

Pro gradu –tutkielma

Kadmiumaltistuksen havaitseminen *Hydropsyche pellucidula* -vesiperhostoukilla (Trichoptera: Hydropsychidae) hyperspektrikuvantamisen ja kidusvaurioiden avulla

Henna Ruuth



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

7.6.2017

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

RUUTH HENNA, J.: Kadmiumaltistuksen havaitseminen *Hydropsyche pellucidula* - vesiperhostoukilla (Trichoptera: Hydropsychidae) hyperspektrikuvantamisen ja kidusvaurioiden avulla
 Pro gradu: 32 s.
 Työn ohjaajat: FT Anna Karjalainen, FT Heikki Hämäläinen, FT Johanna Salmelin
 Tarkastajat: Dos. Matti Leppänen, FT Anna Karjalainen
 Kesäkuu 2017

Hakusanat: bioindikaattori, melaniini, morfologiset muutokset, raskasmetalli, trehaloosi

TIIVISTELMÄ

Metallipäästöt aiheuttavat vesistöissä eliöyhteisöille monenlaisia haittavaikutuksia, joita voidaan tutkia bioindikaattori- eli ilmentäjälajimenetelmin. Vesiperhostoukkia (Trichoptera) on käytetty virtavesien metallisaastumisen indikaattoreina, sillä ne kestävät metallialtistusta suhteellisen hyvin, mutta altistuksen seurauksena toukilla voi esiintyä morfologisia muutoksia, kuten kidusvaurioita tai pintakudoksen tummumista. Koska toisaalta vierasaineiden kudospitoisuusmittaus on usein työlästä ja toisaalta rakenteellisten muutosten arviointi altis subjektiiviselle harhalle, tavoitteenani oli kehittää objektiivinen ja kustannustehokas tapa selvittää metallialtistusta ja sen vaikutuksia pohjaeläimistä. Hyperspektrikuvantamisella (*hyperspectral imaging*, HSI) voidaan tutkia aineiden pitoisuusvaihteluja eri matriiseissa. Sitä hyödynnetään jo muun muassa maaperätutkimuksessa, maataloudessa ja elintarviketeollisuudessa. Tutkielmassani tutkin hyperspektrikuvantamisen soveltuvuutta kadmiumin havaitsemiseen *Hydropsyche pellucidula* -vesiperhostoukista. Toukkia altistettiin kadmiumkloridille 96 tuntia subletaaleissa pitoisuuksissa 9,9, 94,5, 880 ja 8996 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$. Toukat kuvattiin HSI-kameralla 500–665 nm aallonpituuksilla, niistä tutkittiin mikroskoopilla kidusten vauriot ja niiden Cd-pitoisuudet määritettiin. Kudosten ja altistusveden kadmiumpitoisuuden välillä oli positiivinen korrelaatio (Spearman, $n = 74$, $r = 0,93$, $p < 0,001$). Kidusvaurioita esiintyi kaikissa altistuspitoisuuksissa, mutta eniten pitoisuudessa 94,5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Kudosten kadmiumpitoisuudella ja kidusvaurioiden esiintymisellä ei havaittu yhteyttä (Spearman, $n = 74$, $r = -0,034$, $p = 0,774$). Hyperspektriaineiston perusteella toukkien hemolymfan trehaloosi- eli disakkaridipitoisuus korreloi negatiivisesti (Pearson, $n = 30$, $r = -0,43$, $p < 0,05$) kudosten kadmiumpitoisuuden kanssa. Takaruumiin tumma pigmentti, eumelaniini, runsastui (Pearson, $n = 30$, $r = 0,61$, $p < 0,001$) ja vaalea pigmentti, feomelaniini, väheni (Pearson, $n = 30$, $r = -0,62$, $p < 0,001$) kuvan spektrin kokonaisintensiteetin kasvaessa. Kudosten kadmiumpitoisuus nähtävästi vaikutti kokonaisintensiteettiin ja pigmenttisuhteisiin välillisesti, sillä kudospitoisuudella ei havaittu yhteisvaihtelua näiden muuttujien kanssa. Havaitut spektriirteiden muutokset toukissa viittaavat stressi- tai immuunireaktioihin altistuksen seurauksena. Hyperspektrikuvantaminen vaikuttaa lupaavalta menetelmältä kadmiumaltistuksen havaitsemiseen, mutta sen laajempi käyttöönotto vaatii sisäänajoa eri lajeilla ja metalleilla.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science
Aquatic Sciences

RUUTH HENNA, J.: Detecting cadmium exposure from *Hydropsyche pellucidula* (Trichoptera: Hydropsychidae) larvae using hyperspectral imaging and incidence of gill anomalies.

Master of Science Thesis: 32 p.

Supervisors: PhD Anna Karjalainen, PhD Heikki Hämäläinen, PhD Johanna Salmelin

Inspectors: Doc. Matti Leppänen, PhD Anna Karjalainen

June 2017

Key Words: bioindicator, heavy metal, melanin, morphological changes, trehalose

ABSTRACT

The effects of metal pollution on aquatic biota can be studied using bioindicator methods. Caddis larvae (Trichoptera) are widely used to indicate metal contamination of stream waters since they are relatively tolerant to metal exposure, but show morphological responses, such as gill anomalies or darkening of surface tissue. Because the analyses of tissue concentrations are often quite laborious and evaluation of morphological responses liable to subjective error, my goal was to develop an objective, cost-efficient method to detect metal exposure and its effects from benthic macroinvertebrates. Hyperspectral imaging (HSI) can be used to detect concentrations of elements and substances in different matrices. HSI has applications already in soil research, agriculture and food industry. In this study, I tested the applicability of HSI in detecting sublethal Cd exposure of *Hydropsyche pellucidula* larvae. Larvae were exposed to CdCl₂ for 96 hours, in Cd concentrations of 9.9, 94.5, 880 ja 8996 µg Cd l⁻¹. The measured endpoints were the Cd-concentration of larvae and occurrence of gill anomalies. All larvae were imaged using 500-665 nm visible light wavebands. The measured tissue Cd concentration of the larvae correlated significantly with the exposure concentration (Spearman, n = 74, r_s = 0.93, p < 0.001). Gill anomalies were present at all exposure concentrations, but were the most frequent at 94.5 µg Cd l⁻¹. However, there was no association between the incidence of gill anomalies and the Cd tissue concentration (Spearman, n = 74, r = -0.034, p = 0.774). Based on the HSI results, the trehalose concentration (a disaccharide) in larval hemolymph decreased with increasing Cd tissue concentration (Pearson, n = 30, r = -0.43, p < 0.05). Pigmentation of larval abdomen changed as the total intensity of images increased; the relative amounts of eumelanin, a dark pigment, increased (Pearson, n = 30, r = 0.61, p < 0.001) and pheomelanin, yellow pigment, decreased (Pearson, n = 30, r = -0.62, p < 0.001) with increasing total intensity. It seems that tissue Cd concentration affected total intensity and pigment proportions indirectly, since tissue concentration did not correlate with these variables. The observed changes in spectral features suggest stress or immune reactions followed by Cd exposure. Based on the results, hyperspectral imaging is a promising technique for detecting Cd exposure from *H. pellucidula*, though more research with different species and metals is needed.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. TUTKIMUKSEN TAUSTA	6
2.1. Metallit vesistökuormittajina.....	6
2.2. Metallien aiheuttamat vaikutukset eläimiin	7
2.3. Vesistövaikutusten mittaaminen.....	9
2.4. Hyperspektrikuvantamisen sovellukset.....	11
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	12
3.1. Koetoukkien keruu ja käsittely.....	12
3.2. Altistuskoe.....	12
3.3. Numeeriset analyysit	14
3.4. Spektriaineiston käsittely	14
4. TULOKSET	16
4.1. Altistuskokeen olosuhteet.....	16
4.2. Kidusvauriot	18
4.3. Kuvantamistulokset.....	19
5. TULOSTEN TARKASTELU	22
5.1. Kidusvauriot	22
5.2. Hyperspektrikuvantamisella havaitut piirteet.....	24
5.3. Yhteenveto.....	26
Kiitokset	27
Kirjallisuus	29

Liite 1. Toukka-aineisto

1. JOHDANTO

Euroopan unionissa astui vuonna 2000 voimaan vesipolitiikan puitedirektiivi (2000/60/EU). Yhtenä direktiivin tavoitteista on, että kaikkien jäsenvaltioiden pintavedet saavuttavat hyvän tilan viimeistään vuoteen 2027 mennessä. Vesistöjen tilaa arvioidaan veden fysikaalis-kemiallisten ja biologisten piirteiden perusteella, ja tila määräytyy huonomman mukaan. Vesistöjen tilaa voivat heikentää esimerkiksi raskasmetallipäästöt, joita vapautuu vesistöihin monista lähteistä, mutta erityisesti kaivosteollisuudesta (Byrne 2012). Metallit voivat aiheuttaa monenlaisia muutoksia vesiekosysteemeissä tappamalla kaloja ja selkärangattomia tai vaikuttamalla lajien lisääntymiseen, elintoimintoihin tai käyttäytymiseen (esim. Hellawell 1983, Hilty & Merenlender 2000). Vesinäytteenottoon perustuvilla kemiallisilla analyyseillä voidaan havaita vedessä esiintyvät yhdisteet ja niiden pitoisuudet, mutta ne eivät erottele eläimille saatavilla olevaa osuutta tai mittaa vaikutusta eliöissä (Bae & Park 2014).

Suurien vedenlaatumittausten rinnalle on kehitetty bioindikaattorimenetelmiä, joissa esimerkiksi indikaattori- eli ilmentäjälajien vaste tiettyyn ympäristötekijään, kuten jonkin raskasmetallin pitoisuuteen tunnetaan. Siten kyseisen lajin vasteita tutkimalla voidaan päätellä niiden kokemaa altistusta elinympäristössään. Pohjaeläimiä käytetään laajasti kuvaamaan elinympäristönsä tilaa (Hilty & Merenlender 2000). Niillä on merkittävä rooli ekosysteemien ravintoverkoissa, sillä ne ovat monien vedessä ja maalla elävien lajien ravintoa, ja ne kierrättävät siten ravinteita näiden ekosysteemien sisällä ja välillä (esim. Covich ym. 1999, Macadam & Stockan 2015). Siksi esimerkiksi metallialtistuksen seurauksena tapahtuvilla muutoksilla pohjaeläinten lajikoostumuksessa tai runsaudessa voi olla kauaskantoisia, epäsuoria vaikutuksia myös ekosysteemeissä laajemmin. Myös vesiperhostoukkien morfologisia muutoksia voidaan käyttää altistumisen mittarina. *Hydropsyche* –vesiperhostoukilla näitä muutoksia ovat ruumiin vatsapuolen kidusten tummuminen ja vaurioituminen sekä takaruumiissa sijaitsevien, ionitasapainon ja osmoosin säätelyyn osallistuvien anaalipapillien tummuminen, joita voi esiintyä esim. kloori- tai metallialtistuksen seurauksena (Camargo 1991, Vuori 1994, Vuori & Kukkonen 1996, 2002). Bioindikaattorimenetelmien heikkoutena on usein kuitenkin niiden työläys, sekä varsinkin morfologisten vasteiden osalta alttius subjektiiviselle harhalle (Toivanen & Närkki 2013, Salmelin ym. 2015). Esimerkiksi surviaissäskitoukkien suosien epämuodostumia käytetään indikoimaan elinympäristön saastumista. Salmelin ym. (2015) havaitsivat surviaissäskitoukkien vauriotulkinnoissa huomattavia eroja kokeneidenkin arvioijien välillä, etenkin, jos vauriot ovat laadullisia, kuten hampaan kuluminen, eivätkä numeerisia, kuten hampaan puuttuminen. Siten tutkimusten keskinäinen vertailtavuus ja tulosten tulkintavarmuus voivat heiketä oleellisesti (Salmelin ym. 2015).

Subjektiivisuuden aiheuttamaa epävarmuutta voidaan vähentää kehittämällä objektiivisia ja automatisoituja mittaumenetelmiä. Hyperspektrikuvantamisella (*hyperspectral imaging*, HSI) voidaan mitata eri alkuaineiden ja yhdisteiden pitoisuuksia erilaisissa matriiseissa (Asuncion ym. 2011, Antonucci ym. 2012, Mortimer ym. 2014). Menetelmä perustuu siihen, että eri aineet heijastavat ja absorboivat sähkömagneettisen säteilyn aallonpituuksia kukin omalla, leimallisella tavallaan. Menetelmässä tutkimuskohde kuvataan usealla eri aallonpituudella, ja saatu spektriaineisto voidaan yhdistää kuvaksi. HSI-menetelmää sovelletaan laajasti muun muassa maa- ja metsätaloudessa sekä geologiassa, missä sillä on esimerkiksi kartoitettu maaperän metallipitoisuuksia (Asuncion ym. 2011, Antonucci ym. 2012) ja yksisolujen eliöiden vierasainekuormitusta (Mortimer ym. 2014). Menetelmän etuja ovat sen tarkkuus, nopeus ja monikäyttöisyys, ja sitä voidaan käyttää sekä yksittäisten, pienten näytteiden analysointiin, että suurten alueiden tutkimiseen ilmasta käsin.

Tähänastisten sovellusten monipuolisuuden perusteella HSI myös tarjolla yhdeksi mahdolliseksi vesistöjen tilanarvioinnin työkaluksi. Hyperspektrikuvantaminen mahdollistaa muun muassa vesikasvillisuuden kartoittamisen ilmasta käsin, esimerkiksi tutkittaessa vieraslajien levittäytymistä tietyllä alueella (Everett ym. 2011). Menetelmän toimivuutta pohjaeläinten kadmiumaltistuksen havaitsemiseen yhdessä kidusvaurioiden esiintymisen kanssa on jo aiemmin alustavasti tutkittu (Salmelin ym. 2016). Kokeessa altistettiin kadmiumille yhteensä 132 *Hydropsyche pellucidula* -toukkaa pitoisuuksissa 0, 1, 10 ja 100 $\mu\text{g l}^{-1}$, ja toukkien spektriipirteet analysoitiin. Tuloksissa saatiin viitteitä siitä, että Cd-altistuksessa olleiden toukkien selkäpuolen pehmeiden kitiiniosien spektriominaisuudet heijastelivat toukkien tummumista. Salmelinin ym. (2016) mukaan kadmiumin kertymisessä toukkien kudoksiin oli paljon yksilöllistä vaihtelua, joten toukkien yksilökohtainen analysointi olisi ollut tärkeää. Myös mm. toukkien asennon ja niiden kuvausmenetelmän vakioinnin todettiin vaativan vielä parantamista. Muun muassa näihin kehityskohtiin pyrin tässä pro gradu -tutkielmassa vastaamaan.

Tutkielmassani selvitin hyperspektrikuvantamisen edellytyksiä toimia työkaluna kadmiumaltistuksen havaitsemisessa pohjaeläimistä. Tutkimuslajina käytettiin siiviläsirvikkäisiin (Trichoptera: Hydropsychidae) kuuluvan *Hydropsyche pellucidula* -vesiperhosen toukkia, jotka on todettu suhteellisen kestäviksi metallialtistuksen suhteen. Tutkimuskysymykset ovat seuraavat: 1) Ilmentävätkö hyperspektrikuvantamisella havaitut piirteet vesiperhostoukkien kokonaiskadmiumpitoisuutta? 2) Syntykö toukille annosvasteisuutena ilmeneviä morfologisia muutoksia kuten kidusvaurioita? 3) Onko hyperspektrikuvantamisen avulla mahdollista estimoida toukkien kudosten kadmiumpitoisuutta? Mikäli spektriipirteet muuttuvat kadmiumaltistuksen seurauksena, spektriipirteiden muutoksen perusteella voisi olla mahdollista ennakoida kadmiumaltistusta luonnossa jo ennen kuin se aiheuttaa morfologisia vaurioita. Jos menetelmä soveltuu raskasmetallien havaitsemiseen toukista ja annosvasteisuutta esiintyy altistuksen ja tutkittujen vasteiden välillä, sillä on potentiaalia kustannustehokkaaksi ja nopeaksi menetelmäksi vesiekosysteemien metallikuormituksen havaitsemiseksi jo sen varhaisessa vaiheessa.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1. Metallit vesistökuormittajina

Ihminen muuttaa jokia ja järviä vastaamaan energiantuotannon, teollisuuden ja asutuksen tarpeita. Asutus, maanviljely ja teollisuus ovat pitkälti keskittyneet vesistöjen äärelle, ja siten myös niistä aiheutuneet päästöt ovat päätyneet yleensä vesistöihin (Allan & Castillo 2007). Pistekuormitusta aiheuttavat yksittäiset päästölähteet, kuten teollisuuslaitokset. Vuonna 2014 Suomen kaivos- ja louhostoiminnan aiheuttamiksi vesistöpäästöiksi arvioitiin noin 15,5 miljoonaa kuutiometriä jättevettä ja metallituoteteollisuuden vastaaviksi päästöiksi 0,6 miljoonaa kuutiometriä (Suomen ympäristökeskus 2015). Näistä toiminnoista vapautunut jätevesi sisälsi muun muassa rautaa ja raskasmetalleja (Taulukko 1). Kadmiumia, elohopeaa ja lyijyä vapautuu jätevesiin eniten metallien valmistuksen yhteydessä. Jätevedet johdetaan yleensä puhdistusprosessien kautta vesistöihin. Prosesseissa niihin voi jäädä pitoisuusjäämiä, jolloin vesistöjen eläimet voivat altistua haitallisille pitoisuuksille erilaisia yhdisteitä. Nykyään teollisuuslaitosten jätevesien puhdistus on melko tehokasta, mutta etenkin menneinä vuosikymmeninä puhdistus on ollut puutteellista tai puuttunut kokonaan (Ratia ym. 2012).

Taulukko 1. Metalliteollisuuden ja kaivos- ja louhustoiminnan aiheuttamat kokonaismetallipäästöt Suomen vesistöihin vuonna 2014 (Suomen ympäristökeskus 2015).

	jätevettä (1000 m ³)	tonnia										
		Cr	Fe	Ni	Co	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb	F
Kaivos- ja louhustoiminta	15 510	0	43	1	0,1	0,1	1,2	0,4	0,003	0	0	7
Metallien valmistus	199 668	1,6	70	67,5	1,7	1,6	2,9	0,2	0,033	0,002	0,2	28
Metallituoteteollisuus	596	0	1	0	0	0	0,2	-	0	-	0	1

Vesistöjen saastuminen voi vaikuttaa monella tavalla paitsi ekosysteemien toimintaan, myös suoraan ihmiseen. Erilaiset vesistöjä saastuttavat yhdisteet, kuten raskasmetallit, voivat pilata juomavettä ja haitata vesistöjen virkistyskäyttöä. Hallitsemattomia vesistöpäästöjä voi ilmetä muun muassa teknisten vikojen tai lisääntyvien sään ääri-ilmiöiden seurauksena, ja ne voivat aiheuttaa monenlaisia ongelmia vesiekosysteemeille. Ympäristö- ja terveysongelmien ehkäisemiseksi teollisuustoiminnoista syntyvää vesistökuormitusta pyritään säätämään lainsäädännöllä (Valtioneuvosto 2010, 2011, 2014).

Jos vesistö pääsee saastumaan, sen vaikutukset voivat olla kauaskantoiset. Vesistöihin päässeet metallit voivat varastoitua varsinkin hitaasti virtaavilla alueilla pohjasedimentteihin jopa vuosisadoiksi, ja niitä voi vapautua sedimenteistä veteen etenkin runsaan valunnan aikana, esimerkiksi kevättulvien yhteydessä (Byrne ym. 2012, Karjalainen ym. 2014). Teollisuudesta peräisin olevat yhdisteet voivat kulkeutua vesistöreittejä pitkin kauas päästölähteestä, ja ekosysteemin toipuminen päästöjen aiheuttamista muutoksista voi kestää kymmeniä vuosia (esim. Vuori 1995, Ratia ym. 2012).

2.2. Metallien aiheuttamat vaikutukset eläimiin

Kaikki metallit eivät ole automaattisesti myrkyllisiä eläimille, ja monet, kuten kupari ja rauta, ovat pieninä määrinä tarpeellisia hivenaineita. Suurina määrinä ympäristössä nekin voivat kuitenkin olla hyvin haitallisia elolliselle luonnolle. Eriyksen haitallisia metalleja ovat kadmium, lyijy ja elohopea, jotka on luokiteltu vaarallisiksi aineiksi valtioneuvoston antamassa vaarallisten aineiden asetuksessa, ja niiden määrää jättevesissä säädelään tiukasti (Valtioneuvosto 2010).

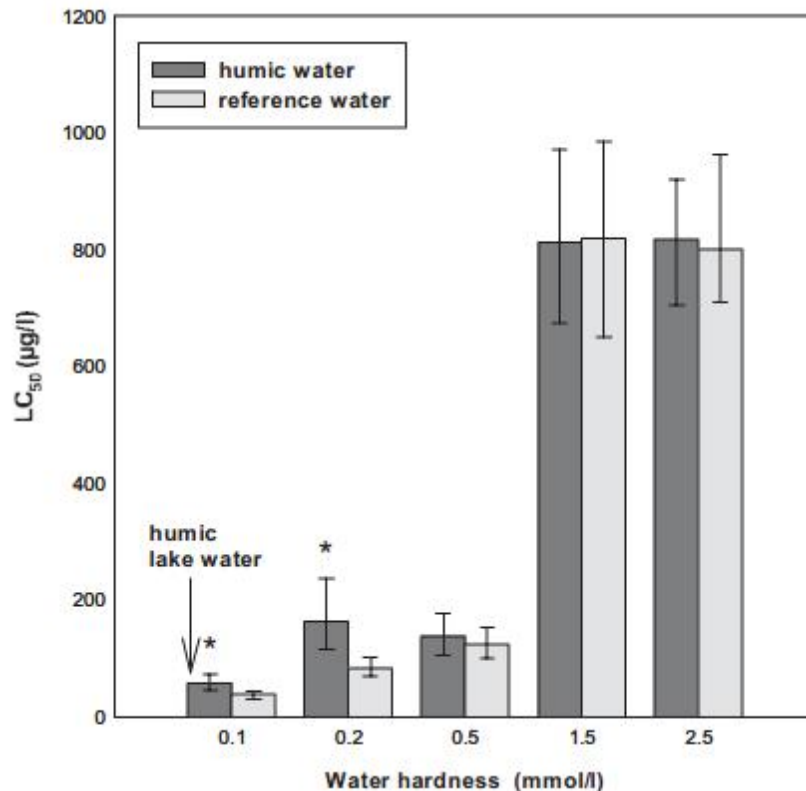
Metallialtistus voi aiheuttaa esimerkiksi kasvun hidastumista, kuolleisuutta ja morfologisia muutoksia (Hellawell 1983). Metallialtistus voi vaikuttaa myös yksilöiden käyttäytymiseen: altistuminen kadmiumille aiheutti muutoksia *Hydropysche* -vesiperhostoukkien aggressiivisuudessa ja pyyntiverkkojen puolustushalukkuudessa (Vuori 1994). Metallit voivat aiheuttaa yksinään erilaisia vaikutuksia kuin esiintyessään yhdessä muiden metallien kanssa. Song ym. (2014) selvittivät kadmiumin, kuparin ja raudan yhteisvaikutusta eräällä tokkolajilla (*Synechogobius hasta*). He totesivat, että kadmium absorboitui token maksa-, haima-, kidus- ja lihaskudoksiin tehokkaammin, jos kyse oli kuparin ja kadmiumin yhteisaltistuksesta. Kadmium ja kupari hidastivat yhdessä token kasvua enemmän kuin jompikumpi yksittäisenä altistuksena (Song ym. 2014). Metallit voivat toimia myös toistensa antagonisteina, eli yhdessä esiintyessään niiden aiheuttamat haitat ovat pienempiä kuin yksin esiintyessään (Byrne 2012, Walker ym. 2006). Joskus tietty vierasaine, esimerkiksi elohopea voi sellaisenaan olla suhteellisen harmiton eliölle, mutta aineenvaihduntaprosessien seurauksena se sitoutuu orgaaniseen ligandiin ja muuttuukin alkuperäistä yhdistettä toksisemmaksi (Walker ym. 2006). Metallien toksisuusvasteen voimakkuuteen vaikuttaa tietenkin olennaisesti annoksen suuruus. Ekotoksikologisissa kokeissa määritetään eri yhdisteille altistus- ja annos-vastesuhteita,

joiden tunnuslukuina käytetään usein LC₅₀- tai EC₅₀ -arvoja. LD₅₀ ja ED₅₀ kuvaavat sitä annosta, joka tappaa tai aiheuttaa tutkitun vasteen puolelle koe-eläimistä (*lethal/effective dose*), LC₅₀ ja EC₅₀ (*lethal/effective concentration*) puolestaan pitoisuutta, joka aiheuttaa koe-eläimissä puolet maksimivasteesta (Rand 1995).

Metallien aiheuttamien vaikutusten määrä ja laatu vesistöissä vaihtelee vuodenajan ja hydrologisten prosessien mukaan. Mm. kevättulvat ja runsaat sateet voivat vapauttaa sedimentoituneita metalleja pohjasta, jolloin myös eliöille saatavassa muodossa oleva eli biosaatava osuus kokonaisuudesta voi kasvaa (Rand 1995, Cain ym. 2004). Tämä vaikuttaa siten myös pohjaeläinten metallikuormaan. Tietty metallipitoisuus eliössä ei kuitenkaan automaattisesti tarkoita, että metalli on myrkyllinen kyseiselle lajille. Vesieliöiden herkkyys metalleille vaihtelee paitsi lajien välillä, myös saman lajin yksilöiden välillä. Herkkyys riippuu monien ympäristötekijöiden lisäksi eläinten fysiologiasta. Eroihin vaikuttavat mm. yksilön koko ja kehitysvaihe. Pohjaeläimet voivat olla tavallista alttiimpia metallikuormitukselle tietyssä kehitysvaiheessa, kuten munana tai vastakuoriutuneena, tai kehitysvaiheen vaihtumisvaiheessa (Vuori & Kukkonen 1996). Vuori & Kukkonen (1996) havaitsivat juuri nahkansa luoneissa *Hydropsyche* -toukissa suurempia kadmiumin ja kuparin kudospitoisuuksia kuin yksilöissä, jotka eivät olleet vielä siirtyneet seuraavaan kehitysvaiheeseen. Yksilön kehitysvaiheen muuttuessa metallien sisäänotto voi kasvaa joko muuttuneen metabolian vuoksi, tai koska pehmeämpi pintakudos edesauttaa metallien tehokkaampaa absorboitumista. Vaihtoehtoisesti myös kudosten suuri metallipitoisuus voi kiihdyttää nahanluontia (Vuori & Kukkonen 1996).

Pienikokoiset yksilöt sietävät kuormitusta usein heikommin kuin suuret yksilöt, koska pienillä yksilöillä on suurempi pinta-ala suhteessa eläimen massaan, jolloin ionit absorboituvat ja adsorboituvat niihin nopeammin (Poteat & Buchwalter 2014). Fysiologisten tekijöiden lisäksi esimerkiksi veden happamuus säätelee metallien myrkyllisyyttä, mutta suhde on monimutkainen (Byrne ym. 2012). Happamuus voidaan ilmoittaa veden pH-arvona eli vetyionikonsentraation kymmenkantaisen logaritmin vastalukuna. Happamuuden kasvu saa monet metallit, kuten lyijyn ja alumiinin muuttumaan toksisemmiksi; toisaalta esimerkiksi kadmiumin, nikkelin ja sinkin toksisuus voivat kasvaa pH:n noustessa (Schubauer-Berigan ym. 1993, Qu ym. 2013).

Myös humusaineet ja erityisesti veden kovuus vaikuttavat merkittävästi kadmiumin myrkyllisyyteen (esim. Penttinen 2010). Veden luontaisesti sisältämä liennut orgaaninen aines eli humus sitoo Cd²⁺ -ioneja itseensä, ja vähentää siten vapaan kadmiumin määrää vedessä. Siten kadmiumin biosaatava osuus on humuksisessa vedessä pienempi, ja sen kokonaispitoisuuden vedessä on oltava suurempi, jotta se on eliöille yhtä myrkyllistä kuin humuksettomassa vedessä (Penttinen ym. 1998, Penttinen 2010). Siten laboratorio-oloissa keinotekoisessa vedessä tehdyt kokeet eivät välttämättä anna todenmukaista kuvaa altistuksen vaikutuksista eliöissä, sillä useimmat pintavedet Suomessa ovat humuksisia. Ca²⁺ -ionit kilpailevat Cd²⁺ -ionien kanssa sitoutumispaikoista humuksessa. Pehmeässä (0,5 mmol l⁻¹) vedessä kalsiumia on vähemmän kuin kovassa, joten kadmium sitoutuu tehokkaammin humukseen, kun kilpailevia Ca²⁺ -ioneja on vähän. Kun veden kalsiumionien määrä kasvaa kovuuden lisääntyessä, kadmiumin sitoutuminen humukseen vähenee ja siten vapaiden kadmiumionien määrä kasvaa. Käytännössä tämä tarkoittaa, että pehmeässä, Suomen luonnonvesiä kovuudeltaan vastaavassa (0,5 mmol/l) vedessä kadmiumin LC₅₀-konsentraatio saavutetaan aiemmin humuksettomassa kuin humuspitoisessa vedessä (Kuva 1).



Kuva 1. Kadmiumin akuutti toksisuus (LC₅₀) 48 tunnin kokeessa vastasyntyneille *Daphnia magna* -vesikirpuille humuksisessa vedessä ja referenssivedessä eri vedenkovuuksissa (Penttinen 2010 mukaan).

Metallien aiheuttamien vaikutusten tunnistamista ja tutkimista vaikeuttaa se, että tietyn metallin vaikutus voi olla yksin erilainen kuin yhdessä muiden metallien kanssa. Yhteisvaikutustapoja on olemassa useita, mutta usein metallien katsotaan vaikuttavan keskenään additiivisesti, jolloin niiden yhteisvaikutus on suunnilleen sama kuin yksittäisten vaikutusten summa (Rand 1995, Walker ym. 2006).

Cain ym. (2006) tutkivat *Hydropsyche californica* -vesiperhoslajilla, onko populaation aiemmalla altistumisella vaikutusta kadmiumin sisäänottoon ja jakautumiseen soluissa, verrattuna populaatioon, joka ei ole altistunut kadmiumille aiemmin. He havaitsivat, ettei altistushistorialla ollut vaikutusta kadmiumin kertymisnopeuteen yksilöissä. Sen sijaan kadmiumin jakautumisessa solutasolla oli eroja: aiemmin altistuneilla yksilöillä selvästi suurempi osa (89 %) soluliman kadmiumista oli sitoutunut metallotioniinien kaltaisiin proteiineihin verrattuna aiemmin altistumattomiin yksilöihin (60 %). Altistumattomien yksilöiden soluissa suurempi osa kadmiumista oli sitoutunut metalleille herkkiin solun osiin (Cain ym. 2006).

2.3. Vesistövaikutusten mittaaminen

Vesistöjen metallikuormitusta voidaan selvittää erilaisin mittaamenetelmin suoraan vedestä, mutta ongelma on, että yhdisteiden kuormat ympäristössä eivät kuvaa niiden aiheuttamia vaikutuksia altistuneissa eliöyhteisöissä, sillä siihen vaikuttaa yhdisteen eliöille käyttökelpoisessa muodossa oleva osuus (Bae & Park 2014). Vedenlaatumittaukset ovat lisäksi usein työläitä, koska etenkin virtavesissä olosuhteet voivat vaihdella nopeasti, joten mittauksia olisi tehtävä useita kertoja eri vuodenaikoina. Esimerkiksi ekosysteemien hyvinvoinnin kannalta merkittävät pH:n poikkeuksellisen matalat tai korkeat arvot jäävät

helposti huomaamatta, jos mittauksia ei toisteta riittävän usein (Karjalainen ym. 2014). Automaattisesti mittaavien mittalaitteiden käyttö ja huolto vaativat usein erikoisosaamista.

Suorien vedenlaatumittausten rinnalla käytetään usein erilaisia bioindikaattorimenetelmiä, joilla saadaan tietoa siitä, onko kyseisessä vesistössä haitta-aineita eliöille saatavassa muodossa, ja niin paljon, että niillä on vaikutuksia eliöihin. Kun tunnetaan lajin vaste johonkin stressitekijään, kuten tietyn kemikaalin pitoisuuteen, vasteessa tapahtuvien muutosten perusteella voidaan arvioida kemikaalin pitoisuudessa tapahtunutta muutosta (Hilty & Merenlender 2000). Tällainen vaste voi olla esim. muutos kasvunopeudessa, kuolleisuudessa tai lisääntymisessä (esim. Hellawell 1983, Hilty & Merenlender 2000).

Vesiperhostoukkia on käytetty indikoimaan vierasainetäyttöä sekä laboratorio- että luonnonolosuhteissa. Siiviläsirvikkäisiin (Trichoptera: Hydropsychidae) kuuluva ukkoseulakas (*Hydropsyche pellucidula*) esiintyy runsaana virtavesissä ympäri Suomea (Vuori 2002). *Hydropsyche* -toukat (Kuva 2) muodostavat usein merkittävän osan koskien pohjaeläimistöä (Vuori 2002, Thorp & Covich 2010). Toukkien esiintyminen keskittyy pysyvätisiin kivikkoisiin koskiin, missä ravintoa ja happea on tasaisesti tarjolla virtauksen ansiosta. Siiviläsirvikkäiden toukat nimensä mukaisesti siivilöivät ravintonsa vedestä pyyntiverkkojen avulla ja käyttävät ravintonaan kasviplanktonia ja detrituspartikkeleita sekä jonkin verran eläinplanktonia (Andersen & Klubnes 1983, Vuori 2002). Ruokaillessaan toukat voivat altistua ravinnon sisältämille haitta-aineille. Altistumista voi tapahtua myös suoraan toukan ihon läpi vedestä tai sedimentistä. Toukat hengittävät pääasiassa niiden vatsapuolella olevien haarautuneiden, vaaleiden kidustupsujen kautta sekä jonkin verran ihon läpi. Lajin vuoden mittaiseen elinkiertoon kuuluu muna-, kotelo- ja aikuisvaiheen lisäksi viisi toukkavaihetta. Siten lajin voidaan olettaa ilmentävän elinympäristönsä tilaa pidemmällä aikavälillä (Andersen & Klubnes 1983, Vuori 2002).

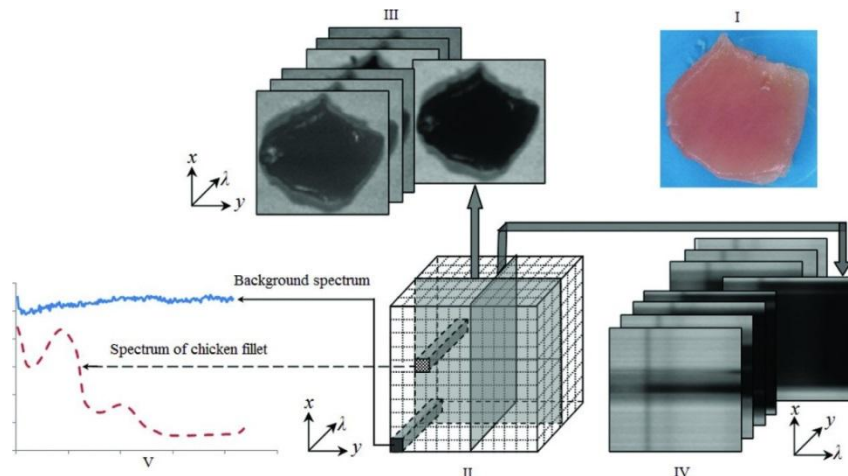
H. pellucidula sietää ympäristönsä likaantumista melko hyvin (Vuori 2002). Likaantumisen sietokykyä kuvaavassa indikaattoriarvoluokittelussa (asteikko yhdestä viiteen, missä yksi tarkoittaa hyvää ja viisi huonoa sietokykyä) laji saa arvon kaksi. Koska lajin elinympäristövaatimukset tunnetaan melko hyvin, laji on suhteellisen kestävä kuormituksen suhteen ja lajin yksilöitä on helppo käsitellä, ne täyttävät monia hyvän bioindikaattorin vaatimuksia (Hellawell 1983, Hilty & Merenlender 2000). Lajin kestävyys on oleellista yksilössä tapahtuvaa vastetta tutkittaessa, sillä silloin vasteen voimakkuutta eri altistuspitoisuuksissa voidaan seurata. Toukilla on tehty bioindikaattoritutkimuksia muun muassa veden kadmium-, kupari- ja alumiinipitoisuuden suhteen (Vuori 1996, Vuori & Kukkonen 1996, 2002). Saasteiden aiheuttamat mahdolliset morfologiset poikkeavuudet, kuten kidusten ja anaalipapillien tummuminen ja kidusten lyheneminen, ovat helposti nähtävissä (Camargo 1991, Vuori & Kukkonen 1996, Ratia ym. 2012). Metallialtistuskokeita on tehty myös muilla *Hydropsyche*-suvun lajeilla (Vuori 1994).



Kuva 2. *Hydropsyche pellucidula* -toukka hyperspektrikameralla kuvattuna. Kuva: Ilkka Pölönen.

2.4. Hyperspektrikuvantamisen sovellukset

Hyperspektrikuvantamisella on mahdollista havaita spektriirteiden perusteella kuvattavalle kohteelle vieraiden yhdisteiden esiintyminen ja niiden pitoisuuseroja. Menetelmässä tutkimuskohteesta otetaan kuva usealla eri aallonpituudella, ja jokaisella yhdisteellä on sille ominainen tapa heijastaa tai absorboida näiden aallonpituuksien valoa. Saatua pikseliaineisto yhdistetään kuvaksi, jolloin saadaan kolmiulotteista aineistoa kuvannetusta kohteesta (Antonucci ym. 2012, Mortimer ym. 2014) (Kuva 3). Menetelmällä on mahdollista havaita yhdisteiden esiintyminen ja pitoisuuseroja kuvattavassa kohteessa sen perusteella, miten kohteen spektriirteet muuttuvat.



Kuva 3. HSI-menetelmällä saatu kolmiulotteinen kuva, ”hyperkuutio” (hypercube). I = Kuvattava kohde. II = Hyperkuution rakenne. III = Eri aallonpituuksilla otettuja kuvia, hyperkuutio edestäpäin. IV = Hyperkuutio sivulta. V = Pikselien spektrikuvio. Mortimer ym. (2014) mukaan.

Hyperspektrikuvantaminen on osoittautunut erittäin monipuoliseksi menetelmäksi ja sillä on eri aloilla jo useita sovelluksia käytössä tai kehitteillä. Kuvantamista voidaan käyttää esimerkiksi geologiassa, maataloudessa, elintarviketeollisuudessa esimerkiksi maaperän metallipitoisuuksien, eliöiden vierasainekuormituksen ja elintarvikkeiden kontaminoitumisen selvittämiseen (Asuncion ym. 2011, Antonucci ym. 2012, Feng & Sun 2012, Mortimer ym. 2014).

Hyperspektrikuvantamisen hyödyntämistä on kokeiltu myös rannikkoalueiden kosteikkokasvillisuuden tyyppipitoisuuden selvittämisessä. Siciliano ym. (2008) selvittivät erään suolayrttilajin (*Salicornia virginica*) lannoitettujen ja lannoittamattomien kasvustojen spektriominaisuuksia näkyvän valon aallonpituuksilla. Lannoitettujen kasvustojen spektriirteet, kuten heijastuskyky erosivat selkeästi lannoittamattomista kasvustoista, yksittäisten lehtien osalta, ja ilmasta kuvatulla maisematasolla. Siten spektriirteiden muuttumisen perusteella voisi tulevaisuudessa olla mahdollista tehdä päätelmiä rannikkovesien rehevöitymisen tilasta kasvien tyyppipitoisuuden muutosta hyödyntämällä (Siciliano ym. 2008).

Aiempien sovellusten perusteella voidaan odottaa eri kadmiumpitoisuuksien aiheuttavan muutoksia toukkien spektriirteissä, kuten heijastuskyvyssä tai intensiteetissä. Sovelluksesta voisi olla hyötyä vesistöjen tilanarvioinnissa erityisesti siinä tapauksessa, jos spektriirteiden muuttuminen havaitaan pienemmissä altistus- tai kudospitoisuuksissa kuin missä altistus alkaa aiheuttaa toukille niiden esimerkiksi kasvua, kehitystä tai lisääntymistä haittaavia vaikutuksia. Menetelmän tehokkuuden kannalta olisi hyödyllistä, jos sillä havaitaan myös muiden yhdisteiden altistus tai niiden yhteisvaikutus.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Koetoukkien keruu ja käsittely

Altistuskokeen toukat kerättiin Konneveden Siikakoskesta (ETRS TM35-FIN, N 6943292 E 466267) toukokuussa 2015. Siikakoski laskee Konneveden länsipäästä Kellanvirtaa pitkin Liesveteen. Siikakoskea on käytetty aiemmin tutkimuksissa kontrollinäytealana, ja monissa laboratoriokokeissa koe-eläimet on kerätty Siikakoskesta (Vuori 1994, 1996, Ratia ym. 2012, Ratia ym. 2014) sen puhtauden vuoksi (ympäristöhallinnon HERTTA -tietokanta). Toukat kerättiin käsin kivien alapinnoilta n. 0,5 m syvyydestä kovasta virtauksesta. Tutkimukseen otettiin mukaan vain viidennen eli viimeisen vaiheen vesiperhostoukat, jotta altistettavat yksilöt olivat mahdollisimman samankokoisia. Toukat kuljetettiin Jyväskylän yliopiston laboratorioon elävinä 10 litran ämpäreissä, joissa oli jokivettä n. 7 l. Ämpärit ilmastettiin paristokäyttöisillä ilmastimilla, ja lämpötilan liiallinen nousu estettiin kuljettamalla ämpärit jäämurskalla täytetyissä vadeissa. Toukkia akklimoitiin koeolosuhteisiin 5-7 vrk ennen altistuskokeen toteuttamista ja Siikakosken vesi vaihdettiin vähitellen kokeessa käytettävään makeaan veteen. Akklimoinnin aikana toukkia ruokittiin kerran päivässä (akvaariokalojen Sera mikropan® -mikroruokahiutaleet). Ruokinta lopetettiin vuorokautta ennen kokeen alkua, millä pyrittiin varmistamaan toukkien suolen tyhjeneminen ennen altistuskokeen alkua.

3.2. Altistuskoe

Toukkia altistettiin laboratorio-oloissa kadmiumkloridille ($\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, puhtaus 99,995 %, Sigma-Aldrich) 4 vrk ajan (96 h). Toukkia altistettiin 500 ml dekanterilaseissa viidessä eri kadmiumin nimellispitoisuudessa: 0, 10, 100, 1000 ja 10 000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Jokaisessa pitoisuudessa (käsittely) tehtiin 3 toistoa, joissa kussakin oli 5 toukkaa ja altistettuja toukkia oli siten 15 yksilöä pitoisuutta kohden. Kokeen aloitus jaettiin kolmelle päivälle niin, että joka päivä aloitettiin yksi toisto joka pitoisuudesta.

Koe toteutettiin standardin SFS 5062 (1984) mukaan valmistetussa, ultrapuhtaaseen veteen tehdyssä keinotekoisessa makeassa vedessä. Vesi sekoitettiin neljästä kantaliuoksesta, joiden konsentraatiot olivat seuraavat: 294,00 $\text{g l}^{-1} \text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 123,25 $\text{g l}^{-1} \text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 64,75 $\text{g l}^{-1} \text{NaHCO}_3$, 5,75 $\text{g l}^{-1} \text{KCl}$. Näitä kantaliuoksia lisättiin 0,2 ml ultrapuhdistettua vesilitraa kohden, jolloin koeveden kokonaiskovuus (Ca + Mg) oli 0,5 mmol l^{-1} . Keinotekoinen makea vesi valmistettiin ja altistuskoe toteutettiin puhtaissa, vähintään 2 tuntia 10 % typpihapossa lionneissa ja MilliQ-vedellä huuhdelluissa astioissa. Vesi valmistettiin aina käyttöä edeltävänä iltana ja veden pH:n puskurointiin käytettiin 0,750 g l^{-1} MOPS-puskuria (3-[N-Morpholino]Propane-Sulfonic Acid, ultra pure/biotechnology grade, lot. no. 132802, GBiosciences). Puskurin lisäämisen jälkeen veden pH oli n. 5,8-5,9 ja säädettiin arvoon 6,0 1 M natriumhydroksidilla. Kadmiumkloridikantaliuokset lisättiin puskuroituun veteen seuraavana aamuna, ja pH:n pysyminen tavoitearvossa tarkistettiin ennen veden käyttöä altistuskokeessa.

CdCl_2 -kantaliuoksia valmistettiin 3: 1000, 10 000 ja 250 000 mg Cd l^{-1} , joista tehtiin laimennokset koevesiin. Laimenin kantaliuos saatiin pipetoimalla 2,5 ml 10 000 mg Cd l^{-1} kantaliuosta ja laimentamalla se keinotekoisella makealla vedellä lopputilavuuteen 25 ml. Altistusveden määrä oli 0,1 l toukkaa kohden. Yksi litra koevettä tavoitepitoisuudessa 10 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ saatiin pipetoimalla veteen 10 μl laimeinta kantaliuosta, ja 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ tavoitepitoisuus pipetoimalla 10 $\mu\text{l l}^{-1}$ 10 000 mg Cd l^{-1} kantaliuosta. 1000 ja 10 000 $\mu\text{g l}^{-1}$ tavoitepitoisuuksia varten pipetointimäärät väkevimmästä kantaliuoksesta olivat 4 $\mu\text{l l}^{-1}$ ja 40 $\mu\text{l l}^{-1}$. Valmistetun altistusveden määrä vaihteli eri päivinä 0,5 ja 2,5 l välillä johtuen kokeen porrastetusta aloituksesta ja vedenvaihtojen ajoittumisesta.

Valmista vettä sekoitettiin magneettisekoittimessa vähintään 15 min, ja jokaisesta vesierästä otettiin sekoittamisen jälkeen 50 ml vesinäyte kadmianalyysiä varten. Kokeen aikana dekantterilasien altistusvesi vaihdettiin tuoreeseen altistusveteen yhteensä neljä kertaa: 6, 24, 48 ja 72 tunnin kohdalla, ja ennen jokaista veden vaihtoa vanhasta koevedestä otettiin kadmianalyysiä varten 15 ml näyte. Kaikki vesinäytteet kestävöitiin 65 % suprapur-typipihapolla (2 pisaraa 15 ml:aan koevettä tai 6 pisaraa 50 ml:aan koevettä). Koeveden pH, happipitoisuus ja lämpötila mitattiin päivittäin vedenvaihtojen yhteydessä.

Altistuskokeen purku tehtiin aloitusjärjestyksen mukaisesti kolmen päivän aikana. Kokeen päätyttyä koeastiasta otettiin 15 ml vesinäyte, joka säilöttiin kuten muutkin vesinäytteet. Toukkien pinnalle adsorboitunut kadmium pyrittiin poistamaan huuhtelemalla toukkaa 50 ml:ssa keinotekoista makeaa vettä 20 s ajan, ja kuivaamalla toukka tämän jälkeen imusuppilossa vesi-imulla suodatinpaperin päällä (Whatman Filter Papers GF/F, \varnothing 55 mm tai Whatman Filter Papers 41, ashless, \varnothing 90 mm, CAT no. 1441-090). Toukat tainnutettiin vahvassa Samarin®-hedelmäsuolaporettablettiliuoksessa (10 ml keinotekoista makeaa vettä ja n. 1 g Samarina). Tainnutus kesti n. 4 min, minkä aikana toukka tutkittiin preparointimikroskoopilla. Toukkien kidusten mahdolliset vauriot kirjattiin ylös Ratian ym. (2012) ja Salmelinin ym. (2016) käyttämää kolmiportaista vaurioluokittelua mukailien: 1) kiduksen päärunko surkastunut, 2) päärunko tummunut, 3) tummumia yli 50 % sivuhaaroista (Kuva 4).

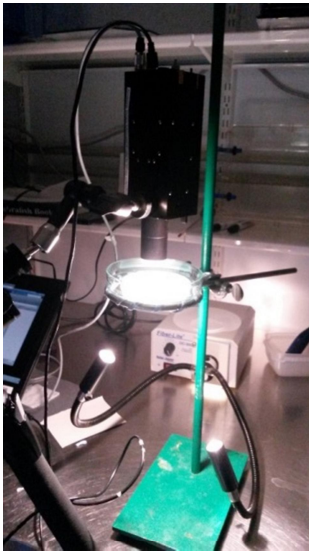


Kuva 4. Toukkien kidusvaurioiden tutkimisessa käytetty vaurioluokitus. A = terveet kidukset, B = vaurioluokat 1 ja 2, kiduksen päärunko surkastunut (punainen nuoli) tai tummunut (musta nuoli), C = vaurioluokka 3, vaurioita yli 50 %:ssa sivuhaaroista. Kuvat: Johanna Salmelin.

Mikroskopoinnin jälkeen toukka huuhdeltiin imusuppilossa vesi-imulla 20 ml:ssa keinotekoista makeaa vettä ja asetettiin sisähalkaisijaltaan 4,2 mm ja 5 cm pituiseen lasiputkeen (Glasröhren Duran, ulkohalkaisija 5mm, lasin paksuus 0,4 mm. Art. nro. 2011005) keinotekoiseen makeaan veteen kuvantamista varten. Toukat kuvattiin näin vedessä putkien sisällä hyperspektrikameralla vatsa- ja selkäpuolelta sekä molemmilta kyljiltä. Lasiputkella pyrittiin vakioimaan toukan asento mahdollisimman hyvin ja minimoimaan toukan vaurioitumista sekä nopeuttamaan kuvausprosessia (Kuva 5). Laitteiston aallonpituusalue oli 500-885 nm, ja spektriresoluutio < 1 nm.

Kuvaamisen jälkeen toukat pakastettiin merkityissä 15 ml muoviputkissa -20 °C:ssa. Sen jälkeen toukat kuivattiin vakuumikylmäkuivurissa pitoisuusanalyysiä varten n. 5 vrk ajan, minkä jälkeen ne punnittiin parafilmin päällä. Cd-analyysien esikäsittelyssä toukat liuotettiin kuningasvesiliuoksella, joka sisälsi 16 pisaraa kuningasvettä (n. 37 % HCl ja 65 % HNO₃,) (suprapur, pure analytical) ja ultrapuhdasta vettä (lopputilavuus 5 ml). Putkia pidettiin n. 60-asteisessa ultraäänivesihauteessa (Ultraäänilaite: 35 kHz Sonorex RK 512 CH) 5 min jaksoissa, joiden välissä putkista päästettiin paine ulos ja niitä sekoitettiin käsissä muutama sekunti, kunnes toukat liukenivat. Neste kaadettiin 15 ml

sentrifugiputkeen suodatinpaperin (Whatman filter papers 41, ashless, \varnothing 90 mm, cat. no. 1441-090) läpi ja näyte analysoitiin spektrometrillä (Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA), malli: Optima 8300, induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometri). Vesinäytteet analysoitiin samalla emissiospektrometrillä kuin toukkanäytteet. Kokeen aikana kuolleet toukat tutkittiin mikroskoopilla ja kuvattiin mahdollisimman pian kuoleman jälkeen. Yksi toukista kuoli 2 vrk ennen kuvauslaitteiston asennusta, joten toukkaa ei kuvattu sen säilyvyyden varmistamiseksi. Tämänkin toukan kidusvauriot tutkittiin ja toukka punnittiin ja pakastettiin.



Kuva 5. Hyperspektrilaitteiston asettelu toukkien kuvauksessa.

3.3. Numeeriset analyysit

Toukkien mikroskopointitarkastelun perusteella toukkakohtaisia kidusvaurioita tarkasteltiin sekä vaurioluokittain (1-3) että vaurioiden kokonaismäärinä kussakin käsittelyssä (toukkien lkm 15 per käsittely). Parametrittomalla Friedmanin varianssianalyysillä selvitettiin, oliko kidusvaurioiden määrässä eroja koetoistojen (3 koetoistoa) välillä. Testin perusteella tilastollisesti merkitsevää eroa ei havaittu, joten toukkia käsiteltiin toisistaan riippumattomina havaintoina kussakin käsittelyssä. Kidusanomalia- ja kudospitoisuusaineistojen normaalijakautuneisuus tarkistettiin Kolmogorov-Smirnovin testillä.

Altistuspitoisuus laskettiin vedenvaihtoajoilla painotettuna keskiarvona kaikkien vedenvaihto- ja altistuspitoisuuksien osalta. Toukkien koon vaikutusta kadmiumin kertymiseen ja kidusvaurioihin arvioitiin toukkien kuivapainon ja kudospitoisuuden, altistuspitoisuuden ja kidusvaurioiden välisellä korrelaatiolla. Koska aineisto ei ole normaalisti jakautunut, käytettiin parametritonta Spearmanin järjestyskorrelaatioanalyysiä. Toukka-aineisto kadmiumpitoisuuksien ja kidusvaurioiden osalta on liitteessä 1. Numeerista aineistoa käsiteltiin Microsoft Office Excel 2013 - ja 2016 -ohjelmilla. Tilastoanalyysit on tehty IBM[®] SPSS[®] Statistics 23 -ohjelmalla.

3.4. Spektriaineiston käsittely

Hyperspektrikuvantaminen perustuu eri yhdisteiden yksilöllisiin spektrin ominaispiirteisiin. HSI -menetelmässä tutkimuskohteesta otetaan kuva usealla eri aallonpituudella, ja jokaisella yhdisteellä on sille ominainen tapa heijastaa tai absorboida

näiden aallonpituuksien valoa. Saatu pikseliaineisto yhdistetään kolmiulotteiseksi kuvaksi (Antonucci ym. 2012, Mortimer ym. 2014) (Kuva 2).

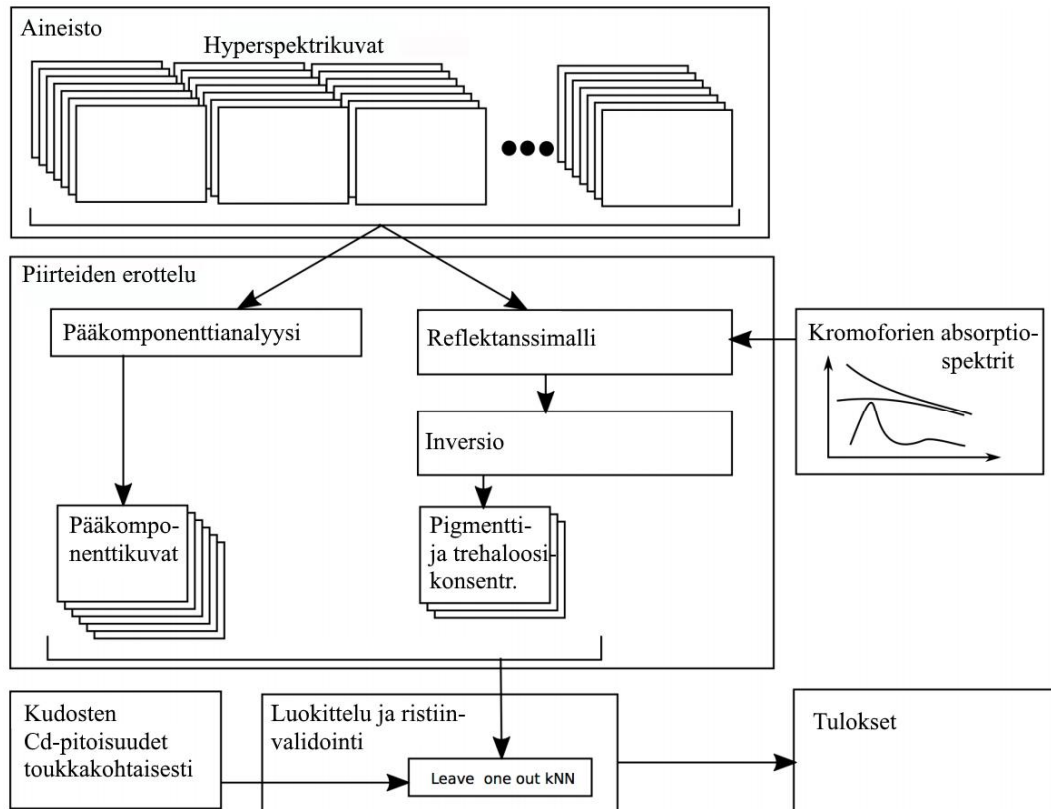
Toukkien kuvantamistulokset käsiteltiin Jyväskylän yliopiston tietotekniikan laitoksella FT Ilkka Pölösen toimesta. Toukkien selkäpuolelta rajattiin analyysiin mukaan takaruumiin neljä ensimmäistä jaoketta, koska ne olivat kaikilla toukilla tasaisesti painuneet lasiputken seinämää vasten, jolloin välissä ei ollut veden aiheuttamia heijastuksia, eikä niiden asennossa ollut vaihtelua. Kuvatusta spektriaineistosta valittiin jatkokäsittelyyn aallonpituudet 500–665 nm, joilla aineistossa esiintyi vähiten kohinaa. Kukin kuvattu pikseli voidaan ilmaista seuraavasti: $r_{x,y}(\lambda) = [r_{x,y}(\lambda_1), r_{x,y}(\lambda_2), \dots, r_{x,y}(\lambda_p)]^T$, missä r on diffuusirefleksiarvo, λ = aallonpituus ja p = aallonpituuksien lukumäärä (viite!). Spektrikuvantamisaineisto on kolmiulotteinen matriisi, joka koostuu eri pikseleistä ja niiden sisältämästä aallonpituusaineistosta:

$$R = \begin{bmatrix} r_{1,1} & \dots & r_{m,1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{1,n} & \dots & r_{m,n} \end{bmatrix}$$

Aineiston käsittelyä varten kolmiulotteinen rakenne puretaan listaksi: $R^i = [r_{1,1} \dots r_{m,n}]$, josta voidaan edelleen laskea aineiston keskiarvospektri. Kuvausaineistosta karsittiin pois ne toukat, joiden kuva oli alivalottunut tai tärähtänyt toukan liikahtamisen vuoksi (n=44), ja jatkoanalyysit (Kuva 6) toteutettiin jäljelle jääneiden 30 toukan aineistolla. Toukkakohtaisille keskiarvospektreille tehtiin pääkomponenttianalyysi (PCA), jossa tunnistetaan ja ryhmitellään eri pääkomponenteille samalla tavalla vaihtelevia muuttujia (Ranta ym. 2012).

Pääkomponenttianalyysin tulosten ymmärtämiseksi aineistoon sovellettiin yksinkertaista reflektiomallia, jolla pyrittiin erottelemaan kolmen *H. pellucidula* -toukissa oletettavasti esiintyvän kromoforin (eumelaniinin, feomelaniinin ja trehaloosin) suhteellisia osuuksia altistuksen jälkeen. Kromofori tarkoittaa molekyylin osaa, joka aiheuttaa molekyylin värin esim. absorboimalla tai heijastamalla valon aallonpituuksia. Eumelaniini aiheuttaa eläimillä tumman pigmentin ja feomelaniini vaalean (Simon & Peles 2010), trehaloosi puolestaan on hyönteisten hemolymfassa eli verinesteessä oleva hiilihydraatti (Elbein ym. 2003). Kromoforien spektrien ominaisuudet saatiin kirjallisuudesta (Sarna & Swartz 1988, Malferrari ym. 2014), ja mallin avulla näitä piirteitä verrattiin kadmiumille altistettujen toukkien spektriin. Kromoforien osuuksien sekä kokonaisintensiteetin yhteisvaihtelua kudospitoisuuksien kanssa tarkasteltiin Pearsonin korrelaatioanalyysillä. Tilastollisissa analyyseissä käytetty kokonaisintensiteetin ja kromoforien osuuksien yksikkö on au (*arbitrary unit*), jolla ei ole fysikaalista suuretta. Lukuja voi vertailla toisiinsa parametriluokan (esimerkiksi feomelaniinin) sisällä, mutta esimerkiksi feomelaniinin määrä ja eumelaniinin määrää ei voi suoraan verrata toisiinsa. Mahdollisia trendejä (kuten määrän nousu) parametriluokissa on mahdollista arvioida.

Kudosten kadmiumpitoisuuden taso estimoitiin mitatuista spektriin piirteistä. Kolmen lähimmän naapurin luokittelulla rakennettiin estimointimalli, joka hyödynsi pääkomponenttianalyysistä saatuja pääkomponentteja 3-9. Aineistoa käsiteltiin ja analyysit tehtiin Matlab 2016b -ohjelmalla.



Kuva 6. Spektriaineiston käsittelykaavio.

4. TULOKSET

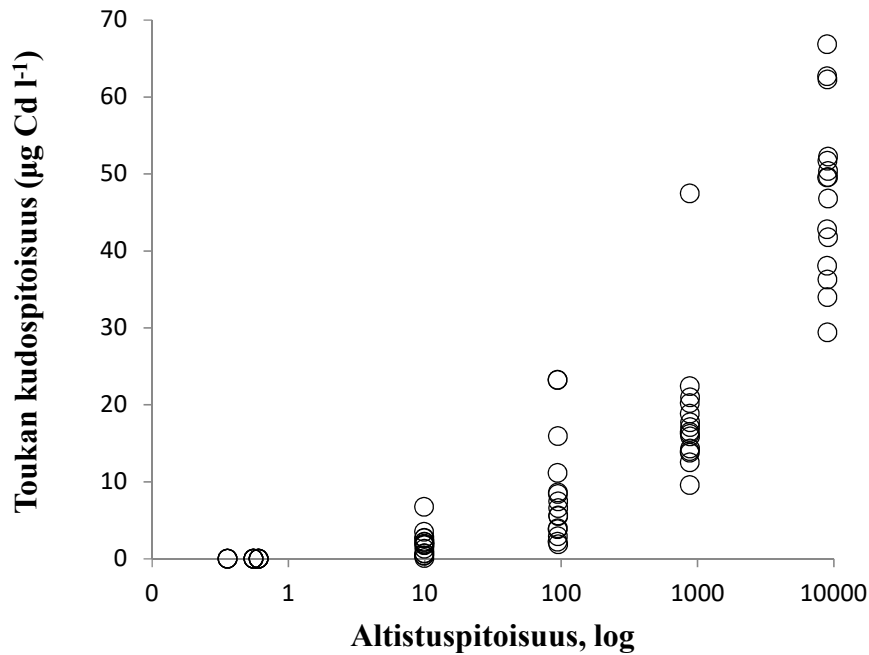
4.1. Altistuskokeen olosuhteet

Koeolosuhteet pysyivät tasaisina koko altistuksen ajan (Taulukko 2). Kokeen aikana veden pH:n vaihteluväli oli 5,80 – 6,17, veden lämpötilan 18,2 – 19,0 °C ja happisaturaation 97,6 – 102,0 %. Vedestä mitatut altistuspitoisuudet olivat kaikissa pitoisuuksissa tavoitepitoisuuksia pienemmät, ja erot olivat suurimpia suurimmissa altistuspitoisuuksissa. Kokeen aikana kuolleisuus oli pientä: 2 toukkaa kuoli kontrollikäsitellyssä ja yksi toukka altistuspitoisuudessa 880 µg Cd l⁻¹.

Taulukko 2. Altistuskokeen aikaiset vedenlaatutiedot (keskiarvo ± keskihajonta) ja toukkien keskimääräinen kuivapaino kussakin pitoisuudessa. Ylimmän rivin tiedot kuvaavat kokeen kontrollikäsitelyä, ja sen toteutunut kadmiumpitoisuus oli alle määrittäysrajan.

Altistuspitoisuus (µg Cd l ⁻¹)	Tavoitepitoisuus (µg Cd l ⁻¹)	pH	°C	O ₂ (%)	Kuivapaino (mg)
< 0,96	0,0	6,01 ± 0,08	18,7 ± 0,22	100,6 ± 0,56	12,4 ± 3,11
9,9 ± 1,15	10	5,98 ± 0,06	18,6 ± 0,16	100,7 ± 0,62	10,1 ± 2,31
94,5 ± 3,78	100	5,99 ± 0,04	18,7 ± 0,20	100,0 ± 1,05	13,1 ± 3,34
880 ± 16,36	1000	5,98 ± 0,03	18,7 ± 0,23	100,6 ± 0,53	11,3 ± 3,46
8996 ± 114,77	10 000	5,98 ± 0,06	18,5 ± 0,17	100,4 ± 0,60	11,9 ± 3,07

Altistusveden kadmiumpitoisuus ja toukkien kadmiumin kudospitoisuus korreloivat positiivisesti (Spearman: n = 74, ρ = 0,93, p < 0,001). Kudospitoisuuksissa oli enemmän hajontaa suurissa altistuspitoisuuksissa kuin pienissä (Kuva 7).

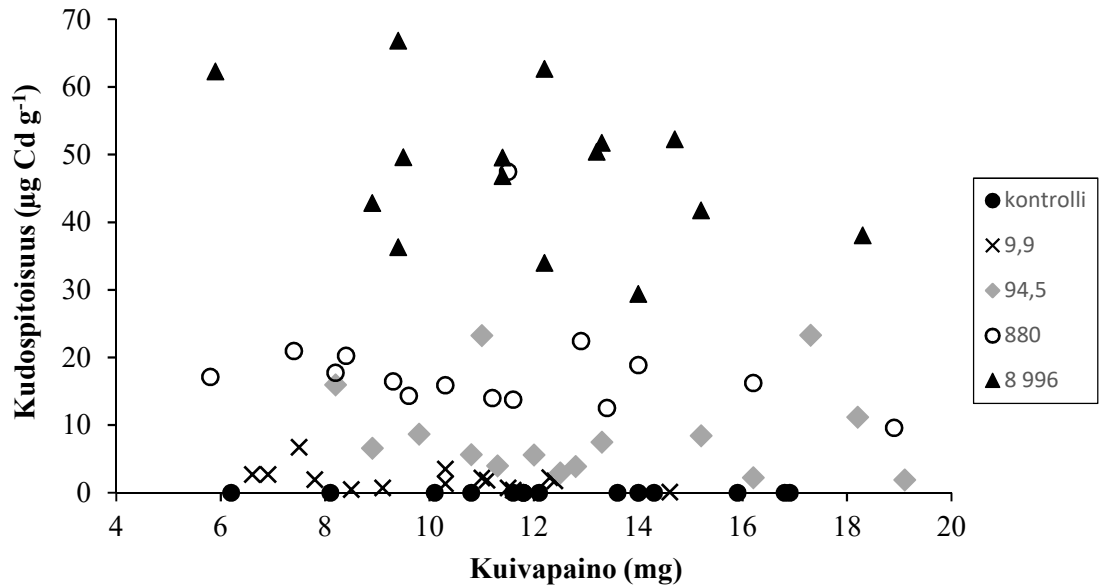


Kuva 7. Toukkien kudosten kadmiumpitoisuus ($\mu\text{g Cd g}^{-1}$) suhteessa logaritmiseen altistuspitoisuuteen ($\mu\text{g Cd l}^{-1}$).

Toukkien kuivapainot vaihtelivat keskimäärin välillä 5,8 ja 19,1 mg, eikä kuivapainoissa ollut tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyjen välillä (1-ANOVA, $F = 2,069$, $df = 4, 69$, $p = 0,094$). Toukkien kudosten kadmiumpitoisuus korreloi toukkien kuivapainon kanssa pienimmässä altistuspitoisuudessa (Taulukko 3). Muissa kudospitoisuuksissa tilastollisesti merkitsevää yhteisvaihtelua ei havaittu (Taulukko 3 ja kuva 8).

Taulukko 3. Kudosten kadmiumpitoisuuden ja toukkien kuivapainon väliset korrelaatiokerroimet ja p-arvot eri altistuspitoisuuksissa.

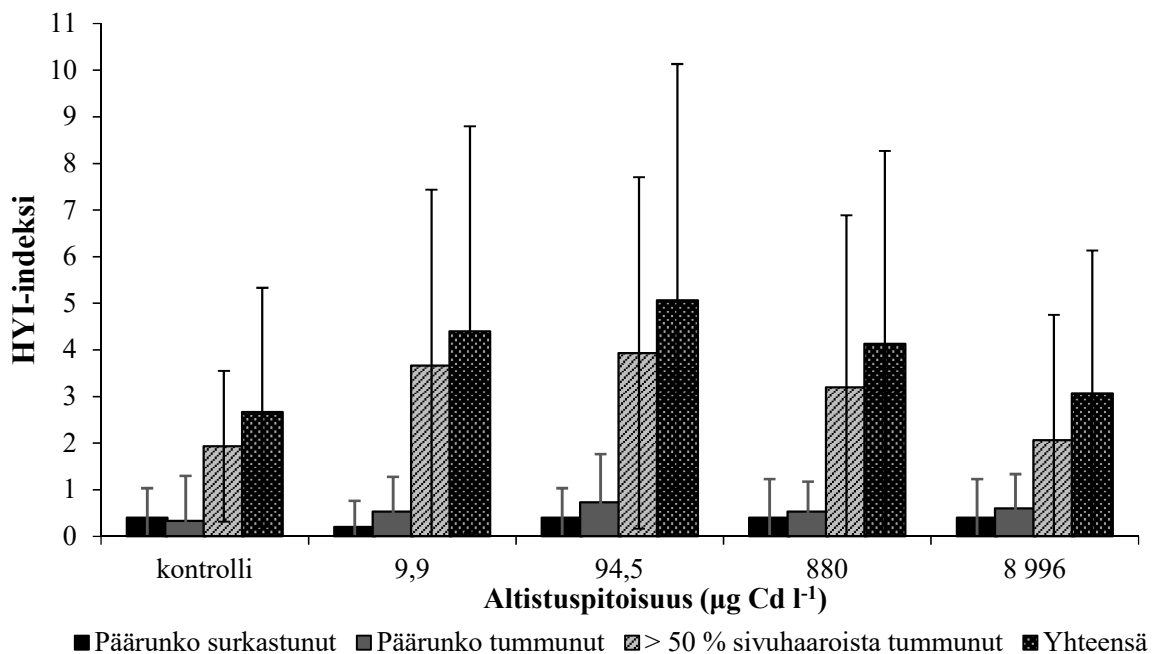
Altistuspitoisuus ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Spearman korrelaatiokerroin	p-arvo
9,9	-0,525	0,044
94,5	-0,236	0,398
880	-0,371	0,173
8996	-0,267	0,336



Kuva 8. Toukkien kudosten kadmiumpitoisuuden (kuivapainoon suhteutettuna) ja kuivapainon välinen suhde eri altistuspitoisuuksissa.

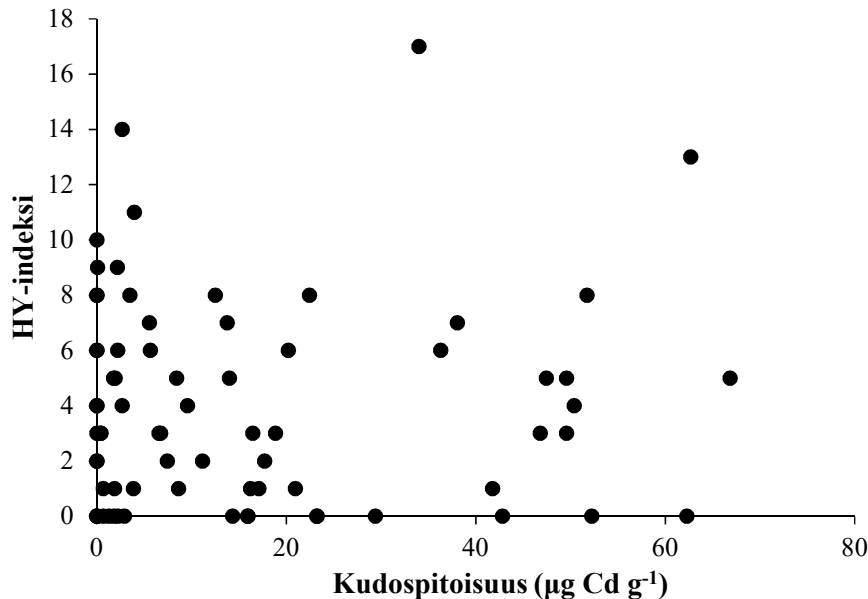
4.2. Kidusvauriot

Toukkien kidusvauriot olivat yleisiä: 76 %:lla kaikista toukista havaittiin yhden tai useamman luokan vaurioita. Keskimäärin toukkayksilöllä oli 3,9 vaurioitunutta kidustupsua, kontrollikäsitellyn toukat mukaan luettuna. Yleisin vauriotyyppi oli ohuiden sivuhaarojen tummuminen, jota havaittiin kaikissa altistuspitoisuuksissa eniten. Eniten vaurioituneita kidustupsuja oli toiseksi pienimmässä altistuspitoisuudessa 94,5 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$, jossa HY-indeksi oli 5,1 ja vähiten kontrollipitoisuudessa, jossa HY-indeksi oli 2,7. Pienimmässä altistuspitoisuudessa 9,9 $\mu\text{g l}^{-1}$ HY-indeksi oli 4,4, toiseksi suurimmassa altistuspitoisuudessa 880 $\mu\text{g l}^{-1}$ 4,1 ja suurimmassa altistuspitoisuudessa 3,1 (Kuva 9). Kidusvauriot eivät eronneet koetoistojen välillä (Friedmanin testi: $n = 25$, $X^2 = 0,277$, $df = 2$, $p = 0,871$).



Kuva 9. Havaitut kidusvauriot ja keskihajonnat vaurioluokittain eri pitoisuuksissa.

Toukkien kidusvaurioiden määrä (HYI) ei korreloinut kadmiumin altistus- eikä kudospitoisuuden kanssa (Taulukko 2, Kuva 10). Kadmiumin altistuspitoisuudella ei havaittu vaikutusta toukkien yhteenlaskettuihin kidusvaurioihin (Taulukko 2).



Kuva 10. Toukkien kidusvaurioiden lukumäärä (HY-indeksi) suhteessa kadmiumin kudospitoisuuteen. Kudosten Cd-pitoisuus on ilmoitettu suhteessa toukkien kuivapainoon.

Toukkien kuivapaino ei vaikuttanut kudosten kadmiumpitoisuuteen (Spearman, $r = -0,062$, $p = 0,597$). Kaikki kidusvaurioluokat korreloivat yhteenlaskettujen kidusvaurioiden kanssa, ja voimakkaimmin niistä korreloivat keskenään lievät vauriot (vaurioluokka 3) ja toukkien yhteenlasketut kidusvauriot (Spearman, $r = 0,952$, $p < 0,001$).

Taulukko 2. Altistuskokeen ja kidusvaurioiden (kunkin luokan vaurioiden lkm per toukka) keskinäiset Spearman-korrelaatiokertoimet ($n = 74$). Tilastollisesti merkitsevät tulokset on merkitty yhdellä ($p < 0,05$) tai kahdella tähdellä ($p < 0,001$). Kudosten Cd-pitoisuus on ilmoitettu suhteessa kuivapainoon.

	Altistuspitoisuus ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Kudospitoisuus ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Kidusvauriot yht.	Vaurio- luokka 1	Vaurio- luokka 2	Vaurio- luokka 3
Kudospit. ($\mu\text{g Cd g}^{-1}$)	0,929**	1				
Kidusvauriot yht.	-0,049	-0,034	1			
Vaurioluokka 1	-0,199	-0,215	0,422**	1		
Vaurioluokka 2	0,109	0,068	0,497**	0,132	1	
Vaurioluokka 3	-0,41	-0,025	0,952**	0,252*	0,309*	1

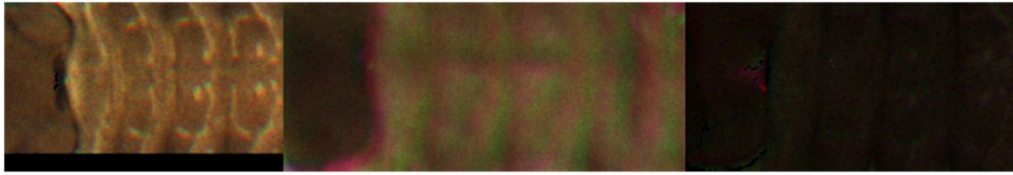
** $p < 0,001$

* $p < 0,05$

4.3. Kvantamistulokset

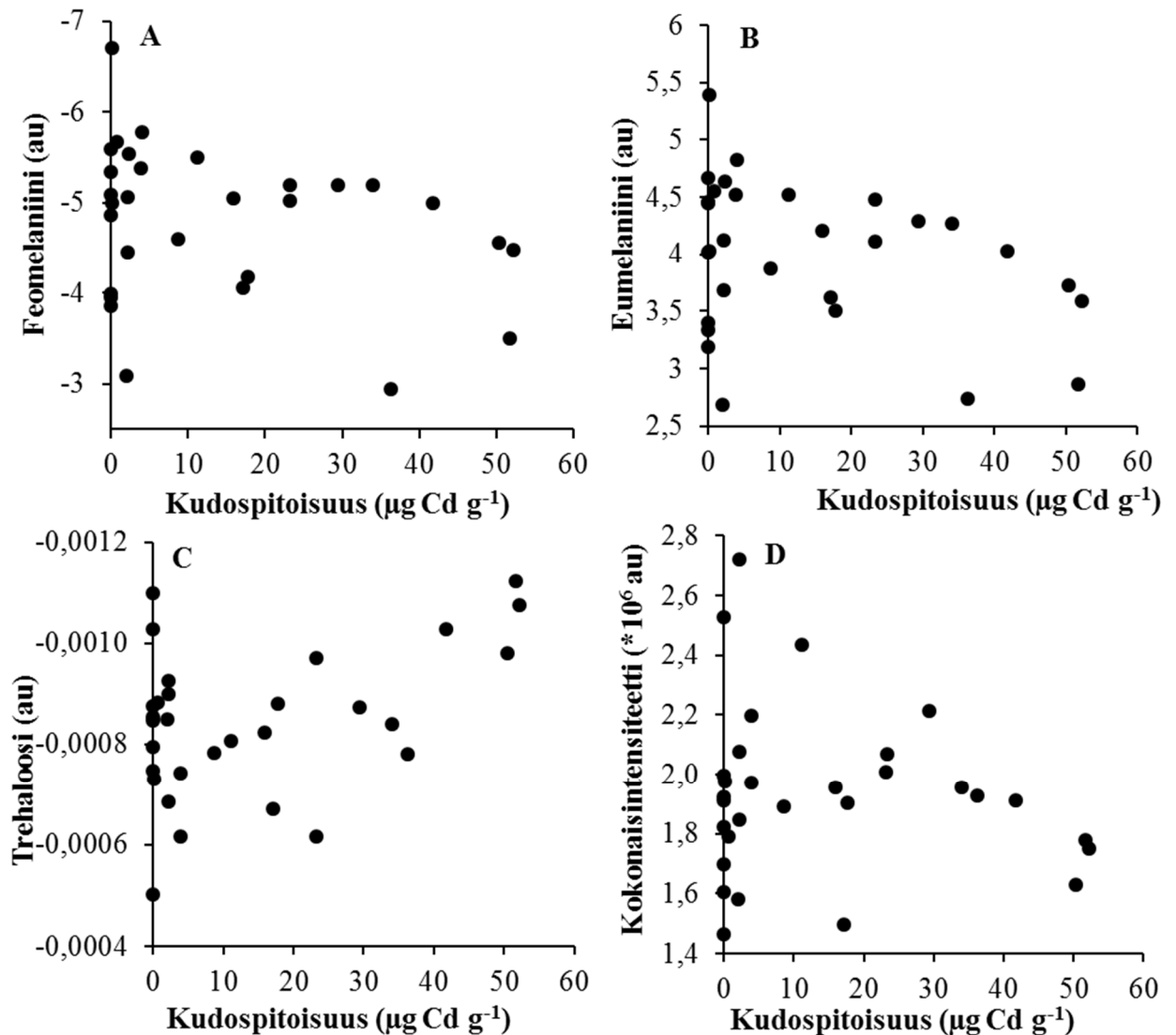
Yhtä kontrollipitoisuudessa kuollutta toukkaa lukuun ottamatta muut kokeen aikana kuolleet toukat kuvattiin HS-kameralla. Huonosti valottuneet kuvat ja kuvat, joissa toukat olivat liikkuneet, hylättiin (Kuva 11); yhteensä 44 yksilöä eli 60 % kaikista toukista. Siten käyttökelpoista spektriaineistoa saatiin vain 30 toukasta. Hylätyt toukat jakautuivat kaikkiin altistuspitoisuuksiin, mutta eniten toukkia hylättiin pitoisuuksista $880 \mu\text{g Cd l}^{-1}$

(12 yksilöä) ja $9,9 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ (10 yksilöä). Pitoisuuksista 8996 ja $94,5 \mu\text{g Cd l}^{-1}$ hylättiin kummastakin 8 toukkaa, ja kontrollista 6 toukkaa.



Kuva 11. Kolmesta kapeasta aallonpituudesta koostetut värikuvat toukan takaruumiin neljästä ensimmäisestä jaokkeesta selkäpuolelta. Vasemmalla onnistunut kuva, keskellä tähtänyt ja oikealla kuva, jonka valotus on epäonnistunut.

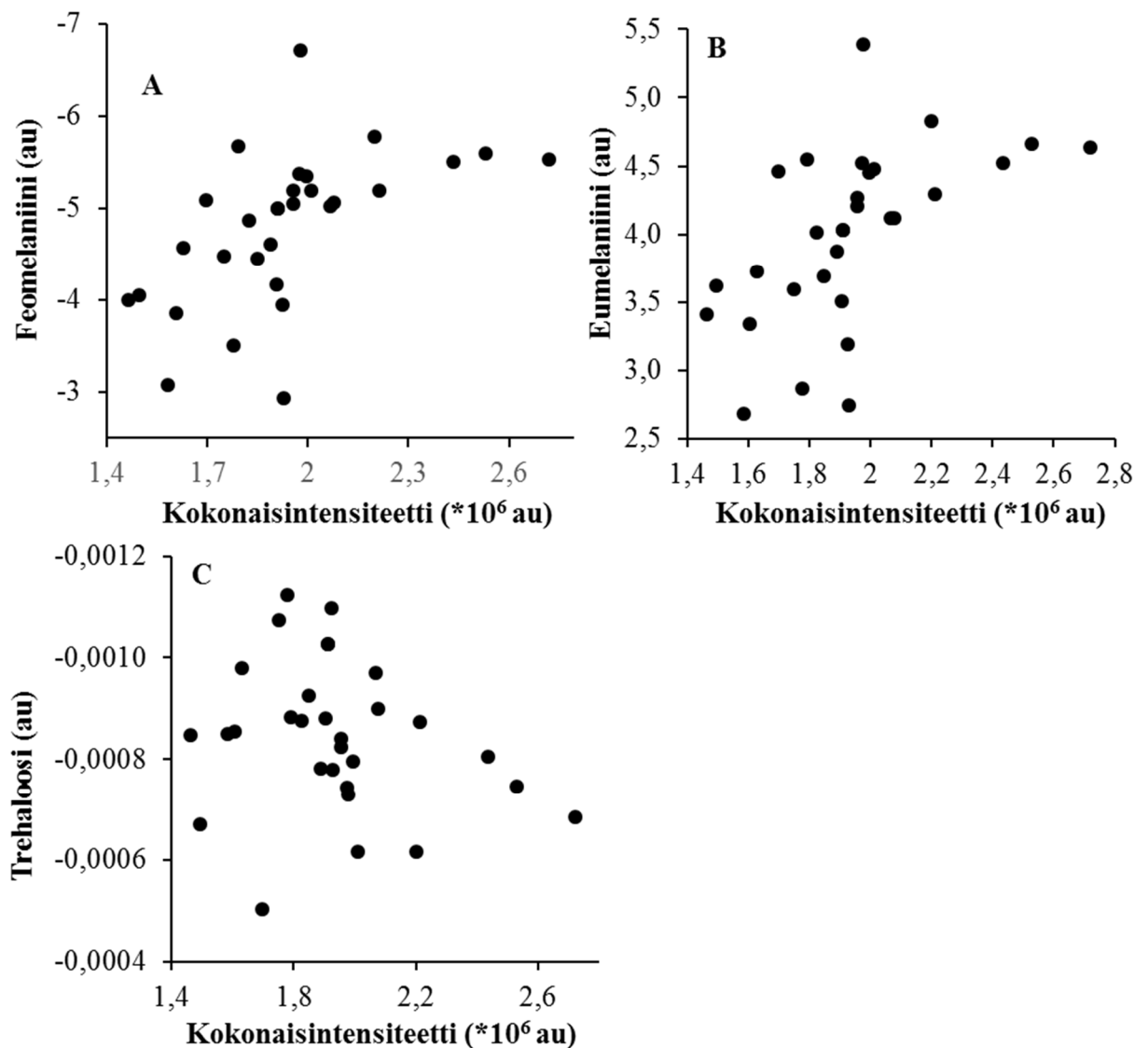
Tutkittaessa spektriirteiden yhteisvaihtelua suhteessa kudosten kadmiumpitoisuuteen, trehaloosilla havaittiin tilastollisesti merkitsevä negatiivinen korrelaatio kudosten kadmiumpitoisuuteen (Pearson: $n = 30$, $r = -0,43$, $p = 0,017$) (Kuva 12c). Feomelaniinin suhteellinen määrä ei korreloinut kudosten kadmiumpitoisuuden kanssa (Pearson: $n = 30$, $r = -0,32$, $p = 0,072$) (Kuva 12a), kuten ei eumelaniininkaan osuus (Pearson: $n = 30$, $r = -0,35$, $p = 0,056$) (Kuva 12b), Kaikkiaan korrelaatiot ovat hyvin heikkoja.



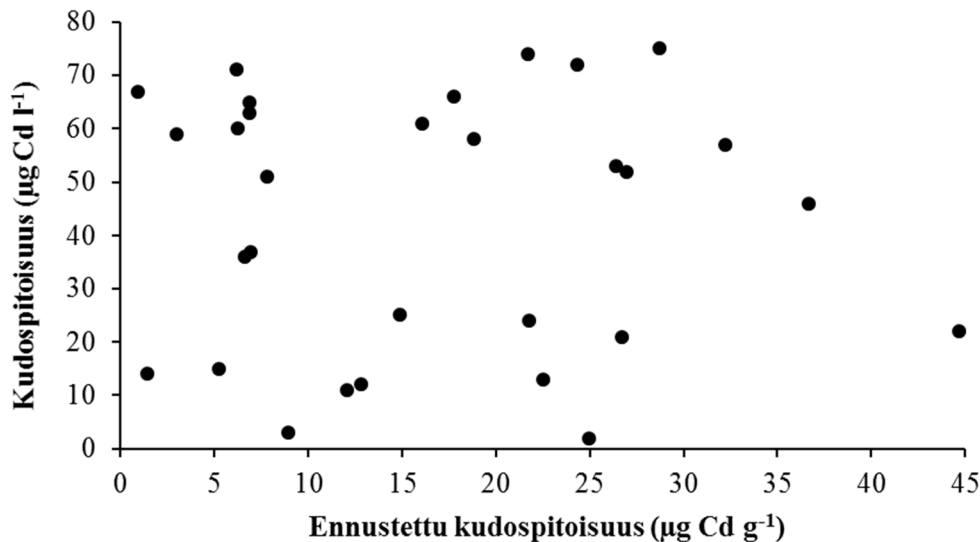
Kuva 12. Toukkien kudosten kadmiumpitoisuuden (suhteessa kuivapainoon) ja feomelaniinin (A), eumelaniinin (B) sekä trehaloosin (C) välinen yhteys.

Pigmenttien suhteelliset osuudet vaihtelivat spektrikuvan kokonaisheijastuksen eli kaikkien aallonpituuksien yhteenlasketun intensiteetin suhteen: kokonaisheijastuksen kasvaessa feomelaniinin määrä väheni (Pearson: $n = 30$, $r = -0,62$, $p < 0,001$) (Kuva 13a) ja eumelaniinin lisääntyi (Pearson: $n = 30$, $r = 0,61$, $p < 0,001$) (Kuva 13b). Kokonaisintensiteetin ja trehaloosin välillä ei havaittu lineaarista yhteisvaihtelua (Pearson: $n = 30$, $r = 0,21$, $p = 0,271$) (Kuva 13c), kuten ei kokonaisintensiteetin ja kudosten kadmiumpitoisuuden välilläkään (Pearson: $n = 30$, $r = 0,14$, $p = 0,448$) (Kuva 13d).

Mallintamalla saatu kudosten kadmiumpitoisuus korreloi tilastollisesti miltei merkittävästi kudoksista mitattujen kadmiumpitoisuuksien kanssa, mutta korrelaatio on heikko (Pearson: $n = 30$, $r = 0,35$, $p = 0,06$, NRMSE = 32 %) (Kuva 14). Pääkomponenttianalyysin 1. pääkomponentti, joka tiivistää suurimman osan aineiston vaihtelusta, korreloi selvimmin trehaloosipitoisuuden kanssa (Pearson: $n = 30$, $r = 0,84$, $p < 0,001$).



Kuva 13. Spektrikuvan kokonaisintensiteetin yhteisvaihtelu feomelaniinin (A), eumelaniinin (B), trehaloosin (C) ja kudosten kadmiumpitoisuuden (kuivapaino) kanssa (D).



Kuva 14. Kudosten ennustetun kadmiumpitoisuuden ja kudoksista mitatun kadmiumpitoisuuden välinen suhde.

5. TULOSTEN TARKASTELU

5.1. Kidusvauriot

Kidusvaurioita esiintyi eniten altistuspitoisuudessa $94,5 \mu\text{g l}^{-1}$, ja tätä suuremmissa ja pienemmissä altistuspitoisuuksissa selvästi vähemmän. Ilmiölle voi löytyä selitys metallien jakautumisesta toukkien kudoksiin eri altistuspitoisuuksissa. Proteiineista osa on erikoistunut metallien sitomiseen itseensä, jolloin ne voivat varastoida tai sitoa metalli-ionit vaarattomaan muotoon, jolloin ne eivät pääse aiheuttamaan myrkytysoireita. Cain ym. (2004) huomasivat, että mitä suurempi *Hydropsyche* -toukista mitattu kuparipitoisuus oli, sitä suurempi osuus tästä kuparista oli soluissa sitoutuneena metalleja sitoviin tai niiden kaltaisiin proteiineihin (metallotioniineihin). Cain ym. (2004) päättelivät samanlaisen ilmiön tapahtuvan myös kadmiumilla. Tässä tutkimuksessa selvitettiin vain toukkien kudosten kokonaiskadmiumpitoisuus, eikä siitä siten voida päätellä, missä kudoksissa tai proteiineissa kadmiumia esiintyi eniten eri pitoisuuksissa. Jos tutkimuksen suurimmissa altistuspitoisuuksissa suurin osa kadmiumista sitoutui solujen metalleja sitoviin proteiineihin ja siten pienempi osuus kadmiumista päätyi aineenvaihduntaprosesseihin, joissa kadmium olisi ollut myrkyllisempää, on mahdollista, että kidusvaurioita esiintyi siksi vähemmän suurissa pitoisuuksissa. Vastaavasti pienemmissä altistuspitoisuuksissa, joissa suurin osa kadmiumista saattoi olla sitoutuneena toksisuuden vaikutuspaikkaan aiheuttaen vaurion, kidusvaurioiden määrä on suurempi.

Altistuksen suuruuden lisäksi myös lajien välillä on vaihtelua siinä, mihin metallit sitoutuvat ja vaikuttavat (Cain ym. 2004). Metallionit voivat sitoutua myös muihin proteiineihin, jolloin ne voivat häiritä proteiinien normaalia toimintaa. Metalleja sitovat ja vaarattomaksi varastoivat proteiinit ovat hyönteisillä lähes aina lämpöstabiiileja. Cain ym. (2004) tutkimuksen mukaan päivänkorennot (*Baetis* spp., *Epeorus albertae* ja *Serratella tibialis*) sitovat enemmän kadmiumia ja kuparia lämpödenaturoituihin proteiineihin kuin lämpöstabiiileihin. Vesiperhosilla (*Hydropsyche* spp.) kadmium ja kupari puolestaan sitoutuivat selvästi enemmän lämpöstabiiileihin proteiineihin. Siten kadmium ja kupari olivat päivänkorennoille ja koskikorennoille myrkyllisempiä kuin vesiperhosille.

Vuori & Kukkonen (2002) havaitsivat *Hydropsyche siltalai* -vesiperhostoukilla log-lineaarisen annos-vasteisuuden kadmiumaltistuksen ja kidusvaurioiden esiintymisen välillä Cd-pitoisuuksissa 12, 160 ja 10 000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Heidän tutkimuksessaan vaurioita esiintyi selvästi enemmän, sillä Vuoren & Kukkonen (2002) tutkimuksessa HYI vaihteli välillä 5-15, ja tässä tutkimuksessa 2,7 ja 5,1 välillä. Syynä, miksi Vuoren (1994) tutkimuksessa havaittiin kidusvaurioiden esiintymisessä log-lineaarinen vaste kadmiumpitoisuudelle, mutta ei tässä tutkimuksessa, voi olla lajien väliset erot herkkyydessä kadmiumaltistukselle. *H. siltalai* on todettu herkemäksi kuin *H. pellucidula* rehevöitymisen ja happivajeen osalta (Vuori 2002), ja on mahdollista että *H. siltalai* sietää myös kadmiumaltistusta heikommin kuin *H. pellucidula*. Toinen mahdollinen selittävä tekijä voi löytyä koeveden ominaisuuksista: kadmiumin myrkyllisyyteen vaikuttavat veden happamuus (Qu ym. 2013), kovuus ja humus (Penttinen ym. 1998). Vuoren tutkimuksessa pH oli 7,5 eli selvästi korkeampi kuin tässä tutkimuksessa käytetty pH-arvo 6,0. Kadmiumin toksisuuden on todettu kasvavan pH:n kasvaessa. Qu ym. (2013) tutkivat kadmiumin toksisuutta vesikirpulle (*Daphnia magna*) eri pH-arvoissa, ja havaitsivat, että kadmiumin EC₅₀ (*effective concentration*) eli pitoisuus, jossa puolessa tutkituista koe-eläimistä esiintyi altistuksen aiheuttama vaikutus, oli pH-arvossa 6 lähes kolminkertainen verrattuna pH-arvoon 7. Selityksenä voi olla, että pH:n laskiessa lisääntyneet vapaat vetyionit kilpailevat Cd²⁺ -ionien kanssa samoista sitoutumispaikoista eli reseptoreista solujen pinnalla, mikä vähentää kadmiumin toksisia ominaisuuksia (Qu ym. 2013).

Kidusvaurioiden vähenemistä suurimmissa altistuspitoisuuksissa voisi selittää myös hormoneina tunnettu ilmiö. Hormeesihypoteesin mukaan aine voi pieninä pitoisuuksina kiihdyttää esimerkiksi jotakin aineenvaihdunnan toimintoa, mutta suurina pitoisuuksina se voi inhiboida eli estää kyseistä reaktiota (Calabrese & Baldwin 1998, Calabrese 2005). On mahdollista, että hormonein vuoksi pienemmät kadmiumin altistuspitoisuudet 9,9 ja 94,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ aiheuttivat enemmän kidusvaurioita kuin isommat pitoisuudet. Mekanismia, joka aiheuttaa kidusten tummumisen ei tunneta, joten ilmiötä on vaikea spekuloida enempää (Ratia ym. 2012, Salmelin ym. 2016). On arvioitu, että tummuminen johtuisi kadmiumionien sakkautumisesta kidusten pinnalle (Salmelin ym. 2016).

Puhtaitakin alueilta kerätyillä toukilla on yleensä jonkin verran kidusvaurioita, jotka voivat aiheutua esimerkiksi loisten tai tautien tartunnasta, tai olla seurausta toukkien välisestä kilpailusta. Vuonna 2008 Siikakoskesta kerätyissä *H. pellucidula* -toukissa (n = 28) havaittiin lievästi vaurioituneita kidustupsuja eli vauriotyyppiä 3 vastaavia vaurioita yhteensä 19 %:lla tutkituista kiduksista (Ratia ym. 2012). Selviä vaurioita, eli vauriotyyppiä 1 ja 2, havaittiin 1 %:ssa kidustupsuista. Samassa tutkimuksessa tutkittiin toukkia myös toisesta referenssikoskesta Simunankoskesta, jolloin lieviä vaurioita havaittiin 24 %:ssa ja selviä vaurioita 3 %:ssa kidustupsuista (Ratia ym. 2012). Vuonna 2013 Siikakoskesta kerättyjen toukkien (n = 88) kidustupsuista 14 % oli lievästi vaurioituneita ja 4 % selvästi vaurioituneita (Toivanen ja Närkki 2013). Tässä tutkimuksessa kontrollikäsittelyn saaneiden toukkien kidustupsuista 10 % oli vaurioitunut lievästi ja 4 % selvästi, eli vaurioita havaittiin vähemmän kuin Ratian ym. (2012) ja Toivasen & Närkin (2013) tutkimuksissa. Tässä tutkimuksessa kontrollikäsittelyn saaneet toukat olivat olleet 5-7 vrk akklimoitumassa laboratorio-olosuhteisiin ja sen jälkeen 4 vrk altistuskokeessa. Toivasen & Närkin (2013) tutkimuksessa toukkia akklimoitiin laboratorio-oloihin 10 vrk, jonka jälkeen kidusvauriot tutkittiin. Ratia ym. (2012) tutkimuksessa toukat säilöttiin etanoliin heti keräämisen jälkeen.

Vanhimmat toukat ovat isokokoisimpia, jolloin niiden pinta-alan suhde massaan on pienempi kuin nuoremmilla kehitysvaiheilla. Tämä voi vaikuttaa metallien kokonaisabsorptioon ja tehdä suuremmista toukista kestävämpiä elinympäristössä

esiintyvälle altistukselle, kun suuriin toukkiin kohdistuva kokonaisabsorptio on pienempi kuin pienemmillä yksilöillä. Tässä kokeessa pienimmässä altistuspitoisuudessa havaittiin heikko negatiivinen korrelaatio yksilön kudospitoisuuden ja kuivapainon välillä. Muissa altistuspitoisuuksissa yhteyttä ei havaittu. Kuvan 8 perusteella kadmiumpitoisuudessa on mahdollisesti havaittavissa heikko laskeva trendi, mutta se ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Kaikki toukat olivat viidennen eli viimeisen kehitysvaiheen toukkia, joten suuria kokovaihteluja ei odotettukaan esiintyväksi. Kadmiumin absorboituminen voi olla kuitenkin vähäisempää kuin esimerkiksi ensimmäisen vaiheen toukilla. Siksi kidusvaurioiden esiintymistä kadmiumaltistuksen seurauksena olisi hyödyllistä tutkia myös saman lajin erikokoisilla yksilöillä.

Tutkimuksessa toukkien kudospitoisuuksissa oli suhteellisen suurta hajontaa saman altistuspitoisuuden sisälläkin. Juuri nahkansa luoneiden *Hydropsyche* -vesiperhostoukkien kudosten metallipitoisuudet olivat suurempia kuin yksilöillä, jotka eivät olleet vielä luoneet nahkaansa (Vuori & Kukkonen 1996). Yksilön kehitysvaiheen muuttuessa metallien sisäänotto voi kasvaa joko muuttuneen metabolian vuoksi, tai koska pehmeämpi pintakudos voi mahdollistaa metallien tehokkaamman absorboitumisen. Vaihtoehtoisesti myös kudosten kohonnut metallipitoisuus voi kiihdyttää nahanluontia (Vuori & Kukkonen 1996). Tässä tutkimuksessa havaituilla vaihteluilla kudospitoisuuksissa ei kuitenkaan todennäköisesti ole kyse kehitysvaiheen muuttumisesta, koska toukat talvehtivat 5. toukkavaiheessa ja aikuistuvat kesäkuussa, ja tutkimuksessa kerätyt toukat kerättiin huhtikuun alussa. Suuret erot kudospitoisuuksissa voivat johtua esimerkiksi yksilöllisistä eroista metallien akkumulaatiossa.

Kidusvaurioiden määrä tässä tutkimuksessa ei eronnut eri altistuspitoisuuksien tai altistussarjojen välillä, vaikka toukkien kunnossa oli eroja ennen sarjojen aloittamista: 1. ja 2. päivänä aloitettujen pitoisuussarjojen toukat olivat aggressiivisia toisiaan kohtaan jopa tunteja, pitoisuudesta riippumatta. Yhteenottoja olisi voinut estää tarjoamalla toukille kiinnittymisalustoja, mutta se ei onnistunut tämän kokeen toteutuksessa käytännön syistä. Viimeisessä sarjassa altistetut toukat olivat selvästi passiivisempia kuin aiempien toistojen toukat, eikä yhteenottoja esiintynyt. Tämä voi johtua epätasaisista akklimointiolosuhteista: kaikki toukat pidettiin yhteisissä akklimointiastioissa, ja niiden ruokinta lopetettiin päivää ennen ensimmäisen altistussarjan aloittamista. Siten viimeisen sarjan toukat olivat ilman ruokintaa 3 päivää ja saattoivat olla yleiskunnoltaan heikentyneitä ensimmäisten altistussarjojen toukkiin verrattuna. Yleiskunnon heikkenemistä pyrittiin välttämään jättämällä akklimointiastioihin runsaasti oksia ja lehtiä, joista toukkien oletettiin löytävän siivilöitävää ravintoa myös ruokinnan lakattua.

Koeasetelmaan pyrittiin valitsemaan vain terveitä, aktiivisia yksilöitä. Kokeeseen valikoitui kuitenkin myös yksilöitä, joiden takaruumiin anaalipapillit olivat ilman mikroskopointitarkasteluakin todeten tummuneet. Anaalipapillien kautta tapahtuu ionien vaihtoa, joten papillien tummuminen viittaisi siihen, että toukat ovat kokeneet jonkinlaista stressiä jo ennen altistuskoetta. Siikakoski, josta tämän toukat kerättiin, on kemialliselta ja biologiselta tilaltaan erinomainen. Akklimoinnin aikana laboratorioissa tapahtunut altistuminen jollekin vierasaineelle on hyvin epätodennäköistä. Eri päivinä aloitettujen altistusten välillä ei ollut tilastollisia eroja, joten olosuhteet olivat kunakin päivänä tasaiset.

5.2. Hyperspektrikuvantamisella havaitut piirteet

Kudosten kadmiumpitoisuuden vaikutusta toukkien spektriipirteisiin tutkittiin selvittämällä toukkien tummumisesta kertovien pigmenttisuhteiden muutosta sekä toukkien hemolymfan eli verinesteen disakkaridipitoisuuden eroja eri altistuspitoisuuksissa. Altistus näytti aiheuttavan toukkien selkäpuolen spektriipirteissä muutoksia, joko suoraan tai

välillisesti. Spektriirteiden avulla mallinnettu toukkien hemolymfan trehaloosipitoisuus osoitti yhteisvaihtelua kudosten kadmiumpitoisuuden kanssa. Trehaloosi on hyönteisten hemolymfassa eli verinesteessä esiintyvä päähiilihydraatti, joka pilkotaan glukoosiksi ja käytetään energianlähteenä (Elbein ym. 2003). Trehaloosi suojaa hyönteisiä abioottisilta stressitekijöiltä, kuten epäsuotuisilta lämpöolosuhteilta, kuivumiselta ja elinympäristön suolaisuudelta, ja toimii energiavarastona. Tässä tutkimuksessa mallinnettu trehaloosin määrä toukissa pieneni kadmiumaltistuksen myötä. Vaikka korrelaatio kudosten kadmiumpitoisuuden suhteen on heikko, se on kuitenkin tilastollisesti merkitsevä. Tulos on linjassa muiden tutkimusten kanssa, joissa lehtinunnan (*Lymantria dispar*) hemolymfan trehaloosipitoisuus pieneni selvästi kadmiumaltistuksen jälkeen (esim. Bischof 1995, Ortel 1996). Kadmiumin lisäksi sama vaikutus veren hiilihydraattisuhteisiin on havaittu ainakin sinkillä, ja joissain pitoisuuksissa myös lyijyllä ja kuparilla (Bischof 1995, Ortel 1996). Em. tutkimuksissa toukat tosin altistettiin kadmiumille ravinnon kautta, toisin kuin tässä tutkimuksessa, mutta yksilöiden kudosten arvioidut kadmiumpitoisuudet, 10 ja 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ (kuivapaino), kahdessa eri altistuspitoisuudessa ovat samaa suuruusluokkaa kuin tutkimukseni mitatut kadmiumpitoisuudet. Tulokset viittaavat siihen, että altistuksen seurauksena toukkien stressitaso oli koholla ja energiankulutus kasvoi, jolloin trehaloosipitoisuus vastaavasti laski. Koska trehaloosipitoisuus selkeästi voi laskea myös silloin, kun altistus tapahtuu ravinnon kautta (esim. Bischof 1995, Ortel 1996), toukkien paastotus kokeessani ei siis todennäköisesti aiheuttanut trehaloosipitoisuuden laskua, vaikka akklimointiolosuhteista johtuen viimeisenä aloitettujen altistusten toukat saattoivat olla pidempään ilman ravintoa kuin ensimmäisenä altistetut. Tietääkseni metallialtistuksen vaikutuksesta vesihyönteisten trehaloosipitoisuuteen ei ole aiempaa tutkimustietoa.

Toinen spektriirteissä havaittu muutos liittyi toukkien pintakudoksen melaniini- eli pigmenttisuhteisiin. Muutos voidaan nähdä pintakudoksen tummuuden määräävien pigmenttien, melaniinien, suhteellisten osuuksien muuttumisena kadmiumaltistuksen myötä. Mallinnettu eumelaniinin osuus toukan kudoksissa kasvoi ja vastaavasti feomelaniinin osuus väheni kuvan kokonaisuheijastuksen kasvaessa. Pigmenttien määrät eivät kuitenkaan tilastollisesti korreloineet suoraan kadmiumpitoisuuden kanssa. Kuvan kokonaisuheijastukseen ei korreloinut kadmiumpitoisuuden kanssa, mutta koska koeolosuhteet olivat kaikissa käsittelyissä muilta osin samanlaiset, kadmiumpitoisuuden muutos todennäköisesti vaikutti kokonaisuheijastukseen välillisesti.

Melaniinilla tarkoitetaan pigmenttiproteiinien ryhmää, jotka on jaettu kahteen päätyyppiin: eumelaniiniin eli tummaan ja feomelaniiniin eli vaaleaan tai punertavaan pigmenttiin (Simon & Peles 2010). Eumelaniini on yleinen useilla eläinryhmillä, myös hyönteisillä. Feomelaniinin esiintymistä hyönteisillä ei ole toistaiseksi juuri tutkittu, mutta sitä on todettu esiintyvän ainakin yhdellä heinäsiirkkalajilla (Galván ym. 2015). Melaniineilla on eri tehtäviä eri eliöryhmissä, mutta hyönteisissä niiden on havaittu suojaavan soluja UV-säteilyltä, minkä lisäksi melaniinien on todettu myös osallistuvan solujen hapetus-pelkistysreaktioihin, sitovan vapaita radikaaleja, kelatoivan metalli-ioneja ja vahvistavan hyönteisten pintakudoskerrosta, eksokutikulaa (Nappi & Christensen 2005). Melaniinin määrä soluissa linkittyy myös hyönteisten immuunipuolustukseen (Eleftherianos & Revenis 2011).

Eumelaniinin ja etenkin feomelaniinin merkitystä hyönteisillä ei tunneta hyvin, eikä kudosten tummenemisen tarkkaa mekanismia tai syytä tiedetä. Mahdollinen selitys eumelaniinin määrän lisääntymiselle voi olla immuunipuolustusreaktio kadmiumaltistuksen seurauksena. Yksi vaihtoehto on, että kidusten tummuminen aiheutuu kadmiumionien sakkautumisesta kidusten pintaan. Toukka voi yrittää puhdistaa itseään kadmiumista tämän avulla. Melaniini liittyy hyönteisten immuunipuolustukseen: eräällä

banaanikärpäslajilla pintakudoksen vaurioituminen aktivoi melanisaation vaurioalueella (Eleftherianos & Revenis 2011). Riley (2013) ehdottaa, että lisääntynyt melaniinin tuotanto voisi suojata hyönteisiä ilman kautta saatavalta metallialtistukselta. Koivumittareilla (*Biston betularia*) esiintyy teollisuusmelanismia eli teollisuuspainotteisilla alueilla ilman epäpuhtauksien seurauksena tapahtuvaa hyönteisten tummumista. Ilmiön on yleensä ajateltu johtuvan lähinnä saalistuspaineen aiheuttamasta luonnonvalinnasta, jossa tummuneilta puiden rungoilta helposti näkyvät vaaleat yksilöt joutuvat helpommin petojen ravinnoksi ja heikommin alustasta erottuvat tummemmat yksilöt pääsevät lisääntymään. Riley (2013) kuitenkin ehdottaa, että teollisuusmelanismin osatekijä voisi olla lisääntyneen melaniinipigmentin tuoma hyöty ilman metallialtistukselta suojaumisessa. Melaniinin tiedetään sitovan metalleja itseensä, mutta ilmiötä ei tietääkseni ole tutkittu hyönteisillä. Salmelinin ym. (2016) tutkimus antoi samansuuntaisia viitteitä toukkien pehmeiden kitiiniosien tummumisesta kadmiumaltistuksen seurauksena. Vaste oli käytetyissä kadmiumpitoisuuksissa kuitenkin heikompi kuin tässä tutkimuksessa.

Vaikka toukat kuvattiin selkä- ja vatsapuolelta sekä molemmilta kyljiltä, aineiston käsittelyyn valittiin vain keski- ja takaruumiin selkäpuolen segmentit, sillä ne olivat kaikilla yksilöillä tasaisesti asettuneet lasiputkea vasten. Siten ne olivat myös helpoimmin analysoitavissa, kun toukan ja kameran väliin ei syntynyt veden pinnasta tulevia heijastuksia tai paksua vesikerrosta. Salmelinin ym. (2016) tutkimuksessa toukat kiinnitettiin kuvauksen ajaksi neuloilla alustaan, jolloin toukat paitsi vaurioituivat, niihin saattoi kohdistua venytystä. Kudosten kadmiumpitoisuuksien mallintaminen spektriipirteiden perusteella vaatii vielä kehittelyä, pääasiassa kuvien tasaisen laadun varmistamiseksi. Lasiputkessa kuvaaminenkaan ei osoittautunut täysin ongelmattomaksi: vaikka toukat nukutettiin, osa niistä liikkui kuvauksen aikana, ja yksilöt, joiden kuvat tärähtivät, jouduttiin poistamaan jatkoanalyyseista. Liikkeet saattoivat johtua kameran valonlähteen aiheuttamasta veden lämpenemisestä, tai toukkien reflekseistä, jos nukutukseen käytetty Samarin-annostus ei ollut tappava. Noin 60 % kuvista oli selvästi tärähtäneitä tai alivalottuneita. Kaikkiaan vain 20 kuvaa 73:sta onnistui moitteettomasti, ja tämän vuoksi analyysiin otettiin myös 10 hieman epätarkkaa kuvaa kokonaismäärän kasvattamiseksi. Myös kameraan liitetyn tietokoneen toiminnasta saattoi aiheutua kohinaa kuviin, mikä vaikeuttaa spektriaineiston tulkintaa. Kameran kalibroinnin jälkeen yhden toukan kuvaamiseen neljältä puolelta kului kokeessa aikaa n. 2-3 minuuttia. Toukkia ei todennäköisesti tarvitse menetelmän mahdollisessa jatkokehittelyssä kuvata kuin selkäpuolelta, jolloin yhden toukan kuvaukseen kuluva aika lyhenee merkittävästi, ja menetelmän kustannustehokkuus paranee.

5.3. Yhteenveto

Vesistöihin voi päätyä niitä saastuttavia yhdisteitä jatkuvasti tarkoituksella tai vahingossa pistemäisinä kertapäästöinä. Metalliyhdisteet aiheuttavat ongelmia esimerkiksi pohjaeläimille, joten altistuksen aiheuttamien vaikutusten mittaaminen on oleellista vesistön todellisen tilan selvittämiseksi. Tässä tutkimuksessa altistin kadmiumille *Hydropsyche pellucidula* -vesiperhostoukkia ja selvitin, voiko hyperspektrikuvantamisella havaita altistuksen. Tutkin myös, esiintyikö altistetuilla toukilla kidusvaurioita. Havaittiin, että toukilla, joiden kudosten kadmiumpitoisuus oli suuri, spektriipirteet poikkesivat kontrollikäsittelyn saaneiden toukkien spektriipirteistä. Kidusvaurioilla ei havaittu lineaarista yhteyttä kudosten kadmiumpitoisuuteen. Kadmiumaltistukseen reagoi spektriipirteistä selvimmin toukkien hemolymfan trehaloosi- eli disakkariditaso, joka kertoo toukkien stressireaktiosta.

Tutkimukseni antoi myös uutta tietoa siitä, miten *H. pellucidula* -toukat reagoivat kadmiumaltistukseen suuressa pitoisuudessa. Koska aiheutuneet kydusvauriot eivät selvästi esiintyneet lineaarisessa suhteessa altistuspitoisuuteen vaan ennemminkin paraabelimaisesti, pelkästään kydusvaurioiden perusteella ei voida tehdä luotettavia päätelmiä eläinten altistumisesta kadmiumille. Vain kydusvaurioiden määrää tutkimalla tämän tutkimuksen tuloksista voitaisiin päätellä, että keskimmäiset käytetyt altistuspitoisuudet olivat toukille haitallisempia kuin hyvin suuret, vaikka kydusvaurioiden määrä ei välttämättä kerro suurten kadmiumpitoisuuksien mahdollisesti aiheuttamista muista vaikutuksista. Tutkimuksessa toukkien kadmiumin kydospitoisuudet korreloivat selkeämmin mallinnetun trehaloosipitoisuuden kuin kydusvaurioiden määrän kanssa. Vaikka toukkien kudoksista ei varsinaisesti analysoitu trehaloosipitoisuutta, kirjallisuustietojen perusteella on perusteltua olettaa hyönteistoukissa esiintyvän sitä, ja trehaloosipitoisuuden laskun kuvaavan eläinten kokemaa vierasainealtistuksen aiheuttamaa stressiä (Bischof 1995, Ortel 1996).

Tässä tutkimuksessa analysoitiin vain toukkien kokonaiskadmiumpitoisuus. Jatkon kannalta voisi olla hyödyllistä tehdä tarkempia analyysejä eri kudoksista, jotta tiedetään, mihin kudoksiin tai solun osiin kadmium toukissa kertyy, koska se vaikuttaa kadmiumin toksisuuteen. Samoin voisi verrata toukkien mallinnettuja melaniini- ja trehaloositasoja mitattuihin kydospitoisuuksiin. Kokeeni altistusaika oli hyvin lyhyt ja altistuspitoisuudet suuret. Toki luonnossa voi esiintyä ajoittain myös tällaisia tilanteita esimerkiksi kaivoksen jäteveden käsittelyssä tapahtuvien tilapäisten häiriöiden vuoksi. Luonnossa kuitenkin esiintyy usein myös tilanteita, joissa altistuspitoisuus on suhteellisen pieni, mutta altistusaika voi olla selvästi pitempi, kuukausista vuosiin. Lisäksi luonnonpopulaatioissa yksilöt voivat altistua useammalle yhdisteelle, mikä voi vaikuttaa myös spektriipirteisiin. Tämä tutkimus valottaa lähinnä hyperspektrikuvantamisen käyttökelpoisuutta toimia työkaluna lyhytkestoisen, akuutin yhden metallin altistuksen tilanteessa, eikä siten ota suoraan kantaa siihen, miten menetelmä toimii pienemmissä pitoisuuksissa tai toisenlaisissa koeolosuhteissa. Hyperspektrikuvantamisen käyttökelpoisuudessa on kuitenkin oleellista menetelmän toimivuus myös luonnonoloissa, joten mielestäni tulisi tutkia sen mahdollisuuksia havaita pidempiaikainen, mutta pitoisuuksiltaan pienempi altistus. Menetelmää tulisi myös kokeilla muilla lajeilla. Hyperspektrikuvantaminen vaikuttaa kuitenkin lupaavalta menetelmältä raskasmetallialtistuksen havaitsemiseksi pohjaeläimistä. Tulokset ovat linjassa Salmelinin ym. (2016) tutkimuksen kanssa, sillä metallialtistuksen kasvaessa spektriipirteet muuttuivat ja näkyivät myös Salmelinin ym. (2016) havaitsemana tummumisena. Tutkimus antoi myös hyvän kuvan kadmiumin kertymispotentialista vedessä *Hydropsyche pellucidula* -toukkiin.

KIITOKSET

Haluan suuresti kiittää kaikkia ohjaajiani tuesta tutkielman suunnittelussa, toteuttamisessa ja kirjoittamisessa. Kiitän FT Ilkka Pölästä Jyväskylän yliopiston informaatioteknologian laitokselta hyperspektrikuvantamisen käytännön toimista sekä kuvantamisaineiston analysoinnista. Kiitän myös FT Ari Väisästä Jyväskylän yliopiston kemian laitokselta kydos- ja vesinäytteiden analysoimisesta, Jyväskylän yliopiston ympäristötieteen ja -teknologian osaston laboratoriomestareita Mervi Koistista ja Leena Siitosta sekä tutkimusavustaja Terhi Rahkosta käytännön koejärjestelyissä avustamisesta.

Tutkimus tehtiin osana Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen MineView-projektia, jonka tavoitteena on kehittää kaivostoiminnan metallipäästöjen aiheuttamien ekotoksikologisten ja ympäristöterveydellisten vaikutusten ja riskien

arviointia pintavesistöissämme sekä tuottaa tietoa monimetallialtistumisen vaikutuksista, kuten suolaantumisesta suomalaisissa olosuhteissa ja suomalaisilla lajeilla.

KIRJALLISUUS

- Allan J.D. & Castillo M.M. 2007. *Stream ecology. Structure and function of running waters*. Springer, Alankomaat.
- Andersen T. & Klubnes R. 1983. The life histories of *Hydropsyche siltalai* Döhler, 1963 and *H. pellucidula* (Curtis, 1834) (Trichoptera, Hydropsychidae) in a West Norwegian river. *Aquat. Insects*. 5: 51–62.
- Antonucci F., Menesatti P., Holden N.M., Canali E., Giorgi S., Maizena A. & Stazi S.R. 2012. Hyperspectral visible and near-infrared determination of copper concentration in agricultural polluted soils. *Commun. Soil. Sci. Plan.* 43:1401–1411.
- Asuncion R., Buzzi J., García-Meléndez E., Carrère V. & Müller A. 2011. Monitoring the extent of contamination from acid mine drainage in the Iberian Pyrite belt (SW Spain) using hyperspectral imagery. *Remote Sens.* 3: 2166–2186.
- Bae M.-J. & Park Y.-S. 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. *Sci. Total Environ.* 466–467: 635–649.
- Bischof C. 1995. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the hemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 87–92.
- Byrne P., Wood P.J. & Reid I. 2012. The impairment of river systems by metal mine contamination: a review including remediation options. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 42: 2017–2077.
- Cain D.J., Luoma S.N. & Wallace W.G. 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1463–1473.
- Cain D.J., Buchwalter D.B. & Luoma S.L. 2006. Influence of metal exposure history on the bioaccumulation and distribution of aqueous cadmium in the insect *Hydropsyche californica*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 1042–1049.
- Calabrese E.J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicology sciences. *Environ. Pollut.* 138: 378–411.
- Calabrese E.J. & Baldwin L.A. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. *Environ. Health Persp.* 106: 357–362.
- Camargo J.A. 1991. Toxic effects of residual chlorine on larvae of *Hydropsyche pellucidula* (Trichoptera, Hydropsychidae): a proposal of biological indicator. *B. Environ. Contam. Tox.* 47: 261–265.
- Covich A.P., Palmer M.A. & Crowl T.A. 1999. The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems – zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *Bioscience* 49: 119–127.
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I. & Carroll D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R–27R.
- Eleftherianos I. & Revenis C. 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J. Innate Immun.* 3: 28–33.
- EU. 2000. Tai EU 60/2000. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi yhteisön vesipolitiikan puitteista. 2000/60/EY, *Euroopan Unionin virallinen lehti* 327/20. 22.12.2000.
- Everett J.H., Yang C., Summy K.R., Glomski L.M. & Owens C.S. 2011. Evaluation of hyperspectral reflectance data for discriminating six aquatic weeds. *J. Aquat. Plant Manage.* 49: 94–100.

- Feng Y.-Z. & Sun D.-W. 2012. Application of hyperspectral imaging in food safety inspection and control: a review. *Crit. Rev. Food Sci.* 52: 1039–1058.
- Galván I., Jorge A., Edelaar P. & Wakamatsu K. 2015. Insects synthesize pheomelanin. *Pigm. Cell Melanoma R.* 28: 599–602.
- Hellawell J.M. 1983. *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. Elsevier applied science publishers, Lontoo ja New York.
- HERTTA. OIVA – ympäristö- ja paikkatietopalvelu, SYKE, Luettu 15.3.2015.
- Hilty J. & Merenlender A. 2000. Faunal indicator taxa selection for monitoring ecosystem health. *Biol. Conserv.* 92: 185–195.
- Karjalainen A., Siimes K., Leppänen M.T. & Mannio J. 2014. *Maa- ja metsätalouden kuormittamien pintavesien haitta-aineseuranta Suomessa. Seurannan tulokset 2007–2012*. Suomen ympäristökeskuksen raportteja 38/2014. Edita Prima, Helsinki, 61 s.
- Macadam C.R. & Stockan J.A. 2015. More than just fish food: ecosystem services provided by freshwater insects. *Ecol. Entomol.* 40: 113–123.
- Malferrari M., Nalepa A., Venturoli G., Francia F., Lubitz W., Möbius K. & Savitsky A. 2014. Structural and dynamical characteristics of trehalose and sucrose matrices at different hydration levels as probed by FTIR and high-field EPR. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16: 9831–9848.
- Mortimer M., Gogos A., Bartolomé N., Kahru A., Bucheli T.D. & Slaveykova V.I. 2014. Potential of hyperspectral imaging microscopy for semi-quantitative analysis of nanoparticle uptake by Protozoa. *Environ. Sci. Technol.* 48: 8760–8767.
- Nappi A.J. & Christensen B.M. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reaction: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 35: 443–459.
- Ortel J. 1996. Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepidoptera). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1171–1176.
- Penttinen S. 2010. Bioavailability and toxicity of chemicals in inland waters - the importance of prevailing water chemistry and implications for risk assessment. Väitöskirjatyö. University of Joensuu.
- Penttinen S., Kostamo A., Kukkonen, J.V.K. 1998. Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2498–2503.
- Poteat M.D. & Buchwalter D.B. 2014. Calcium uptake in aquatic insects: influences of phylogeny and metals (Cd & Zn). *J. Exp. Biol.* 217: 1180–1186.
- Qu R.-J., Wang X.-H., Feng M.-B., Li Y., Liu H.-X., Wang L.-S. & Wang Z.-Y. 2013. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 95: 83–90.
- Rand G.M. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC Press.
- Ranta E., Rita H. & Kouki J. 2012. *Biometria: tilastotiedettä ekologeille*. 10. painos. Gaudeamus, Helsinki.
- Ratia H., Vuori K.-M. & Oikari A. 2012. Caddis larvae (Trichoptera, Hydropsychidae) indicate delaying recovery of a watercourse polluted by pulp and paper industry. *Ecol. Indic.* 15: 217–226.

- Ratia H.M., Vehniäinen E.-R., Rusanen A.T. & Oikari A.O.J. 2014. Recovery of a historically contaminated watercourse polluted by the chemical wood industry: EROD activity in fish as biomarker. *Soil and Sediment Contamination* 23: 211–225.
- Riley P.A. 2013. A proposed selective mechanism based on metal chelation in industrial melanic moths. *Biol. J. Linn. Soc.* 109: 298–301.
- Salmelin J., Vuori K.-M. & Hämäläinen H. 2015. Inconsistency in the analysis of morphological deformities in Chironomidae (Insecta: Diptera) larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 1891–1898.
- Salmelin J., Pölönen I., Puupponen H.-H., Hämäläinen H., Karjalainen A.K., Väisänen A. & Vuori K.-M. 2016. Hyperspectral imaging of macroinvertebrates – a pilot study of a novel technique for detecting cadmium contamination in aquatic ecosystems. *Int. J. Environ. Sci. Te.* [painossa].
- Sarna T. & Swartz H.M. 1988. The physical properties of melanins. Teoksessa: (toim.) Nordlund E.E., Boissy R.E., Hearing V.J., King R.A., Oetting W.S. & Ortonne J.-P. *The Pigmentary System*, Oxford University Press, 311–341.
- Siciliano D., Wasson K., Potts D.C. & Olsen R.C. 2008 Evaluating hyperspectral imaging of wetland vegetation as a tool for detecting estuarine nutrient enrichment. *Remote Sens. Environ.* 112: 4020–4033.
- Simon J.D. & Peles D.N. 2010. The red and the black. *Accounts Chem. Res.* 43: 1452–1460.
- Song Y.-F., Luo Z., Pan Y.-X., Liu X., Huang C. & Chen Q.-L. 2014. Effects of copper and cadmium on lipogenic metabolism and metal element composition in the Javelin goby (*Synechogobius hasta*) after single and combined exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 167–180.
- Suomen ympäristökeskus 2015. Teollisuuden päästöt vesistöön vuonna 2014. http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Vesistojen_ravinnekuormitus_ja_luonnon_huuhouma/Teollisuuden_vesistokuormitus/Teollisuuden_paastot_vesistoon_vuonna_20%2835696%29. Luettu 27.9.2016.
- Thorp J.H. & Covich A.P. 2010. *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Academic Press, Lontoo.
- Toivanen H. & Närkki S. 2013. *Kuljetuskäsittelyn ja laboratorioakklimointiajan vaikutus ukkoseulakkaan (Hydropsyche pellucidula) toukkien kidusvaurioihin sekä henkilön vaikutus vauriotulkintaan*. LuK-tutkielma. Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteen laitos.
- Valtioneuvosto. 2010. Valtioneuvoston asetus vesiympäristölle vaarallisista ja haitallisista aineista annetun asetuksen muuttamisesta. 2010/868, liite B.
- Valtioneuvosto. 2011. Kaivoslaki 621/2011.
- Valtioneuvosto. 2014. Ympäristönsuojelulaki 527/2014.
- Vuori K.-M. 1994. Rapid behavioral and morphological responses of hydropsychid larvae (Trichoptera, Hydropsychidae) to sublethal cadmium exposure. *Environ. Pollut.* 84: 291–299.
- Vuori K.-M. 2002. Vesisammal- ja vesiperhosmenetelmät jokivesistöjen haitallisten aineiden riskinarvioinnissa ja seurannassa. *Suomen ympäristö* 571: 57–85.
- Vuori K.-M. & Kukkonen J. 1996. Metal concentrations in *Hydropsyche pellucidula* (Trichoptera, Hydropsychidae) in relation to the anal papillae abnormalities and age of exocuticle. *Water Res.* 30: 2265–2272.

- Vuori K.-M. & Kukkonen J. 2002. Hydropsychid (Trichoptera, Hydropsychidae) gill abnormalities as morphological biomarkers of stream pollution. *Freshwater Biol.* 47: 1207–1306.
- Walker C.H., Sibly R.M., Hopkin S.P. & Peakall D.B. 2006. *Principles of ecotoxicology*. CRC Press. Boca Raton.

Liite 1. Toukka-aineisto.

ID	Altistus-sarja	Altistus-pitoisuus (Cd µg l ⁻¹)	Pvm	Toukan kuivapaino (dw, mg)	Toukan märkäpaino (ww, mg)	Kudospitoisuus (Cd µg g ⁻¹ dw)	Kudospitoisuus (Cd µg g ⁻¹ ww)	Kidusvauriot luokittain			HYI-indeksi
								Päärunko surkastunut	Päärunko tummunut	> 50 % sivuhaaroista tummunut	
1	A	< 0,96	16.5.2015	-	67,0	-	-	3	0	0	3
2	A	< 0,96	19.5.2015	11,6	36,5	0,00	0,00	1	1	0	2
3	A	< 0,96	19.5.2015	15,9	53,7	0,00	0,00	5	0	1	6
4	A	< 0,96	19.5.2015	12,1	45,4	0,00	0,00	2	2	2	6
5	A	< 0,96	19.5.2015	11,8	45,1	0,00	0,00	0	0	0	0
6	A	9,9	19.5.2015	7,5	36,8	6,73	1,37	0	0	1	1
7	A	9,9	19.5.2015	8,5	33,1	0,45	0,11	3	1	1	5
8	A	9,9	19.5.2015	11,6	36,2	0,38	0,12	4	2	1	7
9	A	9,9	19.5.2015	6,6	31,1	2,67	0,57	5	0	0	5
10	A	9,9	19.5.2015	10,3	40,8	3,50	0,88	3	0	0	3
11	A	94,6	19.5.2015	18,2	66,7	11,2	3,05	4	1	0	5
12	A	94,6	19.5.2015	12,8	43,6	3,86	1,13	4	3	0	7
13	A	94,6	19.5.2015	11,0	42,8	23,2	5,97	13	0	0	13
14	A	94,6	19.5.2015	17,3	53,5	23,3	7,52	0	0	0	0
15	A	94,6	19.5.2015	16,2	49,0	2,23	0,74	3	0	0	3
16	A	893,5	19.5.2015	16,2	49,2	16,2	5,34	5	1	0	6
17	A	893,5	19.5.2015	11,5	39,8	47,4	13,7	5	0	0	5
18	A	893,5	19.5.2015	11,6	44,6	13,8	3,58	12	0	2	14
19	A	893,5	19.5.2015	11,2	46,2	14,0	3,39	0	1	0	1
20	A	893,5	19.5.2015	9,3	31,4	16,5	4,88	0	0	0	0
21	A	9202,4	19.5.2015	13,3	44,9	51,7	15,3	0	0	0	0
22	A	9202,4	19.5.2015	9,4	34,6	36,3	9,86	0	0	0	0
23	A	9202,4	19.5.2015	5,9	23,5	62,3	15,6	1	0	0	1
24	A	9202,4	19.5.2015	12,2	38,8	34,0	10,7	1	0	0	1

25	A	9202,4	19.5.2015	14,0	47,4	29,4	8,68	2	0	0	2
26	B	96,2	19.5.2015	12,0	50,2	5,55	1,33	7	1	0	8
27	B	96,2	20.5.2015	13,3	44,1	7,44	2,24	0	0	0	0
28	B	96,2	20.5.2015	10,8	39,4	5,64	1,55	7	2	1	10
29	B	96,2	20.5.2015	8,9	34,0	6,56	1,72	0	0	0	0
30	B	96,2	20.5.2015	19,1	53,3	1,89	0,68	0	0	0	0
31	B	9159,0	20.5.2015	9,4	34,7	66,8	18,1	0	1	0	1
32	B	9159,0	20.5.2015	18,3	51,7	38,1	13,5	9	1	1	11
33	B	9159,0	20.5.2015	12,2	38,9	62,7	19,7	4	1	0	5
34	B	9159,0	20.5.2015	8,9	29,3	42,8	13,0	0	0	0	0
35	B	9159,0	20.5.2015	11,4	39,2	49,6	14,4	0	0	0	0
36	B	< 0,96	20.5.2015	10,1	35,6	0,00	0,00	3	0	0	3
37	B	< 0,96	20.5.2015	16,8	50,7	0,00	0,00	3	0	0	3
38	B	< 0,96	20.5.2015	13,6	44,4	0,00	0,00	3	0	0	3
39	B	< 0,96	20.5.2015	16,9	54,0	0,00	0,00	3	0	1	4
40	B	< 0,96	20.5.2015	14,3	43,3	0,00	0,00	4	3	1	8
41	B	900,3	20.5.2015	13,4	42,8	12,5	3,92	0	0	1	1
42	B	900,3	20.5.2015	8,4	33,8	20,2	5,03	0	0	0	0
43	B	900,3	20.5.2015	12,9	45,8	22,4	6,32	4	0	0	4
44	B	900,3	20.5.2015	14,0	45,6	18,9	5,79	1	2	0	3
45	B	900,3	20.5.2015	18,9	56,4	9,57	3,21	2	1	2	5
46	B	9,9	20.5.2015	12,3	40,5	2,20	0,67	8	0	0	8
47	B	9,9	20.5.2015	12,4	43,6	1,76	0,50	4	2	0	6
48	B	9,9	20.5.2015	6,9	28,0	2,70	0,66	0	0	0	0
49	B	9,9	20.5.2015	9,1	32,8	0,67	0,19	14	0	3	17
50	B	9,9	20.5.2015	10,3	38,6	1,30	0,35	0	0	0	0
51	C	9255,7	21.5.2015	15,2	48,8	41,8	13,0	4	0	0	4
52	C	9255,7	21.5.2016	14,7	46,8	52,2	16,4	1	2	0	3
53	C	9255,7	21.5.2017	13,2	39,0	50,4	17,1	3	1	0	4
54	C	9255,7	21.5.2018	11,4	39,5	46,8	13,5	0	2	0	2

55	C	9255,7	21.5.2019	9,5	34,6	49,6	13,6	6	1	1	8
56	C	9,7	21.5.2020	11,1	40,8	1,83	0,50	6	1	0	7
57	C	9,7	21.5.2021	7,8	38,0	1,95	0,40	2	0	0	2
58	C	9,7	21.5.2022	11,0	39,9	2,18	0,60	5	1	0	6
59	C	9,7	21.5.2023	14,6	45,1	0,08	0,03	1	1	1	3
60	C	9,7	21.5.2024	11,5	39,0	0,70	0,21	0	0	1	1
61	C	898,6	21.5.2025	10,3	39,7	15,9	4,13	0	0	0	0
62	C	898,6	21.5.2026	9,6	36,4	14,3	3,78	4	1	0	5
63	C	898,6	21.5.2027	5,8	25,7	17,1	3,86	8	1	0	9
64	C	898,6	21.5.2028	7,4	31,9	21,0	4,86	7	1	1	9
65	C	898,6	21.5.2029	8,2	39,8	17,7	3,65	0	0	0	0
66	C	95,6	21.5.2030	9,8	36,6	8,63	2,31	7	0	1	8
67	C	95,6	21.5.2031	11,3	41,1	3,96	1,09	6	0	0	6
68	C	95,6	21.5.2032	15,2	59,9	8,43	2,14	6	2	0	8
69	C	95,6	21.5.2033	12,5	38,3	2,93	0,96	1	2	0	3
70	C	95,6	21.5.2034	8,2	39,9	16,0	3,28	1	0	3	4
71	C	< 0,96	21.5.2035	8,1	33,3	0,00	0,00	1	0	1	2
72	C	< 0,96	21.5.2036	6,2	27,4	0,00	0,00	1	0	0	1
73	C	< 0,96	21.5.2037	11,8	41,9	0,00	0,00	0	0	0	0
74	C	< 0,96	21.5.2038	10,8	39,7	0,00	0,00	0	0	0	0
75	C	< 0,96	21.5.2039	14,0	45,1	0,00	0,00	0	0	0	0