Pro Gradu -tutkielma

Antimonin biosaatavuus peltolieroille (*Aporrectodea tuberculata*) ja sitoutuminen lehtimetsämaassa

Anna Repo

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

19.3.2008

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ympäristötiede

REPO, A.M: Antimonin biosaatavuus peltolieroille (*Aporrectodea tubeculata*) ja sitoutuminen lehtimetsämaassa
Pro Gradu -tutkielma: 29 s.
Työn ohjaajat: FT Jari Haimi ja FT Ari Väisänen
Tarkastajat: Prof. Aimo Oikari ja FT Jari Haimi
Maaliskuu 2008

Hakusanat: bioakkumulaatio, Lumbriciedae, puolimetallit, Sb, vaiheittaiset uutot

TIIVISTELMÄ

Metallin kokonaispitoisuus maaperässä ei kerro kaikkea sen haitallisuudesta. Biosaatavuuden huomiointi on avain luotettavaan altistumisen ja vaikutusten arviointiin. Antimonin kemiasta, ympäristökohtalosta ja biologista vaikutuksista tiedetään vähän. Antimoni sitoutuu maaperässä raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin ja orgaaniseen ainekseen. Ei kuitenkaan tiedetä, kuinka maaperän rakenteelle ja toiminnalle tärkeät lierot altistuvat antimonille. Tässä tutkimuksessa selvitettiin, onko antimoni biosaatava peltolieroille, jotka altistuvat haitta-aineille sekä ihon että ruuansulatuskanavan kautta. Tavoitteena oli myös tutkia vaiheittaisten uuttojen avulla antimonin sitoutumista lehtimetsämaassa ja lierojen vaikutusta sitoutumiseen. Laboratoriokokeessa peltolieroja (*Aporrectodea tuberculata*) altistettiin antimonitrioksidilla kontaminoidulle lehtimetsämaalle. Kahden viikon altistuksen aikana antimoni ei vaikuttanut lierojen kuolleisuuteen suurissakaan Sb-pitoisuuksissa (10 000 mg/kg). Kun peltolieroja altistettiin kahden kuukauden ajan pitoisuuksille 10 mg/kg, 50 mg/kg ja 100 mg/kg, antimoni ei vaikuttanut lierojen kuolleisuuteen, biomassaan tai lisääntymiseen. Mitattujen kudospitoisuuksien perusteella antimoni ei kertynyt peltolieroihin. Kudospitoisuuksissa ei myöskään havaittu eroja eri altistusaikojen tai antimonipitoisuuksien välillä. Vaiheittaiset uutot osoittivat orgaanisen aineksen olevan lehtimetsämaassa tärkeä antimonin sitoja. Karbonaatteihin, ioninvaihtopinnoille ja (oksi)hydroksideihin antimoni sitoutui lehtimetsämaassa vain vähäisissä määrin. Sitoutuminen ei muuttunut kahden kuukauden aikana eivätkä lierot vaikuttaneet siihen. Vaiheittaisten uuttojen tulosten vertailu lehtimetsämaan ja kontaminoituneen maan referenssiaineen (SRM 2710) välillä osoitti antimonin sitoutumisen maaperän eri maa-aineksiin olevan maaperäkohtaista. Referenssiaineessa Sb-pitoisuus orgaanisessa aineksessa oli enintään samaa suuruusluokkaa kuin (oksi)hydroksidifraktiossa. Lehtimetsämaassa orgaaninen aines oli (oksi)hydroksideja tärkeämpi sorptiopinta sitoen neljästä viiteen kertaa enemmän antimonia kuin (oksi)hydroksidifraktio. Lehtimetsämaassa raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideja oli vähemmän kuin referenssimaassa, mikä voi selittää eroja antimonin sitoutumisessa. Vaikka iso osa antimonista oli sitoutunut orgaaniseen ainekseen, jota lierot käyttävät ravintonaan, antimoni ei kertynyt peltolierojen kudoksiin. Antimonitrioksidina lisätyn antimonin biosaatavuus peltolieroille lehtimetsämaassa oli heikkoa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Ecological and Environmental Science

REPO, A.M.: The bioavailability of antimony to earthworm *Aporrectodea tuberculata* and sorption in deciduous forest soil

Master of Science Thesis: 29 p.
Supervisors: PhD Jari Haimi and PhD Ari Väisänen
Inspectors: Prof. Aimo Oikari and PhD Jari Haimi
March 2008

Key Words: bioaccumulation, Lumbricidae, metalloids, Sb, sequential extraction

ABSTRACT

Total concentrations of metals are not always directly related to adverse effects. When assessing exposure and effects bioavailability should be incorporated. Chemistry, environmental fate and biological effects of antimony are not well known. Antimony adsorbs to iron and manganese (oxy)hydroxides and to organic matter in soil. However, it is not known whether earthworms are exposed to antimony while ingesting their way through soil. The objective of the present study was to find out whether antimony is bioavailable and toxic to *Aporrectodea tuberculata* Eisen earthworms which are exposed to contaminants in soil not only through direct dermal contact but also through ingestion of soil. In addition the sorption of antimony in deciduous forest soil and the possible effect of earthworms on the sorption were studied. In this laboratory experiment earthworms were exposed to soil contaminated with Sb_2O_3. In a preliminary test of acute toxicity antimony did not cause earthworm mortality even in high concentrations (10 000 mg/kg). When earthworms were exposed for two months to added antimony concentrations 10 mg/kg 50 mg/kg and 100 mg/kg antimony did not have any effect on earthworm mortality, biomass or reproduction. Tissue concentration measurements showed that antimony did not accumulate in earthworms. Any differences in tissue concentrations due to different antimony exposure concentrations or due to exposure time were not demonstrated. Sequential extractions of soil samples showed the importance of the organic matter as a sorption surface for antimony in deciduous forest soil. Only small amounts of antimony were detected from the carbonate fraction, from the ion exchange surfaces and from the (oxy)hydroxide fraction of deciduous forest soil samples. The results of the sequential extractions of the deciduous forest soil and the standard reference material (NIST SRM 2710) were compared and the results suggest that the sorption of antimony is site-specific. Differences in the sorption of antimony in these soil samples may be due to disparity in iron and manganese (oxy)hydroxide concentrations. Although a large proportion of added antimony was sorbed to organic matter that earthworms feed on, antimony did not accumulate in earthworm tissue or have toxic effects on earthworms. Thus the bioavailability of antimony to earthworms in deciduous forest soils was low.

Sisältö

1. JOHDANTO 5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT 7
2.1 Tutkimusmateriaali 7
2.2 Esikoe 8
2.3 Biosaatavuuskoe 8
2.4 Antimonin sitoutuminen maa-aineksiin 9
2.5 Metallianalyysit 10
2.6 Tilastolliset analyysit 12
3. TULOKSET 13
3.1 Antimonin vaikutus lierojen kuolleisuuteen, biomassaan ja lisääntymiseen 13
3.2 Maan ominaisuudet ja Sb-pitoisuudet 15
3.3 Antimonin kudospitoisuus lieroissa 19
4. TULOSTEN TARKASTELU 19
4.1 Antimonin vaikutus lierojen kuolleisuuteen, biomassaan ja lisääntymiseen sekä kertyminen lieroihin 19
4.2 Antimonin sitoutuminen maaperässä 22
4.3 Tutkimusmenetelmät 24
4.4 Johtopäätökset 25
Kiitokset 26
Kirjallisuus 26

1. JOHDANTO

Perinteisesti maaperän metallikontaminaation kriteerit perustuvat arvioihin kokonaispitoisuuksista (Peijnenburg ym. 1997, Allen 2002, Pellinen ym. 2007). Kokonaispitoisuus kertoo kuitenkin vain vähän metallin haitallisuudesta (Peijnenburg ym. 1997). Kun riskinarvioinnissa selvitetään altistumista ja vaikutuksia, on keskeistä huomioida metallin biosaatavuus maaperästä eli pitoisuus, jolle eliöt todellisuudessa altistuvat (Baker ym. 2003, Komulainen 2005). Jos biosaatavuutta ei tarkastella, voidaan sortua ylilyönteihin tai vaikutusten aliarviointeihin (Allen 2002). Biosaatavuus on dynaaminen prosessi, jota määrittävät sekä maaperän fysikaaliset ja kemialliset sitoutumisprosessit että eliön fysiologia (Peijnenburg ym. 1997). Biosaatavuus siis kuvaa, kuinka helposti haitta-aine on eliön käytettävissä ympäristöstä ja missä määrin se absorboituu eliöön. Toksikologinen biosaatavuus liittyy haitta-aineen jakautumiseen yksilön sisässä ja toksisiin vaikutuksiin. Se on kohde-elimen saavuttava ja siellä vaikuttava pitoisuus (Lanno ym. 2004, Peijnenburg ym. 2007). Biosaatavuus riippuu metallista, eliöstä, ympäristöoloista ja altistusajasta (Peijnenburg ym. 2007).

Biosaatavuuden arvioinnissa on käytetty erilaisia menetelmiä. Fysikaaliset ja kemialliset analyysit selvittävät metallien sitoutumista ja sitoutumisen lujuutta, ja ne perustuvat mm. ioniaktiivisuuksien määrittämiseen, tasapainomalleihin, spektroskopiaan, erilaisiin uuttoihin ja metallin jakautumisen tutkimiseen puoliläpäisevien kalvojen avulla (Sauvé 2002, McGeer ym. 2004, Peijnenburg ym. 2007). Liukoisuustesteillä pyritään määrittämään eliöihin siirtyvä osuus (Pellinen ym. 2007). Yleisimmin käytettyjä ovat vesi-, asetaatti- ja erilaiset suolaliuosuutot, jotka perustuvat oletukseen, että kiinteässä faasissa pysyvä haitta-aine ei aiheuta ekologista riskiä (Sauvé 2002). Uutot ovat mallilaskelmia luotettavampi tapa tapauskohtaiseen altistuksen arviointiin (Pellinen ym. 2007). Yhtä yleisesti hyväksyttyä biosaatavuuden mittaria ei kuitenkaan ole (Sauvé 2002, Pellinen ym. 2007).

Fysikaalisten ja kemiallisten analyysien tulokset on vaikea suhteuttaa ekosysteemin toimintaan, eivätkä esimerkiksi uutot tuota yleistettäviä arvioita metallien biosaatavuudesta (Sauvé 2002, Didden 2003). Näin ollen eliöiden vasteet kuvaavat parhaiten elinympäristön sopivuutta ja ympäristössä tapahtuvia muutoksia (Didden 2003). Vain eliöiden avulla voidaan perimmiltään selvittää, onko haitta-aine biosaatava (Lanno ym. 2004). Eliöiden käyttö biosaatavuuden tutkimisessa huomioi mm. luonnolliset altistumisreitit, käyttäytymisvasteet ja eliön mahdolliset detoksifikaatiomekanismit. Suorat biosaatavuuden mittarit perustuvat eliön kudoksiin absorboiman haitta-aineen pitoisuuden määrittämiseen ja kertovat luotettavimmin aineen biosaatavuudesta, sillä ne yhdistävät biosaatavuutta säätelevät abioottiset ja bioottiset tekijät (Lanno ym. 2004). Kudospitoisuus ei kerro suoraan toksisuudesta (Didden 2003, Lanno ym. 2004). Kuitenkin metallin biosaatavuus on edellytys haitallisille vaikutuksille. Kriittinen kudospitoisuus (CBR, Critical Body Residue) yhdistää kudospitoisuuden ja letaalin tai subletaalin toksisen vasteen (McCarty & Mackay 1993). Erilaiset kemialliset uutot ja biomarkkerit – kuten entsyymitoiminnan inhibitio, kuolleisuus tai lisääntymisvasteet – ovat Lannon ym. (2004) mukaan epäsuoria biosaatavuuden mittareita, koska ne eivät suoraan kerro pitoisuutta, jolle eliöt altistuvat.

Yhdistämällä biotestejä ja kemiallisia analyysejä saadaan kaikkein luotettavinta tietoa riskinarviointiin (Haimi 2000, Sauvé 2002). Biotestit kertovat metallien biosaatavuudesta ja vaikutuksista eliöihin, ja kemialliset analyysit voivat selittää korkean tai heikon biosaatavuuden syitä esimerkiksi kuvaamalla metallin sitoutumista maa-aineksiin.

Metallien sitoutuminen maaperässä ja sitoutumisen lujuus vaikuttavat olennaisesti niiden biosaatavuuteen (Allen 2002). Pidättymiseen ja kulkeutumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat mm. komplekseja muodostavien yhdisteiden määrä, raudan, alumiinin ja mangaanin (oksi)hydroksidien määrä, orgaanisen aineksen määrä, savimineraalien määrä ja laatu, maaperän vedenläpäisykyky sekä maaperän happamuus ja hapetus-pelkistysolot. Nämä puolestaan riippuvat maaperän maalajeista, kerrosrakenteesta, kallioperän mineraalikoostumuksesta, maannostumisprosesseista, pohjavesioloista sekä pohjaveden ja sadeveden kemiallisesta koostumuksesta. Edellisten lisäksi myös metallin hapetusaste, kemialliset ominaisuudet ja veden ionisuhteet säätelevät, mitkä ioneista pidättyvät maaperään ja mitkä huuhtoutuvat. (White 1979, Alloway 1990, Heikkinen 2000). Metallien tarkkojen sitoutumistapojen ja esiintymismuotojen selvittäminen on kuitenkin hankalaa. Tällöin hyvänä kompromissiratkaisuna toimii laajempien muotojen ja faasien määrittäminen (Quevauviller ym. 1993). Uuttamalla vaiheittaisesti uuttoreagenssien vahvuutta lisäten voidaan maaperän maa-ainekset eristää tarkasti (Ure 1990). Näillä vaiheittaisilla uutoilla voidaan kuvata metallien sitoumista maa-aineksiin, mm. ioninvaihtopinnoille, orgaaniseen ainekseen, ja raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin, sekä sitoutumisen lujuutta maaperässä (Tessier ym. 1979, Peijnenburg ym. 1997).

Antimoni on mm. paristoissa, luodeissa, puolijohteissa, lasiteollisuudessa ja palonestoaineena käytetty puolimetalli, jonka Euroopan yhteisö on luokitellut haitallisten aineiden prioriteettilistalle (Filella ym. 2002a, Coucil of European Union 2006). Kemiallisilta ominaisuuksiltaan antimoni muistuttaa arseenia (Mitsunobu 2000, Krachler ym. 2001), eikä sillä uskota olevan biologista merkitystä (Filella ym. 2002a, Steely ym. 2007). Kuten muidenkin metallien, antimonin toksisuus riipuu kemiallisesta sitoutumismuodosta, yhdisteiden liukoisuudesta ja vuorovaikutuksesta ligandien kanssa (Krachler ym. 2001, Flynn ym. 2003). Antimoni esiintyy luonnossa hapetusluvuilla Sb(III) ja Sb(V), joista pentavalentti antimoni on yleisempi maaperä-maavesisysteemissä (Lintschinger ym. 1998 Johnson ym. 2005, Mitsunobu 2006, Scheinost ym. 2007, Steely ym. 2007). Metallimuotoinen Sb on toksisempi kuin sen suolat, ja trivalentit Sb-yhdisteet ovat pentavalentteja jopa 10 kertaa toksisempia (Krachler 2001). International Agency for Research on Cancer on luokitellut antimonitrioksidin mahdollisesti karsinogeeniseksi ihmisille (IARC 1989). Antimonin taustapitoisuudet ovat alle 1 mg/kg, Suomessa keskimäärin 0,3 mg/kg (Edwards 1990, Valtioneuvoston asetus 214/2007). Pienten taustapitoisuuksien ja antimoniyhdisteiden niukkaliukoisuuden vuoksi antimonia ei ole pidetty huolenaiheena (Filella ym. 2002b). Taustapitoisuuksia huomattavasti korkeampia pitoisuuksia on kuitenkin havaittu esim. kaivosalueilla (Hammel ym. 2000, Flynn ym. 2003, Gál ym. 2006), sulattojen läheisyydessä (Ainsworth ym. 1990a), teollisuusalueilla (Lintschinger ym. 1998) ja ampumaradoilla (Johnson ym. 2005, Steely ym. 2007). Kontaminaatio voi olla arvioitua suurempaa, sillä käytössä olevat analyysimenetelmät aliarvioivat todelliset antimonipitoisuudet maaperässä (Krachler ym. 2001).

Antimonin kemiallisista muodoista, muuntumisesta, ympäristökohtalosta tai biologisista vaikutuksista tiedetään vähän, ja selvitykset koskien esiintymistä ja kemiaa on tehty vesiympäristöissä (Filella ym. 2002a, 2002b). Antimonin biosaatavuustutkimus on keskittynyt kaivosalueille. Biosaatavuutta on tutkittu liukoisuuskokeilla (Hammel ym. 2000, Flynn ym. 2003, Gál ym. 2006) ja analysoimalla antimonipitoisuuksia kasveista luonnossa ja laboratoriossa (Hammel ym. 2000, Murciego ym. 2007, Baroni ym. 2000). Antimonin liikkuvuutta ja biosaatavuutta säätelevät tekijät ovat kuitenkin vielä epäselviä. Antimoni esiintyy usein anionina (Vink 1996) ja käyttäytyy maaperässä päinvastoin kuin monet raskasmetallikationit, jolloin raskasmetallikationien pidättyessä lähes neutraaliin tai lievästi happamaan lehtimetsä- tai peltomaahan antimoni voikin olla biosaatavassa muodossa.

Lierot ovat monien ekosysteemien hajottajayhteisöissä yksi tärkeimmistä eläinryhmistä. Ne vaikuttavat ravinteiden kiertoon ja parantavat maaperän rakennetta (Lee & Foster 1991, Edwards & Bohlen 1995). Liikkuessaan maaperässä lierot ovat jatkuvassa kontaktissa epätasaisesti maaperään jakautuneiden haitta-aineiden kanssa ja altistuvat niille sekä ihon että ruunsulatuskanavan kautta. Lierojen fysiologiaa ja ekologiaa on tutkittu, ja metallien vaikutuksia lieroissa voidaan arvioida solu-, kudos- , yksilö- ja populaatiotasoilla (Lanno ym. 2004). Altistusreitin ja tärkeän biologisen merkityksensä vuoksi lierot ovat erinomaisia biosaatavuuden mittareita (Lanno ym. 2004).

Antimonin biosaatavuutta ei ole tutkittu laboratorio-oloissa lieroilla. Useat tutkimukset osoittavat antimonin sitoutuvan orgaaniseen ainekseen (Lintschinger ym. 1997, Buschmann & Sigg 2004, Steely ym. 2007) ja raudan ja alumiinin (oksi)hydroksideihin (Lintschinger ym. 1997, Johnson ym. 2005, Leuz ym. 2006, Mitsunobu ym. 2006, Scheinost ym. 2006). Ei kuitenkaan tiedetä, kuinka lierot altistuvat maaperässä antimonille. Maaperän kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet yhdessä lierojen fysiologian ja käyttäymisen kanssa määrittävät metallien biosaatavuuden lieroille (Lanno ym. 2004). Biologisten vaikutusten kannalta oleellista on, kuinka tiukasti antimoni on sitoutunut maahan. Voiko antimoni olla biosaatava lieroille, jotka syövät tiensä läpi maa-aineksen?

Tässä tutkimuksessa selvitettiin:

- Onko antimonilla haitallisia vaikutuksia peltolieroihin?
- Onko antimoni biosaatava peltolieroille ja muuttuuko biosaatavuus ajan myötä antimonin sitoutuessa maahan?
- Mihin maa-ainekseen ja miten vahvasti antimoni sitoutuu, vaikuttavatko lierot sitoutumiseen ja selittääkö sitoutuminen eri maa-aineksiin biosaatavuutta?

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimusmateriaali

Tutkimuksessa oli kaksi osaa, joista ensimmäisessä (esikoe) selvitettiin, millä pitoisuusalueella antimoni vaikuttaa lierojen kuolleisuuteen ja biomassaan. Tutkimuksen toisessa osassa (biosaatavuuskoe) seurattiin antimonin vaikutusta lierojen biomassaan ja lisääntymiseen sekä antimonin kudospitoisuutta, kun lieroja altistettiin esikokeen perusteella valituissa Sb-pitoisuuksissa kahden kuukauden ajan. Biosaatavuuskokeessa selvitettiin myös vaiheittaisten uuttojen avulla antimonin sitoutumista lehtimetsämaan maa-aineksiin ja ajan vaikutusta sitoutumiseen. Samassa yhteydessä tutkittiin myös lierojen vaikutusta antimonin sitoutumiseen.

Peltoliero (*Aporrectodea tuberculata* Eisen) on yleinen ja runsas lierolaji suomalaisessa lehtimetsämaassa (Terhivuo 1989). Se on elintavaltaan endogeeninen eli syö tietään maan läpi sekoittaen samalla maa-aineksia ja altistuen maaperän haitta-aineille sekä ihon että ruuansulatuskanavan kautta (Edwards & Bohlen 1995, Lanno ym. 2004). Ravintonaan peltolierot käyttävät lähinnä maan orgaanista ainesta ja siinä eläviä mikrobeja (Edwards & Bohlen 1995). Peltolieroja ja muita *Aporrectodea*-lajeja on käytetty useissa metallien kertymistä koskevissa tutkimuksissa, joita ovat koonneet yhteen Nahmami ym. (2007).

Kokeissa käytetty maa ja tarvittavat peltolierot kerättiin toukokuun lopussa 2007 lehtimetsästä Jyväskylän Ylistönrinteestä (62° 14´N, 25° 44´E). Tutkimusta varten peltolierot poimittiin käsin lehtimetsästä ensin esikoetta varten ja myöhemmin biosaatavuuskoetta varten. Lieroja säilytettiin omassa maassaan kasvukammiossa

+10 °C:ssa noin kaksi viikkoa ennen esikokeen ja biosaatavuuskokeen alkua. Säilytysastioiden pinnalle lisättiin leikattua nurmea ja lehtiä lierojen ravinnoksi.

Seulotusta maasta (seulan läpimitta 5 mm) määritettiin kosteusprosentti punnitsemalla kuusi rinnakkaista noin 50 g:n näytettä, joita kuivattiin +80 °C:ssa 48 tunnin ajan. Orgaanisen aineksen osuus kuivapainosta määritettiin tuhkaamalla neljä noin 1 g:n näytettä +550 °C:ssa neljän tunnin ajan. Jäljelle jääneestä mineraaliaineksesta analysoitiin raudan ja mangaanin kokonaispitoisuus. Maan vedenpidätyskyky (WHC) määritettiin kolmesta rinnakkaisesta näytteestä ISO 11268-2-standardin liitteen C mukaan käyttäen suodatinpaperin sijaan huokoista käsipaperia. Orgaanisen aineen osuus määritettiin myös kontaminoituneen maan referenssiaineesta SRM 2710 (National Institute of Standards & Technology) punnitsemalla 250 mg kuivaa referenssiainetta kolmena rinnakkaisena näytteenä ja tuhkaamalla ne +550 °C:ssa neljän tunnin ajan. Orgaanisen aineen osuuden määrityksessä käytettiin kustannussyistä vähemmän referenssiainetta kuin lehtimetsämaan tapauksessa.

2.2 Esikoe

Esikokeessa noudatettiin soveltuvin osin lieroilla tehtävän akuutin toksisuuden standarditestin preliminary test -osiota (ISO 11268-1). Antimoni lisättiin antimonitrioksidina (Sb_2O_3), sillä metallisen antimonin oheella Sb_2O_3 on yleisin antimonin muoto Suomessa alueilla, joissa antimonipitoisuudet ovat korkeat (Olli-Pekka Jaakola, SGS Finland, suullinen tiedonanto). Antimonitrioksidissa antimonin hapetusaste on +III, joka on antimonin hapetusasteista toksisempi kuin Sb(V) (Krachler ym. 2001). Sb_2O_3 (Riedel-de Haën) sekoitettiin puhtaaseen lehtimetsämaahan siten, että lisätyt antimonin pitoisuudet kuiva-ainetta kohti eri käsittelyissä olivat noin 0 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg ja 1000 mg/kg. Sb_2O_3 on niukkaliukoinen veteen, joten kutakin käsittelypitoisuutta varten Sb_2O_3 sekoitettiin ensin 10 g:aan kuivaa, hienonnettua lehtimetsämaata. Tämä seos sekoitettiin lopun maan kanssa. Antimonin lisäyksen yhteydessä maan kosteusprosentti nostettiin 30 %:iin (46 %:iin vedenpidätyskyvystä). Kutakin esikoekäsittelyä varten valmistettiin 700 g maata (kuiva-aine). Kontaminoidun maan kosteusolojen annettiin tasaantua kasvukammiossa +10 °C:ssa seitsemän vuorokautta ennen lierojen lisäämistä (ISO 11268-1).

Esikokeessa kussakin pitoisuuskäsittelyssä oli yksi koeastia, johon lisättiin kymmenen peltolieroa. Kuhunkin koeastiaan valittiin satunnaisesti kymmenen peltolieroa, jotka punnittiin yhdessä. Ennen punnitusta maa poistettiin lierojen pinnalta huuhtelemalla ne vedessä ja kuivaamalla ne kevyesti käsipaperilla. Esikokeessa käytetyillä peltolieroilla oli selkeästi erottuva clitellum. Koeastioina käytettiin yhden litran lasiastioita, joihin punnittiin kuhunkin 500 g (kuiva-aine) antimonilla kontaminoitua maata. Koeastiat peitettiin rei'itetyllä muovilla. Kustakin pitoisuudesta mitattiin pH(H_2O), ja kosteusprosentti lierojen lisäämisen jälkeen ja esikokeen lopussa.

Kuolleisuus ja biomassa tarkistettiin seitsemän ja 14 päivän kuluttua lierojen lisäämisestä koeastioihin. Kunkin koeastian lierot punnittiin kuten edellä. Esikokeessa ei 14 päivän aikana havaittu kuolleisuutta yhdessäkään pitoisuudessa, joten esikokeen pitoisuussarjaa täydennettiin vielä pitoisuudella 10 000 mg/kg. Tämä pitoisuus valmistettiin kuten edellä käyttäen samaan aikaan kerättyä maata ja peltolieroja kuin muissa esikokeen pitoisuuksissa oli käytetty.

2.3 Biosaatavuuskoe

Biosaatavuuskokeeseen altistuspitoisuudet valittiin esikokeen perusteella sitten, että ne eivät merkittävästi vaikuttaisi lierojen aktiivisuuteen. Lierojen ei haluttu vaipuvan diapaussiin, jolloin ne eivät liiku ja altistuminen maaperän haitta-aineille on vähäistä.

Pitoisuuksien valinnassa huomioitiin myös valtioneuvoston asetuksen ohjearvot: alempi ohjearvo 10 mg/kg ja ylempi ohjearvo 50 mg/kg (Valtioneuvoston asetus maaperän pilaantuneisuuden ja puhdistustarpeen arvioinnista 214/2007). Kokeen antimonipitoisuudet kuiva-ainetta kohti olivat: 0 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg ja 100 mg/kg lisättyä antimonia. Kutakin pitoisuutta valmistettiin neljä koeastiaa, joihin kuhunkin lisättiin viisi lieroa. Kuten esikokeessa, antimoni sekoitettiin puhtaaseen lehtimetsämaahan seitsemän vuorokautta ennen lierojen lisäämistä (ISO 11268-1). Kutakin pitoisuuskäsittelyä varten kontaminoitiin 5 kg maata, lukuun ottamatta pitoisuutta 50 mg/kg, jota valmistettiin 10 kg ja käytettiin myös tutkittaessa lierojen vaikutusta antimonin sitoutumiseen maaperässä. Sb_2O_3 sekoitettiin ensin 50 g:aan kuivaa, hienonnettua maata. Seos sekoitettiin maahan ja kosteusprosentti nostettiin 30 %:iin lisäämällä vettä. Tämän jälkeen maa sekoitettiin hyvin. Seitsemän vuorokauden kuluttua antimonilla kontaminoitu maa jaettiin kahden litran reikäkannellisiin muoviastioihin siten, että jokaiseen koeastiaan tuli yksi kilo kuiva-ainetta. Kuhunkin koeastiaan lisättiin viisi yhdessä punnittua lieroa, jotka oli käsitelty kuten esikokeessa. Lierot lisättiin eri pitoisuuskäsittelyihin satunnaisessa järjestyksessä. Koeastiat siirrettiin satunnaiseen järjestykseen kasvukammioon +10 °C:een. Kosteus pidettiin vakiona punnitsemalla koeastiat viikoittain ja lisäämällä tarvittaessa vettä. Koeastioiden paikkaa kasvukammiossa vaihdettiin kerran viikossa. Maan pH(H_20) määritettiin kustakin pitoisuudesta yhdestä satunnaisesti valitusta koeastiasta kokeen alussa ja lopussa. Maan orgaanisen aineksen osuus määritettiin kokeen lopussa kustakin pitoisuudesta yhdestä satunnaisesti valitusta koeastiasta.

Biosaatavuuskokeen yhteydessä perustettiin myös koesarja, jossa tutkittiin lierojen vaikutusta antimonin sitoutumiseen maaperässä. Biosaatavuuskokeen pitoisuuden 50 mg/kg koeastioita valmisteltiin kaksinkertainen määrä. Neljään koeastiaan lisättiin peltolierot (biosaatavuuskoe) ja neljään ei lisätty lieroja. Lierottomat koeastiat toimivat kontrolleina tutkittaessa lierojen vaikutusta antimonin sitoutumiseen, ja näitä koeastioita käsiteltiin yhdessä biosaatavuuskokeen koeastioiden kanssa kaikissa vaiheissa samalla tavalla.

Kuukauden kuluttua kaikkiin koeastioihin lisättiin 3 g tuoretta nurmenleikkuujätettä lierojen ravinnoksi. Kahden viikon kuluttua nurmen lisäämisestä siinä havaittiin hometta, jolloin nurmi poistettiin mahdollisimman tarkasti kaikista koeastioista. Koeastioiden kosteus säädettiin huomioiden poistetun nurmen massa.

Lierojen biomassan muutosta seurattiin punnitsemalla lierot edellä kuvatulla tavalla kahden viikon, kuukauden ja kahden kuukauden kuluttua lierojen lisäämisestä. Samalla kirjattiin myös mahdolliset diapaussissa olleet yksilöt. Samoina ajanhetkinä kustakin koeastiasta valittiin satunnaisesti yksi liero, josta määritettiin antimonin kudospitoisuus. Kahden kuukauden altistuksen jälkeen kaikista koeastioista märkäseulottiin (seulan läpimitta 0,59 mm) munakotelot kahden päivän sisällä kokeen päättymisestä. Munakotelot huuhdeltiin ja laitettiin vedellä kostutetuilla suodatinpapereilla (Whatman 41) varustetuille petrimaljoille. Tislattua vettä ei käytetty osmoottisen tasapainon säilyttämiseksi. Munakoteloiden annettiin kehittyä kasvukammiossa +10°C asteessa kahden kuukauden ajan. Suodatinpaperi pidettiin kosteana lisäämällä tarvittaessa muutama pisara vettä. Kahdesti viikossa tarkistettiin, oliko munakoteloista kuoriutunut lieroja.

2.4 Antimonin sitoutuminen maa-aineksiin

Vaiheittaisia uuttoja ja kosteusprosentin määrittämistä varten jokaisesta koeastiasta punnittiin viidestä osanäytteestä koostuva 10 g:n kokoomanäyte kokeen alussa sekä kuukauden ja kahden kuukauden kuluttua lierojen lisäämisestä. Vaiheittaiset uutot tehtiin kosteasta maasta, sillä kuivaaminen olisi saattanut vaikuttaa antimonin sitoutumiseen. Kosteusprosentti näytteenottohetkellä määritettiin punnitsemalla kokoomanäytteestä noin

5 g maata, jota kuivattiin lämpökaapissa +60 °C:ssa 48 tunnin ajan. Vaiheittaisia uuttoja varten jokaisesta kokoomanäytteestä punnittiin 500 mg 50 ml:n sentrifugiputkeen, jolloin jokaisesta koeastiasta tehtiin määritys. Vaiheittaiset uutot tehtiin viiden vuorokauden kuluessa näytteenotosta ja näytteitä säilytettiin +10 °C:ssa näytteenkäsittelyyn asti.

Vaiheittaiset uutot tehtiin samalla tavalla neljänä rinnakkaisena määrityksenä myös kontaminoituneen maan referenssiaineelle SRM 2710 (National Institute of Standards & Technology), jonka sertifioitu antimonipitoisuus on 38,4 ± 3 mg/kg kuiva-ainetta kohti. Referenssiainetta käytettiin sellaisenaan ja antimonipitoisuuksia ilmoitettaessa huomioitiin referenssiaineen kosteus 2,3 %.

2.5 Metallianalyysit

Näytteiden käsittely kokonaispitoisuuksien ja eri maa-ainesten sitoman antimonin analysoimiseksi tehtiin ultraääniavusteisesti. Ultraääni-vesihaudetta käytettäessä useita näytteitä voidaan käsitellä kerralla, näytteiden käsittely on nopeaa ja reagenssien kulutus vähäistä (Väisänen & Kiljunen 2005). Antimonipitoisuuksien määrittämiseen käytettiin kaikissa vaiheissa ultraääni-vesihaudelaitetta Elma® Model Transsonic 820/H, 650W, 35kHz. Metallianalyysien laimennokset ja liuokset tehtiin ultrapuhtaalla vedellä (18,2 Ω cm^{-1}, ELGA maxima water system). Käytetyt reagenssit olivat analyyttistä laatua.

Esikokeen lopussa kustakin pitoisuudesta määritettiin antimonin kokonaispitoisuus ultraääniavusteisella kuningasvesiuutolla (Väisänen ym. 2002). Kustakin pitoisuudesta otettiin kolme noin 10 g:n (tuorepaino) viidestä osanäytteestä koostuvaa kokoomanäytettä. Kuivatut maanäytteet (+80 °C, 48 tuntia) hienonnettiin yksitellen huhmareessa ja hienonnettua maata punnittiin 500 mg 50 ml:n sentrifugiputkeen. Putkeen lisättiin 10 ml ultrapuhtaalla vedellä laimennettua (1:1) kuningasvettä (1:3 HNO_3 HCl; HNO_3 65 %, HCl 36–38 %, molemmat J.T. Baker). Näytteitä käsiteltiin +40 °C:ssa ultraääni-vesihauteessa neljä kertaa kolme minuuttia. Käsittelyjen välissä sentrifugiputkia ravisteltiin käsin sedimentaation välttämiseksi. Näytteiden jäähdyttyä ne suodatettiin (Whatman nro 41) 50 ml:n mittapulloon. Jäännös pestiin suodattimella kolmeen kertaan pienellä määrällä ultrapuhdasta vettä. Näytteet laimennettiin tarkasti 50 ml:aan ja siirrettiin muovipulloihin. Myös biosaatavuuskokeessa käytettyjen maiden antimonipitoisuus tarkistettiin ennen lierojen lisäämistä samalla tavalla yhtenä näytteenä kustakin pitoisuudesta.

Raudan ja mangaanin kokonaispitoisuus lehtimetsämaan mineraaliaineksessa määritettiin vastaavasti neljänä rinnakkaisena näytteenä. Tuhkattuun ja punnittuun maanäytteeseen lisättiin 10 ml 1:1 ultrapuhtaalla vedellä laimennettua kuningasvettä (1:3, HNO_3:HCl, HNO_3 65 % Fluka, HCl 37 % Riedel-de Haën) ja näytteitä käsiteltiin 40 °C:ssa ultraääni-vesihauteessa (Decon F5400B) kolme kertaa kolme minuuttia ravistellen putkia käsittelyjen välillä. Näytteet suodatettiin, laimennettiin 50 ml:aan ja siirrettiin muovipulloihin.

Vaiheittaisten uuttojen tulos kertoo metallin sitoutumisesta ioninvaihtopinnoille, karbonaatteihin, raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin, orgaaniseen ainekseen ja jäännösfraktioon, joka kuvaa mineraaliaineksen sisältämää Sb-pitoisuutta (Tessier ym. 1979, Peijnenburg ym. 1997). Antimonille optimoidussa vaiheittaisten uuttojen sarjassa näytteitä käsiteltiin ultraääni-vesihauteessa asteittain voimistuvilla uuttoreagensseilla kolmen minuutin sarjoissa ja käsittelyjen välissä putkia ravisteltiin käsin sedimentaation välttämiseksi (Pöyhönen 2007). Menetelmä perustuu Tessierin ym. (1979) kehittämään menetelmään, ja sen vertailukelpoisuus BCR:n (European Community Bureau of Reference, nykyisin SMT) standardimenetelmään on selvitetty erillisessä tutkimuksessa (Pöyhönen 2007). Ultraäänikäsittelyn jälkeen näyte sentrifugoitiin 3000 rpm kymmenen minuutin ajan (Sanyo, Harrier 18/80). Uutos pipetoitiin 25 tai 50 ml:n mittapulloon, mittapullo täytettiin merkkiin ultrapuhtaalla vedellä ja näyte siirrettiin muovipulloon.

Vaiheittaisissa uutoissa erotettiin seuraavat fraktiot:

Fraktio I - etikkahappoon liukenevat/ karbonaattit ja kationinvaihtopinta

Sentrifugiputkeen punnittiin 500 mg maata, putkeen lisättiin 20 ml 0,11M CH_3COOH (>90%, VWR International) ja näytettä käsiteltiin ultraääni-vesihauteessa huoneenlämpöisessä vedessä kolme minuuttia. Uutos sentrifugoitiin ja pipetoitiin 25 ml:n mittapulloon. Ennen laimennusta 25 ml:aan näyte kestävöitiin lisäämällä 1 ml väkevää typpihappoa (Merck).

Fraktio II - pelkistyvät/ raudan ja mangaanin (oksi)hydroksidit

Edellisen jäännökseen lisättiin 20 ml 0,5M hydroksyyliamiini hydrokloridia, ($NH_2OH \bullet HCl$, Merck), jonka pH noin 1,5 oli säädetty väkevällä typpihapolla. Näytettä käsiteltiin ultraääni-vesihauteessa huoneenlämpöisessä vedessä viisi kertaa kolme minuuttia. Näyte sentrifugoitiin kuten edellä, uutos pipetoitiin 50 ml:n mittapulloon ja laimennettiin ultrapuhtaalla vedellä.

Fraktio III - hapettuvat/ orgaaninen aines ja sulfidit

Edellisen jäännökseen lisättiin 3 ml 0,02M HNO_3 (Merck) ja 10 ml 1:1 ultrapuhtaalla vedellä laimennettua 30 %:sta vetyperoksidia (H_2O_2, Riedel-de-Haën), jonka pH ~ 2 oli säädetty väkevällä typpihapolla. Näytettä käsiteltiin ultraääni-vesihauteessa, 75 °C:ssa, kolme kertaa kolme minuuttia. Näytteen jäähdyttyä se sentrifugoitiin kuten edellä ja uutos pipetoitiin 50 ml:n mittapulloon. Jäännös pestiin 5ml:lla 3,2M ammoniumasetaattia (CH_3COONa, J.T. Baker, lisätty 20 tilavuus-% HNO_3, Merck). Näyte sentrifugoitiin ja pesuliuos pipetoitiin samaan mittapulloon. Uutos laimennettiin 50 ml:aan ultrapuhtaalla vedellä.

Fraktio IV - kuningasveteen liukeneva osuus/ jäännösfraktio

Jäännökseen lisättiin 5 ml 1:1 ultrapuhtaalla vedellä laimennettua kuningasvettä (1:3 HNO_3 16M, Merck; HCl 12M, J.T.Baker). Näyte käsiteltiin ultraääni-vesihauteessa, 40 °C:ssa, kolme kertaa kolme minuuttia. Näyte suodatettiin 25 ml:n mittapulloon (Whatman nro 41) ja jäännös pestiin kahteen kertaan noin 5 ml:lla ultrapuhdasta vettä. Mittapullo täytettiin merkkiin ultrapuhtaalla vedellä.

Kokonaispitoisuudet ja eri maa-ainesten sitomat metallipitoisuudet mitattiin ICP-OES-laitteistolla (Perkin Elmer Optima 4300DV). Mittauksia varten valmistettiin kontrolli- ja standardiliuokset, joissa oli vastaava reagenssitausta kuin maanäytteissä. Antimonin kokonaispitoisuuksien standardiliuokset valmistettiin laimentamalla standardiliuoksesta 1000 mg/l (Merck) pitoisuudet 0,1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l ja 100 mg/l. Vastaavasti fraktioiden pitoisuuksien mittaamista varten valmistettiin kontrolliliuokset ja standardiliuokset 0,1 mg/l, 1 mg/l ja 10 mg/l. Raudan ja mangaanin kokonaispitoisuuden mittaamiseksi valmistettiin kontrolliliuos ja standardiliuoksista (Fe 1000 mg/l ja Mn 1000 mg/l) laimennettiin kolme liuosta, joissa oli pitoisuudet: Fe 1 mg/l ja Mn 0,2 mg/l, Fe 10 mg/l ja Mn 2 mg/l sekä Fe 100 mg/l ja Mn 20 mg/l. Raudan ja mangaanin pitoisuuden mittaamiseksi fraktiosta II valmistettiin kontrolliliuoksen lisäksi liuokset, joissa oli sekä rautaa että mangaania 0,2 mg/l, 2 mg/l ja 20 mg/l.

Kahden viikon, kuukauden ja kahden kuukauden altistuksen jälkeen kustakin koeastiasta valittiin satunnaisesti yksi liero, josta määritettiin antimonin kudospitoisuus. Lierojen annettiin tyhjentää suoli kasvukammiossa (+10 °C) kosteilla käsipapereilla vuoratuissa lasipurkeissa kolmen vuorokauden ajan. Koprofagian välttämiseksi käsipaperit

vaihdettiin päivittäin. Suolensa tyhjentäneet lierot punnittiin, pakastettiin (-21 °C, 30 minuuttia) ja kuivattiin lämpökaapissa 60 °C:ssa 72 tunnin ajan. Metallimäärityksiä varten kuivatut lierot liuotettiin kuningasveteen (Lukkari ym. 2004). Kuivatut lierot käsiteltiin tasapohjaisissa 25 ml:n lasiputkissa lisäämällä kuhunkin 10 ml ultrapuhtaalla vedellä laimennettua (1:1) kuningasvettä (1:3 HNO_3 ja HCl; HNO_3 65 % ja HCl 36–38 %, molemmat J.T.Baker) ja kuumentamalla vesihauteessa 50–60 °C:ssa kunnes liero oli hajonnut. Jäähtynyt näyte suodatettiin (Whatman nro 41) 50 ml:n mittapulloon. Jäännös pestiin suodattimella kolmeen kertaan pienellä määrällä ultrapuhdasta vettä. Mittapullo täytettiin merkkiin ultrapuhtaalla vedellä, jonka jälkeen näyte siirrettiin muovipulloon. Lieronäytteet analysoitiin GFAAS-laitteistolla (Perkin Elmer Aanalyst 800).

Koska kahden viikon ja kuukauden altistuksen jälkeen lierojen antimonin kudospitoisuudet jäivät alle määritysrajan, kahden kuukauden altistuksen jälkeen lieronäytteet käsiteltiin liuottamalla kuiva liero 5 ml:aan väkevää kuningasvettä kuumassa vesihauteessa. Lieronäytteitä hajotettaessa todettiin, että lämpötilan noustessa yli 60 °C:een näytteet kuohuivat voimakkaasti, joten näytteet käsiteltiin vesihauteessa 50–60 °C:ssa. Jäähtyneet näytteet suodatettiin (Whatman nro 41) 20 ml:n mittapulloon, jäännös pestiin suodattimella kuten edellä ja mittapullo täytettiin merkkiin ultrapuhtaalla vedellä. Kuumemmassa vesihauteessa olleissa näytteissä muodostui vaalea sakkaa niiden jäähtyessä. Koska haluttiin varmistua, ettei antimoni ollut sitoutunut saostumaan, tehtiin kuningasvesihajotus 50–60 °C:ssa vesihauteessa toisille samoista koeastioista otetuille kuivatuille lieroille. Näytteenkäsittely uusittiin myös lieronäytteille, joissa suodatusvaiheessa havaittiin, ettei lieron suoli ollut tyhjentynyt täysin ja suotimelle jäi hiekkaa.

2.6 Tilastolliset analyysit

Lierojen biomassa-aineisto käsiteltiin kaksitekijäisellä toistomittausten kovarianssianalyysillä. Koeasetelmassa oli ryhmittelevänä tekijänä lisätty antimonipitoisuus (0, 10, 50 ja 100 mg/kg) ja toistomittaustekijänä punnituskerta (2 vko, 1 kk ja 2 kk). Vastemuuttujana käytettiin koeastiakohtaista yksilöiden biomassaa, joka laskettiin jakamalla koeastian lierojen biomassa yksilömäärällä kullakin punnituskerralla. Kovariaattina käytettiin biomassaa kokeen alussa. Yhdysvaikutusten puuttuessa päävaikutuksia tutkittiin varianssianalyysillä.

Kahden viikon ja yhden kuukauden altistuksen jälkeen kunkin koeastian lierojen biomassa punnittiin kahteen kertaan: ennen kuin lieroista otettiin satunnaisesti yksilö metallinanalyysia varten ja tämän jälkeen. Toistomittausanalyysiä varten kullekin punnituskerralle valittiin kuitenkin vain yksi punnitustulos. Mahdollinen punnitustuloksen valinnan vaikutus tuloksiin kontrolloitiin vertailemalla saman punnituskerran tuloksia pitoisuuksittain riippuvien otosten t-testillä. Kokeissa käytettyjen lierojen biomassan normaalijakautuneisuus varmistettiin punnitsemalla yksitellen satunnaisesti valitut 20 lieroa ennen lierojen lisäämistä koeastioihin.

Metallimääritysten toteamis- ja määritysrajat laskettiin kunkin mittauskerran kalibraatiosuoran parametreista sijoittamalla kalibraatiosuoran yhtälöön $y = bx + a$ y:n paikalle $a + 3S_a$ (toteamisraja) tai $a + 10S_a$ (määritysraja), joissa a on suoran leikkauspiste ja S_a on vakiotermin keskivirhe (Miller & Miller 2000). Toteamis- ja määritysrajat kuiva-ainetta kohti laskettiin käyttäen mittauskerran näytteiden kuiva-aineen keskiarvoa. Metalliaineistosta tilastolliset tarkastelut tehtiin vain määritysrajan ylittäville mittaustuloksille.

Lisätyn pitoisuuden vaikutusta antimonin sitoutumiseen maaperässä tutkittiin kaksitekijäisellä toistomittausten varianssianalyysillä käyttäen ryhmittelevänä tekijänä

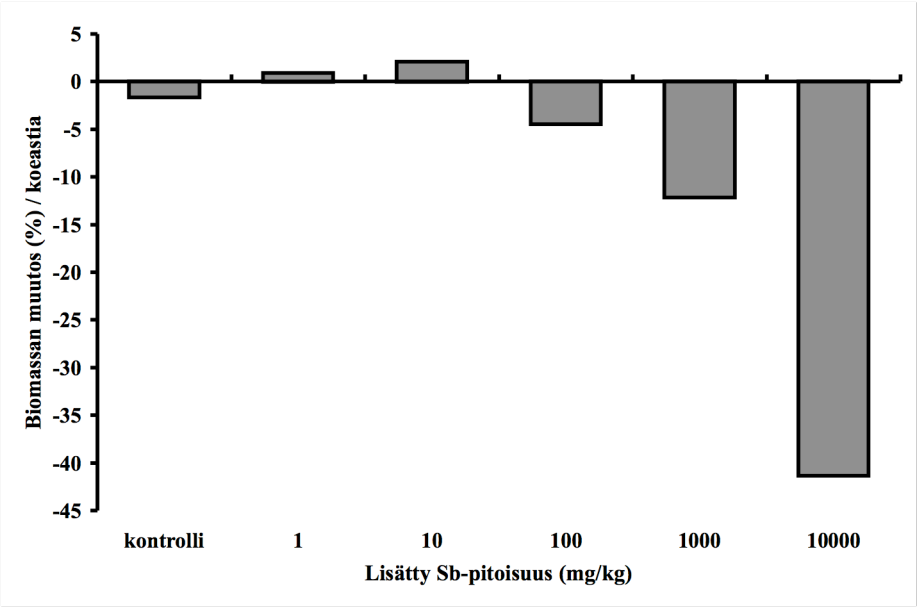
pitoisuuksia 50 ja 100 mg/kg ja toistomittaustekijänä kokeen edetessä maa-aineksesta mitattuja antimonipitoisuuksia. Vastemuuttujana käytettiin Sb-pitoisuuden suhteellista osuutta, joka saatiin jakamalla mittaustulos lisätyllä pitoisuudella. Myös lierojen vaikutusta antimonin sitoutumiseen selvitettiin kaksitekijäisellä toistomittausten varianssianalyysillä, jolloin ryhmittelevänä tekijänä 50 mg/kg lisättyä antimonia sisältävissä koeastioissa oli lierollisuus/lierottomuus ja toistomittaustekijänä koeastioista mitatut Sb-pitoisuudet kuukauden ja kahden kuukauden kuluttua lierojen lisäämisestä.

Kovarianssimatriisien yhtäsuuruusoletusta tarkasteltiin Box-testillä ja kovarianssien sfäärisyyttä Mauchlyn testillä ja ε-kertoimien avulla. Aineistojen normaalijakautuneisuutta tarkasteltiin Shapiro–Wilk-normaalisuustestillä ja samavarianssisuutta ja virhevarianssien samansuuruusoletusta Levenen testillä. Tilastollisissa analyyseissä käytettiin ohjelmiston SPSS® 14.0 Windows-versiota. Poikkeamat oletuksista siirtävät p-arvoja merkitsevämpään suuntaan, jolloin riski nollahypoteesin hylkäämiseen väärin perustein kasvaa. Jos jokin testien oletuksista ei täyttynyt, tarkasteltiin ryhmäkeskiarvoja ja keskineliöitä. Näissä tapauksissa keskineliöiden vertailu osoitti, etteivät eri mittauskertojen tai eri käsittelyjen väliset vaihtelut olleet olennaisesti mittauskertojen tai käsittelyjen sisäisiä vaihteluita suurempia, eikä näin ollen näyttöä nollahypoteesia vastaan ollut.

3. TULOKSET

3.1 Antimonin vaikutus lierojen kuolleisuuteen, biomassaan ja lisääntymiseen

Esikokeessa ei todettu lierojen kuolleisuutta yhdessäkään pitoisuudessa 14 vuorokauden altistuksen aikana, joten varsinaista toksisuustestiä ei tehty (ISO 11268-1). Esikokeen aikana peltolierojen biomassat eivät muuttuneet alhaisissa Sb-pitoisuuksissa ja vähenivät koeastioissa, joissa antimonia oli 100 mg/kg tai enemmän (kuva 1). Kahden viikon altistuksen jälkeen neljä lieroa kymmenestä oli diapaussissa pitoisuudessa 1000 mg/kg ja seitsemän pitoisuudessa 10 000 mg/kg.



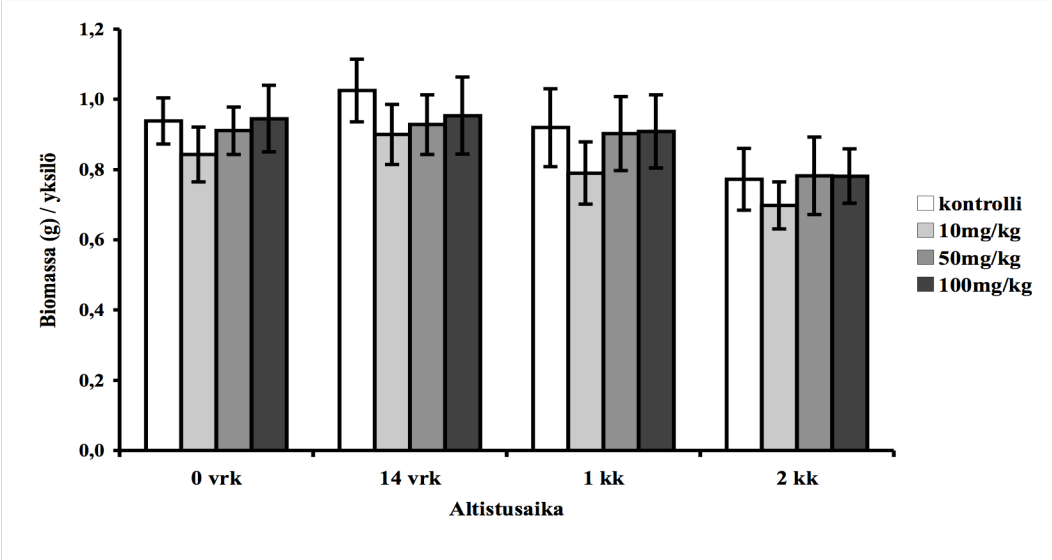
Kuva 1. Lierojen biomassan muutos 14 vuorokaudessa esikokeessa (n=1). Lisätty pitoisuus on ilmoitettu kuiva-ainetta kohti.

Biosaatavuuskokeessa antimoni ei vaikuttanut peltolierojen biomassaan kahden kuukauden altistuksen aikana (taulukko 1). Lierojen biomassat eivät muuttuneet kokeen aikana (kuva 2). Kokeen lopussa kussakin pitoisuussarjassa oli yhteensä 12 lieroa, joista seitsemän oli diapaussissa kontrolliastioissa ja pitoisuudessa 10 mg/kg, kahdeksan pitoisuudessa 50 mg/kg ja yhdeksän pitoisuudessa 100 mg/kg. Lierot oli jaettu satunnaisesti eri käsittelyihin, koska biosaatavuuskokeen alussa yksilöä kohti lasketuissa biomassoissa ei ollut eroa eri Sb-pitoisuuksien välillä (ANOVA F = 1,457, p = 0,275, df = 3). Biomassa kokeen alussa vaikutti biomassoihin kautta koeajan (taulukko 1). Vaikutus oli samanlaista kaikilla punnituskerroilla.

Antimoni ei vaikuttunut peltolierojen munakoteloiden tuotantoon tai munakoteloiden elinkykyyn (taulukko 2). Käytetystä lehtimetsämaasta ei erikseen poistettu munakoteloita ennen kokeen alkua. Lierottomista koeastioista ei kuitenkaan löytynyt kokeen lopussa munakoteloita, joten todennäköisesti lierot tuottivat munakotelot kokeen aikana. Kun munakoteloiden annettiin kehittyä petrimaljoilla, havaittiin hometta yhdellä munakotelolla pitoisuudessa 50 mg/kg kuukauden kuluttua kokeen päättymisestä ja yhdellä munakotelolla kontrollisarjasta seitsemän viikon kuluttua kokeen päättymisestä.

Taulukko 1. Antimonin ja altistusajan vaikutus lierojen biomassaan. Taulukossa on esitetty kaksitekijäisen toistomittausten kovarianssianalyysin tunnusluvut. SS = neliösumma, df = vapausasteet, MS = keskineliö, F = testisuure ja p = tilastollinen merkitsevyys

Käsittely	SS	df	MS	F	p
Aika x antimoni	0,017	6	0,003	1,183	0,351
Aika	<0,001	2	<0,001	0,078	0,925
Virhevaihtelu (aika)	0,051	22	0,002		
Antimoni	0,002	3	0,001	0,457	0,718
Virhevaihtelu (antimoni)	0,017	11	0,002		
Aika x alkumassa	0,003	2	0,002	0,704	0,505
Alkumassa	0,072	1	0,072	47,34	<0,001
Virhevaihtelu	0,017	11	0,002		



Kuva 2. Antimonin vaikutus peltolierojen biomassaan. Biomassa yksilöä kohti on laskettu jakamalla koeastian lierojen biomassa yksilömäärällä kullakin punnituskerralla. Kuvassa esitetty keskiarvot ± keskihajonnat kullekin pitoisuudelle (n = 4).

Taulukko 2. Munakoteloiden kokonaistuotanto kussakin Sb-pitoisuudessa kahden kuukauden aikana ja munakoteloiden kuoriutumisprosentti. Munakoteloiden kappalemäärä on summa neljästä koeastiasta.

Lisätty pitoisuus (mg/kg)	Munakotelot (kpl)	Kuoritumisprosentti (%)
kontrolli	3	67
10	1	100
50	2	0
100	3	33

3.2 Maan ominaisuudet ja Sb-pitoisuudet

Puhtaan lehtimetsämaan kosteus oli 26 % tuorepainosta ja orgaanisen aineksen osuus kuiva-aineesta oli 7 %. Kontaminoituneen maan referenssiaineen (SRM 2710) orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta oli 10 %. Niin esikokeessa kuin biosaatavuuskokeessa tutkitun lehtimetsämaan kosteusprosentti säilyi noin 30 %:ssa ja orgaanisen aineksen osuus muuttumattomana koko kokeen ajan. Myöskään pH-arvossa ei tapahtunut suuria muutoksia esikokeen tai biosaatavuuskokeen aikana (taulukko 3).

Ultraääniavusteisen kuningasvesiuuton saanto oli antimonin kokonaispitoisuuden määrityksissä yli 50 % kaikissa yli määritysrajan olevissa tapauksissa (taulukot 3 ja 4). Esikokeen pitoisuuden 10 mg/kg korkea saanto johtuu todennäköisesti kontaminaatiosta näytteenkäsittelyssä.

Taulukko 3. Puhtaan lehtimetsämaan ja esikokeen pitoisuuksien pH(H_20) kokeen alussa ja lopussa (n = 1), mitattu antimonin kokonaispitoisuus toteamis- ja määritysrajoineen ja menetelmän saantoprosentti (keskiarvo ± keskihajonta, n = 3)

Lisätty Sb-pitoisuus	pH 0 vrk	pH 14 vrk	Mitattu pitoisuus (mg/kg)	Sb-saanto (%)
Lehtimetsämaa	6,5	6,1	<2,8	-
Kontrolli	6,5	6,2	<2,8	-
1	6,5	6,2	<2,8	-
10	6,5	6,2	14,9±0,7	157±7
100	6,5	6,2	76,1±0,1	75±1
1000	6,4	6,2	756,6±15,9	76±2
10000	6,3	6,2	8473,3±218,2	82±3
Toteamisraja Sb-pitoisuus ≤ 100 mg/kg			2,8	
Määritysraja Sb-pitoisuus ≤ 100 mg/kg			9,4	
Toteamisraja Sb-pitoisuus ≥ 1000 mg/kg			58,1	
Määritysraja Sb-pitoisuus ≥ 1000 mg/kg			193,7	

Taulukko 4. Biosaatavuuskokeessa käytettyjen käsittelypitoisuuksien pH(H_20) kokeen alussa ja lopussa, mitattu antimonin kokonaispitoisuus toteamis- ja määritysrajoineen ja saantoprosentti (n = 1).

Lisätty Sb-pitoisuus	pH 0 vrk	pH 2kk	Mitattu pitoisuus (mg/kg)	Sb-saanto (%)
Kontrolli	6,4	5,9	<2,8	-
10mg/kg	6,4	5,9	5,1	51
50mg/kg	6,4	6,0	34,6	69
50mg/kg ilman lieroja	6,4	6,1	34,6	69
100mg/kg	6,4	6,1	65,6	66
		Toteamisraja	2,8	
		Määritysraja	9,4	

Lehtimetsämaassa suurin osa vaiheittaisissa uutoissa liuenneesta antimonista oli sitoutuneena orgaaniseen ainekseen ja mineraalien sisältämää antimonipitoisuutta kuvaavaan jäännösfraktioon (Taulukko 5a–c). Lisätystä antimonista keskimäärin 74 % (vaihteluväli 68–83 %) mitattiin fraktioista III ja IV pitoisuuksissa 50 mg/kg, 50 mg/kg ilman lieroja ja 100 mg/kg. Lehtimetsämaassa orgaaninen aines oli tärkeä antimonin sitoja: vajaa puolet lisätystä antimonista oli sitoutuneena orgaaniseen ainekseen kaikissa määritysrajan ylittävissä pitoisuuksissa kaikkina mittausajankohtina. Antimonia oli orgaanisessa aineksessa neljästä viiteen kertaa enemmän kuin sitoutuneena raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin. Sb-pitoisuudet raudan ja mangaanin (oksi)hydroksidifraktiossa jäivät alle toteamisrajan kokeen alussa ja kuukauden kuluttua lierojen lisäämisestä, jolloin vähemmän kuin 4 % lisätystä antimonista oli sitoutuneena (oksi)hydroksideihin. Kahden kuukauden kuluttua pitoisuudet tässä fraktiossa olivat yli määritysrajan Sb-pitoisuuksissa 50mg/kg, 50 mg/kg ilman lieroja ja 100 mg/kg, jolloin noin kymmenesosa lisätystä antimonista oli sitoutunut raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin. Ioninvaihtopinnoille ja karbonaatteihin antimoni sitoutui vain vähäisissä määrin, ja mittaustulokset jäivät alle toteamisrajan.

Kontaminoituneen maan referenssiaineessa (SMR 2710) yhteensä 40 % standardoidusta antimonin kokonaispitoisuudesta oli sitoutuneena (oksi)hydroksidifraktioon ja jäännösfraktioon. Sb-pitoisuus orgaanisessa aineksessa jäi alle toteamisrajan, jolloin vähemmän kuin 12 % standardin ilmoittamasta antimonin kokonaispitoisuudesta oli sitoutuneena orgaaniseen ainekseen (taulukko 5c).

Raudan ja mangaanin pitoisuudet fraktiossa II erosivat merkitsevästi lehtimetsämaan ja referenssiaineen välillä (riippumattomien otosten t-testi, Fe: $t = -59{,}1$ $p < 0{,}001$, $df = 6$; Mn: $t = -345{,}5$ $p < 0{,}001$, $df = 6$). Lehtimetsämaassa raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideja oli vähemmän kuin referenssiaineessa (kuva 3). Myös raudan ja mangaanin kokonaispitoisuudet olivat pienemmät lehtimetsämaassa kuin referenssiaineessa (taulukko 6). Alle kymmenesosa kokonaisraudasta oli (oksi)hydroksideina niin lehtimetsämaassa kuin referenssimaassakin: lehtimetsämaassa keskimäärin 9 % raudan kokonaispitoisuudesta liukeni fraktiossa II ja referenssimaassa vastaava luku oli 7 %. Lehtimetsämaan mangaanista 72 % kokonaispitoisuudesta oli (oksi)hydroksideina, referenssimaassa vastaavasti 22 %.

Taulukko 5a–c. Lehtimetsämaan Sb-pitoisuudet eri maa-aineksissa eri mittausajankohtina biosaatavuuskokeessa ja referenssiaineen (SRM 2710) Sb-pitoisuudet eri maa-aineksissa. I = ioninvaihtopinnat ja karbonaattifraktio, II = Fe, Mn (oksi)hydroksidit, III = orgaaninen aines ja IV = jäännösfraktio. Tulokset on ilmoitettu keskiarvona ± keskihajonta kuiva-ainetta kohti (n = 4).

a) Mittaus kokeen alussa

Lisätty pitoisuus (mg/kg)	Mitattu pitoisuus (mg/kg)			
	I	II	III	IV
Kontrolli	<1,4	<2,1	<2,9	<1,6
10	<1,4	<2,1	<2,9	<5,4
50	<1,4	<2,1	19,9±3,5	16,3±1,7
100	<4,5	<2,1	45,1±7,1	31,6±5,8
Toteamisraja	1,4	2,1	2,9	1,6
Määritysraja	4,5	7,0	9,7	5,4

b) Mittaus kuukauden kuluttua

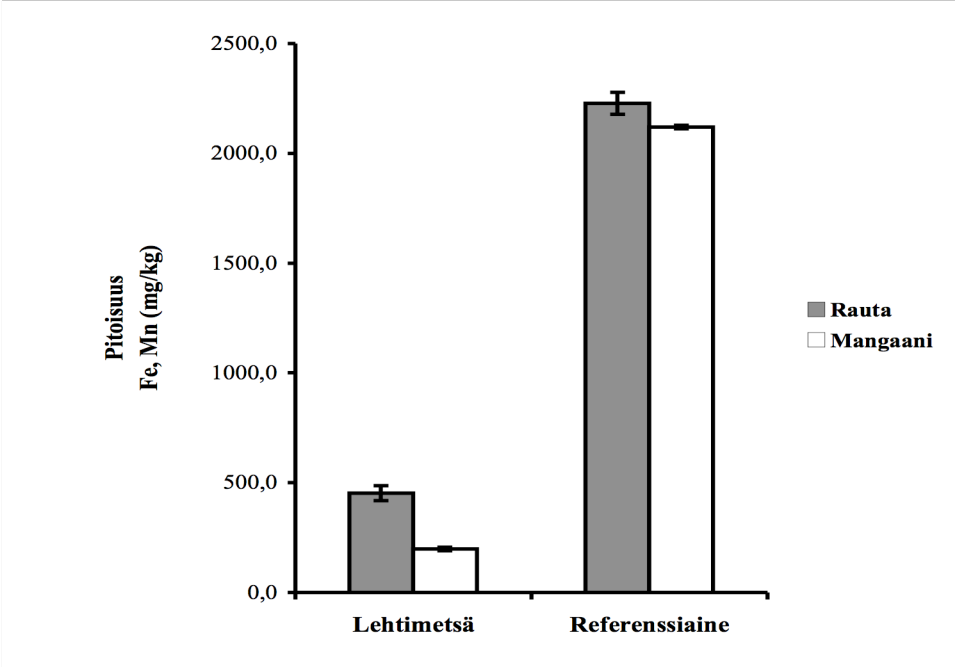
Lisätty pitoisuus (mg/kg)	Mitattu pitoisuus (mg/kg)			
	I	II	III	IV
Kontrolli	<1,4	<2,1	<2,9	<1,6
10	<1,4	<2,1	<2,9	<5,4
50	<1,4	<2,1	23,0±5,6	15,3±3,4
100	<4,5	<2,1	42,3±14,4	29,1±12,4
Toteamisraja	1,4	2,1	2,9	1,6
Määritysraja	4,5	7,0	9,7	5,4

c) Mittaus kahden kuukauden kuluttua

Lisätty pitoisuus (mg/kg)	Mitattu pitoisuus (mg/kg)			
	I	II	III	IV
Kontrolli	<1,6	<3,2	<4,6	<0,9
10	<1,6	<3,2	<15,2	4,5±2,2
50	<5,3	5,9±0,6	20,9±0,9	13,3±1,1
100	<5,3	7,7±0,4	40,8±11,9	28,1±8,9
Referenssimaa (SRM 2710)	<1,6	3,7±0,2	<4,6	11,8±0,3
Toteamisraja	1,6	0,9	4,6	0,9
Määritysraja	5,3	3,2	15,2	2,9

Taulukko 6. Raudan ja mangaanin kokonaispitoisuus lehtimetsämaassa ja referenssiaineessa. Lehtimetsämaan pitoisuus on keskiarvo ± keskihajonta (n = 4). Lehtimetsän arvot perustuvat mittaustuloksiin; kontaminoituneen maan referenssiaineen (SMR 2710) arvot ovat standardoidut (NIST) pitoisuudet.

Maa-aines	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)
Lehtimetsä	4915,8 ± 35,3	273,3 ± 13,3
Referenssiaine (SRM 2710)	33800 ± 1000	8530 ± 400
Toteamisraja (lehtimetsä)	2,7	0,4
Määritysraja (lehtimetsä)	9,0	1,3

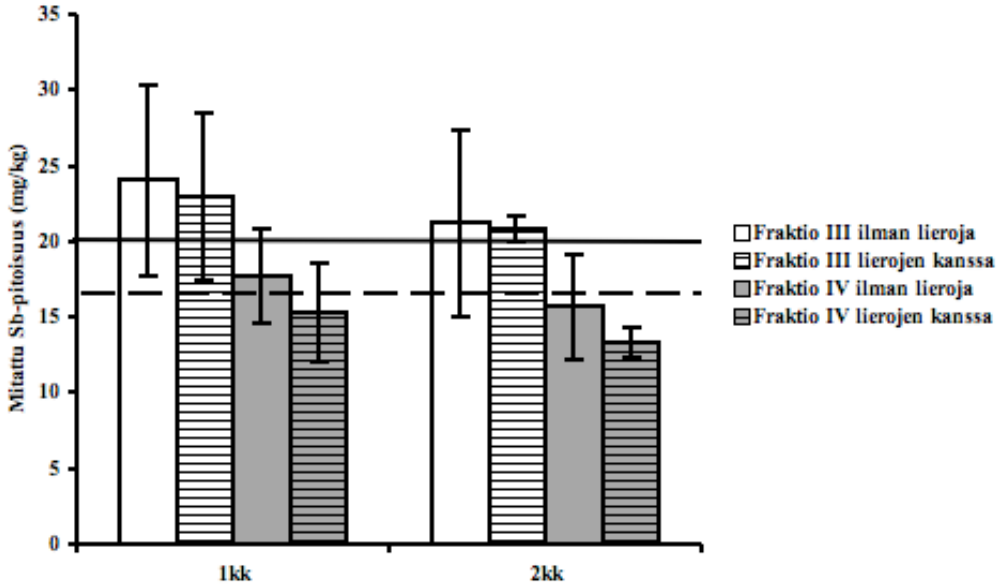


Kuva 3. Lehtimetsämaan ja kontaminoituneen maan referenssiaineen (SMR 2710) raudan ja mangaanin pitoisuus fraktiossa II (Fe, Mn (oksi)hydroksidit). Kuvassa on keskiarvo ± keskihajonta (n = 4). Toteamisraja raudalle ja mangaanille 4,9 mg/kg, määritysraja raudalle ja mangaanille 16,2 mg/kg

Lisätyn antimonin pitoisuus ei vaikuttanut antimonin sitoutumiseen orgaaniseen ainekseen tai jäännösfraktioon (taulukko 7). Orgaanisesta aineksesta tai jäännösfraktiosta mitatut Sb-pitoisuudet eivät muuttuneet kahden kuukauden aikana (taulukko 7). Lieroilla ei havaittu olevan vaikutusta orgaanisesta aineksesta mitattuun pitoisuuteen (ANOVA, F = 0,04, p = 0,843, df = 1) (kuva 4). Lierot eivät myöskään vaikuttaneet mittaustuloksiin jäännösfraktiossa (ANOVA F = 1,57, p = 0,257, df = 1) (kuva 4). Vertailtaessa lierollisia ja lierottomia koeastioita mittauskertojen välillä ei ollut eroa pitoisuudessa orgaanisessa aineksessa (ANOVA, F = 3,09, p = 0,129, df =1) eikä jäännösfraktiossa (ANOVA, F = 5,581, p = 0,056, df =1). (Oksi)hydroksideihin sitoutuneen antimonin pitoisuudessa ei ollut eroa lierollisten ja lierottomien koeastioiden välillä kahden kuukauden jälkeen (riippumattomien otosten t-testi, t = -1,291, p = 0,244, df = 6)

Taulukko 7. Lisätyn Sb-pitoisuuden ja ajan vaikutus sitoutumiseen fraktiossa III (orgaaninen aines) ja IV (jäännösfraktio). Taulukossa on esitetty kaksitekijäisen toistomittausanalyysin tilastolliset tunnusluvut yhdysvaikutuksille ja päävaikutuksille. Vastemuuttujana on käytetty mitatun pitoisuuden osuutta lisätystä pitoisuudesta. SS = neliösumma, df = vapausasteet, MS = keskineliö, F = testisuure ja p = tilastollinen merkitsevyys.

Fraktio	Käsittely	SS	df	MS	F	p
III	Aika x pitoisuus	0,008	2	0,004	0,482	0,629
	Aika	0,003	2	0,002	0,198	0,823
	Virhevaihtelu (aika)	0,100	12	0,008		
	Pitoisuus	0,00001	1	0,00001	0,003	0,959
	Virhevaihtelu (pitoisuus)	0,024	6	0,004		
IV	Aika x pitoisuus	0,001	2	0,001	0,131	0,878
	Aika	0,009	2	0,004	1,105	0,363
	Virhevaihtelu (aika)	0,049	12	0,004		
	Pitoisuus	0,00003	1	0,00003	0,012	0,915
	Virhevaihtelu (pitoisuus)	0,016	6			



Kuva 4. Lierojen vaikutus mitattuun Sb-pitoisuuteen fraktiossa III (orgaaninen aines) ja IV (jäännösfraktio) koeastioissa, joissa lisättyä antimonia oli 50 mg/kg. Mitattu Sb-pitoisuus ennen lierojen lisäämistä (0 vrk) fraktiossa III on kuvattu viivalla ja fraktiossa IV katkoviivalla. Kuvassa on keskiarvo ± keskihajonta (n = 4).

3.3 Antimonin kudospitoisuus lieroissa

Mitatut antimonin kudospitoisuudet jäivät mittausajankohdasta riippumatta alle toteamisrajan (taulukko 8). Antimonitrioksidina lisätty antimoni ei tutkituissa pitoisuuksissa kertynyt peltolierojen kudoksiin kahden kuukauden altistuksen aikana, esimerkiksi pitoisuudessa 100 mg/kg ympäristön pitoisuus oli yli 50 kertaa kudospitoisuutta suurempi.

Taulukko 8. Antimonin kudospitoisuus lieroissa eri altistusaikojen jälkeen (n = 4).

Lisätty pitoisuus	Altistusaika		
	2 viikkoa	1 kuukausi	2 kuukautta
Kontrolli	<2,3 µg/g	<2,3 µg/g	<1,9 µg/g
10 mg/kg	<2,3 µg/g	<2,3 µg/g	<1,9 µg/g
50 mg/kg	<2,3 µg/g	<2,3 µg/g	<1,9 µg/g
100 mg/kg	<2,3 µg/g	<2,3 µg/g	<1,9 µg/g
Toteamisraja	2,3 µg/g	2,3 µg/g	1,9 µg/g
Määritysraja	7,6 µg/g	7,6 µg/g	6,2 µg/g

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Antimonin vaikutus lierojen kuolleisuuteen, biomassaan ja lisääntymiseen sekä kertyminen lieroihin

Tutkimuksessa ei havaittu peltolierojen kuolleisuutta esikokeen suurissakaan Sb-pitoisuuksissa tai lierojen altistuessa pienemmille pitoisuuksille kahden kuukauden ajan.

Kuolleisuus ei kuitenkaan ole ainoa biosaatavuuden tai haitallisten vaikutusten mittari. Biomassa on yleisindikaattori lierojen kunnosta, ja muutokset biomassassa voivat kertoa subletaaleista ja kroonisista vaikutuksista. Biomassan muutosten seuraaminen parantaa myös toksisuustestien tarkkuutta (Bembridge 1998, McIndeo ym. 1998). Tässä tutkimuksessa antimoni ei vaikuttanut peltolierojen biomassaan kahden kuukauden altistuksen aikana Sb-pitoisuuksien ollessa alle 100 mg/kg. Esikokeen tulokset puolestaan viittaavat siihen, että antimonilla voi olla vaikutus lierojen biomassoihin suuremmilla pitoisuuksilla kuin 1000 mg/kg. Esikokeen havaintoihin tulee suhtautua suuntaa antavasti, sillä varsinaisista ISO 11268-1 standardin mukaista toksisuustestausta ei tehty, koska esikokeessa ei havaittu kuolleisuutta (ISO 11268-1). Esikokeen havaintoja tarkasteltaessa on myös huomioitava, että esikoepitoisuus 10 000 mg/kg tehtiin erillisenä täydennyksenä pitoisuussarjaan.

Kupermanin ym. (2006) antimonin toksisuustestissä suurin vaikuttamaton Sb-pitoisuus aikuisten tunkiolierojen *(Eisenia fetida)* hengissäsäilymiselle (NOEC) oli 617 mg/kg ja pienin vaikuttava pitoisuus (LOEC) oli 679 mg/kg. Vaikutuksia biomassaan ei raportoitu. Tunkiolierojen jälkeläistuotanto oli kuitenkin aikuisten hengissäsäilymistä herkempi toksisuusvaste. Tunkiolieron lisääntymisen NOEC oli 60 mg/kg ja LOEC 86 mg/kg. Lisääntymisen EC_{50} eli pitoisuus, joka vaikutti puoleen testieliöistä, oli 70 mg/kg ja EC_{20} oli 30 mg/kg (Kuperman ym. 2006). Biosaatavuuskokeessa antimoni ei vaikuttanut lierojen lisääntymiseen, mutta pienen aineiston ja alhaisten koepitoisuuksien vuoksi tulokseen tulee suhtautua varauksella. Biosaatavuuskokeessa käytettiin aikuisia peltolieroja, joilla oli erottuva clitellum. Nuoret lierot voivat olla herkempiä antimonille.

Tämän tutkimuksen ja Kupermanin ym. (2006) tuloksia vertailtaessa on huomioitava, että tässä tutkimuksessa ei tehty varsinaista toksisuustestausta. Myös eri lierolajien herkkyys haitta-aineille ja näiden vasteet eroavat. Aikaisemmissa tutkimuksissa muiden lierolajien on todettu olevan tunkiolieroja herkempiä metalleille (Spurgeon & Hopkin 1996, Langdon ym. 2004). Kiinnostavaa onkin, että tunkiolieroilla tehdyssä tutkimuksessa antimonilla on ollut haitallisia vaikutuksia jo pienillä pitoisuuksilla (Kuperman ym. 2006), mitä ei tässä tutkimuksessa havaittu peltolieroilla. Biosaatavuus on linkki eri altistusreittien kautta tapahtuvan kokonaisaltistuksen ja haitallisten vaikutusten välillä (Baker ym. 2003). Tässä tutkimuksessa antimonilla ei ollut haitallisia vaikutuksia peltolieroihin. Onko syynä tähän antimonitrioksidin kemiallisesta luonteesta johtuva vähäinen toksisuus, heikko biosaatavuus vai näiden yhdistelmä?

Diapaussit ovat peltolierojen vasteita epäsuotuisiin ympäristöoloihin. Tällöin lierot tyhjentävät suolen ja kiertyvät kerälle odottamaan olosuhteiden muuttumista (Morgan & Morgan 1993). Biosaatavuuskokeessa antimoni ei aiheuttanut diapaussivastetta, mutta esikokeessa oli viitteitä siitä, että korkeissa Sb-pitoisuuksissa peltolierot vaipuvat diapaussiin. Havaintoja tarkastellessa on huomioitava, että aineisto oli pieni. Selvittämättä jää, kuinka paljon diapaussit vaikuttivat kudospitoisuuksiin, koska diapaussissa lierot altistuivat vähäisissä määrin vain ihon kautta. Kuparin ja sinkin kudospitoisuuksien tiedetään olevan pienemmät diapaussissa olevilla lieroilla kuin aktiivisilla lieroilla, joilla kudospitoisuudet vaihtelevat vain vähän (Morgan & Morgan 1993). Biosaatavuuskokeessa myös kontrolliastioissa lierot olivat kiertyneet kerälle. Kosteus, pH, orgaanisen aineksen määrä ja lämpötila kuitenkin pysyivät vakioina koko kokeen ajan. Suurin osa diapaussihavainnoista tehtiin viimeisen kuukauden aikana. Kuukauden kuluttua kokeen alkamisesta koeastioihin lisätyn nurmen homehtuminen, koeastioiden käsittelystä aiheutunut stressi tai ravinnon määrä ovat myös voineet olla syinä diapaussivasteisiin. Yksi todennäköinen selitys diapaussivasteisiin voi myös olla alhainen maaperän kosteus pitkän ajan kuluessa.

Eliöön siirtyneen haitta-aineen määrää voidaan pitää osoituksena aineen biosaatavuudesta ympäristöstä ja kertymistä kuvataan kudospitoisuuden ja maaperän kokonaispitoisuuden osamäärällä (Didden 2003). Mitattujen kudospitoisuuksien perusteella antimoni ei kerry peltolieroihin, ja maaperästä mitatut pitoisuudet olivat kertaluokkia suurempia kuin kudospitoisuudet. Tutkimuksessa ei myöskään löydetty eroja kudospitoisuuksissa eri altistusaikojen tai Sb-pitoisuuksien välillä. Havainnot tukevat Svedsenin ym. (1996) kenttätutkimuksen tuloksia Iso-Britanniassa muovipaloalueella, jossa antimonin estimoitu maksimikokonaispitoisuus oli 20,2 mg/kg. Keskimääräinen kudospitoisuus ruskolieroissa (*Lumbricus castaeus*) oli merkitsevästi pienempi kuin keskimääräinen pitoisuus maaperässä, mikä viittaa siihen, ettei antimoni kerry lieroihin (Svendsen ym. 1996). Tässä laboratoriossa toteutussa biosaatavuuskokeessa antimoni oli sekoitettu tasaisesti koemaahan eivätkä lierot pystyneet pakenemaan puhtaampaan maahan. Tästä huolimatta antimoni ei kertynyt peltolierojen kudoksiin. Selitys voi olla joko antimonin heikko saatavuus ympäristöstä tai lierojen tehokas eritysmetabolia. Morgan & Morgan (1993) ehdottavat, että lierot voivat säädellä kuparin ja sinkin kudospitoisuuksia. Meharg ym. (2003) ovat havainneet, että samanlainen säätelymekanismi arsenaatille voisi löytyä myös *Lumbricus terrestris* -lajin lieroilta. Näin ollen lieroilla voisi olla säätelymekanismi myös metalleille, joilla ei ole merkitystä hivenaineena kuten sinkillä ja kuparilla. Koska tässä tutkimuksessa lieroista mitatut Sb-pitoisuudet jäivät altistuspitoisuudesta ja -ajasta riippumatta alle toteamisrajan, on todennäköistä, että syynä olemattomiin kudospitoisuuksiin on antimonitrioksidin heikko biosaatavuus eikä lierojen fysiologia.

Svendsenin ym. (1996) tutkimuksessa ruskolierojen kudospitoisuudet vaihtelivat runsaasti näytteenottopaikkojen välillä taustapitoisuudesta jopa kertaluokkaa maaperän antimonipitoisuutta korkeampiin pitoisuuksiin. Lierojen saastunella alueella viettämä aika ja migraatio (Svendsen ym. 1993) tai lierojen kyky välttää metalleilla kontaminoitunutta maata (Lukkari & Haimi 2005) voivat selittää vaihtelua kudospitoisuuksissa. Tämän tutkimuksen kannalta mielenkiintoista on, miksi muovipaloalueella lierojen kudoksissa oli mitattavia määriä antimonia, kun biosaatavuuskokeessa antimoni ei siirtynyt peltolieroihin. Biosaatavuuskokeessa kudospitoisuus määritettiin lähes viidestäkymmenestä peltolierosta ja Sb-pitoisuus jäi kaikissa mittauksissa yhtä poikkeusta lukuunottamatta alle määritysrajan. Metallien kertymisessä lieroihin on lajikohtaisia eroja (Spurgeon & Weeks 1998, Langdon ym. 2005), ja lierojen suoleen jäänyt maa-aines voi selittää yksittäisiä suuria mittaustuloksia. Muovipaloalueella antimonin esiintymismuoto, maaperän omaisuudet tai muut haitta-aineet ovat saattaneet vaikuttaa antimonin biosaatavuuteen lieroille.

Mittaustulokset peltolierojen kudoksista ja haitallisten vaikutusten puute yhdessä osoittavat, että antimonitrioksidina lisätyn antimonin biosaatavuus ja toksisuus peltolieroille lehtimetsämaassa oli heikkoa. Tuloksia yleistettäessä on kuitenkin muistettava, että maan ominaisuudet vaikuttavat oleellisesti biosaatavuuteen (Allen 2002). Tämän tutkimuksen ja Kupermanin ym. (2006) tunkiolieroilla tekemän toksisuustestin havaintojen eroja voi selittää erilainen ympäristö. Kuperman ym. (2006) käyttivät tutkimuksessaan hiekkaista luonnon maata, jonka pH oli 5,29 ja jossa metallien biosaatavuutta pidetään korkeana johtuen alhaisesta orgaanisen aineksen osuudesta (1,2 %) ja vähäisestä savimineraalien määrästä. Biosaatavuuskokeessa tutkitussa lehtimetsämaassa orgaanisen aineksen osuus oli lähes kuusinkertainen verrattuna Kupermanin ym. (2006) käyttämään maahan.

Myös lisätty antimoniyhdiste vaikuttaa lierojen altistumiseen ja haitallisiin vaikutuksiin. Kupermanin ym. (2006) kokeessa niukkaliukoinen antimonisulfaatti oli toksisempi kuin vesiliukoinen antimonitartraatti, kun toksisuusvasteena käytettiin

tunkiolierojen munakoteloiden tuottoa. Kokeessa sulfaatin vaikutus oli kontrolloitu. On mahdollista, että biosaatavuuskokeessa yksi heikon biosaatavuuden syy onkin juuri lisätyn antimoniyhdisteen muoto, ja tulokset voisivat olla erilaisia, jos antimoni olisi lisätty liuoksessa. Toisaalta Kupermanin ym. (2006) tulokset osoittavat, ettei antimoniyhdisteen vesiliukoisuus yksin tarkoita suurempaa toksisuutta. Metallien lisääminen testimaahan liuoksena voi myös yliarvioida biosaatavuutta ja eliöiden altistumista verrattuna todellisiin kontaminoituneisiin kohteisiin (Spurgeon & Hopkin 1996).

Aikaisemmissa tutkimuksissa antimonin biosaatavuutta on tutkittu lähinnä kaivosalueilla. Liukoisuuskokeissa antimonin vesiliukoinen osuus on ollut vain muutama prosentti kokonaispitoisuudesta (Lintschinger ym. 1998, Flynn ym. 2003, He ym. 2007, Murciego ym. 2007). Niukkaliukoisuuden ja bakteeribiotestin perusteella Flynn ym. (2003) toteavat antimonin biosaatavuuden olevan heikkoa kaivosalueilla huolimatta korkeista kokonaispitoisuuksista (jopa 700 mg/kg). Kasveille biosaatavaa pitoisuutta kuvaavien NH_4NO_3-uuttojen perusteella biosaatava Sb-pitoisuus kaivosalueilta oli alle prosentti kokonaispitoisuudesta (Hammel ym. 2000, Gál ym. 2006). Antimoni ei kertynyt viljelykasveihin tutkittaessa entisellä kaivostoiminta-alueella kasvatettuja 19 kasvilajia, vaikka antimonin kokonaispitoisuudet olivat suuria (500 mg/kg) (Hammel ym. 2000). Syyksi alhaiseen liukoisuuteen ja biosaatavuuteen Hammel ym. (2000) esittävät antimonin esiintymistä alueella niukkaliukoisina sulfideina ja Wilson ym. (2004) antimonin sitoutumista tiukasti (oksi)hydroksideihin. Myös Aisworthin ym. (1990a) kenttätutkimukset viittaavat antimonin heikkoon biosaatavuuteen maaperässä: antimoni on geokemiallisesti liikkumaton, ja korkeat pitoisuudet kasveista voivat selittyä laskeumalla ilmasta. Samalla alueella tehdyssä tutkimuksessa ei myöskään löytynyt merkkejä antimonin rikastumisesta ravintoketjussa maaperä–kasvillisuus–selkärangaton–hyönteissyöjä. Altistusreitin osoittaminen oli kuitenkin hankalaa (Aisworth ym. 1990b).

Kun antimoni esiintyy helposti sitoutuvassa muodossa, sen biosaatavuus on heikkoa eikä se rikastu ravintoketjussa (Ainsworth 1990b, Hammel ym. 2000, Flynn ym. 2003). Liikkuvassa muodossa oleva antimoni voi kuitenkin kertyä kasveihin (Baroni ym. 2000, Hammel ym. 2000), mutta antimonin bioakkumulaatiossa on eroja eri kasvilajien välillä (Murciego ym. 2007). Esimerkkejä antimonin kertymisestä löytyy myös sienikunnasta: tietyt tattisuvut (*Suillus*, *Chalciporus*) voivat biokonsentroida antimonia alueilla, joissa antimonin kokonaispitoisuudet ovat korkeat (Borovicka ym. 2006). Veteen tai etikkahappoon liukenevan antimonin osuus kokonaispitoisuudesta voi olla pieni, mutta kokonaispitoisuuden ollessa suuri antimonia kertyy kasveihin (Baroni ym. 2000, He ym. 2007). Näin ollen kaivosalueilla, jossa antimonipitoisuudet ovat korkeat, voi antimonin bioakkumulaatio kasveihin aiheuttaa ekologisen riskin (He ym. 2007). Toisaalta myöskään pienet kokonaispitoisuudet eivät välttämättä tarkoita alhaista biosaatavuutta. Tulva-alueen laitumelta kasveista on mitattu yhtä suuria pitoisuuksia kuin Hammelin ym. (2000) tutkimuksissa, vaikka tulva-alueella antimonin kokonaispitoisuudet olivat vain kymmeniä milligrammoja kilossa verrattuna Hammelin ym. (2000) useisiin satoihin milligrammoihin kilossa (Tighe ym. 2005). Ampumaradalla antimonin vesiliukoiset pitoisuudet olivat korkeammat kuin muilla metalleilla, jopa korkeammat kuin lyijyn pitoisuudet. Näin ollen ampumaradoilla antimonin vapautuminen voi olla merkittävää (Johnson ym. 2005). Antimoni voi siis oloista riippuen olla biosaatava.

4.2 Antimonin sitoutuminen maaperässä

Lehtimetsämaassa orgaaninen aines oli tärkeä antimonin sitoja, ja lähes puolet vaiheittaisissa uutoissa liukenevasta antimonista oli sitoutuneena siihen. Myös muut tutkimukset osoittavat antimonin sitoutuvan orgaaniseen ainekseen (Lintschinger ym. 1997, Hou ym. 2006, Steely ym. 2007). Neutraalit Sb(III)-yhdisteet, esim. $Sb(OH)_3$,

sitoutuvat helposti orgaanisiin happoihin (Filella 2002b, Buschmann & Sigg 2004). Humushapot paitsi sitovat antimonia myös osallistuvat sen hapettamiseen (Buschmann & Sigg 2004, Steely ym. 2007). Sitoutuminen humushappoihin muuttaa antimonia vähemmän toksiseen muotoon ja laskee antimonin pitoisuutta maavedessä vähentäen näin sen liikkuvuutta (Flynn ym. 2003, Buschmann & Sigg 2004, Steely ym. 2007). Sitoutuminen humushappoihin on voimakkainta pH:n ollessa noin 6, ja sopivissa ympäristöoloissa jopa 30 % Sb(III):sta voi olla sitoutuneena orgaaniseen ainekseen (Buschmann & Sigg 2004).

Vain muutama prosentti lisätystä antimonista oli sitoutuneena raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideihin. Kuitenkin aikaisemmissa tutkimuksissa korostetaan (oksi)hydroksidien merkitystä antimonin sitojana. Uuttuvasta antimonista 50–90% on ollut sitoutuneena (oksi)hydroksideihin (Lintschinger ym. 1998, Johnson ym. 2005, Gál ym 2006). Raudan (oksi)hydroksidit ovat erityisen tärkeitä antimonin sitojia (Mitsunobu ym. 2006). Tarkasteltaessa antimonin jakautumista fraktioihin II ja III lehtimetsämaassa ja referenssiaineessa havaitaan lehtimetsämaassa antimonin sitoutuneen orgaaniseen ainekseen neljä–viisinkertaisesti verrattuna (oksi)hydroksideihin. Kontaminoituneen maan referenssiaineessa orgaaniseen ainekseen sitoutuneen antimonin pitoisuus oli alle toteamisrajan ja näin ollen enintään samaa suuruusluokkaa kuin pitoisuus (oksi)hydroksidifraktiossa. Lehtimetsämaan ja referenssiaineen vaiheittaisten uuttojen tuloksia ei voi vertailla suoraan, koska kokonaissaantoa ei voitu laskea tiettyjen fraktioiden mittaustulosten jäädessä alle toteamisrajan. Fraktioiden pitoisuudet voidaan referenssiaineen tapauksessa suhteuttaa NIST-standardin ilmoittamaan estimoituun kokonaispitoisuuteen ja lehtimetsän tapauksessa lisättyyn Sb-pitoisuuteen. Tuloksia vertailtaessa on myös huomioitava, että biosaatavuuskokeen maassa ja referenssiaineessa kontaminaation lähde ei ole sama.

Lehtimetsämaassa orgaaninen aines oli (oksi)hydroksideja tärkeämpi antimonin sitoja toisin kuin referenssiaineessa. Eroja sitoutumisessa voivat selittää erot rauta- ja mangaaniyhdisteiden määrissä: lehtimetsämaassa raudan ja mangaanin kokonaispitoisuudet ja näiden (oksi)hydroksidien määrä olivat pienemmät kuin referenssimaassa. Toisaalta myös erot orgaanisen aineksen määrässä voivat selittää sitoutuminen eroavaisuuksia, mutta orgaanisen aineen osuus oli samaa suuruusluokkaa niin lehtimetsämaassa kuin referenssiaineessa. Näin ollen myös orgaanisen aineksen laadulla voi olla merkitystä antimonin sitoutumisessa. Lehtimetsämaassa vaikuttaa olevan sorptiokapasiteettia ainakin Sb-pitoisuudelle 100 mg/kg, koska orgaanisesta aineksesta uuttui sama osuus lisätystä antimonista riippumatta siitä, oliko antimonia lisätty 50 mg/kg vai 100 mg/kg. Lintschingerin ym. (1998) mukaan antimoni näyttää erityisesti sitoutuvan rauta- ja alumiiniyhdisteisiin, jos orgaanista ainesta on niukasti. Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että yhteys voi toimia myös päinvastoin: orgaaninen aines on tärkeä antimonin sitoja, jos (oksi)hydroksideja on vähän. Antimonin lisääminen maahan niukkaliukoisena antimonitrioksidina selittää pitoisuudet jäännösfraktiossa. Myös tässä tutkimuksessa antimoni sitoutui vain vähäisissä määrin karbonaatteihin (Lintschinger ym. 1998)

Aika ja reaktiot ritsosfäärissä tai maata syövien eläinten ruuansulatuskanavassa voivat vaikuttaa sitoutumis- ja desorptioprosesseihin maaperässä (Allen 2002, Sauvé 2002). Ajan myötä metallit sitoutuvat maaperään usein yhä tiukemmin (Sauvé 2002). Biosaatavuuskokeen tulosten mukaan antimoni sitoutuu lehtimetsämaahan jo ensimmäisen viikon aikana eikä sitoutuminen muutu merkitsevästi seuraavien kahden kuukauden aikana. Kiinnostavaa on kuitenkin havaita, että (oksi)hydroksidifraktiosta mitattu Sb-pitoisuus kaksinkertaistuu viimeisen kuukauden aikana. Maaperän prosessit ovat hitaita, jolloin kahden kuukauden laboratoriokoe ei välttämättä kuvaa todellista sitoutumista maa-

aineksiin. Toisin kuin tässä tutkimuksessa aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu lierojen vaikuttavan metallien sitoutumiseen ja vähentävän esimerkiksi kuparin ja sinkin liikkuvuutta ja saatavuutta maasta (Lukkari ym. 2006). Lierojen on myös todettu lisäävään harvinaisten metallien (Y, Ce, La, Pr ja Nd) vesiliukoista osuutta (Wen ym. 2006).

Tarkasteltaessa haitta-aineiden biosaatavuutta on myös huomioitava potentiaalinen biosaatavuus (Baker ym. 2003). Mitkä tekijät sitten säätelevät antimonin biosaatavuutta ja vaikuttavatko siihen ympäristöolojen muutokset? Antimonin sitoutuminen on hyvin paikkakohtaista (Gál ym. 2006), ja liukoisuutta ja liikkuvuutta säätelevistä tekijöistä on erilaisia teorioita (Johnson ym. 2005, He 2007, Murciego ym. 2007). Maaperän pH vaikuttaa kuitenkin olevan tärkeä antimonin liikkuvuuden ja biosaatavuuden kannalta: pH:n noustessa antimonin liukoisuus kasvaa (Gál ym. 2006, Johnson ym. 2005). Sb(III) ja Sb(V) sitoutuvat tiukasti hydratoituneen raudan oksidin, goethiitin, pinnalle muodostaen sisäkehän komplekseja. Sitoutuminen ei ole välttämättä pysyvää, sillä goethiitti voi hapettaa antimonia, ja emäksisissä olosuhteissa pentavalentti antimoni vapautuu goethiitin pinnalta maa-veteen (Leuz ym. 2006). Niin raudan kuin muidenkin (oksi)hydroksidien yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on pH:sta ja ionivahvuudesta riippuva pintavaraus (Schwertmann & Taylor 1989). Happamassa maaperässä (oksi)hydroksidien pinnalle voi kehittyä positiivinen pintavaraus, joka sitoo anioneja elektrostaattisesti epäspesifillä adsorptiolla. Anionit voivat myös sitoutua spesifien sorptio- tai ligadinvaihtoreaktioiden kautta (White ym. 1979). Koska anionien sorptio maaperään on voimakkaampaa happamissa olosuhteissa, tässä tutkimuksessa käytetty lievästi hapan lehtimetsämaa edustaa tilannetta, jossa antimonin biosaatavuus voi teoriassa olla suurempaa kuin happamassa havumetsämaassa. Tämä perustuu kuitenkin oletukseen, että antimoni esiintyy maaperässä anionina, eikä tässä tutkimuksessa selvitetty, mitä antimonitrioksidille tapahtui koeastioihin lisäämisen jälkeen. Ei siis tiedetä varmasti, missä muodossa tai millä hapetusasteella antimoni esiintyi koeastioissa.

Aikaisemmissa tutkimuksissa todetaan antimonin esiintyvän anionina laajalla pH-alueella niin hapettavissa kuin pelkistävissäkin olosuhteissa (Vink 1996, Filella ym. 2002b). Anionien adsorption kannalta olennaisimmat tekijät ovat pH, maaperän (oksi)hydroksidien määrä ja hapetus-pelkistysolosuhteet (McLean & Bledsoe 1995). Muutokset näissä tekijöissä voivat vaikuttaa biosaatavuuteen. Tehtäessä haitallisia vaikutuksia tai eliöiden altistumista koskevia päätelmiä on myös huomioitava, että muutokset ympäristötekijöissä, kuten maaperän pH-arvossa, voivat vaikuttaa myös suoraan eliöihin (Peijnenburg ym. 1997). Antimonin anioninen luonne on huomioitava esimerkiksi suunniteltaessa kunnostustoimia useilla metalleilla saastuneilla alueilla. Toimet, jotka vähentävät muiden metallien liukoisuutta, voivat lisätä antimonin biosaatavuutta. Esimerkiksi fosfaattien lisäys lisää antimonin liikkuvuutta ja fytotoksisuutta, sillä fosfaatit kilpailevat antimonin kanssa sitoutumispaikoista (Spuller ym. 2007).

4.3 Tutkimusmenetelmät

Ultraääniavusteinen kuningasvesiuutto on hyvä menetelmä antimonin kokonaispitoisuuden estimointiin, sillä tässä tutkimuksessa analyysimenetelmän saanto oli kaikissa tapauksissa yli 50 %. Krachlerin ym. (2001) kirjallisuuskatsauksessa todetaan, että vain muutama prosentti maaperässä olevasta antimonista saadaan analysoitua yleisesti käytetyillä uuttomenetelmillä. USEPA:n (1994) typpihappo- ja vetykloridihajotukseen perustuva menetelmä 200.8 tuottaa huomattavasti todellisia pitoisuuksia alhaisempia määritystuloksia. USEPA:n (1996) menetelmässä 3050B puolestaan käytetään typpihapon ja vetykloridin lisäksi myös vetyperoksidia, mutta tälläkin menetelmällä saannot ovat vain 58 % lisätyistä pitoisuuksista (Kuperman ym. 2006). Ultraäänikäsittely nopeuttaa näytteenkäsittelyä vaiheittaisissa uutoissa verrattuna BCR:n menetelmään (Pöyhönen

2007). Vaiheittaisissa uutoissa käytetyn menetelmän saannot pysyivät muuttumattomina fraktioissa III ja IV, mikä on osoitus käytetyn menetelmän toistettavuudesta. Sb-pitoisuus tai mittauskerta eivät vaikuttaneet tuloksiin. Ultraäänikäsittelyn avulla näytteet voitiin käsitellä muutaman päivän sisällä näytteenotosta ja näin pienentää mahdollista näytteiden säilytyksestä aiheutuvaa virhettä fraktiointituloksissa.

Vaiheittaisten uuttojen avulla voidaan kuvata luonnollisia prosessseja kuten desorptiota. Menetelmää on kuitenkin kritisoitu siitä, ettei reagenssien selektiivisyydestä ole täyttä varmuutta (Peijnenburg ym. 2007). Voidaanko sanoa, että esimerkiksi fraktiossa II liukenevat vain raudan ja mangaanin (oksi)hydroksidit ja näihin sitoutunut antimoni? Yhdessä vaiheessa vapautuvat metallit saattavat sitoututua uudelleen, mikä voi johtaa biosaatavuuden aliarviointiin. Myös näytteenkäsittelyssä metallien ominaisuudet, kuten hapetusaste, voivat muuttua. Tämä voi puolestaan vaikuttaa metallien liukoisuuteen. Vaiheittaiset uutot antavat jonkinlaisen kuvan sitoutumista ja sitoutumisen lujuudesta, mutta yksittäistä fraktiota ei voida suoraan yhdistää biosaatavuuteen (Sauvé 2002, Fairbrother ym. 2007). Näin ollen vaiheittaiset uutot eivät yksin riitä kuvaamaan metallin biosaatavuutta (Peijnenburg ym. 2007).

Kontrolloiduissa olosuhteissa tehdyllä kokeellisella tutkimuksella voidaan selvittää antimonin biosaatavuuden mekanismeja. Kuitenkin laboratoriokoe kertoo vain tietyistä oloista, ja tulosten yleistettävyyteen liittyy epävarmuustekijöitä. Biosaatavuuskokeessa käytetyt pitoisuudet olivat suhteellisen pieniä, mutta kuitenkin jopa satakertaisia verrattuna taustapitoisuuksiin (Edwards ym. 1990). Ampumaradoilta ja kaivosalueilta on mitattu kertaluokkia suurempia kokonaispitoisuuksia (Hammel ym. 2000, Gál ym. 2006, Spuller ym. 2006). Näin ollen antimonin biosaatavuutta olisi hyvä tutkia tämän tutkimuksen pitoisuuksia suuremmilla pitoisuuksilla.

Antimonin ympäristökohtalosta ei tiedetä riittävästi. Tutkimus on painottunut kaivosalueille, joilla luonnollisesti suurin osa antimonista on primaaristen ja sekundaaristen mineraalien kiderakenteessa ja pitoisuudet biosaatavina pidetyissä fraktioissa jäävät pieneksi (Wilson ym. 2004). Biosaatavuutta pitäisi huomioida paikkakohtaisesti, jotta voitaisiin ennustaa todellisia vaikutuksia (Allen 2002). Näin ollen tutkimukset louhoksilta ja sulatoilta eivät riitä, vaan olisi syytä tutkia antimonin biosaatavuutta erilaisissa maaperissä. Myös antimonin vaikutuksia eliöihin pitäisi selvittää tarkemmin, sillä tämän puolimetallin löytyminen kasveista tai lierojen kudoksista ei vielä kerro sen haitallisuudesta (Didden ym. 2003).

Kontaminaation lähde ja antimonin esiintymismuoto vaikuttavat olennaisesti biosaatavuuteen ja haitallisuuteen (Hammel ym. 2000, Flynn ym. 2003, Kuperman ym. 2006, He ym. 2007). Tässä tutkimuksessa yksi tärkeimmistä heikon biosaatavuuden syistä lienee lisätyn antimoniyhdisteen kemialliset ominaisuudet. Antimonin ympäristökohtaloa olisi hyvä tutkia erilaisilla yhdisteillä, mutta samalla pitäen mielessä, että esimerkiksi ekotoksisuustestaus suolaliuoksilla voi yliarvioida biosaatavuutta (Fairbrother ym. 2007). Tutkimuksen tulisi keskittyä niihin yhdisteisiin, jotka voivat päätyä ympäristöön. Muuten laboratoriokokeiden käytännön relevanssi on heikkoa, ja ne kuvaavat vain pahimpia mahdollisia tilanteita.

4.4 Johtopäätökset

Aikaisemmat tutkimukset korostavat (oksi)hydroksidien merkitystä antimonin sitojana. Tutkitussa lehtimetsämaassa raudan ja mangaanin (oksi)hydroksideja oli vähän, ja orgaaninen aine oli tärkeä antimonin sitoja. Tutkimuksessa antimoni sitoutui vain vähäisissä määrin ioninvaihtopinnoille ja karbonaattifraktioon. Vaikka lierot altistuvat maaperän haitta-aineille sekä ihon että ruuansulatuskanavan kautta ja käytävät ravintonaan orgaanista ainesta ja siinä eläviä mikrobeja, tämän tutkimuksen mukaan käytetyillä

pitoisuuksilla antimoni ei vaikuta peltolierojen kuolleisuuteen, biomassan tai lisääntymiseen eikä kerry peltolierojen kudoksiin. Näin ollen antimonitrioksidin biosaatavuus peltolieroille lehtimetsämaassa on heikkoa. Syinä tähän voivat olla antimonin lisääminen niukkaliukoisena antimonitrioksidina ja antimonin luja sitoutuminen lehtimetsämaan runsaaseen orgaaniseen ainekseen. Antimonin sitoutuminen ja biosaatavuus ovat kuitenkin paikkakohtaisia, eikä näitä säätelevistä tekijöistä ole riittävästi tietoa.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani Jari Haimia ja Ari Väisästä. Tohtori Haimi on johdatellut minut maaperän ihmeelliseen maailmaan, ja hänen neuvonsa ja kannustuksensa ovat olleet arvokkaita. Kiitollinen olen myös tohtori Väisäsen opeista laboratoriotöissä ja avusta metallipitoisuuksien mittaamisessa. Kiitos myös Jyväskylän yliopiston kirjastolle tutkijahuoneesta.

KIRJALLISUUS

Ainsworth, N., Cooke, J., & Johnson, M. 1990a. Distribution of antimony in contaminated grassland: 1 – vegetation and soils. – Environmental Pollution 65: 65–77.

Ainsworth, N., Cooke, J., & Johnson, M. 1990b. Distribution of antimony in contaminated grassland: 2 – small mammals and invertebrates – Environmental Pollution 65: 79–87.

Allen, H. E. 2002. Terrestrial Ecosystems: an overview. – Teoksessa Allen, H.E. Bioavailabity of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants. – Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). USA.

Alloway, B. 1990. Soil processes and the behaviour of heavy metals. – Teoksessa Alloway, B. (toim.) Heavy metals in soils. 2nd edition. – Blackie Academic and Professional. Chapman & Hal. Glasgow. UK. 363s. ss. 4–7.

Baker, S., Herrchen M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kördel, W., Peijnenburg, W. & Rensing, C. 2003. Underlying issues including approaches and information need in risk assessment. – Ecotoxicology and Environmental Safety 56: 6–19.

Baroni, F., Boscagli, A., Protano, G. & Riccobono, F. 2000. Antimony accumulation in *Achillea ageratun, Plantago lanceolata* and *Silene vulgaris* growing in an old Sb-mining area. – Environmental Pollution 109: 347–352.

Bembridge, J.D. 1998. Recommendations from the second international workshop on earthworm ecotoxicology, Amsterdam. Netherlands (April 1997). – Teoksessa Sheppard, S.C. ym. Advances in earthworm ecotoxicology. SETAC. Amsterdam. 413s.

Borovicka, J., Zdenek, R. & Jelínek, E. 2006. Antimony content of macrofungi from clean and polluted areas. – Chemosphere 64: 1837–1844.

Buschmann, J. & Sigg, L. 2004. Antimony (III) binding to humic substances: influence of pH and humic acid. – Environmental Science and Technology 38: 4535 – 4541.

Council of the European Communities 2006. Council Directive 2006/11/EC February 2006 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. – Official Journal L64: 52–59.

Didden, W. 2003. Oligochaeta. – Teoksessa Markert, B., Breure, A. & Zechmeister. Bioindicators and biomonitors. – Elsevier Science. Oxford. UK.

Edwards C.A & Bohlen, P.J 1995. Biology and ecology of earthworms. – Third edition. Chapman & Hall. London.

Edwards, R., Lepp, N.W. & Jones, K.C 1990. Other less abundant elements of potential environmental significance. –Teoksessa Alloway, B.J (toim.) Heavy metals in soils.

Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K. & Wood, W. 2007. Framework for metals risk assessment –Ecotoxicology and Environmental Safety 68: 145–227.

Filella, M., Belzile, N. & Chen, Y. 2002a. Antimony in the environment. A review focused on natural waters. I Occurrence. – Earth-Science Reviews 57: 125–176.

Filella, M., Belzile, N. & Chen, Y. 2002b. Antimony in the environment. A review focused on natural waters. II Relevant solution chemistry. – Earth-Science Reviews 59: 265–285.

Flynn, H., Meharg, A., Bowyer, P. & Paton, G. 2003. Antimony bioavailability in mine soils. – Environmental Pollution 124: 93–100.

Gál, J., Hursthouse, A.S. & Cuthbert, S.J. 2006. Chemical availability of arsenic and antimony in industrial soils. – Environmental Chemistry Letters 3: 149–154.

Haimi. J. 2000. Decomposer animals and bioremediation of soils. –Environmental Pollution 107: 233–238.

Hammel, W., Debus, R. & Steubing, L. 2000. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. – Chemosphere 41: 1791–1798.

He, M. 2007. Distribution and phytoavailability of antimony at an antimony mining and smelting area, Hunan, China. – Environmental Geochemistry and Health 29: 209–219.

Heikkinen, P. 2000: Haitta-aineiden sitoutuminen ja kulkeutuminen maaperässä. – Geologian tutkimuskeskus tutkimusraportti 150s. ss. 42–74.

Hou, H., Takamatsu, T., Koshikawa, M.K. & Hosomi, M. 2006. Concentration of Ag, Sn, Sb and Bi, and their chemical fractionation in typical soils in Japan. – European Journal of Soil Science 57: 214–227.

ISO 11268-1:1993 Soil quality – Effects of pollutans on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.

ISO11268-2:1997: Soil quality – Effects of pollutans on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effect on reproduction.

IARC 1989: Some organic solvents, resinmonomers and related compounds, pigments and occupational exposure in paint manufacturing and painting. – IARC monographs on the evaluation of carcinogenic effects on humans 47. International Agency for Reach in Cancer. WHO.

Johnson, C.A., Moench, H., Wersin, P., Kugler, P. & Wenger, C. 2005. Solubility of antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. – Journal of Environmental Quality 34: 249–254.

Komulainen H. 2005. Pilaantuneet maat. – Teoksessa Janhunen, M., Komulainen, H., Nevalainen, A., Tuomisto, J., Venäläinen, R. & Viluksela, M. Selvitys elinympäristön kemikaaliriskeistä. Kansallisen kemikaaliohjelman taustaselvitys. – Kansanterveys laitoksen julkaisuja B11/2005. Helsinki.

Krachler, M., Emons, H. & Zheng, J. 2001. Speciation of antimony for the 21st century: promises and pitfalls. – Trends in Analytical Chemistry 20: 79–89.

Kuperman, R., Checkai, R., Simini, M., Phillips, C., Speicher, J.& Barclift, D. 2006. Toxicity benchmarks for antimony, barium and beryllium determined using reproduction endpoints for *Folsomia Candida*, *Eisenia Fetida* and *Enchytraeus Crypticus*. – Environmental Toxicology and Chemistry 25: 754–762.

Langdon, C., Hodson, M., Arnold, R. & Black, S. 2004. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and soil avoidance test. – Environmental Pollution 138: 368–375.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. & Basta, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. – Ecotoxicology and Environmental safety 57: 39–47.

Lee, K.E & Foster, R.C. Soil fauna and soil structure. – Australian Journal of Soil Research 29: 745–775.

Leuz, A-K., Mönch, H. & Johnson, C.A. 2006. Sorption of Sb(III) and Sb(V) to goethite: influence on Sb(III) oxidation and mobilization. – Environmental Science & Technology 40: 7278–7282.

Lintschinger, J., Michalke. B, Schulte-Hostede, S. & Schramel, P. 1998. Studies on speciation of antimony in soil contaminated by industrial activity. – International Journal of Analytical Chemistry 72: 11–25.

Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M. Oikari, A. & Haimi, J. 2004. Biomarker responses of earthworm Aporrectodea tuberculata to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier exposure. – Environmental Pollution 129: 377–386.

Lukkari, T. & Haimi, J. 2005. Avoidance of Cu- and Zn-contamined soil by three ecologically different earthworms. – Ecotoxicology and Environmental Safety 62: 35–41.

McLean, J. & Bledsoe, B. 1992. Behavior of metals in soils. EPA Ground Water Issue. – EPA/540/S-92/018.

McCarty L. & Mackay, D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. – Environmental Science & Technology 27: 1719–1728.

McIndoe, E.C., Bembridge, J.D. & Martin, P. 1998. Improving the accuracy and precision of earthworm laboratory experiments through the use of pretreatment measuments. – Teoksessa. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. & Posthuma, L. (toim.). Advances in earthworms ecotoxicology. SETAC. Amsterdam. 413s.

McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, R. Fisher, N., Sappington, K. & Drexler, S. 2004. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals – U.S. Environmental protection agency. Risk Assessment Forum. Washington.

Meharg, A., Shore, R. & Broadgate, K. 1998. Edaphic factors affecting the toxicity and accumulation of arsenate in the earthworm Lumbricus terrestris. – Environmental Toxicology and Chemistry 17: 1124–1131.

Mitsunobu, S., Harada, T. & Takahashi, Y. 2006. Comparision of Antimony Behavior with that of Arsenic under Various Soil Redox conditions. – Environmental Science and Technology 40: 7270–7276.

Miller, J.N. & Miller, J.C. 2000. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. – Fourth edition. Pearson Education Limited. Dorset. Great Britain.

Morgan, J.E. & Morgan, A.J. 1993. Seasonal changes in the tissue-metal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysiologically dissimilar earthworm species: pollution monitoring implications. – Environmental Pollution 82: 1–7.

Murciego Murciego, A., García Sánchez, A., Rodrígues González, M.A., Pinilla Gil, E., Toro Gordillo, C., Cabezas Fernández, J. & Buyolo Triguero, T. 2007. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (Cytisus stiratus, Cistus ladanifer and Dittrichia viscosa) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). – Environmental Pollution 145: 12–21.

Nahmani, J., Hodson, M. & Black, S. 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. – Environmental Pollution 145: 402–424.

Peijnenburg, W., Posthuma, L., Eijsackers, H. & Allen, H. 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. – Ecotoxicology and Environmental Safety 37: 163–172.

Peijnenburg, W., Zablotskaja, M. & Vijver, M. 2007. Monitoring metals in terrestrial environments a bioavailability framework and a focus on soil extraction. – Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 163–179.

Pellinen, J., Sorvari, J. & Soimasuo M. 2007. Pilaantuneen maaperän ekologinen riskinarviointi. – Ympäristöopas 2007. Suomen Ympäristökeskus. Helsinki.

Pöyhönen, S. 2007. Antimonin, arseenin ja lyijyn uuttaminen maanäytteistä ultraääniavusteisella vaiheittaisella uuttomenetelmällä. – Erikoistyö. Epäorgaanisen ja analyyttisen kemian osasto. Jyväskylän yliopisto.

Quevauviller, P., Ure, A., Muntau, H. & Griepink, B. 1993: Improvement of analytical measurements within the BCR-programme: single and sequential extraction procedures applied to soil and sediment analysis. – International Journal of Environmental Analytical chemistry 51: 129–134.

Sauvé, S. 2002. Speciation of metals in soils. – Teoksessa Allen, H.E. (toim). Biovailabity of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants. – Society of Environmetal Toxicology and Chemistry (SETAC). USA.

Scheinost, A., Rossberg, A., Vantelon, D., Xifra, I., Kreutzschmar, R., Leuz, A.-K., Funke, H. & Johnson, A. 2006. Quantitative antimony speciation in shooting-range soils by EXSFS spectroscopy. – Cheochimica et Cosmoshimica Acta 70: 3299 – 3312.

Schwertmann, U. & Taylor, R.M. 1989. Iron Oxides. – Teoksessa Dixon, J.B. & Weed, S.B. (toim.) Minerals in soil environment. – 2nd edition. Soil Science Society of American book series. Madison. USA.

Steely, S., Amarasiriwardena, D. & Xing, B. 2007: An investigation of inorganic antimony species and antimony associated with soil humic acid molar mass fractions in contaminated soils. – Environmental Pollution 148: 590–598.

Spuller, C., Weigand, H. & Marb, C. 2007. Trace metal stabilisation in a shooting range soil: mobility and phytotoxicity. – Journal of Hazardous Materials 141: 378–387.

Spurgeon, D.J. & Hopkin, S.P. 1996. The effects of metal contamination on earthworm populations aroud smelting works – quantifying species effect. – Applied Soil Ecology 4: 147–160.

Spurgeon, D.J. & Weeks, J.M. 1998. Evaluation of factors influencing results form laboratory toxicity test with earthworms. – Teoksessa. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. & Posthuma, L. (toim.). Advances in earthworm ecotoxicology. SETAC. Amsterdam. 413s.

Svendsen, C. Meharg, A., Freestone, P. & Weeks, J. 1996. Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire. – Applied Soil Ecology 3: 99–107.

Tessier, A., Campbell, P.G. & Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals – Analytical Chemistry 51:844-850.

Terhivuo, J. 1989. The lumbricidae (Oligochaeta) of southern Finland: species assemblages, numbers, biomass and respiration. – Annales Zoologici Fennici 26: 1–23.

Tighe, M., Ashley, P. Lockwood, P. & Wilson, S. 2005. Soil, water and pasture enrichment of antimony and arsenic a coastal floodplain system. – Science of the Total Environment 347: 175–186.

Ure, A. 1990. Methods of analysis for heavy metals in soils. –Teoksessa Alloway, B. 1990. Heavy metals in soils.

USEPA 1994. Method 200.8. Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma-mass spectrometry. EPA-600/R-94-111. – United States Environmental Protection Agency.Washington. DC.

USEPA 1996. Method 3050B. Acid digestion od sediments, sludges and soils. SW-846 Test methods for evaluating sold waste physical/chemical methods. – United States Environmental Protection Agency.Washington DC.

Valtioneuvoston asetus maaperän pilaantuneisuuden ja puhdistustarpeen arvioinnista. 214/2007.

Vink, B.W. 1996. Stability relation of antimony and arsenic compounds in the light of revised and extended Eh-pH diagrams. – Chemical Geology 130: 21–30.

Väisänen, A. & Kiljunen, A. 2005. Ultrasound-assisted sequential extraction method for the evaluation of mobility of toxic elements in contaminated soils. – International Journal of Environmental Analytical Chemistry 85: 1037–1049.

Väisänen, A., Suontamo, R., Silvonen. J.,& Rintala, J. 2002. Ultrasound-assisted extraction in the determination of arsenic, cadmium, copper, lead and silver in contaminated soil samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. –Analytical and Bioanalytical Chemistry 373: 93–97.

Wilson, N,J., Craw, D. & Hunter, K. 2004. Antimony distribution and environmental mobility at an historic antimony smelter site, New Zealand. – Environmental Pollution 129: 257–266.

Wen, B., Liu, Y., Hu, X. & Shan, X. 2006. Effect of earthworms *(Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. – Chemosphere 63: 1179–1186.

White, R.E. 1979. Introduction to the principles and practice of soil science. – Blackwell. Oxford.