

KOIVUTISLE LEHTOKOTILOIDEN (*Arianta arbustorum*)  
KARKOTTEENA JA SEN KÄYTÖN YMPÄRISTÖ-  
VAIKUTUKSET MAAPERÄSSÄ JA VESIELIÖISSÄ

TIINA PASANEN

HELSINGIN YLIOPISTO  
YMPÄRISTÖEKOLOGIAN LAITOS  
PRO GRADU –TUTKIELMA  
22.8.2006

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Biotieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution Ympäristöekologian laitos	
Tekijä – Författare Tiina Pasanen			
Työn nimi – Arbetets titel Koivutisle lehtokotiloiden ( <i>Arianta arbustorum</i> ) karkotteena ja sen käytön ympäristövaikutukset maaperässä ja vesieliöissä			
Oppiaine – Läroämne Ympäristöekologia			
Työn laji – Arbetets art Pro gradu	Aika – Datum 22.8.2006	Sivumäärä – Sidoantal 42	
Tiivistelmä – Referat <p>Lehtokotilo (<i>Arianta arbustorum</i>) on yleistynyt eteläisessä ja keskisessä Suomessa 1960-luvulta lähtien. Varsin usein se muodostaa runsaita massaesiintymiä, joista Suomessa kuuluisia ovat mm. Porvoon ja Lahden esiintymät. Lehtokotilo on kaikkiruokainen, mutta varsin usein se viihtyy pihojen ja puutarhojen viljelykasveilla. Tiheissä esiintymissä kotiloiden vaikutus istutuksiin on huomattava.</p> <p>Pro gradu-työni on osa Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen koivutisleprojektia. Koivutisle syntyy grillihiilituotannon sivutuotteena ja se sisältää tuhansia erilaisia yhdisteitä. Koivutisle voidaan erottaa paksumpaan terva- ja juoksevampaan tisleeseen. Koivutisleen koostumus ei ole vielä selvillä, mutta tisleen vaikutusta tuholaiskarkotteena on kokeiltu useilla eliöillä, mm. etanoilla. Tutkimukseni tarkoitus oli tutkia koivutisleen karkotetehoa lehtokotiloihin. Karkotevaikutuksen lisäksi tutkin myös koivutisleen käytön aiheuttamaa haittaa muille eliöille maa- ja vesiympäristössä.</p> <p>Koivutisleen karkotetehoa tutkittiin tervatisleellä maalattujen aidanteiden avulla. Tutkimuksissa oli mukana kahdenlaisia kotiloidannekokeita: toisissa rajattiin kotilot aidanteiden sisään, toisissa ulos. Kesän 2004 kokeessa lauta-aidanteiden sisään sijoitettiin 50 kotiloa, jotka laskettiin uudelleen kokeen lopussa. Koe toistettiin laajempaan kesällä 2005 käyttäen uudenlaisia muovipleksiaidanteita ja seuraten kotiloiden määrää aidanteissa useamman kerran kokeen aikana. Toisessa kesän 2005 kokeessa aidanteet sijoitettiin alueelle, jossa kotiloita esiintyy runsaasti ja seurattiin niiden liikkumista aidanteisiin kokeen aikana. Kesän 2005 kokeissa tervatisleen joukkoon lisättiin vaseliinia tervan säänkestävyyden parantamiseksi.</p> <p>Tisleen vaikutuksia maaperässä tutkittiin kenttäkokeella sekä kasvittomin ja kasvillisin mikrokosmoksien. Pellolle ruiskutettiin 100 % koivutislellä. Mikrokosmokset puolestaan ruiskutettiin 100 % tai 5 % koivutisleellä. Kenttä- ja mikrokosmoskokeista otettiin näytteet viidesti kokeen aikana. Tällöin maasta erotettiin sukkula- ja änkyrimadot märkäsappilomenetelmää käyttäen. Madot laskettiin ja määritettiin änkyrimatojen biomassa. Tisleen vaikutusta mikrobeihin tutkittiin mikrobiaktiivisuuden muutoksina. Mikrobiaktiivisuuden määrittämiseen käytettiin CO<sub>2</sub>-tuottoa mittaavaa respiometriä ja EasyQuant-hiilianalysointia. Kokeen lopussa kasvillisista mikrokosmoksista määritettiin myös kasvibiomassa. Koivutisleen vesistövaikutusten tutkimista varten valittiin kuuden vesieliön joukko, jotka altistettiin useammalle tislepitoisuudelle. Koe-eliönä oli yksi bakteeri, yksi kasvi ja neljä selkärangattomia. Seurattava vasteena oli koe-eliöstä riippuen kuolleisuus, käyttäytymismuutokset tai kasvun inhibitio. Vasteen avulla laskettiin tisleen EC<sub>50</sub>-pitoisuudet (effect concentration) kullekin koe-eliölle.</p> <p>Tervatisle toimii kotiloita karkottaen. Karkoteteho parani lisättäessä tisleen joukkoon vaseliinia ja taustalla lienee parantunut säänkestävyys. Sadesää heikensi tervatisleen karkotetehoa muuttamalla sen värin vaaleanruskeaksi ja mattapintaiseksi. Terva-vaseliiniseos pysyi sen sijaan aina mustana ja kiiltävänä ja sen karkoteteho säilyi sateista huolimatta. Mikrokosmoskokeet osoittavat, että ruohovartisten kasvit kuihtuivat tiseruiskutuksesta, mutta alkoivat toipua jo saman kasvukauden aikana. Tisle ei puolestaan vaikuttanut maassa eläviin änkyrimatoihin, mutta peltomaassa elävät sukkulamadot kärsivät tisleestä jonkin verran. Mikrobiaktiivisuus nousi kasvittomissa 100 % tislekäsittelyissä kokeen alussa, palaten pian samaan tasoon muiden käsittelyiden kanssa. Tällainen hengityskäyrä on tyypillinen energiaressurssin lisäyksen jälkeen kun helposti käytettävä lisäresurssi käytetään nopeasti loppuun ja hengitys palautuu normaalitasolle. Myös aineen toksisuus voi saada aikaan hengityksen kasvun, jolloin puhutaan ns. huuhotusilmästä. Peltomaassa tisleellä havaittiin olevan myös negatiivinen vaikutus mikrobihengitykseen. Todennäköisesti hengityksen pieneneminen ja tisleen vaikutus sukkulamatoihin oli kuitenkin seurausta juurieritteiden vähenemisestä kasvien kuihtuessa tiseruiskutuksen myötä. Tähän viittaa myös se, että mikrobibiomassa ei muuttunut, vaikka hengitysaktiivisuus laski: resurssipulan myötä mikrobit vaipuivat lepotilaan. Vesieliöt olivat maaperäeliöitä herkempiä, todennäköisesti siksi, että vedessä suurempi osa tisleestä oli liuenneena. Tisle ei kuitenkaan ollut myöskään vesieliöille erityisen haitallista. EC<sub>50</sub>-pitoisuudet olivat välillä 0,002 - 0,089 % (noin 16–872 mg/L).</p> <p>Koivutisle toimii kotiloiden karkotteena, etenkin muovisessa kotiloidanteessa, jonka maalaamiseen käytetään tervatisleen ja vaseliinin (2:3) seosta. Vaikka aidanteet eivät pitäneet kotiloita sisällä sataprosenttisesti, pysyivät kotilot hyvin niiden ulkopuolella. Koivutisle voi joissain oloissa ja suurina määrinä olla haitaksi maaperässä ja vesistöissä, mutta se voi toimia myös resurssina mikrobeille.</p>			
Avainsanat - Nyckelord Lehtokotilo, koivutisle, karkoteteho, änkyrimadot, sukkulamadot, mikrobit, vesieliöt, ekotoksisuus			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Ympäristöekologian laitoksen käsikirjasto, Lahti			
Muita tietoja Ohjaaja, Prof. Heikki Setälä			

# SISÄLLYSLUETTELO

## TIIVISTELMÄ

1. JOHDANTO.....	2
1.1. Koivutisle.....	2
1.2. Lehtokotilon käyttäytymisen ominaispiirteet.....	3
1.3. Koivutisleen vaikutus maaperässä.....	6
1.4. Koivutisleen vaikutus vesiekosysteemissä.....	7
1.5. Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit.....	8
2. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	9
2.1. Kotilokokeet.....	9
2.1.1. Kotiloiden poistuminen tervatuista aidanteista.....	9
2.1.2. Kotiloiden tunkeutuminen tervattuihin aidanteisiin.....	11
2.2. Maaperäkokeet.....	12
2.2.1. Mikrokosmoskokeiden perustaminen ja näytteenotto.....	12
2.2.2. Toholammin kenttäkokeen perustaminen ja näytteenotto.....	13
2.2.3. Maaperäeläimet ja kasvit.....	14
2.2.4. Mikrobit.....	14
2.3. Toksisuuskokeet vesieliöillä.....	15
2.4. Tilastolliset testit.....	17
3. TULOKSET.....	18
3.1. Tervatisleen karkotevaikutus.....	18
3.2. Tisleen vaikutus eliöihin mikrokosmoksissa.....	20
3.3. Tisleen vaikutus eliöihin peltomaassa.....	23
3.4. Koivutisleen toksisuus vedessä.....	26
4. TULOSTEN TARKASTELU.....	27
4.1. Tervatisleen karkotevaikutus.....	27
4.1.1. Tervatisleen ja vaseliinin ominaisuudet.....	27
4.1.2. Koeaidanteesta kotiloidannetuotteeksi.....	28
4.2. Tisleen vaikutus maaperässä.....	29
4.2.1. Tisleen vaikutus eläinyhteisöön.....	29
4.2.2. Tislelisäyksen vaikutus maaperän mikrobeihin.....	30
4.3. Tisleen vaikutus vesieliöihin.....	31
4.4. Biosaatavuuteen ja kulkeutumiseen vaikuttavat tekijät.....	33
4.5. Yhteenveto.....	35
5. KIITOKSET.....	36
6. KIRJALLISUUS.....	37

## 1. Johdanto

Lehtokotilot ovat viime vuosikymmeninä nousseet monin paikoin ongelmaksi Etelä- ja Keski-Suomessa. Niiden runsas esiintyminen on poikanut suuren määrän uutisia ja mielipidekirjoituksia paikallisiin sanomalehtiin. Vuonna 2003 koivutisle-tutkimus yhdistettiin kotilotutkimukseen yhteisenä pyrkimyksenä löytää pätevä menetelmä kotiloiden aiheuttamien haittojen vähentämiseen. Pro gradu-työssäni tehdyt kokeet keskittyvät koivutisleen karkote-, maaperä- ja vesistövaikutusten selvittämiseen.

Gradutyöni on osa laajempaa koivutisletutkimukseen liittyvää projektia, jossa yhteistyössä toimivat Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT), Lahden seudun ympäristöpalvelut sekä Helsingin yliopisto. Projektin tavoitteena on selvittää grillihiilituotannon sivutuotteena syntyvän koivutisleen karkotevaikutusta erilaisiin tuholaisiin, kuten lehtokotiloon (*Arianta arbustorum*), etanoihin ja myyriin. Lisäksi projektin tarkoituksena on selvittää koivutisleen mahdollisia vaikutuksia muille eliöille, jotka altistuvat silloin kun tislettä käytetään.

### 1.1. Koivutisle

Koivutisle on mustaa, tervamaista, pistävänhajuista ainetta, jota syntyy koivupuun pyrolyysissä eli kuivatislauksessa. Tällöin puuaine hajoaa lämmön vaikutuksesta erilaisiksi tuotteiksi ja polttoprosessissa syntyy muun muassa tervaa, hiiltä sekä tervavettä (Paajala & Jokivartio 1989). Koivutisleen koostumus ei pysy vakiona eri valmistuserissä. Gradutyössä käyttämäni koivutisle on syntynyt grillihiilituotannon sivutuotteena (Charcoal Finland Oy). Käytän eri kokeiden yhteydessä termejä koivutisle ja tervatisle, vaikka molemmissa tapauksissa on kyse koivutisleestä. Tervatisle on paksumpaa kuin tisle ja valuu ulos polttouunista prosessin myöhemmässä vaiheessa, silloin kun lämpötila on korkeampi eli noin 380 °C.

Koivutisle on puolestaan tervatislettä juoksevampaa, vesipitoisempaa ja vesiliukoisempaa.

Kirjallisuudessa käytetään yleisesti termiä koivuterva eli tökötti, jota on usein valmistettu tislaamalla nimenomaan koivun tuolta (mm. Nykänen & Seppä 1997). Käyttämäni koivutisleen raaka-aine on käsittelemätön koivu, joten siinä lienee samoja aineita kuin koivutuohitervassa. Koivun tislaustuotteiden sisältämissä aineissa on havaittu olevan noin 10 000 ainesosaa (Granlund 1997). Esimerkiksi koivutervan ominainen haju voi johtua pyridiiniemäksistä ja lisäksi tervassa on runsaasti fenoleja (Nykänen & Seppä 1997). Koivutisleen koostumusta on tähän mennessä tutkittu hyvin vähän. Sen on havaittu sisältävän pinta-aktiivisia aineita (Marleena Hagner, suullinen tiedonanto), mutta mäntytervalle ominaiset hartsihapot sekä terpeenit koivutisleestä puuttuvat (Hagner 2004). Tisleiden vaikuttavaa ainetta ei ole kuitenkaan tähän mennessä kyetty selvittämään.

Oma työni keskittyi koostumuksen sijaan koivutisleen vaikutusten tutkimiseen ja on jatkoa Marleena Hagnerin (2004) tutkimukselle. Koska koivutisleen koostumus ja sen sisältämien yhdisteiden vaikutus koivutisleen ominaisuuksiin ei ole kaikilta osin selvillä, käytin tutkimuksessani erilaisia koivutisleseoksia. Tislemäisestä, vesipitoisemmasta koivutisleestä tehtiin useita laimennoksia. Sen sijaan tervamaiseen koivutisleeseen sekoitettiin osassa kokeita vaseliinia, jonka tarkoituksena oli parantaa aineen säänkestävyyttä.

## *1.2. Lehtokotilon käyttäytymisen ominaispiirteet*

Lehtokotilo (*A. arbustorum*, Pulmonata, Helicidae) on kuorellinen etana. Sen kuori on pyöreä ja kierteinen. Useimmiten kuorella on tummanruskealla pohjalla vaaleita läikkiä (Hutri & Mattila 1991), mutta lehtokotilosta on myös olemassa väriykseltään vaaleampia muotoja. Aikuisten lehtokotiloiden kuoren korkeus on noin

10–22 mm ja leveys noin 14–28 mm (Kerney & Cameron 1979). Kotiloiden liikkuminen kuluttaa vettä, sillä ne muodostavat liikkueensa limaa (Kerney & Cameron 1979). Siksi lehtokotilot elävät kosteissa oloissa ja liikkuvat pääasiassa öisin ja sateella. Ne liikkuvat päivittäin 0–4,5 m olosuhteista riippuen (Baur & Baur 1993). Vielä 1970-luvun lopulla Etelä-Suomi oli lehtokotilon levinneisyysalueen pohjoisreunalla (Terhivuo 1978), mutta nykyään ne ovat alkaneet yleistyä maan eteläosissa, erityisesti Etelä-Suomen tervaleppälehdoissa (Valovirta 1955, Valovirta 1991).

Lehtokotiloille on tyypillistä, että ne muodostavat suuria massaesiintymiä, jolloin kotiloita on paikallisesti hyvinkin runsaasti (Baur 1993, Kleewein 1998). Ympäristön ja kasvillisuuden laikuittaisuus johtavat paikallisiin massaesiintymiin, mutta myös sosiaalinen kasautuminen voi olla osasyynä lehtokotiloiden keräytyessä tietyille alueille (Baur 1993). Ensimmäiset massaesiintymät Suomessa havaittiin 1955 Kristiinankaupungissa kun Ilmari Valovirta löysi karikkeen joukosta runsaasti kotiloita, keskimäärin 125 kotiloa/m<sup>2</sup>. Massaesiintymiä on havaittu myös Porvoossa 1960-luvulta lähtien (Valovirta 1964) ja viime vuosikymmeninä kotilot ovat nousseet ongelmaksi Lahden ympäristössä.

Lehtokotilot ovat kaikkiruokaisia. Ne syövät kasviravinnon lisäksi kariketta, sieniä, ulostetta sekä muita eläimiä kuten kuolleita lajikumppaneitaan. (Valovirta 1964, Hägele & Rahier 2001). Eläinravinto on kotilolle helpommin käytettävissä muodossa ja sen vuoksi kuolleet kotilot ja munat ovat haluttua ravintoa kaikkiruokaisten lajitoverien keskuudessa (Baur 1990). Vaikka lehtokotilo syökin hyvin monenlaista ravintoa, sitä pidetään pääasiassa kasvinsyöjänä. Runsas yksilömäärä on syynä siihen, että lehtokotilot aiheuttavat haittaa kasvillisuudelle koti- ja ammattipuutarhoissa sekä viljelyksillä. Varsin usein lehtokotilot syövät mielellään juuri puutarhakasveja. Sata kotiloa syö noin kaksi kiloa ravintoa kuukaudessa (Valovirta 1964) joten massaesiintymissä lehtokotilon vaikutus kasvistolle voi olla

merkittävä. Kasvillisuudelle aiheuttamiensa vahinkojen lisäksi auto- ja kävelyteille sekä ruohikolle litistyvät kotilot ovat monen mielestä vastenmielisiä.

Lehtokotilot ovat kaksineuvoisia (Baur 1988) ja niiden lisääntyminen on melko nopeaa. Suojaisiin paikkoihin munittuja munarykelmiä on vuosittain 1–3, joissa kussakin on 20–80 munaa (Baur & Raboud 1988). Munan kehitys kestää 2–3 viikkoa (Terhivuo 1978). Lehtokotilot saavuttavat sukukypsyyden 2–4 –vuotiaina ja sukukypsät yksilöt elävät keskimäärin 5–8 –vuotiaiksi (Baur & Raboud 1988). Lehtokotilot talvehtivat Suomessa 5–6 kuukautta (Terhivuo 1978). Talvehtiessään ne ovat useimmiten suosa alaspäin maahan kaivautuneina (Raboud 1986). Ne heräävät horroksesta maaliskuussa ja aloittavat lisääntymisen pian kasvukauden alettua (Terhivuo 1978).

Lehtokotiloiden aiheuttamien haittojen vähentämiseksi on tähän mennessä kehitetty vain muutamia menetelmiä. Kotiloihin on koetettu esimerkiksi tuhkaa ja kalkkia ja niitä on houkuteltu ansaan oluella. Kotiloiden torjuntaan on käytetty myös Mesurol-etanakarkotetta sekä rautafosfaattipohjaista Ferramolia. Mesurolin haittana on sen sisältämän torjunta-aineen, koliiniesteraasi-inhibiittorina toimivan metiokarbin, myrkyllisyys muille eliöille varsinkin aineen kulkeutuessa vesistöihin (Kamrin 2000). Aiemmissä tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että koivutisleellä on vaikutusta kotiloihin ja etanoihin ja sitä voitaisiin mahdollisesti käyttää karkoteaineena. Karkotevaikutukseen perustuva aine ei tapa kotiloita vaan pitää ne poissa alueilta joille niitä ei haluta. Koivun tislauustuotteilla ei tähän mennessä ole ollut laajamittaista hyötykäyttöä eikä samanlaista taloudellista arvoa kuin mäntytervalla (Paajala & Jokivartio 1989).

### 1.3. Koivutisleen vaikutus maaperässä

Mikäli koivutislettä käytetään kotiloiden karkotteena kasvinsuojelussa ja koivutislevalmistetta markkinoidaan tähän tarkoitukseen, tulee valmisteen käyttö hyväksyä biosidi- tai kasvinsuojeluelainsäädännön mukaisesti. Jotta koivutisle soveltuisi karkoteaineeksi, on siis välttämätöntä tutkia aiheuttaako se uhkaa muille eliöille ympäristössä, jossa sitä käytetään. Käytön myötä osa tisleestä joutuu väistämättä maaperään, jonka eliöyhteisö voi tästä häiriintyä. Suoran altistumisen lisäksi koivutislettä voi joutua maaperään myös huuhtoutumisen kautta. Eri eliöiden herkkyys vierasaineille vaihtelee mm. sen vuoksi, että aineet kertyvät niihin eri tavoin (Peijnenburg ym. 1997). Tämän vuoksi kokeeseen valittiin kolme seurattavaa eliöryhmää eri trofiatasoilta: änkyri- ja sukkulamadot sekä maaperän mikrobit. Nämä kaikki täyttävät useimmat toksisuuskokeiden testieliöltä vaadittavat kriteerit. Ne ovat laajalle levinneitä, runsaita, merkittäviä maaperän toiminnan kannalta, lisääntyvät helposti ja kuvaavat herkästi ympäristömuutoksia (Freckman 1988, Didden & Römbke 2001, Römbke & Moser 2002, Scholter ym. 2003). Tutkin koivutisleen vaikutusta maaperään sekä yksinkertaistetuissa kasvittomissa oloissa että oloissa, joissa kasvit olivat läsnä. Tämä mahdollisti myös koivutisleen kasveille aiheuttaman vaikutuksen seuraamisen.

Änkyrimadot (Annelida, Oligochaeta) kuuluvat mesofaunaan (leveys 0,1–2 mm) (Brussaard ym. 1997) ja ovat biomassallisesti runsaita maaperäeläimiä. Pohjoisilla alueilla yksi laji, *Cognettia sphagnetorum*, muodostaa monin paikoin suurimman osan änkyrimatoesiintymistä (Nurminen 1967, Dawod & FitzPatrick 1993, Huhta ym. 1998). Änkyrimatojen vaikutus maaperän toimintaan ja sitä kautta kasvi-tuotantoon on suuri: ne vaikuttavat hajotukseen, ravinteiden kiertoon sekä maaperän rakenteeseen (Brussaard ym. 1997). Änkyrimatoa onkin luonnehdittu maa-systeemien avainlajiksi (Huhta ym. 1998). Runsautensa vuoksi änkyrimatojen aikaansaamat vaikutukset maaperän prosesseihin ovat huomattavia ja maaperä-ekosysteemin toiminnan kannalta niiden merkitys on suuri etenkin pohjoisissa



oloissa. Mikäli koivutisle vaikuttaa avainlajina toimivaan änkyrimatoon, ovat myös epäsuorat ravintoverkkovaikutukset muihin maaperän eliöihin todennäköisiä (Connell 1999).

Sukkulamadot (Nematoda) ovat tärkeitä suuren yksilömääränsä vuoksi, vaikkakaan niiden merkitys maaperän toiminnan kannalta ei ole yhtä suuri kuin änkyrimatojen (Huhta ym. 1998). Ne ovat änkyrimatoja runsaampi ryhmä sekä maailmanlaajuisesti että Suomessa, sillä lajeja on yli 11 000 (Brussaard ym. 1997, Schloter ym. 2003). Sukkulamadot kuuluvat mikrofaunaan (leveys <200 µm) (Brussaard ym. 1997) ja ne ovat jakautuneet useisiin ravinnonkäyttöryhmiin (Sohlenius 1979), joiden sisällä lajien toiminnallinen korvaavuus on suurta (Huhta ym. 1998, Laakso & Setälä 1999).

Maaperän mikrobisto on sekä biomassaltaan että lajistoltaan maaperän runsain eliöryhmä ja se osallistuu hyvin monenlaisiin prosesseihin (Islam & Wright 2003). Mikrobit vastaavat pääosin eloperäisen aineen hajotuksesta, mikä vaikuttaa suoraan ravinteiden ja hiilen kiertoon maaperässä (Martikainen 2003, Schloter ym. 2003). Mikrobisto koostuu pääasiallisesti bakteereista sekä sienistä (Schloter ym. 2003), joista jälkimmäiset usein haarautuvat ja muodostavat rihmastoja. Laajoja rihmastoja muodostavilla mykorritsasienillä on merkittävä vaikutus kasvien ravinteiden ja vedenottoon (Helmisaari ym. 2003). Lisäksi mikrobeissa on mm. aktinomykettejä ja leviä (Islam & Wright 2003).

#### *1.4. Koivutisleen vaikutus vesiekosysteemissä*

Monet aineet päätyvät lopulta vesistöihin. Myös haitallisia määriä koivutisleen sisältämiä yhdisteitä voi huuhtoutua vesistöihin ja pohjavesiin asti, mikäli aineen käyttö karkoteaineena laajenee merkittävästi. Vesieliöt ovat usein herkkiä monenlaisille orgaanisille ja epäorgaanisille myrkyille (Connell ym. 1999), sillä pienetkin

määrät haitallista ainetta ovat veteen liuenneena helposti eliöiden saatavilla. Koivutisleen vesistötoksisuuden tutkimiseksi valittiin neljä selkärangatonta eläintä sekä yksi kasvi- ja yksi bakteerilaji. Tavoitteena oli valita kattava joukko yleisesti toksisuuskokeissa käytettyjä vesieliöitä. Koe-elämistä vesisiirat (*Asellus aquaticus*, Crustacea, Isopoda) ja *Lumbriculus variegatus* –harvasukasmadot (Annelida, Oligochaeta) kuuluvat pohjaeläimiin. Lisäksi tutkittiin keuhkokotiloihin (Pulmonata) kuuluvia limakotiloita (*Lymnea sp.*), jotka esiintyvät yleisesti vesikasveilla ja voivat myös riippua veden pintakalvosta (Olsen ym. 2005). Kotilot valittiin koe-eläimiksi myös sen vuoksi, että saataisiin maakotiloiden lisäksi seurata tisleen vaikutusta vedessä eläviin kotiloihin. Pelagiaalin ja litoraalin eliöistä tutkittiin vesikirppuja (*Daphnia magna*, Crustacea, Cladocera), veden pinnalla vapaasti kelluvaa, putkilokasveihin kuuluvaa pikkulimaskaa (*Lemna minor*) ja fluoresoivaa säteilyä tuottavia *Vibrio fischeri* –valobakteereja. Ekotoksikologisten kokeiden avulla määritettiin tisleen haitallisuus kullekin tutkittavalle eliölle.

### 1.5. Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit

Kokeissa koivutisleen karkotevaikutusta tutkittiin seuraamalla liikkuvatko lehtokotilot yli tervatisleellä maalattujen aidanteiden. Aiemmin tervatisleen on havaittu vaikuttavan etanoihin ja jopa tappavan niitä (Bengt Lindqvist, suullinen tiedonanto). Marleena Hagnerin (2004) laboratorioskokeessa, jossa kotilot rajattiin maalattujen tervatislempyröiden sisään, tervatisle toimi kasvinsuojeluaineena kotiloita karkottaen, mutta se ei tappanut niitä. Tämä johtuu todennäköisesti kuoren suojaavasta vaikutuksesta. Koivutisleellä havaittiin myös olevan ainakin lyhytkestoinen vaikutus lehtokotiloihin luonnossa. Hagner (2004) selvitti kenttäkokeissaan myös tisleen vaikutusta maaperäeliöihin pienimuotoisessa kenttäkokeessa ja tällöin tisleellä ei havaittu olevan haittavaikutusta. Jatkoain maaperätutkimusta mikrokosmoskokein ja pyrin varmentamaan mikrokosmoskokeiden

tulokset laaja-alaisin kenttäkokein. Kehitin myös kotilokokeiden aidanneratkaisuja ja uusia tisleseoksia sekä selvitin tisleen vaikutusta kasvibiomassaan.

Tutkimukseni hypoteesit:

1. Tervatisle pysäyttää kotiloiden etenemisen.
2. Vaseliini parantaa tervatisleen säänkestävyyttä ja samalla sen karkotetehoa.
3. Koivutisle vaikuttaa sukkula- ja änkyrimatojen yksilömääriin, mikrobien aktiivisuuteen ja mikrobibiomassaan. Vaikutukset voivat olla sekä eliöiden määrää/aktiivisuutta vähentäviä (myrkyllisyys) että lisääviä (resurssi).
4. Koivutisleen seosominaisuuden vuoksi voidaan olettaa koivutisleen vaikuttavan vesieliöihin valikoimattomasti jo alhaisissa pitoisuuksissa.

## *2. Aineisto ja menetelmät*

### *2.1. Kotilokokeet*

#### *2.1.1. Kotiloiden poistuminen tervatuista aidanteista*

Kesän 2004 kotilokoe oli esikoeluonteinen. Marleena Hagnerin (2004) käyttämiä puisia 2 m<sup>2</sup> -aidanteita pienennettiin, sillä näin suurista aidanteista kotiloita on vaikea löytää. Käyttämäni puiset aidanteet olivat kooltaan 0,5 m x 0,5 m ja niiden korkeus oli 30 cm. Kokeen alussa aidanteet siveltiin yläreunastaan (10–15 cm) tervatisleellä. Koska kesä oli sateinen ja tervatisleen tehon havaittiin heikkenevän nopeasti sadesäällä, aitausten yläreunaan naulattiin alapinnaltaan tervattu poikkilauta suojaksi sateelta. Tervauksen kuivuttua aidanteet upotettiin kevyesti maahan. Aidanteita oli kolme ja kunkin sisään sijoitettiin 50 eri-ikäistä lehtokotiloa (Kuva 1). Koe aloitettiin heinäkuun puolivälissä ja kotiloiden yksilömäärä laskettiin elokuussa kuukauden koejakson jälkeen. Varsinaista koetta edelsi muutama esikoe,

joissa oli mukana myös kontrolliaitauksia. Kaikki kontrolliaidanteissa elävinä säilyneet kotilot poistuivat aidanteista. Tutkimusalueena oli Lahden tiede- ja yritys- puiston hoidettu nurmialue, jossa luonnollinen kotilopopulaatio on suhteellisen pieni. Aidanteiden sisällä oleva kasvillisuus pyrittiin pitämään matalana, jotta kotiloille olisi mahdollisimman vähän suojaa ja ravintoa aidanteiden sisällä. Tällaisten epäsuotuisten olojen vallitessa kotiloiden oletettiin lähtevän aidanteista mikäli ne pystyvät ylittämään tervauksen. Kotiloidaidanteiden päälle viritettiin folioiset lintupelotteet.

ESIKOE (2004)

Tervatsile + 50 kotiloa (n=3)
-------------------------------------

KESÄ 2005

Tervatsile + 50 kotiloa (n=5)
-------------------------------------

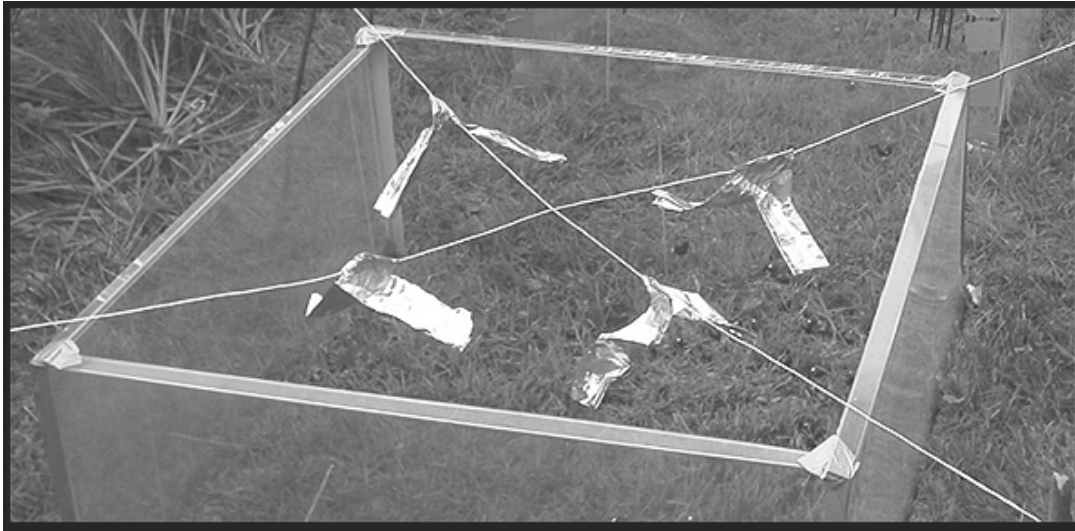
Terva- vaseliini + 50 kotiloa (n=5)
--

Vaseliini- kontrolli + 50 kotiloa (n=3)
--

Kontrolli + 50 kotiloa (n=4)
------------------------------------

**Kuva 1.** Koeasetelma koivutisleen karkotevaikutusten tutkimiseksi: lehtokotilot rajattu koivutisleellä käsiteltyjen aidanteiden sisään.

Koivutisleen karkotevaikutuksen tutkimista jatkettiin kesällä 2005. Kesän 2005 kokeisiin valmistettiin uudensuunniteltuja muovipleksi-aidanteita, joiden ylälaidassa oli taite sateensuojana (Kuva 2). Ne olivat muuten samankokoisia kuin edellisen kesän lauta-aidanteet, mutta korkeampia (40 cm). Tervatsileen sateenkestävyyttä pyrittiin parantamaan sekoittamalla sen joukkoon vaseliinia. Sekoitussuhde oli 2:3 (tervatsile:vaseliini, suhde tilavuuksina). Aidanteita oli neljänlaisia: maalaa- mattomia kontrolliaidanteita, vaseliinilla ylälaidastaan 10–15 cm leveydeltä maalattuja kontrolliaidanteita sekä tervatsileellä ja terva-vaseliini –seoksella maalattuja aidanteita (Kuva 1). Koe kesti kesäkuun alusta heinäkuun puoleenväliin (38 vrk) ja aidanteet tarkastettiin kokeen aikana yksitoista kertaa. Kotiloidaidanteet sijoitettiin samantyyppisille nurmikkopihoille eri puolille Lahtea: Ankkuriin, Anttilanmäelle, Niemeen, Petsamoon ja Saksalaan.



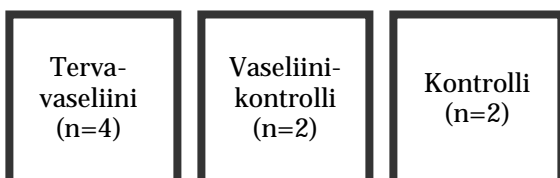
**Kuva 2.** Kotilokokeissa käytetyt muovipleksiaidanteet. Kuvassa kontrolliaidanne.

### *2.1.2. Kotiloiden tunkeutuminen tervattuihin aidanteisiin*

Kesällä 2005 tehtiin myös koe, jossa lehtokotilot rajattiin aidateiden ulkopuolelle. Käsittelyt olivat vastaavat kuin kotiloiden poistumista seuraavassa kokeessa, mutta pelkällä tervatsileellä maalatut aidanteet jätettiin pois niiden kohtuullisen heikon karkotetehon vuoksi (Kuva 3). Aidanteet sijoitettiin kotiloesiintymistään tunnetulle Lahden Anttilanmäelle, heiniä, ruohoja ja nuoria lehtipuita kasvavaan lehtoon. Karkotevaikutusta tutkittiin seuraamalla siirtyikö kotiloita ulkopuolelta aitauksiin. Aidanteiden sisältä poistettiin kotilot ennen kokeen aloittamista, mutta koska kaikkia pienimpiä kotiloita ja kotilon munia ei voitu löytää, kokeessa seurattiin ainoastaan kotiloita, joiden kuoren läpimitta oli  $>1$  cm. Kasvillisuus aidanteiden välittömässä läheisyydessä leikattiin matalaksi, jotta kotilot eivät olisi päässeet liikkumaan aitaukseen tai sieltä pois ruohonkorsia tai muita kasvinosia pitkin. Aidanteiden reunamille sijoitettiin kuitenkin katkottua horsmaa ja voikukkaa, jotta kotilot liikkuisivat alueella senkin jälkeen kun kasvillisuus oli poistettu. Aidanteiden sisään laitettiin apilaa, voikukkaa, porkkanaa ja muuta kotiloiden suosimaa ravintoa (Pakarinen 1992, Hagner 2004). Näin pyrittiin varmistamaan, että aidan-

teisiin menneet kotilot viihtyivät siellä seuraavaan laskentakertaan asti. Koe alkoi heinäkuun puolessa välissä ja jatkui syyskuun alkuun (43 vrk). Aidanteiden kotilotilanne tarkistettiin viidesti kokeen aikana ja sisäpuolelta löytyneet kotilot poistettiin kunkin laskennan yhteydessä.

KESÄ 2005



**Kuva 3.** Koeasetelma koivutisleen karkotevaikutuksen tutkimiseksi: lehtokotilot rajattu koivutisleellä käsiteltyjen aidanteiden ulkopuolelle.

## 2.2. Maaperäkokeet

### 2.2.1. Mikrokosmoskokeiden perustaminen ja näytteenotto

Maaperävaikutusten selvittämiseksi käytettiin koivutisleen vesiliukoisempaa, tislemaidstä muotoa sen annostelun ja laimentamisen helppouden vuoksi. Mikrokosmoskokeita varten tisleestä tehtiin 5 % laimennos. Laimeaa (5 %) ja väkevää (100 %) tisleliuosta ruiskutettiin kokeen alussa mikrokosmoksiin pientä suihkepulloa apuna käyttäen tisleen mahdollisimman tasaisen levittymisen takaamiseksi. Kontrollimikrokosmoksiin ruiskutettiin vettä. Tisleruiskutukset laskettiin pinta-alaa kohden siten, että lopullisen laimennoksen määrä maassa oli keskimäärin 500 L/ha. Tämä tislemäärä valittiin MTT:n kenttäkokeiden testiruiskutusten perusteella.

Sekä kasvillisia että kasvittomia mikrokosmoksia oli 75 kappaletta. Kasvilliset mikrokosmoset perustettiin 1500 ml lasipurkkeihin, joihin lisättiin 400 g tuoretta, homogenoitua, orgaanista maata Lahden tiede- ja yritysruiston nurmialueelta.

Maasta poistettiin suurimmat juuret, kasvinosat sekä mahdolliset lierot. Kasvillisiin mikrokosmoksiin kylvettiin nurmiskoitusta, joka sisälsi punanataa, lampaannataa ja niittyurmikkaa. Kasvilliset mikrokosmokset sijoitettiin ulos muovikatoksen alle ja kasvien annettiin kasvaa noin kuukauden ajan ennen varsinaisen kokeen aloittamista, jolloin mikrokosmoksiin ruiskutettiin käsittelystä riippuen joko tislettä, tislelaimennosta tai vettä. Kasvittomat mikrokosmokset perustettiin reikäkantisiin purkkeihin, joihin punnittiin 100 g samaa maata kuin kasvillisiin ja ne pidettiin kokeen ajan huoneenlämmössä valolta suojattuna. Myös kasvittomat mikrokosmokset stabiloituivat noin kuukauden ennen niiden ruiskutuskäsittelyä. Mikrokosmosten kosteus pyrittiin pitämään koko kokeen ajan vakiona. Mikrokosmoskokeiden kesto oli noin 7 viikkoa. Tässä ajassa tulevat esille myös mahdolliset aineen pitkäaikaisvaikutukset, sillä sukkula- ja änkyrimadot sekä mikrobit lisääntyvät nopeasti ja kokeen aikana syntyy useampi sukupolvi (esim. Nurminen 1967). Näytteet otettiin 1, 7, 20, 29 ja 50 päivää (kasvittomissa 48 päivää) tislelisäyksen jälkeen ja tällöin kustakin käsittelystä purettiin aina viisi rinnakkaista mikrokosmosta. Viimeisellä näytteenottokerralla kasvit otettiin juurineen talteen.

### *2.2.2. Toholammin kenttäkokeen perustaminen ja näytteenotto*

Kenttäkokeessa vierekkäisiksi ruuduiksi jaettu, rikkakasveja kasvava pelto ruiskutettiin 100 % tisleellä (136 ml/m<sup>2</sup>). Vedellä ruiskutetut kontrolliruudut sijaitsivat jonossa kahden rypsipellon välissä, hieman erillään tisleluiskutetusta pellostä. Koe-pellot sijaitsivat MTT:n tutkimusalueella Toholammilla, josta näytteet lähetettiin tutkittaviksi Lahteen. Koe alkoi kesäkuun puolessa välissä 2005 ja kesti runsaan kuukauden ajan. Näytteenottokertoja oli viisi: 4, 10, 20, 29 ja 42 päivää tisle-/vesilisäyksen jälkeen. Kullakin näytteenottokerralla tisle- ja kontrolliruuduilta (5 ruutua/käsittely) otettiin 5 cm syvyydestä kolme maakairanäytettä (Ø 4 cm).

### 2.2.3. Maaperäeläimet ja kasvit

Mikrokosmos- ja peltomaista tutkittiin sukkula- ja änkyrimadot sekä mikrobiaktiivisuus ja -biomassa. Sukkula- ja änkyrimadot eroteltiin maasta (5 g tuoremassana) Sohleniuksen (1979) modifioimaa märkäsuppilomenetelmää käyttäen. Sukkulamatojen yksilömäärät laskettiin binokulaarimikroskoopin avulla. Änkyrimatojen erotteluun käytettiin O'Connorin (1955) märkäsuppilomenetelmää. Ajoja varten punnittiin 80 g mikrokosmos- tai peltomaata. Änkyrimatojen yksilömäärien lisäksi mitattiin änkyrimatojen pituudet ja laskettiin eri kokoluokkien biomassakerrointen avulla änkyrimatobiomassa Abrahamsenin (1973) mukaan. Kasvit kuivattiin lämpökaapissa (1 vrk, 70°C) kuivapainon selvittämiseksi.

### 2.2.4. Mikrobit

Jokaisella näytteenotokerralla mikrokosmos- ja peltomaista tutkittiin myös mikrobiaktiivisuus ja -biomassa. Mikrobiaktiivisuus mitattiin maahengityksen avulla. Maahengitys kuvaa maaperästä vapautuvan energian määrää (Packham & Harding 1982) ja siten maassa elävien mikrobien aktiivisuutta (Huhta & Koskenniemi 1975). Maaperäeläinten osuus maahengityksestä on n. 2 %, minkä vuoksi se kuvaa pääosin mikrobiston toimintaa (Didden 1993). Tulosten laskemiseksi massayksikköä kohden määritettiin maiden kuivapaino (70°C, 1 vrk). Maahengityksen mittausta varten siirrettiin 100 g (tuorepaino) peltomaata kasvittomien mikrokosmospurkkien kaltaisiin astioihin, joiden kannessa oli reikä.

Maahengitys mitattiin hiilidioksidin tuottona vakio-olosuhteissa (Anderson & Domsch 1977). Mikrokosmoskokeissa mittaustalteenä käytettiin respiometriä (Nordgren 1988), joka mittaa hengityksen sähkönjohtokyvyn muutoksina hiilidioksidin liuetessa KOH:iin. Maata punnittiin kutakin määritystä varten 5 g (tuoremassa). Mikrobibiomassa määritettiin SIR-menetelmällä (substrate induced



respiration) ja määrittystä varten maahan lisättiin mittauksen loppuvaiheessa glukoosia (2 % näytteen tuoremassasta) veteen liuotettuna. Perushengitystä mitattiin n. 40–50 tunnin ajan ennen glukoosilisäystä. Laitteen antama mittaustulos (mg CO<sub>2</sub>/näyte/h) muutettiin yksikköön mg CO<sub>2</sub>-C/g maata (kp)/h. Kasvittomien mikrokosmosten respirometrituloksia ei otettu mukaan analyysihin respirometrin toimintaongelmien vuoksi.

Kenttäkokeessa ja kasvittomissa mikrokosmoksissa mitattiin maahengityksen tuottamaa hiilidioksidia EasyQuant –infrapuna-hiilianalyysaattorilla. Purkkien ilmatilasta injektointiin 1 ml kaasua, joka ruiskutettiin analyysaattoriin. Tämän jälkeen kannessa oleva reikä suljettiin teipillä ja mittaus tehtiin uudelleen 1–2 tunnin kuluttua. Hiilidioksidipitoisuudet muutettiin mittauspurkkien ilmatilavuus huomioiden yksikköön µg CO<sub>2</sub>/g maata (kp)/h. Viidestätoista kasvittomasta mikrokosmoksista mitattiin maahengitys myös kokeen alussa, sillä hiilianalyysaattorilla suoritettuja mittauksia varten mikrokosmosta ei tarvitse purkaa. Kasvien hiilidioksidinkulutus esti analyysaattorin käytön kasvillisten mikrokosmosten kohdalla. Peltomaan mikrobibiomassa mitattiin EasyQuant-analyysaattorilla, mutta maahan lisätty glukoosi oli respirometrimittauksista poiketen kideäistä (2 % näytteen kuivapainosta). Glukoosin sekoittamisen vuoksi maan annettiin stabiloitua noin kaksi tuntia ennen mikrobibiomassan perustason mittaamista.

### *2.3. Toksisuuskokeet vesieliöillä*

Vesieliöt altistettiin veden kautta lyhytkestoisissa toksisuuskokeissa eikä niille tarjottu ravintoa kokeen aikana. Varsinaisia toksisuuskokeita edelsivät esikokeet, joiden perusteella lopullisten toksisuuskokeiden altistuspitoisuudet valittiin väliltä 0,002–0,8 %. Pitoisuuksia oli kussakin toksisuuskokeessa seitsemästä yhteentoista ja ne valmistettiin pipetoimalla tietty määrä tislekantaliuosta tiettyyn vesitulavuuteen. Seuraava pitoisuus oli aina 60 % edellistä pienempi (60 % laimennos-

sarja). Kokeissa määritettiin EC<sub>50</sub>-arvo, eli pitoisuus, jossa 50 %:lle koe-elioistä tulee toksisia vaikutuksia. Seurattava vaste oli liikuntakyvyttömyys (EC<sub>50</sub>, *D. magna*), kuolleisuus (LC<sub>50</sub>, *L. variegatus*; *A. aquaticus* ja *Lymnea sp.*), lehtien (lkm) ja juurten (cm) kasvun inhibitio (IC<sub>50</sub>, *L. minor*) tai valontuoton inhibitio (IC<sub>50</sub>, *V. fischeri*).

Toksisuuskoe *D. magna* -vesikirpulle tehtiin standardoidun testin mukaisesti (SFS 5062 1984) laboratoriossa kasvatetuilla, vuorokauden ikäisillä vesikirpuilla (24 ja 48 h). Valobakteeritesti tehtiin puolestaan ISO 11348-3 (1998) –standardia mukaillen, kaupallisen Aboatox<sup>TM</sup>-määrityskitin avulla, joka sisältää kylmäkuivattuja valobakteereja. *V. fischeri* –valobakteeri tuottaa valoa lusiferaasientsyyminsä avulla ja tämä bioluminesenssiksi kutsuttu valontuotto mitattiin 15 ja 30 minuuttia tislelisäyksen jälkeen. Pikkulimaskan (*L. minor*) toksisuuskokeet noudattelivat testistandardia ISO/CD 20079 (2005) ja niissä käytettiin luonnosta (Lahti) haettua pikkulimaskaa. Pikkulimaskan annettiin olla järivedessä ennen altistusta ja viikon pituiseen kokeeseen valittiin kaksilehtivaiheessa olevia kasveja. Muut toksisuuskokeet suoritettiin yleisiä toksisuuskokeisiin annettuja ohjeita noudattaen (esim. USEPA 2002). *L. variegatus* –harvasukasmadot kasvatettiin laboratoriossa järivedessä, hienojakoisella hiekkapohjalla ja niitä ruokittiin akvaariokalan ruualla. Toksisuuskokeissa käytettiin aikuisia harvasukasmatoja. Vesisiirat ja limakotilot (pituus n. 1 cm) haettiin luonnosta (Lammi/Lahti), ja myös niitä pidettiin järivedessä ennen toksisuuskokeiden aloittamista. Vesisiirujen annettiin lisääntyä astiassa, jossa oli hiekkaa sekä siirujen ravinnoksi soveltuvaa tervalepän lehtikariketta. Toksisuuskokeisiin valittiin kasvatuksen aikana syntyneitä nuoria vesisiiruja. Harvasukasmatojen, vesisiirujen ja limakotiloiden kuolleisuus määritettiin yhdestä kolmeen kertaan 24 h välein. Koska koivutisleen sisältämät yhdisteet voivat sitoutua järiveden sisältämiin humusyhdisteisiin, tehtiin järivedessä kasvatettujen eläinten pitoisuussarjat SFS 5062 (1984) –standardin mukaiseen levänkasvatusveteen. Toksisuuskokeiden muuttujat on esitetty taulukossa 1.

**Taulukko 1.** Muuttujat vesieliöillä tehdyissä toksisuuskokeissa.

	<i>D. magna</i>	<i>A. aquaticus</i>	<i>Lymnea sp.</i>	<i>L. variegatus</i>	<i>L. minor</i>	<i>V. fischeri</i>
Lämpötila °C	22	22	22	22	22	22
Koeastioiden tilavuus, ml	10	100	100	100	50	4
Testieliöiden määrä	5	4	3	5	6	bakteerisuspensio
Rinnakkais-ten määrä	3	3	3	3	3	2
Koevesi	M7-vesi (SFS 5062)	levänkasvatusvesi (SFS 5062)	levänkasvatusvesi (SFS 5062)	levänkasvatusvesi (SFS 5062)	Steinberg-vesi (ISO/CD 20079)	NaCl-liuos (ISO 11348-3)
Kokeen kesto	48 h	48 h	72 h	48 h	7 vrk	30 min
Mitattava muuttuja	liikuntakyvyttömyys	kuolleiden määrä	kuolleiden määrä	kuolleiden määrä	juurten pituus ja lehtien määrä	bakteerien tuottaman valon määrä
Vastemuuttuja	käyttäytyminen	kuolleisuus	kuolleisuus	kuolleisuus	kasvun inhibitio	bioluminesenssin inhibitio

#### 2.4. Tilastolliset testit

Kesän 2004 kotiloesikokeen lopussa tervattujen ja tervaamattomien aidanteiden tehokkuutta kotiloita vastaan verrattiin Wilcoxonin ei-parametrisellä testillä. Kokeessa oli ajallinen kontrolli eli alkutilanne, jolloin aitauksissa oli 50 kotiloa. Kotiloiden poistumista kuvaavaa kesän 2005 aineistoa ei testattu tilastollisesti sillä se oli epätäydellinen terva-vaseliinikäsittelyiden nollahavaintojen vuoksi. Toisessa kesän 2005 kotilokokeessa aidanteet sijoitettiin eri puolille Lahtea ja ominaisuudet, kuten kosteus, vaihtelivat piholla huomattavasti. Käsittelyiden sisäiset suuret vaihtelut tekivät aineistosta hyvin heterogeenisen, joten myöskään tätä aineistoa ei testattu tilastollisesti.

Mikrokosmoskokeiden änkyrimato-, sukkulamato- ja mikrobitulosten tilastolliseen testaukseen käytettiin kaksisuuntaista varianssianalyysia (2-faktori-ANOVA).

Faktoreina olivat aika (viisi näytteenottokertaa) ja käsittely (väkevä tisle, laimea tisle tai kontrollin vesikäsittely). Tisleen vaikutus kasvibiomassaan testattiin yksisuuntaista varianssianalyysiä (yksisuuntainen ANOVA) käyttäen ja eri käsittelyiden välisiä kasvibiomassaeroja verrattiin pareittain Tukeyn testillä. Kenttäkokeessa vertailtiin tislekäsiteltyjen ja kontrolliruutujen antamia änkyrimato-, sukkulamato- ja mikrobituloksia keskenään toistomittausten varianssianalyysillä (toistomittaus-ANOVA), sillä näytteet otettiin toistuvasti samoilta ruuduilta. Aineistot, joissa havaittiin yhdysvaikutusta ajan ja käsittelyn välillä, testattiin lisäksi simple effects -mallin mukaisesti, jossa käsittelyn vaikutus testattiin erikseen kullakin näytteenottokerralla. Aineistojen tilastollisissa käsittelyissä käytettiin parametrisiä testejä, vaikka aineistot eivät kaikilta osin täyttäneet homogeenisuus- ja normaalisuussääntöjä. Muunnokset eivät huomattavasti parantaneet aineistoa, joten niitä ei käytetty. EC<sub>50</sub>-, LC<sub>50</sub>- ja IC<sub>50</sub>-pitoisuudet laskettiin regressioon perustuvalla probit-analyysillä. Tilastolliset testit tehtiin SPSS-tilasto-ohjelmalla (versio 11.5.0) ja tilastollisen merkitsevyyden raja-arvona käytettiin p-arvoa 0,05.

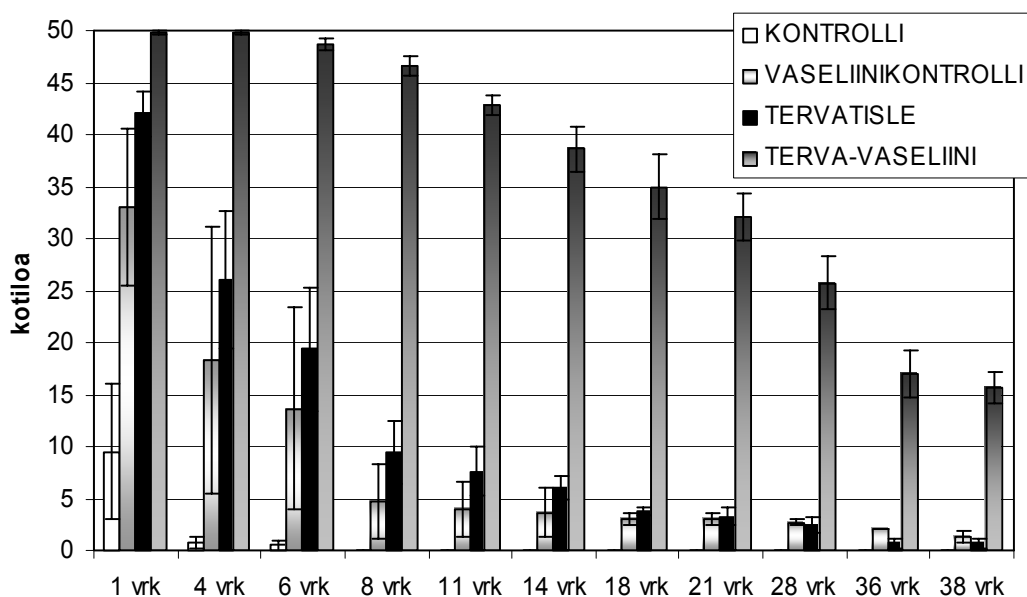
### *3. Tulokset*

#### *3.1. Tervatisleen karkotevaikutus*

Kokeissa, joissa tutkittiin kotiloiden poistumista tervatisleellä käsitellyistä aidanteista, tervatisle vaikutti kotiloihin karkottavasti. Kesän 2004 esikokeessa viidestäkymmenestä kotilosta 42, 38 ja 28 löytyi aidanteista kokeen lopussa. Vaikka kotilot vähenivät aidanteissa kokeen aikana, tämä väheneminen ei ollut tilastollisesti merkitsevää (Wilcoxon,  $p=0,109$ ).

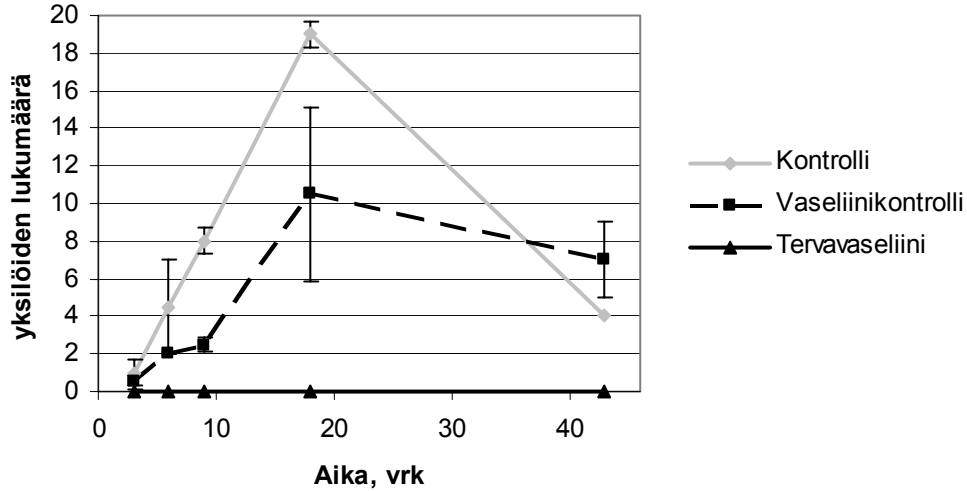
Kesän 2005 vastaavassa kokeessa havaittiin vaseliinin parantavan huomattavasti tervatisleen säänkestävyyttä ja karkotetehoa pelkkään tervatisleeseen verrattuna (Kuva 4). Myös pelkkä vaseliini vaikutti kotiloiden liikkumiseen: kotilot pysyivät

myös vaseliinikotrolliaidanteissa pidempään kuin kontrolliaidanteista ja kokeen loppua kohden tervatisleellisissä ja vaseliinikontrolleissa oli paljolti saman verran kotiloita (Kuva 4).



**Kuva 4.** Kotiloiden väheneminen eri käsittelyissä kesän 2005 aidannekokeen aikana (keskiarvo ja keskihajonta).

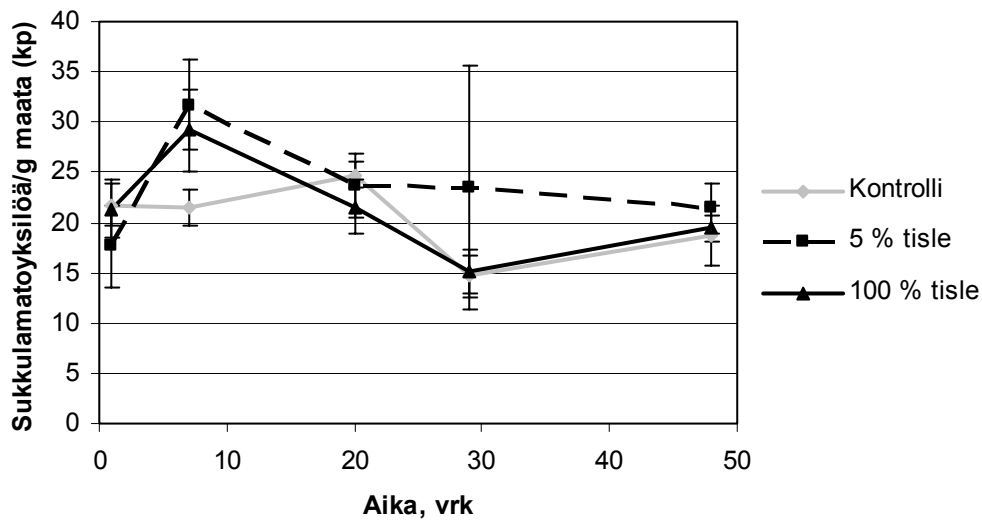
Myös kesän 2005 kokeessa, jossa kotilot rajattiin aidanteen ulkopuolelle, havaittiin tervatisleen karkottavan kotiloita. Kontrolliaidanteista löytyi kotiloita jokaisella laskentakerralla (Kuva 5), vaikka aidanteet tyhjennettiin aina laskemisten yhteydessä. Sen sijaan terva-vaseliiniseoksella maalattuihin aidanteisiin ei mennyt kokeen aikana (43 vrk) ainuttakaan kotiloa (Kuva 5).



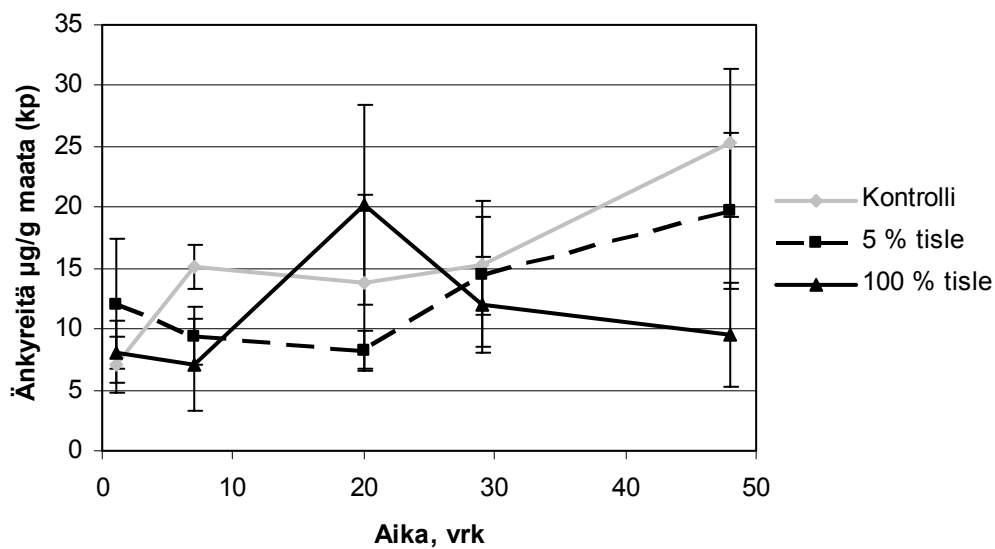
**Kuva 5.** Kesällä 2005 kotiloaidanteisiin kokeen aikana eri käsittelyissä tulleet kotilot (keskiarvo ja keskihajonta).

### 3.2. Tisleen vaikutus eliöihin mikrokosmoksissa

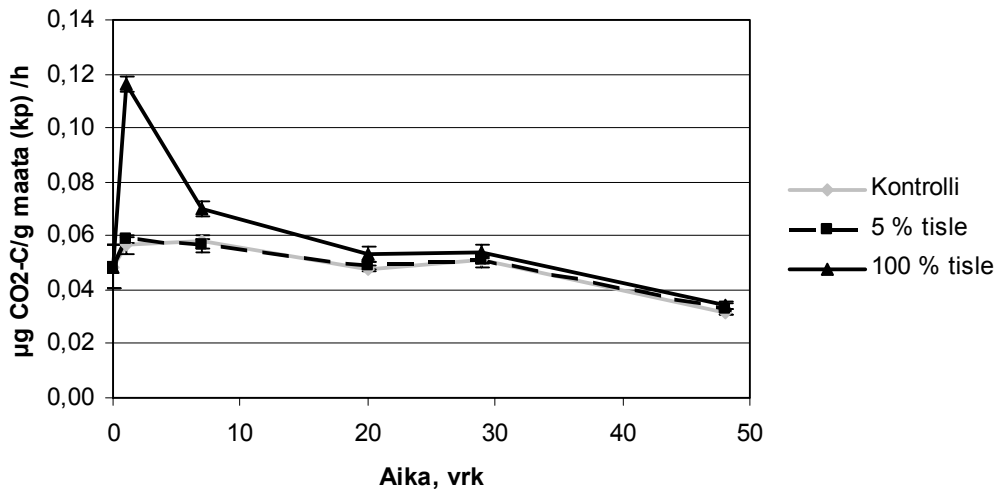
Koivutislekäsittelyillä ei ollut missään tutkimuksen vaiheessa vaikutusta mikrokosmoksissa elävien sukkulamatojen yksilömäärään (2-faktori-ANOVA,  $p=0,72$ ) eikä änkyrimatobiomassaan (2-faktori-ANOVA,  $p=0,33$ ) (Kuvat 6 ja 7). Tisله vaikutti kokeen aikana ainoastaan mikrokosmosten mikrobihengitykseen (2-faktori-ANOVA,  $p<0,001$ ). Mikrobihengitys kohosi väkevän koivutislekäsittelyn saaneissa mikrokosmoksissa toisella näytteenottokerralla (Kuva 8) ja oli merkitsevästi suurempi kuin mikrobihengitys kontrollissa (Tukey,  $p<0,001$ ) sekä laimealla koivutisleliuoksella käsitellyssä mikrokosmosmaassa (Tukey,  $p<0,001$ ). Hengitykset kontroleissa ja laimealla tislekäsittelyn saaneissa mikrokosmoksissa eivät kokeen aikana eronneet toisistaan (Kuva 8).



**Kuva 6.** Eri tislekäsittelyjen vaikutus sukkulamatojen yksilömäärään kokeen aikana kasvittomissa mikrokosmoksissa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).



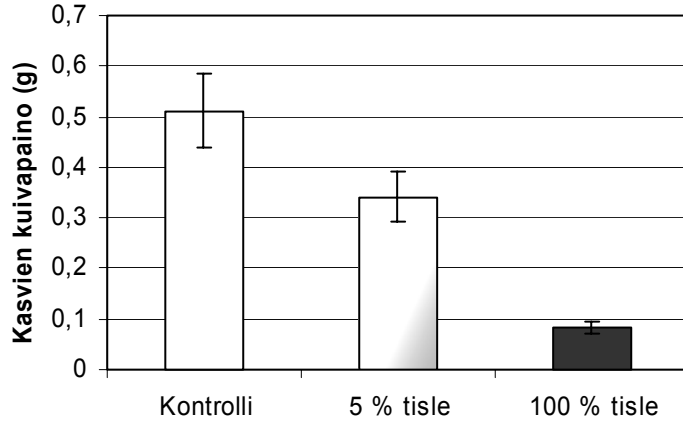
**Kuva 7.** Eri tislekäsittelyjen vaikutus änkyrimatojen biomassaan kokeen aikana kasvittomissa mikrokosmoksissa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).



**Kuva 8.** Eri tislekäsittelyjen vaikutus mikrobihengitykseen kokeen aikana kasvittomissa mikrokosmoksissa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).

Koivutislekäsittelyt eivät vaikuttaneet tutkimuksen aikana sukkulamatojen yksilömäärään, änkyrimatobiomassaan eikä mikrobihengitykseen kasvillisissa mikrokosmoksissa (2-faktori-ANOVA,  $p=0,52$ ). Sukkulamatoja oli grammassa maata (kp) 4-21 yksilöä, änkyrimatojen biomassa/g maata (kp) vaihteli välillä 0-22 µg ja mikrobihengitys oli välillä 0,002–0,013 mg CO<sub>2</sub>-C/g maata (kp)/h. Mikrobiomassan määrittämisessä oli teknisiä ongelmia joten sitä ei käsitellä tässä yhteydessä. Koivutisleluiskutuksella oli vaikutusta mikrokosmosten kasvibiomassaan kokeen lopussa (yksisuuntainen ANOVA,  $F=6,32$ ,  $p=0,01$ ). Laimealla koivutisleellä käsitellyissä mikrokosmoksissa kasvibiomassa oli noin 33 % pienempi ja väkevällä koivutisleellä käsitellyissä mikrokosmoksissa noin 84 % pienempi kuin kontrollimikrokosmosten kasvibiomassa. Koivutisle ei kuitenkaan laimeana liuoksena vaikuttanut merkitsevästi kasvibiomassaan (Tukey,  $p=0,76$ ), vaikka väkevänä liuoksena tisle biomassaa vähensikin (Tukey,  $p=0,01$ ) (Kuva 9). Eri tisleväkevyyksin ruiskutettujen mikrokosmosten kasvibiomassoissa ei ollut tilastollista eroa (Tukey,  $p=0,05$ ).

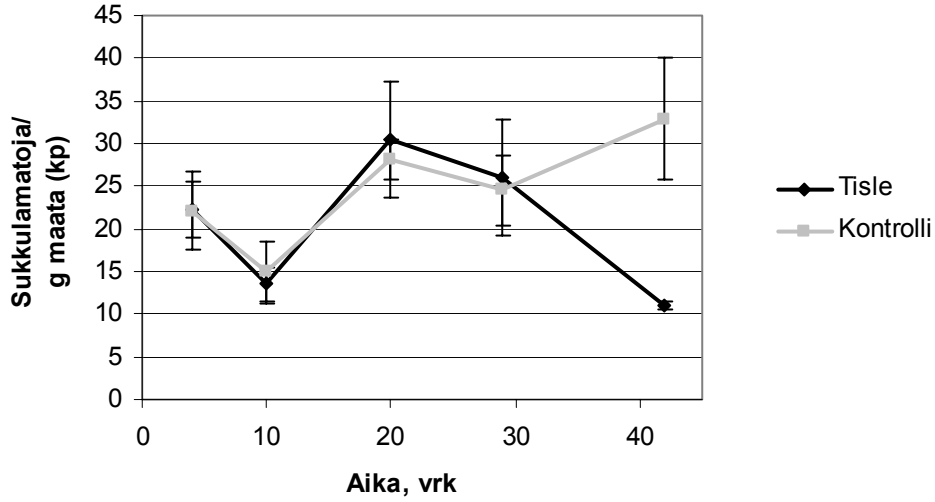




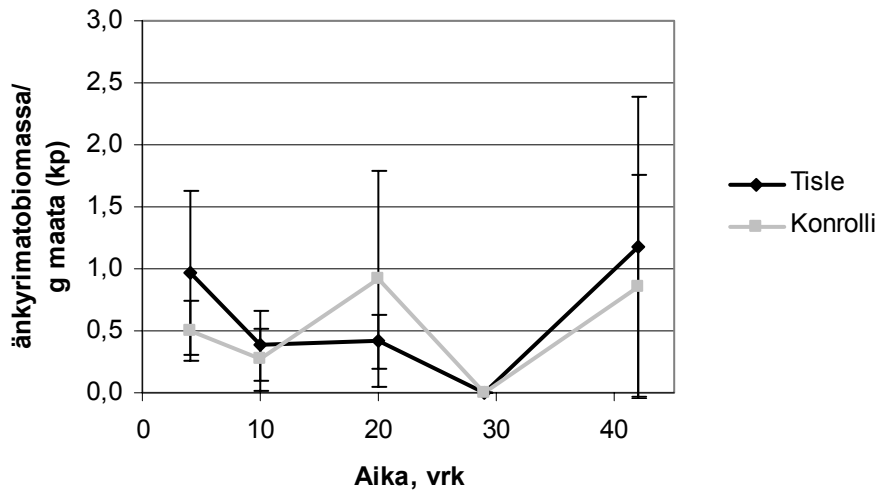
**Kuva 9.** Eri tislekäsittelyiden vaikutus kasvibiomassaan kasvillisissa mikrokosmoksissa 50 päivää tisleen ruiskuttamisen jälkeen (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).

### 3.3. Tisleen vaikutus eliöihin peltomaassa

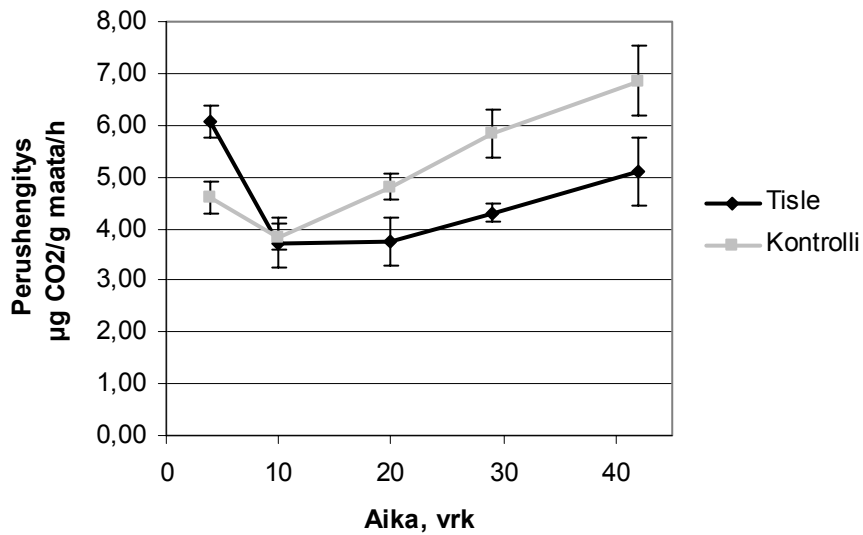
Koivutisle ei vaikuttanut peltomaan sukkulamatoihin (ANOVA, simple effects,  $p < 0,05$ ) viimeistä näytteenottokertaa lukuun ottamatta (simple effects,  $p > 0,05$ ), jolloin sukkulamatojen määrä tisleeruisikutuksen saaneissa maissa laski (Kuva 10). Änkyrimadot eivät kärsineet maan tisleeruisikutuksesta (toistomittaus-ANOVA,  $F=0,04$ ,  $p=0,85$ ) ja niiden määrä oli hyvin alhainen kaikissa käsittelyissä (Kuva 11). Perushengitykseen tisle vaikutti positiivisesti ensimmäisellä näytteenottokerralla ja negatiivisesti kahdella viimeisellä näytteenottokerralla (simple effects,  $p > 0,05$ ) (Kuva 12). Mikrobien biomassaan tisleellä ei ollut vaikutusta (toistomittaus-ANOVA,  $F=0,85$ ,  $p=0,38$ ) (Kuva 13). Kasvien lakastuminen tisleeruisikutuksen myötä havaittiin myös peltomaassa.



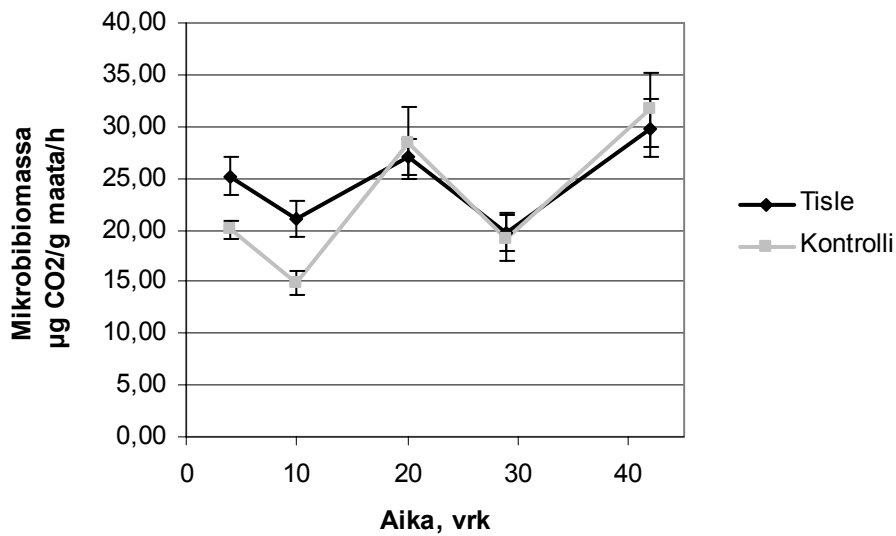
**Kuva 10.** Eri käsittelyiden vaikutus kokeen aikana sukkulamatojen lukumäärään Toholammin peltomaassa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).



**Kuva 11.** Eri käsittelyiden vaikutus kokeen aikana änkyrimatojen biomassaan Toholammin peltomaassa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).



**Kuva 12.** Eri käsittelyiden vaikutus kokeen aikana mikrobien perushengitykseen Toholammin peltomaassa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).



**Kuva 13.** Eri käsittelyiden vaikutus kokeen aikana mikrobibiomassaan (SIR-menetelmällä arvioituna) Toholammin peltomaassa (keskiarvo ja keskihajonta, n=5).

### 3.4. Koivutisleen toksisuus vedessä

**Taulukko 2.** Koivutisleen toksisuus vesieliöille altistusajan suhteen EC<sub>50</sub>-pitoisuutena ilmaistuna. EC = vaikuttava, LC = kuolettava ja IC = inhiboiva pitoisuus. Kaikki pitoisuudet on ilmoitettu prosentteina (keskiarvo ja luottamusväli).

	<i>D. magna</i> EC <sub>50</sub>	<i>A. aquaticus</i> LC <sub>50</sub>	<i>Lymnea</i> sp. LC <sub>50</sub>	<i>L. variegatus</i> LC <sub>50</sub>	<i>L. minor</i> , lehdet IC <sub>50</sub>	<i>L. minor</i> , juuret IC <sub>50</sub>	<i>V. fischeri</i> IC <sub>50</sub>
24 h	0,029 (ei vaihteluväliä)	0,076 (0,056-0,100)	0,089 (0,069-0,113)	0,012 (0,008-0,015)			
48 h	0,015 (ei vaihteluväliä)	0,040 (0,032-0,050)	0,089 (0,069-0,113)	ei tulosta			
72 h			0,089 (0,069-0,113)				
7 vrk					0,002 (0,002-0,004)	0,003 (0,000-0,001)	
15 min							0,002 (0,000-0,005)
30 min							0,002 (0,000-0,003)

Kaikilla vesieliöillä koivutisleen toksisuus ilmeni hyvin pienissä pitoisuuksissa (Taulukko 2). Eläinryhmien herkkyys koivutisleen sisältämille myrkyille oli seuraava: harvasukasmadot > vesikirput > vesisiirat > limakotilot. Mitä pidempi oli altistusaika, sitä pienemmät pitoisuudet olivat myrkyllisiä. Ainoastaan limakotiloilla tämä ei pätenyt, sillä kaikki kokeen aikana kuolleet limakotilot kuolivat jo ensimmäisen 24 tunnin aikana.

#### *4. Tulosten tarkastelu*

##### *4.1. Tervatisleen karkotevaikutus*

###### *4.1.1. Tervatisleen ja vaseliinin ominaisuudet*

Vaikka kotilokokeet vahvistivat hypoteesini tervatisleen karkottavasta vaikutuksesta, kesän 2004 esikokeista oli nähtävissä, että tervatisle sellaisenaan ei tehoa kotiloihin kovinkaan hyvin: kotilot poistuivat aidanteista pian tervauksen jälkeen. Vasta sadesuojatuissa aidanteissa tervatisleen karkotevaikutus tuli näkyviin, joskaan tervauksen teho ei näissäkään aidanteissa ollut täydellinen. Ensimmäisen, kesällä 2004 tehdyn kokeen perusteella sateelta suojatun tervatisleen karkoteteho kesti noin kolme viikkoa. Kesän 2004 kokeissa varmistui myös Marleena Hagnerin (2004) havainto siitä, että säällä on merkittävä vaikutus tervatisleen karkoteteeseen. Tervaus muuttui sateisessa säässä, pian maalaamisen jälkeen, vaaleanruskeaksi ja mattapintaiseksi ja samalla sen karkotetehe heikkeni. Tervatisle erottuu vedessä kolmeen faasiin: pinnalle jää ohut öljymäinen kerros, paksu musta tervamönjä vajoaa astian pohjalle ja vesifaasi värjäytyy voimakkaan ruskeaksi (oma havainto). Voidaankin olettaa, että ainakin osa koivutisleen sisältämistä aineista on vesiliukoisia.

Vaseliinin tarkoituksena oli parantaa tervatisleen ominaisuuksia säänkestävyyden suhteen. Tämä hypoteesi myös toteutui, sillä vaikka koealueen kotilopopulaatio oli poikkeuksellisen runsas, 43-päiväisen kokeen aikana terva-vaseliiniaidanteista ei löytynyt ainuttakaan kotiloa (Kuva 5). Tervan ja vaseliinin seos "piti pintansa" ja sen koostumus säilyi koko kokeen ajan väriltään mustana ja kiiltävänä. Toisaalta kesän 2005 sää oli myös edelliskesäistä aurinkoisempi ja vähäsateisempi, mikä saattoi pienentää tervatisleen altistumista kosteudelle ja täten vaikuttaa tuloksiin. Vaseliinilla itselläänkin näyttää olevan jonkin verran vaikutusta kotiloihin, sillä se piti kotilot aidanteissa maalamattomia kontrolliaitauksia paremmin (Kuvat 4 ja 5).

Vaseliini on mineraaliöljypohjainen rasva joten siinä olevat öljyperäiset yhdisteet saattavat vaikuttaa kotiloihin karkottavasti.

Myös Hagnerin (2004) samantyyppisessä tervauskokeessa pelkän tervatisleen karkoteteho oli lyhytaikainen. Hagnerin koe tehtiin kesällä 2003 poikkeuksellisen kuivissa, lämpimissä ja aurinkoisissa oloissa. On mahdollista, että myös aurinko vaikuttaa merkittävästi tervatisleen ominaisuuksiin. Esimerkiksi styreeni, jota käytetään polymeerien valmistuksessa, on hyvin haihtuvaa, minkä tiedetään vähentävän eliöiden altistumista aineelle (Cushman ym. 1997). On mahdollista, että tervatisleen vaikuttavat aineet voivat haihtua etenkin suorassa auringonpaisteessa. Tähän viittaa se, että veneen- ja paanukattojen tervausta ei suositella tehtäväksi voimakkaalla auringonpaisteella, sillä liuotinten kaasuuntuminen heikentää tervauksen lopputulosta. Hypoteesini on, että vaseliinilisäyksen myötä parantunut karkoteteho johtui siitä, että vaseliini vähensi helposti haihtuvien yhdisteiden kaasuuntumista.

#### *4.1.2. Koeaidanteesta kotiloidannetuotteeksi*

Myös käytetyllä aidannemateriaalilla voitaneen vaikuttaa siihen, kuinka kauan tervaus säilyttää tehonsa. Kesällä 2004 lauta-aidanteet tervattiin uudelleen heti kokeen alettua tervauksen muututtua sateessa vaalean mattapintaiseksi. Terva kuitenkin toimii puun kyllästysaineena ja estää mm. kosteuden imeytymistä. Kerran tervattu pinta saattaa hylkiä myös uudelleentervausta jolloin uuden tervan pitävyys ja säänkestävyys heikkenevät. Tämä saattoi heikentää tervauksen kestoa kesän 2004 lauta-aidannekokeissa. Ilman sateensuojaa ja etenkin ilman seosainetta tervatisleen pitävyys muoviaidanteissa on kuitenkin vielä huonompi. Tämä todettiin kesällä 2004 suoritetuissa alustavissa muoviaidannekokeissa. Laboratoriossa, liukkaalla muovipinnalla, tervatisle pisaroitui joutuessaan kosketuksiin veden kanssa. Aitaus itsessään ei näyttänyt olevan este kotiloiden etenemiselle, sillä myös kesän 2005

kotiloiden tunkeutumista seuraavista maalaamattomista kontrolleista löytyi kotiloita.

Kokeet koivutisleen karkotevaikutuksesta osoittavat, että muovinen kotiloaidanne soveltuu hyvin kotiloiden torjuntaan kun sen maalaamiseen käytetään tervatisleen ja vaseliinin (2:3) seosta. Vaikka aidanteet eivät pitäneet kotiloita sisällä sataprosenttisesti, pysyivät kotilot hyvin niiden ulkopuolella. Hyvin pitkäkestoisia aidannekokeita ei tämän työn yhteydessä tehty, mutta yksi kesän 2005 terva-vaseliiniaidanne ja yksi maalaamaton kontrolliaidanne jätettiin maastoon talven yli. Tästä yli vuosi sitten maalatusta terva-veseliiniaidanteesta ei kesän 2006 aikana löydetty yhtään kotiloa, vaikka kontrollista niitä löytyi aina. Tämä yksittäinen havainto viittaa siihen, että koivutisleen ja vaseliinin seoksen karkotevaikutus on pitkäkestoinen.

#### *4.2. Tisleen vaikutus maaperässä*

##### *4.2.1. Tisleen vaikutus eläinyhteisöön*

Hypoteesini vastaisesti koivutisle ei vaikuttanut mikrokosmosten eläinyhteisöihin. Kasvillisissa mikrokosmosissa maan kosteus oli vaikea pitää vakiona ja kosteusolojen aiheuttama vaihtelu maaperäeläinten kannoissa oli niin suurta, että mahdollinen tisleen vaikutus saattoi peittyä tämän ympäristötekijän vaihteluiden alle. Toisaalta myös luonnossa kosteusvaihtelut ovat luontaisia. Hypoteesini kuitenkin toteutui osin, sillä kenttäkokeessa tisleen havaittiin vaikuttavan negatiivisesti sukkulamatoihin viimeisellä näytteenotokerralla (Kuva 10). Tällöin maa oli hieman aiempaa kosteampi, mikä mahdollisesti lisäsi tisleen biosaataavuutta täysin maavedestä riippuvaisille sukkulamadoille. Sukkulamatoa vapaammin maaperässä eläviin änkyrimatoihin (Brussaard ym. 1997) tisleellä ei ollut vaikutusta.

Koska tisle ei vaikuttanut maaperän avainlajiin änkyrimatoon, sen epäsuorat, ravintoverkon kautta ilmenevät vaikutukset lienevät vähäiset.

#### *4.2.2. Tislelisäyksen vaikutus maaperän mikrobeihin*

Toisin kuin kasvillisissa mikrokosmoksissa, hypoteesini toteutui kasvittomassa mikrokosmoskokeessa: tisleellä oli vaikutusta mikrobiaktiivisuuteen hengityksen kohotessa hetkeksi väkevällä tisleliuoksella käsitellyssä maassa (Kuva 8). Hengityksen kasvu viittaa mikrobien hajotustoiminnan vilkastumiseen (Setälä & Huhta 1990). Kasvittomissa mikrokosmoksissa havaittu hengityskäyrä on tyypillinen ravintolisäyksen jälkeen, kun lisäresurssi käytetään nopeasti hyväksi (Meli 2003) ja maahengitys kohoaa hetkellisesti. Koivutisle tuhansine yhdisteinen sisältänee helposti energiaksi käytettäviä yhdisteitä, sillä se sisältää samoja aineita kuin koivupuu, jota mikrobit luonnossa hajottavat. Resurssihypoteesia tukee myös se, että koivutisleen on yli 1 % liuoksena havaittu lisäävän myös leivinhiivan ja vedessä elävien mikrobien kasvua (Marleena Hagner, suullinen tiedonanto). On kuitenkin huomioitava, että myös mikrobeille haitalliset aineet voivat lisätä hengitystä (Connell ym. 1999, Bååth 1989), jolloin puhutaan ns. huohottamis-ilmiöstä. Oli koivutisleen vaikutus hengitykseen sitten seurausta lisäresurssista tai tisleen myrkyllisyydestä, vaikutus mikrobistoon oli hyvin lyhytkestoinen.

Kenttäkokeessa hypoteesini toteutui mikrobien osalta vain osittain. Vaikka maan mikrobit eivät biomassallisesti kärsineet tisleestä, vaikutti se lähes koko kokeen ajan mikrobihengitykseen. Kenttäkokeen alussa havaittiin samanlainen hengityksen nousu kuin kasvittomissa mikrokosmoksissa (Kuva 12). Tämän jälkeen hengitys tislerruiskutetussa maassa alkoi kuitenkin hiljalleen laskea suhteessa kontrolliin. Negatiivinen vaikutus hengitykseen ei välttämättä ole seurausta tisleen suorasta myrkyvaikutuksesta, vaan siitä, että tisle tappoi kasvit, joilla on tärkeä rooli maaperän ravintoverkossa. Ne säätelevät mm. maaperän valaistus- ja lämpöoloja,



vaikuttavat karikkeen koostumukseen ja erittävät juuristaan muille maaperäeliöille käyttökelpoisia orgaanisia yhdisteitä (Smolander & Priha 2003, Wardle ym. 2004). Tisleen negatiivinen vaikutus mikrobihengitykseen voi tulla esiin kasvillisuuden kuihtumisen kautta: kasvit kuolivat eivätkä siten vapauttaneet juurieritteitä maaperään, mutta kuolleesta kasvimateriaalista ei vielä ollut ehtinyt muodostua kariketta mikrobien ravinnoksi. Epäsuorat ravintoverkkovaikutukset saattoivat olla myös peltomaan negatiivisten sukkulamatoivaikutusten takana. Tisle ei näytä tappavan mikrobeja, vaikka voikin vaikuttaa negatiivisesti niiden aktiivisuuteen. Mikrobihengityksen lasku voi johtua siitä, että kasvimateriaalin ja kasvien erittämien yhdisteiden väheneminen johtaa resurssipulaan, jolloin mikrobit vaipuvat lepotilaan (Martikainen 2003). Biomassa ei tällöin muutu, vaikka hengitys pienenee. Kaiken kaikkiaan tisleen vaikutus maaperän ravintoverkkoon oli kuitenkin vähäinen.

#### 4.3. Tisleen vaikutus vesieliöihin

Eläimistä herkimpä koivutisleelle olivat harvasukasmadot (Taulukko 2), mikä voi selittyä matojen pintaepiteelin ohuudella, jolloin tisle pääsee helposti kertymään matoon. Vesikirppuja puolestaan altistaa niiden tapa suodattaa jatkuvasti vettä planktonravinnon keräämiseksi (Olsen ym. 2005). Vesisiiran parempi tisleensieto voi selittyä sen suuremmalla koolla: siira on noin 4–12 mm pitkä (van Hattum 1995) eli noin kaksi kertaa suurempi kuin vesikirppu (Koivisto 1995). Kuten maakotiloita, myös limakotiloita suojaa niiden kalkkipitoinen kuori. Tämä suojaa kotiloa, vaikka kotilo ei pystykään sulkemaan kuoren suuta operculumin eli sulkijalevyn puuttuessa (Olsen ym. 2005). *Daphnia*-vesikirppua pidetään usein hyvin herkkänä koe-eliönä (von der Ohe & Liess 2004) kun taas harvasukasmattojen katsotaan sietävän myrkyjä kohtuullisen hyvin (Phipps ym. 1993). Myös von der Ohe ja Liess'n (2004) vertaillessa vesieliöiden herkkyyttä useille metalleille ja orgaanisille kemikaaleille, *D. magna* –vesikirput olivat *Lumbriculidae*-suvun harva-

sukasmatoja, vesisiiruja ja limakotiloita herkempiä. Koivutisleen ominaisuudet, kuten osittainen pinta-aktiivisuus, saattavat kuitenkin olla sellaisia, että ne altistavat harvasukasmatoja vesikirppuja enemmän. Alhaiset koivutislepitoisuudet lisäsivät pikkulimaskan kasvua. Toksisuuskokeissa on kuitenkin havaittu, että *L. minor* voi reagoida positiivisesti alhaisiin myrkkypitoisuuksiin (Sherry ym. 1997, Song & Huang 2005). Toksisuuskokeiden tulokset osoittavat eliöiden välillä olevan herkkyyseroja.

Koivutisle vaikutti valikoimatta sekä kasveihin että eläimiin. Se voineekin toimia sekä tuholais- että kasvimyrkkyjen tavoin. Esimerkiksi hyönteismyrkkyinä käytetty tuholaiskarkote, malationi, on myrkyllinen *D. magna* -vesikirpuille pitoisuuksissa 1–2,35 µg/L (LC<sub>50</sub> 24 ja 48 h; Keller & Ruessler 1997, Cano ym. 1999). Kasvimyrkkyinä käytetty glyfosaatti aiheuttaa pikkulimaskan kasvun inhibition (EC<sub>50</sub>, 14 vrk) pitoisuudessa 2 µg/L (Hartman & Martin 1984) ja on myrkyllinen myös eläinplanktonille, kuten *D. magna* -vesikirpuille (EC<sub>50</sub> 24 h = 61,72 µg/L ja EC<sub>50</sub> 48 h = 95,96 µg/L; Alberdi ym. 1996). Koivutisleen toksisuusarvot ovat välillä 16–872 mg/L, kun tiedetään, että 1 ml koivutislettä painaa noin 0,98 mg. Malationiin ja glyfosaattiin verrattuna koivutisle ei ole myrkyä vesieliöille. Kamrinin (2000) tuholaismyrkyluokituksen mukaan alle 100 µg/L jäävät toksisuusarvot osoittavat aineen olevan erittäin myrkyllistä vesieliöille. Aine ei ole akuutisti myrkyllistä mikäli toksisuusarvot ovat yli 100 000 µg/L. Valtaosa koivutisleen toksisuusarvoista meni tämän rajan yli. Ainoastaan *V. fischerin* ja pikkulimaskan toksisuusarvot osoittavat tisleen olevan hieman myrkyllistä Kamrinin luokituksen perusteella (arvot välillä 10 000–100 000 µg/L). Myrkyvaikutuksen aikaansaavaa ainetta on tisleessä vain osa tisleen kokonaismäärästä ja tämä osuus vaihtelee eri valmistuserissä. Vaikuttava aine aiheuttaa vasteen koe-eliöissä, mutta koivutisleseoksessa se ei ole kovinkaan myrkyllistä vesieliöille. Alhaiset pitoisuudet eivät siis hypoteesini vastaisesti olleet haitallisia vesieliöille.

Kaikissa kokeissa toksisen ja ei-toksisen pitoisuuden välinen raja oli hyvin jyrkkä: pienempi pitoisuus ei saanut vastetta aikaan, mutta seuraavassa pitoisuudessa suuri osa kuoli ja vielä väkevämpi liuos tappoi kaikki koe-eliöt. Vaste siis ilmeni nopeasti tietyn kynnyspitoisuuden jälkeen. Nopeasti ilmenevä vaikutus voi viitata spesifiseen vaikutusmekanismiin (Gustavson ym. 1998), jolloin jokin koivutisleen sisältämä aine vaikuttaa tiettyyn toimintoon. Koska vaste oli samanlainen sekä kasveilla, bakteereilla että eläimillä, kyseessä lienee toiminto, joka on yhteinen kaikille eliöille. Bioluminesenssin inhibitio ilmentää negatiivista vaikutusta elektroninsiirtoketjussa (Ringwood ym. 1997), joka on puolestaan elintärkeä prosessi monessa aineenvaihdunnan reaktiossa kuten soluhengityksessä ja yhteyttämisessä. Kaikissa vesieliöissä havaittu äkillinen toksinen vaikutus saattaisikin olla seurausta tisleen perusaineenvaihdunnalle aiheuttamasta häiriöstä. Monille tuholaismyrkyille on tyypillistä, että ne vaikuttavat tiettyyn toimintoon kuten hermostoon tai energia-aineenvaihduntaan, joka on yleinen kaikilla eliöillä (Stenersen 2004).

Limakotilo pystyy säätelemään tisleen kertymistä vetäytymällä kuoreensa ja sen vuoksi kotiloiden toksisuustuloksista puuttuu ajallinen annosvasteisuus: 48 ja 72 tunnin  $LC_{50}$ -arvot ovat identtisiä 24 h-tulosten kanssa. Limakotiloita lukuun ottamatta tisleen toksisuudessa oli nähtävissä annosvasteisuus: mitä pitempi oli altistusaika, sitä suuremmat olivat tisleen vaikutukset ja sitä pienemmät tislepitoisuudet myrkyllisiä vesieliöille. Pitempiaikaisessa altistuksessa vasteen ilmenemiseen siis riittää pienempi tislepitoisuus.

#### *4.4. Biosaatavuuteen ja kulkeutumiseen vaikuttavat tekijät*

Heterogeenisenä yhdisteenä koivutisle sisältää sekä vesiliukoisia että rasvaliukoisia aineita. Kuitenkin vain biosaatava osa aineesta kulkeutuu eliöihin ja usein vesiliukoinen osuus on biosaatavuuden kannalta merkittävä (Connell ym. 1999). Vesieliöiden maaperäeliöitä suuremman herkkyuden syynä lienee se, että vesikokeissa

kaikki vesiliukoinen osuus koivutisleestä oli myös biosaatavassa, liukoisessa muodossa. Maaperäeliöiden altistumista pienentää aineen sitoutuminen maapartikkeleihin (Didden & Römbke 2001). Joutuessaan Suomen humuksekkaisiin pintavesiin myös koivutisleen haittavaikutukset vesieliöille voivat olla pienempiä, sillä humuspartikkelit, samoin kuin maapartikkelit sitovat haitallisia aineita ja tekevät niistä eliöille vaikeammin saatavia (Wetzel 2001) Tällöin haitallisten aineiden kulkeutuminen ja ympäristökohtalo voivat merkittävästi muuttua (Wetzel 2001).

Aineyhdisteiden huuhtoutuminen maaperän kautta pohjavesiin ja vesistöihin on ollut aiempien kotiloiden kontrollointiin tarkoitettujen aineiden, kuten Mesurolin, ongelma. Vaikka koivutisle on osittain vesiliukoista, tultaneen koivutisleestä kuitenkin käyttämään pääosin tervatislettä, joka ei ole yhtä vesipitoista kuin maaperä- ja vesistökokeisiin käytetty tisle. Tervatisleen käytön ympäristövaikutukset voivat siten jäädä pienemmiksi, kuin mitä ne olisivat tisleen käytön seurauksena. Myös tervatisleen joukkoon sekoitettu vaseliini vähentää tisleen liukoisuutta ja huuhtoutumista maahan, jolloin maa- ja vesieliöiden altistuminen jää pienemmäksi. Vesistöön huuhtoutuvan tisleen osuus sekä sen laimeneminen vesistössä kuitenkin ratkaisevat koivutisleen todelliset vaikutukset vesieko-systeemissä. Tisleen huuhtoutumista maaperästä vesistöihin voisi vähentää esimerkiksi se, että tisle on mahdollinen lisäresurssi mikrobeille.

Kokeissa, joissa tisleellä havaittiin olevan vaikutusta maaperän eliöihin, myös altistuminen auringonvalolle oli vähäisempää kuin Marleena Hagnerin kesän 2003 paahteisessa kenttäkokeessa. Vesiliukoisuuden ohella pysyvyys vaikuttaa bio-saatavuuteen lisäten eliöiden altistumisaikaa aineelle (Didden & Römbke 2001). Aurinkoinen sää voi vähentää aineen vaikutusaikaa lisäämällä sen haihtumista (Walker 2006) ja myös mm. nopea hajoaminen vähentää aineen pysyvyyttä (Römbke & Moser 2002, Walker 2006). Pysyvyyttä lisäävät sääolot saattoivat osaltaan tuoda esiin koivutisleen vaikutukset maaperässä. Koivutisleen

ominaisuuksia ei tunneta, mutta mikäli haihtuminen ja hajoaminen on suurta, ei koivutisle kulkeudu helposti maasta vesistöihin.

Tässä kokeessa ei selvitetty ympäristömuuttujien kuten maatyypin, pH:n, lämpötilan tai orgaanisen aineen määrän vaikutusta koivutisleen myrkyllisyyteen. Kuitenkin nämä olosuhteet vaikuttavat merkittävästi aineiden biosaatavuuteen (Peijnenburg ym. 1997) ja niiden huomioiminen toisi tietoa tisleen käyttäytymisestä maaperässä. Myös eliöiden lajistosuhteet voivat altistumisen myötä muuttua, sillä aineen altistumisreitti ja siten lajikohtainen biosaatavuus poikkeavat eliöiden välillä (Peijnenburg ym. 1997). Lajistosuhteiden muuttuminen kertoo paljon maaperäekosysteemin toiminnasta, sillä monimuotoinen eliöyhteisö on toiminnaltaan yksinkertaista tehokkaampi (Setälä & Huhta 1990) ja usein myös herkempi kuvaamaan ympäristön stressitekijöitä (Yeates & Bongers 1999). Siksi myös tutkittujen eliöiden lajikoostumus olisi hyvä huomioida tisleen vaikutuksia tutkittaessa.

#### *4.5. Yhteenveto*

Aiemmissa Ympäristöekologian laitoksella tehdyissä kokeissa saadut tulokset vahvistuvat myös tässä tutkimuksessa: koivutisle toimii tehokkaana kotilokarkotteena. Karkoteteho paranee ratkaisevasti kun tisleen joukkoon lisätään vaseliinia ja taustalla lienee parantunut säänkestävyys. Koska tisle ei tapa, se ei vaikuta suoraan lehtokotiloiden populaatiokokoon. Vanhat, kotiloiden houkutteluun perustuvat menetelmät voitaisiin yhdistää koivutisleen karkotevaikutukseen, jolloin saataisiin keino lehtokotilopopulaatioiden tehokkaaseen hillintään.

Vaikutus mikrobihengitykseen ja peltomaan sukkulamatoihin viittaa siihen, että koivutisleestä voi joissain olosuhteissa olla haittaa maaperässä. Suoran myrkyvaikutuksen sijaan saattaa kasvien kuihtumisesta seuraava hiilen ja juurieritteiden väheneminen kuitenkin olla negatiivisten vaikutusten taustalla. Koska kasvit

alkoivat toipua jo saman kasvukauden aikana, ei tisleen haittavaikutus kasvien kautta jääne pitkäkestoiseksi. Tisleen vaikutus mikrobihengitykseen ei ollut yksinomaan negatiivinen, joten on mahdollista että jotkin koivutisleen sisältämät aineet saattavat toimivat lisäresurssina mikrobeille. Koivutisle ei kuitenkaan liene kova myrkky maaperässä. Ekotoksikologiset kokeet eivät osoittaneet myöskään vesieliöiden olevan kovin herkkiä tisleelle, vaikka tisle vaikuttikin niihin enemmän kuin maaperäeliöihin.

## *5. Kiitokset*

Esitän kiitoksen gradunohjaajalleni, professori Heikki Setälälle, joka vastasi kirjajaan joukkoon mieltäni askarruttavia kysymyksiä sekä kesän 2005 työparilleni Marleena Hagnerille, jonka kanssa sukelsimme koivutisleen tutkimattomaan maailmaan. Haluan kiittää myös yliopistonlehtori Olli-Pekka Penttistä, joka avusti minua ekotoksikologisissa pohdinnoissani ja professori Rauni Strömmeriä, joka auttoi painiessani respirometrin kanssa. Kiitokset myös MTT:n Kari Tiilikkalalle ja Bengt Lindqvistille, tutkimusavustaja Tuukka Rynäselle, avuliaille ympäristö-ekologian laitoksen opiskelijoille, kotipihansa tutkimuskäyttöön luovuttaneille sekä yhteistyökumppaneille. Eikä sovi unhoittaa Aleksia, jolle suolsin monet ajatukseni ennen kuin sain ne piirrettyä paperille. Nukahditko?

## 6. Kirjallisuus

- Abrahamsen, G. 1973: Studies of body-volume, body-surface area, density and live weight of Enchytraeidae (Oligochaeta). – *Pedobiologia* 13: 6-15.
- Alberdi, J. L.; Sáenz, M. E.; Di Marzio, W. D. & Tortorelli, M. C. 1996: Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. – *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 229-235.
- Anderson, J. P. E. & Domsch, K. H. 1977: A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. – *Soil Biology and Biochemistry* 10: 215-221.
- Baur, B. 1988: Population regulation in the land snail *Arianta arbustorum*: density effects on adult size, clutch size and incidence of egg cannibalism. – *Oecologia* 77: 390-394.
- Baur, B. 1990: Possible benefits of egg cannibalism in the land snail *Arianta arbustorum* (L.). – *Functional ecology* 4 (5): 679-684.
- Baur, B. 1993: Population structure, density, dispersal and neighbourhood size in *Arianta arbustorum* (LINNAEUS, 1758) (Pulmonata: Helicidae). – *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien Serie B Botanik und Zoologie* 94-95: 307-321.
- Baur A. & Baur B. 1993: Daily movement patterns and dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*. – *Malacologia* 35 (1): 89-98.
- Baur, B. & Raboud, C. 1988: Life history of the land snail *Arianta arbustorum* along an altitudinal gradient. – *The Journal of Animal Ecology* 57 (1): 71-87.
- Brussaard, L.; Behan-Pelletier, V. M.; Bignell, D.E.; Brown, V. K.; Didden, W.; Folgarait, P.; Fragoso, C.; Freckman, D. W.; Gupta, V. V. S. R.; Hattori, T.; Hawksworth, D. L.; Klopatek, C.; Lavelle, P.; Malloch, D. W.; Rusek, J.; Soderstrom, B.; Tiedje, J. M. & Virginia, R. A.: 1997. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. – *Ambio* 26: 563-570.
- Bååth, E. 1989: Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations: A review. – *Water, Air, and Soil Pollution* 47: 335-379.

- Cano, E.; Jimenez, A.; Cabral, J. A. & Ocete, M. E. 1999: Acute toxicity of Malathion and new surfactant "Genapol OXD 080" on species of rice basins. – *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63(1): 133-138.
- Connell, D.; Lam, D.; Richardson, B. & Wu, R. 1999: *Introduction to ecotoxicology*. –Blackwell Publishing. Isobritannia. 170 s.
- Cushman, J. R.; Rausina, G. A.; Cruzan, G.; Gilbert, J.; Williams, E.; Harrass, M. C.; Sousa, J. V.; Putt, A. E.; Garvey, N. A.; St. Laurent, J. P.; Hoberg, J. R. & Machado, M. W. 1997: Ecotoxicity hazard assessment of styrene. –*Ecotoxicology and environmental safety* 37: 173-180.
- Dawod, V. & FitzPatrick E. A. 1993: Some population sizes and effects of the Enchyraeidae (Oligochaeta) on soil structure in a selection of Scottish soils. –*Geoderma* 56: 173-178.
- Didden, W. 1993: Ecology of terrestrial enchytraeidae. –*Pedobiologia* 37: 2-29.
- Didden, W. & Römbke, J. 2001: Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. –*Ecotoxicology and Environmental Safety* 50: 25-43.
- Freckman, D. W. 1988: Bacterivorous nematodes and organic-matter decomposition. –*Agriculture, Ecosystems and Environment* 24: 195-217.
- Granlund, H. 1997: Terva ihon lääkeaineena. –*Muinaistutkija* 1: 86-90.
- Gustavson, K. E.; Svenson, A. & Harkin, J. M. 1998: Comparison of toxicities and mechanism of action of n-alkaloids in the submitochondrial particles and *Vibrio fischeri* bioluminescence (Microtox®) bioassay. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 17(10): 1917-1921.
- Hagner, M. 2004: *Koivutisle torjunta-aineena: Vaikutukset lehtokotiloon (Arianta arbustorum) ja maaperään*. –Pro gradu. Helsingin yliopiston ympäristöekologian laitoksen tutkimuksia ja raportteja 26. 39 s.
- Hartman, W. A. & Martin, D. B. 1984: Effects of suspended bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. –*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 33: 355-361.
- van Hattum, B. 1995: *Bioaccumulation of Sedimen-bound Contaminants by the Freshwater Isopod Asellus aquaticus (L.)*. –Väitöskirja. Institute for Environmental Studies of the Vrije Universiteit. 243 s.



- Helmisaari, H-S.; Lehto, T. & Makkonen, K. 2003: Hienojuuret ja mykorritsat – Teoksessa: Mälkönen, E. (toim.), *Metsämaa ja sen hoito*: 115-128. Karisto, Hämeenlinna.
- Huhta, V. & Koskenniemi, A. 1975: Numbers, biomass and community respiration of soil invertebrates in spruce forests at two latitudes in Finland. –*Annales Zoologici Fennici* 12: 164-182.
- Huhta, V.; Persson, T. & Setälä, H. 1998: Functional implications of soil fauna diversity in boreal forests. –*Applied Soil Ecology* 10: 277-288.
- Hutri, K. & Mattila, T. 1991: *Kotilo- ja simpukkaharrastajan opas*. –Luonto-Liiton harrasteoppaat. Tammi, Helsinki. 155 s.
- Hägele, B. F. & Rahier, M. 2001: Determinants of seasonal feeding of the generalist snail *Arianta arbustorum* at six sites dominated by Senecioneae. –*Oecologia* 128: 228-236.
- Islam K. R. & Wright, S. R. 2003: Microbial Communities. –Teoksessa: *Encyclopedia of Soil Science*: 1-6. Marcel Dekker, New York.
- ISO 1998: *Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) - Osa 3: Method using freeze-dried bacteria*. ISO 11348-3. -International Organisation for Standardization. 13 s.
- ISO 2005: *Water quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (Lemna minor) - Duckweed growth inhibition test*. ISO/CD 20079. –International Organisation for Standardization. 23 s.
- Kamrin, M. A. 2000: *Pesticide profiles: Toxicity, Environmental impact, and fate*. –CRC Press LLC, New York.
- Keller, A. E. & Ruessler, D. S. 1997: The toxicity of malathion to unionid mussels: Relationship to expected environmental concentrations. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 16(5): 1028-1033.
- Kerney M. P. & Cameron R. A. D. 1979: *A Field Guide to the Lands Snails of Britain and North-west Europe*. –Collins, London. 288 s.
- Kleewein, D. 1999: Population size, density, spatial distribution and dispersal in an Austrian population of the land snail *Arianta arbustorum styriaca* (Gastropoda: Helicidae). –*Journal of Molluscan Studies* 65: 303-315.

- Koivisto, S. 1995: Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicology tests? –*Environmental Pollution* 90 (2): 263-267.
- Laakso, J & Setälä, H. 1999: Sensitivity of primary production to changes in the architecture of belowground food webs. –*Oikos* 87: 57-64.
- Martikainen, P. 2003: Metsämaan mikrobisto –Teoksessa: Mälkönen, E. (toim.), *Metsämaa ja sen hoito*: 101-114. Karisto, Hämeenlinna.
- Meli, S. M.; Badalucco, L.; English, L. C. & Hopkins, D. W. 2003: Respiratory responses of soil micro-organisms to simple and complex organic substrates. –*Biology and Fertility of Soils* 37: 96-101.
- Nordgren, A. 1988: Apparatus for the continuous long-term monitoring of soil respiration rate in a large number of samples. –*Soil Biology and Biochemistry* 20: 955-957
- Nurminen, M. 1967: Ecology of enchytraeids (Oligochaeta) in Finnish coniferous forest soil. –*Annales Zoologici Fennici* 4: 147-157.
- Nykänen, P. & Seppä, J. 1997: Koivutervan valmistus ja käyttö. –*Muinaistutkija* 1: 25-32.
- O'Connor, F. B. 1955: Extraction of enchytraeid worms from a coniferous forest soil. –*Nature* 175: 815-816
- von der Ohe, P. C. & Liess, M. 2004: Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 23(1): 150-156.
- Olsen, L-H.; Sunesen, J. & Pedersen, V. 2005: *Vesikirppu ja sudenkorento: makean veden eläimiä*. –WSOY, Porvoo. 231 s.
- Paajala, J. & Jokivartio, T. 1989: *Tervan valmistus ja käyttö*. –Oulun yliopisto. Pohjois-Suomen tutkimuslaitos. Tutkimusraportti 93. 101 s.
- Packman, J. R & Harding, D. J. L. 1982: *Ecology of Woodland Processes*. –The Pitman Press, Bath. 261 s.
- Pakarinen, E. 1992: Feeding avoidance of terrestrial gastropods to conspecific and nonspecific material. –*Journal of Molluscan Studies* 58(2): 109-120.

- Peijnenburg, W. J. G. M.; Posthuma, L.; Eijsackers, H. J. P. & Allen H. E. 1997: A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. –*Ecotoxicology and Environmental Safety* 37: 163-172.
- Phipps, G. L.; Ankley, G. T.; Benoit, D. A. & Mattson, V. R. 1993: Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 12(2): 269-279.
- Raboud, C. 1986: Age determination of *Arianta arbustorum* (L.) (Pulmonata) based on growth breaks and inner layers. –*Journal of Molluscan Studies* 52: 243-247.
- Ringwood, A. H.; DeLorenzo, M. E.; Ross, P. E. & Holland, A. F. 1997: Interpretation of Micotox® solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition. –*Environmental toxicology and chemistry* 16 (6): 1135-1140.
- Römbke, J. & Moser, T. 2002: Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. –*Chemosphere* 46: 1117-1140.
- Schlöter, M. Dilly O. & Munch, J. C. 2003: Indicators for evaluating soil quality. –*Agriculture, Ecosystems and Environment* 98: 255-262.
- Setälä H. & Huhta, V. 1990: Evaluation of the soil fauna impact on decomposition in a simulated coniferous forest soil. –*Biology and Fertility of Soils* 10: 163-169.
- SFS 1984: *Vesitutkimukset. Akuutin myrkyllisyyden määrittäminen Daphnia Magna Straus vesikirpulla. SFS 5062.* –Suomen standardoimisliitto. 9 s.
- Sherry, J; Scott, B. & Dutka, B. 1997: Use of various acute, sublethal and early life-stage tests to evaluate the toxicity of refinery effluents. –*Environmental Toxicology and Chemistry* 16(11): 2249-2257.
- Smolander, A. & Priha, O. 2003: Puulajin merkitys metsämaan viljavuuden hoidossa –Teoksessa: Mälkönen, E. (toim.), *Metsämaa ja sen hoito*: 155-158. Karisto, Hämeenlinna.
- Sohlenius B. 1979: A carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in a Swedish coniferous forest soil. –*Holarctic Ecology* 2: 30-40.

- Song, Z. H. & Huang, G. L. 2005: Toxic effects of pentachlorophenol on *Lemna minor*. –*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 1166-1172.
- Stenersen, J. 2004: *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*. –CRC Press, Boca Raton. 296 s.
- Terhivuo, J. 1978. Growth, reproduction and hibernation of *Arianta arbustorum* (L.) (Gastroboda, Helicidae) in southern Finland. –*Annales Zoologici Fennici* 15: 8-16.
- USEPA 2002: *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. EPA-821-R-02-012. 5.painos. –United States Environmental Protection Agency. 266 s.
- Valovirta, E. J. 1955: Runsaasti lehtoetanoita (*Arianta arbustorum* L.) Kristiinankaupungin tienoilla. –*Memoranda Societatis Flora Fauna Fennica* 32: 101-103.
- Valovirta, I. 1964: Porvoon *Arianta arbustorum* -esiintymä. –*Luonnon tutkija* 68: 127-128.
- Valovirta, I. 1991: Maakotilot suosivat lehtoja. –*Eläinmaailma* 6:35-37.
- Vanguelova, E. I.; Nortcliff, S.; Moffat, A. J. & Kennedy, F. 2005: Morphology, biomass and nutrient status of fine roots of Scots pine (*Pinus sylvestris*) as influenced by seasonal fluctuations in soil moisture and soil solution chemistry. –*Plant and Soil* 270: 233-247.
- Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M. & Peakall, D. B. 2006: *Principles of Ecotoxicology*. –Taylor & Francis, Lontoo. 315 s.
- Wardle, D. A.; Bardgett, R. D.; Klironomos, J. N.; Setälä, H.; van der Putten, W. H. & Wall, D. H. 2004: Ecological linkages between aboveground and belowground biota. –*Science* 304: 1629-1633.
- Wetzel, R. G. 2001: *Limnology: Lake and River Ecosystems*. 3. painos. –Academic Press, London. 1006 s.
- Yeates, G. W. & Bongers, T. 1999: Nematode diversity in agroecosystems. –*Agriculture, Ecosystems & Environment* 74(1): 113-135.