksien ja kontrollin välillä kuten Belamy ym. (2023) tutkimuksessa, vaikka 1200 mg/l ja kontrollin välillä olikin lähes merkitsevä ero ($p = 0,061$). Tässä tutkimuksessa aktiivisuuden tarkastelu-aika oli korkeintaan viisi minuuttia per seuranta-ajankohta ja kaikki liike laskettiin aktiivisuudeksi, josta laskettiin aktiivisuusfrekvenssi koko kokeen ajalta, kun taas Belamy ym. (2023) tutkimuksessa aktiivisuutta eli liikkumista kuoppalevyllä mitattiin 24 tunnin altistuksen jälkeen 30 minuuttia videoseurannan avulla. Tässä kokeessa aktiivisuuden seuranta tapahtui altistuksen aikana. Poikasten seuranta-aika oli vain viisi minuuttia aina vedenvaihdon yhteydessä, joten voisi olla tarpeellista seurata aktiivisuutta useammin ja pidempään kuin viisi minuuttia. Kroonisessa toksisuuskokeessa aktiivisuuden seuraaminen voi olla aikaa vievää, mutta aktiivisuutta voisi mahdollisesti tarkastella samoin kuin Belamy ym. (2023) tutkimuksessa.

Belamy ym. (2023) havaitsivat myös, että altistus valolle lisäsi poikasten aktiivisuutta, eli poikaset ovat saattaneet olla aktiivisempia silloin, kun niitä tarkasteltiin mikroskoopin valon alla. Poikaset alkoivat liikkua, kun valo laitettiin päälle, ja niiden aktiivisuus väheni asteittain valon sammuttua (Belamy ym. 2023). Poikasten tarkastelu mikroskoopin valon alla on siis voinut vaikuttaa niiden aktiivisuuteen myös tässä kokeessa. Aktiivisuuteen on voinut lisäksi vaikuttaa tarkastelu huoneenlämmössä. Kukin kuoppalevy oli vedenvaihdon aikana muutaman tunnin huoneenlämmössä, mikä on hetkellisesti vaikuttanut kuoppalevyjen lämpötilaan. Lämpötilan muutos ei välttämättä ole ollut suuri, mutta jo pieni muutos on voinut vaikuttaa poikasten aktiivisuuteen. Valon ja lämpötilan muutos olivat kuitenkin samanlaisia kaikissa käsittelyissä, ja käsittelyiden välinen vaikutus poikasten aktiivisuuteen oli selvä.

Lurman ym. (2014a) kokeessa simpukoiden kuori oli useammin kiinni 14 asteisessa vedessä verrattuna 24 asteiseen veteen. Kylmän lämpötilan on havaittu vaikuttavan simpukoiden aktiivisuuteen (Ortman & Grieshaber 2003). Ortman &

Grieshaber (2003) seurasi *Corbicula fluminea* -lajilla kuoren sulkemiskäytöstä ja huomasivat simpukoiden sulkevan kuorensa useiksi päviksi veden ollessa kylmää talvisaikaan. Tosin niiden kuoret saattoivat myös olla auki pidempiä aikoja (Ortman & Grieshaber 2003). Lurman ym. (2014a, b) tutkimuksessa havaittiin, että talvisin poikaset ovat useammin kiinni ja kiinnioloaika on huomattavasti pidempi kuin kesällä. Talviolosuhteissa suola-altistuksen vaikutukset voivat olla hyvin erilaiset kuin lämpimissä olosuhteissa. Poikasten aktiivisuus on todennäköisesti vähäisempää niiden pitäessä kuortaan kiinni pidempiä aikoja kylmissä olosuhteissa. Lisätutkimusta voitaisiin tehdä tiesuolan vaikutuksista raakun poikasiin kylmissä olosuhteissa, sillä se kuvaisi paremmin tiesuolalle altistumisen vaikutuksia luonnossa. Tämän kokeen lämpötiloissa, 17 °C:ssa, ei suolausta tietenkään tarvita. Koetta ei tehty talvilämpötiloissa, koska kylmissä lämpötiloissa simpukoiden aktiivisuus vähenee (Ortman & Grieshaber 2003, Lurman ym. 2014a, b), jolloin aktiivisuutta olisi ollut vaikeampi seurata eikä viiden minuutin seuranta välttämättä olisi riittänyt arvioimaan suolan vaikutusta aktiivisuuteen. Natriumkloridin tai kloridin vaikutuksia raakun poikasiin on hyvä selvittää, sillä kloridia voi vapautua vesistöihin muutenkin kuin suoraan tiesuolauksen seurauksena, kuten pohjavesistä. Tutkimuksissa on havaittu, että kloridia voi vapautua pohjavesistä myös kesäisin (Kelly ym. 2008, Roy ym. 2015, Kelly ym. 2019).

Tilastollisesti merkitsevää kasvua poikasilla oli havaittavissa ainoastaan kontrollin kuivamassassa. Natriumkloridi vaikuttaisi siis heikentävän poikasten kuivamassan kasvua niiden altistuessa suurille natriumkloridipitoisuuksille. Muissa käsittelyissä poikasten kuivamassa ei ollut kasvanut tai oli jopa kutistunut verrattuna kokeen alussa mitattuun satunnaisotokseen. Wang ym. (2018b) tutkimuksessa havaittiin kahden kuukauden ikäisten *L. siliquoides* -lajin poikasten pituuden ja kuivamassan pienentyneen merkitsevästi 1000 mg/l natriumkloridipitoisuudessa neljä viikkoa kestäneessä kroonisessa altistuksessa. Kontrollissa poikasten kuivamassa oli kasvanut 1,3 kertaa enemmän kuin suola-altistuksessa. Altistuksessa, jossa poikaset olivat olleet hiekassa, toksiset vaikutukset havaittiin alhaisemmissa pitoisuuksissa ja kontrollissa niiden massa oli 1,5 kertaa suurempi (Wang ym. 2018b). Tässä kokeessa jokihelmisimpukan poikasilla kuivamassan pienentyminen oli merkitsevää jo 400 mg/l pitoisuudessa, ja kuivamassa oli 1,5 kertaa suurempi kontrollissa verrattuna muihin pitoisuuksiin. Wang ym. (2024) kokeessa, jossa *L. siliquoides* poikasialtistettiin kaliumkloridille, havaittiin kontrollissa olleiden simpukoiden kasvavan huomattavasti enemmän kuin altistuksissa. Neljän viikon aikana poikasten kuivamassa oli kasvanut 8,5 kertaa suuremmaksi verrattuna kaliumkloridille altistettuihin poikasiin (Wang ym. 2024). Hintz & Relyea (2017) testasivat kahden päivän ikäisillä kirjolohen (*Oncorhynchus mykiss*) poikasilla kolmen eri tiesuolan vaikutusta niiden kasvuun. Natriumkloridi vaikutti selvästi niiden pituuteen ja massaansa suurimmassa pitoisuudessa (3000 mg Cl⁻/l). Massa oli 27 % pienempi verrattuna kontrolliin. (Hintz & Relyea 2017). Paksupäämudulla (*Pimephales promelas*) yli 2920 mg/l kloridipitoisuudet vaikuttivat massaansa negatiivisesti. 3000 mg/l pitoisuudessa kalojen massa oli noin 40 % pienempi verrattuna kontrolliin (Corsi ym. 2010). Raakun poikasten kuivamassa oli 32–43 % pienempi 400–2000 mg/l natriumkloridipitoisuuksissa (240–1200 mg Cl⁻/l) verrattuna kontrolliin.

Suola-altistuksen aikana raakun poikasten epäaktiivisuus on voinut vaikuttaa niiden ravinnon saantiin ja heikentää siten myös niiden kasvua (Ortmann & Grieshaber 2003, Riisgård & Larsen 2015). Ympäristön aiheuttaman stressin on todettu vaikuttavan simpukoiden kuoren liikkeisiin, joten suola-altistus voi lisätä simpukoissa kuoren sulkemista ja samalla simpukat vähentävät ruokailukäyttäytymistään ja hapenkulutusta (Ortmann & Grieshaber 2003, Riisgård & Larsen 2015, Hartmann ym. 2016). Kuoren ollessa kiinni simpukoiden aineenvaihdunta hidastuu (Ortmann & Grieshaber 2003). Raakun poikaset syövät pääsääntöisesti jalkansa avulla suodatuksen sijaan, kunnes ovat tarpeeksi kehittyneitä syömään suodattamalla ravinnon vedestä (Schartum ym. 2017). Jalalla syöminen estyy kuoren ollessa kiinni, mikä on voinut vaikuttaa poikasten aineenvaihduntaan ja samalla niiden kuivamassan pienentymiseen. Korkea suolapitoisuus on voinut aiheuttaa raakun poikasissa myös osmoottista stressiä, mikä voi myös vaikuttaa niiden aineenvaihduntaan ja vähentää kasvua (Ruiz & Souza 2008). Tuoremassassa ei kokeessa havaittu merkitseviä muutoksia. Muutamalla yksilöllä tuoremassa oli huomattavasti suurempi verrattuna muihin. Suolapitoisuuden kasvu lisää simpukoilla veden poistumista elimistöstä veden pyrkiessä siirtymään ulos simpukasta ympäröivään suolaveteen osmoosilla yrittäen tasapainottaa liukoisten aineiden pitoisuutta. Tämä voi aiheuttaa simpukoissa nestehukkaa ja muita haittoja, jos simpukat eivät pysty säätelemään osmoottista tasapainoaan (Zheng & Dietz 1998, Ruiz & Souza 2008). Vesipitoisuuden pitäisi siis laskea suolapitoisuuden kasvaessa, mutta tässä kokeessa vesipitoisuus kuitenkin kasvoi natriumkloridipitoisuuden kasvaessa, vaikka käsittelyiden väliset erot eivät olleetkaan merkitseviä. Poikasten tuoremassaa mitattaessa niiden kuivaamisen yhteydessä niiden sisälle on saattanut jäädä ylimääräistä vettä, mikä on vaikuttanut mittaustulokseen. Virheellinen mittaustulos on voinut osittain vaikuttaa vesipitoisuuteen, mutta se ei kuitenkaan selitä käsittelyiden välisiä eroja.

4.2 Vesistöjen kloridipitoisuudet

Makeiden vesistöjen kloridipitoisuudet ovat normaalisti 0–100 mg/l (Fay & Shi 2012). Vesistöistä on kuitenkin mitattu erilaisia kloridipitoisuuksia, jotka ylittävät tämän arvion, ja pitoisuuksiin näyttäisi vaikuttavan vuodenaika ja paikka (Kaushal ym. 2005, Todd & Kaltenecker 2012). Kloridipitoisuudet vesistöissä vaihtelevat kirjallisuuden mukaan 0,18 ja 4629 mg/l välillä (Thunqvist 2004, Kaushal 2005, Kelly ym. 2008, Novotny ym. 2008, Todd & Kaltenecker 2012, Corsi ym. 2015, Dugan ym. 2017, Kelly ym. 2019). Nämä tutkimukset on tehty Pohjois-Amerikassa, jossa kloridimittauksia on tehty muun muassa teiden läheisyydestä sekä kaupunki-, maatalous- ja metsäalueilla (Thunqvist 2004, Kaushal 2005, Kelly ym. 2008, Novotny ym. 2008, Todd & Kaltenecker 2012, Corsi ym. 2015, Dugan ym. 2017, Kelly ym. 2019). Suomen raakkujoissa on havaittu vuosien 2000–2023 välisenä aikana tehdyissä mittauksissa 0,2–10,1 mg/l kloridipitoisuuksia ja 0,13–2,6 mg/l natriumpitoisuuksia (Suomen ympäristökeskus 2023). Kirjallisuudesta havaitut vesistöjen kloridipitoisuudet ovat suurimmaksi osaksi alle 1000 mg/l eli tämän sekä muiden tutkimusten perusteella makeanveden simpukoille siedettäviä pitoisuuksia

(Bringlof ym. 2007, Roy ym. 2015, Prosser ym. 2017, Wang ym. 2017, 2018a, Salerno ym. 2018, Belamy ym. 2020, Salerno ym. 2020, Gillis ym. 2022). Näissä pitoisuuksissa raakun poikasilla ei havaittu kuolleisuutta eikä niillä myöskään ollut vaikutusta poikasten aktiivisuuteen, joten vesistöjen suolapitoisuudet eivät näyttäisi olevan raakulle haitallisia. Nämä pitoisuudet saattaisivat vaikuttaa lähinnä poikasten kasvuun, sillä tässä kokeessa vaikutukset kuivamassan havaittiin jo 243 mg Cl-/l pitoisuuksissa. Kloridipitoisuudet ovat suurimpia talvella, jolloin mitatut pitoisuudet vesistöissä ovat nousseet korkeimmillaan 1000–4500 mg/l (Kaushal 2005, Todd & Kaltenecker 2012). Talvella vesistöistä mitatut pitoisuudet olisivat jo niin korkeita, että niiden vaikutus raakkuihin olisi haitallinen, jopa kuolettava. Raakun poikasilla havaittiin tilastollisesti merkitseviä muutoksia aktiivisuudessa 1200 mg Cl-/l pitoisuuksissa, mutta aktiivisuus väheni jo 717 mg Cl-/l pitoisuuksissa. Kuolleisuutta raakuilla havaittiin reilun 1000 mg/l kloridipitoisuuksissa ja lähes puolet poikasista kuoli 1200 mg/l kloridipitoisuudessa. Kaikki poikaset kuolivat yli 1700 mg/l kloridipitoisuuksissa. Pintavesistä mitatut pitoisuudet eivät välttämättä kuvasta pitoisuuksia, joille raakun poikaset altistuisivat pohjasedimentissä. Esimerkiksi Suomen Ympäristökeskuksen (2023) julkaiseman aineiston mittaukset oli tehty 0,1–1 m syvyydestä veden pinnasta, eli todennäköisesti ei kovin läheltä joen pohjaa.

Valumavesissä on mitattu korkeampia kloridipitoisuuksia kuin vesistöistä. Esimerkiksi Gillis ym. (2022) mittasivat McGregor Creek ja Baptiste Creek -jokien valumavesissä korkeimmillaan 8250 mg/l kloridipitoisuuksia. Toksisuuskokeissa käytetyistä laimentamattomista näytteistä suurin osa oli akuutisti toksisia kokeessa käytetyille makeanveden simpukanpoikasille (Gillis ym. 2022). Pahin altistuminen suolalle tapahtuisi siis todennäköisemmin teiltä jokiin päätyvästä valunnasta. Jos raakkujen esiintymisalueilla valumavesien pitoisuudet olisivat yhtä suuria kuin Gillis ym. (2022) tutkimuksessa korkeimmat pitoisuudet, vaikutus raakun poikasiin olisi kuolettava. Altistuminen suolalle valumavesissä olisi todennäköisesti lyhytaikaisempaa, eli suola-altistus olisi akuutti eli vaikutukset voivat olla erilaisia, mitä tässä kroonisessa altistuskokeessa havaittiin. Raakulla voitaisiin tehdä lisätutkimusta, kuinka valumavesi vaikuttaa poikasten selviytymiseen. Sulamis- ja valumavesissä, jotka ovat usein happamia, sisältävät usein mahdollisia haitta-aineita eliöstölle, kuten metalleja (Bäckström ym. 2004). Raakkujen on todettu olevan herkkiä useille metalleille (Belamy ym. 2020, 2022), joten valumavesien sisältämällä haitta-aineilla voi myös olla negatiivisia vaikutuksia raakkuihin.

Saastunut pohjavesi voi lisätä natriumia ja kloridia vesistöissä myös kesäisin (Kelly ym. 2008, Corsi ym. 2015, Kelly ym. 2019). Roy ym. (2015) mittasivat pohjavesinäytteistä kloridipitoisuuksia 26–3200 mg/l. Osa pitoisuuksista olivat suurempia kuin kokeessa arvioitu EC50-kloridipitoisuus (1500 mg/l) *L. siliquoides* poikasilla (Roy ym. 2015). Pitoisuudet ylittävät myös tässä kokeessa ja Belamy ym. (2020) mitatut EC50-kloridipitoisuudet raakulle. Kloridipitoisuuksien nousu kesäisin pohjavesistä päätyvän kloridin seurauksena voi vaikuttaa raakun poikasten aktiivisuuteen, kasvuun ja selviytymiseen, jos raakkujokiin vapautuvissa pohjavesissä kloridipitoisuudet ylittävät raakuille siedettävä rajan. Pohjavesistä vapautuva kloridi voi lisäksi vaikuttaa kesän lopussa vapautuviin glokidium-toukkiin. Muilla simpukkalajeilla glokidium-toukille EC50-kloridipitoisuudet ovat

olleet 113 ja 2505 mg/l välillä (Gillis ym. 2011, Beggel & Geist 2015), mitkä ovat matalampia pitoisuuksia kuin mitä osalla poikasista on havaittu. Pikkujärvisimpukoiden glokidium-toukilla havaittiin kloridialtistuksen vaikuttavan negatiivisesti niiden kiinnittymiseen isäntäkaloihin (Beggel & Geist 2015). Glokidium-toukkien altistuminen suolalle saattaisi vaarantaa raakkujen lisääntymisen.

4.3 Käytettyjen muuttujien vertailu

ASTM:n (2013) standardin mukaan simpukat, jotka eivät liiku viiden minuutin seurannan jälkeen pitäisi luokitella kuolleeksi. Tätä havaintokriteeriä käytettäessä tulokset olisivat hyvin erilaiset uuteen standardiin (ASTM 2022) verrattuna, jossa kuolleisuus määritellään siten, että poikanen on liikkumaton ja sillä on jalka ulkona eikä se reagoi kosketukseen, tai jos jäljellä on enää vain avonainen kuori, jossa ei ole jalkaa (jalka on hajonnut). ASTM:n (2013) vanhan standardin mukaan kokeessa kuolleisuus olisi ollut suurempaa kaikissa pitoisuuksissa (Taulukko 4). Kontrollissa kuolleisuus olisi ollut ASTM:n (2013) vanhan standardin mukaan 33 %:ia, jolloin kuolleisuus ei olisi ollut käyttökelpoisen kokeen laatuvaatimusten mukainen. Elossa säilyminen kontrollissa tulisi olla yli 80 %, jotta laatuvaatimukset täyttyvät (ASTM 2013). Kokeen tulokset eivät olisi olleet käyttökelpoiset. Tässä kokeessa kuolleisuus määriteltiin ASTM:n (2022) uuden standardin mukaan, jolloin kontrollissa kuolleisuus oli 0 % 28 päivän altistuskokeessa.

ASTM:n (2013) vanhan määritelmän mukaan osa poikasista olisi luokiteltu kuolleiksi, vaikka ne olisivat olleet vielä elossa. Poikasten aktiivisuutta seurattaessa kokeen aikana huomattiin, että poikaset saattoivat liikkua vielä kokeen aikana, vaikka ne oli kertaalleen merkitty liikkumattomaksi tai kuori kiinni oleviksi, eli olivat passiivisia. Poikaset saattoivat myös olla useammalla tarkastelukerralla liikkumattomia eikä niissä ollut muita merkkejä kuolleisuudesta. Useissa tutkimuksissa on havaittu simpukoiden sulkevan kuorensa altistuessaan saasteille välttämättä niiden haittavaikutuksia (Ortmann & Grieshaber 2003, Hartmann ym. 2016, Salerno ym. 2018). Kuoren kiinni pitäminen on siis täysin normaali reaktio simpukoiden altistuessa saasteille. Tutkimuksissa on havaittu, että simpukat voivat pitää kuorta kiinni 5–20 tuntia. Ne voivat tosin pitää kuorta kiinni pidempiäkin aikoja, jopa useita päiviä (Pynnönen & Huebner 1995, Ortman & Grieshaber 2003). Ortmann & Grieshaber (2003) havaitsivat pitkien epäaktiivisten aikojen olevan pääasiassa talvisin. Kokeen aikana kuoren ja jalan liike väheni poikasten altistuessa epäsuotuisille olosuhteille, mikä kertoo kuoren ja jalan liikkeen vähenemisen olevan stressireaktio. Tämä ei kuitenkaan välttämättä ennusta tulevaa kuolemaa. Esimerkiksi 1200 ja 1600 mg/l natriumkloridipitoisuuksissa raakun poikasten kuori oli suurimmaksi osaksi kiinni kokeen alussa, mutta kokeen lopussa selviytyminen oli 100 %. Jalan liikkeen tai kuoren kiinni pitämistä voitaisiin käyttää poikasten stressin seuraamiseen, jolloin lisääntynyt kuoren kiinni pitäminen olisi merkki ympäristön aiheuttamasta stressistä.

Tässä kokeessa EC-pitoisuudet laskettiin uudella tavalla käyttämällä aktiivisuusfrekvenssiä. ASTM:n (2022) standardin mukaan akuuteissa kokeissa poikasten passiivisuutta käytetään EC-pitoisuuksien laskennassa, mutta tässä

kokeessa passiivisuutta käytettiin uudella tavalla kroonisen altistuskokeen koko kokeen aikaisena aktiivisuusfrekvenssinä. Tämän avulla kokeessa saatiin merkitseviä tuloksia, jonka perusteella aktiivisuusfrekvenssiä voitaisiin käyttää toksisuuskokeissa määrittämään haittaa aiheuttavien aineiden toksisuutta. Aktiivisuuden seurantamenetelmä oli kokeellinen ja sitä voitaisiin kehittää esimerkiksi pidentämällä poikasten aktiivisuuden seuranta-aikaa. Viiden minuutin seuranta vedenvaihdon yhteydessä ei välttämättä anna tarpeeksi tietoa poikasten aktiivisuudesta. Mahdollisesti aktiivisuuden seuranta voitaisiin tehdä useammin. Kroonisessa toksisuuskokeessa aktiivisuuden seuraaminen voi kuitenkin olla aikaa vievää. Aktiivisuutta voisi mahdollisesti tarkastella videokuvaamalla poikasia kuten Belamy ym. (2023) tutkimuksessa.

Tässä kokeessa simpukat olivat kuoppalevyillä. Kuoppalevyillä tehdyssä tutkimuksissa yksilöt voidaan tunnistaa toisistaan. Näin voidaan esimerkiksi seurata, miten yksilön aktiivisuus tai käytös muuttuu altistuskokeen aikana. Simpukat ovat aitoja toistoja eli toisen simpukan kuoleminen ei vaikuta muihin esimerkiksi vesihomeen leviämisen kautta. ASTM:n (2022) standardin mukaan simpukoita olisi viisi yhdessä astiassa, jolloin vesihome voisi levitä yksilöstä toiseen ja näin vaikuttaa kokeen tuloksiin. Kuoppalevyjen käyttö toksisuuskokeissa voisi olla parempi vaihtoehto yksilöiden seuraamisen ja tautien leviämisen estämisen kannalta.

5. PÄÄTELMÄT

Tämän tutkimuksen perusteella tiesuolana käytetty natriumkloridi voi hidastaa raakun poikasten kasvua, vähentää niiden aktiivisuutta ja aiheuttaa kuolleisuutta. Kuivamassan kasvuun suola vaikutti jo matalissa natriumkloridipitoisuuksissa (403 mg/l). Suola-altistuksessa vähentynyt aktiivisuus on voinut vaikuttaa poikasten ravinnon ja hapen saantiin sekä aineenvaihduntaa. Nämä tekijät ovat voineet vaikuttaa raakun poikasten kasvuun. Suolalla oli merkittävä vaikutus kuolleisuuteen ja aktiivisuuteen vasta suuremmissa natriumkloridipitoisuuksissa (1977 mg/l). Raakun poikasilla kuolleisuutta havaittiin suurimmissa pitoisuuksissa (yli 1200 mg Cl-/l), joita luonnossa harvemmin tavataan. Useissa tutkimuksissa korkeimpia kloridipitoisuuksia vesistöistä on mitattu talvisin. Tosin Suomen raakkujoissa mitatut kloridipitoisuudet olivat hyvin matalia ympäri vuoden. Teiden valumavesistä on mitattu suurempia kloridipitoisuuksia. Talvisin ja keväisin valumaveden mukana tuleva tiesuola voisi vaikuttaa raakkuihin enemmän kuin joen kloridipitoisuus. Tässä kokeessa tutkittiin tiesuola-altistuksen kroonisia vaikutuksia, mutta on kuitenkin epävarmaa, tapahtuuko luonnossa kroonista altistusta suolalle. Todennäköisesti altistukset ovat lyhytaikaisia, kun talvella ja keväällä vesistöihin päätyy teiltä suolaa valunnan mukana. Suola-altistuksella voisi kuitenkin olla merkittävä vaikutus raakkupopulaatioihin sen lisätessä entisestään nuorten yksilöiden kuolleisuutta. Raakuilla tarvitaan lisää ekotoksikologista tutkimusta, jotta ymmärrettäisiin paremmin saasteiden roolista raakkupopulaatioiden pienentymisessä.

KIITOKSET

Tahtoisin kiittää ohjaajiani Heini Hyväristä, Juha Karjalaista ja Jouni Taskista ohjauksesta ja avusta Pro gradu -tutkielman teossa. Jokihelmisimpukan poikaset kasvatettiin Konneveden tutkimusasemalla LIFE Revives -hankkeen ja tutkimusaseman henkilökunnan toimesta. Kiitokset myös Xiaoxuan Hulle avusta tilastoanalyysien toteutuksessa.

KIRJALLISUUSLUETTELO

- ASTM International 2013. ASTM International standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels. E2455-06 (2013). Annual Book of ASTM International Standards, Vol 11.06. West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM International 2022. Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels. E2455-22 (2022). Annual Book of ASTM International Standards, Vol 11.06. West Conshohocken, PA, USA.
- Bauer G. 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in central Europe. *Biol. Conserv.* 45: 239–253.
- Beggel S. & Geist J. 2015. Acute effects of salinity exposure on glochidia viability and host infection of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). *Sci. Total Environ.* 502: 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.067>
- Belamy T., Baudrimont M., Cordier M.-A., Dassie È., Gourves P.-Y. & Legeay A. 2022. Sensitivity of newly transformed juveniles of the freshwater pearl mussel: *Margaritifera margaritifera* to acute toxicity of a wide range of contaminants. *Hydrobiologia* 849: 2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04827-7>
- Belamy T., Legeay A., Cachot J., Clérandeau C. & Baudrimont M. 2023. Locomotion behavior of juveniles of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*: A new non-invasive tool for the evaluation of stress effects. *Chemosphere* 327: 138521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138521>
- Belamy T., Legeay A., Etcheverria B., Cordier A.-M., Courves P.-Y. & Baudrimont M. 2020. Acute Toxicity of sodium chloride, nitrates, ortho-phosphates, cadmium, arsenic and aluminum for juveniles of the freshwater pearl mussel: *Margaritifera Margaritifera* (L.1758). *Environments* 7: 48. <https://doi.org/10.3390/environments7060048>
- Blasius B. J. & Merritt R. W. 2002. Field and laboratory investigations on the effects of road salt (NaCl) on stream macroinvertebrate communities. *Environ. Pollut.* 120: 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00142-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00142-2)
- Boeker C., Lueders T., Mueller M., Pander J. & Geist J. 2016. Alteration of physico-chemical and microbial properties in freshwater substrates by burrowing invertebrates. *Limnol.* 59: 131–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2016.05.007>
- Bogan A. E. 1993. Freshwater Bivalve extinction (Mollusca: *Unionoida*): A search for causes. *Amer. Zool.* 33: 599–609.
- Bringolf R. B., Cope W. G., Eads C. B., Lazaro P. R., Barnhart M. C. & Shea D. 2007. Acute and chronic toxicity of technical-grade pesticides to glochidia and juveniles of freshwater mussels (*Unionidae*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 2086–2093. <https://doi.org/10.1897/06-522R.1>
- Brown A. H. & Yan N. D. 2015. Food Quantity Affects the Sensitivity of *Daphnia* to Road Salt. *Environ. Sci. Technol.* 49: 4673–4680. doi:10.1021/es5061534
- Bäckström M., Karlsson S., Bäckman L., Folkesson L. & Lind B. 2004. Mobilisation of heavy metals by deicing salts in a roadside environment. *Water Res.* 38: 720–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.006>

- Cañedo-Argüelles M., Grantham T. E., Perrée I., Rieradevall M., Céspedes-Sánchez R. & Prat N. 2012. Response of stream invertebrates to short-term salinization: a mesocosm approach. *Environ. Pollut.* 166: 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.027>
- Cañedo-Argüelles M., Kefford B. J., Piscart C., Prat N., Schäfer R. B. & Schulz C.-J. 2013. Salinisation of rivers: an urgent ecological issue. *Environ. Pollut.* 173:157–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.011>.
- Cañedo-Argüelles M., Kefford B. & Schäfer R. 2019. Salt in freshwaters: causes, effects and prospects - introduction to the theme issue. *Phil. Trans. R. Soc. B* 374: 20180002. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2018.0002>
- Cope W. G., Bringolf R. B., Buchwalter D. B., Newton T. J., Ingersoll C. G., Wang N., Augspurger T., Dwyer F. J., Barnhart M. C., Neves R. J. & Hammer E. 2008. Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 27: 451–462. DOI: 10.1899/07-094.1
- Corsi S. R., De Cicco L. A., Lutz M. A. & Hirsch R. M. 2015. River chloride trends in snow-affected urban watersheds: increasing concentrations outpace urban growth rate and are common among all seasons. *Sci. Total Environ.* 508: 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.012>
- Corsi S. R., Graczyk D. J., Geis S. W., Booth N. L. & Richards K. D. 2010. A fresh look at road salt: aquatic toxicity and water-quality impacts on local, regional, and national scales. *Environ. Sci. Technol.* 44: 7376–7382. <https://doi.org/10.1021/es101333u>
- Cosgrove P. J. & Hastie L. C. 2001. Conservation of threatened freshwater pearl mussel populations: river management, mussel translocation and conflict resolution. *Biol. Conserv.* 99: 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00174-9)
- Cosgrove P. J., Young M. R., Hastie L. C., Gaywood M. & Boon P. J. 2000. The status of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* Linn. in Scotland. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 10: 197–208. [https://doi.org/10.1002/1099-0755\(200005/06\)10:3<197::AID-AQC405>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1099-0755(200005/06)10:3<197::AID-AQC405>3.0.CO;2-S)
- Cuttelod A., Seddom M. & Neubert E. 2011. European Red List of non-marine molluscs. Luxemburg: Euroopan unionin julkaisutoimisto.
- Dailey K. R., Welch K. A. & Lyons W. B. 2014. Evaluating the influence of road salt on water quality of Ohio rivers over time. *J. Appl. Geochem.* 47: 25–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.05.006>
- Degerman E., Alexanderson S., Bergengren J., Henrikson L., Johansson B.-E., Larsen B. M. & Söderberg H. 2009. Restoration of freshwater pearl mussel streams. WWF Sweden, Solna.
- Denic M. & Geist J. 2017. The freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Bavaria, Germany – population status, conservation efforts and challenges. *Biol. Bull.* 44: 61–66. DOI: 10.1134/S1062359017010034
- Dugan H. A., Bartlett S. L., Burke S. M., Doubek J. P., Krivak-Tetley F. E., Skaff N. K., Summers J. C., Farrell K. J., McCullough I. M., Morales-Williams A. M., Roberts D. C., Ouyang Z., Scordo F., Hanson P. C. & Weathers K. C. 2017.

- Salting our freshwater lakes. *PNAS* 114: 4453–4458.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1620211114
- Elphick J. R. F., Bergh K. D. & Bailey H. C. 2011. Chronic toxicity of chloride to freshwater species: effects of hardness and implications for water quality guidelines. *Environ. Toxicol. Chem.* 30: 239–246.
<https://doi.org/10.1002/etc.365>
- Evans M. & Frick C. 2001. The effects of road salts on aquatic ecosystems. Environment Canada WSTD Contribution No. 02–308.
- Fay L. & Shi X. 2012. Environmental impacts of chemicals for snow and ice control: state of the knowledge. *Water Air Soil Pollut.* 223: 2751–2770.
<https://doi.org/10.1007/s11270-011-1064-6>
- Findlay S. E. G. & Kelly V. R. 2011. Emerging indirect and long-term road salt effects on ecosystems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1223: 58–68.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05942.x>
- Geist J. & Auerswald K. 2007. Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshw. Biol.* 52: 2299–2316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01812.x>
- Geist J. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia* 644: 69–88. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-010-0190-2>
- Geist J. 2011. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecol. Indic.* 11: 1507–1516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.002.n>
- Gillis P. 2011. Assessing the toxicity of sodium chloride to the glochidia of freshwater mussels: implications for salinization of surface waters. *Environ. Pollut.* 159: 1702–1708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.032>
- Gillis P. L., Salerno J., McKay V. L., Bennett C. J., Lemon K. L. K., Rochfort Q. J. & Prosser R. S. 2022. Salt-laden winter runoff and freshwater mussels; assessing the effect on early life stages in the laboratory and wild mussel populations in receiving waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 239–254.
<https://doi.org/10.1007/s00244-020-00791-2>
- Gonçalves A. M. M., Castro B. B., Pardal M. A & Gonçalves F. 2007. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). *Ann. Limnol. Int. J. Lim.* 43: 13–20.
- Hartmann J. T., Beggel S., Auerswald K., Stoeckle B. C. & Geist J. 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 170: 279–288.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>
- Hastie L. C., Boon P. J. & Young M. R. 2000a. Physical microhabitat requirements of freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Hydrobiologia* 429: 59–71. DOI:10.1023/A:1004068412666
- Hastie L. C. & Young M. R. 2003. Timing of spawning and glochidial release in Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Freshw. Biol.* 48: 2107–2117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01153.x>
- Hastie L. C., Young M. R., Boon P. J., Cosgrove P. J. & Henninger B. 2000b. Size, densities and age structure of Scottish *Margaritifera margaritifera* (L.) populations. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 10: 229–247.

- [https://doi.org/10.1002/1099-0755\(200007/08\)10:4<229::AID-AQC409>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1099-0755(200007/08)10:4<229::AID-AQC409>3.0.CO;2-3)
- Hintz W. D., Mattes B. M., Schuler M. S., Jones D. K., Stoler A. B., Lind L. & Relyea R. A. 2017. Salinization triggers a trophic cascade in experimental freshwater communities with varying food-chain length. *Ecol. Appl.* 27: 833–844. <https://doi.org/10.1002/eap.1487>
- Hintz W. D. & Relyea R. A. 2017b. Impacts of road deicing salts on the early-life growth and development of a stream salmonid: Salt type matters. *Environ. Pollut.* 223: 409–415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.040>
- Howard J. K. & Cuffey K. M. 2006. The functional role of native freshwater mussels in the fluvial benthic environment. *Freshw. Biol.* 51: 460–474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01507.x>
- Hyvärinen H. S. H., Sjöberg T., Marjomäki T. J. & Taskinen J. 2022. Effect of low dissolved oxygen on the viability of juvenile *Margaritifera margaritifera*: Hypoxia tolerance ex situ. *Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 32: 1393–1400. <https://doi.org/10.1002/aqc.3859>
- Jones D. K., Mattes B. M., Hintz W. D., Schuler M. S., Stoler A. B., Lind L. A., Cooper R. O. & Relyea R. A. 2016. Investigation of road salts and biotic stressors on freshwater wetland communities. *Environ. Pollut.* 221: 159–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.060>
- Jungbluth J. H. 2011. The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in Germany. *Ferrantia* 64: 5-12.
- Karjalainen J., Hu X., Mäkinen M., Karjalainen A., Järvisjö J., Järvenpää K., Sepponen M. & Leppänen M. T. 2023. Sulfate sensitivity of aquatic organism in soft freshwaters explored by toxicity tests and species sensitivity distribution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 258: 114984. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114984>
- Kaushal S. S., Groffman P. M., Likens G. E., Belt K. T., Stack W. P., Kelly V. R., Band L. E. & Fisher G. T. 2005. Increased salinization of fresh water in the northeastern United States. *PNAS* 38: 13517-13520. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506414102
- Kelly C. R., Findlay S. E., Hamilton S. K., Lovett G. M. & Weathers K. C. 2019. Seasonal and long-term dynamics in stream water sodium chloride concentrations and the effectiveness of road salt best management practices. *Water Air Soil Pollut.* 230: 13. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4060-2>
- Kelly V. R., Lovett G. M., Weathers K. C., Findlay S. E. G., Strayer D. L., Burns D. J. & Likens G. E. 2008. Long-term sodium chloride retention in a rural watershed: legacy effects of road salt on streamwater concentration. *Environ. Sci. Technol.* 42: 410–415. DOI: 10.1021/es071391l
- Koryak M., Stafford L. J., Reilly R. J. & Magnuson P. M. 2001. Highway deicing salt runoff events and major ion concentrations along a small urban stream. *J. Freshw. Ecol.* 16: 125–134. <https://doi.org/10.1080/02705060.2001.9663795>
- Lopes-Lima M., Burlakova L. E., Karatayev A. Y., Mehler K., Seddon M. & Sousa R. 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia* 810: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3486-7>

- Lopes-Lima M., Sousa R., Geist J., Aldridge D. C., Araujo R., Bergengren J., Y. Bespalaya Y., Bódis E., Burlakova L., Van Damme D., Douda K., Froufe E., Georgiev D., Gumpinger C., A. Karatayev A., Kebapçı Ü., Killeen I., Lajtner J., Larsen B. M., Lauceri R., Legakis A., Lois S., Lundberg S., Moorkens E., Motte G., Nagel K.-O., Ondina P., Outeiro A., Paunovic M., Prié V., von Proschwitz T., Riccardi N., Rudzīte M., Rudzītis M., Scheder C., Seddon M., Şereflişan H., Simić V., Sokolova S., Stoeckl K., Taskinen J., Teixeira A., Thielen F., Trichkova T., Varandas S., Vicentini H., Zajac K., Zajac T. & Zogaris S. 2017. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biol. Rev.* 92: 572–607. <https://doi.org/10.1111/brv.12244>
- Lummer E.-M., Auerswald K. & Geist J. 2016. Fine sediment as environmental stressor affecting freshwater mussel behavior and ecosystem services. *Sci. Total Environ.* 517: 1340-1348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.027>
- Lurman G. J., Walter J. & Hoppeler H. H. 2014a. The effect of seasonal temperature variation on behaviour and metabolism in the freshwater mussel (*Unio tumidus*). *J. Therm. Biol.* 43: 13–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.04.005>
- Lurman G., Walter J. & Hoppeler H. H. 2014b. Seasonal changes in the behaviour and respiration physiology of the freshwater duck mussel, *Anodonta anatina*. *J. Exp. Biol.* 217: 235–243. <https://doi.org/10.1242/jeb.093450>
- Mahrosh U., Kleiven M., Meland S., Rosseland B. O., Salbu B. & Teien H.-C. 2014. Toxicity of road deicing salt (NaCl) and copper (Cu) to fertilization and early developmental stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Hazard. Mater.* 280: 331–339. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.076>
- Moorkens E., Cordeiro J., Seddon M. B., von Proschwitz T. & Woolnough D. 2017. *Margaritifera margaritifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T12799A128686456. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T12799A508865.en>
- Mullaney J. R., Lorenz D. L. & Arntson A. D. 2009. Chloride in groundwater and surface water in areas underlain by the glacial aquifer system, northern United States: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2009–5086, 41 s.
- Nogueira L. S., Bianchini A., Wood C. M., Loro V. L. Higgins S. & Gillis P. L. 2015. Effects of sodium chloride exposure on ion regulation in larvae (glochidia) of the freshwater mussel *Lampsilis fasciola*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122: 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.003>
- Novotny E. V., Murphy D., Stefan H. G. 2008. Increase of urban lake salinity by road deicing salt. *Sci. Total Environ.* 406: 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.037>
- Olofsson P. 2017. Regional monitoring of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in the county of Norrbotten Sweden. *Biol. Bull.* 44:74–80. DOI: 10.1134/S1062359017010095
- Ortmann C. & Grieshaber M. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *J. Exp. Biol.* 206: 4167–4178. <https://doi.org/10.1242/jeb.00656>

- Oulasvirta P., Leinikki J. & Syväranta J. 2017. Freshwater pearl mussel in Finland – current status and future prospects. *Biol. Bull.* 44: 81–91. DOI: 10.1134/S1062359017010101
- Prosser R. S., Rochfort Q., McInnis R., Exall K. & Gillis P. L. 2017. Assessing the toxicity and risk of salt-impacted winter road runoff to the early life stages of freshwater mussels in the Canadian province of Ontario. *Environ. Pollut.* 230: 589–597. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.001>
- Pynnönen K. S. & Huebner J. 1995. Effects of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve. *War. Res.* 29: 2579–2582.
- Riisgård H. U. & Larsen P. S. 2015. Physiologically regulated valve-closure makes mussels long-term starvation survivors: test of hypothesis. *J. Molluscan Stud.* 81: 303–307. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyu087>
- Ritz C., Baty F., Streibig J. C., & Gerhard D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10: e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rogers J. J., Henley W. F., Weberg A. G., Jones J. W. & Cope W. G. 2023. Histological evaluations of organ tissues reveal sublethal effects in a freshwater mussel (*Villosa iris*) exposed to chloride and potassium concentrations below benchmark estimates. *Aquat. Toxicol.* 258: 106476. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106476>
- Roy J. W., McInnis R., Bickerton G. & Gillis P. L. 2015. Assessing potential toxicity of chloride-affected groundwater discharging to an urban stream using juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoides*). *Sci. Total Environ.* 532: 309–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.023>
- Ruiz J. L. & Souza M. M. 2008. Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 151: 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.03.028>
- Salerno J., Gillis P. L., Bennett C. J., Sibley P. K. & Prosser R. S. 2018. Investigation of clearance rate as an endpoint in toxicity testing with freshwater mussels (*Unionidae*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163: 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.054>
- Salerno J., Gillis P. L., Khan H., Burton E., Deeth L. E., Bennett C. J., Sibley P. K. & Prosser R. S. 2020. Sensitivity of larval and juvenile freshwater mussels (*Unionidae*) to ammonia, chloride, copper, potassium, and selected binary chemical mixtures. *Environ. Pollut.* 256: 113398. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113398>
- Salonen J. K., Marjomäki T. J. & Taskinen J. 2016. An alien fish threatens an endangered parasitic bivalve: the relationship between brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 26: 1130–1144. <https://doi.org/10.1002/aqc.2614>
- Salonen, J. K., P.-L. Luhta, E. Moilanen, P. Oulasvirta, J. Turunen & J. Taskinen, 2017. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*) differ in their suitability as hosts for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in northern Fennoscandian rivers. *Freshw. Biol.* 62: 1346–1358. <https://doi.org/10.1111/fw.12947>

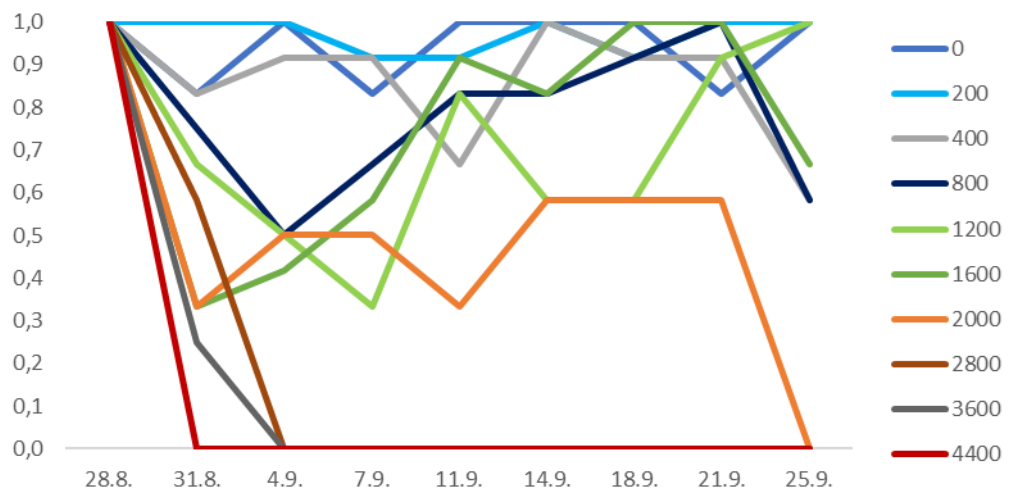
- Sarma S. S. S., Nandini S., Morales-Ventura J., Delgado-Martinez I. & Gonzales-Valverde L. 2006. Effects of NaCl salinity on the population dynamics of freshwater zooplankton (rotifers and cladocerans). *Aquat. Ecol.* 40: 349–360.
- Schartum E., Mortensen S., Pittman K. & Jakonben P. J. 2017. From pedal to filter feeding: ctenidial organogenesis and implications for feeding in the postlarval freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *J. Molluscan Stud.* 83: 36–42. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyw037>
- Sikorski L. 2021. Effects of sodium chloride on algae and crustaceans—the neighbouring links of the water trophic chain. *Water* 13: 2493. <https://doi.org/10.3390/w13182493>
- Simon O. P., Vanícková I., Bílyb M., Doudae K., Patzenhauerová H., Hruska J. & Peltánováca A. 2015. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. *Limnologica* 50: 11–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2014.11.0040075-9511/>
- Soucek D. J., Linton T. K., Tarr C. D., Dickinson A., Wickramanayake N., Delos C. G. & Cruz L. A. 2011. Influence of water hardness and sulfate on the acute toxicity of chloride to sensitive freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 30: 930–938. <https://doi.org/10.1002/etc.454>
- Spooner D. E. & Vaugh C. C. 2006. Context-dependent effects of freshwater mussels on stream benthic communities. *Freshw. Biol.* 51: 1016–1024. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01547.x>
- Strayer D. L., Downing J. A., Haag W. R., King T. L., Layzer J. B, Newton T. J. & Nichols S. J. 2004. Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. *BioScience* 54: 429–439. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0429:CPOPMN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0429:CPOPMN]2.0.CO;2)
- Suomen ympäristökeskus 2023. Herttatietokanta https://www.syke.fi/fi-FI/Avoin_tieto/Ymparistotietojarjestelmat
- Taskinen J., Berg P., Saarinen-Valta M., Vätilä S., Mäenpää E., Myllynen K. & Pakkala J. 2011. Effect of pH, iron and aluminum on survival of early life history stages of the endangered freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 93: 1764–1777. <https://doi.org/10.1080/02772248.2011.610798>
- Thunquist E.-L. 2004. Regional increase of mean annual chloride concentrations in water due to the application of deicing salt. *Sci. Total Environ.* 325: 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.020>
- Todd A. K. & Kaltenecker M. G. 2012. Warm season chloride concentrations in stream habitats of freshwater mussel species at risk. *Environ. Pollut.* 171: 199–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.040>
- Vaugh C. C. 2018. Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia* 810: 15–27. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3139-x>
- Vaugh C. C. & Hakenkamp C. C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 46: 1431–1446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x>
- Wang N., Ingersoll C. G., Hardesty D. K., Ivey C. D., Kunz J. L., May T. W., Dwyer F. J., Roberts A. D., Augspurger T., Kane C. M., Neves R. J. & Barnhart M. C.

2007. Acute toxicity of copper, ammonia, and chlorine to glochidia and juveniles of freshwater mussels (*Unionidae*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 2036–2047. <https://doi.org/10.1897/06-523R.1>
- Wang N., Ingersoll C. G., Ivey C. D., Hardesty D. K., May T. W., Augspurger T., Roberts A. D., van Genderen E., Barnhart M. C. 2010. Sensitivity of early life stages of freshwater mussels (*Unionidae*) to acute and chronic toxicity of lead, cadmium, and zinc in water. *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 2053–2063. <https://doi.org/10.1002/etc.250>
- Wang N., Ivey C. D., Dorman R. A., Ingersoll C. G., Steevens J., Hammer E. J., Bauer C. R. & Mount D. R. 2018a. Acute Toxicity of sodium chloride and potassium chloride to a Unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) in water exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 37: 3041-3049. <https://doi.org/10.1002/etc.4206>
- Wang N., Ivey C. D., Ingersoll C. G., Brumbaugh W. G., Alvarez D., Hammer E. J., Bauer C. R., Augspurger T., Raimondo S. & Barnhart M. C. 2017. Acute sensitivity of a broad range of freshwater mussels to chemicals with different modes of toxic action. *Environ. Toxicol. Chem.* 36: 786–796. <https://doi.org/10.1002/etc.3642>
- Wang N., Kunz J. L., Cleveland D., Dorman R. A., Steevens J. A., Raimondo S., Augburger T. & Barnhart M. C. 2024. Evaluation of chronic effects of potassium chloride and nickel on survival, growth and reproduction of a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*). *Environ. Toxicol. Chem.* 00: 1–15. <https://doi.org/10.1002/etc.5843>
- Wang N., Kunz J. L., Dorman R. A., Ingersoll C. G., Steevens J. A., Hammer E. J. & Bauer C. R. 2018b. Evaluation of chronic toxicity of sodium chloride or potassium chloride to a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) in water exposures using standard and refined toxicity testing methods. *Environ. Toxicol. Chem.* 37: 3050–3062. <https://doi.org/10.1002/etc.4258>.
- Young M. R., Cosgrove P. J. & Hastie L. C. 2001. The extent of, and causes for, the decline of a highly threatened naid: *Margaritifera margaritifera*. Teoksessa Bauer G. & Wächtler K. (toim.) *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida*. Springer-Verlag, Berliini, pp. 337–357.
- Young M. & Williams J. 1983. The status and conservation of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* Linn. in Great Britain. *Biol. Conserv.* 25: 35–52.
- Zao Q., Zhang Y., Guo F., Leigh C. & Jia X. 2021. Increasing anthropogenic salinisation leads to declines in community diversity, functional diversity and trophic links in mountain streams. *Chemosphere* 263:127994. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127994>
- Zheng H. & Dietz T. H. 1998. Paracellular solute uptake in the freshwater Bivalves *Corbicula fluminea* and *Toxolasma texasensis*. *Biol. Bull.* 194: 170-177.
- Österling M. E., Greenberg L. A. & Arvidsson B. L. 2008. Relationship of biotic and abiotic factors to recruitment patterns in *Margaritifera margaritifera*. *Biol. Conserv.* 141: 1365–1370. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.03.004>
- Österling. M. E., Arvidsson B. L. & Greenberg L. A. 2010. Habitat degradation and the decline of the threatened mussel *Margaritifera margaritifera*: influence of

turbidity and sedimentation on the mussel and its host. *J. Appl. Ecol* 47: 759–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01827.x>

Österling M. & Högberg J.-O. 2014. The impact of land use on the mussel *Margaritifera margaritifera* and its host fish *Salmo trutta*. *Hydrobiologia* 735: 213–220. DOI 10.1007/s10750-013-1501-1

LIITE 1. POIKASTEN AKTIIVISUUDEN MUUTOKSET NATRIUMKLORIDIALTISTUKSEN AIKANA.



**LIITE 2. PARITTAINEN VERTAILUN P-ARVOT JOKIHELMISIM-
PUKOIDEN KUIVAMASSASSA (A) JA VESIPITOISUUK-
SISSA (B) ERI NATRIUMKLORIDIPITOISUUKSIEN VÄ-
LILLÄ.**

A)

	Ennen koetta	Kontrolli	207	403	797	1183	1580	1977
Ennen koetta	-	0,037	0,905	0,965	0,757	0,781	1	0,844
Kontrolli	-	-	0,741	0,013	0,003	0,003	0,051	0,013
207			-	0,523	0,255	0,271	0,818	0,376
403				-	1	1	1	1
797					-	1	0,984	1
1183						-	0,987	1
1580							-	0,985
1977								-

B)

	Ennen koetta	Kontrolli	207	403	797	1183	1580	1977
Ennen koetta	-	0,996	0,303	0,017	0,005	<0,001	0,022	<0,001
Kontrolli	-	-	0,190	0,015	0,005	<0,001	0,017	<0,001
207			-	0,977	0,903	0,204	0,976	0,155
403				-	1	0,787	1	0,593
797					-	0,923	1	0,755
1183						-	0,819	0,999
1580							-	0,626
1977								-