

**Satamasedimenttien
ekotoksikologinen riskinarviointi**

Pro Gradu –tutkielma

Pekka Kautto



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

28.2.2008

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede / Ympäristöanalytiikka ja ekotoksikologia

KAUTTO, P.: Satamasedimenttien ekotoksikologinen riskinarviointi
Pro Gradu 79 s., 1 liite (16 sivua)
Työn ohjaaja: Professori Aimo Oikari
Tarkastajat: FT Aarno Karels ja Prof. Aimo Oikari
Helmikuu 2008

Hakusanat: Satama, sedimentti, riskiarviointi, PAH, polysykliset aromaattiset hiilivedyt, *Caenorhabditis elegans*, Lappeenranta, Jyväskylä

TIIVISTELMÄ

Saastuneet vesistöjen pohjasedimentit muodostavat ekotoksikologisen riskin pohjaeläimille. Erityisesti hydrofobiset orgaaniset haitta-aineet, kuten polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet), kerääntyvät sedimentteihin yläpuolista vettä korkeammiksi pitoisuuksiksi ja saattavat pohjaeläimistölle aiheutuvien haitallisten vaikutusten kautta vaikuttaa koko vesistön tilaan. Sisävesisatamien sedimenttien PAH-yhdisteiden aiheuttamia ekotoksikologisia riskejä arvioitiin Jyväskylän ja Lappeenrannan satamissa kemiallisten analyysien ja toksisuuskoekiden avulla. Satamista ja niille johtavien väylien alueelta Ekman-noutimella otetuista sedimenttinäytteistä analysoitiin substituomattomia ja alkyloituja PAH-yhdisteitä sekä polysyklisiä aromaattisia ketoneita. Näytteiden toksisuutta tutkittiin altistamalla sukkulamato *Caenorhabditis elegans* sedimentin huokosvedelle sekä kiinteälle sedimentille. Subletaaleina vasteina, kestoltaan 96 ja 72 tunnin kokeissa mitattiin pituuskasvun, lisääntymisnopeuden ja sukukypsyyden inhibitiota. Työn yhteydessä laadittiin ohje *C. elegansin* kasvatukseen ja käyttöön toksisuuden tutkimisessa.

Tutkitut sedimentit eivät PAH-yhdisteiden osalta muodosta merkittävää toksisuusriskiä Jyväskylän tai Lappeenrannan sataman pohjaeläimistölle. Sedimenttien huokosvesi oli eräillä Lappeenrannan sataman alueilla sekä Jyväskylän satamassa lievästi toksista *C. elegansille*, mutta kokosedimentille altistettaessa vaikutuksia ei havaittu, mahdollisesti epäherkemman testin ja vähäisemmän biosaataavuuden vuoksi. Molempien satamien sedimenttien PAH-yhdisteet ovat haitallisiksi tunnettuihin pitoisuuksiin verrattuna matalat, mutta paikoitellen bentso[a]antraseenin pitoisuudet ylittävät saastuneelle ruoppausmassalle annetun ohjearvon 0,3 mg/kg. Alkyyli-PAH-yhdisteistä ainoastaan reteeni esiintyi yli 0,5 µg/g pitoisuuksina. Polysyklisiä aromaattisia ketoneita (fluorenoni) havaittiin yhdessä näytteessä. Tulokset tukevat käsitystä, jonka mukaan orgaanisen orgaanisen hiilen pitoisuus on keskeinen PAH-yhdisteiden sedimenttiin sitoutumiseen vaikuttava tekijä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental science and technology / Environmental analytics and ecotoxicology

KAUTTO, P.: Ecotoxicological risk assessment of lake harbour sediments
Master of Science Thesis: 79 p., 1 appendice (16 p.)
Supervisors: Professor Aimo Oikari
Inspectors: PhD Aarno Karels and Prof. Aimo Oikari
February 2008

Key Words: Lake harbour, sediment, risk assessment, PAH, Polycyclic aromatic hydrocarbons, *Caenorhabditis elegans*, Lappeenranta, Jyväskylä

ABSTRACT

Chemically contaminated sediments pose an ecotoxicological risk to benthic animals. Especially hydrophobic organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), can accumulate into sediments and may affect the aquatic ecosystem via harmful effects to benthic fauna. The ecotoxicological risks of lake harbour sediments were assessed in two case studies, Jyväskylä and Lappeenranta harbours. The sediment samples were collected in and near harbour areas using Ekman grab sampler and analysed for both unsubstituted and alkylated PAH-compounds and for polycyclic aromatic ketones. Toxicity of the samples were examined by exposing a threadworm *Caenorhabditis elegans* to pore water and sediment. The sublethal endpoints measured after 96 and 72 hour tests were inhibition of growth, reproduction and maturity. An operation procedure for *C. elegans* care and use as toxicity test organism were developed during the work.

PAH –compounds of the assessed harbour sediments don't cause a significant risk to benthic fauna either in Jyväskylä or Lappeenranta. Pore water of some harbour sediments was weakly toxic to *C. elegans*, but effects were not noticed while using sediment as test matrix. Possibly this was due to a less sensitive bioassay and reduced bioavailability. PAH concentrations in all the samples were low compared to Finnish guideline values. However, the guideline values to dredged sediments of benzo[a]anthracene (0.3 mg/kg) were exceeded in some of the sample sites. Retene was the only alkylated PAH compound exceeding the concentration 0.5 µg/g. Polycyclic aromatic ketones (fluorenone) were detected in one sample. The results support the conclusion of the important role of organic carbon in sorption of PAHs to sediment.

Keskeiset termit ja lyhenteet

Σ16 PAH	Kuudentoista PAH-yhdisteen summapitoisuus
AVS	Sedimentin sisältämä sulfidi, joka voi sitoutua metalleihin (Acid Volatile Sulphide)
B[a]P	Bentso[a]pyreeni
DOC	Liuenneiden orgaanisten yhdisteiden hiili (Dissolved Organic Carbon)
dw	Kuivapaino (dry weight)
ERA	Ekologinen riskinarviointi
GC/MS	Laitteistokokoonpano jossa kaasukromatografiin on liitetty massaselektiivinen detektori.
haitta-aine	Ympäristössä esiintyvä aine joka voi aiheuttaa haitallisia vaikutuksia eliöissä.
LOEC	Matalin pitoisuus, jossa koe-eliössä havaittiin muutos tutkitussa vasteessa (Lowest Observed Effect Concentration).
Negatiivinen kontrolli	Toksisuusmittauksissa käytetty myrkytön vertailunäyte, josta käytetään myös nimityksiä nollanäyte, nollakontrolli ja blank.
MTBE	Metyyli-tert-butyylieetteri
PAH	Polysyklinen aromaattinen hiilivety
Positiivinen kontrolli	Toksisuusmittauksissa käytetty vertailunäyte joka sisältää tunnetun pitoisuuden haitallista ainetta. Käyteään myös nimitystä referenssiaine.
Prekursori	Lähtöaine, joka voi muuntua toiseksi aineeksi
Pyrolyysi	Orgaanisten yhdisteiden hajoamista ja muuntumista korkean lämpötilan vaikutuksesta
Referenssinäyte	Päästölähteen oletetun vaikutusalueen ulkopuolelta, samankaltaisista olosuhteista peräisin oleva vertailunäyte. Auttaa taustapitoisuuksien määrittämisessä ja paikallisten olosuhteiden huomioimisessa.
TOC	Orgaanisten yhdisteiden hiili (Total Organic Carbon)
ww	Märkäpaino (wet weight)

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	3
1.1 Sedimenttien merkitys vierasaineiden nieluna ja lähteenä	4
1.2 Polysykliset aromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet	8
1.3 Sedimenttien toksisuuden tutkiminen	19
1.4 Sukkulamoto <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
1.5 Ekotoksikologinen riskinarviointi	23
1.6 Tutkimuksen tavoitteet	26
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	27
2.1 Tutkimuskohteet ja näytteenotto	27
2.2 Kemialliset analyysit	30
2.3 Toksisuuden mittaaminen	37
2.4 Kohteiden aiemmat tutkimukset	39
2.5 Tilastolliset menetelmät	40
3 TULOKSET	41
3.1 Kemialliset analyysit	41
3.2 Sedimenttien toksisuus	45
3.3 Muut tutkimukset	50

4 TULOSTEN TARKASTELU	52
4.1 Näytteiden edustavuus ja analytiikka	52
4.2 Satamaedimenttien PAH-yhdisteet	53
4.3 Sedimenttien toksisuus	56
4.4 Riskinarviointi	58
4.5 Lisätutkimustarpeet	65
5 JOHTOPÄÄTÖKSET	66
KIITOKSET	67
KIRJALLISUUSVIITTEET	67
Liite Sukkulamato <i>Caenorhabditis elegans</i> – kasvatus ja käyttö toksisuuskokeissa	

1. JOHDANTO

Tässä työssä tutkittiin kahden sisävesisataman, Jyväskylän ja Lappeenrannan sataman, merkitystä sedimentteihin kerääntyvien myrkyllisten aineiden päästölähteenä, sekä arvioitiin niiden ekotoksikologisia riskejä pohjaeläimille. Toisin kuin rannikon satamista (esim. Kohonen & Kotilainen 2005), sisävesisatamien sedimenteistä ja niiden ympäristöriskeistä ei toistaiseksi ole Suomessa julkaistua tietoa. Sedimenttien toksisuuden arvioinnissa hyödynnettiin sukkulamatoa *Caenorhabditis elegans*, tiettävästi ensimmäistä kertaa ekotoksikologiseen tutkimukseen Suomessa. Työ oli luonteeltaan kartoittava ja menetelmien kehittäminen oli keskeisessä roolissa.

Sedimentit ja pohjaeläimet

Vesistöjen pohjien sedimentit ovat puolikiinteää ainesta, joka koostuu mineraaleista, orgaanisesta aineksesta ja kiinteiden hiukkasten välisestä välivedestä. Sedimenteillä on suuri merkitys vesiekosysteemien aineiden kierrossa: Vesifaasista laskeutuu materiaalia sedimenttiin, jossa tavallisesti tapahtuu merkittävin osuus orgaanisen aineen hajoamisesta. Toisaalta sedimentistä siirtyy eloperäisen aineksen hajoamisessa vapautuvia ravinteita ja muita yhdisteitä ylläolevaan veteen (Burton & MacPherson 1995). Bakteerien ja alkueläinten ohella laaja kirjo monisoluisia pohjaeläimiä asuttaa vesistöjen sedimenttejä kattaen eri trofiatasoja ja toimien saaliina tai saalistajina, herbivoreina tai omnivoreina. Monet pohjaeläimet vaikuttavat predaation kautta sedimenttien bakteerien runsauteen ja biomassaan (Traunspurger & Drews 1996). Lisäksi pohjaeläimet käyttävät ravintonaan kasviainesta ja hienojakoista, ravintoarvoltaan huonoa detritusta. Käyttäessään ravintoa oman biomassansa kasvattamiseen ne muuttavat sen muotoon joka on edelleen muiden eläinten kuten kalojen käytettävissä (Särkkä 1996). Eläimillä onkin huomattava vaikutus energian, ravinteiden ja orgaanisen aineksen kiertoon pohjan ja avoveden välillä.

Saastuneella sedimentillä tarkoitetaan sedimenttiä, joka sisältää kemiallisia yhdisteitä

ympäristölle tai terveydelle vaaraa aiheuttavina pitoisuuksina (Ingersoll 1995). Sedimenttien kontaminaatio etenkin hydrofobisilla orgaanisilla haitta-aineilla on maailmanlaajuinen vesistöjä uhkaava ilmiö. Saastuneet sedimentit erityisesti virtaavissa vesissä, järvissä, suistoissa ja satamissa aiheuttavat ekologisia ja terveydellisiä riskejä. Useissa tutkimuksissa on osoitettu haitallisten vaikutusten mahdollisuus sedimentin läheisyydessä eläville ja sieltä ravintoa ottaville eliöille, vaikka veden laadulle asetetut raja-arvot eivät ylittyisikään (Apitz ym. 2005). Muutokset pohjaeläinyhteisössä voivat vaikuttaa ravinteiden kiertoon vesistössä ja siten myös ekosysteemin tuottajatasoon ja koko eliöyhteisöön (Burton & MacPherson 1995). Tiettyjen sedimentin eliöiden, kuten hiilivetyjä hajottavien mikro-organismien, katoaminen voi merkittävästi heikentää vesiekosysteemin kykyä toipua myöhemmästä lisäkontaminaatiosta (Traunspurger & Drews 1996). Myös haitta-aineiden aiheuttamalla denitrifikaation inhibitiolla voi olla huomattava vaikutus ekosysteemille. Denitrifikaatiossa vesiliukoiset typpiyhdisteet pelkistyvät typpikaasuksi, ja siten käytännössä poistuvat eliöiden käytöstä. Näinollen denitrifikaatio vastustaa vesistöjen eutrofikaatiota eli rehevöitymistä. Koska useat orgaaniset haitta-aineet kertyvät sedimentteihin, ne saattavat haitata denitrifikaatiota, mistä seuraa nitraattipitoisuuden kasvu. Niinpä alueet, joilla orgaanisten haitta-aineiden akkumuloitumisen vuoksi on vähentynyt denitrifikaatio, ovat herkempiä suurten typpipäästöjen eutrofisoivalle vaikutukselle (Magnusson ym. 1996).

1.1 Sedimenttien merkitys vierasaineiden nieluna ja lähteenä

Vesistöön päässeiden haitallisten aineiden kulkeutumisen kannalta pohjasedimentit toimivat tyypillisesti niiden nieluna, sillä vedessä monilla yhdisteillä on taipumusta kompleksoitua ja adsorboitua sedimentin kiinteän aineksen kanssa. Haitallisten aineiden pitoisuudet sedimentissä ovatkin tavallisesti huomattavasti korkeampia kuin ylläolevassa vedessä. Sedimenttejä voidaankin pitää eräänlaisina varastoina, joihin päätyy useista toiminnoista syntyvien päästöjen kemiallisia ja biologisia kontaminantteja (Särkkä 1996; Apitz ym. 2005).

Toisaalta sedimentti voi toimia myös likaantumisen sekundäärisenä lähteenä, jos sitoutuneet aineet vapautuvat takaisin veteen. Tämä voi nopeutua sedimentin sekoittuessa veteen esimerkiksi aallokon aiheuttaman resuspension vaikutuksesta. Aineiden pitoisuudet

sedimentin eri kohdissa vaihtelevat, eli toisin sanoen pohjasedimentissä voi esiintyä erilaisia konsentraatiogradientteja. Bioturbaatio eli pohjaeläinten pystysuunnassa tapahtuva aineiden kuljetus voi muuttaa näitä jakaantumisia ja olla syynä siihen, että aineet osittain palautuvat sedimentin ylläolevaan veteen. Ihmistoiminnasta erityisesti ruoppaus voi päästää liikkeelle suuria ainemääriä (Traunspurger ym. 1996; Särkkä 1996; Apitz ym. 2005).

Sedimenttien tutkiminen

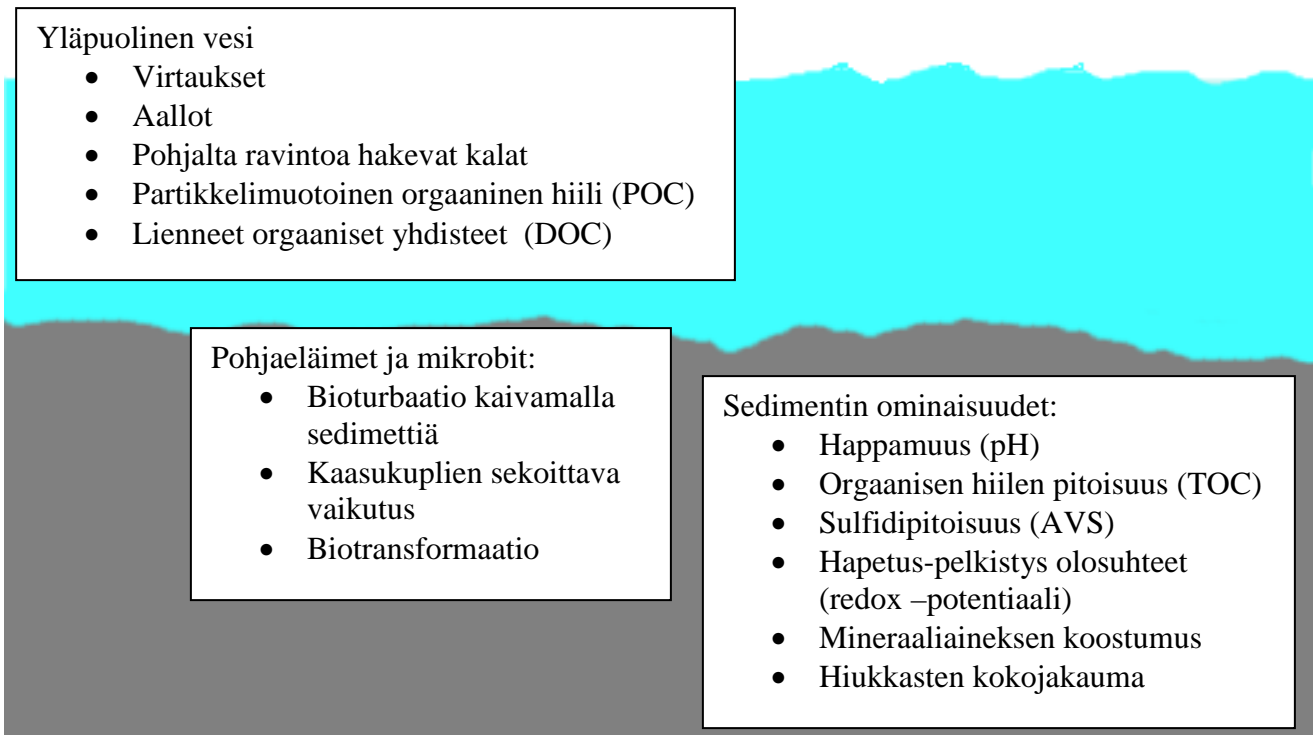
Se yksinkertainen tosiasia, että sedimentit sijaitsevat veden alla, tekee kontaminoituneen ekosysteemin mittauksista, havainnoinnista ja kartoituksesta teknisesti haasteellista ja kustannuksiltaan kallista. Sedimenteissä yhdistyvät päästöt useista lähteistä eri puolilta valuma-aluetta, mikä vaikeuttaa tarkan päästölähteen jäljittämistä. Samasta syystä sedimentit ovat usein monien eri kemikaalien kontaminoimia, mikä tekee riskinarvioinnista ja päätöksenteosta haastavaa (Burton & MacPherson 1995).

Haitalliset aineet voivat vaikuttaa eliöstöön sekä välittömästi (akuutit vaikutukset) että pitkäaikaisvaikutuksina (krooniset vaikutukset). Suorien vaikutusten lisäksi kemikaalit voivat aiheuttaa ympäristövaikutuksia myös epäsuorasti esimerkiksi muuttamalla ravintoketjua. Kemikaalien vaikutuksia voi ilmetä niin solu-, yksilö-, populaatio- kuin eliöyhteisötasollakin. Osa seurauksista on helposti havaittavissa, mutta usein vaikutukset ovat epäselviä, esimerkiksi pelkästään kokemusperäisesti havaittavia, tai niistä ei ole lainkaan tietoa. Useimmissa päästöjä vastaanottavissa vesistöissä haitta-aineiden vaikutuksia onkin vaikea havaita syy-seuraustasolla ja kemikaalien vaikutusten havaitseminen edellyttää erilaisia tutkimuksia sekä riskin arviointi menetelmien käyttöä, kuten:

- pohjaeläinyhteisön tutkimista
- kemiallisia analyysejä
- hydrodynamiikan ja sedimentin kulkeutumisen mittaamista
- kasvupaikkatutkimuksia
- toksisuuden tutkimista (Burton & MacPherson 1995; Ingersoll 1995).

Biosaatavuus

Sedimentin toksisuuden arviointi sen sisältämän haitta-ainesisällön perusteella on osoittautunut erittäin vaikeaksi, sillä kemikaalien vuorovaikutukset sedimentin kanssa muuttavat niiden toksisuutta. Matalimmat kemikaalin biologisia vaikutuksia aiheuttavat pitoisuudet vaihtelevat erilaisten sedimenttien välillä jopa yli 10-kertaisesti (Traunspurger ym. 1996; Leppänen 1999). Biosaatavuus viittaa kemikaalin fraktioon joka voi siirtyä eliöön. Yleisesti hyväksytyn käsityksen mukaan pääasiassa sitoutumaton, helposti saatavilla oleva fraktio aiheuttaa toksisuuden. Chapman ym. (1997) mukaan kokemusperäisen tiedon perusteella sedimentin huokosveden vierasainepitoisuuksista voidaankin sedimentin kokonaispitoisuutta luotettavammin ennustaa toksisuutta ja jopa eliöyhteisötason vaikutuksia. Biosaatavuuden väheneminen riippuu sekä sedimenttien että kemikaalin fyysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista, joista merkittävimpiä ovat orgaanisen hiilen (TOC) ja metalleihin sitoutuvan sulfidin (AVS) pitoisuudet. Myös happamuus, hapetus-pelkistys olosuhteet, sedimentin mineraaliainekset sekä kemikaalin sitoutumisominaisuudet vaikuttavat biosaatavuuteen (Kuva 1, Burton & MacPherson 1995; Traunspurger ym. 1996).



Kuva 1. Sedimentin sisältämien haitta-aineiden biosaatavuuteen vaikuttavia tekijöitä.

Poolittomien orgaanisten yhdisteiden biosaatavuuteen vaikuttavista tekijöistä merkittävin on sedimentin sisältämän orgaanisen hiilen pitoisuus. Tämän tiedon pohjalta on luotu tasapainojakautumis -lähestymistapa (equilibrium partitioning approach, Di Toro ym. 1991). Teoria perustuu oletukseen, että aineen biosaatavuus on suoraan verrannollinen sen pitoisuuteen välivedessä ja kääntäen verrannollinen sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuuteen. Tasapainojakautumisteoria ennustaa, että jos sedimentin huokosvesi on siihen liuenneiden aineiden suhteen tasapainossa kiinteän aineksen kanssa, niin vakiintunut tila sedimentin orgaanisen hiilen ja eliön lipidien välillä saavutetaan riittävän ajan kuluessa aineiden kulkeutumistavasta riippumatta (Di Toro ym. 1991).

Lukuisat tutkimukset tukevat tasapainojakautumisteoriaa, mutta eräissä tutkimuksissa on saatu sen suhteen ristiriitaisia tuloksia. Esimerkiksi Leppäsen (1999) mukaan harvasukamadolla *Lumbriculus variegatus* suoritetuissa bioakkumuloitumiskokeissa sedimentin nieleminen altisti eläimet selvästi suuremmalle biosaatavalle PAH-fraktiolle kuin pelkästään ihon kautta tapahtuva altistuminen. Kemikaali voi siirtyä vesiympäristössä eliöön paitsi suoraan pintakudoksen, kuten ihon läpi, myös suolistosta niellyn ravinnon tai veden mukana. Kulkeutumisreitit suhteellinen merkitys vaihtelee paitsi kemikaalin hydrofobisuuden mukaan, myös eliön ravinnonottotavan ja sedimentin ominaisuuksien mukaan. Niellyn materiaalin merkitys vierasaineen akkumuloitumisessa lisääntyy aineen hydrofobisuuden kasvaessa (Leppänen 1999). Huokosvedestä tapahtuvaa akkumuloitumista rajoittaa desorptionopeus sedimentin hiukkasista sekä diffuusionopeus sedimentissä (Landrum ym. 2002). Weston ym. (2000) mukaan harvasukamadolle *Abarenicola pacifica* bentso[a]pyreenillä (B[a]P) tehdyissä bioakkumuloitumiskokeissa eri absorptioreittien suhteellisen merkityksen havaittiin riippuvan altistumisajasta. Yhtä vuorokautta lyhyemmissä altistuskokeissa veteen liunneen B[a]P:n absorptio ihon läpi elimistöön havaittiin merkittävimmäksi kulkeutumisreitiksi. Sen sijaan 72:n tunnin altistuksen jälkeen keskimäärin 77 % kudoksen B[a]P:stä arvioitiin kulkeutuneen kudoksiin niellyn ravinnon välityksellä. Sedimenttiä ravintonaan käyttäville eliölle ravinto saattaakin olla merkittävin hydrofobisten myrkkujen kulkeutumisreitti (Weston ym. 2000).

Sedimenttien haitta-aineet

Suomen ympäristöhallinnon vuonna 1995 tekemässä Saastuneiden sedimenttien kartoitus –

hankkeessa selvitettiin saastuneiden järvi- ja rannikkosedimenttien sijaintia ja määrää. Selvityksen mukaan sedimenttien pilaantumista aiheuttavista toiminnoista merkittävimpiä ovat kaatopaikat sekä mekaanisen puunjalostuksen laitokset kuten sahat ja kyllästämöt. Myös kemiallisen puunjalostuksen, kemianteollisuuden, metalliteollisuuden, korjaamo- ja konepajatoiminnan sekä jätevedenpuhdistamoiden todettiin aiheuttaneen sedimenttien saastumista. Sedimentteihin kertyneistä haitallisista aineista merkittävimpiä olivat orgaaniset klooriyhdisteet, öljyt ja metallit. Saastumistilanteen laajuudesta ei kuitenkaan saatu varmuutta, sillä pilaaviksi toiminnoiksi tunnistetaan myös monia muita toimialoja, jotka eivät sisällyneet selvityksen tietolähteenä olleeseen pilaantuneita maa-alueita koskeneeseen, ns. Samase – kartoitukseen (Ympäristöministeriö 2004).

Satamat ovat ihmistoiminnan erityisen voimakkaasti muokkaamia rannikkoalueita. Satamissa ja niiden läheisyydessä sedimentteihin kertyy eliöille haitallisia yhdisteitä erityisesti öljyperäisiä hiilivedyistä sekä alusten vedenalaisten rakenteiden eliöidenestomaaleista (Martínez-Lladó ym. 2006). Eliöidenestomaalien (antifouling) orgaaniset tinayhdisteet tributyyliitina (TBT) ja trifenyylitina (TPT) ovat ongelmana lähes kaikissa Euroopan satamissa (Korhonen & Kotilainen 2005). Esimerkiksi vuonna 2005 tehdyn tutkimuksen mukaan lähes koko Helsingin edustan sedimentin TBT-pitoisuudet ulkomerialuetta lukuunottamatta ylittävät ympäristöministeriön (2004) sedimenttien ruoppaus- ja läjitysohjeen haitattoman ruoppausmassan pitoisuusohjearvon, 3 µg/kg (Vatanen 2005). Orgaanisten tinayhdisteiden saastuttamia sedimenttejä on paitsi rannikolla myös sisävesien venesatamissa (Fent 2004). Korkeiden TBT- ja TPT-pitoisuuksien ohella satamien ja niille johtavien väylien sedimenteissä on usein myös kohonneita pitoisuuksia raskasmetalleja sekä polykloorattuja bifenyyleitä (PCB) ja PAH-yhdisteitä (Korhonen & Kotilainen 2005).

1.2 Polysykliset aromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet) ovat monimuotoinen ja suhteellisen yleinen eri puolilla Maapalloa; maaperään, vesistöihin ja ilmaan levinnyt haitta-aineiden ryhmä. PAH nimitystä käytetään yleisesti hiilivedyistä joissa on kaksi tai useampia toisiinsa liittyneitä aromaattisia renkaita (Kuva 2). Vaikka hiilivety -nimitys viittaa periaatteessa vain

hiiltä ja vetyä sisältäviin yhdisteisiin, silti monet PAH-yhdisteisiin luokiteltavat aineet sisältävät myös heteroatomeita kuten typpeä, happea tai rikkiä. Kemiallisen ja toiminnallisen samankaltaisuuden vuoksi näitä yhdisteitä käsitellään samassa yhteydessä varsinaisten polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen kanssa (Varanasi 1989).



Kuva 2. Kaksi-seitsemänrenkaisten polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen rakennekaavoja vasemmalta oikealle: naftaleeni, antraseeni, pyreeni, bentso[a]pyreeni ja koroneeni

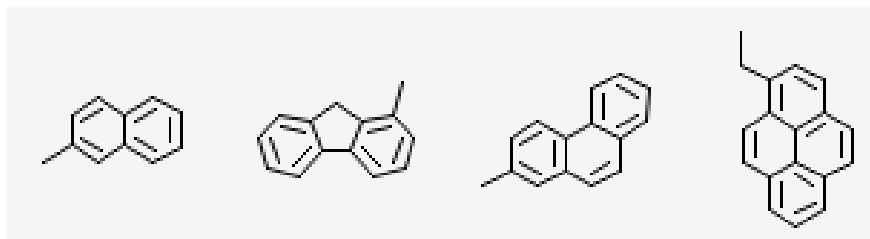
PAH-yhdisteiden muodostuminen

PAH-yhdisteitä muodostuu:

1. Matalan lämpötilan diagenesissä, jossa geologisten sedimenttien orgaanisista aineista on hitasti muuntunut fossiilisia polttoaineita (Burgess ym. 2003).
2. Bakteerien, sienten, kasvien ja hyönteisten pigmenttien, terpeenien ja vahojen biosynteesissä hapettomissa olosuhteissa (Budzinski ym. 1997).
3. Orgaanisen aineksen epätäydellisessä palamisessa, pyrolyysissä ja pyrosynteesissä (Burgess ym. 2003).

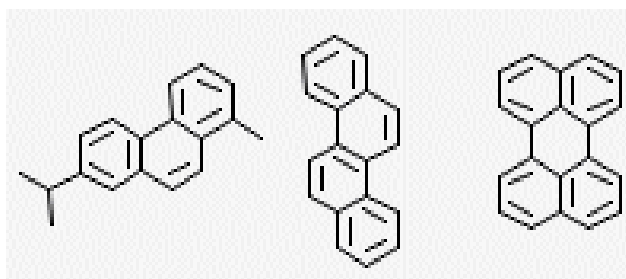
PAH-yhdisteitä syntyy pyrogeenisesti, kun orgaaniset yhdisteet hajoavat pyrolyysissä korkean lämpötilan (500–800 °C) vaikutuksesta pienimolekyylisemmiksi radikaaleiksi, jotka liittyvät toisiinsa muodostaen alkyloimattomia aromaattisia rakenteita Pyrogeenisesti muodostuneita PAH-yhdisteitä esiintyy mm. pakokaasuissa, moottoriöljyssä, tervassa, kreosootissa ja puun poltosta syntyvässä savussa. Merkittävimpiä pyrogeenisten PAH-yhdisteiden lähteitä ovat fossiilisia polttoaineita käyttävät teollisuus- ja voimalaitokset, metallien valmistus, jätteenpolto, dieselöljyä ja bensiiniä käyttävien ajoneuvojen pakokaasut sekä metsäpalot (Albers 1995; Sanders ym. 2002; Burgess ym. 2003; Boonyatumanond ym. 2006).

Raakaöljy ja öljyjaloitteet muodostavat toisen merkittävän PAH-lähteen (petrogeeninen lähde). Raakaöljy sisältää laadusta riippuen 0,2–7 %, pääasiassa alkyloituja PAH-yhdisteitä (Kuva 3). Petrogeenistä alkuperää olevat PAH-yhdisteet ovat syntyneet fossiilisten polttoaineiden muodostuessa diageneettisessä prosessissa suhteellisen matalassa lämpötilassa (100-300 °C) geologisten aikajaksojen kuluessa (Albers 1995; Burgess ym. 2003; Boonyatumanond ym. 2006).



Kuva 3. Alkyloituja PAH-yhdisteitä: 2-metyylinaftaleeni, 1-metyylifluoreeni, 2-metyylifenantreeni ja 1-etyylipyreeni.

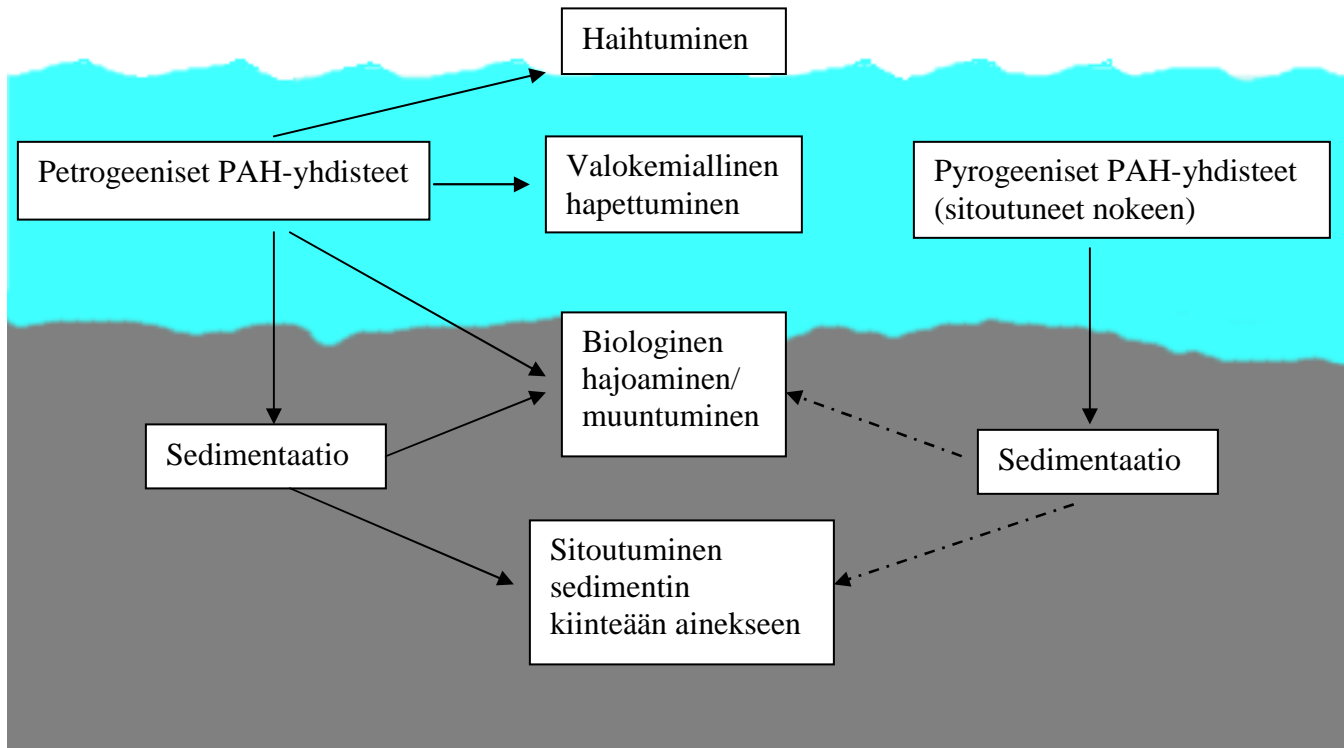
PAH-yhdisteitä voi muodostua myös biogeenisistä prekursoreista kuten terpeeneistä, pigmenteistä ja steroideista hapettomissa ja pelkistävissä olosuhteissa (Budzinski ym. 1997). Esimerkiksi kryseeniä muodostuu biologisesti pentasyklisistä triterpeeneistä, kuten α - ja β -amyriineistä, jotka ovat kasvien kutikulan vahojen tärkeimpiä ainesosia (Yang 2000). Toinen tavallinen biologista alkuperää oleva PAH yhdiste on reteeni eli 7-isopropyyli-1-metyylifenantreeni. Reteeniä muodostuu paitsi biomassan poltossa, myös sedimenteissä havupuista peräisin olevien hatsihappojen, kuten abietiinihapon, muuntumistuotteina (Gabos ym. 2001).



Kuva 4. Biologisesti muodostuvia PAH-yhdisteitä: reteeni, kryseeni ja peryleeni.

Peryleeni on kolmas suhteellisen yleinen biologista alkuperää oleva PAH-yhdiste. Peryleenin muodostumiselle ja pysymiselle sopivat olosuhteet vallitsevat anoksisissa olosuhteissa. Erityisen runsaasti sitä on löydetty maalla turvekerrostumista sekä sedimenteistä vesialueilla, joissa on hyvin suuri tuottavuus ja esimerkiksi piileviä (Dahle ym. 2006). Peryleeniä muodostuu biogeenisistä prekursoreista, kuten peryleenikinonipigmenteistä hapettomissa oloissa pelkistymällä (Boonyatumanond ym. 2006). Sedimentin pääasialliset peryleenin lähteet ovat hyönteisten ja puuta lahottavien sienten peryleenikinonipigmentit, hapettomaan sedimenttiin laskeutunut kasviaines tai piilevät (Sanders ym. 2002). Kaikki ympäristössä esiintyvä peryleeni ei ole biologisesti muodostunutta, sillä sitä muodostuu polttoprosesseissa (Boonyatumanond ym. 2006) ja esiintyy myös raakaöljyssä (Yang 2000).

PAH-yhdisteiden muodostumisolosuhteilla on keskeinen merkitys niiden leviämiseen ympäristössä ja biosaatavuuteen. Lähinnä raakaöljystä ja öljytuotteiden päästöistä peräisin olevat petrogeeniset PAH-yhdisteet esiintyvät vedessä kolloidisessa muodossa tai suspensoituneisiin hiukkasiin liittyneenä. Pyrogeeniset yhdisteet sen sijaan ovat tyypillisesti voimakkaasti sitoutuneet päästölähteestä peräisin oleviin hiukkasiin kuten nokeen (Liu ym. 2000). Nokeen sitoutuneet PAH-yhdisteet kestävät selvästi paremmin valokemiallista hapettumista ja mikrobien hajotustoimintaa kuin vapaat PAH-yhdisteet. Siksi niitä ei juurikaan poistu ympäristöstä hajoamalla vaan lähinnä sedimentaation kautta. Sitä vastoin petrogeeniset PAH-yhdisteet ovat alttiita haihtumiselle, liukenemiselle, mikrobien hajotustoiminnalle ja valokemialliselle hapettumiselle (Kuva 5, Burgess ym. 2003).



Kuva 5. Merkittävimmät pyrogeenisten ja petrogeenisten PAH-yhdisteiden muuntumiseen ja kulkeutumiseen vaikuttavat tekijät vesistöissä: Katkoviivat kuvaavat erittäin hidasta prosessia (Burgess ym. 2003 mukaan).

PAH-yhdisteet vesiympäristössä

PAH-yhdisteet jakautuvat vesiympäristössä eri faaseihin: osa aineista liukenee veteen, osasta muodostuu kolloidisia hiukkasia ja osa kerääntyy suurempiin partikkeleihin, pintasedimentteihin ja eliöstöön. Jakaantuminen riippuu yhdisteen kemiallisista ominaisuuksista kuten vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta ja lipofiilisyydestä (King ym. 2004). PAH-yhdisteiden kemialliset ominaisuudet ja siten myös ympäristökohtalo puolestaan riippuu molekyylin koosta, muodosta ja aromaattisten renkaiden asemasta toisiinsa nähden. Yleensä molekyyylimassan kasvaessa myös hydrofobisuus ja kemiallista vakaus lisääntyvät. Esimerkiksi eri tutkimuksissa ilmoitetut kolmirenkaisen PAH-yhdisteen fenantreenin puoliintumisajat maa-aineksessa ja sedimenteissä vaihtelevat 16 ja 126 vuorokauden välillä, kun taas viisirenkaisen bentso[a]pyreenin vastaava arvo vaihtelee 229:stä yli 1400:n vuorokauteen (Kanaly & Harayama 2000).

Vesiliukoisuus on keskeinen PAH-yhdisteiden ympäristökohtaloon vaikuttava tekijä (Taulukko 1). Varautumattomien orgaanisten yhdisteiden liukoisuus vaikuttaa niiden jakautumiseen veden, sedimentin ja eliöstön kesken sekä biohajoamisen nopeuteen. Pienimolekyyliset PAH-yhdisteet ovat kohtuullisen vesiliukoisia (esim. naftaleeni 32 mg/l) eivätkä pysy sedimentissä korkeina pitoisuuksina. Suurin osa PAH-yhdisteistä on kuitenkin niukkaliukoisia (<1 mg/l) ja sitoutuvat herkästi kiinteään ja suspensoituneeseen ainekseen vedessä ja sedimentissä. Voimakkaan hydrofobisuuden vuoksi erityisesti yli kolmerenkaisilla PAH-yhdisteillä on suuri affiniteetti orgaaniseen hiukkasainekseen. Yhdessä heikon biohajoavuuden kanssa nämä ominaisuudet aiheuttavat PAH-yhdisteiden akkumuloitumista sedimentteihin (Wilcock ym. 1996; Ferguson & Chandler 1998).

Taulukko 1. PAH-yhdisteiden ympäristökohtaloon vaikuttavia ominaisuuksia (Yaffe ym. 2001).

Yhdiste	Molekyylimassa	Vesiliukoisuus (mg/l)	log K _{ow}	log BCF	Kiehumispiste (°C)	Höyrynpaine ¹ (Pa)
Naftaleeni	128,1	31,5	3,3	2,1	218	10,8
1-metyyli-naftaleeni	142,1	28,0	3,9	2,6	245	7,8
Fluoreeni	166,2	1,9	4,2	3,1	295	8,8 * 10 ⁻²
Antraseeni	178,2	0,07	4,4	2,9	340	8,3 * 10 ⁻⁴
Fenantreeni	178,2	1,3	4,5	3,2	340	1,7 * 10 ⁻²
Fluoranteeni	202,2	0,2	5,2	4,1	375	6,7 * 10 ⁻⁴
Pyreeni	202,2	0,13	5,2	3,4	398	7,4 * 10 ⁻⁴
B[a]P	252,3	0,038	6,3	5,1	495	6,9 * 10 ⁻⁷

K_{ow} = oktanoli – vesi –jakaantumiskerroin

BCF = biokonsentroitumiskerroin

¹ 20 °C:n lämpötilassa

B[a]P = bentso[a]pyreeni

Kiintoaineksen vajotessa pohjalle niihin sitoutuneet kontaminantit päätyvät sedimenttiin, josta ne saattavat edelleen siirtyä pohjaeläimistöön (Ferguson & Chandler 1998). Pohjaeläimiin kertyy PAH-yhdisteitä useita reittejä pitkin (Meador ym. 1995):

1. Suorasta ihokosketuksesta sedimentin huokosveteen
2. Vedestä diffuusion vaikutuksesta hengityselinten pinnalta

3. Ravinnon nielemisen kautta suoliston pinnalta

Pohjaeläimistön lajit eroavat toisistaan alttiudessa ympäristömyrkköjen bioakkumuloitumiselle erilaisten elintapojen ja –toimintojen vuoksi. Vierասaineiden kertymiseen vaikuttavat ainakin seuraavat seikat: eläimen koko, lipidipitoisuus, ravinnonotto tapa, biotransformaatiokyky, ravinnon viipymisaika suolistossa, ruuansulatuselimistön eritteet sekä suoliston mikrobit toiminta (Meador 2003; Rust ym. 2004).

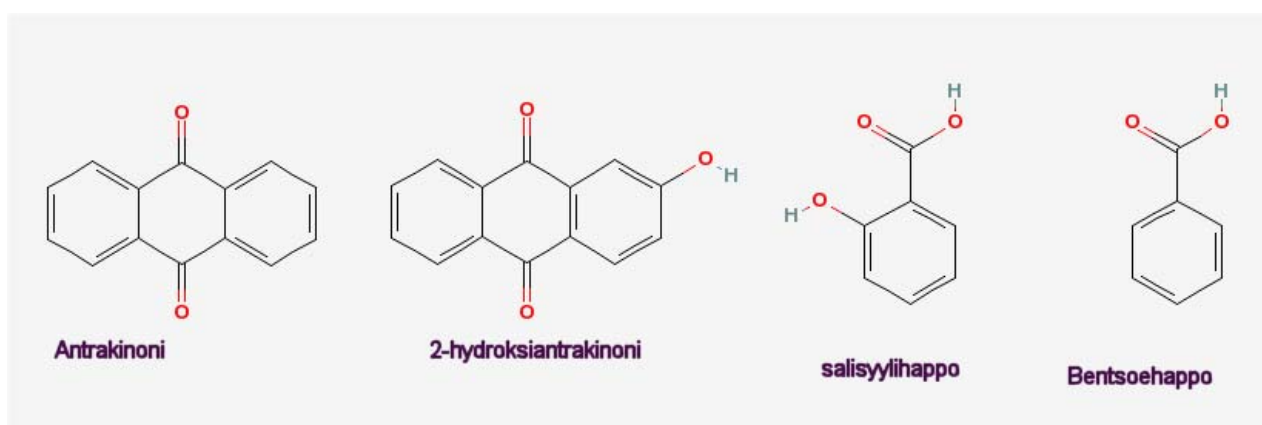
Kuten jo edellä biosaatavuudesta kertovassa kappaleessa mainittiin, useimpien lipofiilisten orgaanisten yhdisteiden tavoin PAH-yhdisteiden biosaatavuus ja siten myös eliöiden altistus riippuu tasapainojakautumisteorian mukaisesti orgaanisen hiilen pitoisuudesta ja kontaktiajasta sedimenttiin. Muita merkittäviä tekijöitä ovat altistuvan eliön elintavat, PAH-yhdisteiden alkuperä, sedimentin ikä sekä orgaanisen aineksen laatu. Usein altistuminen tapahtuu pääasiassa huokosveden välityksellä, minkä vuoksi aineen liukoisuus ja desorptionopeus kiinteästä aineesta veteen ovat toksisten vaikutusten kannalta keskeisiä ominaisuuksia (Varanasi 1989; Meador 2003). Eliöön tapahtuvaan bioakkumuloitumiseen puolestaan vaikuttaa ennenkaikkea biotransformaatiokyky ja ravinto (Meador 2003; Rust 2004). Pohjaeläinten lisäksi sedimenttien PAH-yhdisteille altistuu epäsuorasti esimerkiksi resuspension kautta myös avoveden eliöstö (Boonyatumanond ym. 2006).

PAH-yhdisteiden toksisuus vaihtelee huomattavasti. Yleistäen, vedessä yksittäisten PAH-yhdisteiden toksisuus eläimille ja kasveille lisääntyy molekyylikoon kasvaessa molekyyylimassaan 202 saakka (pyreeni ja fluoranteeni). Tätä suurempien yhdisteiden toksisuutta vähentää niukka vesiliukoisuus, joka on letaalia pitoisuutta matalampi. Yksittäisten PAH-yhdisteiden lyhyen ajan (24-96 h) LC₅₀ –arvot selkärangattomilla vesieläimillä vaihtelevat tyypillisesti välillä 0,3 ja 5,6 mg/l. Herkimpiä elinkierron vaiheita ovat munat ja toukat (Albers 1995). Toksisuutta arvioitaessa on huomioitava, että PAH-yhdisteet esiintyvät sedimenttinäytteissä lähes poikkeuksetta monien yhdisteiden seoksina. Siten niiden haitalliset vaikutukset johtuvat useiden aineiden yhteisvaikutuksesta (Swartz 1999).

Fototoksisuus ja fotomodifikaatio

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt ovat hyvä esimerkki ryhmästä valoaktiivisia ympäristön haitta-aineita. Suuren konjugoituneen π -orbitaalijärjestelmän vuoksi PAH-yhdisteet absorboivat tehokkaasti auringonvalon UV-aallonpituuksia ($\lambda < 380$ nm). Fotonin absorboidessaan PAH-molekyyli virittyy triplettitilaan, jonka purkautuessa energia voi edelleen siirtyä happimolekyyliille. Tämä voi johtaa reaktiivisen singlettihapen muodostumiseen ja siten soluvaurioihin (Mallakin ym. 1999; Ankley ym. 2003).

PAH-molekyylin virittyminen voi myös johtaa yhdisteen kemialliseen muuntumiseen, tavallisesti hapettumiseen. Tämä fotomodifikaatioksi kutsuttu ilmiö tuottaa tyypillisesti monimuotoisen seoksen muuntumistuotteita, joiden biologinen aktiivisuus vaihtelee. Fotomodifioituneet PAH-yhdisteet ovat usein lähtöaineita toksisempia, mikä johtuu lisääntyneestä reaktiivisuudesta ja suuremman vesiliukoisuuden lisäämästä biosaatavuudesta. Esimerkiksi fenantreenin pääasiallinen valomuuntumistuote fenantrokinoni on fenantreenia selvästi toksisempi vesikasville *Lemna gibba* ja bakteerille *Photobacterium phosphoreum*. Antraseeni on johdonmukaisesti havaittu erääksi toksisimmista PAH-yhdisteistä valomuuntumisen jälkeen. Sen fotomodifikaatio tuottaa seoksen, joka sisältää yli 20 yhdistettä - muun muassa antrakinonia, hydroksiantrakinoneita, bentsohappoja ja fenoleita (Kuva 6, Mallakin ym. 1999).

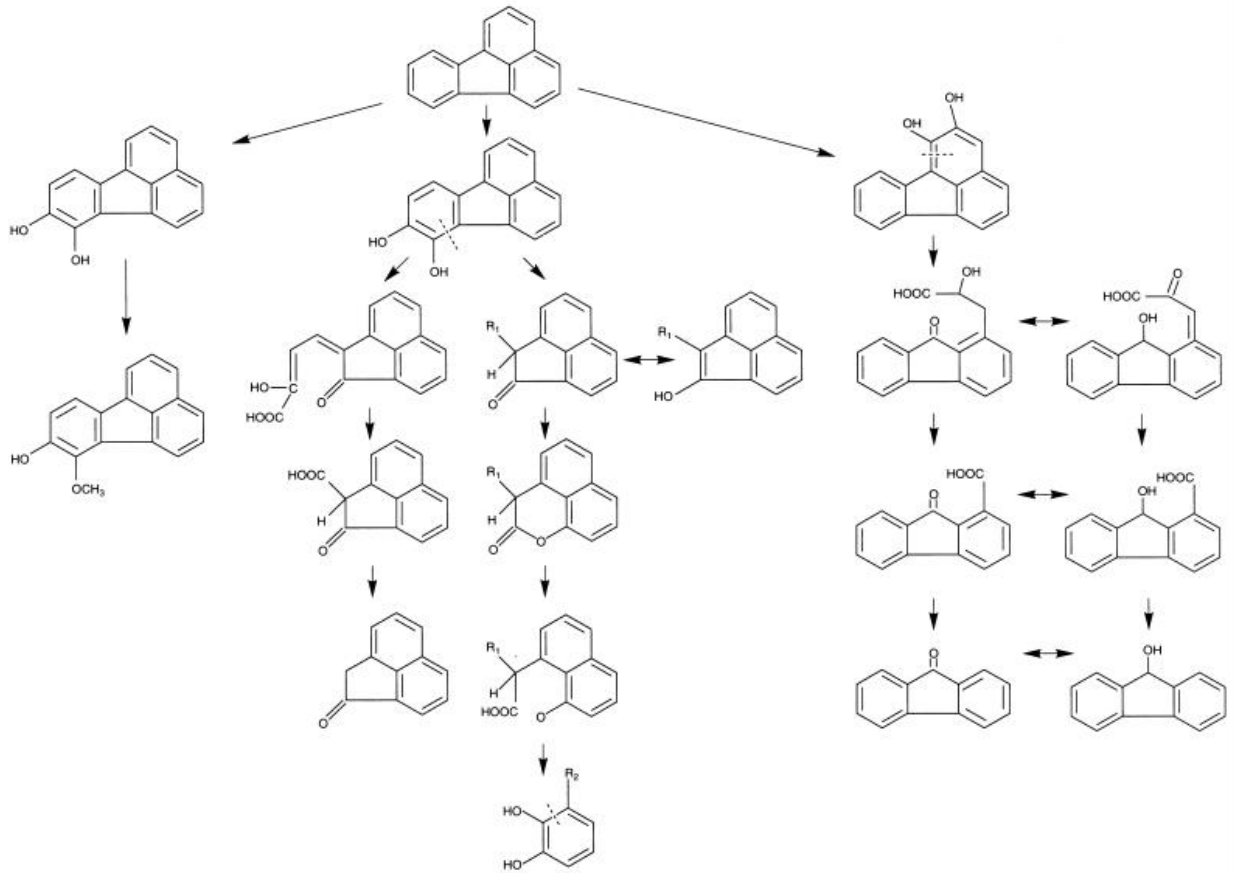


Kuva 6. Antraseenin fotomodifikaatiossa muodostuvia osittain hapettuneita aromaattisia yhdisteitä.

PAH-yhdisteiden biologinen muutunta ja biohajoaminen

Useiden PAH-yhdisteiden on havaittu olevan biohajoavia aerobisissa olosuhteissa. Esimerkiksi Heitkamp & Cerniglia (1989) ovat tutkineet PAH-yhdisteiden biohajoavuutta bakteereilla. Tutkittu bakteerikanta kykeni hajottamaan PAH-yhdisteitä, mutta ei kyennyt hyödyntämään niitä ainoana hiilen ja energian lähteenä. Tutkituista yhdisteistä naftaleeni, fenantreeni, fluorantreeni ja pyreeni mineralisoituivat 10 vuorokauden kuluessa yli 50 prosenttisesti hiilidioksidiksi. 1-nitropyreeni, 3-metyylikolantreeni ja 6-nitrokryseeni mineralisoituivat vain hieman ja bentso[a]pyreenin mineralisointumista ei havaittu lainkaan. Viimeksi mainittua lukuunottamatta kaikista PAH-yhdisteistä oli kokeen lopussa muuntumattomana alle 30 % ja bentso[a]pyreenistäkin vain hieman yli 50 % (Heitkamp & Cerniglia 1989). Myöhemmissä tutkimuksissa on löydetty myös mm. kryseeniä, bentso[a]antraseenia, bentso[b]fluoranteenia ja bentso[a,h]antraseenia mineralisoivia bakteerikantoja (Kanaly & Harayama 2000).

Bakteereilla PAH-yhdisteiden aerobisen katabolian ensimmäisessä vaiheessa muodostuu entsyymaattisen hapettumisen kautta dihydrodioli (Kuva 7). Tämän jälkeen aromaattinen rengas voi aueta ja hajoaminen saattaa yhdisteestä ja bakteerista riippuen jatkua katekolin ja edelleen trikarboksyylihapojen kautta mineralisaatioon saakka (Kanaly & Harayama 2000). Hajotustoiminta on nopeinta sedimentin ja veden rajapinnalla sillä liuennut happi siirtyy hitaasti diffuusion avulla vedestä sedimenttiin. Syvemmillä sedimentissä vallitsevat anaerobiset olosuhteet, joissa PAH -yhdisteiden hajoaminen on erittäin hidasta (Wilcock ym. 1996).



Kuva 7. Mahdollisia fluoranteenin muuntumisreittejä aerobisten bakteerien metaboliassa (Kanaly & Harayama 2000)

Vaikka PAH-yhdisteitä on yleisesti pidetty pysyvinä hapettomissa olosuhteissa, ainakin naftaleeni ja fenantreeni voivat mineralisoitua hiilidioksidiksi myös anaerobisesti (Coates ym. 1997; Volkering & Breure 2003). Anaerobisissa olosuhteissa kemo-organotrofiset bakteerit saavat energiaa elektronin siirrossa pelkistyneeltä orgaaniselta yhdisteeltä epäorgaaniselle elektronin vastaanottajalle, joka voi olla esimerkiksi nitraatti (NO_3^-), rauta(III), mangaani(IV), sulfaatti (SO_4^{2-}) tai karbonaatti (CO_3^{2-}) (Volkering & Breure 2003). Anaerobisen hajoamisen kannalta on olennaista sopiva bakteerikanta ja -yhteisö, jonka kehittymiseen voidaan tarvita pitkä altistus aika suurille PAH pitoisuuksille. Esimerkiksi Coates ym. (1997) tekemissä kokeissa naftaleeni ja fenantreeni mineralisoituivat PAH-yhdisteillä voimakkaasti kontaminoituneen San Diegon sataman sedimentissä, mutta puhtaammissa sedimenteissä anaerobista biohajoamista ei tapahtunut.

Kalat ja ilmeisesti kaikki muutkin selkärangaiset kykenevät PAH-yhdisteiden biotransformaatioon. PAH-yhdisteiden vierasainemetabolia alkaa hydroksilaatiolla, jota katalysoivat pääasiassa sytokromi P450 mono-oksigenaasientsyymit. Hapettuminen johtaa vastaavien fenolien, kinonien ja diolien muodostumiseen. Hapettuneet tuotteet voivat edelleen konjugoitua vaiheen II entsyymien avulla. Metabolia voi johtaa aineen detoksifikaatioon ja eritykseen, mutta toisaalta diolit ja fenolit voivat erällä PAH-yhdisteillä edelleen hapettua dioliepoksiedeiksi ja fenoli-oksiedeiksi, joista osa on karsinogeenisia ja voivat muodostaa kovalenttisen sidoksen solujen DNA:n, RNA:n ja proteiinien kanssa (Akcha ym. 2003).

Selkärangattomilla PAH-yhdisteiden metaboliakyky ja -nopeus vaihtelevat huomattavasti suhteellisen samankaltaistenkin lajien välillä. Esimerkiksi piikkihunnerin (spiny lobster, *Panulirus argus*) elimistöön perikardiaalisesti injektoitu bentso[a]pyreeni muuttui nopeasti metaboliiteiksi. Sen sijaan amerikanhunnerilla *Homarus americanus* vastaava metabolia samankaltasessa kokeessa oli erittäin hidasta (Varanasi 1989). Harvasukamoto *L. variegatus* ei pyreenille ja bentso[a]pyreenille altistettaessa tuottanut metaboliitteja (Leppänen 1999). Sen sijaan monisukamatojen *Nereis virens* ja *Abarenicola pacifica* on havaittu tuottavat poolisia metaboliitteja useista kahdesta viiteen renkaisista PAH-yhdisteistä. Simpukoiden PAH-metabolia on tyypillisesti erittäin hidasta, minkä vuoksi näiden yhdisteiden bioakkumulaatio simpukoihin on merkittävää (Varanasi 1989; Meador 2003)

PAH-yhdisteiden tutkimus ympäristönäytteistä

PAH-aineiden pitoisuuksia ympäristössä on seurattu 1960-luvulta lähtien. Merkittävät pitkän aikavälin ympäristön seurantaohjelmat, kuten Arctic Monitoring and Assessment Program (AMAP), Baltic Marine Environment Protection Commission (Helsinki Commission) ja National Status and Trends Program (US) tutkivat PAH-yhdisteitä merien eliöstössä ja sedimenteissä osana meriympäristön tilan arviointia. PAH-yhdisteitä mitataan säännöllisesti myös ilmakehästä ilmanlaadun arvioinneissa ja biologisista kudoksista terveysvaikutusten arvioinnissa sekä ravinnosta turvallisuussyistä (Poster ym. 2006).

Kuten jo aiemmin mainittiin, PAH-yhdisteiden leviämiseen ympäristössä vaikuttaa ennenkaikkea hydrofobisuus, joka taas liittyy niiden taipumuksen kertyä sedimentteihin. PAH-

yhdisteitä onkin tutkittu erityisen paljon sedimenteistä eri puolilla maapalloa. Tavallisimmin mitattujen Yhdysvaltojen liittovaltion ympäristöviraston (US.EPA) priorisoiman kuudentoista substituomattoman PAH-yhdisteen* kokonaispitoisuus ($\Sigma 16$ PAH) vaihtelee sedimenteissä hyvin paljon, Euroopassa välillä 0,32 - 48 000 $\mu\text{g}/\text{kg dw}$ (kuivapaino). Yleensä pitoisuudet ovat suurimpia satamissa ja lahdelmissa kaupunkien keskustojen lähellä vähentyen merkittävästi etäisyyden kasvaessa (Latimer & Zheng 2003). Pitoisuudet voivat vaihdella huomattavasti satama-alueidenkin sisällä. Esimerkiksi Barcelonan sataman sedimentin $\Sigma 16$ PAH pitoisuudet vaihtelivat välillä 300 - 10320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Martínez-Lladó ym. 2007). Vastaavasti Englannin etelärannikolla Brightonin venesataman $\Sigma 16$ PAH pitoisuudet vaihtelivat välillä 24-4710 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (King ym. 2004).

*Naftaleeni, asenaftyleeni, asenafteeni,fluoreeni, fenantreeni, antraseeni,fluoranteeni, pyreeni, bentso[a]antraseeni, kryseeni, bentso[b]fluoranteeni, bentso[a]pyreeni, indeno[1,2,3-cd]pyreeni, dibentso[a,h]antraseeni ja bentso[g,h,i]peryleeni

1.3 Sedimenttien toksisuuden tutkiminen

Kontaminoituneen maa-aineksen tai sedimentin luotettava riskinarviointi ei voi perustua pelkästään kemiallisten yhdisteiden analyttiseen määrittämiseen, sillä kemiallisilla analyysillä ei voida identifioida kaikkia, mahdollisesti yhteisvaikutuksen kautta toksisuutta aiheuttavia, yhdisteitä tai niiden metaboliitteja, eikä arvioida aineiden biosaatavaa osuutta. Lisäksi kemiallisten analyysien määritysrajat eivät välttämättä riitä toteamaan yksittäisten yhdisteiden tarkkoja pitoisuuksia. Korkeimpina pitoisuuksina esiintyvät yhdisteet eivät aina ole haitallisimpia, vaan toksisuus voi johtua seoksen muista, pienempinä pitoisuuksina esiintyvistä yhdisteistä. Pienetkin pitoisuudet ympäristössä ovat merkittäviä erityisesti eliöihin kertyvillä eli bioakkumuloituvilla aineilla, joiden haittavaikutukset ilmenevät vasta pitkään kestäneen altistumisen jälkeen (Ingersoll 1995; Achazi 2002; Fent 2004).

Toksisuuden tutkiminen eliöillä kuvastaa haitta-aineiden aiheuttamia seurauksia eikä pelkästään niiden olemassaoloa. Erityisesti ympäristönäytteiden toksisuuskokeet ilmentävät useiden aineiden yhteisvaikutuksia, jotka ovat varsinkin vedestä tai sedimentistä otetuissa

näytteissä todennäköisiä. Maastotutkimuksiin verrattuna laboratoriotutkimuksilla voidaan selvemmin osoittaa kausaaliset suhteet altistumisen ja vaikutusten välillä, mikä johtuu pienemmästä vaihtelusta ja mahdollisuudesta kontrolloida olosuhteita. Toksisuuskokeet ovatkin ekotoksikologisen vaikutustenarvioinnin ensimmäinen askel (Chapman ym. 1997; Sochova ym. 2006). Toisaalta laboratoriokokeiden perusteella on vaikeaa arvioida vaikutuksia luonnon ekosysteemeissä, sillä niissä ei milloinkaan ole mukana kaikkia eliöpopulaatioihin vaikuttavia tekijöitä. Toksisuuskokeiden heikkoutena ovat niihin usein vaikuttavat seikat, jotka eivät johdu antropogeenisistä haitta-aineista, vaan koeolosuhteista ja sedimentin ominaisuuksista kuten ammoniakki- ja happipitoisuudesta sekä happamuudesta. Tulosten tulkintaan ja soveltamiseen liittyy siis epävarmuuksia. Näin on erityisesti yhtä lajia käytettäessä. Kuvaavamman ja tarkoituksenmukaisemman kemikaalien riskinarvioinnin suorittamiseksi testeissä tulisi käyttää useita lajeja ja koeasetelmia erilaisilla altistustavoilla (Ingersoll 1995; Chapman ym. 1997; Sochova ym. 2006).

Ideaalinen laboratorioissa tehtävä biotesti on Traunspurger & Drews (1996) mukaan:

- nopea
- yksinkertainen
- helposti toistettavissa
- halpa
- standardisoitu
- vasteiltaan herkäät
- ekologisesti merkittäviä vaikutuksia mittaava
- suhteutettavissa ympäristössä havaittuihin muutoksiin
- hyödynnettävissä hallinnollisten raja-arvojen määrittämisessä

Ympäristöstä otettuja sedimentinäytteitä tutkiessa eliöt altistetaan tavallisesti joko koko sedimentille tai sedimentin vesifaasille. Altistus sedimentille saattaa olla huokosvedessä, elutriaateissa tai agarissa suoritettuja tutkimuksia realistisempi keino jäljitellä *in situ* -tilannetta laboratorio-olosuhteissa. Vertailut erilaisten matriisien välillä saattavat kuitenkin tuottaa lisätietoa biosaatavuudesta ja haitta-aineen kulkeutumisesta eläimiin (Traunspurger ym. 1996). Viimeisen vuosikymmenen kuluessa ekotoksikologiassa on yhä enemmän pyritty siirtymään kuolleisuudesta subletaalien vasteiden mittaamiseen, sillä ne ovat letaalitoksisuutta herkempiä ja oletettavasti myös tarkempia (Sochova ym. 2006).

1.4 Sukkulamato *Caenorhabditis elegans*

Sukkulamadot (Nematoda) ovat yleisin ja lajirikkain vesistöjen sedimenteissä ja maaperässä elävä eläinten pääluokka (Traunspurger ym. 1996). Huomattava osa sedimenttien bakteereista on ravinnon puutteen ja korkean yksilötiheyden vuoksi lepotilassa. Bakteereita ravintonaan käyttävät sukkulamadot lisäävät bakteerikasvua erityisesti bakteeritiheyden säätelmissä populaatioissa. Mikrobien kasvua lisäävän - ja siten myös typen mineralisaatiota ja ravinteiden kiertoa kiihdyttävän - vaikutuksen vuoksi sukkulamadoilla on huomattava merkitys orgaanisen aineksen hajotusprosesseissa (Kammenga ym. 1996; Traunspurger ym. 1997).

Sukkulamato *C. elegans* esiintyy maaperän nestefaasissa ja makeiden vesistöjen sedimenteissä. Se ottaa vedestä ravinnokseen bakteereita ja muita ympäröivän aineksen sisältämiä pienikokoisia hiukkasia (Höss ym. 1999; Anderson ym. 2001). Munassa tapahtuvan alkiokehityksen jälkeen *C. elegansilla* on tavallisesti neljä ihonvaihdosten erottamaa nuoruusvaihetta; J1-J4. Täysikasvuiset madot ovat noin 1-1,5 mm pituisia. Ravinnon puutteessa tai muuten epäsuotuisissa olosuhteissa kehitys voi keskeytyä kolmannen kehitysvaiheen (J3) sijaan niin sanottuun dauer -vaiheen muodostumiseen. Dauer -kehitysvaihe on pitkäikäinen ja stressitekiäjä sekä ravinnonpuutetta kestävä. Vähäinen ravinnonmäärä, korkea yksilötiheys ja korkea lämpötila vaikuttavat varhaisessa nuoruusvaiheessa yksilön kehittymiseen daueriksi. Dauereiden käyttäytyminen edistää leviämistä uuteen ympäristöön ja niiden elinikä on vähintään viisinkertainen normaaliin elinikään verrattuna. Dauer-vaiheisen sukkulamadon energian tuotanto perustuu pääasiassa vararavintoon. Olosuhteiden muuttuessa suotuisammiksi dauerien kehitys J4 -nuoruusvaiheen kautta aikuiseksi jatkuu (Traunspurger ym. 1996; Wang & Kim 2003).

Sukupuolet ovat hermadofriitti ja uros, valtaosan ollessa hermadofriitteja. Hermadofriitit tuottavat sekä uros että naaraspuolisia sukusoluja, mikä mahdollistaa itsehedelmöityksen. Lisäksi urokset voivat hedelmöittää hermadofriitteja ja suvullisen lisääntymisen tapahtuessa itsehedelmöitys syrjäytyy lähes täysin. Suvullisesti lisääntyvät hermadofriitit voivat saada enemmän jälkeläisiä kuin suvuttomasti lisääntyvät, mutta niiden elinikä jää lyhyemmäksi (Alvarez ym. 2005; Stiernagle 2006).

Sedimentissä ja maaperässä vapaana elävien sukkulamatojen helposti aineita läpäisevä iho on suorassa kosketuksessa väliveteen, joten ne altistuvat ihon kautta etenkin veteen liuenneille vierasaineille. Sukkulamadoille onkin kehitetty useita toksisuuskokeita, joita on enenevässä määrin käytetty myös ympäristöriskien arvioinnissa. Kokeiden herkkyyys vastaa toisilla lajeilla, kuten harvasukamadoilla ja hyppyhäntäisillä suoritettuja testejä, mutta niillä on pienempi ajan ja tilan tarve. Toistaiseksi vain muutamaa sukkulamatoalajia on käytetty toksisuuden tutkimiseen: *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae), *Plectus acuminatus* (Plectidae) ja *Panagrellus redivivus* (Panagrolaimidae). Nämä kaikki ovat vapaana eläviä bakteerivorsia maaperälajeja, joilla on opportunistinen lisääntymisstrategia, eli ne lisääntyvät suotuisissa olosuhteissa erittäin nopeasti. Lajien ja kehitysvaiheiden välillä on kuitenkin eroja herkkyydessä myrkyllisille aineille (Sochova ym. 2006).

***Caenorhabditis elegansin* käyttö ekotoksikologiassa**

C. elegans on yksi eniten tutkituista eliöistä (Voorhies & Ward 2000). Se on tärkeä malliorganismi kehityksen ja ikääntymisen tutkimisessa, isäntälaji-patogeeni –vuorovaikutusten ja tiettyjen sairauksien tutkimuksessa sekä lisääntyvässä määrin toksisuuden tutkimisessa (Anderson ym. 2001). Lajin elinkierrosta ja genetiikasta on tehty paljon kokeellista ja kuvailevaa tutkimusta (Höss ym. 1999; Anderson ym 2001). Sen käyttöä ekotoksikologiassa on edistänyt käyttö geneettisenä mallieliönä (Sochova ym. 2006). Käyttö ekotoksikologiassa voidaan katsoa alkaneen vuodesta 1990, jolloin Williams & Dusenbery ehdottivat sitä vesien toksisuustesteihin (Khanna ym. 1997). *C. elegansin* elinkiero kestää 20 °C:n lämpötilassa noin kolme vuorokautta, mikä mahdollistaa lisääntymisnopeuden käytön tutkittavana vasteena. Muita toksisuuden tutkimisessa mitattuja vasteita ovat ruumiin pituus, lisääntyvien yksilöiden osuus (Höss ym. 1999; Anderson ym 2001; Sochova ym. 2006), yksilönkehitys, eri kehitysvaiheiden ajallinen kesto, populaation kasvunopeus, hermadofriitti:uros –suhde, hengitys (Sochova ym. 2006), kuolleisuus, käyttäytyminen (liikkuvuus), ravinnon otto, stressiproteiinien tuotanto ja solurakenteiden muutokset (Anderson ym 2001; Sochova ym. 2006) sekä geenien aktivoituminen (Achazi 2002).

Sukkulamadot ovat käytännöllisiä koe-eläimiä, koska ne tarvitsevat erittäin vähän tilaa, niillä on lyhyt elinkierto ja niitä on suhteellisen helppo käsitellä sekä ylläpitää

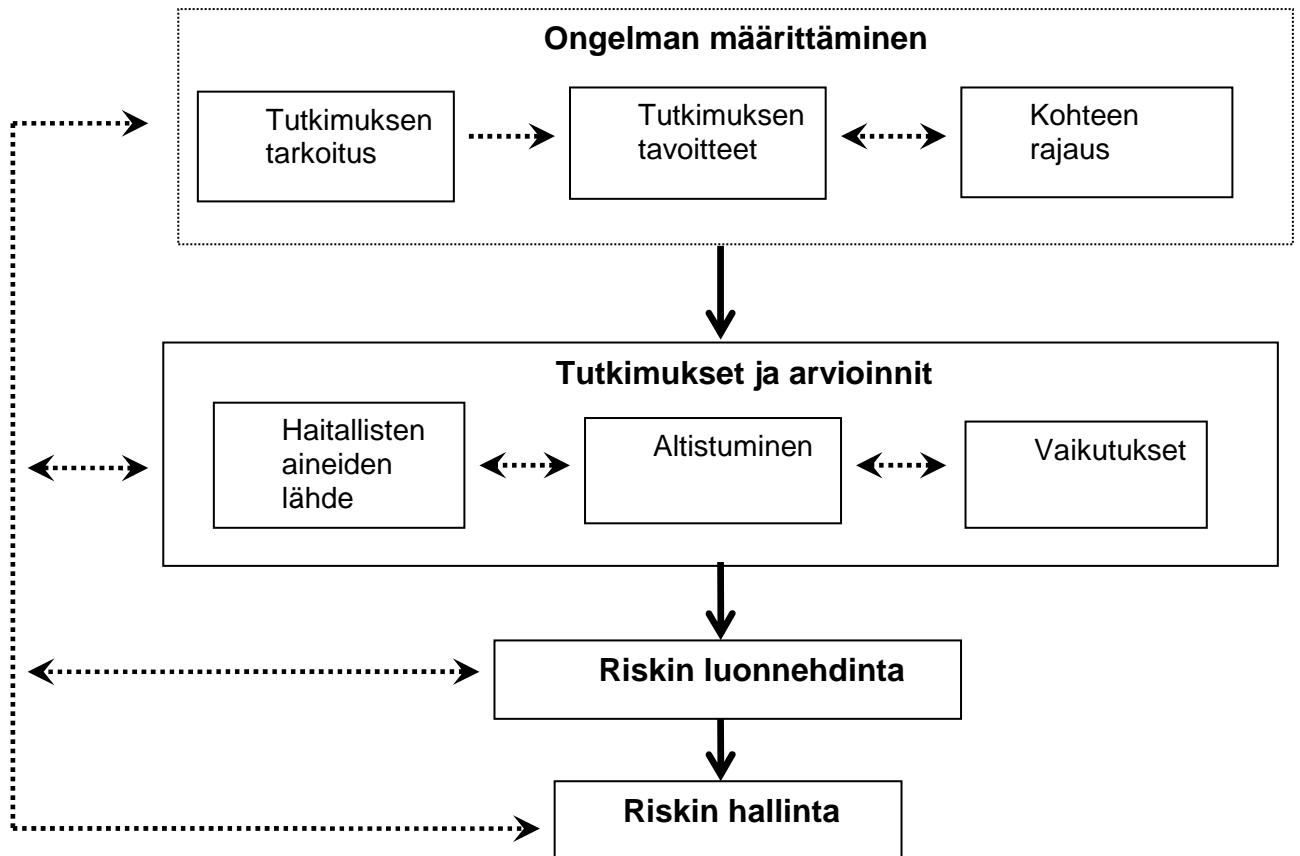
laboratorioviljelmissä. Muita ominaisuuksia, jotka tekevät *C. elegansista* hyvän testilajin ovat suhteellisen korkea sietokyky erilaisille ympäristöolosuhteille, kuten happamuudelle ja saliniteetille sekä mahdollisuus säilyttää pitkiä aikoja dauerina tai jäädytettynä (Sochova ym. 2006). Elinympäristönsä ja ravinnonkäytön vuoksi *C. elegans* on ekologisessa mielessä relevantti eliö sekä maaperän että sedimentin toksisuuden tutkimiseen (Höss ym. 1999; Anderson ym. 2001). Lajin soveltuvuuden kannalta haittapuolena voidaan pitää kantojen vuosikymmeniä kestänyttä säilytystä laboratorioissa ja vaikeutta tunnistaa laji maanäytteen muista sukkulamadoista (Sochova ym. 2006).

Sukkulamadoilla tehtyihin tutkimuksiin on useimmiten käytetty vesiliuoksia. Vesifaasin etuna maa-ainekseen tai agariin verrattuna on, ettei matoja tarvitse erotella muista kiinteistä aineksista, vaan vaikutuksia voidaan tutkia suoraan kuoppalevyiltä tai petrimaljalta. Monia subletaaleja vasteita, kuten liikkumista, ravinnonottoa ja kasvua on vaikeampi seurata maasta kuin vedestä. On kuitenkin huomattava, että maaperä ja sedimentti ovat matojen luonnollisia elinympäristöjä. Kun kokeita suoritetaan vedessä tai agarissa, niin useat maa-aineksessa vaikuttavat tekijät jäävät kokeen ulkopuolelle, mikä lisää koetuloksen maastoon soveltamisen epävarmuutta (Sochova ym. 2006).

1.5 Ekotoksikologinen riskinarviointi

Ekologinen riskinarviointi on prosessi, jossa tunnistetaan ja kvantitoidaan eliöstölle aiheutuvia riskejä sekä määritellään riskeille hyväksyttävä taso. ERA-prosessiin sisältyy usein ekotoksikologinen riskinarviointi, jolla tarkoitetaan haitallisten aineiden ekosysteemille aiheuttamien haittojen todennäköisyyden ja suuruuden arviointia (Suter 1995; Vuori ym. 2001). Sedimenttien riskinarviointi voi olla joko prospektiivinen eli tulevien ja nykyisten päästöjen aiheuttamia riskejä arvioiva tai retrospektiivinen eli menneisyydessä tapahtuneen, mutta edelleen ympäristön tilaan vaikuttavan saastumisen riskejä arvioiva. Prospektiivista riskinarviointia käytetään yleensä kemikaalien riskien arviointiin, kun taas retrospektiivista riskinarviointimenetelmää sovelletaan mahdollisesti pilaantuneiden alueiden tutkimuksissa (Suter 1995). Ekotoksikologinen riskinarviointi on kolmivaiheinen: Ensimmäisenä vaiheena

on ongelman määrittäminen. Tämän jälkeen edetään varsinaisiin tutkimuksiin ja lopuksi tulosten perusteella tehdään riskin luonnehdinta (Kuva 8).



Kuva 8. Riskinarviointiprosessin käsitteellinen malli. Yhtenäiset nuolet kuvaavat prosessin etenemistä, katkoviivoitetut nuolet vuorovaikutuksia eri vaiheiden välillä (Suter 1995 mukaan).

Ongelman määrittäminen

Ekologinen riskinarviointi alkaa ongelman määrittämisestä ja tutkimussuunnitelman laatimisesta. Taustatietojen perusteella identifioidaan ympäristöongelma tai vaara. Vaaran arviointi auttaa riskinarvioinnin kysymysten asettelussa ja tavoitteiden määrittämisessä arvioimalla, mitkä ekosysteemin osat tai eliöryhmät saattavat altistua haitallisille pitoisuuksille ja mitkä ovat mahdollisia altistusreittejä. Tutkimuksen tarkoituksen perusteella määritetään tutkimuksen tavoitteet ja painopistealueet sekä rajataan tutkimuksen kohde (Chapman ym. 1997; Suter 1995).

Tutkimukset ja arvioinnit

Varsinaisessa tutkimusvaiheessa kerätään tietoa riskinarvioinnin kohteena olevien eliöiden altistumisesta kontaminanteille ja sen vaikutuksista. Altistuksen arvioinnissa pyritään vierasaineille altistumisen voimakkuuden, keston ja laajuuden ja vaihtelun kvantitatiiviseen arviointiin. Arvioinnissa tarvitaan tietoja päästölähteistä, kemikaalin kulkeutumisesta, jakautumisesta ja muuntumisesta sekä altistuvien eliöiden spatiaalis-temporaalista jakautumista. Keskeisenä tavoitteena on arvioida kemikaalin biosaatavuutta. Vaikutusten arvioinnissa arvioidaan vierasainealtistuksen tai muun haitallisen tekijän annos-vasteisuutta, eli sitä miten haitallisten vaikutusten todennäköisyys ja intensiteetti kasvavat haitallisen tekijän lisääntyessä. Näin voidaan arvioida tutkittavan haitta-aineen tai muun tekijän merkitystä mahdollisesti havaittavien vaikutusten aiheuttajana (Chapman ym. 1997; Suter 1995).

Altistuksen arviointiin liittyen voidaan selvittää keskeisimmät päästölähteet. Päästöjen lähteen määrittäminen on tärkeää sekä juridisesta että tieteellisestä näkökulmasta. Juridisesta näkökulmasta on olennaista osallisten vastuun osoittaminen ja siten mahdollisuus saada pilaantumisen aiheuttaja osallistumaan mahdollisiin kunnostustoimenpiteiden kustannuksiin. Tieteellisestä näkökulmasta päästöjen alkuperä on tärkeä aineiden ympäristökohtalon ja kulkeutumisen selvittämiseksi. Lisäksi päästölähteiden tunnistaminen voi auttaa kohdentamaan analyysit tiettyihin, alueen historian perusteella huolenaiheena oleviin kontaminantteihin (Chapman ym. 1997).

Riskin luonnehdinta

Riskin luonnehdinta on ERAn osaprosessi, jossa kootaan tiedot altistumisesta ja vaikutuksista riskin laadun ja suuruuden määrittämiseksi. Eri todistusaineistojen antamaa näyttöä arvioidaan kokonaisuutena. Esimerkiksi sedimentin triaditarkastelussa vertaillaan keskenään eliöyhteisötutkimuksia, toksisuuskokeiden tuloksia ja kemiallisten analyysien tietoja, jotka eivät välttämättä osoita samanlaista riskiä pohjaeläinyhteisölle. Eri tuloksia arvioidessa tulee huomioida tulosten varmuus ja vasteen voimakkuus. Mitä suurempi osa todisteista tukee samaa havaintoa, sitä varmempia johtopäätöksiä voidaan tehdä (Chapman ym. 1997).

1.6 Tutkimuksen tavoitteet

Venesatamat ovat melko vähän tutkittuja, mutta ihmistoiminnan voimakkaasti muokkaamia alueita. Niiden sedimentit ovat alttiina haitallisten aineiden päästöille sekä piste- että hajakuormituksesta (King ym. 2004). Pohjaeläimille haitallisia yhdisteitä pääsee venesatamissa veteen ja siitä edelleen sedimenttiin esimerkiksi veneiden maaleista, poltto- ja voiteluaineista sekä pakokaasuista. Satamien sedimenttien öljypäästöistä peräisin oleva hiilivetykontaminaatio on merkittävä huolenaihe polttoaineen monien ainesosien toksisuuden ja pysyvyyden vuoksi. Erityisen ongelmallinen ryhmä on PAH-yhdisteet, mikä johtuu niiden toksisuudesta, pysyvyydestä, vähäisestä haihtuvuudesta, kestävydestä mikrobien hajotustoimintaa vastaan ja vahvasta affiniteetista sedimenttiin (Coates ym. 1997). PAH-yhdisteitä kulkeutuu satamissa veteen paitsi veneiden ja laivojen päästöistä, myös kauempana syntyneiden päästöjen kuiva- ja märkälasseumasta sekä ympäröiviltä alueilta tulleiden valumavesien mukana (King ym. 2004).

Tämän tutkimuksen päätavoitteena oli tutkia Jyväskylän ja Lappeenrannan satamien pohjasedimenttien ekotoksikologista tilaa sekä arvioida sedimentin haitta-aineiden, erityisesti PAH-yhdisteiden aiheuttamia riskejä pohjaeläimistölle. Riskien arvioimiseksi etsittiin vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Ovatko Jyväskylän ja Lappeenrannan satamat merkittäviä PAH-päästöjen aiheuttajia?
- Onko tutkivien kohteiden sedimenteissä korkeita alkyloitujen ja osittainhapettuneiden PAH-yhdisteiden pitoisuuksia?
- Ovatko sedimentit toksisia sukkulamadolle *Caenorhabditis elegans*?

Tutkimuksen yhteydessä kehitettiin sukkulamatoa *C. elegans* hyödyntäviä toksisuuskokeita ja laadittiin työohje *C. elegans*in kasvatukseen ja käyttöön toksisuuden tutkimisessa (Liite).

Tämän riskinarviointi on jatkoa Heli Kivisaaren (2007) opinnäytetyölle, jonka yhteydessä suoritettiin näytteiden esikäsittely ja analysoitiin PAH-yhdisteitä.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimuskohteet ja näytteenotto

Lappeenrannan Kaupunginlahden satama sijaitsee kaupungin keskustan läheisyydessä Saimaan rannalla. Sataman alueella on yhteensä noin 800 venepaikkaa ja 8 laivapaikkaa (Kuva 9). Venepaikoista noin 700 on Halkosaaren läheisyydessä ja 100 Kaupunginlahden ulkopuolella (suullinen tiedonanto Nikku 2008).



Kuva 9. Lappeenrannan sataman näytteeottopisteiden (L1-L5) sijainnit. Etelä-Saimaan referenssinäytteenottoa (RN) sijaitsee noin yhdeksän kilometrin etäisyydellä satamasta luoteeseen päin (karttapohja: Lappeenrannan kaupunki 2008).

Jyväskylän satama sijaitsee Lutakon kaupunginosassa Päijänteeseen yhteydessä olevan Jyväsjärven rannalla (Kuva 10). Satamassa on noin 300 venepaikkaa. Matkustajaliikennettä harjoittaa 10 laivaa ja sataman kautta kulkee vuosittain arviolta 40000 matkustajaa (suullinen tiedonanto Seuranen 2008).



Kuva 10. Jyväsjärven näytteenottopisteet: J3 ja J2 satamassa sekä J1 satamaan johtavalla väylällä (karttapohja: Jyväskylän kaupunki 2008).

Näytteenotto

Näytteenotto ja esikäsittely tapahtui Kivisaaren (2007) kuvaamalla tavalla. Tutkittavat sedimenttinäytteet kerättiin lokakuussa 2006 Jyväskylän ja Lappeenrannan satama-alueilta sekä niiden läheisyydestä, Jyväsjärvestä ja Etelä-Saimaalta (Taulukko 2). Etelä-Saimaan referenssinäyte otettiin läheltä Rautniemeä, vallitsevaan virtaussuuntaan nähden yläjuoksulta, noin 9 km etäisyydeltä satamasta. Samaa referenssinäytteenottoa on käyttänyt esimerkiksi

Meriläinen (2007), jonka väitöskirjassa on tarkempi kuvaus alueesta. Näytteenotto tapahtui veneestä lasketulla Ekman-noutimella siten, että sedimentin ja sen pinnalle jäävän vesikerroksen tilavuus oli noin 10 litraa ja nostetut näytteet olivat sedimentin pintakerrosta (syvyys 0-15 cm). Näytteet olivat kolmen kahmaisun kokoomanäytteitä. Näytteenottajina toimivat Olli Nousiainen ja Marja Lahti Jyväskylässä sekä Aarno Karels Lappeenrannassa.

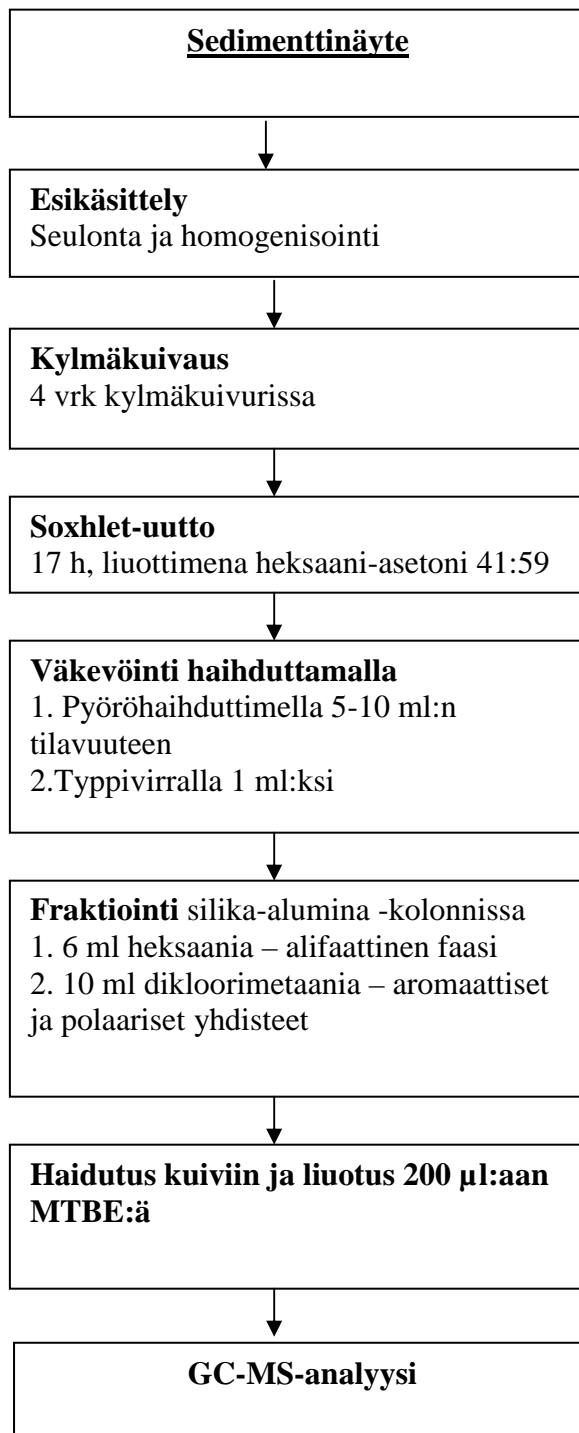
Näytteenottopisteiksi valittiin oletettavasti kontaminaatiolle altteimpia kohtia venesatamista sekä kauempaa järveltä pitoisuus- ja toksisuusgradientin selvittämiseksi. Näytteet kerättiin ja säilytettiin 10 l:n kannellisissa muoviasioissa pimeässä ja viileässä (+4 °C) esikäsittelyyn saakka (< 2 kk). Kivisaaren (2007) suorittama esikäsittely sisälsi homogoinnin koeseulalla (10 * 10 mm) sekä kuiva-ainepitoisuuden ja hehkutusjäännöksen määritykset. Esikäsitellyjä näytteitä säilytettiin samoin kuin alkuperäisiä, tilavuudeltaan noin 1 l:n lasiasioissa, joiden ilma oli korvattu typellä, 6-11 kk ennen käyttöä analyyseissä ja altistuskokeissa.

Taulukko 2. Jyväskylän ja Lappeenrannan satamasedimenttien ja referenssisedimenttien näytteenottoaipaikkojen sijainti ja näytteenottosyvyys.

Näytekoodi	Näytteenottopiste	Syvyys (m)
RN	Etelä-Saimaa, Rautniemi (Referenssinäyte)	4-5
L1	Etelä-Saimaa, Lappeenrannan satama, Halkosaaren edusta	3-4
L2	Etelä-Saimaa, Lappeenrannan satama, vanhan panimon edusta	3-4
L3	Etelä-Saimaa, Lappeenrannan satama, Laivalaiturin lähellä, Prinsessa Armadan edusta	3-4
L4	Etelä-Saimaa, Lappeenranta, Vierasvenesatama, Huoltokioskin edusta	4-5
L5	Etelä-Saimaa, Lappeenranta, väylällä Pappilanniemen ja sataman välillä (noin 600 m etäisyydellä vierassatamasta)	5-6
J1	Jyväsjärvi, väylä Äijälän edustalla (noin 1,5 km etäisyydellä vierasvenesatamasta)	11
J2	Jyväsjärvi, vierassataman edusta	20
J3	Jyväsjärvi, venesatama laiturien sisäpuolella	5-6

2.2 Kemialliset analyysit

Sedimenttinäytteistä pyrittiin uuttamaan ja analysoimaan substituomattomien PAH-yhdisteiden ohella myös alkyloituja ja osittainhapettuneita PAH-yhdisteitä. Ennen varsinaisia analyysejä suoritettiin useita esikokeita menetelmän kehittämiseksi. Näytteen käsittely ja kemialliset analyysit suoritettiin Tarja Hyötyläisen (2001) esittelemää menetelmää soveltaen (Kuva 11). Menetelmät eroavat toisistaan erityisesti näytteen kuivatuksen osalta: sedimenttinäytteet kuivattiin kylmäkuivurissa Hyötyläisen käyttämän Na_2SO_4 kuivatuksen sijaan. Lisäksi pylväskromatografisessa fraktioinnissa käytettiin kaksi kertaa suurempaa (pidempää) pylvästä ja kaasukromatografian lämpötila-ohjelmat poikkesivat toisistaan. Suurempaa kromatografista pylvästä päätettiin käyttää, koska esikokeissa osa PAH-yhdisteistä oli kulkeutunut heksaanifaasiin. Kaasukromatografian hitaammalla lämpötilaohjelmalla pyrittiin parantamaan yhdisteiden erottumista, sillä kolonnin erottelukyky oli PAH-yhdisteiden osalta heikko, mikä ilmeni loivina ja häntivinä piikkeinä.



Kuva 11. Sedimenttinäytteiden käsittely ja analysointimenetelmät PAH-yhdisteiden määrittämiseksi.

Näytteen käsittely

Märkápainoltaan noin 50 g sedimenttinäytteitä jäädytettiin pakastimessa (-20 °C, 24 h) alumiinifoliolla suljetuissa lasipurkeissa, minkä jälkeen foliot rei'itettiin ja näytteitä kuivattiin kylmäkuivurissa (Christ Alpha 2-4, B. Braun Biotech International) noin neljän vuorokauden ajan. Kuivatut, jauhemaiset näytteet säilytettiin eksikaattorissa.

Kylmäkuivatuista näytteistä analysoitiin PAH-yhdisteitä Hyötyläisen (2001) menetelmää soveltaen: mahdollisimman tarkasti punnittu 1,0000 g kuivattua näytettä punnittiin uuttohylysihin, peitettiin roiskeiden estämiseksi kevyesti pumpulitupolla ja uutettiin kuudentoista tunnin ja vähintään 70 syklin ajan soxhlet laitteistolla (Extraction unit B-811 B, Büchi) käyttäen asetoni – heksaani seosta (59:41 v/v). Ennen uuttoa näytteisiin lisättiin sisäinen standardiyhdiste, antraseeni-d₁₀ (3,0 µg).

Uutos väkevöitiin ensin pyöröhaihduttimella 5-10 ml:n tilavuuteen, minkä jälkeen edelleen typpivirralla 0,5-1 ml:n tilavuuteen. Väkevöidyt näytteet jaettiin pylväskromatografisesti kahteen faasiin; heksaanilla eluoituviin tyydyttyneisiin hiilivetyihin, sekä stationäärifaasin tehokkaammin pidättämiin aromaattisiin ja polaarisiin yhdisteisiin, jotka eluoituivat dikloorimetaanilla.

Kromatografisena pylväänä käytettiin noin 30 cm pituista lasiputkea, jonka sisäosan halkaisija oli 1,0 cm. Stationäärifaasina oli 2,4 g hienojakoisen silikan (SiO₂, raekoko 0,063-0,200 mm) ja alumiinioksidin (Al₂O₃, raekoko 0,063 - 0,200 mm) 2:1 seosta. Silika aktivoitiin 150 °C:n lämpötilassa ja alumiinioksidi 450 °C:ssa, molemmat kahdeksan tunnin ajan. Aktivoinnin jälkeen osa silikasta ja alumiinioksidista deaktivoitiin lisäämällä viisi massaprosenttia tislattua vettä ja sekoittamalla voimakkaasti Vortex –ravisteliijaan kiinnitetyssä ilmatiiviisti suljetussa astiassa yhden tunnin ajan.

Kromatografipylvään alaosaan asetettiin asetonilla ultraäänipesulaitteessa puhdistetusta puuvillavanusta tehty pieni tuppö, minkä jälkeen pylvääseen lisättiin pipetillä heksaaniin lietetty silikan (1,6 g) ja alumiinioksidin (0,8 g) seos. Tämän päälle lisättiin vielä noin 1,5 cm:n paksuinen kerros vedetöntä natriumsulfaattia (dekontaminoitu 8 h:n ajan 450 °C:ssa) poistamaan näytteeseen ja liuottimiin mahdollisesti absorboitunut kosteus. Vesi voi

deaktivoida alumiinioksidin-silikan -seoksen ja siten estää PAH-yhdisteiden pidättymisen stationäärifaasiin sekä myöhemmässä vaiheessa häiritä GC-MS analyysiä. Ennen näytteen lisäystä pylvään läpi laskettiin noin 5 ml heksaania epäpuhtauksien poistamiseksi. Näytteen lisäyksen jälkeen pylvääseen lisättiin aluksi 6 ml heksaania ja tämän jälkeen 10 ml dikloorimetaania. Heksaani ja dikloorimetaani kerättiin erillisiin astioihin. Eluotumista nopeutettiin lisäämällä painetta pylvään päähän asetetun pumpetin avulla niin, että liuotin kulkeutui pylvään läpi nopeudella 0,5-1 ml/min.

GC/MS analyysi

Fraktioinnin jälkeen eluentit haihdutettiin kuiviin ja jäljelle jääneet kiinteät aineet siirrettiin lasi-insertteihin liottamalla 200 µl:aan MTBE:ä (liuotus 100 µl:n ja astian huuhtelu 100 µl:lla). Näytteet analysoitiin kaasukromatografilla (Hewlett Packard 6890), jonka detektorina oli massaspektrometri (HP-5973 Mass selective detector). Kantajakaasuna oli helium virtausnopeudella 1 ml/min. Käytetty kolonni oli 30 m kapillaarikolonni HP-5 (5% phenyl methyl siloxane). Kaasukromatografian uunin lämpötilaohjelma oli seuraava: aloituslämpötila 50 °C yhden minuutin ajan, lämpötilan nousu nopeudella 8 °C/min 290 °C:een, jossa lämpötilaa pidettiin viimeisten viiden minuutin ajan. Kokonaisajoaika oli noin 45 min. Jokaisen näytteen ajon välillä suoritettiin 1-3 pesuajoa heksaanilla ja MTBE:llä. Pesuajon lämpötilaohjelma on seuraava: Lähtölämpötila 120 °C ja lämpötilan nousu 10 °C/min 290 °C:een. Pesun ajoaika oli noin 22 min.

Kaasukromatografisessa analyysissä massaspektrometrilla suoritettiin sekä SIM- (single ion monitoring) että SCAN-ajoja. SIM ajossa laitteisto tallentaa tietoja vain ennalta määritetystä ioneista. Sen sijaan SCAN-ajossa tallentuvat tiedot kaikista detektorille tulevista ioneista. Tutkittavat yhdisteet tunnistettiin niiden massaspektrien avulla. SIM-ajolla saadaan tehtyä tarkempi kvantitointi ja määritettyä pienempiä pitoisuuksia, sillä kromatogrammiin tulee vähemmän häiritseviä piikkejä. Toisaalta sedimenttinäytteissä on tyypillisesti hyvin monimuotoinen seos orgaanisia yhdisteitä ja näytematriista voi muodostua samoja ioneja kuin analysoitavasta yhdisteestä. Koska SIM-ajoissa seurataan vain valittuja ioneita, aineiden identifioimisen kannalta olennaisia ioneja jää pois ja piikkien tunnistus saattaa olla epävarmaa. SCAN-ajo sen sijaan tallentaa kaikki muodostuvat ionit, joten yhdisteen kvalitatiivinen

määrittäminen on varmempaa. Suorittamalla näytteelle molemmat ajot, voitiin hyödyntää molempien menetelmien hyviä puolia: SIM-ajon kromatogrammista tehtiin kvantitatiivinen määrittäminen ja SCAN-ajon kromatogrammista tarkistettiin, että määrittäminen on tehty oikeasta yhdisteestä.

Tulosten laskeminen

Kromatografisissa menetelmissä aineiden pitoisuudet voidaan laskea sisäisen standardin (internal standard) menetelmällä: Näytteeseen lisätään tunnettu määrä tunnettua yhdistettä, jonka tuottamaan piikkiin vertaamalla voidaan määrittää tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet. Sisäinen standardi myös korjaa näytteen käsittelystä johtuvan hävikin aiheuttamaa virhettä tuloksissa (Kitson ym. 1996).

PAH-yhdisteen pitoisuudet laskettiin sisäisen standardin menetelmällä kaavaa 1. käyttäen:

$$\text{Kaava 1.} \quad C_{\text{PAH}} = C_{\text{std}} * A_{\text{P}} / A_{\text{std}} * R / M$$

Missä:

C_{PAH} = PAH-yhdisteen pitoisuus näytteessä ($\mu\text{g/g}$)

C_{std} = sisäisen standardin pitoisuus ($\mu\text{g/g}$)

A_{P} = PAH-yhdisteen piikin pinta-ala kromatogrammissa

A_{std} = sisäisen standardin piikin pinta-ala

R = responsokerroin

M = näytteen massa uuton alkaessa (g)

Tämän opinnäytetyön yhteydessä ei erikseen määritetty responsikertoimia, vaan tulokset laskettiin samalla laitteistolla aiemmin määriteltyjä kertoimia käyttäen (Taulukko 3). Responsikertoimet määrittä Marja Lahti.

Taulukko 3. Tulosten laskennassa käytetyt responssikertoimet ja kromatogrammien perusteella arvioidut määrittämissrajat pitoisuuden kvantitatiiviselle määrittämiselle. Suurikokoisemmille yhdisteille määrittämissraja on tyypillisesti korkeampi, koska pohjaviiva nousi retentioajan kuluessa ja piikkien häntäminen voimistui PAH-yhdisteen molekyylikoon kasvaessa.

Yhdiste	Responssikerroin	Arvioitu määrittämissraja
Naftaleeni	1,6911	0,10 µg/g
metyyli-naftaleenit	2,0111	0,10 µg/g
Dimetyyli-naftaleenit	1,9292	0,10 µg/g
Asenaftyleeni	0,9483	0,10 µg/g
Asenafteeni	0,6692	0,10 µg/g
Fluoreeni	1,0994	0,10 µg/g
fluorenoni	4,1640	0,10 µg/g
Fenantreeni	0,8229	0,10 µg/g
antraseeni	0,9690	0,10 µg/g
Fluoranteeni	0,7523	0,10 µg/g
Pyreeni	0,7062	0,10 µg/g
Reteeni	1,3412	0,10 µg/g
Bentso[a]antraseeni	1,4557	0,20 µg/g
Kryseeni	0,8477	0,20 µg/g
Bentso[b]fluoranteeni	1,6437	0,30 µg/g
Bentso[k]fluoranteeni	0,9860	0,30 µg/g
Bentso[a]pyreeni	2,0247	0,30 µg/g
Indeno[1,2,3-cd]pyreeni	2,0667	0,30 µg/g
Dibentso[a,h]antraseeni	1,4781	0,30 µg/g
Bentso[g,h,i]peryleeni	1,8029	0,30 µg/g

Responssikertoimet (R) voidaan laskea PAH-yhdisteiden standardiseoksen kromatogrammista käyttäen kaavaa 2.

$$\text{Kaava 2.} \quad R = (C_{\text{PAH}} * A_{\text{std}}) / (C_{\text{std}} * A_{\text{PAH}})$$

Missä:

R = responstikerroin

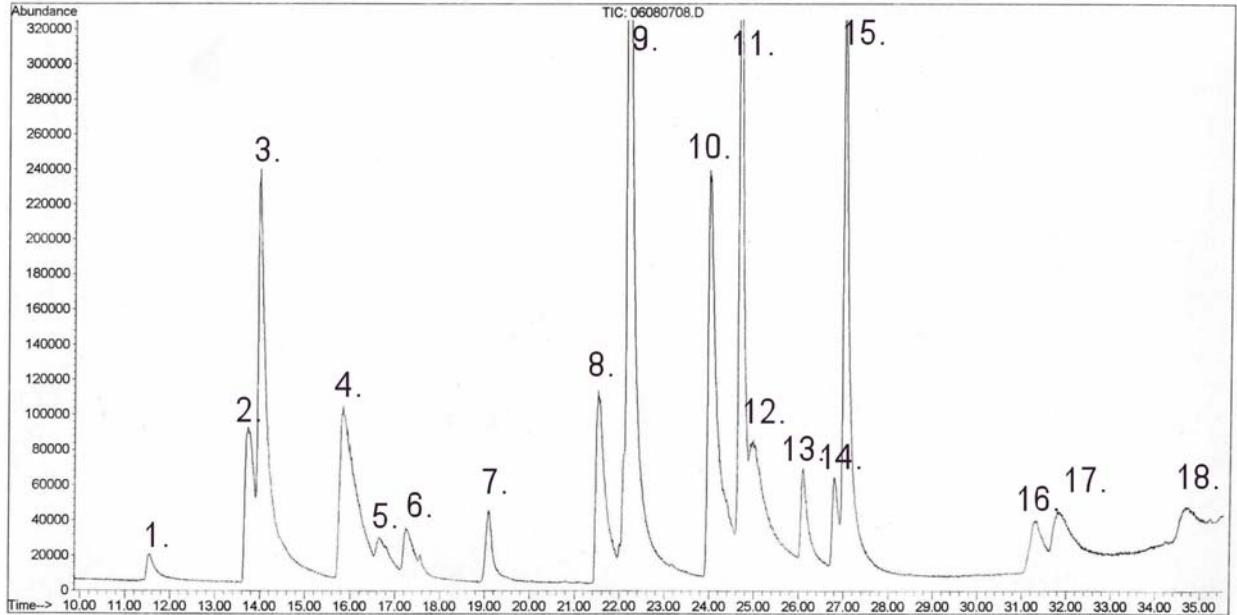
C_{PAH} = PAH-yhdisteen pitoisuus

A_{std} = sisäisen standardin piikin pinta-ala kromatogrammissa

C_{std} = sisäisen standardin pitoisuus

A_{PAH} = PAH-yhdisteen piikin pinta-ala kromatogrammissa

Tulosten laskennassa käytettyjen responsskerrointen laskemiseen käytettiin substituomattomien PAH-yhdisteiden osalta US.EPAn priorisoiman 16 PAH-yhdisteen seosta (PAH mix, Dr Ehrenstorph: naftaleeni, asenaftyleeni, asenafteeni, fluoreeni, antraseeni, fenantreeni, fluoranteeni, pyreeni, bentso[a]antraseeni, kryseeni, bentso[b]fluoranteeni, bentso[k]fluoranteeni, bentso[a]pyreeni, indeno[1,2,3-cd]pyreeni, dibentso[a,h]antraseeni ja bentso[g,h,i]peryleeni), jonka kromatogrammin piikkien pinta-aloja verrattiin sisäisen standardiaineen (antraseeni-d₁₀, 50,34 µg/ml) piikin pinta-alaan. Alkyloitujen ja osittain hapettuneiden PAH-yhdisteiden responsskerrointen määrittämisessä käytettiin seuraavista yhdisteistä valmistettua seosta: antraseeni-d₁₀, 1-metyyli-naftaleeni, 2-metyyli-naftaleeni, 2,6-dimetyyli-naftaleeni, 9-metyyli-antraseeni, 2-metyyli-antraseeni, 9,10-dimetyyli-antraseeni, 9-fluorenoni, antrakini, perinaftenoni ja 1,9-bentso-10-antroni. Lisäksi nämä kaksi seosta yhdistettiin eri yhdisteiden piikkien suhteellisten sijaintien selvittämiseksi (Kuva 12).



Kuva 12. Substituioimattomien ja alkyloitujen PAH-yhdisteiden sekä polyaromaattisten ketonien seoksen kromatogrammi. Kromatogrammi ilmentää yhdisteiden kvantitatiivisessa määrittäyksessä ilmenneitä ongelmia: Piikit häntivät ja menevät osittain päällekkäin.

Numeroitujen piikkien yhdisteet ovat: 1. naftaleeni, 2. 2-metyyli-naftaleeni, 3. 1-metyyli-naftaleeni, 4. 2,6-dimetyyli-naftaleeni, 5. asenafteeni, 6. asenaftyleeni, 7. fluoreeni, 8. fluorenoni, 9. antraseeni-d₁₀, 10. 2-metyyli-antraseeni, 11. 9-metyyli-antraseeni, 12. 9,10-antrakinoni, 13. fluoranteeni, 14. pyreeni, 15. 9,10-dimetyyli-antraseeni, 16. kryseeni, 17. 1,9-bentso-10-antroni ja 18. bentso[a]pyreeni.

2.3 Toksisuuden mittaaminen

Sedimenttinäytteiden toksisuutta tutkittiin altistamalla *C. elegans* -sukkulamatoja huokosvedelle ja sedimentille. Eläimet altistettiin ensimmäisessä vaiheessa sentrifugoimalla ja laskeuttamalla erotellulle sedimentin huokosvedelle ja toisessa vaiheessa sedimentille. Lisäksi esikokeissa käytettiin sedimentistä valmistettuja elutriaatteja. Toksisuuskokeet suoritettiin oheisen työohjeen mukaisella menetelmällä standardiluonnosta ISO NW Nematoda mukailten (Liite). Mitattavina vasteina käytettiin pituuskasvua, sukukypsyyttä sekä huokosvesikokeissa lisäksi lisääntymistä. Tutkimisessa käytetty *C. elegans* kanta (N2, "wild type") saatiin lahjoituksena Kuopion yliopiston A.I.Virtanen instituutilta maaliskuussa 2007.

Toksisuuskokeen suorittaminen lyhyesti: 12-kuoppaisen kuoppalevyn kuoppiin (3,5 cm³) lisättiin tutkittava materiaali: 0,5 ml sedimentistä sentrifugoimalla (2000 g, 20 min) eroteltua

huokosvettä (20 ± 1 °C) tai 0,5 g laskeutunutta sedimenttiä. Negatiivisena kontrollilioksena oli M9-medium (fosfaattipuskuroitu suolaliuos) ja positiivisena kontrollina eli referenssiaineena CdCl₂-liuos. 0,5 - 2 h ennen koetta testiaineeseen sekoitettiin koe-eläinten ravinnoksi 0,5 ml M9-mediumiin tehtyä *Escherichia coli* OP50 –bakteerisuspensiota. Koe aloitettiin lisäämällä kuhunkin kuoppaan 10 kpl ensimmäisen nuoruusvaiheen (J1) matoja. Kuoppalevyjä pidettiin kokeen ajan pimeässä 20 ± 1 °C:n lämpötilassa. Koe päätettiin ja sukkulamadot lopetettiin siirtämällä kuoppalevyt 15 min ajaksi 80 °C:een lämpökaappiin. Matojen mittamiseen ja laskemiseen käytettiin planktonin laskentakenna ja käänteismikroskooppia (Wild Heerbrugg, M40-102421).

Ensimmäisessä varsinaisessa kokeessa Lappeenrannan satamasta otettujen näytteiden huokosvesien toksisuutta tutkittiin 96 h kestäneessä altistuksessa. Tulosten laskennan osoittauduttua erittäin työlääksi päädyttiin työmäärän vähentämiseksi tutkimaan loput näytteet lyhyemmällä, 72 h altistusajalla. Huokosvesinäytteitä tutkittaessa käytettiin kolmea rinnakkaista ja sedimentillä neljää rinnakkaista koetta. Lappeenrannan sataman näytteiden (L1-L5) huokosvesikoe poikkesi muista paitsi pidemmän keston (96 h) myös testiliuoksen osalta: Ohjeen tulkintaan liittyvän epäselvyyden vuoksi kuhunkin näytteeseen kontrollit mukaanlukien lisättiin muiden aineiden lisäksi 0,5 ml M9-mediumia, jolloin näytteet laimenivat vahvuudesta 1+1 → 1+2. Sen sijaan Jyväsjärvestä ja Etelä-Saimaan referenssipisteestä nostettujen sedimenttien huokosvesinäytteitä (J1, J2, J3 ja RN) ei ravinnoksi tarkoitettua bakteerisuspension lisäksi laimennettu muilla nesteillä.

Näytteille J3, L3 ja L5 suoritettiin myös puolikiinteän sedimentin toksisuuskoe. Koe poikkesi nestefaaseilla suoritetuista paitsi tutkittavan matriisin osalta, myös sikäli että ravintoaineena oli noin 12 kertaa vahvempi bakteerisuspensio. Kokeen päätyttyä madot eroteltiin sedimentistä kolloidista silikaa sisältävän liuoksen (LudoxTM, Sigma-Aldrich 420778-IL) ja harsosuo-dattimen avulla. Toisin kuin huokosvesitesteissä, sedimenttitestissä ei tutkittu lisääntymisvastetta, koska käytetyllä menetelmällä ei voinut riittävän luotettavasti erotella kaikkein pienikokoisimpia matoja.

Sedimenttikokeessa negatiivisena kontrollisedimenttinä oli keinotekoinen sedimentti (TOC 1,7 %, Taulukko 4). Positiivisena kontrollisedimenttinä käytettiin koostumukseltaan positiivista kontrollia vastaavaa sedimenttiä, joka oli kaksi kuukautta aiemmin keinotekoisesti kontaminoitu kreosoottijyllä (750 mg/kg dw).

Taulukko 4. Keinotekoisin sedimentin koostumus

Ainesosa	Suhteellinen osuus (massa % dw)
Palosjärven sedimentti*	7,85
Hienojakeinen SiO ₂	51,5
Karkeajakeinen SiO ₂	38,7
CaCO ₃	1,3
Kaoliini	0,65

*TOC 22 % (dw), tiivistetty sentrifugoimalla alkuperäisestä 95 % kosteudesta yhdeksäänkymmeneen prosenttiin. Sedimentti on peräisin Toivakan Palosjärven Myllylahdesta. Tarkempia tietoja Hyötyläisen (2001) ja Meriläisen (2007) väitöskirjoissa.

2.4 Kohteiden aiemmat tutkimukset

Heli Kivisaari (2007) tutki opinnäytetyössään samoja näytteitä. US.EPA:n priorisoiman kuudentoista PAH-yhdisteen* ($\Sigma 16$ PAH) pitoisuudet määritettiin kylmäkuivatuista sedimenteistä ja 1:4 elutriaateista Hyötyläisen (2001) esittelemää menetelmää mukaillen. Sedimenttien hiilipitoisuudet määritettiin kylmäkuivatuista näytteistä alkuaineanalysaattorilla CE-Instruments EA 1110 Automatic Elemental Analyzer. Analyysiä edelsi karbonaattien poistaminen HCl-käsittelyllä (Kivisaari 2007).

*Naftaleeni, asenaftyleeni, asenafteeni,fluoreeni, fenantreeni, antraseeni,fluoranteeni, pyreeni, bentso[a]antraseeni, kryseeni, bentso[b]fluoranteeni, bentso[a]pyreeni, indeno[1,2,3-cd]pyreeni, dibentso[a,h]antraseeni ja bentso[g,h,i]peryleeni

2.5 Tilastolliset menetelmät

Tilastollinen tarkastelu tehtiin SPSS 14.0 for Windows –ohjelmalla (Statistic product service solutions inc. Chicago, IL, USA). Toksisuuden tutkimisen tulosten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin parametrittomia menetelmiä, koska näytteiden väliset varianssit eivät olleet yhtäsuuruisia eikä normaaliutta kyetty osoittamaan. Ryhmiä eroavaisuutta testattiin yksisuuntaisella (oneway) ANOVA –testillä minkä jälkeen näytteiden välisiä eroja tarkasteltiin Tukey testillä.

3. TULOKSET

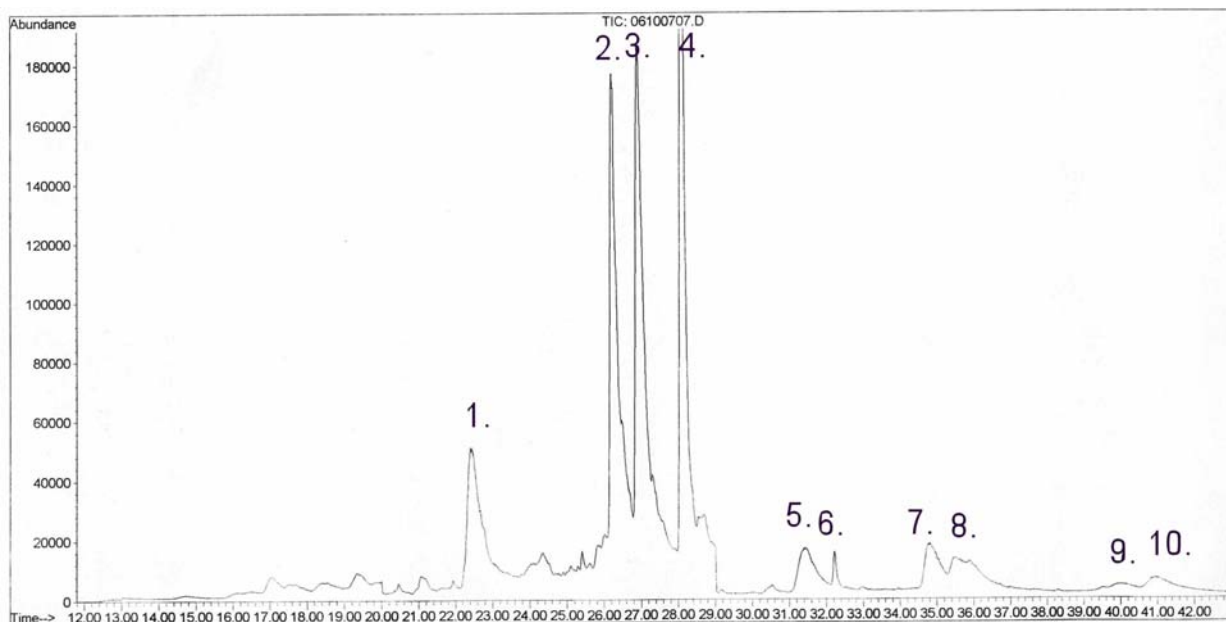
3.1 Kemialliset analyysit

GS-MS –laitteistolla analysoitujen näytteiden kromatogrammeista pyrittiin tunnistamaan alkyloituja ja osittain hapettuneita sekä substituomattomia PAH-yhdisteitä ja määrittämään niiden pitoisuudet sedimentissä. Tutkituista näytteistä korkeimmat PAH-yhdisteiden pitoisuudet ovat Lappeenrannan vierasvenesatamassa (L4) sekä Lappeenrannan sataman väylällä (L5) (Taulukko 5, Kuvat 13 ja 14). Useimpien näytteiden osalta korkeimpina pitoisuuksia esiintyivät reteeni, fluoranteeni, pyreeni ja bentso[a]pyreeni (Kuva 15). Rautniemen näytteestä (RN) ei kyetty kvantitatiivisesti määrittämään lainkaan PAH-yhdisteitä pienten pitoisuuksien ja heikkolaatuisen kromatogrammin vuoksi. Eräiden PAH-yhdisteiden pitoisuutta ei voitu määrittää muistakaan näytteistä, sillä osa kromatogrammin piikeistä oli niin suurelta osin toistensa päällä, ettei pinta-alojen integrointi ollut mielekäästä. Esimerkiksi antraseeni-d₁₀ piikki peitti osittain antraseenin ja fenantreenin piikit (Kuva 14).

Alkyyli-PAH-yhdisteistä esiintyi kaikissa näytteissä korkeimpana pitoisuutena reteeni. Muiden yhdisteiden pitoisuudet olivat joko liian pieniä määritettäväksi tai liian samanlaisia erottuakseen kaasukromatografissa omiksi piikeikseen. Esimerkiksi 1- ja 2-metyylinaftaleenilla on lähes sama retentioaika. Niinpä näistä isomeereistä mitattiin yhteispitoisuus. Osittain hapettuneiden PAH-yhdisteistä kiinnitettiin huomiota lähinnä polyaromaattisiin ketoneihin ja kinoneihin. Näiden pitoisuudet olivat kuitenkin lähes kaikissa näytteissä liian pieniä edes kvalitatiiviseen määrittämiseen. Ainoa poikkeus oli 9-fluorenoni, jota havaittiin vähäinen pitoisuus näytteessä L1.

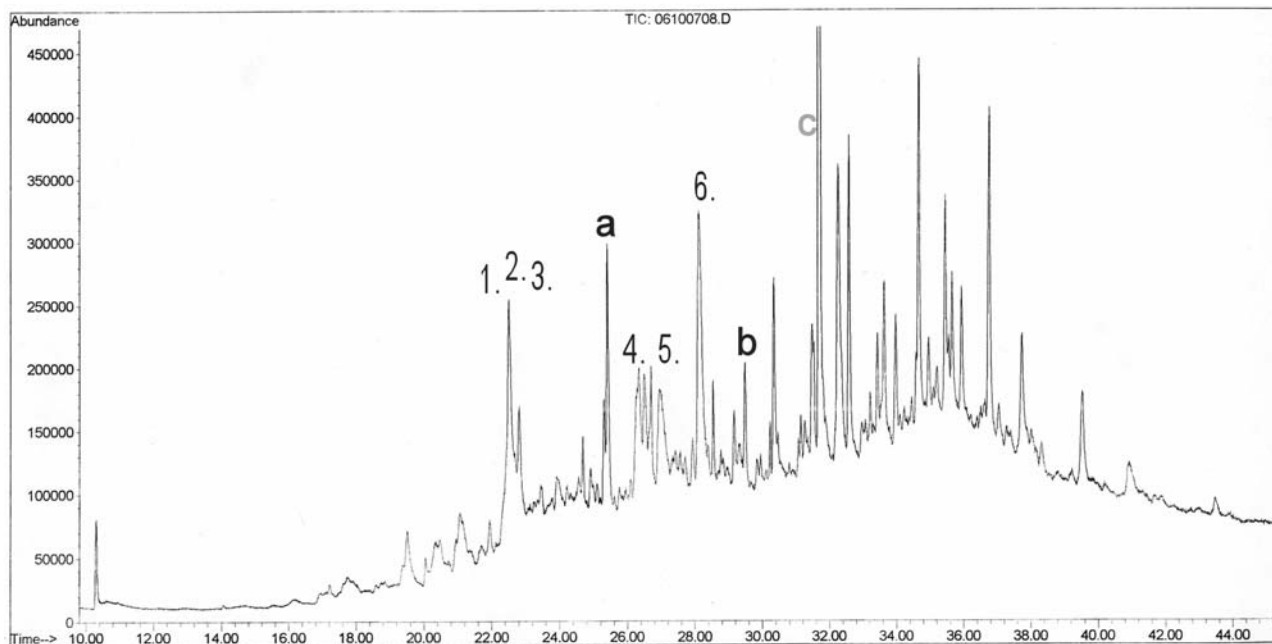
Taulukko 5. Jyväskylän (J2-3) ja Lappeenrannan (L1-4) satamien sedimenteistä sekä satamaan johtavien väylien sedimenteistä (J1 ja L5) määritetyt yhdisteet ($\mu\text{g/g dw}$). + merkitsee kvalitatiivista määritystä ja – merkki = ei havaittu.

Yhdiste	J1.	J2.	J3.	L1.	L2.	L3.	L4.	L5.	RN.
Naftaleeni	< 0,10	< 0,10	0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	0,16	< 0,10	+
metyyli-naftaleenit	< 0,10	0,10	0,13	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Asenaftyleeni	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	0,16	< 0,10
Asenaftteeni	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
Fluoreeni	< 0,10	< 0,10	0,21	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10
fluorenoni	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fenantreeni	+	+	+	+	+	+	+	+	+
antraseeni	< 0,10	0,18	0,29	< 0,10	0,25	0,47	0,48	+	+
Fluoranteeni	0,20	0,43	0,75	0,30	0,66	0,92	1,20	2,48	< 0,10
Pyreeni	0,27	0,61	1,06	0,28	0,68	0,89	1,22	2,68	< 0,10
Reteeni	1,02	1,82	0,85	0,57	0,97	0,93	3,45	5,32	< 0,10
Bentso[a]- antraseeni	< 0,20	0,52	1,08	< 0,20	0,59	0,54	0,93	1,34	+
Kryseeni	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	1,43	+
Bentso[b]- fluoranteeni	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bentso[k]- fluoranteeni	< 0,30	< 0,30	0,49	< 0,30	0,31	0,33	0,44	0,62	+
Bentso[a]pyreeni	< 0,30	0,76	1,16	0,31	1,11	0,88	1,12	1,69	+
Indeno[1,2,3-cd]- pyreeni	< 0,30	0,36	1,12	0,34	0,69	< 0,30	0,91	0,41	+
Dibentso[a,h]- antraseeni	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30	< 0,30	+
Bentso[g,h,i]- peryleeni	< 0,30	0,32	0,61	< 0,30	0,35	< 0,30	0,56	0,65	+
Dehydroabietini- happo	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Kuva 13. Lappeenrannan sataman väylän näytteenottopisteen (L5) SIM-kromatogrammi.

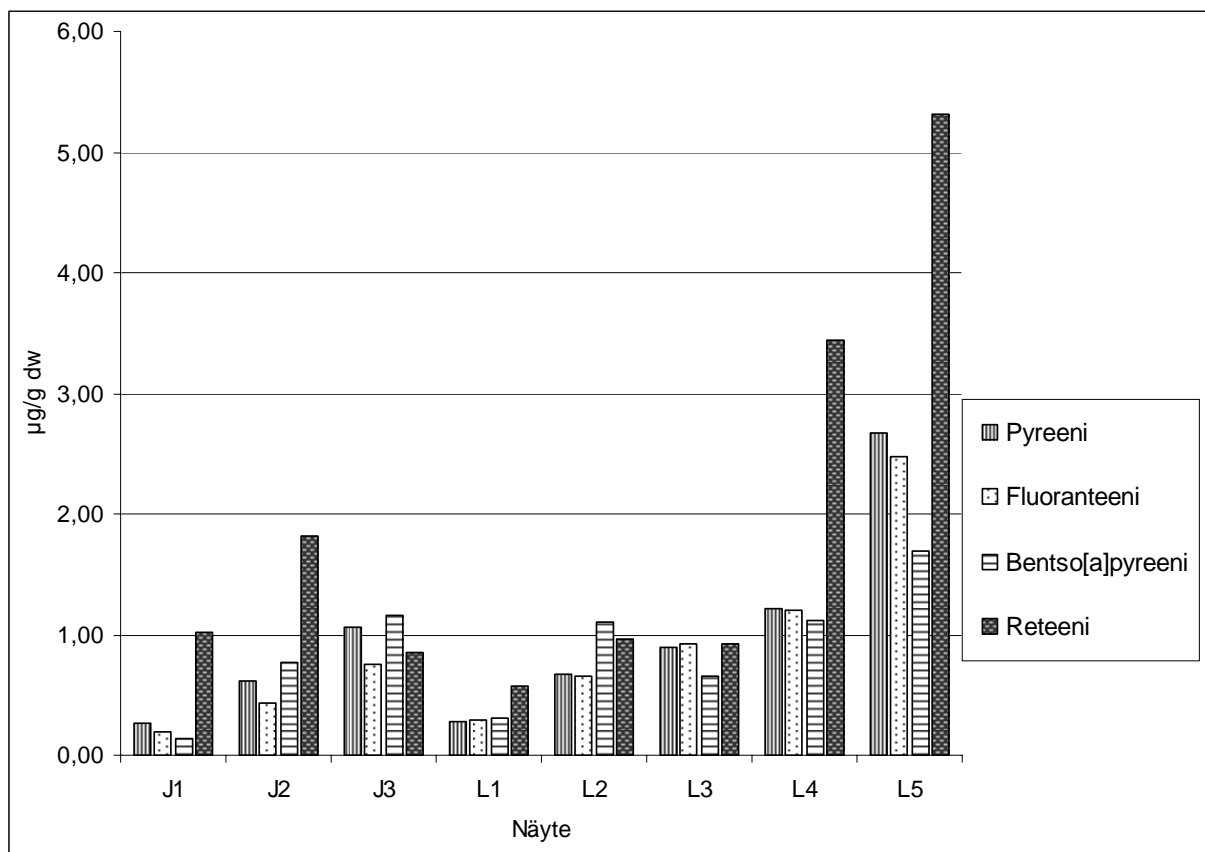
Numeroitujen piikkien yhdisteet ovat: 1. antraseeni-d₁₀ (sisäinen standardi), 2. fluoranteeni, 3. pyreeni, 4. reteeni, 5. kryseeni, 6. bentso[a]antraseeni, 7. bentso[k]fluoranteeni, 8. bentso[a]pyreeni, 9. Indeno[1,2,3,c,d]pyreeni ja 10. bentso[g,h,i]peryleeni.



Kuva 14. Lappeenrannan sataman väylän näytteenottopisteen (L5) SCAN-kromatogrammi.

Numeroitujen piikkien yhdisteet ovat: 1.- 3. antraseeni, antraseeni-d₁₀ ja fenantreeni 4. fluoranteeni, 5. pyreeni ja 6. reteeni. Muiden PAH-yhdisteiden piikit eivät tässä kromatogrammissa erotu pohjavii-

vasta. Aakkosilla merkityt piikit ovat a: 1,4a-β-dimetyyli-7-isopropyli-1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahydrofenantreeni, b: dehydroabietiinihappo ja c: di(2-etyyliheksyyli)ftalaatti. Muita yhdisteitä ei tunnistettu.



Kuva 15. Pyreenin, fluoranteenin, bentso[a]pyreenin ja reteenin pitoisuudet Jyväsjärven ja Etelä-Saimaan sedimenteissä. Näyte J1 Jyväskylän ja L5 Lappeenrannan satamaan johtavalta väylältä. J2 ja J3 ovat Jyväskylän satamasta ja näytteet L1-L4 ovat Lappeenrannan satamasta.

3.2 Sedimenttien toksisuus

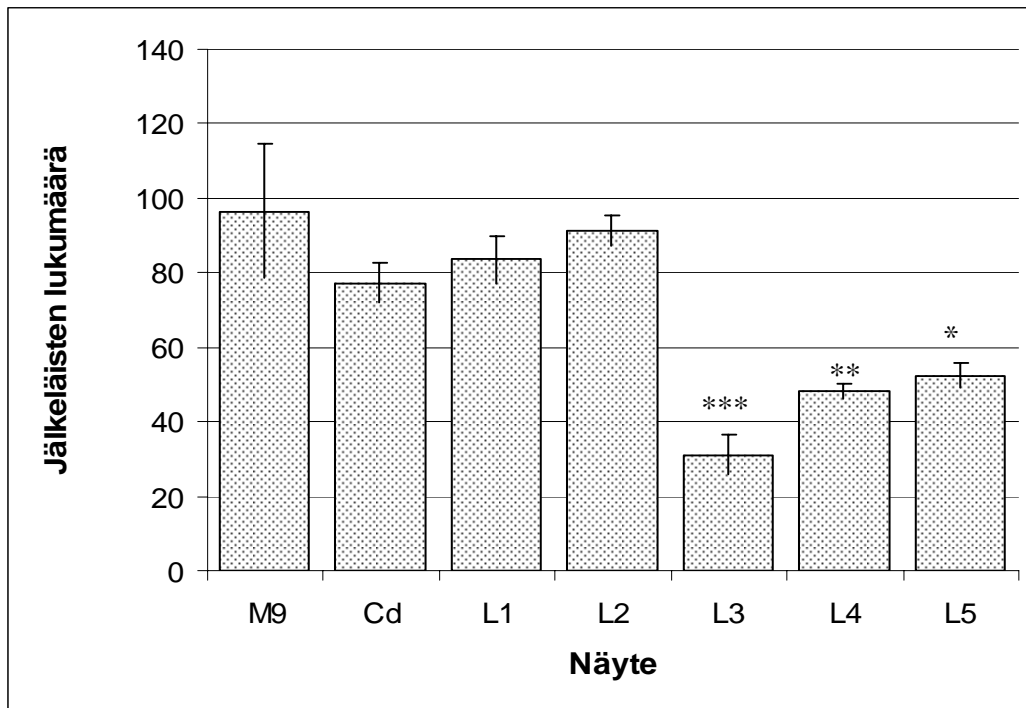
Altistus Lappeenrannan sedimenttien huokosvedelle (96 h)

Lappeenrannan näytteistä sukkulamadoille toksisin oli sekä pituuskasvun että lisääntymisen inhibitiolla mitattuna Kaupunginlahdelta laivalaiturin läheltä otettu näyte L3 (Taulukko 6, Kuvat 16 ja 17). Myös näytteet L4 ja L5 erosivat kontrollista tilastollisesti merkitsevästi sekä jälkeläismäärän että pituuskasvun suhteen. Venesataman läheisyydestä Kaupunginlahdelta otetut näytteet L1 ja L2 eivät olleet toksisia. Lisääntyminen osoittautui pituuskasvua herkemäksi vasteeksi. Sukypsyys oli kaikissa näytteissä 100 %.

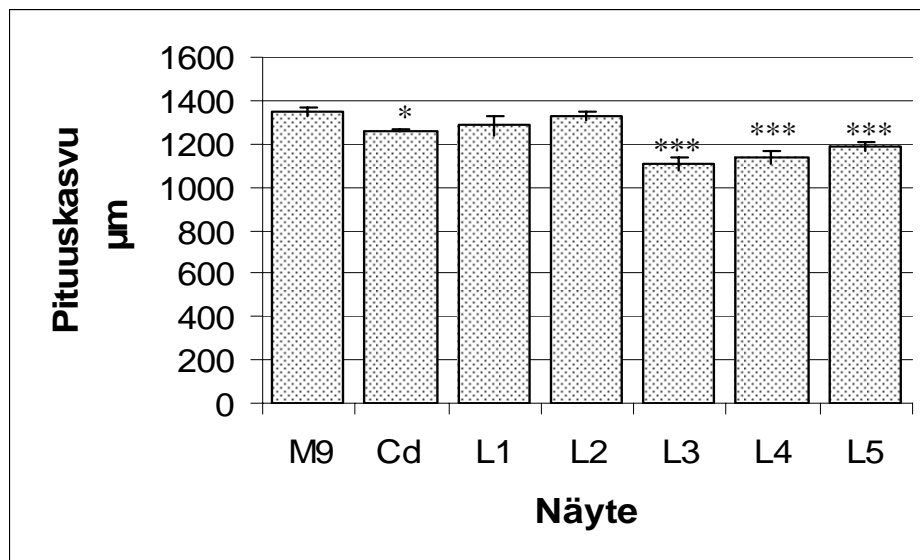
Taulukko 6. *C. elegansin* keskimääräinen kasvu ja jälkeläismäärä 96 h altituksessa Lappeenrannan sataman sedimenttien huokosvedelle.

Näyte	pituuskasvu (μm)	jälkeläisiä (kpl)	pituuskasvun inhibitio (%)	Lisääntymisen inhibitio (%)
Nollakontrolli	1350 \pm 19	97 \pm 18	-	-
Cd	1260 \pm 4*	77 \pm 5	6,7	19,9
L1	1283 \pm 49	84 \pm 6	5,0	13,5
L2	1329 \pm 18	69 \pm 4	1,6	5,5
L3	1106 \pm 27***	31 \pm 5***	18,1	67,9
L4	1137 \pm 35***	48 \pm 2**	15,8	50,0
L5	1179 \pm 21***	52 \pm 3*	12,7	45,8

Luvut ilmaistu kolmen rinnakkaisen kokeen tulosten keskiarvona ja keskihajontana. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Tukey HSD testissä kontrolliin verrattuna. Nollakontrolli = M9-medium, Cd (0,20 mg/l) = 0,33 mg CdCl₂/l. Näytteenottoaikkojen sijainnit esitetty sivulla 27 (Kuva 9).



Kuva 16. Sukkulamatojen jälkeläistuotto (kpl) Lappeenrannan sataman sedimenttien huokosvedessä 96 h altistuksen aikana. Kolmen rinnakkaisen kokeen keskiarvo ja keskihajonta. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Tukey HSD testissä kontrolliin verrattuna. Nollakontrollina M9-medium. Cd (0,20 mg/l) = 0,33 mg CdCl₂/l.



Kuva 17. Sukkulamatojen pituuskasvu Lappeenrannan sataman sedimenttien huokosvedessä 96 h altistuksen aikana. Kolmen rinnakkaisen kokeen keskiarvo ja keskihajonta.

keskihajonta. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Tukey HSD testissä kontrolliin verrattuna. Nollakontrollina M9-medium. Cd (0,20 mg/l) = 0,33 mg CdCl₂/l.

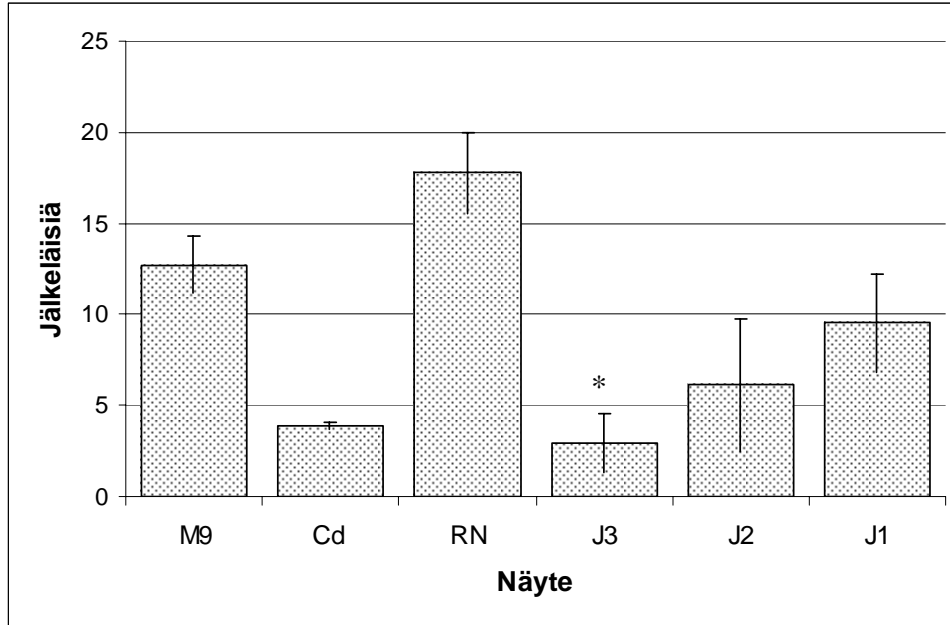
Altistus Jyväsjärven sedimenttien huokosvedelle (72 h)

Jyväsjärvestä otetuista näytteistä sataman laiturialueen sisäpuolelta otettu näyte J3 erosi tilastollisesti merkitsevästi kontrollinäytteestä jälkeläismäärän suhteen (Taulukko 7, Kuva 18). Pituuskasvun suhteen tilastollisestimerkitseviä eroja ei havaittu (Kuva 19). Vertailupisteen (RN) huokosvedellä oli lievä kasvua kiihdyttävä vaikutus. Myös jälkeläismäärä oli kontrollia korkeampi. Sukukypsyys oli kaikissa näytteissä 100 %.

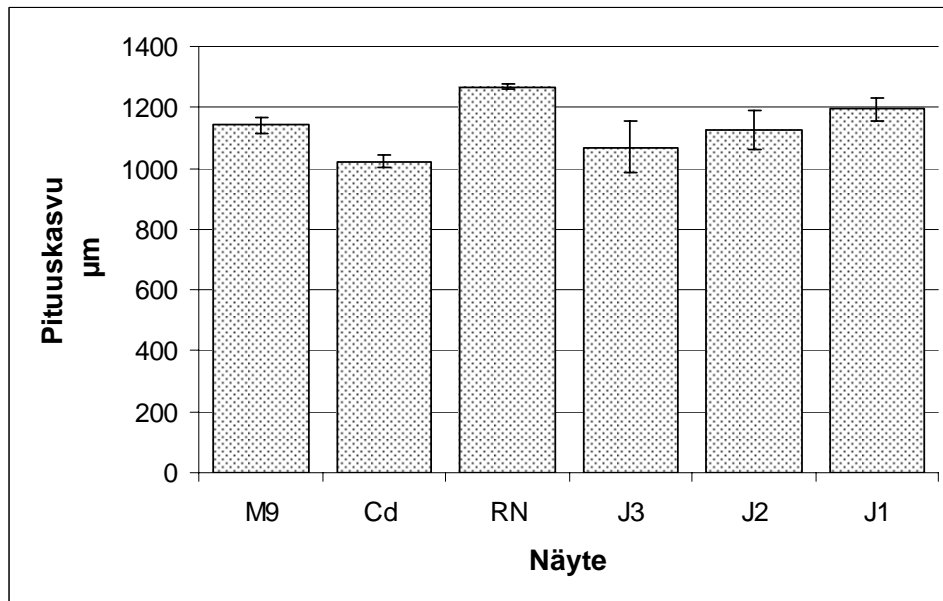
Taulukko 7. Sukkulamatojen 72 h:n altistus sedimentin huokosvedelle – *C. elegans*in pituuskasvu ja lisääntyminen Jyväsjärvestä otetuissa näytteissä ja Rautniemen referenssinäytteessä.

Näyte	pituuskasvu (μm)	jälkeläisiä (kpl)	kasvun inhibitio %	Lisääntymisen inhibitio %
Nollakontrolli	1141 \pm 24	13 \pm 2	-	-
Cd	1023 \pm 20	4 \pm 0,2	10,3	69,5
RN	1268 \pm 9,3	18 \pm 2	-11,1	-39,7
J3	1069 \pm 86,1	3 \pm 2*	6,3	77,0
J2	1124 \pm 63,4	6 \pm 7	1,5	52,0
J1	1154 \pm 37,8	9 \pm 3	-4,7	25,1

Luvut ilmaistu keskiarvona ja keskihajontana. * $p < 0,05$ Tukey HSD testissä kontrolliin verrattaessa. Nollakontrollina M9 medium. Cd pitoisuus 0,31 mg/l = 0,50 mg CdCl₂/l. Näytteenottoaikkojen sijainnit esitetty sivulla 28 (Kuva 10).



Kuva 18. Sukkulamatojen jälkeläismäärät Jyväsjärven (J1-3) ja Rautniemen (RN) sedimenttien huokosvesissä 72 h:n altistuksen aikana. Kolmen rinnakkaisen altistuksen keskiarvo ja keskihajonta. Cd (0,31 mg/l) = 0,50 mg/l CdCl₂. Nollakontrolliin verraessa Jyväskylän sataman näyte J3 eroaa tilastollisesti merkitsevästi (Tukey, p = 0,038).



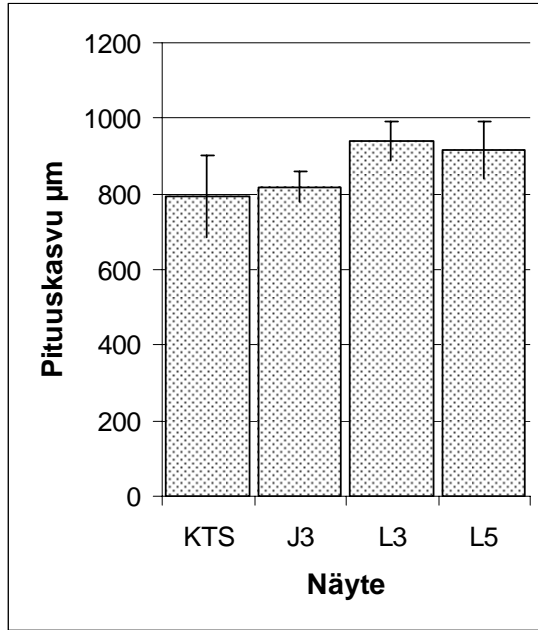
Kuva 19. Sukkulamatojen pituuskasvu Jyväsjärven (J1-3) ja Rautniemen (RN) sedimenttien huokosvesissä 72 h:n altistuksen aikana. Kolmen rinnakkaisen altistuksen keskiarvo ja keskihajonta. Cd (0,31 mg/l) = 0,50 mg/l CdCl₂.

Altistus puolikiinteälle sedimentille.

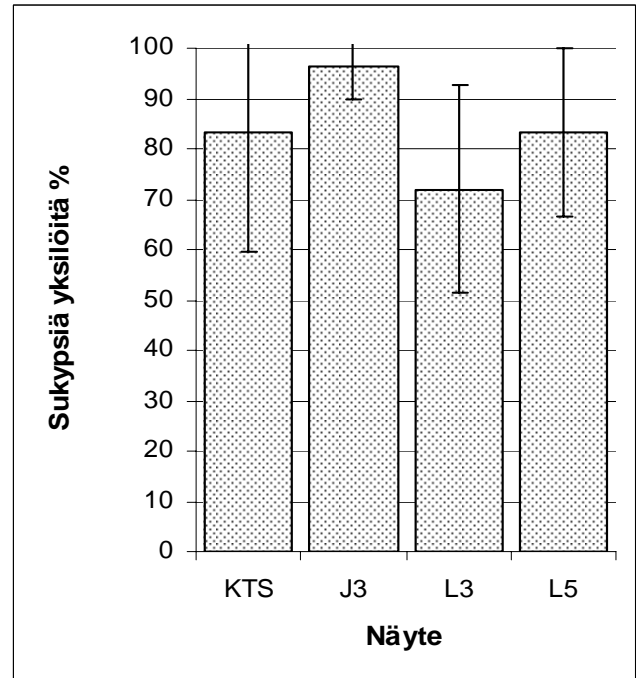
Huokosvedelle altistettaessa toksisimmiksi osoittautuneita ja PAH-pitoisuuksiltaan korkeimpia näytteitä tutkittiin edelleen altistamalla sukkulamatoja puolikiinteälle sedimentille. Sedimentit eivät olleet keinotekoiseen nollakontrollisedimenttiin verrattuna toksisia (Taulukko 8, kuvat 20 ja 21). Sukkulamadot kasvoivat sedimentissä huomattavasti hitaammin kuin vedessä, ja saavuttivat sukukypsyyden pienikokoisempina. Refenssisedimenttinä käytetty kreosoottiöljyllä (750 mg/kg dw) keinotekoisesti kontaminoitu sedimentti osoittautui akuutisti toksiseksi ja kaikki alussa lisätyt madot kuolivat kasvamatta suuremmiksi.

Taulukko 8. Seitsemänkymmenen kahden tunnin altistus sedimentille. Neljän rinnakkaisen kokeen keskiarvo ja keskihajonta. Inhibitioprosentti ilmaisee eroa keinotekoiseen sedimenttiin (KTS, nollakontrolli) verrattuna. Negatiivinen inhibitio kuvastaa nollakontrollia suurempaa kasvua tai sukukypsien yksilöiden osuutta. Näytteenottoaikkojen sijainnit esitetty sivuilla 27-28 (Kuvat 9 ja 10).

Näyte	kasvu (μm)	Sukypsyys (%)	Kasvun inhibitio %	Sukukypsyyden inhibitio %
Keinotekoinen sedimentti (KTS)	794 \pm 11	83 \pm 24	-	-
J3	819 \pm 39	96 \pm 6	-3,2	-15,6
L3	940 \pm 53	72 \pm 21	-18,4	13,6
L5	851 \pm 76	84 \pm 17	-15,5	0,0



Kuva 20. Sukkulamatojen pituuskasvu 72 h sedimenttialtistuksessa. Neljän rinnakkaisen altistuksen keskiarvo ja keskihajonta. KTS = keinotekoinen sedimentti (nollakontrolli).



Kuva 21. Sukkulamatojen sukukypsyys 72 h sedimenttialtistuksen jälkeen. Neljän rinnakkaisen altistuksen keskiarvo ja keskihajonta. KTS = keinotekoinen sedimentti (nollakontrolli). Erot ryhmien välillä eivät ole tilastollisesti merkitseviä.

3.3 Muut tutkimukset

Sedimenttinäytteiden hiilipitoisuus vaihteli Lappeenrannan satamassa hyvin voimakkaasti läheistenkin näytteenottopisteiden välillä (Taulukko 9): Sataman pohjukasta otetussa näytteessä L1 oli tutkituista Etelä-Saimaan näytteistä matalin hiilipitoisuus (3,6 %) kun taas tästä alle 300 m etäisyydeltä otetussa näytteessä L2 oli näytteistä korkein hiilipitoisuus, 11,4 %. Jyväskylässä näytteenottopisteiden välinen hiilipitoisuuden vaihtelu oli vähäisempää: TOC vaihteli vierassataman (J2) 3,2:sta sataman pohjukan (J3) 5,1:een prosenttiin sedimentin kuivapainosta. Sedimenttien $\Sigma 16$ PAH-pitoisuudet olivat selvästi korkeimpia Lappeenrannan vierassatamassa (L4) ja satamaan johtavalla väylällä (L5) (Taulukko 10). Jyväsjärnessä korkeimmat pitoisuudet mitattiin sataman pohjukasta otetusta näytteestä (J3). Sedimenttien elutriaateissa (1:4) ei havaittu lainkaan PAH-yhdisteitä.

Taulukko 9. Kylmäkuivattujen sedimenttinäytteiden hiili- ja $\Sigma 16$ PAH pitoisuudet.

Näyte	Hiilipitoisuus %	$\Sigma 16$ PAH $\mu\text{g/g}$ (dw)
J1	3,6	18,9
J2	3,2	22,8
J3	5,1	35,8
L1	3,2	8,4
L2	11,4	18,6
L3	6,9	66,6
L4	4,8	147,6
L5	9,4	143,0
RN	6,3	3,1

Taulukko 10. Sedimenttinäytteiden PAH-pitoisuudet ($\mu\text{g/g}$) (Kivisaari 2007 mukaan). Luvut on pyöristetty kahden desimaalin tarkkuudelle. Määrittäjärajaa ei ole ilmoitettu. nd = ei määritetty.

Yhdiste Näyte	J1	J2*	J3*	L1	L2	L3	L4	L5	RN*
Naftaleeni	nd	nd	nd	nd	0,01	nd	nd	nd	nd
Asenaftyleeni	0,01	0,03	0,03	0,01	0,04	0,06	0,19	0,06	nd
Asenaftteeni	nd	nd	nd	nd	0,04	nd	nd	0,04	nd
Fluoreeni	0,05	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fenantreeni	0,46	0,59	1,41	0,26	0,72	0,47	0,92	0,80	0,14
Antraseeni	0,05	0,07	0,21	0,08	0,38	0,07	0,21	0,21	0,13
Fluoranteeni	1,04	1,66	2,22	0,76	2,05	3,88	14,09	12,39	0,66
Pyreeni	1,01	1,91	3,08	0,48	1,54	2,36	5,20	6,31	0,93
Bentso[a]antraseeni	7,26	8,34	6,98	3,69	6,61	24,73	64,41	53,6	nd
Kryseeni	1,26	1,43	3,56	0,48	1,34	4,03	8,18	7,00	0,23
Bentso[b]fluoranteeni	1,54	1,55	4,11	0,41	0,70	5,92	11,64	19,0	0,28
Bentso[k]fluoranteeni	0,52	0,46	2,51	0,16	0,89	2,14	4,27	3,82	0,06
Bentso[a]pyreeni	2,07	2,10	9,83	0,58	3,35	8,28	12,69	12,35	nd
indeno[1,2,3,c,d]-pyreeni	2,42	2,63	1,07	0,83	nd	8,09	9,57	13,50	0,30
Dibentso[a,h]-antraseeni	nd	nd	nd	0,22	0,04	2,88	2,20	2,66	nd
Bentso[g,h,i]peryleeni	1,20	1,98	0,74	0,40	0,88	3,70	13,96	11,3	0,36

*Kivisaari (2007) käytti opinnäytetyössään näytteenottopisteestä J2 merkintää J3 ja pisteestä J3 merkintää J5 sekä referenssinäytteestä RN merkintää RL.

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Näytteiden edustavuus ja analytiikka

Ingersoll (1995) mukaan sedimentit vaihtelevat paljon ajan ja paikan suhteen, minkä vuoksi tietyn alueen tutkimiseen tarvitaan rinnakkaisia näytteitä. Tätä tutkimusta tehdessä ei kuitenkaan ollut mahdollisuutta vertailla rinnakkaisia näytteitä. Toisaalta tutkitut näytteet olivat kolmen kahmaisun kokoomanäytteitä, joiden yhteenlaskettu tilavuus oli yli 5 l. Gradienttien arvioimiseksi näytteenottoalueiden määrä oli melko pieni määrä; Jyväsjärvessä kolme ja Etelä-Saimaassa kuusi. Pienen näytemäärän vuoksi ympäristön heterogeenisuudella saattaa etenkin Jyväskylän sataman tapauksessa olla huomattava merkitys tuloksiin.

Näytteitä säilytettiin pimeässä +4 °C:n lämpötilassa. Saimaasta otetut näyteastiat oli täytetty pintaan saakka, mutta Jyväsjärvestä otettujen näytteiden astioissa oli ilmatilaa, jossa ilma oli korvattu typpikaasulla. Näytteiden analysointi ja toksisuuden tutkiminen tapahtui syksyllä 2006 suoritettuun näytteenottoon nähden varsin myöhäisessä vaiheessa: Kivisaari (2007) suoritti analyysyjä talvella 2006 – 2007 ja tässä työssä kuvaillut tutkimukset tehtiin kesällä 2007. Suositellut sedimentin säilytysajat vaihtelevat alle kahdesta viikosta kahdeksaan viikkoon (Ingersoll 1995). Pitkä varastointiaika saattaa heikentää tulosten luotettavuutta. Magnusson ym. (1996) mukaan sedimentin ja huokosveden toksisuus saattaa muuttua näytteenoton ja altistuksen välissä varastoinnin aikana. Erityisesti raskasmetallien spesiaatio ja biosaataavuus voi muuttua näytteenotossa ja säilytyksen aikana joten happipitoisuus on erityisen olennainen tekijä, sillä siitä riippuu raskasmetalleihin sitoutuvien rauta(III)oksidin ja sulfidin (AVS) esiintyminen. Orgaanisiin haitta-aineisiin vaikutus on luultavasti vähäisempi (Magnusson ym. 1996).

Analyysitulosten tarkkuus ja luotettavuus

Tutkimuksessa käytetty analyysilaitteisto ei erottelukykynsä puolesta sopinut PAH-yhdisteiden tarkkaan kvantitatiiviseen määrittämiseen, vaikka näytteen fraktiointi poistikin osan analysointia haittaavista yhdisteistä. Ongelmat laitteiston erottelukyvyyssä johtuivat ilmeisesti kaasukromatografian kolonnista, jonka kyky erotella PAH-yhdisteistä heikkeni nopeasti sen

ikäntyessä. Käytännössä tämä ilmeni kromatogrammin piikkien levenemisenä ja häntimisenä niin, että piikit asettuivat toistensa päälle.

US. EPA:n menetelmäohjeessa method 8270D (2006) kuvataan standardoituja menetelmiä PAH-yhdisteiden GC/MS analyysiin. Kuudentoista US. EPA:n priorisoiman PAH-yhdisteen määrittämiseen suositellaan käyttämään viittä sisäistä standardiyhdistettä: naftaleeni-d₈, asenafteeni-d₁₀, fenantreeni-d₁₀, kryseeni-d₁₂ ja peryleeni-d₁₂. Myös muiden sisäisten standardiaineiden käyttö on hyväksyttyä sillä edellytyksellä, että määritettävän yhdisteen retentioaika sijoittuu välille 0,8-1,2 kertaa sisäisen standardiyhdisteen retentioaika. Tässä työssä käytetyllä antraseeni-d₁₀:llä määritettäväksi sopisivat siten yhdisteet joiden retentioaika on välillä $23 * 0,8 = 18,4$ ja $23 * 1,2 = 27,6$. Tutkituista yhdisteistä fluoreeni, fluorenoni, antraseeni, fenantreeni, fluoranteeni ja pyreeni sijoittuvat tälle retentioaikavälille. Selvästi eri kokoisten ja paljon aikaisemmin tai myöhemmin detektorille kulkeutuneiden yhdisteiden tuloksiin tulee suhtautua varauksella, joskin yhdisteille määritetyt renspossikertoimet korjaavat sisäisen standardiyhdisteen eroista aiheutuvaa virhettä analyysissä.

Naftaleeni on suurempiin PAH-yhdisteisiin verrattuna varsin haihtuva yhdiste (Taulukko 1, s. 13) ja sitä voi haihtua käsittelyvaiheiden aikana merkittävät määrät. Haihtuvuuden vaikutusta yhdisteiden analysoituihin pitoisuuksiin on selvitetty useissa tutkimuksissa. Bersetin ym. (1999) tutkimukset osoittivat, että pienimolekyylisten PAH-yhdisteiden, erityisesti naftaleenin, hävikki kylmäkuivauksessa on suuri. Tämän vuoksi kylmäkuivausta ei suositella käytettäväksi naftaleenin kvantitatiivisessa määrittämisessä. Naftaleenin osalta analyysitulokset saattavatkin olla huomattavasti todellia pitoisuuksia matalampia.

4.2 Satamasedimenttien PAH –yhdisteet

Osittain hapettuneita PAH-yhdisteitä ei havaittu tutkituissa näytteissä lukuunottamatta 9-fluorenonia, jota havaittiin Lappeenrannan sataman näytteessä L1. Tulos oli sikäli odotettu, että PAH-yhdisteiden valokemiallinen hapettuminen tuottaa usein monimuotoisen seoksen yhdisteitä, jolloin yksittäisten aineiden pitoisuudet ovat suhteellisen pieniä (Mallakin ym. 1999). Toisaalta osittain hapettuneet PAH-yhdisteet, kuten polyaromaattiset ketonit, ovat

PAH-yhdisteitä poolisempia ja siten myös vesiliukoisempia. Lisääntyneen vesiliukoisuuden vuoksi nämä yhdisteet eivät oletettavasti kerry sedimenttiin yhtä tehokkaasti kuin PAH-yhdisteet.

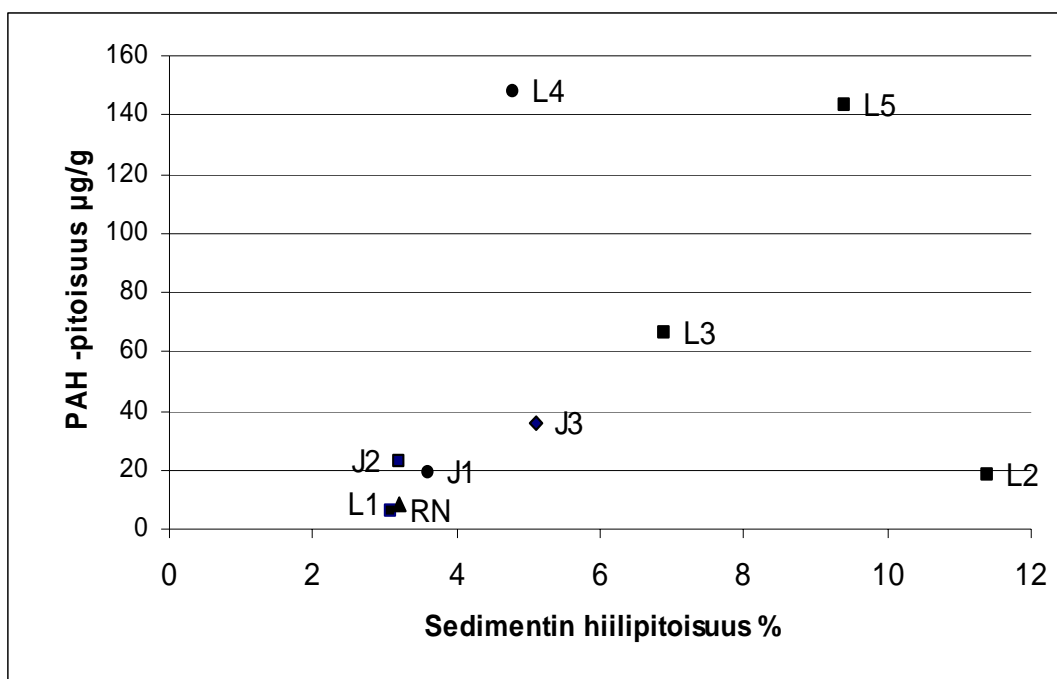
Yhdisteiden suhteelliset runsaudet PAH-profiilissa riippuvat päästöjen alkuperästä, vaikkakin bioottinen ja abioottinen muutonta saattavat muuttaa profiilia (Liu ym. 2000). Alkyloiduista PAH-yhdisteistä kyettiin kvantitatiivisesti analysoimaan reteeniä. Reteeniä muodostuu sedimentissä *in situ* ja sen huomattavan suuret pitoisuudet suhteessa muihin alkyloituihin PAH-yhdisteisiin viittaavat siten biologiseen alkuperään. Kaikissa sedimenttinäytteissä havaittiin myös dehydroabietiinihappoa, josta saattaa anaerobisissa olosuhteissa muodostua reteeniä (Gabos ym. 2001; Sanders ym. 2002). Öljyjalosteiden PAH-yhdisteistä suurimmassa osassa on kaksi tai kolme aromaattista rengasta ja runsaasti alkyloituja johdannaisia (Sanders ym. 2002). Tällaisten yhdisteiden pitoisuudet tutkituissa sedimenteissä olivat hyvin matalia, joten ilmeisesti näytteissä ei ollut merkittäviä määriä petrogeenisia PAH-yhdisteitä. Toisaalta öljyn alkyloidut PAH-yhdisteet muodostavat hyvin monimutkaisen seoksen, jonka tutkimiseen käytetyn kaasukromatografian kolonnin erottelukyky ei välttämättä riitä. Tällöin tutkittavista yhdisteistä ei muodostu selviä piikkejä, vaan kromatogrammin pohjaviiva nousee. Koska reteeni kuitenkin erottui melko selvästi, voidaan olettaa muiden yksittäisten alkyloitujen PAH-yhdisteiden pitoisuuksien olevan selvästi matalinta määritettyä reteenipitoisuutta (0,57 µg/g) pienempiä.

Satamien merkitys PAH-päästöjen lähteenä

PAH-yhdisteiden pitoisuusgradienttia tutkimalla pyrittiin arvioimaan satamien merkitystä saastuneena ympäristönä sekä PAH-päästöjen lähteenä. Jyväsjärnessä PAH-pitoisuudet olivat korkeimmillaan sataman pohjukassa vähentyen välimatkan kasvaessa. Reteeni tosin poikkesi tästä trendistä, mikä luultavasti johtuu edellämäinitusta biologisesta muodostumisesta *in situ*. Lappeenrannassa, Etelä-Saimaalla, PAH-yhdisteiden pitoisuusgradientti näyttää olevan Jyväskylän satamaan verrattuna päinvastainen: sataman näytteiden L1-3 PAH-pitoisuudet olivat matalia, mutta vierasvenesataman näyteenottopisteessä L4 ja satamaan johtavalta väylältä (L5) otetuissa näytteissä oli moninkertaisia pitoisuuksia PAH-yhdisteitä. Koska reteeniä lukuunottamatta alkyloitujen PAH-yhdisteiden pitoisuudet olivat kaikissa näytteissä matalia, voidaan päätellä, että öljypäästöjen merkitys on tutkittujen sedimenttien PAH-

lähteenä vähäinen. Näin ollen PAH-yhdisteiden pääasiallisina kulkeutumisreitteinä sedimenttiin ovat märkä- ja kuivalaskeumana ilmasta, sekä veden mukana kulkeutuminen niin valumavesistä kuin muualtakin järven valuma-alueelta. Koska näytteenottopisteiden väliset etäisyydet ovat niin Jyväskylässä kuin Lappeenrannassakin pisimmilläänkin alle kaksi kilometria, ei yksistään eroilla ilmasta tulevassa laskeumassa voida selittää moninkertaisia pitoisuusgradientteja. Mahdollisesti pitoisuuserot johtuvat ainakin osittain eroista sedimentin koostumuksessa.

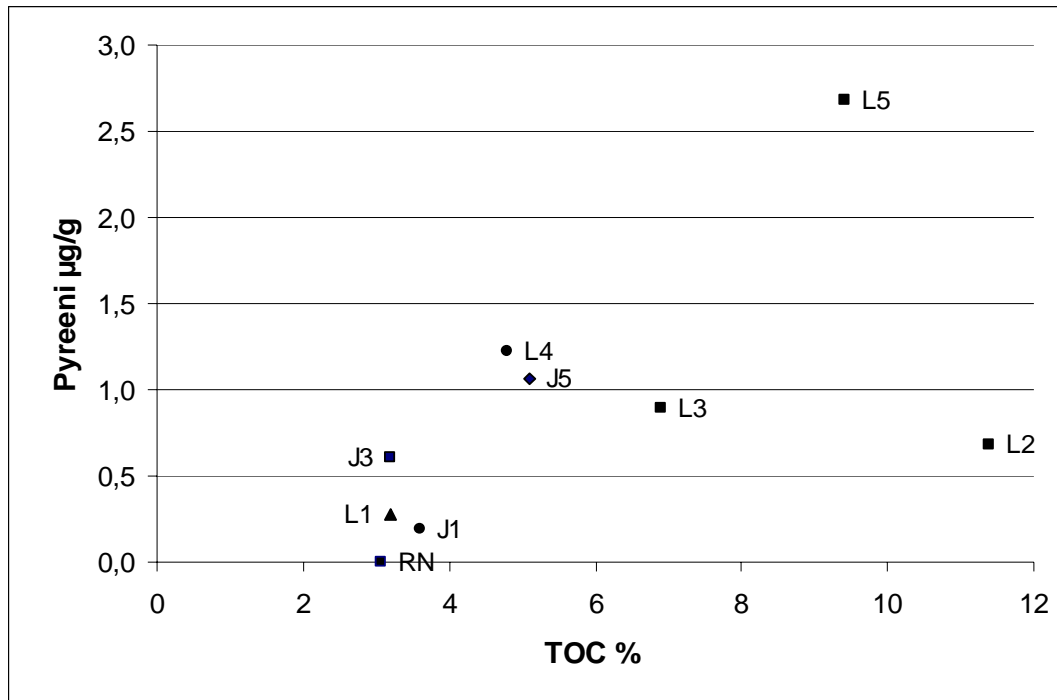
Sedimentin orgaanisen aineksen pitoisuus (TOC) on erityisen merkittävä PAH-yhdisteiden jakaantumiseen ja biosaatavuuteen vaikuttava tekijä (Martínez-Lladó ym. 2007). Tutkittujen sedimenttien hiilipitoisuuksia $\Sigma 16$ PAH –pitoisuuksiin verratessa (Kuva 22) voidaan havaita yhteys pitoisuuksien välillä, mutta kaksi Lappeenrannan sataman näytteenottopistettä (L2 ja L4) poikkeavat trendistä.



Kuva 22. US. EPAn priorisoiman 16 PAH-yhdisteen yhteispitoisuus orgaanisen hiilen pitoisuuden funktiona. Näytteenottpaikkojen sijainnit esitetty sivuilla 27-28 (Kuvat 9 ja 10).

Pyreenipitoisuutta hiilipitoisuuteen verrattaessa pitoisuuksilla on havaittavissa selkeämpi yhteys joskin näytteenottpiste L2 on tässäkin tapauksessa poikkeava havainto (Kuva 23). Mahdollisesti kyseiseen sedimentin kohtaan on lyhyessä ajassa kerääntynyt lähialueeseen

verrattuna poikkeuksellisen paljon orgaanista ainesta esimerkiksi järveen upotettujen jätteiden muodossa tai ruoppausten yhteydessä. Havainto ilmentää sedimenttien heterogeenista luonnetta.



Kuva 23. Sedimentin pyreenipitoisuus orgaanisen hiilen pitoisuuden funktiona. Näytteenottoaikkojen sijainnit esitetty sivuilla 27-28 (Kuvat 9 ja 10).

Hiilipitoisuuden lisäksi useat muutkin ominaisuudet vaikuttavat PAH-yhdisteiden kertymiseen sedimenttiin. PAH-yhdisteitä esiintyy tyypillisesti enemmän hienojakoisista hiukkasista koostuvassa sedimentissä kuin karkeammasta aineksestä koostuvassa materiaalissa. Matalat pitoisuudet hiekkaisista sedimenteistä kuvaavat PAH-yhdisteiden heikkoa absorptiota karkeajakoiseen mineraaliainekseen (Budzinski ym. 1997). Sedimentin hiukkasjakaumien selvittäminen saattaisi tuoda lisätietoa PAH-pitoisuuseroja selittävistä tekijöistä.

4.3 Sedimenttien toksisuus

Sedimenttien toksisuudesta saatiin hieman ristiriitaista tietoa. Lappeenrannassa kolmen sedimenttinäytteen (L3-5) huokosvesi osoittautui toksiseksi, samoin Jyväskylässä yksi näytteistä (J3). Näistä L3, L5 ja J3 tutkittiin lisäksi altistamalla madot puolikiinteälle

sedimentille. Sedimentit eivät kuitenkaan osoittautuneet toksisiksi. Havaittu tulos saattaa johtua kontrollisedimentin sopimattomuudesta tai sedimentin kiinteän aineksen vaikutuksesta toksisten aineiden biosaatavuuteen. Toisaalta matojen kasvu sedimentissä oli huomattavasti hitaampaa kuin vastaavalla altistusajalla huokosvedessä. Vähäiset toksiset vaikutukset eivät välttämättä ilmene yhtä selvästi kasvun ollessa hitaampaa. Myös Traunspurger ym. (1997) kokeissa *C. elegansin* kasvu oli sedimenteissä huomattavasti hitaampaa kuin vesiliuoksissa. Höss ym. (1999) kokeessa havaittiin *C. elegansin* kasvavan hieman paremmin raekooltaan karkeissa kuin hienorakeisissa sedimenteissä. Hiukkaskokojakauma on siis merkittävä sedimenttialtistuksen tuloksiin vaikuttava tekijä ja sedimentin koostumuksella saattoi olla sukkulamatojen kasvuun ja kehittymiseen paljon suurempi vaikutus kuin pieninä pitoisuuksina esiintyvillä toksisilla yhdisteillä. Vähäisestä toksisuudesta todistaa myös sukkulamatojen esiintyminen sedimenttinäytteissä L3 ja L5. Laji ei kuitenkaan ollut tutkimuksessa käytetty *C. elegans*.

Tulosten vertailukelpoisuus

Kadmiumin käyttö vesifaasissa tehtyjen kokeiden referenssiaineena mahdollistaa vertailun aiempiin tutkimuksiin, sillä sitä on käytetty lukuisissa *C. elegansilla* tehdyissä ekotoksikologisissa kokeissa. Traunspurger ym. (1997) suorittamissa testeissä tutkittiin kadmiumkloridin toksisuutta *C. elegansille* useilla eri pitoisuuksilla ja vasteilla (Taulukko 11).

Taulukko 11. Kadmiumin toksisuus *C. elegansille* eri pitoisuuksina ja vasteina 72 h toksisuuskokeissa. Hajontalukuna keskihajonta (Traunspurger ym. 1997).

Cd pitoisuus (mg/l)	N	Ruumiin pituus (µm)	Munien lukumäärä	Jälkeläisten lukumäärä
Kontrolli	45	1367 ± 107	13 ± 3,7	18,9 ± 8,0
0,071	49	1315 ± 87	12,7 ± 2,9	26,0 ± 12,0
0,142	43	1204 ± 80* (LOEC)	7,9 ± 3,1* (LOEC)	16,3 ± 9,4
0,282	44	1120 ± 24*	5,1 ± 4,7*	1,1 ± 1,4* (LOEC)
0,563	38	554 ± 139*	0,0*	0,0*
1,124	37	311 ± 55*	0,0*	0,0*

LOEC = matalin pitoisuus, jolla havaitaan vaikutuksia (lowest-observed-effect-concentration)

* p < 0,001 tilastollisesti merkitsevä ero kontrolliin Bonferroni multiple U testissä

Tämä tutkimuksen 72 h koe vastasi olosuhteiltaan Traunspurger ym. (1997) suorittamia kokeita pieniä eroavaisuuksia lukuunottamatta. Kadmiumpitoisuudessa 0,31 mg/l sukkulamatojen pituudeksi mitattiin $1023 \pm 20 \mu\text{m}$ ja jälkeläisten lukumääräksi $4 \pm 0,2$ kpl. Tulosten vastaavuus aiemmin julkaistujen tulosten kanssa todistaa käytetyn *C. elegans* kannan ja koeolosuhteiden vastaavan aiemmin suoritettuja tutkimuksia, joten tuloksia voidaan sikäli pitää luotettavina ja vertailukelpoisina.

Sedimenttitesteissä on yleensä kontrolli ja referenssisedimentit. Kontrollisedimentti on kontaminanteista puhdasta sedimenttiä ja sitä käytetään testin toimivuuden rutiininomaiseen varmistamiseen. Kontrollisedimentti tuottaa tietoa testin toimivuudesta ja todistaa eliöiden olevan terveitä sekä auttaa tulosten tulkinnassa. Referenssisedimentti kerätään melko läheltä tutkittavaa aluetta ja sitä käytetään sedimentin olosuhteiden arvioimiseen. Referenssisedimentin testaus tuottaa tietoa paikan erityisominaisuuksista toksisuuden arvioinnin perustaksi. Jos testisedimentin geologis-kemialliset ominaisuudet poikkeavat testieliön sietokyvyn rajoista, referenssisedimentti auttaa huomioimaan tällaiset tekijät (Ingersoll 1995). Tässä tutkimuksessa käytetty Rautniemen läheltä nostettu referenssisedimentti osoittautui varsin puhtaaksi ja sukkulamadot lisääntyivät sen huokosvedessä jopa nopeammin kuin kontrolliliuoksessa. Sen sijaan sedimenttikokeissa negatiivisena kontrollina käytetty keinotekoinen sedimentti osoittautui ominaisuuksiltaan huonoksi: Madot kasvoivat ja saavuttivat sukukypsyyden kaikissa tutkituissa sedimenttinäytteissä keinotekoista sedimenttiä nopeammin. Syynä saattaa olla liian suuri hienojakeisen aineksen osuus: Höss ym (1997) havaitsi että kontrollisedimentissä, jossa ei ollut hienojakoisia partikkeleita, madot olivat pidempiä kuin muissa sedimenteissä. *C. elegans* käyttää valikoimatta ravinnokseen bakteereita ja muita pienikokoisia hiukkasia. Niellyt hiukkaset vähentävät bakteerien osuutta niellystä aineksesta ja siten heikentävät ravinnon laatua. Karkeissa sedimenteissä sukkulamadot nielevät ainoastaan bakteereita, koska muut partikkelit ovat liian suurikokoisia. Kontrollisedimentin laatuun tulisikin kiinnittää erityistä huomiota.

4.4 Riskinarviointi

Riskinarvioinnin tavoitteena oli PAH-yhdisteiden pohjaeläimistölle aiheuttamien ekotoksikologisten riskien arviointi kahdessa tutkimuskohteena olleessa sisävesisatamassa ja niiden läheisyydessä. Ekologisilla riskeillä tarkoitetaan pilaantuneen alueen vaikutuspiirissä olevaan eliöstöön kohdistuvia mahdollisia vaikutuksia ja ekotoksikologisilla riskeillä ympäristön haitta-aineiden aiheuttamia ekologisia riskejä (Suter ym. 2000; Vuori ym. 2001). Riskinarviointimenetelmänä käytettiin ohjearvoihin vertaamista ja ekologisen riskinarvioinnin (ERA) mallia. Riskinarviointi oli luonteeltaan retrospektiivinen ja arvioi ympäristön nykytilaa, joten nykyisiä ja tulevia päästöjä ei arvioitu kvantitatiivisesti. Sen sijaan riskinarvioinnissa keskityttiin tarkastelemaan sedimentin ekotoksikologista tilaa ja sen sisältämien PAH-yhdisteiden vaikutuksia

Vertailua ohjearvoihin

Ympäristöministeriön (1994) saastuneita maa-alueita koskevassa muistiossa (ns. SAMASE -raportti) seitsemälletoista PAH-yhdisteelle määritetty raja-arvo maaperässä on summapitoisuutena 200 mg/kg ja yhdistekohtaisena 20 mg/kg. Kaikkien näytteiden PAH-yhdisteet alittavat selvästi sekä summapitoisuuden, että yksittäisten yhdisteiden raja-arvot. SAMASE -raportin pitoisuuksien alittuessa tutkitut sedimentit eivät ole puhdistustarpeen kannalta saastuneita.

Ympäristöministeriön Sedimenttien ruoppaus ja läjitysohjeessa (2004) esitetään ruoppausmassojen läjityskelpoisuuden arviointia varten haitta-ainetasoja. Läjityskelpoisuuden laatuksiteerit on määritetty 25 % savea ja 10 % orgaanista hiiltä sisältävän standardisedimentin avulla. PAH-yhdisteiden pitoisuudet normalisoidaan standardisedimenttiin orgaanisen hiilen pitoisuuden avulla (Kaava 3).

Kaava 3. PAH-pitoisuus standardisedimentissä = $C_{(PAH)} * 5 / TOC$

Missä:

$C_{(PAH)}$ = PAH -pitoisuus tutkitussa sedimentissä (dw)

TOC = alkuaineanalyysointilla määritetty orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus

PAH-yhdisteistä kymmenelle on määritetty kaksi ohjearvoa: taso 1 ja taso 2 (Taulukko 12). Ylempi ohjearvo eli taso 2 on ekotoksikologisin perustein arvioitu haitaton pitoisuus meriympäristössä ja taso 1 on kymmenesosa siitä. Ylemmän ohje-arvon (taso 2) ylittyessä ruopattavaa sedimenttiä on käsiteltävä pilaantuneena, jolloin sitä pääsääntöisesti ei saa sijoittaa mereen. Pitoisuuksien ollessa raja-arvojen välissä sedimenttiä on käsiteltävä mahdollisesti pilaantuneena ja sen läjityskelpoisuus on arvioitava tapauskohtaisesti.

Taulukko 12. Sedimentin ruoppausmassan laatukriteetit¹ PAH-yhdisteille (Ympäristöministeriö 2004).

Yhdiste	Taso 1. Mahdollisesti pilaantunut	Taso 2. Pilaantunut
naftaleeni	0,01	0,1
antraseeni	0,01	0,1
fenantreeni	0,05	0,5
fluoranteeni	0,3	3,0
bentso[a]antraseeni	0,03	0,4
Kryseeni	1,1	11,0
bentso[k]fluoranteeni	0,2	2,0
bensto[a]pyreeni	0,3	3,0
bentso[g,h,i]peryleeni	0,8	8,0
indeno[1,2,3-cd]pyreeni	0,6	6,0

¹ mg/kg standardisedimenttiin normalisoiduille pitoisuuksille

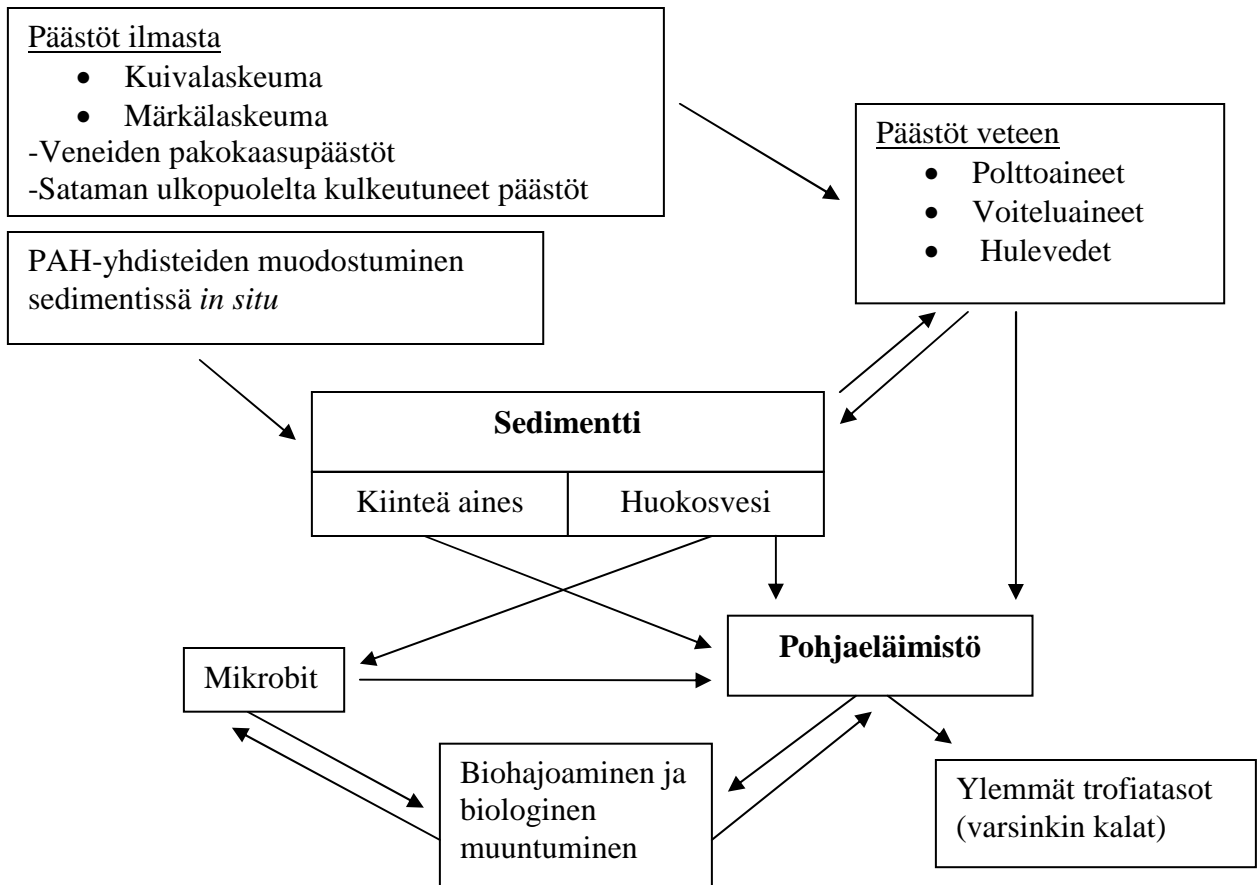
Ruoppausmassojen laatukriteereistä bentso[a]antraseenin raja-arvot olivat hyvin matalat verrattuna tässä työssä mitattuihin satamasedimentin pitoisuuksiin. Sen pitoisuus ylitti referenssinäytettä lukuunottamatta kaikissa näytteenottopisteissä alemman raja-arvon, tason 1 (0,03 mg/kg). Myös taso 2 (0,4 mg/kg) ylittyi useissa tutkituissa näytteissä: Jyväskylän vierasvenestamassa, J2 (0,81 mg/kg), Jyväskylän satamassa, J3 (1,06 mg/kg), Lappeenrannan vierasvenesatamassa, L4 (0,97 mg/kg) ja Lappeenrannan satamaan johtavalla väylällä, L5 (0,71 mg/kg). Muiden yhdisteiden osalta taso 2 ei ylittynyt missään sedimenttinäytteessä.

Riskinarviointi ekologisen riskinarvioinnin menetelmällä

Ekotoksikologisen riskinarvioinnin aluksi määriteltiin tutkimuskysymykset ja rajattiin kohde. Tässä tapauksessa kohde rajattiin maantieteellisesti Jyväskylän ja Lappeenrannan satamiin sekä biologisella tasolla sedimentin pohjaeläimiin. Pohjaeläimistä ei määritetty tiettyä taksonomista tai toiminnallista ryhmää, vaan pohjaeläimistöä käsitellään yhtenä

vesiekosysteemin osana joka rajataan sen eliympäristön perusteella sedimentissä eläviin eläimiin.

Tutkimuksissa arvioitiin pohjaeläimistön altistumista PAH-yhdisteille sekä sedimentin haitallisten yhdisteiden vaikutuksia pohjaeläimiin. Altistumisreittejä ja PAH-yhdisteiden ympäristökohtaloa sedimentissä kuvattiin käsitteellisen mallin avulla (Kuva 24).



Kuva 24. Käsitteellinen malli PAH-yhdisteiden kulkeutumisreiteistä satamien sedimenttiin ja pohjaeläimiin.

PAH-yhdisteiden päästölähteitä arvioitiin vertailemalla yhdisteiden runsaussuhteita. Merkittävimmäksi päästölähteeksi arvioitiin palamisesta syntyneiden PAH-yhdisteiden laskeuma ilmasta ja kulkeutuminen vesistöissä. Myös biologisesti muodostunutta reteeniä oli merkittävä osa sedimenttinäytteiden PAH-yhdisteistä. Sen sijaan öljytuotteista peräisin olevien

alkyloitujen PAH-yhdisteiden pitoisuudet olivat substituomattomiin PAH-yhdisteisiin verrattuna matalia, joten polttoainepäästöjä ei voida pitää merkittävänä päästölähteenä.

Eri näytteenottopisteiden PAH-pitoisuuksia vertaamalla arvioitiin satamien merkitystä vesistön PAH-yhdisteiden päästölähteenä. Jyväskylässä pitoisuudet olivat satamassa korkeampia kuin sen ulkopuolella, mutta erot olivat suhteellisen pieniä ja osittain selitettävissä eroilla sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuuksissa. Lappeenrannassa PAH-yhdisteiden pitoisuudet satamassa olivat matalimmat kuin sinne johtavalla väylällä sijaitsevilla näytteenottopisteissä, joten satamaa ei täälläkään voida osoittaa keskeiseksi päästölähteeksi.

Riskin luonnehdinnassa riskitaso määritellään altistumisen ja vaikutusten arvioinnin perusteella. Sedimentin tilaa voidaan kuvata havainnollisesti vertaamalla referenssiolosuhteisiin. Referenssisedimentti ei välttämättä ole täysin puhdas, mutta se kuvastaa vierasaineiden taustapitoisuuksia ja sedimentin koostumusta. Erilaisten olosuhteiden arviointiin voidaan tarvita useitakin referenssipisteitä (Chapman ym. 1997). Rautniemen referenssinäytteeseen (RN) verrattaessa Lappeenrannan sataman ja sinne johtavan väylän sedimenttien PAH-pitoisuudet ovat kaikissa näytteenottopisteissä huomattavasti korkeampia. Pitoisuudet ovat kuitenkin yhtä yksittäistä yhdistettä, bentso[a]antraseenia lukuunottamatta selvästi ohjearvojen alapuolella, eikä elutriaatteja tutkittaessa havaittu PAH-yhdisteiden liukenemista veteen (Kivisaari 2007). Näin ollen pohjaeläinten altistuminen PAH-yhdisteille on sekä pienten pitoisuuksien että heikon biosaatuuden vuoksi vähäistä. Toksisilla vaikutuksilla ei havaittu yhteyttä PAH-pitoisuuksiin. Myöskään itse sedimentti ei tulosten perusteella ole ainakaan voimakkaasti toksista, vaikkakin eräiden sedimenttinäytteiden (L3, L4, L5 ja J3) huokosvesi vaikutti sukkulamatojen kasvua ja lisääntymistä hidastavasti. Toksisuuden aiheuttajaa ei saatu selville, mutta se on ilmeisesti PAH-yhdisteitä selvästi vesiliukoisempi yhdiste, sillä vaikutukset ilmenivät huokosvedessä ja Kivisaaren (2007) tutkimusten mukaan PAH-yhdisteet eivät liukene sedimentin kiinteästä aineksesta vesifaasiin. Riskinarvioinnin johtopäätöksenä voidaan Jyväskylän sataman osalta PAH-yhdisteiden aiheuttamia ekotoksikologisia riskejä pitää vähäisinä. Sen sijaan Lappeenrannan sataman sedimenttien PAH-yhdisteet yhdessä muiden haitta-aineiden kanssa saattavat paikoitellen aiheuttaa haitallisia vaikutuksia pohjaeläimille. Vaikutusten merkitys on kuitenkin satama-aluetta suuremmissa mittakaavassa vähäinen.

Riskinhallinta

Riskinhallinta on päätöksentekoprosessin osa jossa päätetään arvioidun riskin vaatimista toimenpiteistä. Päätöksenteossa tulee ottaa huomioon paitsi ekologiset ja terveydelliset riskit, myös taloudelliset kustannukset, ennenkaikkea riskinvähentämistoimenpiteiden kustannustehokkuus, lainsäädäntö, sosiaalinen ja poliittinen mielipideilmasto sekä käytettävissä olevien kunnostustekniikoiden soveltuvuus ja mahdollisista pilaantuneen ympäristön kunnostustoimista aiheutuvat riskit. Riskinhallinta on usein erillinen prosessi suhteessa riskinarviointiin, mutta päätöksentekijöiden tulee olla vuorovaikutuksessa riskin arvioijien kanssa, jotta riskiarviointi tuottaisi päätöksenteon kannalta tarpeellista ja helposti sovellettavaa tietoa (Suter 1995). Tämän riskinarvioinnin perusteella ei ilmennyt tarvetta riskinvähentämistoimenpiteisiin, mutta satamien ruoppauksia tai vastaavia sedimenttiin dramaattisesti vaikuttavia toimenpiteitä varten suosittelen laajempaa riskinarviointia, jossa huomioidaan PAH-yhdisteiden lisäksi myös muut todennäköiset haitta-aineet kuten orgaaniset tinayhdisteet.

Epävarmuustarkastelu

Riskinarvioinnin luotettavuus riippuu käytössä olevan tiedosta; sen määrästä ja laadusta. Tämän työn riskinarviointi oli alustava ja työn laajuuden rajaamiseksi useissa tapauksissa oli tyydyttävä yleisluonteisiin ja epävarmoihin tietoihin. Tiedon lähteiden epävarmuutta arvioitiin luokitteluasteikolla matala - kohtalainen – korkea - epäluotettava (Taulukko 13). Kokonaisepävarmuuden kannalta merkittävimpiä seikkoja lienevät suppea tiedon määrä ja riskinarvioijan kokemattomuus.

Taulukko 13. Riskinarvioinnin epävarmuutta lisääviä ja vähentäviä tekijöitä sekä arvio epävarmuuden tasosta luokitteluastekolla matala – kohtalainen – korkea – epäluotettava.

Tiedon lähde	Epävarmuutta lisää	Epävarmuutta vähentää	Epävarmuuden taso
Tiedot satamista	Tiedot yleisluonteisia	Satamat ovat julkisia paikkoja ja käytetty tieto on julkisesti saatavilla ja varmennettavissa	Matala
Näytteenotto	Vähäinen näytemäärä Jyväskylän satamassa Lappeenrannan sataman sedimentit hyvin heterogeenisia	Näytteet kokoomanäytteitä	Kohtalainen
Näytteiden säilytys	Pitkä säilytysaika	Säilytys pimeässä ja viileässä, näyteastioiden ilma korvattu typellä	Matala
Kemialliset analyysit	Menetelmän ja laitteiston matala tarkkuus Ei rinnakkaisia määrittäyksiä,	Menetelmä on riittävän tarkka korkeiden pitoisuuksien määrittämiseen ¹	Korkea
Toksisuuskokeet	Vain yksi eliölaji Sedimenttialtistuksessa suuri hajonta	Subletaalien vasteiden käyttö	Kohtalainen
Riskiarviointi	Tiedot satamien pohja-eläimistöstä ja haitta-aineista ovat PAH-yhdisteitä lukuunottamatta vähäisiä	Eri todistusaineistot eivät ole keskenään ristiriitaisia	Kohtalainen

¹Yhdisteestä riippuen tarkkuus riitti yli 0,1-0,5 µg/g pitoisuuksien määrittämiseen.

4.5 Lisätutkimustarpeet

Tämä ekotoksikologinen riskinarviointi oli alustava ja kartoittava. Kartoittavassa riskinarvioinnissa oleellista on arvioida millaisia jatkotoimenpiteitä mahdollinen tarkempi riskinarviointi edellyttää. Tutkitut satamasedimentit eivät tämän tutkimuksen perusteella aiheuta merkittävää riskiä ympäristölle, mutta esimerkiksi niiden ruoppaamista harkittaessa

syitä täydentää riskiarviointia. Suoritetut tutkimukset osoittavat erityisesti Lappeenrannan Kaupunginlahden sedimenttien vaihtelevan paljon läheistenkin näytteenottoaikkojen välillä niin orgaanisen hiilen kuin PAH-yhdisteidenkin pitoisuuksien suhteen. Mittausepävarmuuksien vähemiseksi jatkotutkimuksissa tulisi huomioida spatiaalinen heterogeenisuus ottamalla enemmän näytteitä.

Kemialliset analyysit osoittavat PAH-yhdisteiden pitoisuuksien olevan tasolla, joka ei aiheuta merkittäviä ekotoksikologisia vaikutuksia. PAH-yhdisteet ovat kuitenkin vain yksi mahdollinen haitta-aineiden ryhmä. Koska polttoaineiden aiheuttama kontaminaatio on satamasedimentissä mahdollinen, näytteistä kannattaisi tutkia kokonaishiilivetyypitoisuus esimerkiksi GC/FID laitteiston avulla. Erityisesti suosittelen tätä Jyväsjärven sataman pohjukasta otetulle näytteelle J3 joka silmämääräisesti arvioiden sisälsi huomattavan paljon uuttuvia yhdisteitä. Erityisesti satamille tyypillisiä sedimentin haitta-aineita ovat myös alusten pohjamaaleissa, ennen vuonna 1991 voimaan astuneita rajoituksia, käytetyt orgaaniset tinayhdisteet (Korhonen & Kotilainen 2005). Näiden analysointi olisikin tarkemmassa riskinarvioinnissa suositeltavaa.

Toksisuuskokeiden kehittäminen sukkulamadolle *C. elegans* oli keskeinen osa tätä työtä. Sedimentit eivät osoittautuneet myrkyllisiksi, mutta täysin haitattomaksikaan niitä ei voitu osoittaa: Osa sedimenttien huokosvesistä vaikutti *C. elegansin* lisääntymiseen ja kasvuun, mutta kiinteällä sedimentillä vaikutuksia ei havaittu. Vaihtelu yksilöiden ja rinnakkaisten kokeiden välillä vaikeuttaa lievien vaikutusten havaitsemista, joten suosittelen lisääntyvästä työmäärästä huolimatta käyttämään useampaa kuin kolmea rinnakkaista määritystä.

Pohjaeläinlajien välillä saattaa olla huomattaviakin eroja herkkyydessä haitallisille aineille, joten toksisuutta ja mahdollisesti myös bioakkumulaatiota kannattaa tutkia useammalla eri taksonomiseen ryhmään kuuluvalla lajilla, kuten harvasukamadolla (*Oligochaeta*) tai äyriäisellä (*Crustacea*). Pohjaeläimistön altistumisesta ei ollut käytettävissä paikan päältä kerättyä tietoa. Sitä voisi tutkia esimerkiksi analysoimalla paikan päältä kerättyjen pohjaeläinten kudoksien haitta-aineita sekä niistä tutkittavien biomarkkerien tai morfologisten muutosten avulla.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkimuksen perusteella tutkittujen satamien sedimentit eivät PAH-yhdisteiden osalta muodosta merkittävää riskiä pohjaeläimistöille. Pitoisuudet sedimentissä ovat selvästi SAMASE-raportin saastuneeksi määritellyn pitoisuuden raja-arvoa alempia, mutta osa molempien satamien näytteistä ylittää saastuneelle ruoppausmassalle asetetun bentso[a]antraseenin ohjearvon. Elutriaateille tehtyjen analyysien perusteella PAH-yhdisteet ovat sitoutuneet sedimenttiin melko voimakkaasti ja liukeneminen veteen on hidasta. Pitoisuusgradienttien ja PAH-yhdisteiden suhteellisten osuuksien vertailun perusteella Jyväskylän ja Lappeenrannan satamat eivät ole erityisen merkittäviä PAH-yhdisteiden päästölähteitä. Tutkimustulokset tukevat käsitystä, jonka mukaan orgaanisen hiilen pitoisuus on keskeinen PAH-yhdisteiden sitoutumiseen vaikuttava tekijä.

C. elegans osoittautui käyttökelpoiseksi lajiksi sedimenttien toksisuuden tutkimiseen. Lajin käyttö edellyttää kuitenkin perehtymistä sen käsittelyyn sekä erityisiä työvälineitä. Huokosvesialtistus osoittautui kiinteälle sedimentille altistusta herkemmäksi sekä teknisesti yksinkertaisemmaksi menetelmäksi toksisuuden tutkimisessa: Osa molempien satamien sedimenttien huokosvesistä osoittautui lievästi toksisiksi, mutta puolikiinteälle sedimentille altistettaessa vaikutuksia ei havaittu.

KIITOKSET

Lämmin kiitos Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen henkilökunnalle, jolta sain runsaasti apua ja neuvoja varsinkin *C. elegans*illa tehtyihin tutkimuksiin liittyneiden lukuisten ongelmien ratkaisemisessa. Erityisesti haluan kiittää työn ohjaajaa, professori Aimo Oikaria runsaista ideoista ja neuvoista työn kaikissa vaiheissa. Suuri kiitos laboratoriomestareille, Leena Sivonen ja Mervi Koistinen, jatko-opiskelijoille Marja Lahti ja Kati Nissinen sekä opiskelutovereille Heli Rämänen ja Heli Kivisaari opastuksesta ja avusta laboratoriotyössä sekä kannustuksesta projektin kaikissa vaiheissa.

Kiitos Kuopion yliopiston A.I.Virtanen -instituutille toksisuuden tutkimisessa käytetyn *C. elegans* sukkulamatomokannan ja sen ravinnon, *E. coli* OP50 –bakteerikannan lahjoituksesta. Kiitos erikoistutkija Merja Laksolle ja professori Garry Wongille neuvoista ja käytännönläheisestä opetuksesta sukkulamatojen käsittelyssä.

Kaikkia ystäviäni tahdon kiittää siitä, että autoitte välillä unohtamaan gradun ja elämään täysipainoista elämää nykyhetkessä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

Achazi, R.K. 2002: Invertebrates in risk assessment - Development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil. *J Soils & Sediments* 2: 174-178.

Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J-N. & Garrigues, P. 2003: Metabolic activation of PAHs: Role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. -Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective 392 s. John Wiley Sons Ltd, Chichester.

Albers, P.H. 1995: Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. -Teoksessa Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A & Cairns, J. (toim) 1995: Handbook of Ecotoxicology 755 s. Lewis Publishers, Lontoo.

Alvarez, O.A., Jager, T., Kooijman, S.A.L.M. & Kammenga, J.E. 2005: Responses to stress of *Caenorhabditis elegans* populations with different reproductive strategies. - *Functional Ecology* 19: 656-664.

Anderson, G.L., Boyd, W.A. & Williams, P.L. 2001: Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 833-838.

Ankley, G.T., Burkhard, L.P., Cook, P.M., Diamond, S.A., Erickson, R.J. & Mount, D.R. 2003: Assessing risk from photoactivated PAHs to aquatic organisms. – Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective. Wiley & Sons, Chichester.

Apitz, S., Davis, J., Finkelstein, K., Hohreiter, D., Hoke, R., Jense, R., Jersak, J., Kirtay, V., Mack, E., Magar, V., Moore, D., Reivle, D. & Stahl, R. 2005: Assessing and managing contaminated sediments: Part 1, Developing an effective investigation and risk evaluation strategy. - *Integrated environmental assessment and management* 1: 2-8.

Berset, J.D., Ejem, M., Holzer, R. & Lischer, P. 1999: Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. - *Analytica Chimica Acta* 383: 263-275.

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A. & Takada, H. 2006: Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuary, and marine sediments in Thailand. – *Marine Pollution Bulletin* 52:942-56.

Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierald, C. & Garrigues, P. 1997: Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. - *Marine Chemistry* 58: 85-97.

Burgess, R.M, Ahrens, M.J. & Hickey, C.W. 2003: Geochemistry of PAHs in aquatic environments: source, persistence and distribution. - Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective 392 s. John Wiley Sons Ltd, Chichester.

Burton, G.A. & MacPherson, C. 1995: Sediment toxicity testing issues and methods - Teoksessa: Hoffman D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. & Cairns, J. (toim.) 1995: Handbook of Ecotoxicology, kappale 5: 70 -103. CRC Press.

Chapman, P.M., Cano, M., Fritz, A.T., Gamlet, C., Menzie, C.A., Sprenger, M. & Stubblefield, W.A. 1997: Workgroup summary report on contaminated site cleanup decisions. Teoksessa Ingersol, C.G., Dillon, T. & Biddinger, G.R. (toim.) 1997: Ecological risk assessment of contaminated sediments. SETAC workshop on sediment ecological risk assessment: 1995 Apr 23-28 Pacific Grove CA 390 s. SETAC Print, Pensacola, Florida.

Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P. & Lovley, D.R. 1997: Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. -Applied and Environmental Microbiology 63: 3589-3593.

Dahle, S., Savinov, V., Petrova, V., Klungsoyr, J., Savinova, T., Batova, G. & Kursheva, A. 2006: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Norwegian and Russian Arctic marine sediments: concentrations, geographical distribution and sources. -Norwegian Journal of Geology 86: 41-50.

Di Toro, D.M., Zarba, C.S, Hanse, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. & Paquin, P.R. 1991: Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. – Environmental Toxicology and Chemistry 10: 1541-1583.

EPA 2006: Method 8270D Semivolantile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). – Revision 4. Helmikuu 2007. US. EPA.

Fent, K. 2004: Ecotoxicological effects at contaminated sites. – *Toxicology* 205: 223-240.

Ferguson, P., & Chandler, G.T. 1998: A laboratory and field comparison of sediment polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation by the cosmopolitan estuarine polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). – *Marine Environmental Research* 45: 387-401.

Gabos, S., Ikonomou, M.G., Schopflocher, D., Fowler, B.R., White, J., Prepas, E., Prince, D., & Chen, W. 2001: Characteristics of PAHs, PCDD/Fs and PCBs in sediment following forest fires in northern Alberta. - *Chemosphere* 43: 709-719.

Heitkamp, M.A. & Cerniglia, C.E. 1989: Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. – *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1968-1973.

Hyötyläinen, T. 2001: Assessment of ecotoxic effects of creosote contaminated lake sediment and its remediation. Väitöskirja. - Jyväskylä studies in biological and environmental science 99.

Ingersoll, C.G. 1995: Sediment tests. - Teoksessa Rand, G. M. (toim.) 1995: Fundamentals of aquatic toxicology (2. painos). Taylor & Francis, Washington D.C.

Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Grazer, H., Ahlf, W. & Steinberg, C. 1997: Influence of particle size distribution and content of organic matter on the toxicity of copper in sediment bioassays using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). – *Water, Air and Soil Pollution* 99: 689 – 695.

Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W. & Steinberg, C. 1999: Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in unpolluted freshwater sediments: response to particle size, distribution and organic content. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2921 - 2925.

ISO 2006: (the International Organization for Standardization) Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). - Standardiluonnos ISO/TC 147/SC 5 N 0576. 25.8.2006.

Jyväskylän kaupunki 2008: Karttapalvelu. <http://kartta.jkl.fi/>

Kanaly, R.A. & Harayama, S. 2000: Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. - *Journal of Bacteriology* 182: 2059-2067.

Kammenga, J.E., Van Koert, P.H.G., Riksen, J.A.G, Korthals, G. & Bakker, J. 1996: A toxicity test in artificial soil based on the life-history strategy of the nematode *Plectus acuminatus*. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 722-727.

Khanna, N., Cressman, C.P., Tatara, C.P. & Williams, P.L. 1997: Tolerance of the Nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, Salinity, and Hardness in Aquatic Media – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 110-115.

King, A.J., Readman, J.W. & Zhou, J.L. 2004: Dynamic behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brighton marina, UK. – *Marine Pollution Bulletin* 48: 229-239.

Kitson, F.G., Larsen, B.S. & McEwen, C.N. 1996: Gas chromatography and mass spectrometry – a practical guide. – Academic Press, San Diego.

Kivisaari, H. 2007: Sedimenttien PAH-yhdisteet ja ekotoksisuus. – Opinnäytetyö, Jyväskylän ammattikorkeakoulu, Tekniikka ja Liikenne.

Korhonen, T. & Kotilainen, A. 2005: Likaantuneet sedimentit satama- ja väyläruoppauksessa. – Teoksessa Sarvala, M & Sarvala, T. (toim): Miten voit Selkämeri? Ympäristön tila Lounais-Suomessa 4. Lounais-Suomen ympäristökeskus, Turku.

Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S. & Rowland, C.D. 2002: Biological responses of *Lumbriculus variegatus* exposed to fluoranthene-spiked sediment. – Archives of Environmental Contamination and Toxicology 42: 292-302.

Lappenrannan kaupunki 2008: Opaskartta. <http://kartta.lappeenranta.fi/>

Latimer, J.S. & Zheng, J. 2003: The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. - Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective 392 s. John Wiley Sons Ltd, Chichester.

Leppänen, M. 1999: Bioaccumulation of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). - Väitöskirja. Joensuun yliopiston luonnontieteellisiä julkaisuja no. 53.

Liu, M., Baugh, P.J., Hutchinson, S.M., Yu, L. & Xu, S.2000: Historical record and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from the Yangtze estuary, China. - Environmental Pollution 110: 357-365.

Magnusson, K., Ekelund, R., Dace, G., Granmo, Å., Förlin, L., Wennberg, L., Samuelsson, M.-O., Berggren, M. & Brorström-Lunden, E. 1996: Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. – Journal of Sea Research 35: 224-234.

Mallakin, A., McConkey, B.J., Miao, G., McKibben, B., Snieckus, V., Dixon, D.G., & Greenberg, B.M. 1999: Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation products. - Ecotoxicology and Environmental Safety 43: 204-212.

Martínez-Lladó, X., Gibert, O., Marti, V., Diez, S., Romo, J., Bayona, J. & de Pablo, J. 2007: Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and tributyltin in Barcelona harbour sediments and their impact on benthic communities. – Environmental Pollution 149: 104-113.

Meador, J.P., Casillas, E., Sloan, C.A., & Varanasi, U. 1995: Comparative bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by two infaunal invertebrates. – *Marine Ecology Progress Series* 123: 107-124.

Meador, J.P. 2003: Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. – Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective. Wiley & Sons, Chichester.

Meriläinen, P. 2007: Exposure assessment of animals to sediments contaminated by pulp and paper mills. - *Jyväskylä studies in biological and environmental science* 180, Väitöskirja.

Nikku, J. 2008: Satamavalvojan suullinen tiedonanto Lappenrannan Kaupunginlahdensataman laituripaikoista 14.1.2008.

Poster, D.L., Schantz, M.M., Sander, L.C. & Wise, S.A. 2006: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386: 859-881.

Rust, A.J., Burgess, R.M., Brownawell, B.J., & McElroy, A. 2004: Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo[a]pyrene in benthic invertebrates. – *Environmental Toxicology & Chemistry* 23: 2587-2593.

Sanders, M., Sivertsen, S., & Scott, G. 2002: Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments from the savannah river. - *Environmental Contamination and Toxicology* 43: 438-448.

Seuranen, K. 2008: Suullinen tiedonanto Jyväskylän Lutakon sataman laituripaikoista ja liikennemääristä 14.1.2008.

Sochova, I., Hofman, J. & Holoubek, I. 2006: Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environment international* 32: 374-383.

Stiernagle, T. 2006: Maintenance of *C. elegans* (Helmikuu 11. 2006), Wormbook, toim. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

Suter G.W. 1995: Introduction to ecological risk assessment for aquatic toxic effects. – Teoksessa Rand, G. M. (toim.) 1995: Fundamentals of aquatic toxicology (2. painos). Taylor & Francis, Washington D.C.

Suter, G.W., Efrogmson, R., Sample, B.E. & Jones, D.S. 2000: Ecological risk assessment for contaminated sites – 438 s., CRC Press LCC, USA.

Swartz, R. 1999: Concensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. - Environmental Toxicology and Chemistry 18: 780-787.

Särkkä, J. 1996: Järvet ja ympäristö – Limnologian perusteet. Gaideamus, Tammer-Paino Oy, Tampere.

Traunspurger, W. & Drews, C. 1996: Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: a review. – Hydrobiologia 328: 215-261.

Traunspurger, W., Haitzer, M., Höss, S., Beier, S., Ahlf, W. & Steinberg, C. 1996: Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) - a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. - Environmental Toxicology and Chemistry 16: 245-250.

Traunspurger, W., Bergtold, M., & Goedkoop, W. 1997: The effects of nematodes on bacterial abundance in a freshwater sediment. – Oecologia 112: 118-122.

Varanasi, U. 1989: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC press.

Vatanen, S. 2005: Sedimenttien haitta-ainekartoitus Helsingin vesialueella vuonna 2005. – Helsingin kaupungin ympäristökeskuksen julkaisuja 8/2005.

Volkering, F. & Breure, A.M. 2003: Biodegradation and general aspects of bioavailability. - Teoksessa Douben, P.E.T. (toim.) 2003: PAHs: An ecotoxicological perspective. Wiley & Sons, Chichester.

Voorhies, W.A. & Ward, S. 2000: Broad oxygen tolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. -The Journal of Experimental Biology 203: 2467-2478.

Vuori, K-M., Tuppurainen, J. & Jokela, S. 2001: Ekologiset riskit jokivesistöissä – Arviointimenetelmät ja niiden soveltaminen boreaalisille jokiekosysteemeille. – Suomen ympäristö 496. Pohjois-Karjalan ympäristökeskus, Joensuu.

Wang, J. & Kim, S.K. 2003: Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. – Development 130: 1621-1634.

Weston, D.P., Penry, D.L. & Gulmann, L.K. 2000: The Role of Ingestion as a Route of Contaminant Bioaccumulation in a Deposit-Feeding Polychaete' - Archives of Environmental Contamination and Toxicology 38: 446-454.

Wilcock, R.J, Corban, C.A., Northcott, G.L., Wilkins, A.L., & Langdon, A.G. 1996: Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of an intertidal sandflat. - Environmental Toxicology and Chemistry 15: 670-676.

Yang, G-P. 2000: Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China sea. – Environmental Pollution 108: 163-171.

Yaffe, D., Cohem, Y., Arey, J. & Grosovsky A.J. 2001: Multimedia analysis of PAHs and nitro-PAH daughter products in the Los Angeles basin. – Risk Analysis 21:275-290.

Ympäristöministeriö 1994: Saastuneet maa-alueet ja niiden käsittely Suomessa – saastuneiden maa-alueiden selvitys- ja kunnostusprojekti, loppuraportti. - Ympäristöministeriön Ympäristönsuojeluosaston muistio 5/1994.

Ympäristöministeriö 2004: Sedimenttien ruoppaus- ja läjitysohje. Ympäristöministeriö, Helsinki.

Sukkulamato *Caenorhabditis elegans*

– kasvatus ja käyttö toksisuuskokeissa

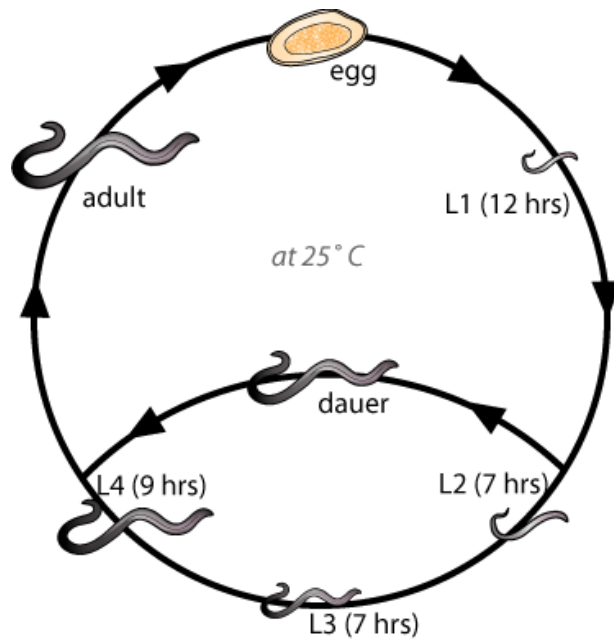
ESIPUHE

Tämä työohje on tarkoitettu avuksi ISO NW Nematoda standardiluonnoksen mukaisessa ympäristönäytteiden toksisuuden tutkimisessa sukkulamadolla *Caenorhabditis elegans*. Kyseinen luonnos on ohjeen pohjana, mutta erityisesti kantojen kasvatukseen ja ylläpitoon on kerätty ohjeita myös muista lähteistä. Työohje on luotu pro gradu opinnäytetyön yhteydessä. Eräät neuvoista ovat ristiriidassa edellämainitun standardiluonnoksen kanssa. Tämä johtuu useimmiten ohjeiden soveltamisesta käytettävissä olleeseen välineistöön ja laitteistoon. Standardista poikkeamisen suhteen tulee käyttää tapauskohtaista harkintaa ja tulosten raportoinnin yhteydessä on suositeltavaa perustella ohjeista poikkeaminen.

1. JOHDANTO

Sukkulamadot (Nematoda) ovat yleisin ja lajirikkain sedimenteissä ja maaperässä elävien eläinten pääluokka. Huomattava osa sedimenttien bakteereista on ravinnon puutteen ja korkean yksilötiheyden vuoksi lepotilassa. Bakteereita ravintonaan käyttävät sukkulamadot lisäävät bakteerikasvua erityisesti bakteeritiheyden säätelemässä populaatioissa. Mikrobien kasvua lisäävän - ja siten myös typen mineralisaatiota ja ravinteiden kiertoa kiihdyttävän vaikutuksen vuoksi sukkulamadoilla on huomattava merkitys orgaanisen aineksen hajotusprosesseissa (Kammenga ym. 1996; Traunspurger ym. 1997; Sochova ym. 2006).

Sukkulamato *Caenorhabditis elegans* esiintyy maaperän nestefaasissa ja makeiden vesistöjen sedimenteissä. Se käyttää ravinnokseen valikoimatta bakteereita ja muita ympäröivän aineksen sisältämiä pienikokoisia hiukkasia (Traunspurger ym. 1997; Sochova ym. 2006). Munamaisen alkiovaiheen jälkeen *C. elegans*illa on neljä kuorenvaihdosten erottamaa nuoruusvaihetta (juveniles); J1-J4 (myös larvaes; J1-J4 nimitystä käytetään vastaavasti) (kuva 1). Täysikasvuiset madot ovat pituudeltaan noin 1-1,5 mm ja vastakuoriutuneet noin 260 µm. Ravinnon puutteessa tai muuten epäsuotuisissa olosuhteissa kehitys voi keskeytyä kolmannen nuoruusvaiheen (J3) sijasta dauer –vaiheen kehittymiseen. Dauer –kehitysvaihe on suhteellisen pitkäikäinen sekä stressitekijöitä ja ravinnonpuutetta kestävä. Vähäinen ravinnonmäärä, korkea yksilötiheys ja korkea lämpötila vaikuttavat varhaisessa nuoruusvaiheessa yksilön kehittymiseen daueriksi. Dauereiden käyttäytyminen edistää leviämistä uuteen ympäristöön ja niiden elinikä on vähintään viisinkertainen normaaliin elinikään verrattuna. Energian saanti perustuu pääasiassa vararavintoon. Olosuhteiden muuttuessa suotuisammiksi dauerien kehitys J4 –nuoruusvaiheen kautta aikuiseksi jatkuu (Traunspurger ym. 1997). *C. elegans*in sukupuolet ovat hermadofriitti ja uros. Ekotoksikologiassa tavallisimmin käytetyn, jalostamattoman N2-kannan madoista valtaosa (yli 99 %) on hermadofriitteja. Hermadofriitit tuottavat sekä uros että naaraspuolisia sukusoluja, mikä mahdollistaa itsehedelmöityksen. Urokset voivat hedelmöittää hermadofriitteja ja suvullisen lisääntymisen tapahtuessa itsehedelmöitys syrjäytyy lähes täysin (Alvarez ym. 2005; Stiernagle 2007).



Kuva 1. *C. elegansin* yksilökehityksen vaiheet ja nuoruusvaiheiden ajallinen kesto 25 °C:n lämpötilassa. Eri kehitysvaiheita erottaa ihon vaihto (Yan 2004).

C. elegansin kasvu- ja kehittymisnopeus ovat voimakkaasti lämpötilasta riippuvaisia. Kehitys sukukypsäksi kestää 16 °C lämpötilassa noin kaksi kertaa kauemmin kuin 25 °C:ssa (Stiernagle 2007). Toksisuutta tutkittaessa käytetään tavallisesti 20 °C:n lämpötilaa, jolloin sukukypsäys saavutetaan suotuisissa oloissa noin kuudenkymmenen tunnin kuluessa munasta kuoriutumisen jälkeen. Myrkyllisten yhdisteiden vaikutus ilmenee lyhytkestoisemmissä kokeissa mm. kasvun ja kehityksen hidastumisena sekä pidempiaikaisessa altistuksessa lisäksi heikompana jälkeläistuotona (Sochova ym. 2006). Tässä ohjeessa keskitytään kestoalta 72 ja 96 tunnin altistuksiin, jolloin kehityksen vähäinenkin viivästyminen ilmenee optimaalisiin kasvuolosuhteisiin verrattuna selvästi pienempänä jälkeläistuotona.

2. SUKKULAMATOJEN KASVATUS

2.1 Tarvikkeet

Aineet

- 70 % etanoli (massa%, desinfiointiin)

- LB-medium: peptoni¹ 2,5 g/l, hiivauute² 5,0 g/l, NaCl 10,0 g/l, ionivaihdettu vesi (johtokyky <10 µS/cm)
- NG –agar: agar³ 17,0 g/l, NaCl 3,0 g/l, peptoni 2,5 g/l, ionivaihdettu vesi (johtokyky <10 µS/cm)

¹ Casein-meat peptone, Biocar Diagnostics, A1048HA)

² Yeast extract, Biocar Diagnostics, A1202HA)

³ Bacteriological agar type A, Biocar Diagnostics A1010HA)

Peptoni, agar ja NaCl liotetaan 975 ml:an ionivaihdettua vettä. Seos autoklavoidaan.

Liuoksen jäähtyttyä siihen lisätään steriilisti esimerkiksi ruiskuun liitettävän suodattimen läpi:

- 1 ml kolesteroliliuosta: Kolesteroli* 5 g/l etanolissa (liukenee erittäin hitaasti; alkoholiliuosta ei voi autoklavoida)
 - 1 ml 1 M CaCl₂ liuosta (111 g/l)
 - 1 ml 1 M MgSO₄ liuosta (247 g/l MgSO₄ x 7 H₂O)
 - 25 ml 1 M fosfaattipuskuriliuosta (KH₂PO₄ 136 g/l, säädä pH 6,0:n 1 M KOH:lla)
- (*Cholesterol; 5-cholesten-3β-ol, Sigma Chemical Co. C-3045)

Agar valetaan maljoille automaattipipettiä käyttäen ohueksi kerrokseksi. Kuhunkin maljaan lisätään sama määrä agaria, jotta mikroskopoidessa maljojen välillä ei tarvitse tarkennusta.

Välineet

- Lasipulloja 250 ml
- Alumiinifoliota
- Parafilmiä
- Pasteuripipettejä
- Petrialjoja ø 6 cm (steriilejä, PS-muovia)
- Platinalankaa
- 1,5 ml:n Eppendorf putkia (osa kierrekorkillisia)

- Kaasu- tai alkoholil liekki
- Drigalski spaatteli (lasispaatteli bakteerien levittämiseen agarille)

Laitteet

- Nesteautoklaavi
- Inkubattori (37 °C)
- Ravistelijä
- Zoomattava tutkimusmikroskooppi
- Vaaka (1 mg erottelukyky)
- Pakastin (-80 °C)
- Lämpömittari (min-max -tallennus)

Eliöt

Escherichia coli OP 50 (bacteria)

Caenorhabditis elegans (nematoda), N2 wild type -kanta

2.2 Ravinnon valmistus

Suljetussa 250 ml:n pullossa säilytettyyn, autoklavoituun (kirkkaaseen) LB-mediumiin (50 ml) lisätään steriilisti *E. coli* OP 50 bakteereita joko pakastetusta liuoksesta tai agarmaljan pinnalta. Pakastimesta otettu eppendorffputki sulatetaan käsillä lämmittämällä ja kaadetaan pulloon. Maljan pinnalta platinasilmukalla pyyhkimällä ja kastamalla voidaan myös lisätä pulloon ympäri. Pullon korkki jätetään ilman vaihtumiseksi löyhästi kiinni. Roiskeiden varalta pullo laitetaan avoimeen muovipussiin. LB-seosta inkuboidaan tämän jälkeen 37 °C:ssa, ravistelijassa noin 17 h ajan. Bakteerikasvu muuttuu kirkkaan liuoksen sameaksi.

LB-mediumia lisätään agarmaljoille steriileillä välineillä laminaarikaapissa noin 1 ml. Neste levitetään maljalle tasaisesti reunoja lukuunottamatta liekissä steriloidulla drigalski-spaattelilla.

Maljojen annetaan kuivahtaa laminaarikaapin ilmavirrassa kannet raollaan 3 - 4 tunnin ajan. Lyhyempi kuivatus pehmentää agaria ja aiheuttaa kosteuden tiivistymistä maljan kanteen mikä vaikeuttaa mikroskopointia. Liian pitkässä kuivatuksessa agar kuivuu kovaksi. Kontaminaation ja kuivumisen estämiseksi maljat voi sulkea parafilmillä tai niitä voi säilyttää muovipussissa tai –rasiassa. Maljoja voi säilyttää huoneen lämpötilassa muutamia vuorokausia tai jääkaapissa useita viikkoja.

2.3 *E. coli* -kannan säilyttäminen

E. coli kanta säilytetään glyseroliliuoksessa -20 °C:n lämpötilassa tai kylmemmässä. Kanta valmistetaan seuraavasti: Kierrekorkillisiin 1,5 ml Eppendorf-putkiin mitataan 200 µl glyserolia ja autoklavoidaan (20 min, 121°C). Jäähdytyneeseen glyseroliin lisätään 800 µl tuoretta, yön yli eli 17 h kasvatettua *E. coli*-viljelmää. Seos sekoitetaan vortexilla ja jäädytetään mieluiten nestemäisessä työssä. Sulatettua *E. coli*-kantaa ei saa pakastaa uudelleen. Kantaviljelmät tulee uusia 6 kk välein.

2.4 Matojen siirrostaminen

C. elegans lisääntyy suotuisissa olosuhteissa erittäin nopeasti. Yksi maljalle siirrostettu sukukypsä mato voi tuottaa parissa päivässä yli sata munaa, joista kehittyy muutaman päivän kuluessa lisääntyviä matoja. Suuret matojoukot syövät maljoilla kasvavan bakteerimassan hyvin nopeasti loppuun. Ravinnon loppuessa madot lopettavat munimisen ja J1-vaiheen madoista kehittyy dauereita, jotka kestävät paastoa muiden vähitellen kuollessa. Ravinnon loppumisen voi havaita paitsi maljan pinnan kirkastumisena, myös matojen käyttäytymisestä: ruuan loppuessa madot kerääntyvät tiiviiksi röykkiöiksi tai pyrkivät kaivautumaan agariin, ilmeisesti kuivumista välttääkseen.

Toksisuuskokeissa tarvitaan vastakuoriutuneita J1 matoja, joiden tuottamiseksi madoilla tulee olla hyvä ravitsemustila. Siirrostamiseen uudelle maljalle voi käyttää erilaisia menetelmiä. Tavallisimmassa menetelmässä liekissä steriloidulla platinalangalla pyyhitään mikroskoopilla tähystäen maljan pintaa ja siirretään lankaan tarttuneet madot uudelle maljalle. Tarttumista helpottaa bakteerimassan kerääminen lankaan. Siirrostaessa on vältettävä agarin pinnan puhkaisemista, sillä madot menevät mielellään kuoppiin joista niitä on erittäin vaikea poistaa. Siirrostus on aluksi vaikeaa, mutta uuden populaation voi

kasvattaa yhdestäkin vastakuoriutuneesta J1 madosta. Siirrostettavien matojen lukumäärää kasvattamalla saadaan uudelle maljalle paljon nopeammin suuri populaatio. Agarista voi platinalangalla kaivaa paloja, joiden mukana siirtyy matoja uudelle maljalle. Erityisesti tiheistä populaatioista agarpaloja siirrettäessä madot pyrkivät välittömästi levittäytymään uudelle maljalle. Vieläkin nopeampi siirrostustapa on pyyhkiä maljan pintaa liekissä steriloidulla peitinlasilla ja levittää tarttunut massa siirrostettavalle maljalle. Mikäli maljalta loppuu ravinto ja matoja tarvitsee jo seuraavana päivänä, voi suuria matomääriä siirtää huuhtomalla matoja maljan pinnalta yhdellä ml:lla M9 puskuriliuosta ja siirtämällä neste uudelle maljalle (steriilit välineet). Maljoille voi myös lisätä bakteerimassaa, mutta tiheä populaatio käyttää sen nopeasti loppuun.

2.5 *C. elegansin* pakastaminen

(Alkuperäinen ohje Sulston & Hodkin 1988)

Pakastusliuos

NaCl 5,85 g/l

KH₂PO₄ 6,8 g/l

Glyseroli 300 g/l

NaOH 1M 5,6 ml/l

Ionivaihdettu vesi

Valmiin liuoksen pH on 6,0 -6,5.

Autoklavoi (väri muuttuu kellertäväksi), ja lisää sen jälkeen autoklavoitua tai steriilisuodatettua 0,1 M MgSO₄ 3ml/l.

Pakastukseen tarvitaan maljoja joilla on runsaasti nuoria J1 ja J2 matoja. Madot ovat parhaassa pakastamiskunnossa, kun ravinnon loppumisesta on kulunut noin 1 vrk. Huuhdo madot maljalta noin 1 ml:lla M9 liuosta ja siirrä madot sisältävä neste kahteen steriiliin, kierrekorkilliseen eppendorf –putkeen. Lisää joukkoon vastaava määrä (0,5 ml) pakastusliuosta, sekoita ja vie -20 °C:een pakastimeen. Noin tunnin kuluttua putkilot siirretään -70 °C:een tai kylmenpään pakastimeen pitkäaikaista säilytystä varten. Putkilot sulatetaan pitämällä niitä käsien välissä (käsineet) ja sula sisältö kaadetaan maljalle. Suurin osa (jopa >90 %) madoista kuolee pakastuksessa.

3. TOKSISUUDEN TUTKIMINEN

3.1 Tarvikkeet

Välineet

- Lasipulloja 250 ml vähintään 6 kpl
- Spaatteli
- Pasteurpipettejä
- Petrialjoja \varnothing 6 cm (steriilejä)
- Platinalankaa
- Kaasu- tai alkoholiliekki
- Kuoppalevyjä (12 kuoppaa, $3,5 \text{ cm}^3$)
- 1,5 ml Eppendorf putkia (myös kierrekorkillisia)
- 15 ja 50 ml:n sentrifuugiputkia
- Peitinlaseja
- Objektilasi
- NG-agar maljoja

Laitteet

- Nesteautoklaavi
- Inkubattori (37 °C)
- Lämpökaappi (80 °C)
- Ravistelija
- Eppendorf-sentrifuugi (150 - 200 g)
- Sentrifuugi (500 - 2000 g)
- Käänteismikroskooppi (100 x, mitta-asteikollinen)
- Zoomattava tutkimusmikroskooppi

- Preparointimikroskooppi (4-20 x, valolähde)
- Vaaka (1 mg erottelukyky)
- Pakastin (-80 °C)
- Turbidometri
- Lämpömittari (tarkkuus 0,5 °C, min-max -tallennus)

Aineet

- LB-medium
- M9-medium
- Pakastettu *Escherichia coli* OP 50 -kanta
- CdCl₂ (referenssiaine)
- Bengal rose –väriaineen vesiliuos 0,3 g/l
- Hypokloriittiliuos:
 - 1ml 5 % NaOCl
 - 0,5 ml 5 M KOH
 - 3,5 ml H₂O (ionivaihdettu)

Ainesosat sekoitetaan keskenään välittömästi ennen käyttöä.

-Ludox* : Valmistetaan veteen laimentamalla seos, jonka tiheys on 1,14-1,15 g/ml.

(*Ludox TM50 Colloidal silica 50 wt. % suspended in water. Sigma-Aldrich 420778-IL)

3.2 Synkronointi

Sukkulamatojen kehittymisen ja kasvun tutkimista varten kokeissa käytetään vastakuoriutuneita J1 matoja. Samanikäisten yksilöiden tuottamista kutsutaan synkronoimiseksi. Synkronointiin on useita erilaisia menetelmiä, joista yleisimmin käytetään hypokloriittimenetelmää (alkali bleach method). Tässä menetelmässä pyritään erottelemaan matojen munat (alkiot) hajottamalla kemiallisesti matojen kudosta. Munat kestävät paremmin hypokloriittia kuin muut madot. Näin ollen matojen sisällä kehittyvät munat voidaan erotella seoksella, joka syövyttää munia ympäröivät kudokset.

Menetelmä (Huom! Tämä Sulston & Hodkin (1988) ohjeesta sovellettu menetelmä poikkeaa huomattavasti ISO-standardiluonnoksen mukaisesta menetelmästä, sillä tämän ohjeen tekijällä ei ollut käytettävissä sen edellyttämää 10 ja 5 µm suodatinvälineistöä)

1. Kerää runsaasti munivia matoja sisältävältä maljalta madot ja munat huuhtomalla maljaa M9 liuoksella. Nestettä kannattaa ruiskuttaa pipetillä 0,5 ml:n erissä pitämällä maljaa kallellistettuna. Neste kerätään nopeasti 1 ml eppendorffputkiin. Tämä toistetaan useita kertoja, kunnes madot on kerätty koko maljalta.
2. Eppendorffputkia sentrifugoidaan 150 - 200 g voimalla 20-30 s ajan
3. Supertanantti poistetaan
4. Pelletti pestään yhdellä ml:lla M9 (lietetään ja sentrifugoidaan)
5. Eppendorffputkiin lisätään 1 ml hypokloriitiliuosta, sekoitetaan ja tarkkaillaan matojen hajoamista preparointimikroskoopin alla.
6. Kun munat ovat erottuneet madoista 3-7 min kuluessa, ne erotellaan sentrifugoimalla 20-30 s 150-200 g voimalla. Tässä vaiheessa on toimittava nopeasti, sillä liian pitkä käsittelyaika vahingoittaa munia. Älä odota yli 7 min ja toimi nopeasti myös seuraavassa vaiheessa.
7. Poista supertanantti ja pese pelletti 4 kertaa 1 ml:lla M9:ää (kuten kohdassa 4.).
8. Sekoita pelletti 0,5 ml:n M9-mediumia ja lisää neste kuoppalevyille.
9. Odota kunnes munista kehittyy J1 matoja 12-24 h kuluessa (20 °C:ssa).

3.3 Ravinnon valmistaminen kokeeseen

Bakteerien viljely

Pakastimesta otettu *E. coli* OP50 -kanta sisältävä eppendorff putki sulatetaan pitämällä käsien välissä ja sekoitetaan perusteellisesti vortexilla. 50 ml autoklavoitua LB-mediumia sisältävään 250 ml säilöpulloon lisätään steriilisti (esim. autoklavoidulla pipetinkärjellä) 25 µl *E. coli* kantaa. Inkuboidaan ravistelijassa 17 h 37 °C lämpötilassa.

Ravintoaineksen valmistus (Huom! Tämä osa ohjeesta poikkeaa huomattavasti ISO:n standardiluonnoksesta, koska käytössä ei ollut sopivaa formasiinilla kalibroitua spektrofotometriä. Sen tilalla käytettiin turbidometriä, jonka NTU yksiköinä antama lukema ei ole vertailukelpoinen FAU yksiköihin nähden.)

Kasvata nestemäisten näytteiden tutkimiseen kaksi pullollista (2 * 50 ml) ja sedimentissä tapahtuvaa altistusta varten näytemäärästä riippuen vähintään 6 pullollista *E. colia*. Tuoretta bakteeriviljelmää mitataan 50 ml sentrifuugiputkiin ja bakteerit pelletöidään sentrifugoimalla 2000 g:n voimalla 20 min ajan huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen supertanantti poistetaan dekantoimalla, ja pelletti pestään M9-mediumilla (resuspensio pipetin ja vortexin avulla sekä uudelleen sentrifugointi). Pesun jälkeen supertanantti poistetaan ja pelletti lietetään alkuperäiseen tilavuuteen nähden 1/5:n M9-mediumia. Lopuksi bakteerisuspensiot yhdistetään ja sekoitetaan huolellisesti.

Sopivan vahvuisen seoksen valmistamiseksi edellä valmistetusta kantaseoksesta otetaan 3 ml ja laimennetaan M9:llä 30:ksi millilitraksi. Tästä mitataan sameus. Tuloksen perusteella lasketaan laimentamattoman kantaseoksen sameus. Tavoitteena on määrittää sekoitussuhde, jolla saadaan liuosten toksisuustestiin tarvittava 1000 tai sedimenttitestiin 12000 NTU vastaava sameus. Näin vahvojen seosten sameutta ei sellaisenaan voida mitata. Jos esimerkiksi 3:27 laimennuksen vahvuus on 300 NTU, 1000 NTU vahvuinen seos saadaan $1000/300 = 3,333$ kertaa vahvemalla seossuhteella eli 10:20 seoksella.

Lopuksi lisätään kolesterolikantaliuosta 0,2 % bakteerisuspension tilavuudesta; esim. 100 µl kolesterolikantaliuosta 50 ml:n bakteerisuspensiota.

3.4 Testiaineen valmistus

Sedimentin huokosvesi (pore water)

Mittaa testiin tarvittavan liuoksen tilavuuteen nähden vähintään kolminkertainen määrä kostea ja laskeutunutta tai homogenisoitua sedimenttiä 50 ml:n sentrifuugiputkiin. Erottele kiinteä aines sentrifugoimalla 2000 g:n voimalla 20 minuutin ajan. Ota supertanantti talteen välttämällä kiinteiden hiukkasten ottamista mukaan. Säilytä 4-8 °C:n lämpötilassa vähintään kaksitoista tuntia ja enintään vuorokausi ennen koetta. Osa kolloidisesta aineksesta muodostaa tänä aikana suurempia hiukkasia ja laskeutuu pohjalle. Lisää 0,5 ml huokosvettä 12 kuoppaisen kuoppalevyn kuoppiin 2-4 h ennen kokeen aloitusta, jotta neste saavuttaa huoneen lämpötilan. Vältä kiinteiden hiukkasten ottamista ja tarvittaessa sentrifugoi uudelleen edellä mainitulla tavalla.

Sedimentti

Punnitse taarattuihin upokkaiisiin noin 10 g tutkittavaa sedimenttiä kosteusprosentin määrittämistä varten. Kuivata 105 °C:ssa 17 h. Kosteuden tulisi olla vähintään 40 %. Mikäli se jää tämän alle, säädä kosteus 40 %:in lisäämällä M9-mediumia. Sedimentti lisätään 12 kuoppaiseen kuoppalevyyn noin 24 h ennen kokeen aloitusta ja säilytetään 4-8 °C:n lämpötilassa.

Käytä referenssiaineen (CdCl₂) kantaliuoksessa kaksinkertaista väkyyttä lopulliseen pitoisuuteen nähden niin, että ravintoaineksen lisäyksen jälkeen muodostuu tarkoitettu vahvuus. Esimerkiksi kadmiumkloridin vahvuuteen 0,5 mg/l pyrittäessä 0,5 ml ravintoseosta lisätään 0,5 ml:n CdCl₂, jonka vahvuus on 1,0 mg/l.

3.5 Kokeen aloitus

Noin 1 h ennen matojen lisäystä lisää kuoppiin 0,5 ml ravintoainesta ja sekoita aineet keskenään pienellä spaattelilla tai lasisauvalla. Siirrä madot kuoppiin, sulje kuopat parafilmilla ja asetan kansi kuoppalevyn päälle. Siirrä kuoppalevyt ja lämpömittari kannelliseen styrox-laatikkoon (tasaa lämpötilan vaihteluita, pimentää) ja siirrä laatikko 20 ± 1 °C:n lämpötilaan kokeen ajaksi.

Aloituspituuden mittaaminen

Mahdollisimman pian kokeen aloituksen jälkeen tulee määrittää tutkittavien matojen keskipituus. Sitä varten madot tulee värjätä, lopettaa ja mitata: Lisää ylijääneet madot sisältävään kuoppaan 0,5 ml bengal rose -liuosta (0,3 g/l) ja siirrä kuoppalevy 15 min ajaksi 80 °C:een lämpökaappiin. Tämän jälkeen mittaa kolmekymmentä satunnaisesti valittua matoa ja lopuksi laske niiden keskiarvo, jota käytään kasvun mittaamisessa aloituspituutena.

3.6 Matojen siirrostus ja laskeminen koetta varten

Kokeissa käytetään 10 matoa/kuoppa. Ravitele kuoppalevyä varovaisesti, jotta madot lähtevät liuoksen mukana liikkeelle. Ota pipetillä noin 10 µl nestettä hiukan pohjan yläpuolta, jotta mukaan ei tulisi munia. Lisää pisara objektilasin päällä olevalle peitinlasille siten että siitä muodostuu pitkulainen pisara. Laske pisarasta madot.

- Mikäli joukossa on munia, pese ja kuivaa tai ota käyttöön uusi peitinlasi.

- Kuolleita matoja ei lasketa; kuolleiksi määritellään liikkumattomat yksilöt. Siirtelyn ja muun häirinnän jälkeen osa madoista on aluksi passiivisia, mutta alkavat liikkumaan noin 30 s. kuluessa. Hylkää pisara epäselvissä tapauksissa.
- Mikäli matoja on pisarassa 9-11, huuhto madot peitinlasilta kuoppaan noin 300 µl:lla sieltä otettua liosta ja merkitse yksilöiden lukumäärä mikäli $\neq 10$.
- Mikäli matoja on alle 9; lisää pisaraan 3-5 µl matoja sisältävää nestettä ja laske uudelleen. Toista, kunnes matoja on vähintään 9.
- Mikäli matoja on yli 11, lisää pisaraan 3-10 µl M9 liuosta ja poista tämän jälkeen vastaava määrä nestettä. Toista kunnes matoja on enintään 11.

Yritä toimia nopeasti: Pienestä pisarasta haihtuu kosteutta ja M9 liuos väkevöityy, mikä aiheuttaa madoille osmoottista stressiä ja voi vaikuttaa altistettavien eliöiden terveydentilan kautta koetuloksiin. Haihtumista nopeuttaa mikroskoopin lämpö, joka voi jo sinällään olla merkittävä stressitekijä.

3.7 Kokeen lopetus

Kokeen lopettamiseksi - 72 tai 96 h kuluttua aloituksesta - lisää testikuoppiin 0,5 ml bengal rose -väriaineliuosta (0,3 g/l) ja siirrä kuoppalevyt 15 min ajaksi 80 °C:een lämpökaappiin. Kuumuuteen kuollessa matojen ruumiit oikenevat, mikä mahdollistaa pituuden mittaamisen. Madot säilyvät kylmiössä noin 4 viikkoa kokeen lopetuksesta. Ne voi myös pakastaa sellaisenaan.

3.8 Matojen erottelu sedimentistä

Siirrä kokeen lopetuksen jälkeen sedimentti 15 ml:n sentrifuugiputkiin käyttäen 6 - 4 ml Ludox-suspensiota ja Pasteurpipettiä. Ravistele Vortexilla ja sentrifugoi 5 min 500 g voimakkuudella. Madot siirtyvät supernatanttiin (kelluvat), joka dekantoidaan toiseen astiaan. Toistetaan kunnes vähintään 80 % kokeen alussa lisätyistä madoista on saatu eroteltua, kuitenkin vähintään 3 kertaa. Madot voidaan erotella Ludoxista pienisilmäisen suodatinkankaan avulla (mieluiten 5 ja 10µm, 50 µm suodattimella voidaan erotella kohtuullisen luotettavasti J3 -kehitysvaiheen ja sitä kehittyneemmät yksilöt).

3.9 Tulosten mittaaminen ja laskenta

Käytä matojen mittaamiseen ja laskemiseen mitta-asteikolla varustettua käänteismikroskooppia ja planktonilaskentakenna. Mikroskoopin mitta-asteikon voi tarkistaa mitta-asteikollisen objektilasin avulla. Ennen laskemista matojen määrää voi arvioida mikroskoopin avulla. Varsinkin 96 h kokeessa negatiivisen kontrollin madot (jopa >1000 kpl /kuoppa) kannattaa laskea kahdessa erässä.

Pituuskasvu (Growth)

Pituuskasvu = $BL - BL_{J1}$, missä BL = madon pituus (etu)päästä takapäin (ns. hännän) kärkeen ja BL_{J1} = kokeeseen otettujen matojen keskipituus

Sukukypsyys (Fertility)

Sukukypsyyden määritelmänä on munien näkyminen madon sisällä (gravid). Nestefaasissa kasvatetuista madoista sukukypsiä ovat tavallisesti yli 1200 μm pitkät yksilöt. Sedimentissä madot kasvavat yleensä hitaammin ja saavuttavat sukukypsyyden pienempinä, usein jo 1000 μm :n pituisina.

Sukukypsien yksilöiden osuus lasketaan suhteessa kokeen alussa lisättyihin yksilöihin. Kokeen alussa kuolleita (J1-matoja) ei lasketa mukaan.

$$\text{Sukukypsyys \%} = \{NG / (NT - NM)\} * 100$$

missä:

NG = sukukypsien yksilöiden lukumäärä (number of gravid)

NT = kokeen alussa lisättyjen yksilöiden lukumäärä poislukien kokeen alussa kuolleet (number of test organisms)

NM = urosten lukumäärä (number of males)

Lisääntyminen (Reproduction)

Jälkeläisten lukumäärä lasketaan suhteessa kokeen alussa lisättyihin yksilöihin. Kokeen alussa kuolleita (J1-matoja) ei lasketa mukaan.

$$\text{Lisääntyminen} = NO / (NI - NM)$$

missä:

NO = matojen lukumäärä kuopassa (number of offspring)

NI = kokeen alussa lisättyjen yksilöiden lukumäärä (number of introduced test organisms)

NM = urosten lukumäärä (number of males)

Tulosten raportointi

Rinnakkaisista näytteistä lasketaan keskiarvo ja keskihajonta. Tulokset ilmaistaan inhibitioprosentteina suhteessa nollakontrolliin.

Inhibitio % = $100 - \frac{XA}{XC} * 100$

Missä XA = näytteen parametri (kuten pituuskasvu) ja XC = nollakontrollin parametri

Viitteet

Alvarez, A.O., Jager, T., Kooijman S.A.L.M. & Kammenga, J.E. 2005: Responses to stress of *Caenorhabditis elegans* populations with different reproductive strategies. – *Functional Ecology* 19: 656-664.

ISO 2006: (International Organization for Standardization) Water quality - Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). - Standardiluonnos ISO/TC 147/SC 5 N 0576. 25.8.2006.

Sochova, I., Hofman, J. & Holoubek, I. 2006: Using nematodes in soil ecotoxicology. *Environment international* 32: 374-383.

Sulston, J.E.; Hodkin, J. 1988: The nematode *Caenorhabditis elegans*, s. 588-590. -Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Stiernagle, T. 2007: Maintenance of *C. elegans*. *Caenorhabditis Genetics Center*, University of Minnesota, Minneapolis, USA. Viitattu 20.10.2007.

http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf

Traunspurger, W., Bergtold, M., & Goedkoop, W. 1997: The effects of nematodes on bacterial abundance in a freshwater sediment. – *Oecologia* 112: 118-122.

Yan, J. 2004: Genetic studies of aging and longevity of model organisms. – The Science Creative Quaterly. Numero 3. Viitattu 16.1.2008. <http://www.scq.ubc.ca/genetic-studies-of-aging-and-longevity-in-model-organisms/>

Suosittelavaa kirjallisuutta

ASTM E2172-01 Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity Tests with Nematode *Caenorhabditis elegans*.

Stiernagle, T.: Maintenance of *C. elegans*. Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, Minneapolis, USA Elektroninen julkaisu.

http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf