

**Pro gradu -tutkielma**

**Hydroksyyli-radikaalien muodostuminen järviveteen  
biogeenisessä Fentonin reaktiossa**

**Titta Kotiranta**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

13.09.2021

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

Titta Kotiranta: Hydroksyyliiradikaalien muodostuminen järviveden biogeenisessä Fentonin reaktiossa  
Pro gradu -tutkielma: 55 s., 4 liitettä (4 s.)  
Työn ohjaaja: Yliopistonlehtori Anssi Vähätalo  
Tarkastajat: Professori Tuula Tuhkanen ja yliopistonlehtori Sami Taipale

Syyskuu 2021

---

Hakusanat: 7-hydroksikumariini, DOC, DOM, heterotrofinen bakteeri, HPLC, humus, korkean erotuskyvyn nestekromatografia, kumariini, liennut orgaaninen hiili, makea vesi, oksidoreduktaasi, rauta, ROS, umbelliferoni

Tässä Pro gradu -tutkielmassa etsitään kokeellisesti vastausta siihen, osallistuvatko makean veden heterotrofiset bakteerit vesiympäristössä tapahtuvaan, voimakkaasti hapettavia hydroksyyliiradikaaleja ( $\cdot\text{OH}$ ) muodostavaan, Fentonin reaktioon. Tarkastellun mekanismin oletettiin aktivoituvan bakteerien oksidoreduktaasientsyymien välityksellä, jotka katalysoivat välillisesti vetyperoksidin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) muodostumista. Ferrorauta ( $\text{Fe}^{2+}$ ) toimi vedessä reaktion katalyyttina, minkä vuoksi rautapitoisissa humusvesissä reaktion odotettiin tapahtuvan nopeammin. Mekanismia testattiin kahdessa erilaisessa järvivedessä, joista toinen oli humuksinen (korkea DOC) ja rautapitoinen Nimetön ja toinen kirkasvetisempi (matala DOC) ja vähärautainen Vesijärvi. Tutkimuksen pääpainona oli mitata korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) järvivesinäytteissä syntyviä hydroksyyliiradikaaleja käyttämällä kumariinia (2H-1-bentsopyran-2-oni) koetinmolekyylinä. Hydroksyyliiradikaaleja muodostui molemmissa järvivesissä, mutta tulokset viittasivat abioottiseen muodostumisprosessiin biogeenisen Fentonin reaktion sijaan.  $\cdot\text{OH}$ :n mitatuissa konsentraatioissa oli kuitenkin merkittäviä eroja järvien välillä, joiden pääteltiin johtuvan (1) järvien erilaisista DOC-pitoisuuksista (2) rautapitoisuudesta, (3) raudan kyvystä kompleksoitua humusmolekyyleihin ja mahdollisesti (4) järvien erilaisista mikrobiyhteisöistä, jotka reagoivat hydroksyyliiradikaaleihin eri tavoin.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Environmental Science

Titta Kotiranta: Biogenic hydroxyl radical production via Fenton reaction  
in fresh waters  
MSc Thesis: 55 p., 4 appendices (4 p.)  
Supervisors: Senior lecturer Anssi Vähätalo  
Inspectors: Professor Tuula Tuhkanen, Senior lecturer Sami Taipale  
September 2021

This study examines the possible involvement of fresh water heterotrophic bacteria in a series of chemical reactions that produce highly reactive and strongly oxidizing hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) in aquatic environment. This mechanism leading to  $\cdot\text{OH}$ -producing reaction (Fenton reaction) was suggested to be triggered by bacterial oxidoreductase enzymes, through which bacteria indirectly catalyze the formation of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in water column. Since ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) catalyzes Fenton reaction, iron content in water column creates favourable conditions for the reaction to proceed. The mechanism was monitored in humic lake water (Nimetön), rich in dissolved organic carbon (DOC) and iron, along with non-humic lake water (Vesijärvi) with poor iron content and low amount of DOC. The focus of the study was to measure hydroxyl radicals generated in the lake water samples by high-performance liquid chromatography (HPLC) using coumarin (2H-1-Benzopyran-2-one) as a probe molecule. Hydroxyl radicals were present in both lake waters though instead of the biogenic Fenton reaction the results strongly suggested that an abiotic process was responsible for the  $\cdot\text{OH}$ -formation in the water samples. Cumulative concentrations of  $\cdot\text{OH}$  between the two lakes were observed to be significantly different, which were concluded to be due to (1) differences in the DOC concentrations, (2) the iron contents of the lake waters, (3) the tendency of humic substances to chelate iron in water column, leading to the formation of complexes, and finally (4) the differences between microbial communities and microbial responses against aquatic ROS-formation.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TUTKIMUKSEN TAUSTA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Liuennut orgaaninen hiili, DOC .....	3
2.2 Liuenneen orgaanisen hiilen koostumus.....	6
2.2.1 Humus.....	6
2.2.1.1 Humusaineiden luokittelu .....	6
2.2.1.2 Humusaineiden alkuainekoostumus.....	7
2.2.2 Muut komponentit .....	8
2.3 Heterotrofisten bakteerien entsyymaattinen hajotustoiminta .....	9
2.4 Biogeeninen Fentonin reaktio .....	10
2.4.1 Haber-Weiss-sykli ja Fentonin reaktio.....	10
2.4.2 Biogeeninen superoksidin muodostuminen.....	12
2.4.3 Biogeenisen Fentonin reaktion mekanismi .....	14
<b>3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materiaalit.....	15
3.1.1 Järvivesinäytteet .....	15
3.1.2 Reagenssit .....	16
3.2 Menetelmät .....	16
3.2.1 Kokeelliset menetelmät.....	16
3.2.1.1 Koejärjestely .....	16
3.2.1.2 Kumariinikoetin •OH:n kvantifioinnissa .....	18
3.2.2 Laskennalliset menetelmät.....	19
3.2.2.1 Hydroksyyliiradikaalinelujen laskeminen.....	19
3.2.2.2 Hydroksyyliiradikaalien kvantifiointi.....	20
3.2.2.3 7-hydroksikumariinin pitoisuuden muutosnopeuden määrittäminen .....	22
3.2.2.4 Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin biologinen hajoaminen .....	23

3.2.3 Analyyttiset menetelmät .....	23
3.2.3.1 HPLC-laitteisto .....	24
3.2.3.2 HPLC-näytteiden valmistaminen .....	24
3.2.3.3 HPLC-laitteen ajo-ohjelman tiedot.....	24
3.2.3.4 HPLC-standardit .....	25
3.2.4 Tilastolliset menetelmät.....	27
3.2.5 Menetelmien laadunvarmistus.....	28
<b>4 TULOKSET .....</b>	<b>29</b>
4.1 •OH:n muodostuminen autoklavoiduissa näytteissä.....	29
4.2 •OH:n muodostuminen mikrobeja sisältävissä näytteissä.....	32
4.2.1 •OH:n muodostuminen matalan DOC:n vesissä (Vesijärvi) .....	33
4.2.2 •OH:n muodostuminen korkean DOC:n vesissä (Nimetön).....	35
4.3 Tilastolliset analyysit.....	41
<b>5 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>42</b>
5.1 Järvivesinäytteissä muodostuneet hydroksyyliiradikaalit .....	42
5.2 Huomioita autoklavoiduista näytteistä .....	44
5.3 Mikrobiyhteisön yhteys hydroksyyliiradikaalien muodostuminen.....	44
<b>6 JOHTOPÄÄTÖKSET .....</b>	<b>45</b>
<b>KIITOKSET .....</b>	<b>46</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>46</b>
<b>LIITE 1. HPLC-standardien pitoisuudet ja pinta-alat.....</b>	<b>52</b>
<b>LIITE 2. Käyrien sovituksissa käytetyt funktiot .....</b>	<b>53</b>
<b>LIITE 3. Riippumattomien otosten t-testi: järvien välinen vertailu .....</b>	<b>54</b>
<b>LIITE 4. Riippumattomien otosten t-testi: järvien sisäinen vertailu.....</b>	<b>55</b>

## SANASTO JA LYHENTEET

### SANASTO

**Oksidoreduktaasit** Luokka entsyymejä, jotka siirtävät elektroneja molekyylyltä toiselle

### LYHENTEET

**DOC** Liuennut orgaaninen hiili  
(engl. *Dissolved organic carbon*)

**FA** Fulvohappo  
(engl. *Fulvic acid*)

**HA** Humushappo  
(engl. *Humic acid*)

**HPLC** Korkean erotuskyvyn nestekromatografia  
(engl. *High-performance liquid chromatography*)

**POC** Partikkelimuotoinen orgaaninen hiili  
(engl. *Particulate organic carbon*)

**ROS** Reaktiiviset hapen lajit  
(engl. *Reactive oxygen species*)

# 1 JOHDANTO

Liuennut orgaaninen aines (DOC) näyttäytyy suuremmassa mittakaavassa osana hiilen kiertoa ja sitä kautta myös osana hiilen kiertoon liittyviä globaaleja ilmiöitä, kuten ilmastonmuutosta ja hiilipohjaisten saasteiden kertymistä ympäristöön. Yksi viimeisen vuosikymmenen merkittävimmistä globaaleista ympäristön pilaantumisen muodoista on ollut muovirokkan päätyminen maailman vesistöihin (Wagner ja Lambert 2018). Muovit voidaan luokitella orgaanisiksi yhdisteiksi hiilipohjaisen rakenteensa takia. Jauhautuessaan läpimitaltaan 0,45 µm:ä pienemmiksi partikkeleiksi vesistöön päätyneet muovirae lukeutuu myös liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) operatiivisen kattokäsitteen alle. Suuren uhan eliökunnalle aiheuttavat läpimitaltaan juuri mikrokokoiset muovipartikkelit, jotka ovat hienontuneet vesissä yleensä valokemiallisissa reaktioissa auringon UV-säteilyn vaikutuksesta (Mostofa ym. 2013a, Wagner ja Lambert 2018). Ongelmana on muovien huono hajoavuus ja kertyminen organismeihin ravintoverkoissa (Eerkes-Medrano ym. 2015, Ivleva ym. 2017, Wagner ja Lambert 2018).

Vesistöissä merkittävimmät orgaanisen aineen hajoamisen mekanismit ovat abioottinen valokemiallinen hajoaminen (fotolyysi) ja valokemian ja biologisen hajotustoiminnan yhdistelmä, jossa DOC valohajoaa helpommin biohajoaviksi substraateiksi, joita bakteerit pystyvät paremmin hajottamaan (Münster ja De Haal 1998, Mostofa ym. 2013a). DOC:n abioottista hajoamista voimistaa erityisesti rautapitoisessa vedessä UV-säteilyn käynnistämä Fentonin reaktio (foto-Fenton), joka muodostaa veteen voimakkaasti ainetta hapettavia reaktiivisia hapen lajeja (ROS) (tässä tapauksessa superoksidiradikaalianioneja  $O_2^{\bullet-}$ , vetyperoksidia  $H_2O_2$  ja hydroksyyliiradikaaleja  $\bullet OH$ ) (Mostofa ym. 2013b, Gligorovski ym. 2015). Hapettuminen tekee aineesta bakteereille helpommin käsiteltävää ja edistää sen hajoamista (Mostofa ym. 2013b).

UV-säteilyä on kuitenkin saatavilla ainoastaan valoisaan aikaan vuorokaudesta ja se ulottuu järvessä foottiselle vyöhykkeelle, joka kattaa vain marginaalisen osan koko vesipatsaasta (Vähätalo ym. 2021). Tässä työssä tutkitaan vastaavaa Fentonin mekanismiin pohjautuvaa aineen mahdollista hajoamismekanismia, jossa UV-säteilyn sijaan Fentonin reaktion käynnistävät bakteerimetaboliasta solun ulkopuolelle vapautuvat elektronit (Vähätalo ym. 2021). Bakterilähtöinen, biogeeninen,  $\cdot\text{OH}$ -tuotanto ei olisi valon rajoittamaa, mikä mahdollistaisi reaktion tapahtumisen myös syvemmillä vesipatsaassa, jossa valoa on vähemmän saatavilla (Vermilyea ym. 2010), mikä vuorostaan lisäisi hapettavien yhdisteiden muodostumista vesipatsaaseen ja voisi johtaa myös vaikeasti hajoavan orgaanisen aineksen heikentymiseen ja biologiseen hajoamiseen vesistössä (Goldstein ym. 2002, Diaz ja Plummer 2018, Vähätalo ym. 2021).

Biologinen hajoaminen vesistössä liittyy vesiekosysteemin mikrobisilmukassa (*microbial loop*) elävien heterotrofisten bakteerien mm. hydrolysoivilla entsyymeillä tapahtuvaan hajotustoimintaan (Tranvik ja Hessen 1998, Arnosti 2002, Mostofa ym. 2013a). Vähätalon ym. (2021) esittämässä biogeenisessä Fentonin mekanismeissa näistä heterotrofisten bakteerien entsyymeistä oksidoreduktaasit saavat mahdollisesti toiminnallaan aikaan Fentonin reaktioon johtavan kemiallisten reaktioiden sarjan.

Vähätalon ym. (2021) esittämä mahdollinen biogeeninen Fentonin mekanismi sivuaa Taipaleen ym. (2019) aiempaa tutkimusta, jossa humusjärven mikrobeille tehdyissä rasvahappoanalyysissä havaittiin jäänteitä  $^{13}\text{C}$ -leimattujen mikromuovien (polyeteeni) sisältämästä hiilestä. Samaa ei kuitenkaan havaittu kirkasvetisessä järvessä. Humuksisuuden (korkean DOC-pitoisuuden) arveltiin olevan avaintekijä mikromuovin biologisessa käsittelyssä. Humuksen yhteys vedessä tapahtuvaan Fentonin reaktioon on humuksen taipumus kelatoida vedessä esiintyvää rautaa, mikä johtaa oletukseen, että humuksiset vedet ovat samalla rautapitoisia. Koska Fentonin reaktion käynnistymiseen tarvitaan rautaa, voidaan päätellä, että humuksisissa vesissä, joissa rautaa on paljon, syntyy Fentonin reaktion kautta enemmän hydroksyyliiradikaaleja verrattuna kirkkaaseen veteen, jossa



humusta ja sen myötä rautaa, on vähemmän. Tämän vuoksi tarkasteluun on valittu sekä kirkasvetinen järvi (Vesijärvi) että humuksinen järvi (Nimetön).

Tutkielman tarkoituksena ja tutkimuskysymyksenä on, ovatko vesistöjen mikrobit vastuussa hydroksyyliiradikaalien ( $\cdot\text{OH}$ ) muodostumisesta Fentonin reaktion kautta valottomissa olosuhteissa?

Tutkimuksen hypoteesit: (1) heterotrofiset bakteerit osallistuvat vedessä tapahtuvaan Fentonin reaktioon ja vaikuttavat siten hydroksyyliiradikaalien ( $\cdot\text{OH}$ ) muodostumiseen, (2) hydroksyyliiradikaaleja ( $\cdot\text{OH}$ ) syntyy enemmän rautapitoisessa vedessä.

## 2 TUTKIMUKSEN TAUSTA

### 2.1 Liuennut orgaaninen hiili, DOC

Liuennut orgaaninen hiili (DOC) (*dissolved organic carbon*) on nimitys veteen liuenneille eloperäisille aineille, joiden hiukkaskoko on pienempi kuin  $0,45\ \mu\text{m}$  (Thurman 1985). Sitä suurempia hiukkasia kutsutaan partikkelimuotoiseksi hiileksi (POC) (*particulate organic carbon*). Partikkelimuotoiseen hiileen lukeutuvat eläin- ja kasviplankton, osa bakteereista ja kuolleesta kasvimateriaalista (Thurman 1985).

Luonnonvesien kokonaishiilestä (TOC) noin 10 % on POC:tä ja noin 90 % DOC:tä (Thurman 1985) (Kuva 1). Liuenneen ja partikkelimuotoisen fraktion välillä on suurikokoisia humusmolekyylejä sisältävä kolloidinen fraktio ( $\leq 10\%$  DOC:stä), joka mielletään hiukkaskokonsa puolesta myös DOC:ksi (Thurman 1985). Vesistön tilasta riippuen noin 15 % DOC:stä on helposti hajoavia, molekyylipainoltaan kevyitä yhdisteitä (LDOC), kuten hiilihydraatteja, aminohappoja ja rasvahappoja (Palviainen ja Finér 2013). Humuksisissa järvissä, joissa DOC:n pitoisuus on korkea ja vesi on ruskeaksi värjäytynyttä, helposti hajoavan LDOC:n osuus kaikesta DOC:stä on vain 1-5 % (Münster ja de Haan 1998).

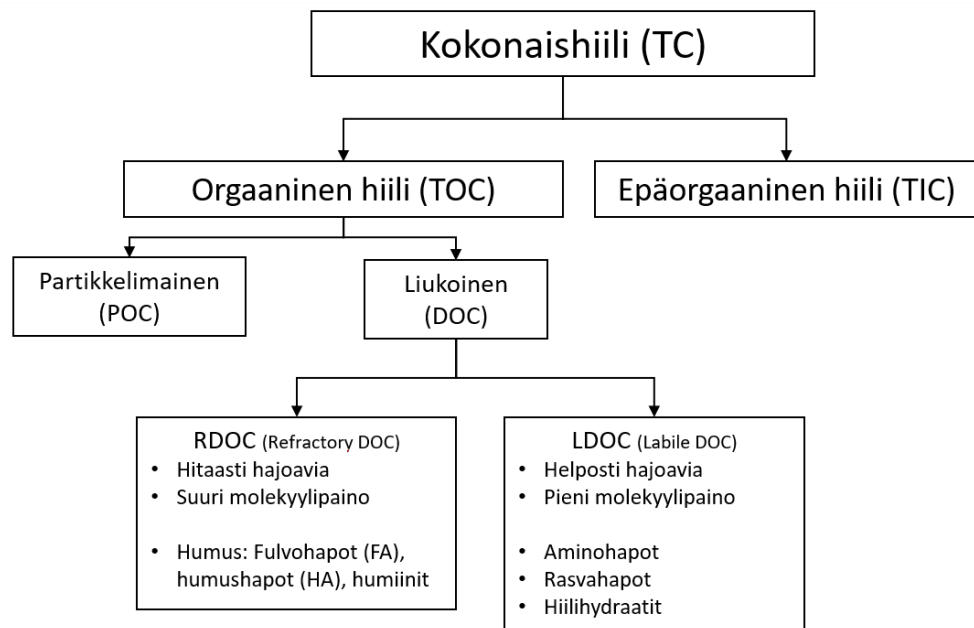
Muu osuus (RDOC engl. *refractory dissolved organic carbon*) muodostuu pääasiassa humusaineista, jotka ovat molekyylirakenteeltaan LDOC:tä suurempia ja kompleksisempia ja joiden biologinen hajoaminen on hidasta (Palviainen ja Finér 2013) (Kuva 2).

DOC koostuu kuolleesta biomassasta liuenneista aineista, maaperän hajottajien metabolian tuotteista, kasvien ja levien erittämistä biomolekyyleistä ja vesistön heterotrofisten bakteerien käsittelemästä POC:stä. Vesistöihin DOC päätyy kolmea reittiä: valuvesien mukana, huuhtoutumalla veteen suoraan kuolleesta kasvimateriaalista ja vesistön sisäisistä prosesseista kasvien, levien ja bakteerien toiminnan seurauksena. Veden hidas virtaama ja vähähappiset olosuhteet edistävät orgaanisen hiilen kumuloitumista. Tehokas aerobinen hajottaminen tapahtuu vain veden pintakerroksessa, jossa valoa ja happea on helposti saatavilla. Siirryttäessä syvemmälle, valo ja hapen määrä vähenevät, jolloin myös hajotustoiminta vähenee. Erityisesti järvissä, joissa happipitoisuus on alhainen, alusveden hajotustoimintaa dominoivat anaerobiset bakteerit. Anaerobinen hajottaminen on aerobista hitaampaa, mikä johtaa DOC:n kertymiseen vesistöön (Thurman 1985).

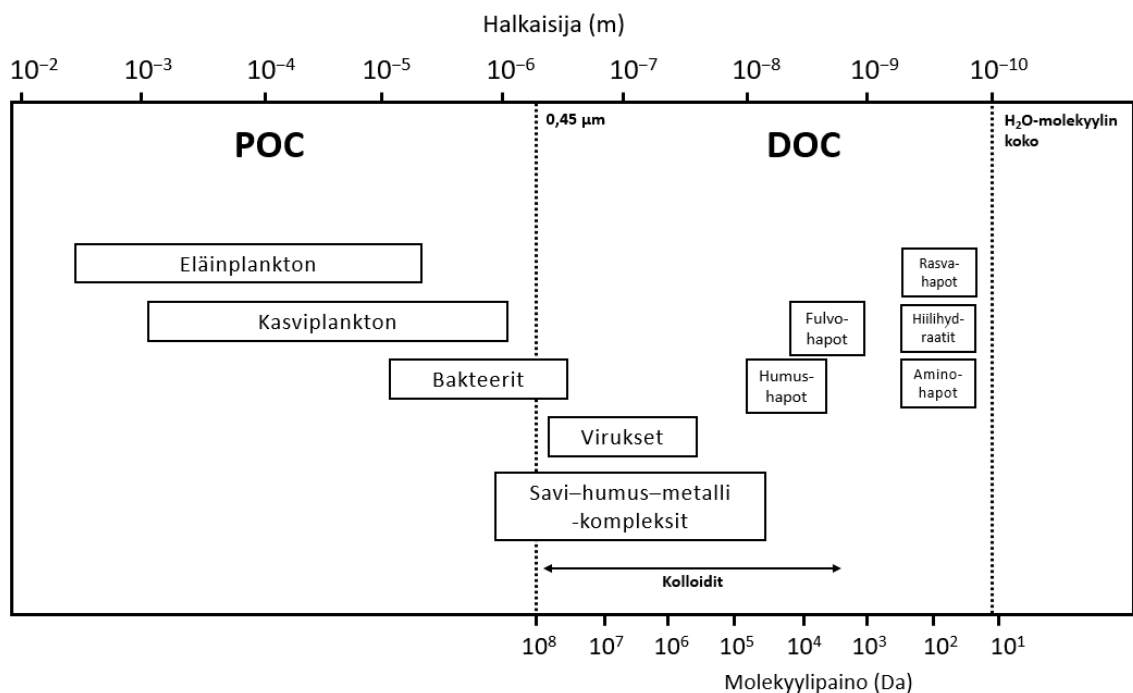
Orgaanisen hiilen pitoisuuden perusteella vesistölle voidaan antaa troofisen tilan luokitus (Taulukko 1), mikä antaa viitteitä vesistön biologisista ominaisuuksista: rehevämmissä järvissä DOC-pitoisuus on korkeampi kuin karummissa järvissä, joissa perustuotantoa on vähemmän (Thurman 1985).

Taulukko 1. Troofisen tilan luokitukset DOC-arvon mukaan. Liuenneen orgaanisen aineen pitoisuudet kasvavat rehevöitymisen myötä. Oligotrofinen viittaa karuun vesistöön, jossa on vähän perustuotantoa, eutrofinen rehevöityneeseen vesistöön ja mesotrofinen niiden välimuotoon (Thurman 1985).

Troofinen tila	DOC (mg l <sup>-1</sup> )
Oligotrofinen	1-3
Mesotrofinen	2-4
Eutrofinen	3-34



Kuva 1. Vesistön kokonaishiili (TC) muodostuu orgaanisesta (TOC) ja epäorgaanisesta (TIC) osuudesta, joista orgaaninen hiili voidaan jakaa partikkelimaiseen (POC) ja liukoiseen (DOC) fraktioon (Thurman 1985). DOC:stä suurin osa on huonosti hajoavaa (RDOC) ja muu osuus (LDOC) yksinkertaisempia orgaanisia molekyylejä, joiden biosaatavuus on humusaineita parempi (Palviainen ja Finér 2013). Muokattu: Palviainen ja Finér 2013.



Kuva 2. Partikkelimuotoisen (POC) ja liunneen orgaanisen hiilen (DOC) komponenttien kokogradientti. Muokattu: Thurman 1985 ja Verdugo ym. 2004.

## 2.2 Liuenneen orgaanisen hiilen koostumus

Liuenneelle orgaaniselle hiilelle (DOC) ei ole olemassa absoluuttista koostumusta, sillä mm. vesistön valuma-alueen ominaisuudet, vuodenaika ja aggregoituminen vaikuttavat molekyylien rakenteeseen (Zularisam ym. 2011). Voidaan sanoa, että DOC koostuu heterogeenisestä joukosta erilaisia orgaanisia molekyyliä (Kuva 2), joihin kuuluu lipidejä, aminohappoja, hiilihydraatteja, ligniiniperäisiä fenoleita, sekä humusaineita: humus- ja fulvohappoja (Perdue ja Ritchie 2005).

### 2.2.1 Humus

Humusaineet ovat joukko biopolymeerejä, jotka ovat peräisin hajonneesta tai hajoavasta biomassasta (MacCarthy 2001). Ne värjäävät veden ruskean tai kellertävän sävyiseksi (Thurman 1985, Nürnberg ja Shaw 1999). Ne vaikuttavat myös veden pH-arvoon; Suomessa järviveden pH on usein humuksen takia yleensä lievästi hapan (pH 6,5–6,8) (Oravainen 1999).

Humuksen osuus voi olla karkeasti 40-90 %:a DOC:stä järven ominaisuuksista riippuen (Thurman 1985, MacCarthy 2001). Soisilla alueilla järvien DOC-pitoisuudesta (tyypillisesti DOC = 20–50 mg l<sup>-1</sup>) jopa 90 %:a voi koostua humusaineista. Tällaisia järviä kutsutaan myös humusjärviksi, sillä humusaineiden aiheuttama veden värjäytyminen on usein nähtävissä veden ruskeasta väristä (Thurman 1985, Hessen 1999). Tummempi sävy viittaa humusaineista fulvohappojen läsnäoloon, joita muodostuu erityisesti rasva- tai karboksyylihappopitoisen karikkeen biologisesta prosessoinnista (Thurman 1985).

#### 2.2.1.1 Humusaineiden luokittelu

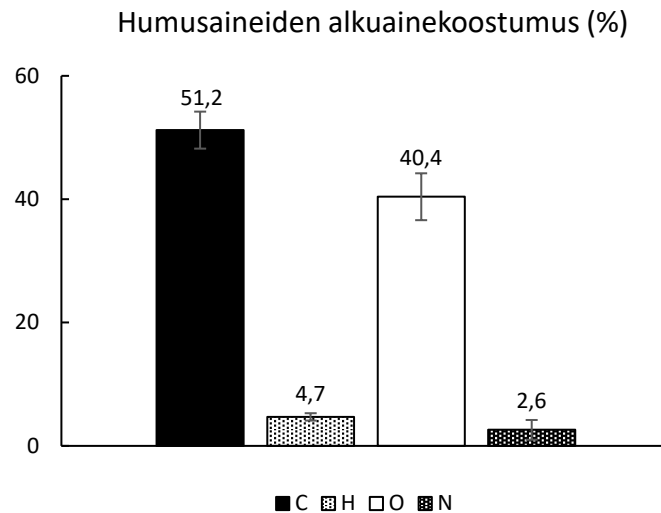
Humusaineiden erotteluun vesinäytteistä käytetään makrohuokoisia XAD-hartseja, jotka toimivat hydrofobisten happojen adsorbentteina. XAD-hartsimenetelmän perusteella humusaineet voidaan luokitella kahteen pääryhmään: (1) fulvohapot (FA) ja (2) humushapot (HA) (Aiken ym. 1979).

Humus- ja fulvohapot adsorboituvat XAD-hartsiiin happamassa liuoksessa, jonka jälkeen niiden fraktiot voidaan erottaa laskemalla liuoksen pH arvoon 1, jolloin HA saostuvat ja FA jäävät liukoiseen muotoon (Aiken ym. 1979, Peuravuori 2000). Humushapot sisältävät fulvohappoja enemmän liukoisuutta heikentäviä aromaattisia ja alifaattisia rakenteita (ks. Taulukko 2), joiden takia ne liukenevat paremmin emäksisiin liuottimiin (Anderson ym. 2001).

HA muodostavat noin kymmenyksen luonnonvesien DOC:stä (Thurman 1985). Ne ovat myös molekyylipainoltaan fulvohappoja raskaampia (Anderson ym. 2001) ja sisältävät myös hapetus-pelkistys-reaktioihin elektroneja välittäviä katekoli- ja kinoniryhmiä (Paciolla ym. 1999, Anderson ym. 2001). Humushapot reagoivat vesimatriisiin raudan kanssa suurella affiniteetilla muodostaen helposti komplekseja (Thurman 1985, Paciolla ym. 1999).

#### 2.2.1.2 Humusaineiden alkuainekoostumus

Alkuainekoostumukseltaan noin puolet humusmolekyylistä on hiiltä, happea on 35–40 %:a, vetyä 4–5 %:a ja typpeä 1 % (Thurman 1985), mikä myötäilee myös MacCarthy (2001) kokeellisesti määritettyjä alkuainekoostumuksia makean veden humukselle (Kuva 3). Jäljelle jäävä osuus on muita aineita, esimerkiksi molekyyliin kompleksoituneita metalleja, tai jotain muuta orgaanisissa rakenteissa esiintyvää ainetta, kuten fosforia (Thurman 1985). Humusmolekyylit voivat muuntua ja aggregoitua vesiympäristössä poolisten rakenteiden takia (Anderson ym. 2001, MacCarthy 2001).



Kuva 3. Humusaineiden alkuainekoostumus. Humus- (HA) ja fulvohappojen (FA) alkuainekoostumus makeassa vedessä (MacCarthy 2001). Puuttuva prosenttiosuus selittyy muilla yhdisteillä (esim. metallikationit), joita humusmolekyyleihin voi liittyä ympäröivästä matriisista. (Thurman 1985).

### 2.2.2 Muut komponentit

DOC voi sisältää myös hiilihydraatteja, proteiineja, aminohappoja, karboksyylihappoja, lipidejä, fenoleita, steroleita, alkoholeja ja eräitä muita vesiliukoisia orgaanisia happoja (Aitkenhead-Peterson ym. 2002, Mostofa ym. 2009). Tranvik ja Jørgensen (1995) tuovat tutkimuksessaan esiin humuksisen ja kirkasvetisen järven DOC-koostumuksen suhteellisia eroja: hiilihydraatit muodostivat kaikesta DOC:stä kirkasvetisissä järvessä n. 24,9 % ja humuksisessa järvessä 4,5 % ja aminohapot vastaavasti kirkasvetisessä järvessä 9,8 % ja humuksisessa järvessä 3,2 % kaikesta DOC:stä.

Taulukko 2. Tärkeimmät liuenneen orgaanisen hiilen sisältämät funktionaaliset ryhmät, niiden rakenteet ja molekyylit, joissa rakenteet esiintyvät. "R" on molekyylin alifaattinen runko ja "Ar" aromaattinen rengasrakenne (Suomennettu: Thurman 1985).

Funktionaalinen ryhmä	Rakenne	Esiintyminen
Happamat ryhmät		
Karboksyylihappo	$R-CO_2H$	90 % kaikesta DOC:stä
Enolinen H	$R-CH=CH-OH$	Akvaattinen humus
Fenolinen OH	$Ar-OH$	Akvaattinen humus, fenolit
Kinoni	$Ar=O$	Akvaattinen humus, kinonit
Neutraalit ryhmät		
Alkoholinen OH	$R-CH_2-OH$	Akvaattinen humus, hiilihydraatit
Eetteri	$R-CH_2-O-CH_2-R$	Akvaattinen humus
Ketoni	$R-C=O(-R)$	Akvaattinen humus, haihtuvat yhdisteet, ketohapot
Aldehydi	$R-C=O(-H)$	Hiilihydraatit
Esteri, laktoni	$R-C=O(-OR)$	Akvaattinen humus, tanniinit, hydroksihapot
Emäksiset ryhmät		
Amiini	$R-CH_2-NH_2$	Aminohapot
Amidi	$R-C=O(-NH-R)$	Peptidit

### 2.3 Heterotrofisten bakteerien entsymaattinen hajotustoiminta

Vedessä elävät bakteerit saavat merkittävän osan kasvuun ja soluhengitykseen vaadittavasta ravinteista DOC:tä hajottamalla (Benner 2002), mikä selittää runsaampaa bakteeriaktiivisuutta humuksisissa vesissä, joissa DOC:tä on paljon. Heterotrofiset bakteerit kilpailevat DOC:n helpommin biosaatavasta osasta

(LDOC), tehokkaimmin huonosti hajoavaa RDOC:a mineralisoivat lajit pärjäävät humusvesissä, joissa suuri osa DOC:sta on huonosti hajoavaa (Thurman 1985, Arnosti 2002).

Vesiympäristön heterotrofiset bakteerit käsittelevät DOC:a solun ulkoisilla entsyymeillä, joiden tarkoituksena on hydrolysoida molekyylejä solukalvon läpäisyyn paremmin soveltuviksi (Arnosti 2002). Entsyymit voivat olla täysin ulkoisia irrallaan organismista, tai kiinnittyneinä bakteerin ulkokalvoon (Arnosti 2002). Bakteerit säätelevät entsyymiaktiivisuutta spesifisti ravinteiden tarpeen ja mineralisoitavan DOC:n määrän ja sen kemiallisen koostumuksen perusteella (Arnosti 2002, Benner 2002, Findlay 2002). Entsyymeistä katalaasien, peroksidaasien ja superoksididismutaasien avulla bakteerit myös suojautuvat ROS:iden hapettavalta vaikutukselta. Näiden entsyymien synteesi vaatii rautaa, jota humuksisessa vedessä on ylimäärin hyödynnettävissä. Tämän perusteella humuksisen, rautapitoisen, järven bakteereilla lähtökohdat suojautua solurakenteita hapettavia yhdisteitä vastaan ovat paremmat, kuin vähärautaisen, matalan DOC:n, järven bakteereilla (Maranger ja Pullin 2002).

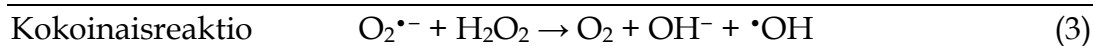
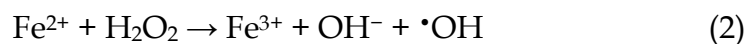
## 2.4 Biogeeninen Fentonin reaktio

### 2.4.1 Haber-Weiss-sykli ja Fentonin reaktio

Haber-Weiss-sykli (Kaavat 1–3) on reaktioiden sarja, jossa reaktiivisten hapen yhdisteiden (ROS:iden), superoksidin ( $O_2^{\cdot-}$ ) ja vetyperoksidin ( $H_2O_2$ ), sekä ferroraudan (Fe(II)) läsnäolo mahdollistavat hydroksyyliiradikaalien ( $\cdot OH$ ) muodostumisen. Fentonin reaktio (Kaava 2) on Haber-Weiss-syklin osareaktio, jossa muodostuu hydroksyyliiradikaaleja. Fentonin reaktio käynnistyy Fe(II):n reagoiessa vetyperoksidin ( $H_2O_2$ ) kanssa muodostaen hydroksyyliiradikaaleja ( $\cdot OH$ ). (Gligorovski ym. 2015). Haber-Weiss-sykliin ja Fentonin reaktioon liittyvät ROS:t elävät vesiympäristössä mikrosekunneista päiviin (Taulukko 3) (Diaz ja Plummer 2018).



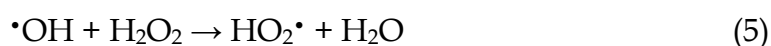
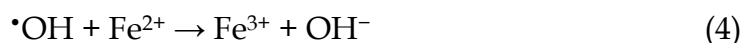
Haber-Weiss-sykli:



Taulukko 3. Reaktiivisten hapen yhdisteiden elinikä vesiympäristössä (Suomennettu: Diaz ja Plummer 2018).

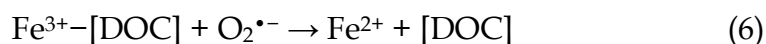
ROS	Tyypillinen konsentraatio (mol l <sup>-1</sup> )	Elinikä
Superoksidi, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	10 <sup>-12</sup> – 10 <sup>-9</sup>	sekunti – minuutti
Vetyperoksidi, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-6</sup>	tunteja – päiviä
Hydroksyyli-radikaali, •OH	10 <sup>-18</sup> – 10 <sup>-15</sup>	mikrosekunteja

Hydroksyyli-radikaalit voivat reagoida edelleen ympäristön ferroraudan (Kaava 4) tai vetyperoksidin (Kaava 5) kanssa, tai hapettaa vesimatriisin muita yhdisteitä, kuten DOC:tä (Goldstone ym. 2002, Gligorovski ym. 2015). DOC:n hapettuessa muodostuu erilaisia happamia yhdisteitä, kuten muurahais-, etikka-, palorypäle-, oksaali-, maloni- ja sukkiinihappoja (Brinkmann ym. 2003).

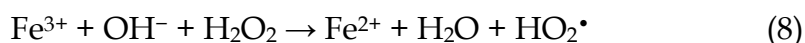
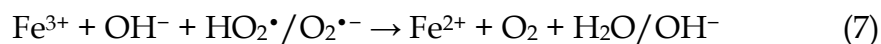


Fentonin reaktioon tarvittavaa ferrorautaa saadaan esimerkiksi O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:n pelkistäessä veden ionimuotoista ferrirautaa (Kaava 1) (Gligorovski ym. 2015). Liukoisten ionien lisäksi rautaa voi olla vedessä kompleksoituneena muuhun ainekseen (Thurman 1985, Paciolla ym. 1999). Humuksisissa vesissä rauta kompleksoituu

helposti DOC:n kanssa (Thurman 1985, Paciolla ym. 1999), jolloin  $O_2^{\bullet-}$ :n hapettaessa Fe(III)–DOC-kompleksin (Kaava 6) ionimuotoinen Fe(II) vapautuu veteen, jonka jälkeen se voi käyttäytyä Fentonin reagenssina (Kaava 2), tai reagoida muodostuneen  $\bullet OH$ :n kanssa (Kaava 4). Molemmissa tapauksissa rauta hapettuu takaisin ferrimuotoon. (Gligorovski ym. 2015).



Ferrimuotoinen rauta voi reagoida vedessä kaavoissa 1, 7 ja 8 esitetyillä tavoilla, jolloin veteen muodostuu lisää ferrorautaa, mikä katalysoi  $\bullet OH$ -tuotantoa (Xiao ym. 2020). Humuksen arvellaan voimistavan Fentonin reaktiota runsaan kompleksoituneen raudan takia (Gligorovski ym. 2015).



#### 2.4.2 Biogeeninen superoksidin muodostuminen

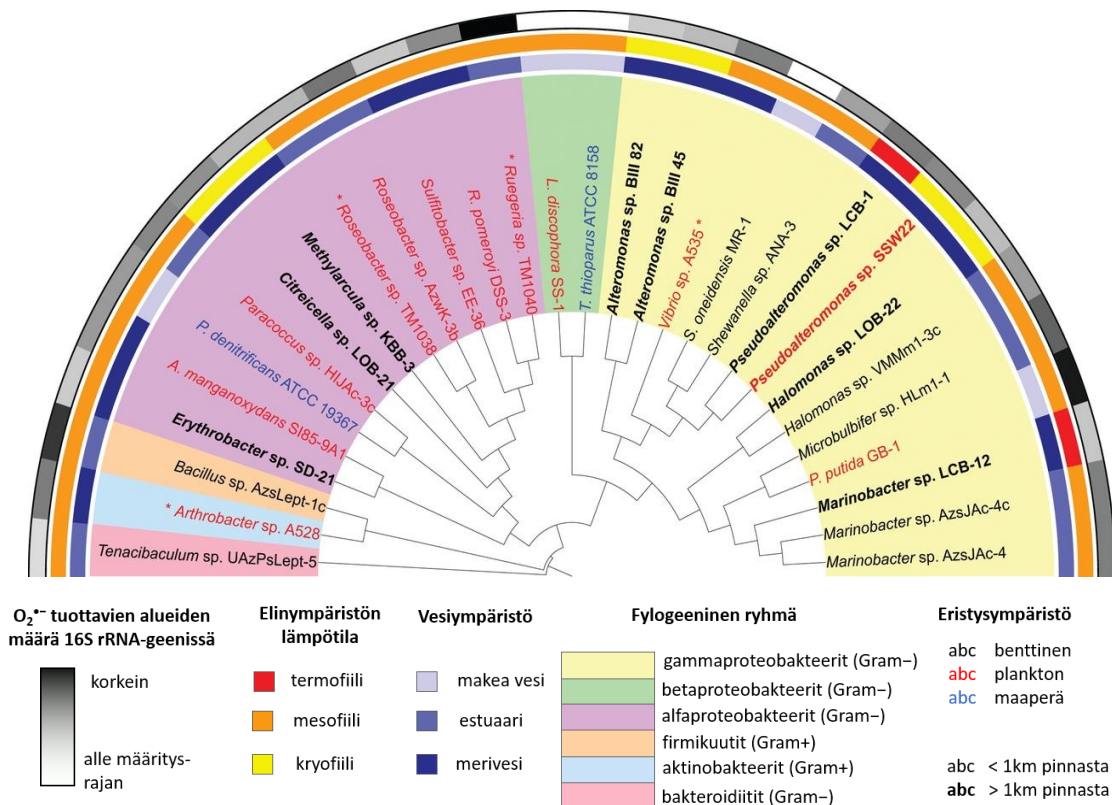
Biogeenisyys tarkoittaa reaktion käynnistyvän biologisesta prosessista. Tarkasteltavassa reaktiomekanismissa biogeenisyys viittaa Fentonin reaktion käynnistävän superoksidin ( $O_2^{\bullet-}$ ) biologiseen muodostumistapaan (Gligorovski ym. 2015, Diaz ja Plummer 2018).

Superoksidi muodostuu veteen heterotrofisen bakteerin tuottaessa elektronin ( $e^-$ ) solunulkoiseen tilaan oksidoreduktaasientsyymien välityksellä (Saran 2003, Diaz ym. 2013, Diaz ja Plummer 2018). Oksidoreduktaasivälitteisesti siirretyt  $e^-$ :t pelkistävät solun ulkopuolella happimolekyylejä ( $O_2$ ) superoksidiksi ( $O_2^{\bullet-}$ ) tai hydroperoksidiradikaaliksi ( $HO_2^{\bullet}$ ) ( $pK = 4,8$ ) (Kaava 9), joka disproporitoituu vesimatriisissa vetyperoksidiksi (Buxton ym. 1988, Saran 2003, Gligorovski ym. 2015). Bakteerien monista oksidoreduktaaseista ainakin NAD(P)H-oksidoreduktaasit kykenevät solunulkoiseen  $O_2^{\bullet-}$ :n muodostamiseen (Diaz ym. 2013). Diazin ym. (2013) raportoimista  $O_2^{\bullet-}$ :ja muodostavista lajeista viisi elää makeissa vesissä ja loput 25 joko meri- tai murtovesissä (Kuva 4).

Koska oksidoreduktaasivälitteinen superoksidien muodostuminen on valosta riippumatonta, superoksidien muodostumista voi tapahtua myös syvemmällä vesipatsaassa (Diaz ja Plummer 2018).



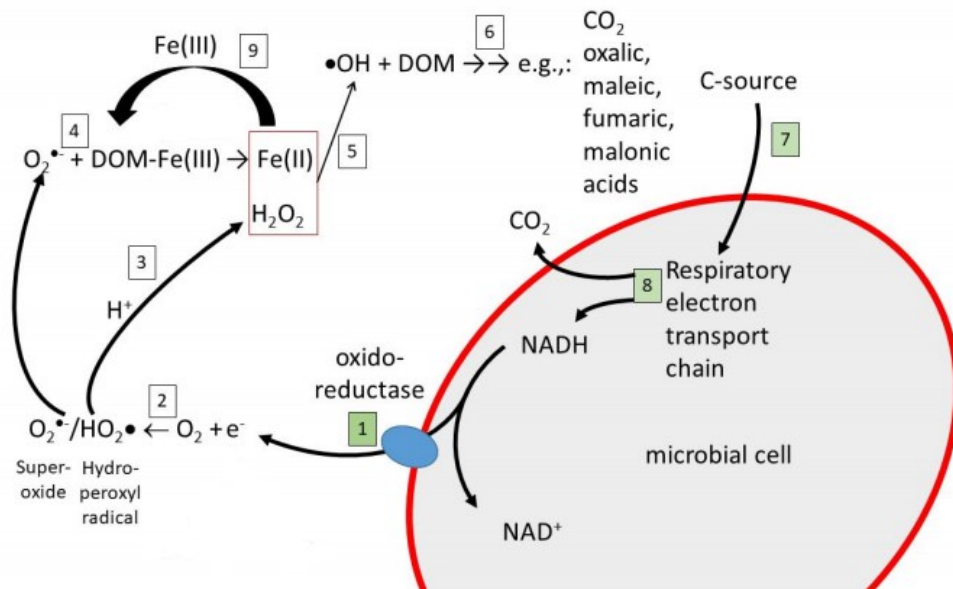
Makeissa vesissä ja maaperässä elävien bakteerien oksidoreduktaasigeenit ovat osittain yhtäläisiä, mikä voi johtua näiden bakteerien hajottaman aineksen samankaltaisuudesta. Molemmista habitaateista löytyy aromaattisia rakenteita sisältävää humusta ja esimerkiksi ligniiniä (Ramírez-Flandes ym. 2019). Oksidoreduktaaseista betaiinaldehydidehydrogenaasi (EC 1.2.1.8), hiilimonoksididehydrogenaasi (EC 1.2.99.2) ja stearyyli-KoA-desaturaasi (EC 1.14.19.1) esiintyivät molempien habitaattien bakteerien genomissa (Ramírez-Flandes ym. 2019).



Kuva 4. Solun ulkoiseen superoksidien tuotantoon kykeneviä bakteereita. Makeissa vesissä superoksidituotanto on pystytty todentamaan ainakin viidellä lajilla. Asteriskilla merkityt lajit ovat peräisin jostain muusta organismista, tai ne ovat olleet osana suurempaa symbioottista bakteeriyhteisöä. Alkuperäinen: Diaz ym. 2013. Julkaistu uudelleen AAAS:n luvalla.

### 2.4.3 Biogeenisen Fentonin reaktion mekanismi

Biogeenisen Fentonin reaktion mekanismi (Kuva 5) yhdistää bakteerien entsyymitoimintaa ja Haber-Weiss-syklin kemiallisia reaktioita: Bakteerien oksidoreduktaasivälitteisesti muodostama superoksidi käynnistää vesimatriisissa Fentonin reaktion, jossa muodostuu hydroksyyliiradikaaleja (Diaz ym. 2013, Gligorovski ym. 2015). Koska hydroksyyliiradikaali on voimakas hapetin, se voi potentiaalisesti hajottaa muuten huonosti hajoavaa ainesta, esimerkiksi DOC:tä, mutta vaarana on, että muodostuneet  $\bullet\text{OH}$ :t voivat samalla vaurioittaa bakteerien kalvomembraanin tyydyttymättömiä rasvahappoja, mikä johtaa solukalvon vaurioon ja bakteerisolun toiminnan häiriintymiseen (Cabiscol ym. 2000, Goldstone ym. 2002, Gligorovski ym. 2015). Biogeenistä Fentonin reaktiota on raportoitu myös kirjallisuudessa (Sekar ja DiChristina 2014, Gu ym. 2016, Xiao ym. 2016).



Kuva 5. DOC:n hajoaminen biogeenisessä Fentonin reaktiossa bakteerit osallistuvat DOC:n hajottamiseen. Kaavioon on kuvattu prosessin biokemialliset (vihreät laatikot) ja abiottiset (valkoiset laatikot) reaktiot. (1) bakteerisolun oksidoreduktaasi siirtää mikrobimetabolian pelkistämän elektronin solunulkoiseen tilaan (2) elektroni reagoi vedessä O<sub>2</sub>:n kanssa pelkistäen sen superoksidiksi (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) tai hydroperoksyyliradikaaliksi (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) (3) O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>•</sup> disproporitoituu vetyperoksidiksi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (4) Superoksidi pelkistää Fe(III)-DOM -kompleksin ferriraudan ferroioniksi (5) Fenton-reaktio (6) DOC hajoaa reagoidessaan hydroksyyliiradikaalin ( $\bullet\text{OH}$ ) kanssa (7) Muodostuu biosaatavia substraatteja, joita mikrobit hyödyntävät ravinnonlähteenä (8) Mikrobit metabolisoivat substraatteja, mikä mahdollistaa oksidoreduktaasien toiminnan jatkumisen (9) Fenton-reaktiosta syntynyt Fe<sup>3+</sup> sitoutuu DOC:hen (Vähätalo ym. 2021).

## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1 Materiaalit

#### 3.1.1 Järvivesinäytteet

Kokeessa tutkittiin kahden DOC-pitoisuudeltaan erilaisen järven mikrobisyhteisön osallistumista hydroksyyliiradikaalien tuotantoon. Tutkimuksen järvet valittiin niiden veden värin perusteella: toinen järvistä (Nimetön) oli selkeästi runsashumuksinen ja vesi oli humusaineista ruskeaksi värjäytynyttä ( $\text{DOC} = 22,6 \pm 1,1 \text{ mg l}^{-1}$ ) ja toinen (Vesijärvi) oli kirkasvetisempi ( $\text{DOC} = 5,4 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ ). Jaakko Litmanen keräsi vesinäytteet 15.7.2020, jonka jälkeen Jussi Vesämäki suodatti ne  $3,0 \mu\text{m}$ :n läpi (Pall® Corporation). Mikromuovien oli todettu hajoavan Nimettömän järvisedessä aiemmassa tutkimuksessa (Taipale ym. 2019).

Tutkimuksessa haluttiin selvittää muodostuuko humuksisessa, rautaa sisältävässä, vedessä enemmän hydroksyyliiradikaaleja, jonka vuoksi vertailuun valittiin vastaavasti myös kirkasvetinen järvi, jossa hydroksyyliiradikaalien tuotannon odotettiin olevan vähäisempää pienemmän rautapitoisuuden takia. Korkean DOC:n järvessä (Nimetön) rautaa oli enemmän:  $287,6 \pm 1,6 \mu\text{g l}^{-1}$  ja matalan DOC:n järvessä (Vesijärvi) raudan pitoisuus oli alle määritysrajan ( $< 3 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Lisäksi vesien pH mitattiin 16.7.2020, jolloin korkean DOC:n järven pH oli 5,80 ja matalan DOC:n järven 7,33. Vesinäytteitä inkuboitiin 16.7.2020-17.8.2020 välisen ajan, jotta helposti hajoava osuus liuenneesta orgaanisesta aineesta ehdittiin kuluttamaan vedestä. Inkubaation jälkeen (17.8.2020) pH-mittaukset suoritettiin uudelleen, jolloin korkean DOC:n järven pH oli 6,15 ja matalan DOC:n järven 7,76.

### 3.1.2 Reagenssit

Taulukko 4. Liuosten valmistuksessa käytetyt reagenssit.

Reagenssi	Valmistaja	Puhtaus (%)
Kumariini	Sigma-Aldrich	≥ 98,0
7-hydroksikumariini	Sigma-Aldrich	≥ 98,0
Asetonitriili (LiChrosolv®)	Merck KGaA	≥ 98,0
Etikkahappo (100 %)	Sigma-Aldrich	≥ 99,8

## 3.2 Menetelmät

### 3.2.1 Kokeelliset menetelmät

#### 3.2.1.1 Koejärjestely

Koejärjestelyssä haluttiin verrata eroaako mahdollinen biogeeninen Fentonin reaktio kirkasvetisessä ja humuksisessa järvessä. Hypoteesin mukaan raudan läsnäolo lisää  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumista, mikä näkyisi suurempana  $\cdot\text{OH}$ :n kumuloituneena pitoisuutena humuksisessa järvivedessä. Lisäksi kokeessa tarkasteltiin molemmista järvistä valmistettuja autoklavoituja näytteitä, joiden avulla selvitettiin, muodostuiko järvivesissä hydroksyyli-radikaaleja abioottisesti ilman mikrobeja. Koeasetelmalla tutkittiin samanaikaisesti muovien ja ligniinin hajoamista vesissä, mistä johtuvat lyhenteet näytteiden nimissä: Ligniini (lig), polyeteeni (PE), polypropeeni (PP) ja polystyreeni (PS). Tämän pro gradu -työn rajaus on kuitenkin hydroksyyli-radikaalien tuotannon määrittämisessä, minkä vuoksi muovien osuus tässä työssä rajoittuu näytteiden nimikkeisiin. Ligniinin hiilipitoisuus C% oli 63,4 %:a. Ligniinivalmisteen lisäys nosti käsittelyn

DOC-pitoisuutta  $21,0 \text{ mg C l}^{-1}$ , mikä huomioitiin hydroksyyliiradikaalien muodostumista laskettaessa.













Näytteet ( $n = 46$ ) valmistettiin 500 ml:n näytepulloihin, joista jokaiseen lisättiin 300 ml järvivettä (Kuva 6). Pullojen korkit olivat septumilla varustettuja kaasutiiviyden varmistamiseksi. Kuvan (Kuva 6) mukaisesti ligniini- ja muovikäsitteilyistä valmistettiin neljä toistoa molemmista järvivesistä. Näytteisiin lisättiin 1 ml 0,003 M:sta kumariinia (Taulukko 4), jotta kumariinin loppupitoisuudeksi näytteissä saatiin  $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Kumariini toimi koetinmolekyylinä hydroksyyliiradikaaleille ja sen pitoisuus määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC).

Kokeessa haluttiin selvittää kumariinin taustapitoisuus järvivesissä, minkä vuoksi molemmista järvivesistä valmistettiin käsittely, johon ei lisätty kumariinia (-) (neljä toistoa). Lisäksi valmistettiin bakteeritoimintaa kontrolloiva autoklavoitu käsittely, josta nähtiin, muodostuuko  $\cdot\text{OH}$ :a ilman bakteeritoimintaa.

Kokeen kesto oli kuusi viikkoa ( $t = 984 \text{ h}$ ), jonka aikana näytteet mitattiin kerran viikossa. Näytteenotto suoritettiin samassa tilassa, jossa näytteitä säilytettiin. Lämpötila laboratoriossa pidettiin  $+18 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa ja näytteet pidettiin viikoittaista näytteenottoa lukuun ottomatta pimeässä.

Ennen mittausten aloitusta vesinäytteitä inkuboitiin pimeässä huoneessa  $+18 \text{ }^\circ\text{C}$ :n lämpötilassa 16.7.2020-17.8.2020 välisen ajan. Vesinäytteet pidettiin inkubaation aikana ravistelijassa. Inkubaation aikana veden mikrobit ehtivät hajottaa vedestä helposti biohajoavan aineksen mahdollisimman perusteellisesti ja näytteisiin jäi tutkimuksen kannalta olennainen, huonosti hajoava, aines.

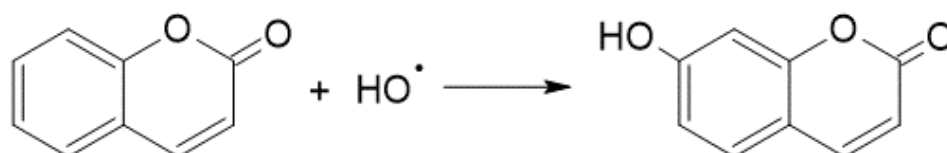
## Koeasetelma

Käsittelyt	Näytteet	
	Matala DOC (V=Vesijärvi)	Korkea DOC (N=Nimetön)
Polyeteeni (PE)	1 2 3 4 	1 2 3 4 
Polypropeeni (PP)	1 2 3 4 	1 2 3 4 
Polystyreeni (PS)	1 2 3 4 	1 2 3 4 
Ligniini (lig)	1 2 3 4 	1 2 3 4 
<b>Kontrollinäytteet</b>		
Ei lisättyä kumariinia (-)	1 2 3 4 	1 2 3 4 
Autoklaavattu vesi (A)	1 2 3 	1 2 3 

Kuva 6. Kuvaus koeasetelmasta. Siniset ja ruskeat palkit kuvaavat 500 ml näytepulloja, joista jokainen sisälsi 300 ml vesinäytettä. Autoklavoiduista käsittelyistä (A) valmistettiin kolme toistoa ja muista (PE, PP, PS, lig ja -) neljä. Kontrollinäytteillä seurattiin kumariinin taustapitoisuutta (-) ja abioottista  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumista (A).

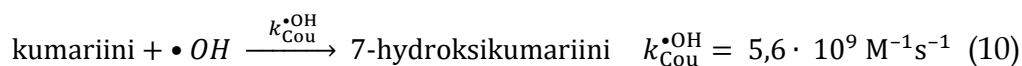
### 3.2.1.2 Kumariinikoetin $\cdot\text{OH}$ :n kvantifiointissa

Hydroksyyliiradikaalien kvantifiointiin käytettiin menetelmää, jossa kumariini toimi koetinmolekyylinä hydroksyyliiradikaaleille (Louit ym. 2005, Burgos Castillo ym. 2018). Menetelmässä kumariini muodostaa  $\cdot\text{OH}$ :n kanssa reagoidessaan fluoresoivan adduktin, 7-hydroksikumariinin (saanto  $\eta = 0,047$ ) (Kuva 7) (Newton ja Milligan 2006, Burgos Castillo ym. 2018).



Kuva 7. Kumariinin ja hydroksyyliiradikaalin välinen reaktio. Hydroksyyliiradikaalin sitoutuessa kumariinin (vasemmalla) 7-hiileen, muodostuu monivaiheisessa reaktiossa lopputuotteena fluoresoivaa 7-hydroksikumariinia (Louit ym. 2005). (Pirretty ohjelmalla ACD/ChemSketch 2020. 1.2)





$\bullet\text{OH}$ :n ja kumariinin välinen reaktio (Kaava 10) on toisen kertaluokan reaktio, jonka nopeusvakio  $k_{\text{Cou}}^{\bullet OH}$  on  $5,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Burgos Castillo ym. 2018).

### 3.2.2 Laskennalliset menetelmät

#### 3.2.2.1 Hydroksyyliiradikaalinelujen laskeminen

Hydroksyyliiradikaaleilla on kumariinin lisäksi myös muita nieluja, joiden kanssa ne reagoivat vedessä. Xiaon ym. (2020) tutkimuksessa  $\bullet\text{OH}$ -nieluiksi lukeutuivat DOC,  $\text{Cl}^-$  ja  $\text{HCO}_3^-$ . Tässä työssä  $\bullet\text{OH}$ :n nielujen vaikutuksen laskemiseksi käytettiin näistä ainoastaan DOC:n pitoisuutta, sillä kloridi-ionien ja bikarbonaatin pitoisuudet ovat yleensä vähäisiä suhteessa DOC-pitoisuuteen makeissa vesissä (Carena ym. 2017).  $\bullet\text{OH}$  voi reagoida vesimatriisissa myös muodostuneen 7-hydroksikumariinin kanssa, jolle reaktionopeusvakio  $k_{7\text{OHCOu}}^{\bullet OH}$  on  $6,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Payá ym. 1992). 7-hydroksikumariinin määrän ollessa hyvin pieni, voidaan  $\bullet\text{OH}$ :n ja 7-hydroksikumariinin välinen reaktio jättää huomiotta.

DOC:n ja  $\bullet\text{OH}$ :n väliselle reaktiolle käytettiin Westerhoffin ym. (2007) määrittämää toisen kertaluvun nopeusvakiota  $1,9 \cdot 10^4 \text{ (mg C l}^{-1}\text{)}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , jota myös Xiao ym. (2020) käyttivät tutkimuksessaan.  $\bullet\text{OH}$ -nielujen reaktionopeusvakiot on koottu Taulukkoon 5. Xiaon ym. (2020) käyttämää laskukaavaa nielujen vaikutuksesta  $\bullet\text{OH}$ :n muodostumiseen (Kaava 11) muokattiin tältä osin.

$$k'_{\text{Scav}} = k_{\text{DOC}}^{\bullet OH} [\text{DOC}], \quad (11)$$

jossa  $k'_{\text{Scav}}$  on 1. kertaluvun reaktionopeusvakio  $\bullet\text{OH}$ -nieluille,  $k_{\text{DOC}}^{\bullet OH}$  on  $\bullet\text{OH}$ :n ja DOC:n välinen nopeusvakio (Taulukko 5) ja  $[\text{DOC}]$  on liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus vedessä.

Kokeessa käytettiin substraattina myös ligniiniä, jonka hiilipitoisuus huomioitiin ligniinikäsitellyissä vesissä  $\bullet\text{OH}$ -nieluna DOC:n yhteydessä (Kaava 12). Ligniini on liuennut orgaaninen yhdiste, minkä vuoksi DOC:n ja  $\bullet\text{OH}$ :n välistä nopeusvakiota

käytettiin myös ligniinin reaktionopeusvakioiden laskemisessa. Lisätyn ligniinin konsentraatio oli näytteissä 21,0 mg C l<sup>-1</sup>.

$$k'_{Scav} = k_{DOC}^{\bullet OH} [DOC] + k_{lig}^{\bullet OH} [lig], \quad (12)$$

jossa  $k'_{Scav}$  on  $\bullet OH$ -nielujen ensimmäisen asteen reaktionopeusvakio,  $k_{DOC}^{\bullet OH}$  on  $\bullet OH$ :n ja DOC:n välisen reaktion nopeusvakio, [DOC] on liuenneen orgaanisen aineen konsentraatio ja [lig] on lisätyn ligniinin pitoisuus orgaanisen hiilen määränä ilmoitettuna.

Taulukko 5.  $\bullet OH$ :n kanssa reagoivien nielujen 2. kertaluvun reaktionopeusvakiot.

Nielu, $Scav_i$	Reaktionopeusvakio, $k_{Scav_i}^{\bullet OH}$	Lähteet
kumariini	$k_{Cou}^{\bullet OH} = 5,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Burgos Castillo ym. 2018
7-hydroksikumariini	$k_{7OHcou}^{\bullet OH} = 6,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Payá ym. 1992
DOC	$k_{DOC}^{\bullet OH} = 1,9 \cdot 10^4 \text{ l (mg C)}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Westerhoff ym. 2007

### 3.2.2.2 Hydroksyyliiradikaalien kvantifiointi

Hydroksyyliiradikaalien muodostuminen määritettiin työssä koetinmolekyylin ja muodostuvan reaktiotuotteen pitoisuuksien muutoksista (Louit ym. 2005). Laskuissa huomioitiin myös DOC:n ja  $\bullet OH$ :n välinen reaktio, jota varten mitattiin molempien järvivesien DOC-pitoisuus (Vione ym. 2010). 7-hydroksikumariinin määrät olivat tässä työssä kertaluokaltaan hyvin pieniä (nanomolaarisia), siitä johtuen  $\bullet OH$ :n ja 7-hydroksikumariinin välinen reaktio jätettiin laskukaavoissa huomiotta.  $\bullet OH$ :n kvantifioinnin laskukaavoja käytettiin sen mukaan, esiintyikö näytteissä kumariinin tai 7-hydroksikumariinin biologista hajoamista.

Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin mittauspisteille tehtiin käyrän sovitus (Liite 2), joista saatiin määritettyä kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuuksien muutosnopeutta kuvaavat funktiot. Sovitefunktioille laskettiin arvot eri ajan hetkillä 24 h välein ja näitä arvoja käytettiin laskettaessa  $\bullet OH$ :n

muodostumisnopeutta  $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  eri ajan hetkille myös 24 tunnin välein (Kaava 16).  $\bullet\text{OH}$ :n muodostumisnopeudelle  $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  määritettiin Kaavasta 16 saatujen arvojen pohjalta yhtälö, joka integroimalla saatiin estimaatti kokeen aikana kumuloituneista konsentraatioista (Kaava 13) (Xiao ym. 2020).

$$[\bullet\text{OH}]_{\Sigma} = \int_{t_0}^{t_1} R_f^{\bullet\text{OH}}(t) dt, \quad (13)$$

jossa  $[\bullet\text{OH}]_{\Sigma}$  on muodostuvien hydroksyyliiradikaalikonsentraatioiden summa,  $t_0$  on kokeen aloitusaika (s),  $t_1$  on tarkasteltava aika (s) ja  $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  on  $\bullet\text{OH}$ :n muodostumisnopeus ajan hetkellä  $t$  ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

Koska  $\bullet\text{OH}$  reagoi lähes heti muodostuttuaan järvivedessä  $\bullet\text{OH}$ -nielujen (DOC ja kumariini) kanssa saavuttaakseen tasapainon, oletettiin hydroksyyliiradikaalien tuotantonopeuden hetkellä  $t$   $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  olevan sama kuin häviämisenopeus. Tällöin  $\bullet\text{OH}$ -konsentraatio ajalla  $t$  on tasapainossa muodostumisen ja hävikin suhteen (*steady state*) ( $[\bullet\text{OH}]_{s.s.}$ ) (Kaava 14) (Xiao ym. 2020).

$$[\bullet\text{OH}]_{s.s.} = \frac{R_f^{\bullet\text{OH}}(t)}{k'_{Scav} + k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}[\text{Cou}]_t}, \quad (14)$$

jossa  $[\bullet\text{OH}]_{s.s.}$  on hydroksyyliiradikaalien konsentraatio tasapainotilassa,  $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  on  $\bullet\text{OH}$ :n muodostumisnopeus ajalla  $t$  ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ ),  $k'_{Scav}$  on  $\bullet\text{OH}$ -nielujen, tässä tapauksessa DOC:n (Kaava 10), 1. kertaluvun reaktionopeusvakio ( $\text{s}^{-1}$ ),  $k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}$  on  $\bullet\text{OH}$ :n ja kumariinin välisen 2. kertaluvun reaktion nopeusvakio (ks. Taulukko 5) ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) ja  $[\text{Cou}]_t$  on kumariinin konsentraatio ajalla  $t$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ).

Kaava 14 voidaan sijoittaa kumariinin pitoisuuden muutosta ilmaisevaan reaktionopeuden kaavaan (Kaava 15), josta saadaan kaava  $\bullet\text{OH}$ :n muodostumisnopeudelle (Kaava 16) (Xiao ym. 2020).

$$R_{\Delta}^{7\text{OH}\text{Cou}}(t) = [\bullet\text{OH}]_{s.s.} \{ \eta_{7\text{OH}\text{Cou}}^{\text{Cou}} k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}} [\text{Cou}]_t \}, \quad (15)$$

jossa  $R_{\Delta}^{7\text{OH}\text{Cou}}(t)$  on 7-hydroksikumariiniin pitoisuuden muutosnopeus ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Pitoisuuden muutos hetkellä  $t$  riippuu kumariinin pitoisuudesta ja sen kanssa

reagoivasta  $\bullet\text{OH}$ :n pitoisuudesta  $[\bullet\text{OH}]_{S.S.}$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ).  $k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}$  on  $\bullet\text{OH}$ :n ja kumariinin välisen reaktion 2. kertaluvun reaktionopeusvakio ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ja  $\eta_{7\text{OHCou}}^{\text{Cou}}$  7-hydroksikumariiniin saanto hydroksyyliiradikaalien ja kumariinin välisessä reaktiossa.

$$R_f^{\bullet\text{OH}}(t) = \frac{R_{\Delta}^{7\text{OHCou}}(t) \{k'_{\text{Scav}} + k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}[\text{Cou}]_t\}}{\eta_{7\text{OHCou}}^{\text{Cou}} k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}[\text{Cou}]_t}, \quad (16)$$

jossa  $R_f^{\bullet\text{OH}}(t)$  on  $\bullet\text{OH}$ :n pitoisuuden muodostumisnopeus ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $R_{\Delta}^{7\text{OHCou}}(t)$  on 7-hydroksikumariinin pitoisuuden muutosnopeus ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $k'_{\text{Scav}}$  on 1. kertaluokan reaktionopeusvakio hydroksyyliiradikaalinielulle ( $\text{s}^{-1}$ ),  $k_{\text{Cou}}^{\bullet\text{OH}}$  on  $\bullet\text{OH}$ :n ja kumariinin välisen 2. kertaluvun reaktion nopeusvakio ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) ja  $[\text{Cou}]_t$  on kumariinin konsentraatio ajalla  $t$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ).  $\eta_{7\text{OHCou}}^{\text{Cou}}$  on kumariinin ja 7-hydroksikumariinin saanto hydroksyyliiradikaalien ja kumariinin välisessä reaktiossa.

### 3.2.2.3 7-hydroksikumariinin pitoisuuden muutosnopeuden määrittäminen

Hydroksyyliiradikaalien kvantifioinnin laskemiseen tarvittava 7-hydroksikumariinin muutosnopeuden parametri  $R_{\Delta}^{7\text{OHCou}}(t)$  (Kaava 17) saatiin kullekin käsittelylle sovittamalla käyrä 7-hydroksikumariinin mitattujen pitoisuuksien muodostamaan suoraan ja laskemalla muodostuneen funktion derivaatta (Xiao ym. 2020). Sovitteiden funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on listattu liitteissä (Liite 2).  $\bullet\text{OH}$ :n ja 7-hydroksikumariinin välinen hajoamisreaktio jätettiin laskuissa huomioimatta, sillä mitattujen pitoisuuksien ollessa pieniä  $\bullet\text{OH}$ -nieluihin verrattuna,  $\bullet\text{OH}$ :n ja 7-hydroksikumariinin välinen reaktionopeus ( $k_{7\text{OHCou}}^{\bullet\text{OH}}[\bullet\text{OH}][7\text{OHCou}]$ ) oli lähellä nollaa.

$$R_{\Delta}^{7\text{OHCou}}(t) = R_f^{7\text{OHCou}}(t) = D[7\text{OHCou}]_t, \quad (17)$$

jossa  $R_{\Delta}^{7\text{OHCou}}(t)$  on 7-hydroksikumariinin muutos ajassa  $t$  ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), muutos on samalla 7-hydroksikumariinin muodostumisnopeus  $R_f^{7\text{OHCou}}$  ( $\text{mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), joka saadaan derivoimalla mitattuihin 7-hydroksikumariinin pitoisuuksiin sovitettu funktio  $f(t) = [7\text{OHCou}]_t$  (ks. Liite 2).

### 3.2.2.4 Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin biologinen hajoaminen

Krikštaponisin ja Meškysin (2018) mukaan eräät vesistöissä elävistä bakteereista pystyvät hydrolysoimaan kumariinin ja 7-hydroksikumariinin laktoniryhmän katkaisemalla rengasrakenteen hapen ja 1<sup>o</sup>-hiilen välisen sidoksen hydrolaasientsyymillä.

Tämä huomioiden 7-hydroksikumariinin muodostumista kuvaavaan reaktionopeuden yhtälöön (Kaava 17) lisättiin reaktionopeus 7-hydroksikumariinin biologiselle hajoamiselle ajan suhteen ( $R_{d,bio}^{7OHCou}(t)$ ) (Kaava 18), mikäli kumariinin tai 7-hydroksikumariinin biologista hajoamista havaitaan.

7-hydroksikumariinin biologisen hajoamisen oletettiin noudattavan kinetiikaltaan kumariinin hajoamisen nopeutta, sillä bakteerien hydrolyysin kohteena oleva laktoniryhmä löytyy molempien yhdisteiden rakenteesta (Krikštaponis ja Meškys 2018). Tämän vuoksi reaktionopeusvakio  $k_{d,bio}$  biologiselle hajoamiselle ratkaistiin sovittamalla käyrä eri aikoina mitattuihin kumariinin pitoisuuksiin. Sovitteen funktio derivoitiin, jolloin saatiin  $k_{d,bio}$ -parametrin arvo, jota käytettiin kumariinin pitoisuuden määrittämiseen hetkellä  $t$ . Samaa arvoa käytettiin myös 7-hydroksikumariinin biologisen hajoamisnopeuden määrittämiseen (Kaavat 18 ja 19).

$$R_{\Delta}^{7OHCou}(t) = R_f^{7OHCou}(t) - R_{d,bio}^{7OHCou}(t) \quad (18)$$

$$R_{d,bio}^{7OHCou}(t) = k_{d,bio}(t)[7OHCou]_t = D[Cou]_t \cdot [7OHCou]_t \quad (19)$$

### 3.2.3 Analytyttiset menetelmät

Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin kokeen aikaiset konsentraatiot määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistolla (HPLC). Mittaukset suoritettiin noin viikon välein, niin että viimeisen mittauksen aikana ensimmäisestä mittauksesta oli kulunut aikaa 984 tuntia.

### 3.2.3.1 HPLC-laitteisto

Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuudet määritettiin vesinäytteistä Shimadzun HPLC-laitteistolla. Käytössä olivat pumppu (LC-30AD), kaasunpoistaja (DGU-20A SR), autosampler (SIL-30AC), kolonniuuni (CTO-20AC), diodirividetektor (SPD-M20A) ja fluoresenssidetektor (RF-20A XS) ja kolonnina käytettiin "Bridge Columns XBridge™ C18 (2,5 µm)" käänteisfaasikolonnia.

### 3.2.3.2 HPLC-näytteiden valmistaminen

Viikoittaiset HPLC-laitteistoon syötettävät näytteet valmistettiin tilavuudeltaan 1,5 ml:n *autosampler*-vialeihin. Vesinäytteet otettiin 500 ml:n näytepulloista septumin läpi injektioneulalla (BD Microlance™ 3 23G 1"- Nr. 16) varustetulla ruiskulla (BD Plastipak™). Näytettä otettiin ruiskuun 3 ml, jonka jälkeen ruiskuun liitettiin 0,2 µm:n selluloosa-asetaatista valmistettu ruiskusuodatin (VWR™ International). Ruiskusuodattimeen huuhteluun käytettiin 2 ml:aa vettä ja 1 ml otettiin *autosampler*-vialiin HPLC-analyysyä varten. Saman käsittelyn toistoille käytettiin samaa ruiskua ja ruiskusuodatinta. Neula vaihdettiin jokaisen käsittelyn välissä.

Kokeen aloituksessa otetut ensimmäiset HPLC-näytteet pakastettiin (-20 °C :seen) näytteenoton jälkeen ja sulatettiin 11 vuorokauden päästä HPLC-ajoa varten. Ensimmäisiä näytteitä lukuun ottamatta näytteiden HPLC-mittaukset tehtiin näytteenottopäivinä ilman pakastusta.

### 3.2.3.3 HPLC-laitteen ajo-ohjelman tiedot

Ajo-ohjelmassa noudatettiin Xiaon ym. (2020) käyttämiä asetuksia: Näytteiden injektio-tilavuudeksi asetettiin 5 µl:aa ja pumpun virtausnopeudeksi 0,300 ml min<sup>-1</sup>. Näytteille suoritettiin gradientt ajo (Taulukko 6) kahdella eluentilla: eluentti A asetoniiriili (100 %) (LiChrosolv®, Merck KGaA) ja eluentti B etikkahappo (0,3 %).

Ajo-ohjelmassa eluentti A:n tilavuusprosentin asetus lähtötilanteesta 0,5 min asti oli 10 %, jonka jälkeen se nostettiin 45 %:n. Ajalla 6–6,5 min eluentti A nostettiin 75 %:n,

jonka jälkeen se laskettiin takaisin lähtötilanteeseen 10 %:iin. Eluentti B valmistettiin jokaiselle ajokerralle erikseen.

Kumariinin (retentioaika  $RT = 5,5$ ) pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin diodirividetektoria aallonpituudella 280 nm. 7-hydroksikumariini ( $RT = 4,0$ ) määritettiin käyttäen fluoresenssidetektoria (ex. 320 nm, em. 450 nm).

Taulukko 6. HPLC-gradienttiajon ohjelma. Eluenttien määrä tilavuusprosentteina ajo-ohjelman aikana.

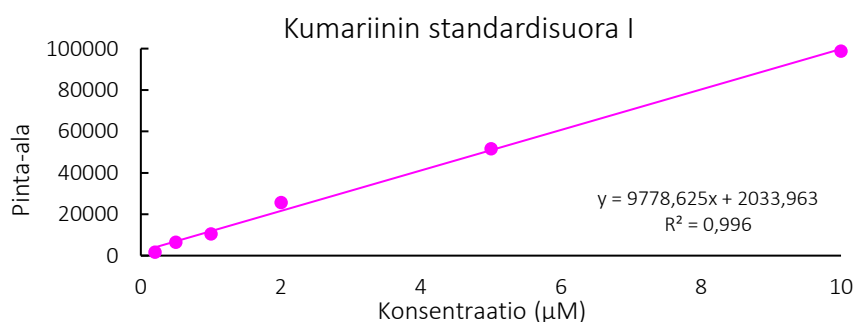
<b>Eluentti A</b>	<b>Eluentti B</b>	<b>Aika (min)</b>
<b>Asetonitriili (100 %)</b>	<b>Etikkahappo (0,3 %)</b>	
10 %	90 %	0–0,5
45 %	55 %	0,5–6,0
75 %	25 %	6,0–6,5
10 %	90 %	6,5–9,0
10 %	90 %	9,0–12,5

#### 3.2.3.4 HPLC-standardit

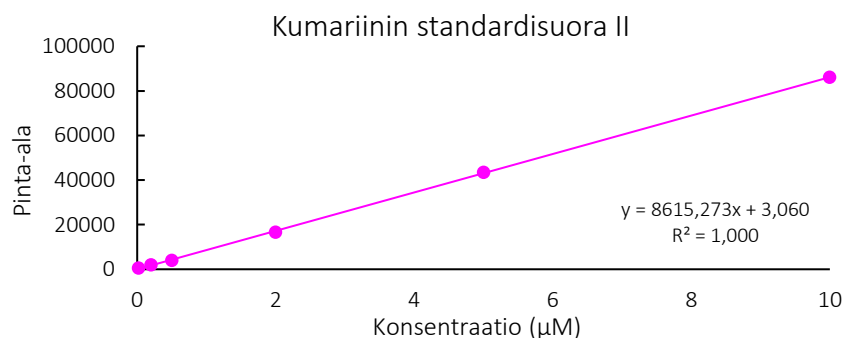
HPLC-ajoa varten valmistettiin standardiliuokset kumariinista ja 7-hydroksikumariinista. Kumariinin 100  $\mu\text{M}$ :seen kantaliuokseen punnittiin (Mettler Toledo AG204) 0,0073 g kumariinia, joka liuotettiin ultrapuhtaaseen veteen. Liuosta sekoitettiin magneettisekoittajalla (Thermolyne Climarec® 2) pienellä lämmöllä, jonka jälkeen se kaadettiin mittapulloon (500 ml) ja täytettiin ultrapuhtaalla vedellä. 7-hydroksikumariinin 100  $\mu\text{M}$ :seen kantaliuokseen punnittiin vastaavasti 0,00810 g 7-hydroksikumariinia, joka liuotettiin ultrapuhtaaseen veteen. Liuosta lämmitettiin ja sekoitettiin magneettisekoittajalla, jonka jälkeen se siirrettiin 500 ml:n mittapulloon ja täytettiin ultrapuhtaalla vedellä mittarajaan asti. Kantaliuoksista valmistettiin standardisuoraa varten laimennokset (kts. Liite 1). Laimennokset tehtiin 1,5 ml:n *autosampler*-vialeihin HPLC-mittauksia varten.

Kumariinin pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin LabSolutions PostRun Analyst -ohjelmiston integrointialgoritmilta automaattisesti muodostettua standardisuoraa I (Kuva 8) ja manuaalisesti ohjelmistolla integroitua standardisuoraa II (Kuva 9). Automaattinen integrointi mittaa kromatogrammin piikin ennalta määritetyllä retentioajalla. Manuaalisessa integroinnissa kromatogrammien piikkien pinta-alan alue valitaan käsin, mikä lisää mittauksen tarkkuutta. Ajan  $t = 0$  h mittauksiin valmistettuja standardeja pidettiin luotettavampana näiden samaan aikaan ajettujen näytteiden konsentraatiomäärittäykseen, kuin myöhemmin valmistettua standardisarjaa. Taulukossa 7 on listattu kunkin käsittelyn, kussakin mittauksessa käytetty standardisuora (Taulukko 7).

7-hydroksikumariinin pitoisuudet määritettiin koko kokeen ajan samalla standardisuoralla (Kuva 10).



Kuva 8. Kumariinin standardisuora I. Standardisuoraa I käytettiin Vesijärven kaikkien käsittelyjen ajan  $t = 0$  h ja Nimettömän käsittelyistä N:n ja NA:n ajan  $t = 0$  h kumariinimäärittäykseen.

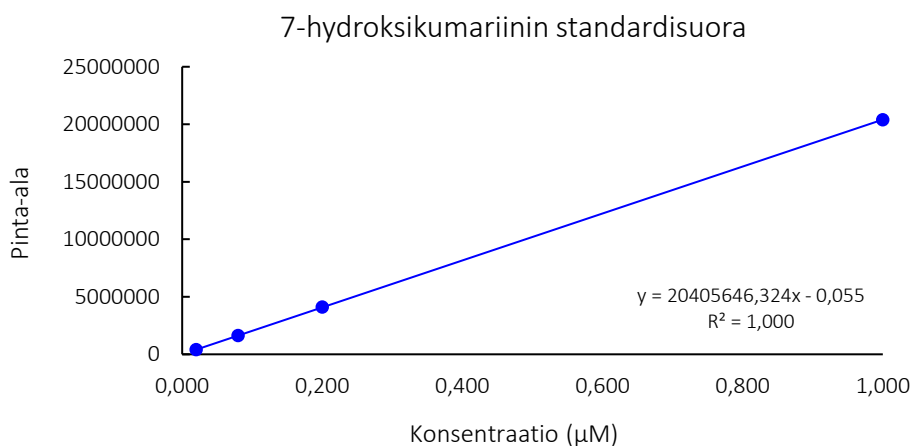


Kuva 9. Kumariinin standardisuora II. Kokeen aikavälillä 672–984 h kumariinille valmistettiin uusi standardisuora, jonka pinta-alat integroitiin kromatogrammeista manuaalisesti matalien pitoisuuksien tarkkuuden lisäämiseksi. Standardisuoraa II käytettiin kaikissa aikavälin 672–984 h mittauksissa.



Taulukko 7. Kumariinin standardisuorien I ja II käyttö mittauksissa. Merkintä " - " tarkoittaa, ettei mittausajalle ole tulosta.

Käytetty standardisuora (kumariini)							
Mittausaika (h)	0	168	336	504	672	840	984
<b>Käsittely</b>							
NPE	-	-	-	-	II	II	II
NPP	-	-	-	-	II	II	II
NPS	-	-	-	-	II	II	II
Nlig	-	-	-	-	II	II	II
NA	I	-	-	-	II	II	II
N	I	-	-	-	II	II	II
VPE	I	-	-	-	II	II	II
VPP	I	-	-	-	II	II	II
VPS	I	-	-	-	II	II	II
Vlig	I	-	-	-	II	II	II
VA	I	-	-	-	II	II	II
V	I	-	-	-	II	II	II



Kuva 10. 7-hydroksikumariinin standardisuora. 7-hydroksikumariinin valittujen pitoisuuksien kromatogrammeista muodostettu standardisuora.

### 3.2.4 Tilastolliset menetelmät

Aineiston käsittelyyn käytettiin Microsoft® Office Excel 2013 -ohjelmaa (versio 15), sekä MathWorks® MATLAB® R2020b (9.9.0 1467703) -ohjelmaa ja IBM® SPSS® Statistics -ohjelmaa (versio 26). Käyrän sovitukset tehtiin käyttäen MathWorks®

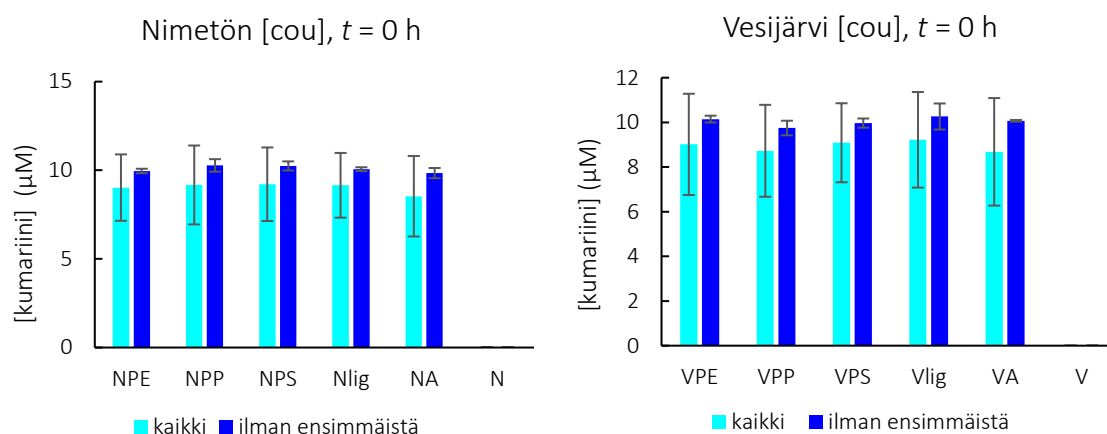
Curve Fitting Toolbox (3.5.12) -työkaluja ja CurveExpert Basic (2.2.3) -ohjelmaa. Käyrien visualisoinnit toteutettiin Microsoft® Office Excel 2013 -ohjelmalla. Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuuksien muutokset saatiin Shimadzu LabSolutions™ PostRun Analyst -ohjelmistosta.

Aineiston poikkeavat havainnot tunnistettiin Tukeyn viiksilaatikkokuvaajista. Poikkeavuuden rajat määräytyivät dataryhmän ensimmäisen ja kolmannen kvartiilin välisen etäisyyden perusteella ( $1,5 \cdot IQR$ ).

Näytteiden eri käsittelyjä verrattiin toisiinsa riippumattomien otosten t-testillä, jota ennen jakaumien normaalius tarkistettiin Shapiro-Wilkin testillä. Levenen testillä selvitettiin vertailtavien ryhmien homoskedastisuus, joka toteutuessaan otettiin huomioon riippumattomien otosten t-testin tuloksissa.

### 3.2.5 Menetelmien laadunvarmistus

Mittauksissa ensimmäiset toistot jätettiin aineiston ulkopuolelle tulosten laadun varmistamiseksi. Ensimmäisten toistojen mukaan ottaminen moninkertaisti neljän toiston välisen keskihajonnan systemaattisesti (Kuva 11). Mittausvirheen pääteltiin johtuvan suodattimen riittämättömästä huuhtelusta, mikä aiheutti kumariinin ja 7-hydroksikumariinin tarttumisen ruiskusuodattimeen ensimmäisen toiston aikana, mikä näkyi HPLC-mittauksessa todellista pienempänä konsentraationa. Konsentraatiot määritettiin kolmen muun toiston perusteella. Kolmen muun (autoklavoiduissa käsittelyissä kahden) toiston samankaltaisuus viittasi siihen, että ruiskusuodattimeen ei enää ensimmäisen näytteen suodattamisen jälkeen adsorboinut kumariinia tai 7-hydroksikumariinia merkittävästi.



Kuva 11. Kokeen aloituksessa ( $t = 0$  h) mitattujen käsittelyjen kumariinikonsentraatioiden keskiarvot ja keskihajonnat muodossa  $y \pm SD$ . Käsittelyissä NA ja VA  $n=3$  ja kaikissa muissa  $n=4$ . Käsittelyjen ensimmäisten näytteiden arvot poikkesivat muista replikaateista ja aiheuttivat hajontaa. Tämän perusteella käsittelyjen ensimmäiset näytteet jätettiin aineiston ulkopuolelle, mikä vähensi näytteiden välistä hajontaa.

## 4 TULOKSET

### 4.1 $\bullet\text{OH}$ :n muodostuminen autoklavoiduissa näytteissä

Hydroksyyli-radikaalien abioottista muodostumista tutkittiin autoklavoiduissa vesinäytteissä, mittaamalla hydroksyyli-radikaalien koetinmolekyylin, kumariinin, pitoisuutta kokeen ajan (Kuva 12). Lähtöpitoisuus oli molemmissa näytteissä n.  $10 \mu\text{M}$ .

Kumariinin pitoisuus pysyi autoklavoiduissa näytteissä tasaisena kokeen ajan (Kuva 12), mutta kumariinin ja  $\bullet\text{OH}$ :n välisessä reaktiossa (Kuva 7, Kaava 10) muodostuvaa 7-hydroksikumariinia havaittiin molemmissa järvivesinäytteissä (Kuva 13), mikä indikoi hydroksyyli-radikaaleja muodostuneen, vaikka kumariinin pitoisuudessa ei havaittu suuria muutoksia. Muodostuneet 7-hydroksikumariinin pitoisuudet olivat nanomolaarisia molemmissa järvivesinäytteissä (Kuva 13): korkean DOC:n vesinäytteessä (Nimetön) 7-hydroksikumariinia kumuloitui

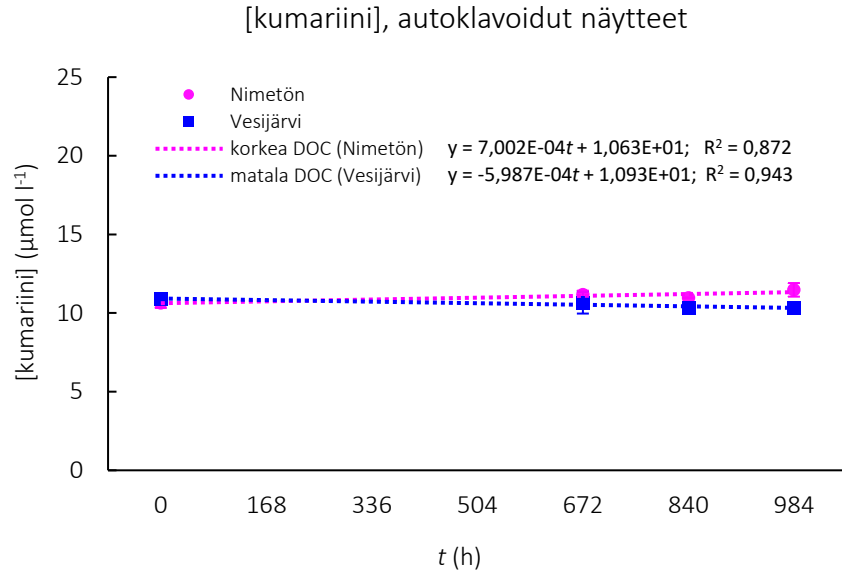
kokeen aikana  $6,7 \pm 1,2 \text{ nmol l}^{-1}$  ja matalan DOC:n vesinäytteessä (Vesijärvi)  $0,6 \pm 0,1 \text{ nmol l}^{-1}$  (Kuva 13).

Autoklavoiduissa näytteissä havaitut 7-hydroksikumariinin pitoisuudet viittasivat abioottiseen hydroksyyliiradikaalien muodostumismekanismiin. Hydroksyyliiradikaalien kumulatiivinen konsentraatio järvivesinäytteissä laskettiin kumariinin ja 7-hydroksikumariinin konsentraatioista (Kuvat 12 ja 13, Kaavat 13-17), huomioimalla laskuissa  $\bullet\text{OH}$ -nieluna järvivesien DOC-pitoisuus (Kaava 11).

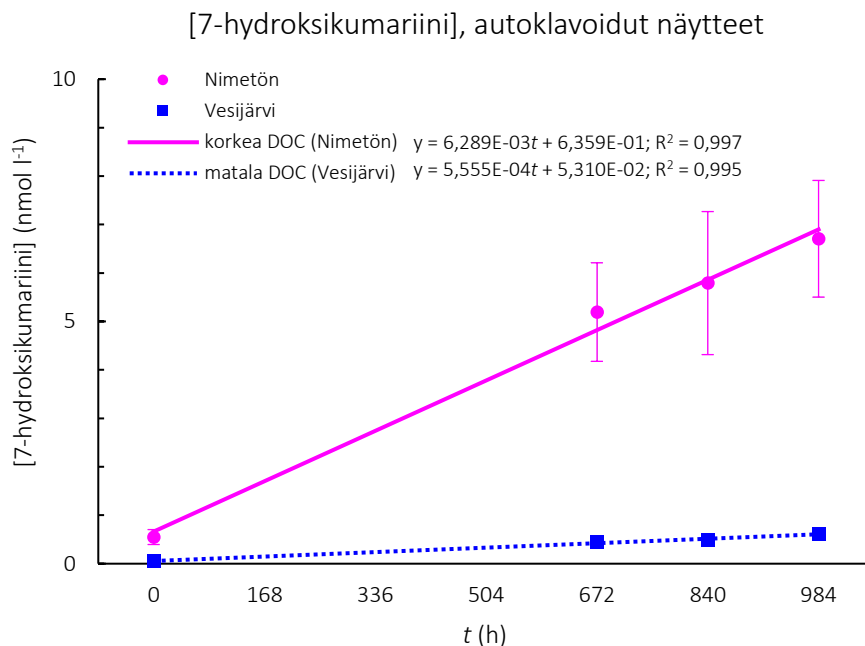
Hydroksyyliiradikaaleja muodostui autoklavoidussa korkean DOC:n (Nimetön) näytteessä yli 300-kertaisella nopeudella  $0,977 \cdot 10^{-12} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , matalan DOC:n (Vesijärvi) näytteeseen verrattuna, jossa muodostumisnopeus  $R_f$  oli  $0,003 \cdot 10^{-12} \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Kuva 14a). Näin ollen myös muodostuneet pitoisuudet olivat korkean DOC:n järven (Nimetön) vedessä huomattavasti suurempia ( $3,5 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) kuin matalan DOC:n järven (Vesijärvi) näytteessä ( $0,01 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) (Kuva 14b).

Autoklavoiduissa näytteissä muodostuneita  $\bullet\text{OH}$ -pitoisuuksia vertailtiin riippumattomien otosten t-testillä, jonka perusteella erot olivat tilastollisesti merkitseviä:  $t(14) = 4,936$ ,  $p < 0,001$ . Ero hydroksyyliiradikaalien muodostumisessa autoklavoitujen näytteiden välillä oli kolmesataakertainen, mikä saattoi selittyä vesien erilaisilla raudan ja liuenneen orgaanisen aineen pitoisuuksilla.

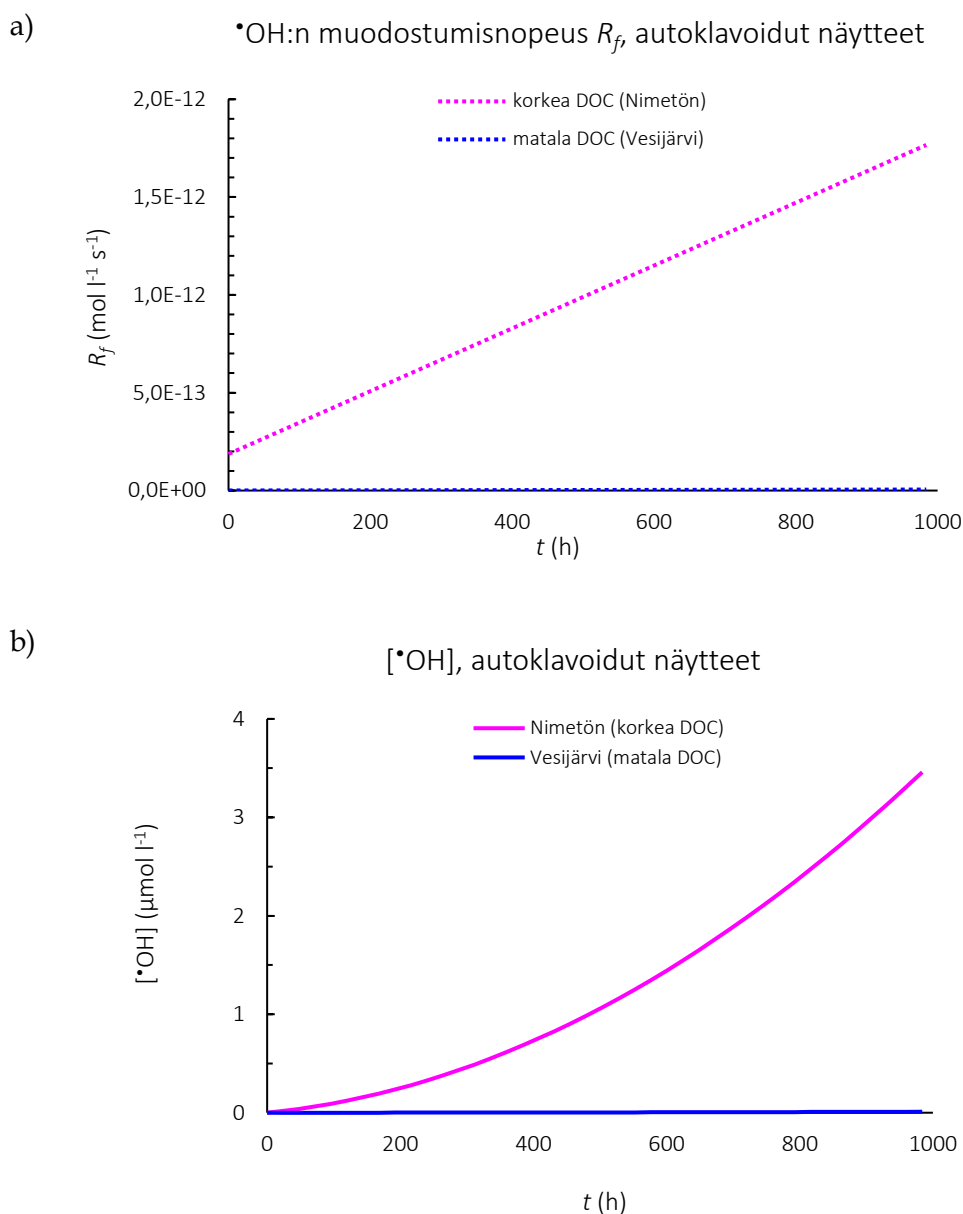
Rautapitoisuus oli Nimetön-järvessä lähes satakertainen ( $287,6 \pm 1,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) Vesijärveen nähden ( $< 3 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Nimetön-järvi sisälsi myös neljä kertaa enemmän liuenutta orgaanista hiiltä ( $22,6 \pm 1,1 \text{ mg l}^{-1}$ ) kuin Vesijärvi ( $5,4 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ ).



Kuva 12. Järvivesiin lisätyn kumariinin pitoisuus autoklavoiduissa käsittelyissä kokeen aikana. Ympyrät (•) kuvaavat Nimetön-järven ja neliöt (■) Vesijärven autoklavoitujen näytteiden mitattuja keskiarvoja ( $n=2$ ) hajontoineen muodossa  $y \pm SD$ . Arvopisteiden perusteella mallinnetut lineaariset regressiosuorat on esitetty kuvassa katkoviivoin. Regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on merkitty kuvaan.



Kuva 13. Kokeen aikana muodostuneet 7-hydroksikumariinin pitoisuudet autoklavoiduissa käsittelyissä. Punaiset ympyrät (•) kuvaavat Nimetön-järven ja siniset neliöt (■) Vesijärven autoklavoitujen näytteiden mitattuja keskiarvoja ( $n=2$ ) keskihajontoineen ( $y \pm SD$ ). Arvojen perusteella mallinnetut lineaariset regressiosuorat on esitetty kuvassa katkoviivoin. Regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on merkitty kuvaan.



Kuva 14. a)  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeus  $R_f$  ja b)  $\cdot\text{OH}$ :n kumulatiivinen konsentraatio autoklavoiduissa käsittelyissä. Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuuksiin mitattuihin pitoisuuksiin sovitettiin funktiot (ks. Liite 2), joiden perusteella laskettiin muodostuneiden hydroksyyli-radikaalien kumuloituva konsentraatio eri ajan hetkillä (Kaavat 13–16).

#### 4.2 $\cdot\text{OH}$ :n muodostuminen mikrobeja sisältävissä näytteissä

Pieniä määriä hydroksyyli-radikaaleja muodostui autoklavoiduissa käsittelyissä abioottisesti. Seuraavaksi tarkastellaan mahdollista biogeenistä Fentonin reaktiota muodostuneiden hydroksyyli-radikaalien pohjalta mikrobeja sisältävissä suodatetuissa (3- $\mu\text{m}$ ) vesinäytteissä, joita ei ollut autoklavoitu.

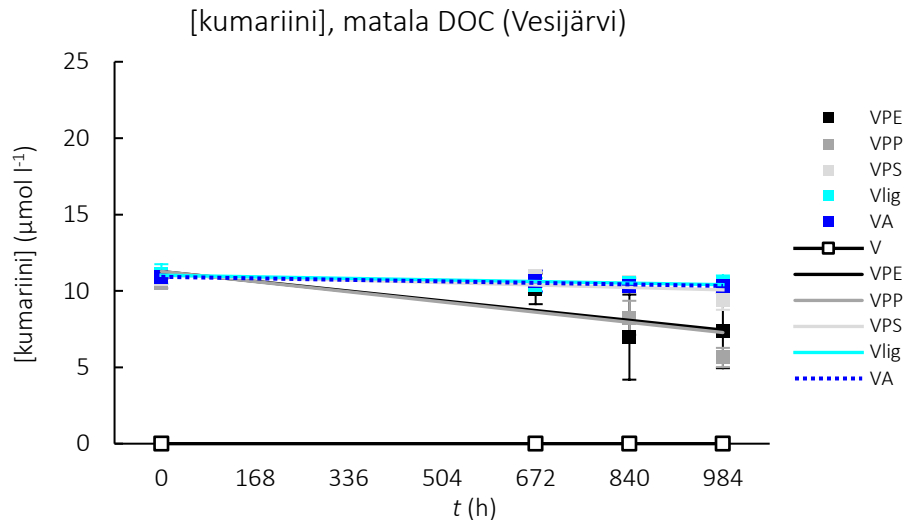
#### 4.2.1 •OH:n muodostuminen matalan DOC:n vesissä (Vesijärvi)

Hydroksyyli-radikaalien koetinmolekyylin, kumariinin, kuluminen huomattiin Vesijärven osalta toisissa käsittelyissä paremmin (polyeteeni, PE ja polypropeeni, PP) kuin toisissa (polystyreeni, PS ja ligniini, lig) (Kuva 15). Kumariinin ja •OH:n välisessä reaktiossa muodostuvan 7-hydroksikumariinin (Kuva 7, Kaava 10) pitoisuuksia mittaamalla vahvistettiin, että •OH:a muodostui myös matalan DOC:n järven biologisesti aktiivisissa vesinäytteissä. Muodostuneet 7-hydroksikumariinin pitoisuudet olivat kaikissa käsittelyissä kuitenkin pienempiä kuin vastaavassa autoklavoidussa käsittelyssä (Kuva 16).

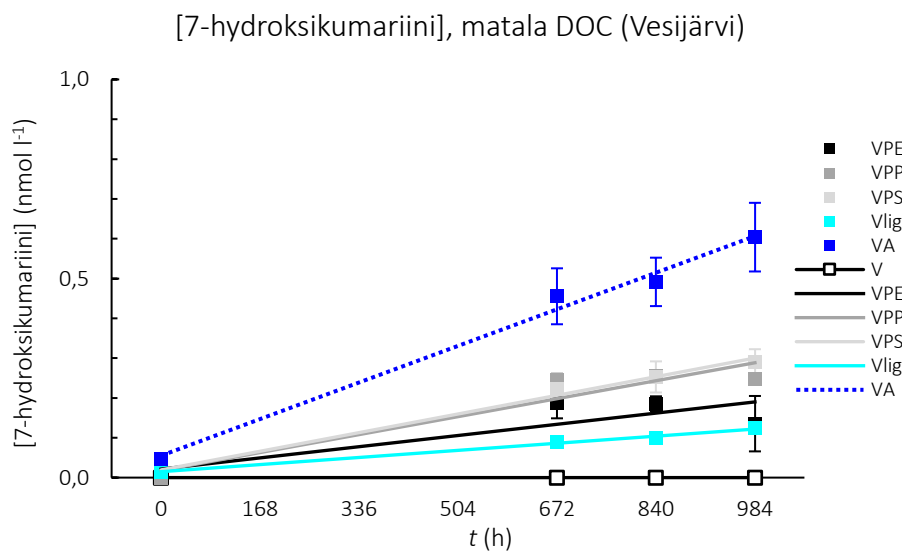
Kumariinin (Kuva 15) ja 7-hydroksikumariinin (Kuva 16) pitoisuuksista laskettiin hydroksyyli-radikaalien muodostumisnopeus  $R_f$  (Kaava 16, Kuva 17a) ja kumuloitunut konsentraatio [ $\bullet\text{OH}$ ] (Kaava 13, Kuva 17b). Laskuissa huomioitiin •OH-nieluina Vesijärven DOC-pitoisuus ( $5,4 \pm 0,03 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Kaava 11) ja ligniinikäsittelyssä DOC-pitoisuuden lisäksi myös lisätyn ligniinin hiilipitoisuus ( $21,03 \text{ mg C l}^{-1}$ ) (Kaava 12).

•OH:n muodostumisnopeudet (Kuva 17a) ja sen seurauksena myös muodostuneet pitoisuudet (Kuva 17b) olivat pienempiä näytteissä, joissa bakteeritoimintaa oli kuin näytteessä, joista bakteeritoiminta oli poistettu autoklavoimalla. Kussakin käsittelyssä kumuloituneet •OH:n pitoisuudet ja muodostumisnopeudet on esitetty Taulukossa 8 ja kaikkien käsittelyiden regressiosuorien funktiot selitysasteineen ( $R^2$ ) löytyvät Liitteestä 2.

Bakteerien läsnäolo tässä tapauksessa inhiboi muodostuvien hydroksyyli-radikaalien pitoisuutta vesinäytteissä. Lisäksi muodostuneet •OH-pitoisuudet olivat biologisesti aktiivisissa näytteissä hyvin pieniä ( $<0,002 \mu\text{M}$ ) autoklavoituun näytteeseen nähden, mikä osoitti, ettei bakteereiden läsnäolo lisännyt •OH-muodostumista järvivedessä, toisin kuin biogeenisessä Fentonin mekanismissa oli arvioitu.

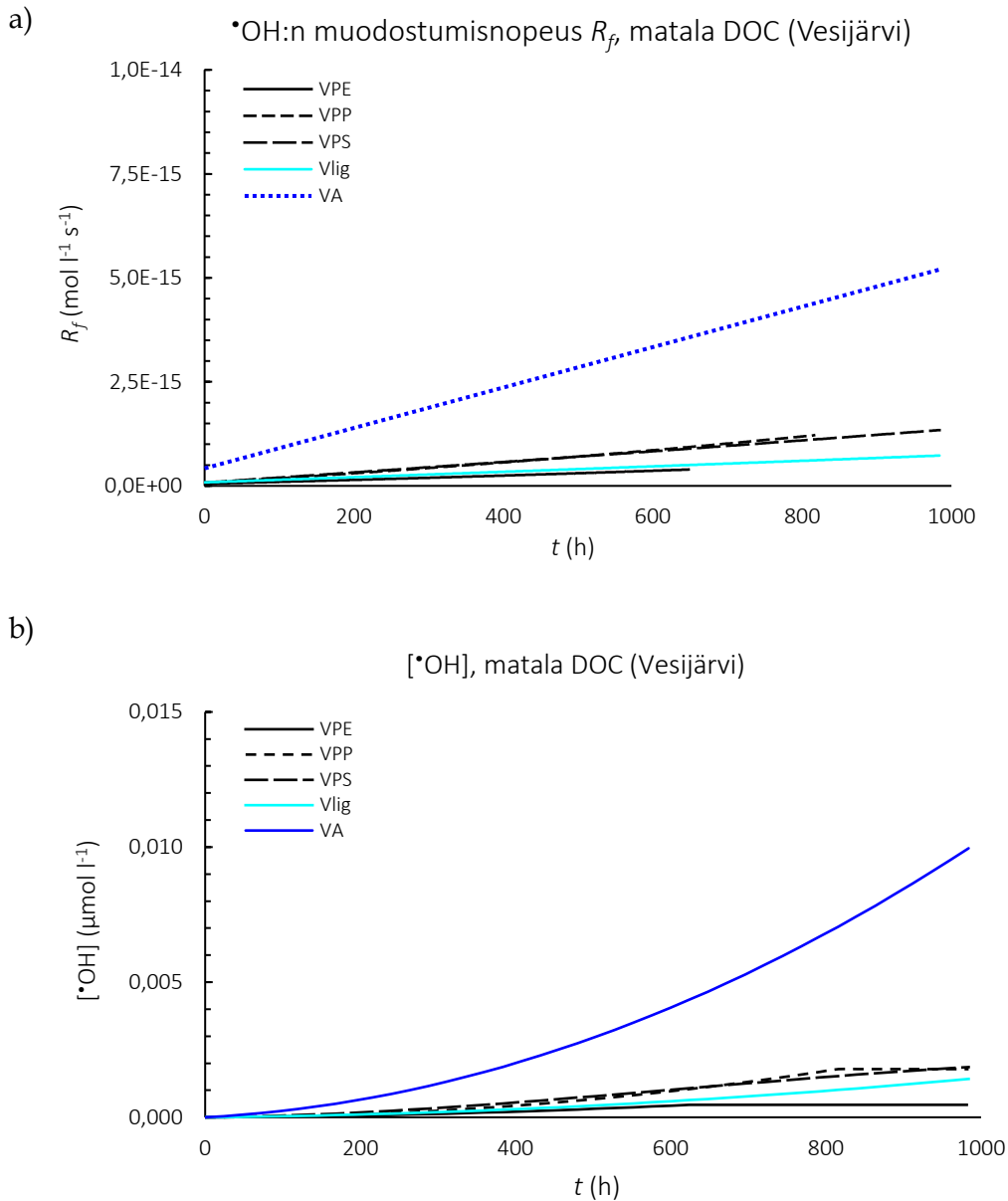


Kuva 15. Kumariinin pitoisuus matalan DOC:n järven (Vesijärvi) kuudessa käsittelyssä. Käsittelyt: PE (polyeteeni), PP (polypropeeni), PS (polystyreeni), lig (ligniini); (n=3). V (n=3) näytteeseen ei lisätty kumariinia. Kuvassa 12 esitelty autoklavoitu käsittely VA (n=2) on esitetty myös tässä kuvassa. Neliöt (■) kuvaavat kunkin käsittelyn mitattuja keskiarvoja keskihajontoineen ( $y \pm SD$ ). Mittauspisteisiin sovitettujen regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on listattu liitteissä (Liite 2).



Kuva 16. 7-hydroksikumariinin pitoisuus matalan DOC:n järven (Vesijärvi) kuudessa käsittelyssä. Käsittelyt: PE (polyeteeni), PP (polypropeeni), PS (polystyreeni), lig (ligniini); (n=3). V (n=3) näytteeseen ei lisätty kumariinia. Kuvassa 12 esitelty autoklavoitu käsittely VA (n=2) on esitetty myös tässä kuvassa. Neliöt (■) kuvaavat kunkin käsittelyn mitattuja keskiarvoja keskihajontoineen ( $y \pm SD$ ). Mittauspisteisiin sovitettujen regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on listattu liitteissä (Liite 2).





Kuva 17. a) Hydroksyyli-radikaalien muodostumisnopeus  $R_f$  ja b) kumuloitunut konsentraatio matalan DOC:n järven (Vesijärvi) viidessä käsittelyssä. Käsittelyt: PE (polyeteeni), PP (polypropeeni), PS (polystyreeni), lig (ligniini); ( $n = 3$ ). Kuvassa 12 esitelty autoklavoitu käsittely VA ( $n = 2$ ) on esitetty myös näissä kuvissa.

#### 4.2.2 $\bullet\text{OH}$ :n muodostuminen korkean DOC:n vesissä (Nimetön)

Korkean DOC:n järven (Nimetön) näytteistä PE, PP, PS ja lig kumariinikoetinmolekyylin pitoisuus kului kokonaan aikavälillä 0–504 h. Häviön pääteltiin johtuvan yhdisteen biologisesta hajoamisesta (Krikštaponis ja Meškys 2018). Näihin käsittelyihin lisättiin kumariinia ajalla  $t = 672$  h niin, että

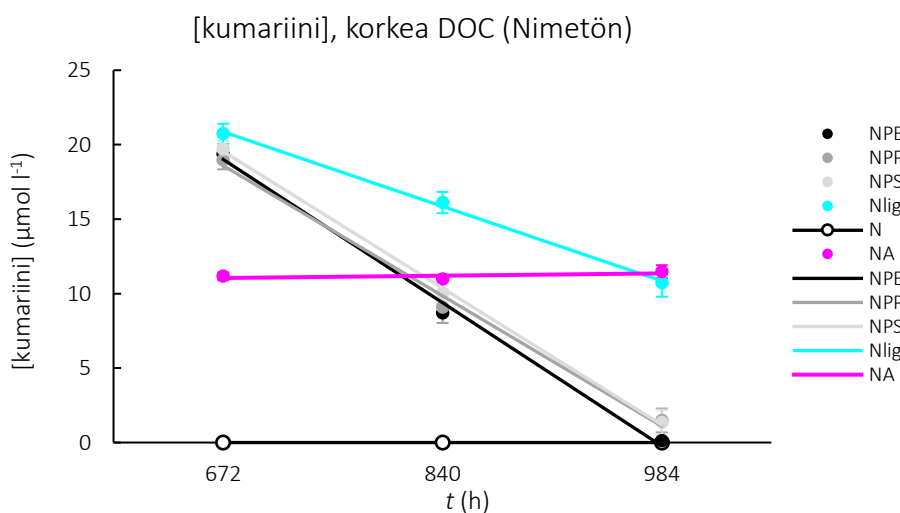
pitoisuuksiksi saatiin noin  $20 \mu\text{mol l}^{-1}$  (mitattu  $19,7 \pm 0,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), jonka jälkeen saatiin 3 onnistunutta mittausta kumariinin pitoisuudesta kokeen viimeisen 312 tunnin ajalta ( $t = 672\text{--}984 \text{ h}$ ) (Kuva 18). Biologinen hajoaminen ei koskenut näytettä, joka oli autoklavoitu (NA), sillä bakteeritoiminta oli poistettu näytteestä. Tätä tuki huomio näytteen pitoisuuden tasaisuudesta kokeen alusta asti ( $n. 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), minkä vuoksi kumariinin lisäystä ei tehty tähän näytteeseen. Lisätyt kumariinin pitoisuudet kuuluivat muoveja sisältäneissä näytteissä kokonaan, tai lähes kokonaan ( $92,2\text{--}99,4 \%$ :sti) seuraavien 312 tunnin aikana. Ligniinikäsittelyssä kumariini kului muita näytteitä hitaammin ja sen loppupitoisuus oli  $10,7 \pm 0,9 \mu\text{mol l}^{-1}$ , mikä oli  $51,7 \%$  näytteeseen lisätyn kumariinin alkupitoisuudesta (Kuva 18).

Seuraavaksi tarkasteltiin muodostuneita 7-hydroksikumariinin pitoisuuksia, joiden mittauksissa näkyi selvästi biologisesta hajoamisesta aiheutunut häviö (Kuva 19a ja 19b).  $\cdot\text{OH}$ :n kumuloituvien pitoisuuksien laskemiseen tarvittavat 7-hydroksikumariinin sovitefunktiot noudattivat häviön takia toisen asteen polynomifunktioita (ks. Liite 2) muissa näytteissä käytettyjen lineaaristen mallien sijaan (Kuva 19b). Biologisesti aktiivisissa näytteissä muodostuneet 7-hydroksikumariinin pitoisuudet olivat muovi- ja ligniinikäsittelyissä jopa kymmenkertaisesti pienempiä kuin korkean DOC:n järiveden autoklavoidussa näytteessä (Kuva 19a).

$\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeuden laskemiseen käytettiin Kaavoja 15 ja 16, joissa huomioitiin reagenssien biologinen hajoaminen (Kaavat 18 ja 19). Muodostumisnopeudet kasvoivat ajan kuluessa (Kuva 20a), mikä tarkoitti, että hydroksyyliiradikaalien muodostuminen kiihtyi kokeen loppua kohden (Kuva 20b). Koska kumariinin ja 7-hydroksikumariinin pitoisuuksien mittaaminen aloitettiin uudelleen kumariinin lisäyksen jälkeen (672 tuntia kokeen aloituksesta), ei voitu olla varmoja, oliko näytteissä tapahtunut  $\cdot\text{OH}$ :a muodostavan reaktion kinetiikkaan vaikuttavia muutoksia kokeen alkutilanteesta. Autoklavoidun näytteen reaktiokinetiikkaa seurattiin aivan kokeen alusta ( $t = 0\text{--}984 \text{ h}$ ), mikä hankaloitti autoklavoidun ja biologisesti aktiivisten näytteiden

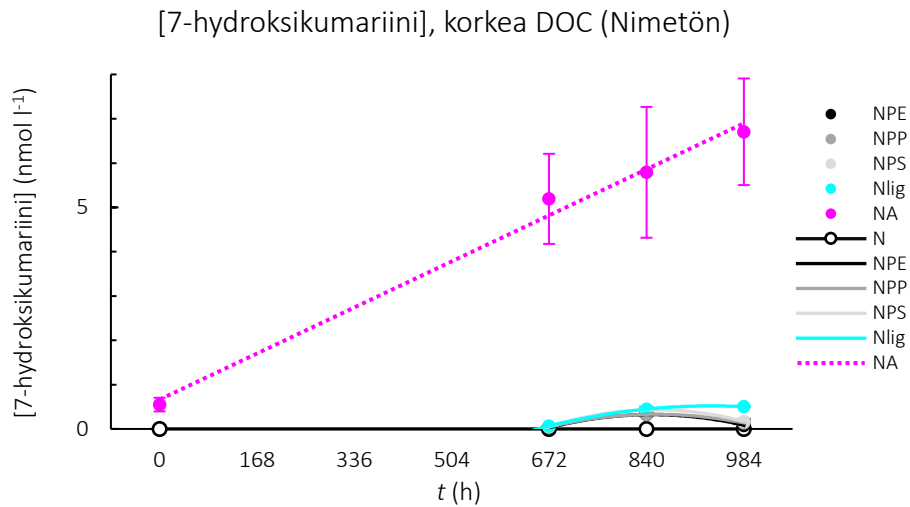
muodostumisnopeuksien vertailua toisiinsa (Kuva 20a). Tästä syystä autoklavoitujen näytteiden  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeuksia ja kumuloituneita  $\cdot\text{OH}$ -pitoisuuksia tarkasteltiin kahdella eri aikavälillä ( $t = 0\text{--}312\text{ h}$  ja  $t = 672\text{--}984\text{ h}$ ), ja näiden aikavälien arvoja verrattiin muihin käsittelyihin (Kuva 21a).

Vertailun tuloksena selvisi, etteivät erot hydroksyyliiradikaalien pitoisuuksissa olleet tilastollisesti merkittäviä kummassakaan tilanteessa. Autoklavoidun näytteen alkuun ( $t = 0\text{--}312\text{ h}$ ) verrattuna, muissa käsittelyissä muodostuneet  $\cdot\text{OH}$ :n pitoisuudet olivat hieman suurempia. Samalle ajanjaksolle ( $t = 672\text{--}984\text{ h}$ ) tehdyssä vertailussa sen sijaan autoklavoituun näytteeseen  $\cdot\text{OH}$ :a kertyi enemmän kuin muihin käsittelyihin, mutta erot eivät olleet tässä tapauksessa merkittäviä.

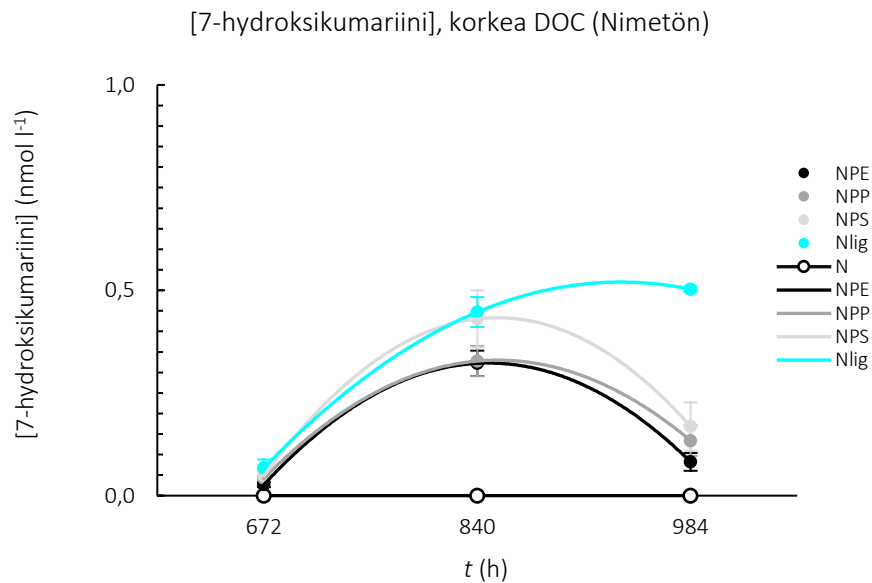


Kuva 18. Kumariinin pitoisuus korkean DOC:n järven (Vesijärvi) kuudessa käsittelyssä. Käsittelyt: PE (polyeteeni), PP (polypropeeni), PS (polystyreeni), lig (ligniini); ( $n=3$ ). V ( $n=3$ ) näytteeseen ei lisätty kumariinia. Kuvassa 12 esitelty autoklavoitu käsittely NA ( $n=2$ ) on esitetty myös tässä kuvassa. Pallot ( $\bullet$ ) kuvaavat kunkin käsittelyn mitattuja keskiarvoja keskihajontoineen ( $y \pm \text{SD}$ ). Mittauspisteisiin sovitettujen regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on listattu liitteissä (Liite 2).

a)

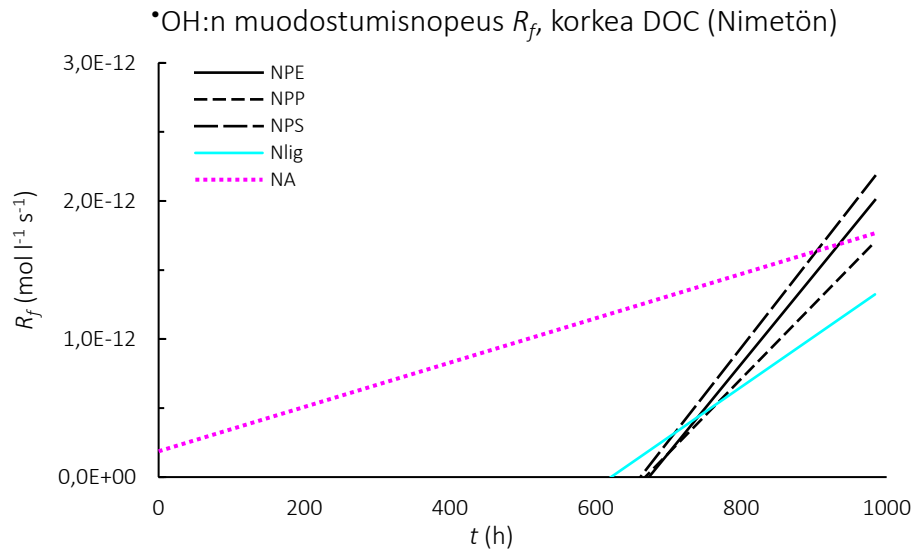


b)

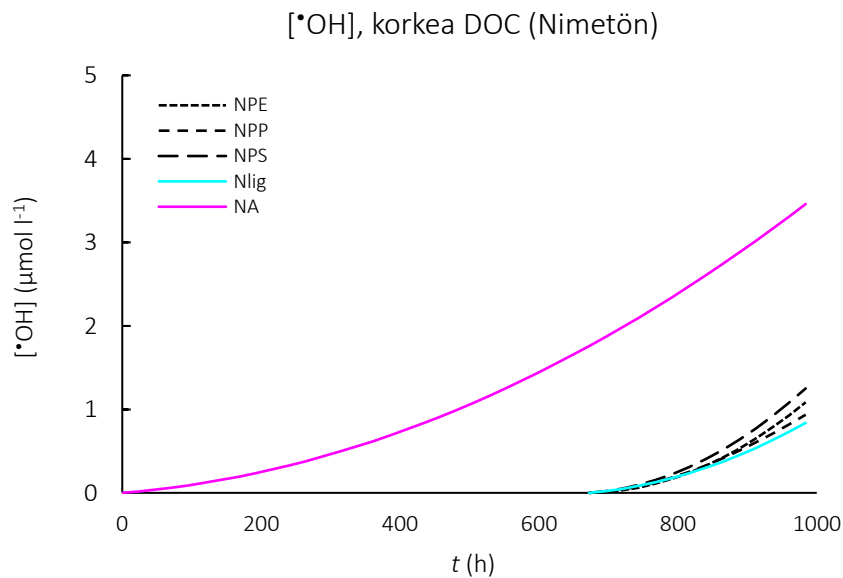


Kuva 19. 7-hydroksikumariinin konsentraatiot ja niiden keskihajonnat ( $y \pm SD$ ) a) kaikissa korkean DOC:n järven (Nimetön) käsittelyissä ja b) skaalattuna pienemmille pitoisuuksille ilman autoklavoitua näytettä (NA). Käsittelyt: PE (polyeteeni), PP (polypropeeni), PS (polystyreeni), lig (ligniini); ( $n=3$ ). N ( $n=3$ ) näytteeseen ei lisätty kumariinia. Pallot (●) kuvaavat kunkin käsittelyn mitattuja keskiarvoja keskihajontoineen ( $y \pm SD$ ). Mittauspisteisiin sovitettujen regressiosuorien funktiot ja selitysasteet ( $R^2$ ) on listattu liitteissä (Liite 2).

a)

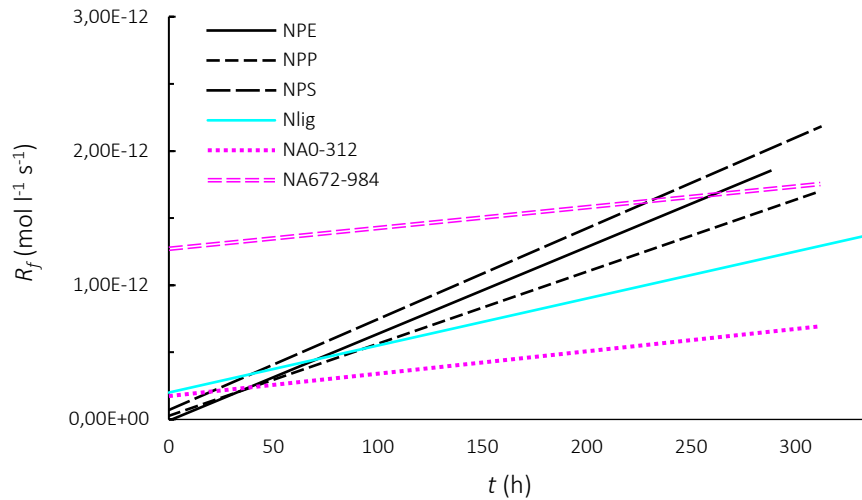


b)

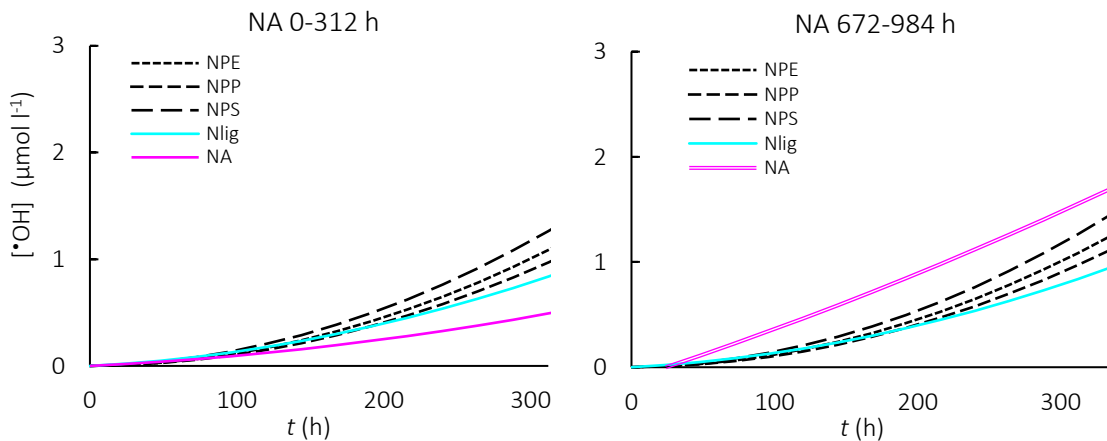


Kuva 20. a) •OH:n muodostumisnopeudet ( $R_f$ ) ja b) •OH:n kumulatiivinen konsentraatio kokeen aikana korkean DOC:n järven (Nimetön) näytteissä. Autoklavoidussa käsittelyssä (NA) koetinmolekyylin lähtöpitoisuus oli  $10,6 \pm 0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$  ja muissa käsittelyissä  $19,7 \pm 0,8 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Käsittelyiden PE, PP, PS ja lig osalta kuvassa on esitetty muodostumisnopeudet ja kumuloidut •OH-pitoisuudet koetinmolekyylin lisäyksen jälkeen ( $t = 672$  h). Käsittelyt: NA=autoklavoitu, PE=polyeteeni, PP=polypropeeni, PS=polystyreeni, lig=ligniini.

a)

 $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeuksien vertailu, korkea DOC

b)

Kumuloituneen [ $\cdot\text{OH}$ ]:n vertailu  
(autoklavoitu käsittely eri aikaväleillä)

Kuva 21. a)  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeuksien ja b) muodostuneiden pitoisuuksien vertailu autoklavoidun käsittelyn eri aikaväleille laskettuihin arvoihin (NA0-312:  $t = 0-312$  h, NA672-984:  $t = 648-984$  h) korkean DOC:n vesinäytteissä.

Nämä tulokset viittasivat siihen, että  $\cdot\text{OH}$ :a muodostava prosessi oli myös humuksisen Nimettömän vedessä abiottinen. Bakteerien läsnä ollessa muodostuneet  $\cdot\text{OH}$ -pitoisuudet eivät olleet tilastollisesti merkittäviä autoklavoituu näytteeseen verrattuna, mistä pääteltiin, että myös järvessä, jossa rautaa ja liuennutta orgaanista ainesta on enemmän, bakteerit joko inhiboivat hydroksyyli-radikaalien muodostumista (Kuva 21b), tai niiden toiminnalla ei ole merkittävää vaikutusta  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumiseen (Kuva 21a). Biogeenisestä Fentonin reaktiota ei näin ollen havaittu tutkimuksessa.

Tuloksien yhteenvedona Taulukossa 8 on esitetty vielä muodostumisnopeudet ja kertyneet pitoisuudet tarkastellulla aikavälillä kaikissa kokeen käsittelyissä.

Taulukko 8.  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeudet ja kumuloituneet konsentraatiot.

Järvi	Käsittely	Muodostumisnopeus ( $\text{nM s}^{-1}$ )	Kumuloitunut [ $\cdot\text{OH}$ ] ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Aikaväli (h)
Korkea DOC (Nimetön)	polyeteeni (PE)	0,0010	1,090	672–984
	polypropeeni (PP)	0,0009	0,970	672–984
	polystyreeni (PS)	0,0011	1,260	672–984
	ligniini (lig)	0,0007	0,840	672–984
	autoklavoitu (A)	0,0004	0,490	0–312
Matala DOC (Vesijärvi)	polyeteeni (PE)	0,00000013	0,001	0–984
	polypropeeni (PP)	0,00000050	0,002	0–984
	polystyreeni (PS)	0,00000052	0,002	0–984
	ligniini (lig)	0,00000040	0,001	0–984
	autoklavoitu (A)	0,00000280	0,010	0–984

### 4.3 Tilastolliset analyysit

Muodostuneiden hydroksyyliiradikaalien pitoisuuksien vertailu tehtiin riippumattomien otosten t-testillä. T-testin tarkemmat tulokset p-arvoineen on esitetty liitteissä (Liitteet 3 ja 4).

Hydroksyyliiradikaalien muodostumisessa havaittiin merkittäviä eroja järvien välillä ( $p \leq 0,01$ ) toisiaan vastaavissa substraattikäsittelyissä (Liite 3). Korkean DOC:n järven näytteiden  $\cdot\text{OH}$ -pitoisuudet olivat jopa tuhatkertaisia matalan

DOC:n järven näytteisiin nähden. Järvien sisäisessä vertailussa (Liite 4) korkean DOC:n järven käsittelyt olivat hydroksyyliiradikaalien tuotannoltaan keskenään samanlaisia ( $p \geq 0,05$ ) (Kuva 21b) ja matalan DOC:n järvessä käsittelyt olivat keskenään tilastollisesti erilaisia, mutta erot selittyvät mittausmenetelmän epätarkkuudella hyvin pieniä pitoisuuksia mitatessa.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

Hydroksyyliiradikaaleja muodostavaa biogeenistä Fentonin reaktiota ei havaittu kokeessa. Hydroksyyliiradikaaleja kuitenkin muodostui, mutta bakteerien läsnäolo ei lisännyt muodostumista merkittävästi.

### 5.1 Järvivesinäytteissä muodostuneet hydroksyyliiradikaalit

Vaikka biogeenistä Fentonin reaktiota ei havaittu, hydroksyyliiradikaalien muodostumisesta tehtiin muita huomioita kokeen aikana. Liunneen orgaanisen aineen määrä ja veden rautapitoisuus tehostivat  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumista.  $\cdot\text{OH}$ :a muodostui enemmän humuksisessa ja rautapitoisessa järvivedessä (Nimetön), kuin toisessa kirkaampivetisessä vedessä, joka sisälsi vain vähän rautaa. Vastaavasti myös  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisnopeudet olivat korkean DOC:n järvessä suurempia kuin matalan DOC:n järvessä. Tulos tuki hypoteesia liunneen orgaanisen aineen ja siihen sitoutuneen raudan  $\cdot\text{OH}$ :n muodostusta edistävästä vaikutuksesta. Raudan merkitys Fentonin reaktiossa on yleisesti tunnettu (Wallin 1975, Salgado ym. 2013, Gligorovski ym. 2015).

Korkean DOC:n järviveden hydroksyyliiradikaalien kumuloituneissa määrissä ei huomattu tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyjen välillä. Tilastollisten erojen puuttuessa  $\cdot\text{OH}$ :a muodostavan mekanismin toiminta vaikutti olevan samanlainen kaikissa järven käsittelyissä. Matalan DOC:n järven tapauksessa muodostuneet hydroksyyliiradikaalien pitoisuudet olivat niin pieniä, ettei niiden välisillä



eroavaisuuksilla ollut olennaista merkitystä, sillä olennaisempia olivat eroavaisuudet järvien välillä.

Xiaon ym. (2020) tutkimuksessa Fentonin reaktio saatiin keinotekoisessa makeassa vedessä aikaiseksi superoksidien avulla DOM-Fe-kompleksien läsnä ollessa. Superoksidianioniradikaalit ( $O_2^{\bullet-}$ ) reagoivat DOC:hen liittyneiden metallien ja kinonien kaltaisten ryhmien kanssa, jolloin Fentonin reagensseja muodostuu uudelleen veteen reaktion käyttöön. Abioottinen  $\bullet OH$ :a muodostava prosessi, joka havaittiin tämän tutkimuksen autoklavoiduissa näytteissä, oli mahdollisesti seurausta Fentonin reagenssien uudelleenmuodostumisesta veteen, mistä aiheutui vedessä jatkuva autokatalyyttinen Fentonin reaktio (ks. Xiao ym. 2020).

Xiaon ym. (2020) tutkimuksessa määritettiin muodostumisnopeuksia  $\bullet OH$ :lle keinotekoisessa makeassa vedessä. Käsittelyssä, johon ei lisätty ROS-lähdettä ja käsittelyssä, johon lisättiin rautaa,  $\bullet OH$ :n muodostumisnopeus  $R_f^{\bullet OH}$  oli 0,0031-0,0034 nM s<sup>-1</sup>. Tässä tutkimuksessa korkean DOC:n järven  $\bullet OH$ :n muodostumisnopeudet olivat hieman pienempiä 0,0004–0,0011 nM s<sup>-1</sup>. Matalan DOC:n järvestä muodostumisnopeudet olivat moninkertaisesti pienempiä, eivätkä vastanneet aiemmassa tutkimuksessa saatuja tuloksia, mikä oli todennäköisesti seurausta vähäisestä rautapitoisuudesta.

Käsittelyssä, johon ROS-lähde oli lisätty, Xiaon ym. (2020) raportoima  $\bullet OH$ :n muodostumisnopeus oli 0,039 nM s<sup>-1</sup> ja käsittely, johon oli lisätty ROS-lähteen lisäksi rautaa, muodostumisnopeus oli 1,14 nM s<sup>-1</sup>. Molemmat näistä arvoista olivat huomattavasti korkeampia, kuin tässä tutkimuksessa mitatut tulokset.

Xiaon ym. (2020) raportoimista  $\bullet OH$ :n muodostumisnopeuden arvoista lähimpänä tämän tutkimukset arvoja oli käsittely, joissa oli rautaa ja ulkoista ROS-lähdettä ei ollut lisätty, mikä vastasi myös asetelmaa tämän kokeen Nimetön-järven (korkea DOC) tapauksessa.

## 5.2 Huomioita autoklavoiduista näytteistä

Molempien järvivesien autoklavoiduissa näytteissä muodostui hydroksyyliiradikaaleja (Kuva 20 ja 15), vaikka bakteeritoiminta oli poistettu näytteistä. Tämä viittasi  $\cdot\text{OH}$ :a muodostavan prosessin abioottisuuteen. Todennäköisesti autoklavoiduissa näytteissä tapahtunut reaktio aiheutui Fentonin reaktioon liittyvästä Fe(II)-katalyytin kierrätyksestä, joka mahdollisti hydroksyyliiradikaalien muodostumisen niin kauan, kun vedessä oli saatavilla vetyperoksidia ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (García Einschlag ym. 2015). Tämä selittäisi, miksi  $\cdot\text{OH}$ :n muodostuminen jatkui näissä näytteissä usean viikon ajan.

## 5.3 Mikrobiyhteisön yhteys hydroksyyliiradikaalien muodostuminen

Tulokset viittasivat siihen, että bakteerien läsnäolo saattoi joissain tapauksissa inhiboida hydroksyyliiradikaalien muodostumista vesissä. Bakteerien puuttuminen näytti aiheuttavan hydroksyyliiradikaalien runsaan muodostumisen järviveteen, kun taas bakteerien kanssa pitoisuudet olivat merkittävästi pienempiä ( $p < 0,01$ ). Tämä huomattiin matalan DOC:n järven (Vesijärvi) näytteistä, joista autoklavoidussa käsittelyssä hydroksyyliiradikaaleja muodostui kokeen aikana (984 h)  $0,010 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kun bakteereja sisältävissä näytteissä vastaava arvo oli enimmillään  $0,002 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Mahdollinen selitys voi olla bakteerien suojautumismekanismi hapettavilta yhdisteiltä (Cabiscol ym. 2000), mikä estäisi samalla autokatalyyttista ROS-muodostumista vedessä. Korkean DOC:n järvessä vastaavaa ei kuitenkaan havaittu, tai muutokset olivat niin pieniä, ettei niillä ollut tilastollista merkitystä. Ero järvivesien välillä voi johtua mahdollisesti erilaisista mikrobiyhteisöistä. Humusveden kemiallisten ominaisuuksien takia  $\cdot\text{OH}$ :a muodostui runsaasti verrattuna kirkasvetiseen järveen, mikä voi aiheuttaa sen, että humuksisen järven mikrobiyhteisö adaptoituu ajan kuluessa suurempaan  $\cdot\text{OH}$ -kuormitukseen. Tämä selittäisi, miksi bakteereita sisältäneissä näytteissä ei Nimettömän (korkea DOC) osalta havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisessa autoklavoituun näytteeseen nähden.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Bakteerien osallisuutta hydroksyyli-radikaalien ( $\cdot\text{OH}$ ) muodostamiseen ei pystytty todistamaan, sillä biologisesti aktiivisissa näytteissä  $\cdot\text{OH}$ :n muodostuminen ei ollut kummassakaan järvessä suurempaa kuin vastaavissa autoklavoiduissa näytteissä. Prosessi, jossa hydroksyyli-radikaaleja muodostui, viittasi siten todennäköisemmin abioottiseen prosessiin kuin biologisesti katalysoituun Fentonin reaktioon.

Hypoteesin mukaisesti hydroksyyli-radikaaleja kuitenkin muodostui enemmän humuksisessa, korkean DOC:n järvessä kuin matalan DOC:n järvessä, mutta runsaan  $\cdot\text{OH}$ -muodostumisen syynä oli todennäköisemmin korkeampi rautapitoisuus liuenneeseen orgaanisen aineeseen sitoutuneen raudan takia. Tämä tuki hypoteesia raudasta  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumista voimistavana tekijänä, mikä oli myös oletettavaa Fentonin reaktion toimintaperiaatteen perusteella.

Korkean DOC:n järvessä  $\cdot\text{OH}$ :n muodostumisessa ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa autoklavoituun näytteeseen nähden. Matalan DOC:n järvessä muodostuneet pitoisuudet olivat bakteereja sisältävissä näytteissä huomattavasti pienempiä kuin autoklavoidussa näytteessä. Syitä näihin järvien välisiin eroihin  $\cdot\text{OH}$ :n muodostuneissa (1) järvien erilaiset DOC-pitoisuudet (2) rautapitoisuus ja (3) humuksen taipumus muodostaa Fe-DOM-komplekseja. On myös mahdollista, että (4) järvien erilaiset mikrobiyhteisöt reagoivat hydroksyyli-radikaaleja kohtaan eri tavoin. Matalan DOC:n järven tapauksessa tulokset antoivat viitteitä mahdollisesta puskuroivasta suojautumismekanismista hydroksyyli-radikaalien liiallista muodostumista vastaan. Korkean DOC:n vastaavaa ei huomattu, mistä pääteltiin, että humuksisissa vesissä elävät bakteeripopulaatiot olivat mahdollisesti adaptoituneet järvelle ominaiseen hydroksyyli-radikaalien kuormitukseen.

## KIITOKSET

Lopuksi haluan kiittää työn ohjaajaa yliopistonlehtori Anssi Vähätaloa mielenkiintoisesta aiheesta ja mahdollisuudesta työskennellä tärkeän tutkimuksen parissa, professori Sami Taipaleen rahoituksesta ja kiinnostuksesta sisällyttää myös tämä työ isompaan vesistöjen mikromuovien hajoamista koskevaan tutkimukseen. Kiitos myös väitöskirjatyöntekijöille Jussi Vesamäelle yhteisen koeasetelman järjestämisestä ja kunnossapidosta ja Jaakko Litmaselle vesinäytteiden hakemisesta. Lisäksi erityiskiitos Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteen laitoksen asiantuntevalle laboratorioteknikoille Emma Pajuselle, Mervi Koistiselle ja Nina Honkaselle, sekä laboratorionsinööri Hannu Pakkaselle korvaamattomasta avusta ja opastuksesta laboratoriotöissä.

## KIRJALLISUUS

- Aiken G.R., Thurman E.M., Malcolm R.L. & Harold F.W. 1979. Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* 51: 1799–1803.
- Aitkenhead-Peterson J.A., McDowell W.H. & Neff J.C. 2002. Sources, Production, and Regulation of Allochthonous Dissolved Organic Matter Inputs to Surface Waters. Teoksessa: Sinsabaugh R.L. (toim.) & Finlay S. (toim.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 25–70.
- Anderson J.C., Park B. J. & Palace V.P. 2016. Microplastics in aquatic environments: implications for. Canadian Ecosystems. *Environmental Pollution* 218: 269–280.
- Anderson T., Shifley L., Amarasiriwardena D., Siripinyanond A., Xing B. & Barnes R.M. 2001. Characterization of Trace Metals Complexed to Humic Acids Derived from Agricultural Soils, Annelif Composts, and Sediment by Flow Field-Flow Fractionation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (Flow FFF-ICP-MS). Teoksessa: Ghabbour E.A. (toim.) & Davies G. (toim.), *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Athenaeum Press Ltd, Gateshead, Tyne & Wear, UK, pp. 165–178.
- Arnosti C. 2002. Microbial Extracellular Enzymes and Their Role in Dissolved Organic Matter Cycling. Teoksessa: Sinsabaugh R.L. (toim.) & Finlay S. (toim.),

- Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–342.
- Arnosti C. 2004. Speed bumps and barricades in the carbon cycle: Substrate structural effects on carbon cycling. *Marine Chemistry* 92: 263–273.
- Arnosti C. 2010. Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Annual Review of Marine Science* 3: 401–425.
- Benner R. 2002. Molecular Indicators of the Bioavailability of Dissolved Organic Matter. Teoksessa: Sinsabaugh R.L. (toim.) & Finlay S. (toim.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 121–137.
- Brinkmann T., Hörsch P., Sartorius D. & Frimmel F.H. 2003. Photoformation of Low-Molecular-Weight Organic Acids from Brown Water Dissolved Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 37: 4190–4198.
- Burgos Castillo R.C., Fontmorin J-M., Tang Walter Z., Dominiguez-Benetton X. & Sillanpää M. 2018. Towards reliable quantification of hydroxyl radicals in the Fenton reaction using chemical probes. *RSC Advances* 8: 5321–5330. DOI:10.1039/c7ra13209c.
- Buxton G.V., Greenstock C.L., Helman W.P. & Ross A.B. 1988. Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals ( $\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$ ) in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 17: 513.
- Cabiscol E., Tamarit J. & Ros, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3: 3–8.
- Carena L., Minella M., Barsotti F., Brigante M., Milan M., Ferrero A., Berto S., Minero C. & Vione D. 2017. Phototransformation of the Herbicide Propanil in Paddy Field Water. *Environmental Science & Technology* 51: 2695–2704.
- Diaz J.M. & Plummer S. 2018. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *Journal of Plankton Research* 40: 655–666.
- Eerkes-Medrano D., Thompson R.C. & Aldridge D.C. 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 75: 63–82.
- Findlay S. 2002. Bacterial Response to Variation in Dissolved Organic Matter. Teoksessa: Sinsabaugh R.L. (toim.) & Finlay S. (toim.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 363–379.
- García Einschlag F.S., Braun A.M. & Oliveros E. 2015. Fundamentals and Applications of the Photo-Fenton Process to Water Treatment. Teoksessa: Bahnemann D. (toim.) ja Robertson (toim.), *Environmental Photochemistry Part III. The Handbook of Environmental Chemistry* 35. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 301–342.

- Gligorovski S., Streckowski R., Barbati S. & Vione D. 2015. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ( $\bullet\text{OH}$ ). *Chemical Reviews* 115: 13051–13092.
- Goldstone J.V., Pullin M.J., Bertilsson S. & Voelker B.M. 2002. Reactions of Hydroxyl Radical with Humic Substances: Bleaching, Mineralization, and Production of Bioavailable Carbon Substrates. *Environmental Science & Technology* 36: 364–372.
- Gu C., Wang J., Liu S., Liu G., Lu G. & Jin R. 2016. Biogenic Fenton-like Reaction Involvement in Cometabolic Degradation of Tetrabromobisphenol A by *Pseudomonas* sp. fz. *Environmental Science & Technology* 50: 9981–9989.
- Hessen D.O. 1999. Catchment Properties and Transport of Major Elements to Estuaries. Teoksessa: Nedwell D.B. & Raffaelli D.G. (toim.), *Advances in Ecological Research*. Academic Press, pp. 1–41.
- Hessen D.O. & Tranvik L.J. 1998. Aquatic Humic Matter: from Molecular Structure to Ecosystem Stability. Teoksessa: Hessen D.O. & Tranvik L.J. (toim.), *Aquatic Humic Substances. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol. 133*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 333–342.
- Ivleva N.P., Wiesheu A.C. & Niessner R. 2017. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition* 56: 1720–1739. DOI: 10.1002/anie.201606957.
- Krikštaponis A. & Meškys R. 2018. Biodegradation of 7-Hydroxycoumarin in *Pseudomonas mandelii* 7HK4 via *ipso*-Hydroxylation of 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-propionic Acid. *Molecules* 23: 2613. DOI: 10.3390/molecules23102613.
- Louit G., Foley S., Cabillic J., Coffigny H., Taran F., Valleix A., Renault J.P. & Pin S. 2005. The reaction of coumarin with the OH radical revisited: hydroxylation product analysis determined by fluorescence and chromatography. *Radiation Physics and Chemistry* 72: 119–124.
- MacCarthy P. 2001. The Principles of Humic Substances: An Introduction to the First Principle. Teoksessa: Ghabbour E.A. (toim.) & Davies G. (toim.), *Humic Substances: Structures, Models and Functions*. Athenaem Press Ltd, Gateshead, Tyne & Wear, UK, pp. 19–30.
- Maranger R. & Pullin M. J. 2002. Elemental Complexation by Dissolved Organic Matter in Lakes: Implications for Fe Speciation and the Bioavailability of Fe and P. Teoksessa: Sinsabaugh R.L. (toim.) & Finlay S. (toim.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 185–214.
- Mostofa K.M.G., Liu C., Mottaleb M.A., Wan G., Ogawa H., Vione D., Yoshioka T. & Wu F. 2013a. Dissolved Organic Matter in Natural Waters. Teoksessa: Mostofa K.M.G. (toim.), Yoshioka T. (toim.), Mottaleb A. (toim.) & Vione D. (toim.), *Photobiogeochemistry of Organic Matter: Principles and Practices in Water Environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–137.

- Mostofa K.M.G, Liu C., Minakata D., Wu F., Vione D., Mottaleb M.A., Yoshioka T. & Sakugawa H. 2013b. Photoinduced and Microbial Degradation of Dissolved Organic Matter in Natural Waters. Teoksessa: Mostofa K.M.G. (toim.), Yoshioka T. (toim.), Mottaleb A. (toim.) & Vione D. (toim.), *Photobiogeochemistry of Organic Matter: Principles and Practices in Water Environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 273–364.
- Münster U. & De Haal H. 1998. The Role of Microbial Extracellular Enzymes in the Transformation of Dissolved Organic Matter in Humic Waters. Teoksessa: Hessen D.O. & Tranvik L.J. (toim.), *Aquatic Humic Substances. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol. 133*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 199–257.
- Newton G.L. & Milligan J.R. 2006. Fluorescence detection of hydroxyl radicals. *Radiation Physics and Chemistry* 75: 473–478.
- Nürnberg G.K. & Shaw M. 1999. Productivity of clear and humic lakes: nutrients, phytoplankton, bacteria. *Hydrobiologia* 382: 97–112.
- Oravainen R. 1999. *Vesistötulosten tulkinta -opasvihkonen*. Kokemäen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry, Tampere.
- Paciolla M.D., Davies G. & Jansen S.A. 1999. Generation of Hydroxyl Radicals from Metal-Loaded Humic Acids. *Environmental Science & Technology* 33: 1814–1818.
- Palviainen M. ja Finér L. 2013. *Kunnostusojituksen vaikutus vesistöjen humuskuormitukseen*. TASO-hankkeen julkaisuja Vol. 2013, saatavissa <http://www.ymparisto.fi/fi-FI/tasohanke/Julkaisut>.
- Payá M., Halliwell B. & Hoult J.R.S. 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology* 44: 205–214.
- Perdue E.M. & Ritchie J.D. 2005. Dissolved Organic Matter in Freshwaters. Teoksessa: Drever J.I. (toim.), *Surface and Ground Water, Weathering, and Soils: Treatise on Geochemistry, vol.5*. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 273–318.
- Peuravuori J. 1999. Precision of Isolation of Aquatic Humic Matter by Xad-Resin Technology from NMR Spectroscopy's Point of View. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 76: 179–198.
- Ramírez-Flandes S., González B. & Ulloa O. 2019. Redox traits characterize the organization of global microbial communities. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 3630–3635.
- Salgado P., Melin V., Contreras D., Moreno Y. & Mansilla H.D. 2013. Fenton Reaction Driven by Iron Ligands. *Journal of the Chilean Chemical Society* 58: 2096–2101.
- Saran M. 2003. Review: To What End does Nature produce Superoxide? NADPH Oxidase as an Autocrine Modifier of Membrane Phospholipids Generating Paracrine Lipid Messengers. *Free Radical Research* 37: 1045–1059.

- Sekar R. ja DiChristina T.J. 2014. Microbially Driven Fenton Reaction for Degradation of the Widespread Environmental Contaminant 1,4-Dioxane. *Environmental Science & Technology* 48: 12858–12867.
- Sinsabaugh R.L. & Findlay S. 2003. *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, Amsterdam.
- Taipale S.J., Peltomaa E., Kukkonen J.V.K., Kainz M.J., Kautonen P. & Tirola M. 2019. Tracing the fate of microplastic carbon in the aquatic food web by compound-specific isotope analysis. *Scientific Reports* 9: 19894. DOI: 10.1038/s41598-019-55990-2
- Thurman E.M. 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Martinus Nijhoff/Dr. W Junk Publishers, Dordrecht.
- Tranvik L.J. & Jørgensen N.O.G. 1995. Colloidal and dissolved organic matter in lake water: Carbohydrate and amino acid composition, and ability to support bacterial growth. *Biogeochemistry* 30: 77–97.
- Verdugo P., Alldredge A.L., Azam F., Kirchman D.L., Passow U. & Santschi P.H. 2004. The oceanic gel phase: A bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry* 92: 67–85.
- Vermilyea A.W., Dixon T.C. & Voelker B.M. 2010. Use of H<sub>2</sub>18O<sub>2</sub> to measure absolute rates of dark H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in freshwater systems. *Environmental Science & Technology* 44: 3066–3072.
- Vione D., Das R., Rubertelli F., Maurino V., Minero C., Barbati S. & Chiron S. 2010. Modelling the occurrence and reactivity of hydroxyl radicals in surface waters: implications for the fate of selected pesticides. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 90: 260–275.
- Vähätalo A.V., Xiao Y. & Salonen K. 2021. Biological Fenton reaction — a possible mechanism for the mineralization of dissolved organic carbon in fresh waters. *Water Research* 188: 116483.
- Wagner M. & Lambert S. 2018. *Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants, The Handbook of Environmental Chemistry* 58. Springer, Cham, Switzerland, pp. 1–303. DOI 10.1007/978-3-319-61615-5\_1.
- Wallin C. 1975. Fenton's Reagent Revisited. *Accounts of Chemical Research* 8: 125-131.
- Xiao Y., Carena L., Näsi M-T. & Vähätalo A.V. 2020. Superoxide-driven autocatalytic dark production of hydroxyl radicals in the presence of complexes of natural dissolved organic matter and iron. *Water Research* 177: 115782.
- Xiao Y., Hoikkala L., Kasurinen V., Tirola M., Kortelainen P. & Vähätalo A. 2016. The effect of iron on the biodegradation of natural dissolved organic matter. *Journal of Geophysical Research G: Biogeosciences* 121: 2544–2561. DOI: 10.1002/2016JG003394.



- Xu H. & Guo L. 2018. Intriguing changes in molecular size and composition of dissolved organic matter induced by microbial degradation and self-assembly. *Water Research* 135: 187-194.
- Zularisam A.W., Ahmad A., Sakinah M., Ismail A.F. & Matsuura T. 2011. Role of natural organic matter (NOM), colloidal particles, and solution chemistry on ultrafiltration performance. *Separation and Purification Technology* 78: 189-200.

## LIITE 1. HPLC-standardien pitoisuudet ja pinta-alat

Kumariinin ja 7-hydroksikumariinin standardien pitoisuudet ja niitä vastaavat pinta-alat.

<b>Kumariinin standardit (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Pinta-ala (vk 0-3)</b>	<b>Pinta-ala (vk 4-6)</b>	<b>7OH-kumariinin standardit (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Pinta-ala</b>
0,020	-	592	0,020	396709
0,200	1771	1953	0,080	1631529
0,500	6541	3947	0,200	4096160
1,000	10566	-	1,000	20402942
2,000	25723	16657		
5,000	51635	43452		
10,000	98828	86098		

## LIITE 2. Käyrien sovituksissa käytetyt funktiot

Mittaus	Käsittely	Funktio, $f(t)$	R <sup>2</sup>	
[Cou] <sub>t</sub>	NPE	$-5,726E-02t + 1,901E+01$	0,998	
	NPP	$-5,206E-02t + 1,860E+01$	0,997	
	NPS	$-5,465E-02t + 1,955E+01$	1,000	
	Nlig	$-2,980E-02t + 2,086E+01$	0,999	
	NA	$7,002E-04t + 1,063E+01$	0,872	
	N	0	1,000	
	VPE	$-3,858E-03t + 1,128$	0,846	
	VPP	$3,962E-03t + 1,124E+01$	0,727	
	VPS	$-9,337E-04t + 1,101E+01$	0,583	
	Vlig	$-6,279E-04t + 1,103E+01$	0,853	
	VA	$-5,987E-04t + 1,093E+01$	0,943	
	V	0	1,000	
	[7OHCou] <sub>t</sub>	NPE	$-9,482E-06t^2 + 3,351E-03t + 2,686E-02$	1,000
		NPP	$-2,396E-01t^2 + 1,005t - 7,23E-01$	1,000
NPS		$-1,141E-05t^2 + 4,190E-03t + 4,845E-02$	1,000	
Nlig		$-5,738E-06t^2 + 3,223E-03t + 6,745E-02$	1,000	
NA		$6,289E-03t + 6,359E-01$	0,997	
N		0	1,000	
VPE		$1,722E-04t - 1,936E-02$	0,853	
VPP		$2,744E-04t - 1,577E-02$	0,957	
VPS		$2,834E-04t + 1,805E-02$	0,997	
Vlig		$1,077E-04t + 1,458E-02$	0,995	
VA		$5,555E-04t + 5,310E-02$	0,995	
V		0	1,000	
R <sub>t</sub> (*OH)		NPE	$5,981E-15t + 3,290E-14$	0,996
		NPP	$5,366E-15t + 2,695E-14$	0,981
	NPS	$6,761E-15t + 7,030E-14$	0,990	
	Nlig	$3,501E-15t + 2,002E-13$	1,000	
	NA	$1,605E-15t + 1,868E-13$	1,000	
	N	0	1,000	
	VPE	$5,279E-19t + 4,099E-17$	0,993	
	VPP	$1,484E-18t + 1,5973E-18$	0,997	
	VPS	$1,2831E-18t + 6,6221E-17$	0,999	
	Vlig	$6,552E-19t + 7,840E-17$	0,978	
	VA	$4,857E-18t + 4,208E-16$	1,000	
	V	0	1,000	

### LIITE 3. Riippumattomien otosten t-testi: järvien välinen vertailu

Vertailtavat käsittelyt	Levenen testi	Riippumattomien otosten t-testi	Keskiarvon erilaisuus	Keskivirheen erilaisuus	95 %- luottamusvälin alaraja	95 %- luottamusvälin yläraja
NPE - VPE	$F(1,28) = 40,094, p < 0,001$	$t(14) = 4,203, p = 0,001$			0,22924363	0,70708178
NPP - VPP	$F(1,28) = 41,826, p < 0,001$	$t(14) = 4,435, p = 0,001$	0,40353151	0,09098491	0,20838831	0,59867471
NPS - VPS	$F(1,28) = 40,204, p < 0,001$	$t(14) = 4,288, p = 0,001$	0,52290183	0,12195267	0,26133937	0,78446428
Nlig - Vlig	$F(1,28) = 40,579, p < 0,001$	$t(14) = 4,313, p = 0,001$	0,36503987	0,8464187	0,18350111	0,54657863
NA - VA	$F(1,28) = 42,712, p < 0,001$	$t(14) = 4,936, p < 0,001$	0,29198105	0,05914863	0,16512001	0,41884210
N - V	Kaikki absoluuttiset jakaumat ovat vakioita, jolloin F-arvoa ei voida laskea.	T-arvoa ei voida laskea, sillä molempien ryhmien keskihajonta on 0.				

#### LIITE 4. Riippumattomien otosten t-testi: järvien sisäinen vertailu

Järvikohtaisten käsittelyiden vertailu toisiinsa riippumattomien otosten t-testillä. Taulukossa on esitetty järvikohtaisten käsittelyiden riippumattomien otosten t-testistä saadut p-arvot. N-alkuiset käsittelyt kuvaavat Nimetön-järven näytteitä (korkea DOC) ja V-alkuiset käsittelyt Vesijärven näytteitä (matala DOC).

	<b>NPE</b>	<b>NPP</b>	<b>NPS</b>	<b>Nlig</b>	<b>NA</b>	<b>N</b>
<b>NPE</b>		0,657	0,743	0,467	0,178	0,001
<b>NPP</b>	0,657		0,440	0,758	0,315	0,001
<b>NPS</b>	0,743	0,440		0,296	0,104	0,001
<b>Nlig</b>	0,467	0,758	0,296		0,489	0,001
<b>NA</b>	0,178	0,315	0,104	0,489		<0,001
<b>N</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	<0,001	

	<b>VPE</b>	<b>VPP</b>	<b>VPS</b>	<b>Vlig</b>	<b>VA</b>	<b>V</b>
<b>VPE</b>		<0,001	<0,001	0,099	< 0,001	<0,001
<b>VPP</b>	<0,001		0,159	<0,001	< 0,001	<0,001
<b>VPS</b>	<0,001	0,159		0,007	< 0,001	<0,001
<b>Vlig</b>	0,099	<0,001	0,007		< 0,001	<0,001
<b>VA</b>	<0,001	<0,001	< 0,001	< 0,01		< 0,001
<b>V</b>	<0,001	<0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,001	