

VESIHALLITUS—NATIONAL BOARD OF WATERS, FINLAND

**Tiedotus
Report**

237

**VEIJO MIETTINEN, RAIJA AALTONEN,
IRMELI TAIPALINEN JA PETRI SHEMEIKKA**

LEVÄ-, BAKTEERI- JA KALATESTIEN KÄYTTÖ- KELPOISUUDESTA PUUNJALOSTUSTEOLLISUUDEN JÄTEVESIEN VAIKUTUSTEN ARVIOINNISSA

**English summary: On the application of tests with algae, bacteria and fish
in the assessment of the effects of pulp and paper mill effluents**

MARJA RUOPPA JA SINIKKA TÄHKÄ

RASKASMETALLIEN VAIKUTUSTEN SELVITTÄMINEN TUTKIMALLA KALOJEN ALKIONKEHITYSTÄ JA POIKASVAIHEITA HISTOLOGISIN MENETELMIN

HELSINKI 1984

WATER MANAGEMENT IN FINLAND

Tekijät ovat vastuussa julkaisun sisällöstä, eikä siihen voida vedota vesihallituksen virallisena kannanottona.

VESIHALLITUKSEN TIEDOTUKSIA koskevat tilaukset: Valtion painatuskeskus PL 516, 00101 Helsinki 10, puh. 90-539011/julkaisutilaukset

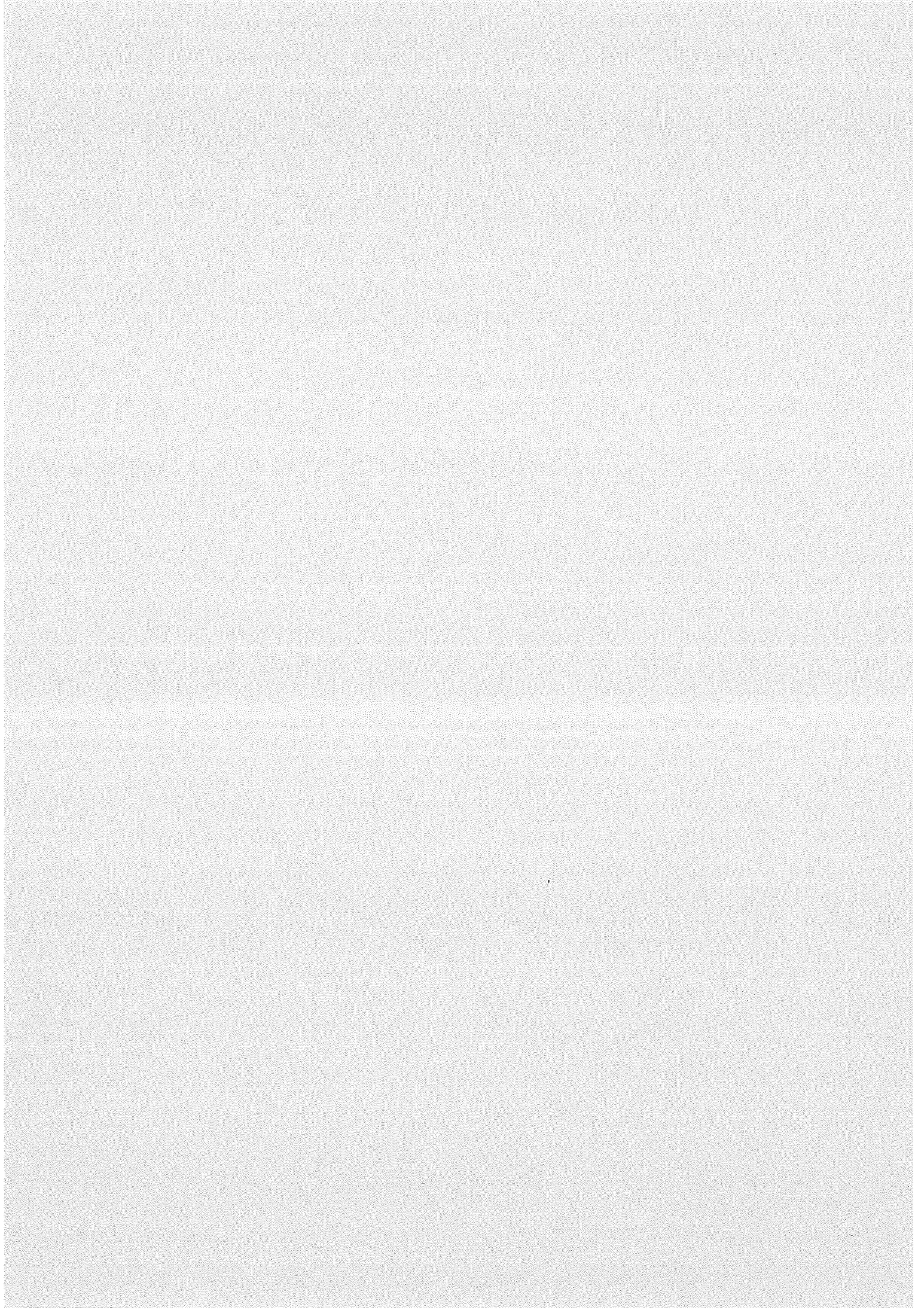
ISBN 951-46-7486-3
ISSN 0355-0745

Veijo Miettinen, Raija Aaltonen, Irmeli Taipalinen ja Petri Shemeikka

LEVÄ-, BAKTEERI- JA KALATESTIEN KÄYTTÖKELPOISUUDESTA PUUN-
JALOSTUSTEOLLISUUDEN JÄTEVESIEN VAIKUTUSTEN ARVIOINNISSA

S I S Ä L L Y S

	Sivu
ALKULAUSE	5
1 JOHDANTO	5
2 TEHTAIDEN PROSESSIT, JÄTEVEDET JA NIIDEN KÄSITTELY	7
3 KOEASETELMA JA MENETELMÄT	9
3.1 Yleistä	9
3.2 Bakteeritestit	12
3.3 Bakterien glukoosinotto-testi	14
3.4 Levätestit	14
3.5 Pohjaeläintestit	16
3.6 Kalatestit	16
3.61 Pitkäaikaistestit	16
3.62 Makutestit	20
3.63 Lyhytaikaistestit	20
4 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	22
4.1 Bakteeritestit	22
4.2 Bakterien glukoosinotto-testi	27
4.3 Levätestit	29
4.4 Kalatestit	33
4.41 Kalatestien käytöstä vesitutkimuksissa	33
4.411 Yleistä	33
4.412 Kalojen fysiologisten muutosten merkitys	34
4.42 Pitkäaikaistestit	39
4.43 Makutestit ja eräiden aineiden kertyminen kaloihin	50
4.431 Sellu- ja paperiteollisuuden jätevesien haitallisista aineista	50
4.432 Haju- ja makutestit	51
4.433 Kertyminen	52
4.44 Lyhytaikaistestit	56
5 YHTEENVETO TULOKSISTA JA NIIDEN TARKASTELU	53
5.1 Jätevesien vaikutukset eliöihin	53
5.2 Testimenetelmien arviointi	61
5.3 Jätevesien puhdistuksen tehokkuus eliöiden kannalta	63
6 TIIVISTELMÄ	64
SUMMARY	67
KIRJALLISUUS	69



A L K U L A U S E

Eräiden biotestien käyttökelpoisuuden selvittäminen puunjalostusteollisuuden jätevesien vaikutusten tutkimisessa Kuopion vesipiirin ja vesihallituksen yhteistyönä aloitettiin Itä-Suomen vesioikeuden velvoitettua A. Ahlström Osakeyhtiön maksamaan valtiolle vesiensuojelumaksua vuoden 1977 alusta lukien. Maksusta puolet on suoritettava maa- ja metsätalousministeriön kalastus- ja metsästysosastolle käytettäväksi kalakannan säilyttämiseen jätevesien vaikutusalueella ja puolet vesihallitukselle käytettäväksi vesiensuojelua koskevaan tutkimustyöhön.

Vesiensuojelumaksulla rahoitettavaa tutkimusta valvovan työryhmän ensimmäinen kokous pidettiin huhtikuussa 1978. Työryhmän puheenjohtajana toimi Kuopion vesipiirin johtaja Reijo Porttikivi. Työryhmässä ovat olleet kuluneiden neljän vuoden aikana mukana DI Pentti Moilanen ja tutkimuspäällikkö Aarre Metsävirta sekä DI Anna-Maija Kuvaja, DI Pirkko Kalliola ja FM Reino Panula A. Ahlström Osakeyhtiöstä, DI Olavi Airanne, DI Jukka Vuontela, DI Juhani Junna ja limnologi Veijo Miettinen vesihallituksesta, limnologi Jarmo Kivinen Mikkelin vesipiiristä sekä limnologi Irmeli Taipalinen ja FK Petri SHEMEIKKA Kuopion vesipiiristä.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin biotestein A. Ahlström Oy:n Varkauden tehtaiden jätevesien vaikutusta neljään eri eliöryhmään vuosina 1978, -79, -80 ja -81. Bakteeri- ja levätestit tehtiin Kuopion vesipiirin vesilaboratoriossa. Bakteerien glukosinotto -testin suoritti Tuija Talsi Helsingin vesipiiristä. Kala- ja pohjaeläintestien akvaariokokeet tehtiin Varkauden tehtaiden puhdistamon tiloissa, joissa kokeiden valvojana toimi ins. Anneli Jäppinen v. 1978 ja Luk Raija Aaltonen vuosina 1979-1981. Kalojen fysiologinen analysointi suoritettiin vesihallituksen laboratoriossa, ja työhön osallistuivat Veijo Miettinen, Marja Ruoppa ja Tarja Nakari vesihallituksesta sekä Eira Railo ja Björn-Erik Lönn Helsingin yliopiston eläintieteen laitokselta. Kloorifenolimääritykset ja pääosa hartsihappomäärityksistä tehtiin dos. Bjarne Holmbomin johdolla Åbo Akademiassa. Vuoden 1981 laajennettujen kalatestien suunnitteluun osallistui dos. Aimo Oikari Helsingin yliopiston eläintieteen laitokselta. Osa näistä tutkimuksista rahoitettiin Maj ja Tor Nesslingin säätiöltä saadulla apurahalla. Kalojen makututkimukset tilattiin valtion teknilliseltä tutkimuskeskukselta.

1 J O H D A N T O

Jätevesien ja kemikaalien vesistövaikutusten selvittäminen pohjautui 1960-luvun lopulle asti selvästi havaittavien muutosten mittaamiseen tavanomaisin kemiallisin ja biologisin menetelmin. Vasta kun vesieliöissä todettiin suuria määriä erilaisia ympäristömyrkyjä sekä niiden mahdollisesti aiheuttamia vaurioita havaittiin täysin uudentyyppisten tutkimusten välttämättömyys. Ekologisen ja fysiologisen tietämyksen lisääntyminen sekä kemiallisen analytiikan kehittyminen ovat mahdollistaneet uusien

biotestien ja tutkimusmenetelmien kehittämisen.

Akuuttia, kuolemaan johtavaa (letaalia) vaikutusta mittaavia menetelmiä on käytetty jo pitkään myrkyllisyystutkimuksissa. Aikaisemmin niitä käytettiin myös pitkäaikaisvaikutusten ehkäisemiseksi laskemalla testitulosten pohjalta mm. turvaker-toimia, joiden oletettiin takaavan eliöille turvalliset olo-suhteet. Akuutteja vaikutuksia mittaavia lyhytaikaisia tes-tejä on kehitetty teknisten menetelmien käyttökelpoisuutta ja yksinkertaisuutta lisäävien parannusten ohella jätevesi-tutkimuksiin soveltuviksi.

Pitkäaikaisvaikutuksia mittaavien menetelmien kehittäminen alkoi 1970-luvun alussa. Lähtökohtina olivat mm. käytössä olleiden menetelmien riittämätön herkkyys, myrkyllisten ai-neiden esiintyminen usein seoksina esimerkiksi jätevesissä sekä veden laadun, kuten kovuuden suuri vaikutus aineiden haitallisuuteen. Pyrkimyksenä oli saada mahdollisimman mo-nipuolinen kuva myrkkyyvaikutuksesta ja sen vaikutusmekanis-meista.

Suomessa menetelmien kehittäminen käytännön vesiensuojelun tarpeisiin aloitettiin vesihallituksessa vuonna 1976. Kala-testien osalta yhteistyötä on ollut Helsingin yliopiston eläintieteen laitoksen kanssa, jossa alan perustutkimusta oli suoritettu jo useita vuosia. Levätestejä myrkyllisyys-tutkimuksiin on kehitetty yhteistyössä Jyväskylän yliopiston biologian laitoksen kanssa. Glukoosin mineralisaatioon pe-rustuvaa bakteeritestiä on kehitetty vesihallituksen omana tutkimushankkeena.

Vuonna 1979 aloitettiin Nordforskin koordinoimana kolmivuo-tinen yhteispohjoismainen projekti "Ekotoxikologiska metoder; akvatisk miljö" testimenetelmien kehittämisen koordinoimiseksi ja tehostamiseksi. Projektin työskentelyyn osallistui yli 20 laitosta Norjasta, Ruotsista, Tanskasta ja Suomesta.

Projektissa oli erityisenä pyrkimyksenä parantaa testausme-nettelyn ekologista merkittävyttä. Käyttökelpoisuuden arvioinnissa ja käytännön tutkimuksissa oli mukana testejä useiden eri trofiatasojen eliöillä: kala- ja Daphnia-vesi-kirpputestit sekä levä- ja bakteeritestit. Myrkyllisyyden lisäksi ympäristötoksikologisessa arvioinnissa välttämättömien kertymisen ja hajoavuuden määritysmenetelmien kehittäminen oli myös projektin ohjelmassa. Projektin neljäs osaprojekti käsitteli teollisuusjätevesien testausta sekä tulosten käyt-tömahdollisuuksia jätevesiä koskevassa päätöksenteossa.

Suomesta vesihallituksen ja sen em. yhteistyölaitosten lisäksi mukana olivat Kuopion korkeakoulu, Åbo Akademi ja Oy Keskus-laboratorio. Tutkimuksia suoritettiin lisäksi useimmissa vesi-piireissä vesiensuojelumaksuilla. Kansallinen tutkimusyhteis-työ keskittyi puunjalostusteollisuuden jätevesien vaikutusten selvittämiseen. Vesihallituksessa tehtiin tutkimuksia myös metalliteollisuuden ja kemian teollisuuden jätevesivaikutuk-sista.

Tämän A. Ahlström Osakeyhtiön Varkauden integroidun puunja-lostusteollisuuslaitoksen jätevesien vaikutusten tutkimuksen

tarkoituksena oli selvittää:

- erilaisten testimenetelmien käyttökelpoisuutta jätevesien vaikutusten arvioinnissa
- jätevesien biologisia vaikutuksia pitoisuudessa, joka saattaa esiintyä tehtaiden lähialueilla sekä vertailuna tätä väkevämmässä jätevesipitoisuudessa
- jätevesien puhdistukseen rakennetun ilmastetun lammikon tehoa vähentää jätevesien eliöille haitallisia vaikutuksia.

Tutkimus oli maassamme ensimmäinen, jossa vaikutusten arviointiin käytettiin usean eri tyyppisen testin muodostamaa testikokonaisuutta.

2. TEHTAIDEN PROSESSIT, JÄTEVEDET JA NIIDEN KÄSITTELY

A. Ahlström Osakeyhtiön Varkauden tuotantolaitokset sijaitsevat Varkauden kaupungin keskustassa. Tehtaiden käyttövesi otetaan yläpuolisesta järvestä Unnukasta ja jätevedet laskeaan Haukiveden pohjoisosaan. Yhtiön integroitu puunjalostusteollisuus Varkaudessa käsittää taulukossa 1 mainitut tuotantolaitokset.

Taulukko 1. A. Ahlström Osakeyhtiön Varkauden puunjalostustehtaiden kapasiteetit (t/v) (Moilanen 1982) ja vuoden 1980 jätevesitase (m³/d) tuotantolaitoksittain.

	kapasiteetti (t/v)	jätevesiä (m ³ /d)
kuorimo (k-m ³)	1 000 000	10 660
puruhierre	18 000	580
hiomo	180 000	
kemimekaaninen massatehdas	25 000	290
kartonkitehdas	30 000	2 590
sulfiittiselutehdas	120 000	
sulfaattiselutehdas	120 000	13 100
paperitehdas 1	215 000	3 340
paperitehdas 2	165 000	7 200
kuumakierremassatehdas	170 000	
pakkaustehdas	5 000	2 450
saha	150 000 m ³ /v	
vaneritehdas		
vesi- ja lämpövoimalat		3 600 (LVL 1)
		Σ 50 400

Suurin muutos tehtaiden tuotantotoiminnassa neljän tutkimusvuoden aikana oli sulfiittiseluloosatehtaan lopettaminen helmikuussa 1979 ja sulfaattiseluloosatehtaan aloittaminen heinäkuussa 1980. Vuoden 1980 jätevesitarkkailun yhteenvedossa on esitetty yllä oleva jätevesitase, josta ilmenee jätevesien määrät tehdasosastoittain. Sen mukaan sulfaattiselutehtaalta tulee noin neljännes ja kuorimolta noin

viidennes jätevesistä. Seuraavaksi eniten jätevesiä tulee paperitehtailta. Edellä esitetty tase kuvaa tilannetta, jossa valmistetaan paperisellua; esihydrolyysisellua valmistettaessa ginnakkaistuoteosastolta muodostuu lisäksi jätevesiä 3 700 m³/d.

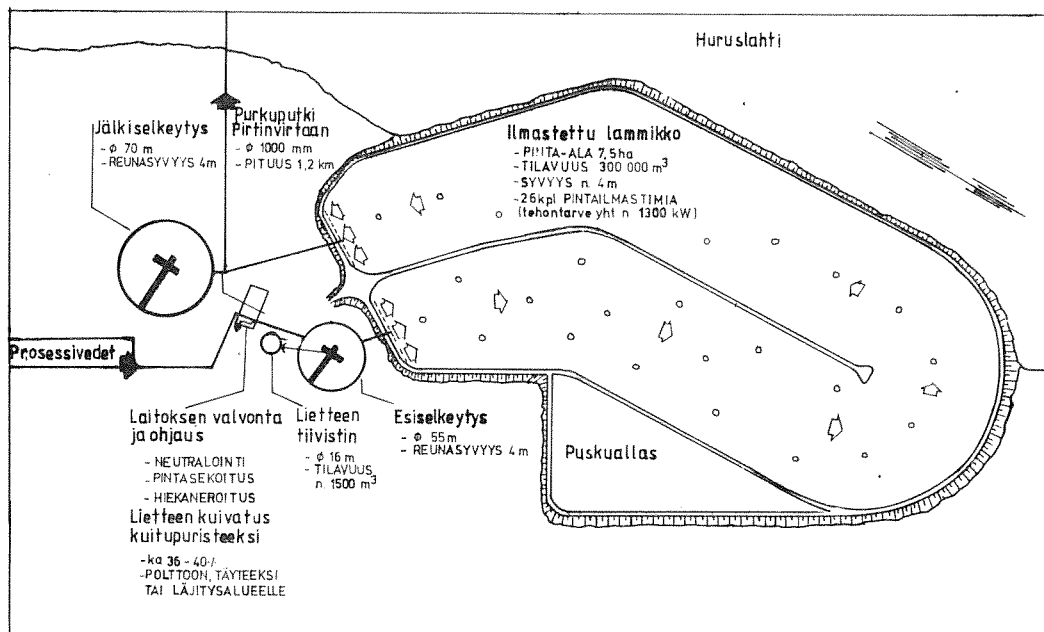
Taulukko 2. Tehtaiden jätevesien käsittely ja jätevesikuormitus tutkimusvuosina. (Suluissa olevat luvut ilmaisevat puhdistamolle tulevaa kuormitusta prosentteina tehtaiden kokonaiskuormituksesta.)

vuosi	jätevesien määrä m ³ /d	kuormitus				käsittely
		BHK ₇ t O ₂ /d	kiint. t/d	kok.P kg/d	kok.N kg/d	
1978	108 000	31,1 (80)	8,7 (70)	44 (90)	288 (70)	mekaaninen
1979	56 000	23,6 (50)	11,4 (35)	40 (50)	248 (50)	mekaaninen + biologinen
1980	49 480	12,2 (70)	8,9 (50)	30 (90)	260 (90)	mekaaninen + biologinen
1981	63 400	17,0	2,9*	62	482	mekaaninen + biologinen

*mittauksessa on eri suodin kuin aiempina vuosina

Jätevesimäärät ja kuormitukset vaihtelivat tutkimusvuosina melko paljon (taulukko 2) tehtaiden prosessimuutosten ja jäteveden puhdistamon käyttöönoton vuoksi. Lisäksi sulfaattiselluloosatehtaan rakentamisen yhteydessä uusittiin viemäri- ja sadevesijärjestelmät, mistä syystä osa jätevesistä johdettiin suoraan vesistöön ja osa puhdistamolle. Tehdasalueella on erillinen sadevesi- ja puhdasvesiviemärijärjestelmä. Näiden viemäreiden vesimäärät ovat yhteensä noin 50 % puhdistamolle johdettavien jätevesien määrästä.

Jäteveden puhdistamon mekaaninen osa otettiin käyttöön vuonna 1977 ja biologinen osa, ilmastettu lammikko, alkuvuodesta 1979. Varsinainen biologinen toiminta ilmastoidussa lammikossa alkoi vasta sulfaattiselluloosatehtaan käynnistyttyä heinäkuussa 1980. Prosessivesien käsittely jäteveden puhdistamolla on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Prosessivesien käsittely jäteveden puhdistamolla.

3. KOEASETELMA JA MENETELMÄT

3.1 YLEISTÄ

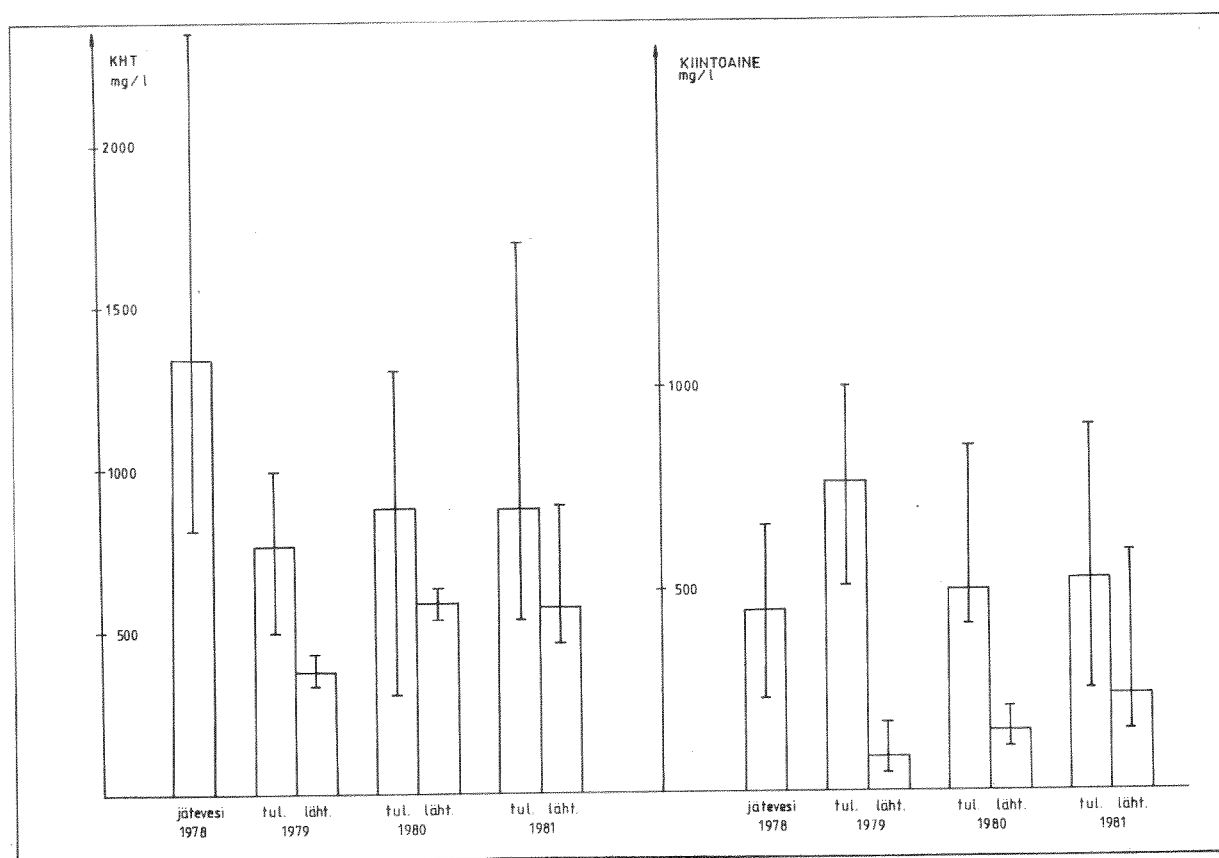
Biologisia testejä eri eliöryhmillä; bakteereilla, levillä, vesisiiralla ja kaloilla tehtiin neljänä vuonna. Ensimmäisen testikerran aikana vuonna 1978 vain jätevedenpuhdistamon mekaaninen osa oli toiminnassa ja sulfiittiselluloosan valmistus oli vielä käynnissä. Puhdistamon biologinen osa otettiin käyttöön juuri ennen seuraavan koejakson alkua v. 1979. Tällöin sulfiittiselluloosatehtaan toiminta oli jo lopetettu, minkä vuoksi puhdistamon kuormitus ja virtaama olivat vain noin puolet mitoitusarvioista ja ilmastettu lammikko toimi näin ollen varsin heikosti. Tämän koejakson ajan kuorimon ja kemimekaanisen masatehtaan jätevedet johdettiin puhdistamon ohi vesistöön. Kaksi viimeistä testikertaa kuvaavat tilannetta, jolloin jäteveden puhdistamo oli käynnissä ja uusi sulfaattiselluloosatehdas toiminnassa. Taulukossa 3 on esitetty eräitä tuotanto- ja jätevesitietoja koejakson ajalta.

Testeissä käytettyjen jätevesien laatu on vaihdellut varsin paljon eri vuosina ja myös testien aikana. Ensimmäisenä testivuonna jäteveden kemiallinen hapentarve oli suuri ja pH sekä kiintoainepitoisuus olivat muihin testikertoihin verrattuna pieniä. Seuraavana vuonna sekä puhdistamolle tulevan että sieltä lähtevän jäteveden pH oli selvästi edellisvuotta korkeampi ja tulevan jäteveden kemiallinen hapentarve pienempi. Kahtena viimeisenä testivuonna jätevesien johtokyky ja puhdistamolta lähtevän jäteveden kemiallinen hapentarve sekä kiintoainepitoisuus kohosivat vuoden 1979 arvoja suuremmiksi (kuva 2, taulukko 4). Vuosina 1980-81 puhdistamolle tuleva jätevesi otettiin vasta neutraloinnin jälkeen, toisin kuin kahtena edellisena vuonna, joten testissä käytettyjen jätevesien pH-arvot olivat taulukossa esitettyjä tasaisempia vaihdellen 5,5 - 6,5.

Taulukko 3. Tuotanto- ja jätevesitietoja testien ajalta.

	1978	1979	1980	1981		
	19.9.- 17.10.	26,10.- 14.11.	10.11.- 3.12.	11.11.- 11.12.	11.11.- 14.11.	24.11.- 27.11.
TUOTANTO						
termohierre	8 260	8 472	11 099	13 318	1 674	1 642
hieke	13 472	11 080	11 013	13 506	1 639	1 443
sellu	5 600*	0	5 153	10 172	1 573	991
käytetty kloori kg/t		0	60	35,1	43,5	0
JÄTEVEDET x 1000m/d						
yhteensä	60,6	21,5	52,4	61,8	62,1	61,1
sellu		0	20*	20*	20*	20*
paperitehdas 1	7,9	0	11,8	8,9	14,1	7,6
termohierre ja paperitehdas 2	4,6	4,3	4,3	4,3	4,8	4,3

* arvio



Kuva 2. Jätevesien kemiallisen hapentarpeen ($\text{mg O}_2/\text{l}$) ja kiintoainepitoisuuksien (mg/l) keskiarvot ja vaihteluvälit eri testikerroilla (vuorokauden kokoomanäytteet).

Taulukko 4. Jätevesien laatu kokeiden aikana (vuorokauden kokomääräytteet).

	pH		χ_{25} mS/m		KHT mg O ₂ /l		kiintoaine mg/l		hartsihapot kok.N		kok.P /ug/l
	\bar{X}	min max	\bar{X}	min max	\bar{X}	min max	\bar{X}	min max	mg/l	ug/l	
<u>1978</u>											
19.9.-16.10.	4,60	3,4 6,0	67,2	54 87	1373	810 980	441	230 660	4100		850 - 2100
<u>1979</u>											
26.10.-14.11.											
tuleva	7,15	5,3 9,4	35,1	26 58	756	490 980	759	510 1000	7,5*	6300*,11000	150*, 980
lähtevä	6,71	6,2 6,9	41,0	37 56	375	330 430	82	46 170	20	3600 , 3600	110 , 870
<u>1980</u>											
10.11.-2.12.											11
tuleva	5,08	2,7 7,6	166,0	100 280	874	300 1300	592	410 850	5,0*	10000*	1200*
lähtevä	7,30	7,2 7,5	167,0	130 200	580	530 660	149	110 210	1,3	8700	820
<u>1981</u>											
14.11.-14.12.											
tuleva	4,04	2,3 6,3	260,0	160 500	865	560 1700	521	250 900	4,2	3300*, 4800	820*, 1900
lähtevä	6,70	5,6 7,0	228,0	190 280	571	460 880	235	150 590	2,3	5200 , 8200	1400 , 1700

* kertanäytteet

Jätevesianalyysien tulokset perustuvat pääosin vuorokauden kokoomänäytteisiin, joten ne eivät kuvaa sellaisenaan kertänäytteinä testiä varten otettuja jätevesiä, joiden laatu lienee vaihdellut huomattavasti enemmän kuin analyysitulokset osoittavat. Puhdistamolle tuleva ja sieltä lähtevä jätevesi on kalojen lyhytaikaistestiä ja bakteerien glukosinotto-testiä lukuunottamatta otettu samanaikaisesti, joten puhdistamon viipymää (5 - 7 vrk vuosina 1980 ja -81, 13 vrk vuonna 1979) ei ole huomioitu.

Taulukko 5. Laimennusveden (Unnukan) laatu koejaksojen aikana.

	pH	$\gamma_{mS/7m}^{25}$	alk. mval/l	KHT mg O ₂ /l	kok.p μg/l	kok.N μg/l
4.10.1978	7,0	4,8	0,15	7,3	6	350
29.10.1979	7,3	4,9	0,15	7,3	8	470
6.11.1980	7,2	5,0	0,15	7,6	13	510
16.11.1981	7,1	5,4		9,0	6	510

Puunjalostusteollisuuden jätevesien tärkeimmät myrkylliset aineryhmät ovat hartsi- ja rasvahapot, klooratut fenolit, diterpeenialkoholit ja -aldehydit, klooratut ligniiniyhdisteet, epäorgaaniset hapot tai emäkset, kloori-, hypokloriitti- ja klooridioksidijäänteet sekä epäorgaaniset ja orgaaniset sulfidit (SITRA 1970). Näistä aineista tutkittiin hartsihappojen ja kloorattujen fenolien määriä koevesissä ja niiden kertymistä kaloihin. Muutoin selvitettiin lähinnä jätevesien kokonaisvaikutusta tutkittaviin eliöryhmiin.

Koevesien jätevesipitoisuudet valittiin suhteessa A. Ahlström Osakeyhtiön tehtaiden jätevesien laimentumiseen vastaanottavassa vesistöissä, jossa niiden osuus Unnukasta purkautuvan veden keskivirtaamasta on keskimäärin 0,5 %. Testien aikaisista jätevesimääristä laskettuna jätevedet muodostivat 0,2 - 1,3 % kokonaisvirtaamasta. Laimennusvetenä ja vertailuna testeissä käytettiin Unnukan vettä, joka otettiin jäteveden puhdistamolle tulevasta putkesta ja jonka laatu ei juuri vaihdellut koejaksojen aikana (taulukko 5).

Tutkimuksessa käytetyt vesianalyysimenetelmät ovat Erkomaa ym. (1977) mukaiset paitsi vuoden 1981 hartsihappo- ja kloorifenolimääritykset, jotka on tehty Holmbomin (1980) mukaan.

3.2 BAKTEERITESTIT

Jätevesien myrkyllisyyttä tutkittiin bakteeritesteillä, joiden järjestelyt on esitetty taulukossa 6. Vuonna 1978 testibakteeri eristettiin asumajätevedestä eikä sitä identifioitu. Silloin testi tehtiin käsittelemättömällä jätevedellä kaksi kertaa. Seuraavina vuosina koeorganismina käytettiin identifioimatonta koliformia bakteeria (1979) tai *Escherichia coli*-bakteeria (1980, -81). THG-agarmaljalta siirrostettiin vuorokauden ikäisiä kolipesäkkeitä, joista tehtiin laimennusveteen opalisoiva suspensio, jota inkuboitiin kaksi tuntia 37 °C lämpötilassa. Puhdistamolle tulevasta ja sieltä lähtevästä jätevedestä tehtiin laimennokset Unnukan veteen, jota käytettiin myös kontrollina. Kutakin jätevesipitoisuutta oli kaksi rinnakkaista laimennosta.

Taulukko 6. Bakteeritestien koejärjestelyt eri vuosina.

	1978	1979	1980	1981
<u>Koeorganismi</u>	ei identifioitu, asumajätevedestä Les endon agar - alustalla	koliformi Savon Sellu Oy:n jäte- vedestä	<u>E.coli</u> Kuopion e- lintarvike- laboratorio	<u>E.coli</u> Kuopion elin- tarvikelabo- ratorio
<u>Bakteerisuspen- sion tiheys</u> x 10 ⁸ /ml	0,1	26	7,4	3,6
<u>Jätevedet</u>		tu, lä	neutr,tu,lä	neutr,tu,lä
ottopäivä	4.10. 17.10.	29.10.	24.11.	18.11.
laimennokset	0,1, 0,2, 0,5	0,2 , 0,5	0,2 , 0,5	0,2 , 0,5
%	1, 2, 10	2, 10	2, 10	2, 10
<u>Inkubointi- aika</u> vrk	1, 4, 5	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
t °C	4, 20	4, 20	4, 20	4, 20
<u>Testivedet</u>	4.10. 17.10.			
laimennusvesi				
pH	7,0 7,0	7,3	7,2	7,1
γ ₂₅ mS/m	4,8 4,8	4,9	5,0	5,3
KHT mgO ₂ /l	7,3 7,5	7,3	7,6	9,3
kok.P /ug/l	6	8	13	38
kok.N /ug/l	350 490	470	510	550
jätevedet	4.10. 17.10.	tu lä	tu lä	tu lä
pH	4,6 4,8	8,8 6,8	4,3 7,3	9,6 6,8
γ ₂₅ mS/m	68,0 75,0	29,8 33,8	180 140	109 175
kiintoaine mg/l	430 510	800 58	450 170	630 240
KHT mgO ₂ /l	2300 980	940 280	880 630	560 510
kok.P /ug/l	1100	980 870		820 1700
kok.N /ug/l		11000 3600		4300 8200

* vuorokauden kokoomanäyte ennen neutralointia

Bakteerisuspensiota siirrettiin 1 ml jokaiseen laimennokseen ja näytteitä inkuboitiin foliolla suljetuissa lasipulloissa pimeässä kahdessa eri lämpötilassa 1, 2 ja 3 vrk (v. 1978 1,4 ja 5 vrk). Bakteerisuspension ja testivesien bakteerien tiheydet määritettiin kalvosuodatusmenetelmällä (standardi SFS 3950) käyttäen inkuboinnissa Les endon agar -alustaa (taulukko 6).

Tehdyssä laajuudessa testin hankaluutena on ollut suodatettavien laimennosten arviointi sopiviksi, jotta pesäkkeitä olisi laskennan kannalta luotettava määrä (vrt. Kohonen 1971). Lisäksi peräkkäisten ja rinnakkaisten laimennosten bakteeritiheyksien välillä on ajoittain ollut melko suuria eroja.

3.3 BAKTEERIEN GLUKOOSINOTTO-TESTI

Jätevesien vaikutusta vesistön bakteriaktiivisuuteen tutkittiin vuonna 1981 bakteerien glukoosinoton perusteella, jota mitattiin ³H-leimatus glukoosin avulla yhden lisäyksen luonnontasomenetelmällä (vrt. Talsi 1981, Kuparinen 1981). Koe tehtiin kaksi kertaa sekä puhdistamolle tulevalla että sieltä lähtevällä jätevedellä, jotka otettiin 3 vrk:n kokoomanäytteinä siten, että puhdistamolta lähtevän jäteveden näytteet otettiin viikko puhdistamolle tulevan jäteveden näytteiden oton jälkeen. Näin otettiin huomioon puhdistamon viipymä.

Jätevettä tai sen laimennosta lisättiin Unnukan veteen (40 ml näyte) 10 ml siten, että jätevesipitoisuudeksi tuli 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % ja 20 % sekä 0 % (kontrolli). Näytteitä inkuboitiin kaksi tuntia 20 °C:ssa, niihin lisättiin 0,5 ml 40 % formaliinia ja ne suodatettiin 0,2 µm:n suodatinkalvoille. Kalvot poltettiin polttolaitteessa, jossa bakteerisoluihin peräisin oleva ³H₂O kerättiin PCS-tuikeluokseen. Näytteiden radioaktiivisuus mitattiin nestetuikelaskimella ja tuloksista laskettiin glukoosin kiertonopeus 1/T, joka kuvastaa bakteerien aktiivisuutta (vrt. Talsi, 1981).

3.4 LEVÄTESTIT

Jätevesien vaikutusta kasviplanktoniin tutkittiin levätesteillä, joissa koeorganismeina käytetyt levät otettiin joka vuosi haavilla (tiheys 40 µm) Unnukalta. Samalla otettiin myös levien määrittämiseksi näytteet, jotka säilöttiin 35 %:lla formaliinilla. Vuosina 1978 ja 1979 levät siirrettiin näytteenottopäivinä koevesiin (1 ml leväsuspensiota/100ml), mutta seuraavina vuosina myöhäisen koeajankohdan vuoksi levät otettiin jo aikaisemmin ja niitä inkuboitiin huoneenlämmössä ennen koevesiin lisäämistä 4 vrk vuonna 1980 ja 13 vrk vuonna 1981, jolloin leväsuspensioon lisättiin myös pieniä määriä ravinteita.

Testivesinä käytettiin jätevesien laimennoksia, kaksi rinnakkaista näytettä kutakin, jotka tehtiin Unnukan veteen. Vuonna 1978 näytteitä inkuboitiin levien ja radiohiilen lisäyksen jälkeen vakiovalossa ja -lämpötilassa 1 tai 4 vuorokautta, jonka jälkeen niistä määritettiin perustuotantokyky. Kontrollina oli Unnukan vesi (taulukko 7).

Seuraavina vuosina testit tehtiin Unnukan vedellä sekä tehtaiden puhdistamolle tulevan ja sieltä lähtevän jäteveden laimennoksilla,

Taulukko 7. Levätestien koejärjestelyt eri vuosina.

	1978	1979	1980	1981
<u>Leväsuspensio</u>				
runsaimmat lajit: <u>Melosira islandica</u> , <u>M. italica</u> var <u>tenuissima</u> , <u>Asterionella formosa</u> , <u>Tabellaria fenestrata</u> , <u>Fragilaria crotonensis</u> , <u>Aphanothece stagnina</u> <u>Closterium</u> sp. <u>Coelosphaerium</u> <u>Botryococcus braunii</u> <u>naegelianum</u> <u>Anabaena</u> sp. <u>Microcystis</u> sp.				
ottopäivä	17.10.	29.10.	6.11.	3.11.
<u>Jätevedet</u>		tu,lä	neutr.tu,lä	neutr.tu, lä
ottopäivä	21.9,4.10,17.10.	29.10.	10.11.	16.11.
laimennokset	0,1, 0,2, 0,5,	0,2, 0,5	0,2, 0,5	0,2, 0,5
%	1, 2, 5, 10	2, 10	2, 10	2, 10
<u>Testivedet</u>	4.10., 17.10.			
laimennusvesi				
pH	7,0	7,0	7,3	6,9
χ_{25} mS/m	4,3	4,8	4,9	5,4
KHT mgO ₂ /l	7,3	7,5	7,3	9,0
alk.mval/l	0,16	0,15	0,16	
kok.P μ g/l	6	8	13	6
kok.N μ g/l	350	490	470	506
<u>jätevedet</u>		tu lä	tu ₊ lä ₊	tu lä
pH	4,6	4,8	8,8 6,8	8,9 6,8
χ_{25} mS/m	68,0	75,0	29,8 33,8	118 188
kiintoaine mg/l	430	510	800 58	530 250
KHT mgO ₂ /l	2300	980	940 280	600 510
kok.P μ g/l		1100	980 870	1600 1600
kok.N μ g/l		11000	3600	3300 7000
inkubointiaika vrk		1, 2, 3		1, 2, 3
<u>Perustuotantokyky</u>				
t °C	20	20	20	20
valaistus lux	5000	5000	3000	3000
aika vrk	1,4	1,4	1	1
	(21.9 1 vrk)			

+ vuorokauden kokoomanäytteet (ennen neutralointia)

joita inkuboitiin levälisäyksen jälkeen avoimissa 2 l lasipulloissa huoneenlämmössä keinovalossa (noin 800 lux) 1, 2 tai 3 vuorokautta, jonka jälkeen niistä otettiin näytteet perustuo-
tantokyvyn määrittystä varten, joka tehtiin radiohiilimenetelmällä standardin (SFS 3049) mukaisesti. Tuloksista laskettiin levien hiilensitomiskyky milligrammoina hiiltä/vesi m³/vrk. Testeissä käytetyt levät määritettiin säilötyistä näytteistä vuonna 1982. Levälajisto oli runsaimpien lajien osalta eri vuosina varsin samanlainen; se koostui pääosin suurikokoisista piilevistä sekä muutamasta sini- ja viherlevälajista (taulukko 7).

3.5 POHJAEÄLÄINTESTIT

Kolmen ensimmäisen koejakson aikana kokeiltiin myös pohjaeläintestejä. Koeorganismina oli vesisiira (Asellus aquaticus), jota kerättiin testejä varten Unnukan rannoilta. Vuosina 1978 ja 1979 koevedet johdettiin kala-akvaarioista, jolloin testiastioissa veden viipymä oli hyvin pieni, alle 1 h, ja niihin kertyi runsaasti orgaanista ainesta. Vuonna 1979 edellisvuonna käytetyt lasipurkit vaihdettiin akryylimuovisiin lokerikkoihin, joiden tilavuus oli noin 4 l. Vuonna 1980 virtaus johdettiin suoraan kalatestien yläaltaista, jolloin veden viipymä saatiin pitemmäksi eikä kala-akvaarioiden veden orgaanista ainesta kertynyt koelokerikkoihin.

Kontrollissa (Unnukan vesi) ja kussakin jätevesilaimennoksessa oli 10 - 17 vesisiiraa eri koejaksojen aikana. Kahtena ensimmäisenä koevuotena veden nopean virtauksen vuoksi osa koe-eläimistä katosi poistuvan veden mukana. Vuonna 1980 kokeen järjestelyt onnistuivat paremmin, mutta siirojen kuolleisuuden (muutama yksilö/lokerikko) perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä jätevesien vaikutuksista ko. eläimiin. Vesisiiran on todettu yleensä kestävän hyvin varsin likaantuneitakin vesiä, jos sille on tarjolla ravinnoksi sopivaa orgaanista ainesta (Holdich ja Tolba 1981).

Koe-eläimiksi kerättiin vuonna 1978 myös kotiloita (Lymnea peregra), mutta ilmenneen kannibalismin vuoksi niiden käytöstä luovuttiin.

3.6 KALATESTIT

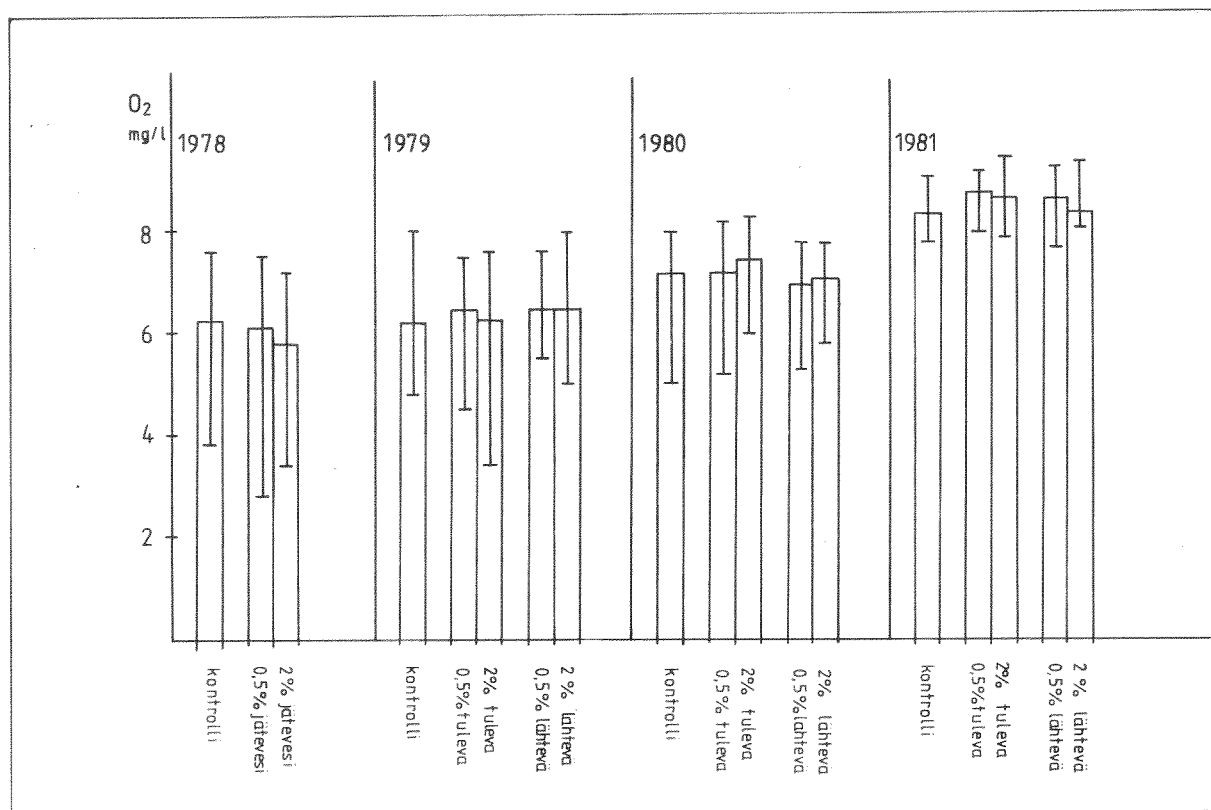
3.61 Pitkäaikaistestit

Kalatesteissä altistettiin kirjolohia tilavuudeltaan 100 l lasiakvaarioissa 0,5 % ja 2 % jätevesilaimennoksissa sekä Unnukan vedessä 3 - 5 viikon ajan. Akvaarioissa vesi vaihtui 3 - 5 kertaa vuorokaudessa. Jätevesilaimennokset tehtiin Unnukan veteen ja jätevedet otettiin kertänäytteinä puhdistamolle tulevasta ja sieltä lähtevästä jätevedestä (vuonna 1978 vain tulevasta jätevedestä). Vuosina 1978 ja 1979 tuleva jätevesi otettiin ennen neutralointia ja seuraavina vuosina sen jälkeen.

Akvaariovesistä mitattiin päivittäin lämpötila, happipitoisuus, pH sekä johtokyky ja tehtiin laajempi analyysi kaksi tai kolme kertaa koejaksojen aikana. Veden laatu eri testikerroilla ei vaihdellut kovinkaan paljon jätevesien laadun vaihteluista huolimatta. Selvin muutos oli tehokkaampien ilmastimien aiheuttama

Taulukko 8. Akvaariovesien laatu pitkäaikaistesteissä.

Aika	Jätevedet ja laimennokset	Virtaus l/vrk	Viipy- mä h	t °C		pH		25mS/m		O ₂ mg/l min max	KHT mg O ₂ /l	Kiintoaine mg/l	kck.F µg/l	kck.N µg/l					
				min	max	min	max	min	max										
1978	Ummukan vesi	300-500	5-8	15,0	18,5	6,6	7,3	4,9	7,4	3,8	7,6	8,8,	11	2,0	120,	250	610,	2400	
19.9.-	0,5 % jätevesi			15,0	19,0	6,5	7,2	5,4	8,2	2,8	7,5	15,	17	2,7	100,	210	900,	2100	
17.10.	2 % jätevesi			15,0	18,5	6,4	7,1	6,2	9,0	3,4	7,2	19,	40	14,0	150,	290	1300,	1600	
1979	Ummukan vesi	300-500	5-8	12,0	17,4	6,4	6,8	5,0	6,5	4,8	8,0	12,	8,7	15,0	750,	55	2300,	780	
26.10.-	0,5 % tuieva																		
14.11.	2 % tuleva			13,8	17,3	6,4	6,7	4,8	6,4	4,5	7,5	14,	12	8,9,	3,6	330,	44	1800,	1000
				13,1	17,6	6,2	6,6	4,6	6,5	3,4	7,6	31,	13	30,	7,2	460,	74	4600,	1400
	0,5 % lähtevä			11,5	17,4	6,5	6,8	4,7	6,3	5,5	7,6	10,	10	5,1	260,	85	1400,	1000	
	2 % lähtevä			13,4	17,1	6,5	6,9	4,9	6,0	5,0	8,0	15,	13	18,	4,6	310,	48	1700,	960
1980	Ummukan vesi	300-700	5-8	12,4	15,9	6,1	6,5	5,4	7,7	5,2	8,0	8,7,	9,8	3,0	83,	130	1200,	1400	
10.11.-																			
3.12.	0,5 % tuleva, neutr.			11,1	15,4	6,1	6,5	5,6	9,0	5,2	8,2	14,	12	5,1,	7,1	56,	110	1100,	1200
	2 % tuleva, neutr.			12,1	15,3	5,7	6,8	6,4	12,9	6,0	8,3	29,	12	13	87,	110	1200,	1500	
	0,5 % lähtevä			11,8	15,2	6,1	6,5	6,1	10,5	5,3	7,9	11,	13	3,2,	4,9	71,	130	1300,	1200
	2 % lähtevä			12,1	15,8	6,1	6,5	6,4	10,0	5,8	8,0	20,	20	6,2,	6,8	60,	120	1200,	1700
1981	Ummukan vesi	300-450	5-8	13,0	16,7	6,3	6,6	4,4	5,2	7,8	9,1	11,	14	1,2,	3,1	51,	210	860,	1500
16.11.-																			
11.12.	0,5 % tuleva, neutr.			12,4	16,1	6,3	6,7	5,0	6,1	8,0	9,2	13,	16	3,8,	5,6	24,	160	740,	1100
	2 % tuleva, neutr.			13,8	16,5	6,3	6,8	5,0	11,0	7,9	9,5	19,	30	10,	20	81,	330	1100,	1600
	0,5 % lähtevä			12,8	16,2	6,3	6,7	5,0	6,4	7,7	9,3	12,	16	4,2,	5,4	35,	180	690,	1400
	2 % lähtevä			13,4	16,0	6,3	6,6	5,0	9,3	8,1	9,4	18,	20	5,8,	9,0	77,	170	1000,	1400

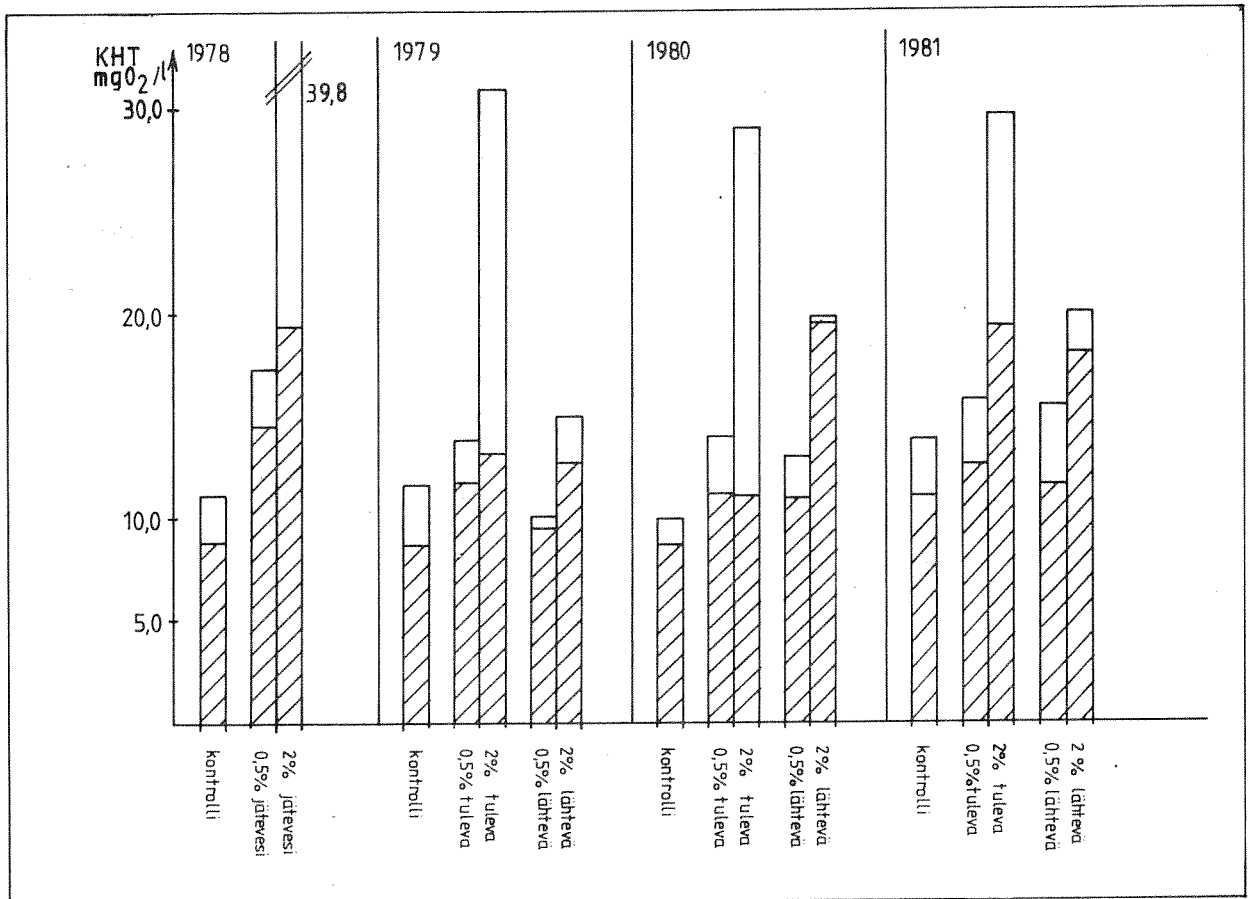


Kuva 3. Akvaariovesien happipitoisuus (mg/l) kalojen pitkäaikaistesteissä eri vuosina, päivittäisten mittausten keskiarvot ja vaihteluvälit.

happipitoisuuksien kohoaminen kahtena viimeisenä koejaksona verrattuna edellisiin (kuva 3). Testikertojen aikana selvimmät erot akvaariovesissä olivat 2 % laimennosten suuremmat kiintoainepitoisuudet ja suurempi kemiallinen hapentarve kuin muissa laimennoksissa ja kontrollissa (kuva 4, taulukko 8). Väkevämmissä laimennoksissa vesi oli myös selvästi sameampaa kuin muissa. Kontrolliakvaarioissa veden kiintoainepitoisuus ja sameus olivat pienempiä kuin 0,5 % jätvesilaimennoksissa. Akvaariovesien laatuun vaikuttivat myös kalojen ruokinta ja ulosteet, erityisesti ne tasoittivat vesien ravinnepitoisuuksia.

Kalanviljelylaitokselta tuotuja kirjolohia totutettiin akvaario-oloihin muutama vuorokausi ennen jätvesien lisäämistä. Kaloja ruokittiin kuivarehulla ja akvaarioista poistettiin ulosteita ym. ainesta kerran tai kaksi kertaa vuorokaudessa. Kalat olivat jokaisen koejakson aikana eri kokoisia ja vuosien 1979 ja 1980 koejaksoissa käytetyt kalat olivat suuria suhteessa akvaarioiden kokoon.

Kalat tottuivat sängen hyvin akvaario-oloihin lukuunottamatta viimeistä testikertaa, jolloin ne olivat selvästi levottomampia ja söivät vähemmän kuin aiempien koejaksojen aikana. Yleensä kalat olivat aktiivisempia ja reagoivat ärsykkeisiin,



Kuva 4. Akvaariovesien kemiallinen hapentarve ($\text{mg O}_2/\text{l}$) kalojen pitkäaikaistesteissä eri vuosina (min, max).

esimerkiksi valaistuksen muutoksiin tai ihmisten liikkumiseen koehuoneessa herkemmin kontrollissa ja 0,5 % laimennoksissa kuin 2 % jätvesilaimennoksissa. Kalat saattoivat myös ahdistella toisiaan akvaarioissa jopa niin, että muutama pieni kala kuoli akvaarioon kokeiden aikana sen vuoksi. Lisäksi jokaisen koejakson aikana akvaarioista hyppäsi tai niihin kuoli yksittäisiä kaloja osittain äkillisen happipitoisuuden vähenemisen osittain muiden, selvittämättömien syiden johdosta. Koejärjestelyt on esitetty yksityiskohtaisesti taulukossa 9.

Akvaariokokeissa pyrittiin saavuttamaan mahdollisimman tasaiset olosuhteet. Kuitenkin jätvesien laadun muutokset ja laitteiden toimintahäiriöt aiheuttivat toisinaan äkillisiä koeolojen muutoksia. Erityisesti ensimmäisten koejaksojen aikana happipitoisuus vaihteli suuresti jätvesien voimakkaan hapenkulutuksen ja pienitehoisten ilmastimien vuoksi.

Koejakson lopulla kalojen ruokinta lopetettiin muutamia vuorokausia ennen näytteenottoa ja niitä pidettiin totutuskamioissa (muoviputki, jonka kumpikin pää on suljettu verkolla)

vuorokausi akvaariovedessä ennen fysiologisten näytteiden ottoa.

Näytteenottoa varten kalat päästettiin varovasti totutuskammioista ja tainnutettiin iskulla päähän. Verinäyte otettiin kahtena ensimmäisenä vuonna ductus Cuvierista läheltä sydäntä ja jälkimmäisinä vuosina pyrstösuonesta injektioneulalla ruiskuun, joka oli käsitelty nestemäisellä hepariinilla veren hyytymisen estämiseksi. Hematokriitti ja leukokriitti määrätettiin välittömästi. Samoin heti otettiin verinäyte reagensseihin hemoglobiinin määrittämistä varten. Jäljellä olleesta verestä erotettiin sentrifuugilla plasma, joka säilöttiin nestetyppeen myöhempiä analyysejä varten. Kala avattiin ja eri elimet irrotettiin ja paloittelettiin eri analyysejä varten ja säilöttiin nestetyppeen. Sappinäyte otettiin sappirakosta injektioneulalla ruiskuun ja säilöttiin nestetyppeen. Näytteenoton jälkeen kalat pakastettiin haju- ja makuanalyysejä varten. Kliiniskemialliset analyysit tehtiin Oikarin ym. (1979) sekä plasman ja sapen hartsihappo- ja kloorifenolianaalyysejä Oikarin ym. (1980) mukaan.

Vuosina 1978, 1980 ja 1981 jokaisesta kalaryhmästä tehtiin makutestit. Vuonna 1978 Unnukalta ja Haukivedeltä pyydystettiin särkiä, joita pidettiin vuorokausi vesistössä totutuskammioissa, minkä jälkeen niistä otettiin samat fysiologiset näytteet kuin akvaariokokeen kalasta. Niistä tehtiin myös makutestit. Vuonna 1979 pyydystettiin samoilta paikoilta haukia ja särkiä makutestejä varten.

3.62 M a k u t e s t i t

Makutestit tehtiin Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen elintarvikelaboratoriossa siten, että pakastettujen näytteiden annettiin sulaa hitaasti $+4^{\circ}\text{C}$:ssa, minkä jälkeen ne puhdistettiin. Näytteet arvioitiin sekä raakoina että keitettynä. Näytteet keitettiin höyryssä alumiinifolioon käärittynä ilman suola- tai muuta lisäystä. Arviointiin osallistui kuusi kalojen makutesteihin harjaantunutta henkilöä. Arvioinnissa käytettiin pistemenetelmää, jossa kalan haju raakana ja keitettynä arvioitiin pistein 0 - 4 ja maku keitettynä pistein 0 - 10. Vuosina 1978, 1979 ja 1980 arvioitiin myös kalan ulkonäkö raakana ja keitettynä pistein 0 - 2. Annetuista pisteistä laskettiin keskiarvot. Maun asteikossa 5 tai sitä alempi pistemäärä merkitsee, että näyte katsotaan selvästi havaittavan vieraan maun perusteella ihmisravinnoksi kelpaamattomaksi. Arvioijien oli kuvailtava havaitsemansa virrehajut ja -maut mahdollisimman tarkasti (vrt. Kuusi, 1973).

3.63 L y h y t a i k a i s t e s t i

Jätevesien myrkyllistä vaikutusta tutkittiin vuonna 1981 staat-
tisella LC 50 -testillä, jolla pyrittiin selvittämään sitä jätevesipitoisuutta, jossa puolet koe-eliöistä kuolee neljän vuorokauden aikana. Koekaloina olivat 1-kesäiset kirjoloheet (paino n. 5 kg). Koeakvaarioiden, joiden tilavuus oli 50 l, vettä ei vaihdettu kokeen aikana. Testi tehtiin kaksi kertaa sekä tulevalla että lähtevällä jätevedellä, jotka otettiin kolmen vuorokauden kokoomänäytteinä siten, että lähtevä jätevesi otettiin aina noin viikkoa myöhemmin kuin tuleva jätevesi. Näin puhdistamon viipymä pyrittiin ottamaan huomioon.

Tuleva jätevesi neutraloitiin ennen koetta ja kontrolli-

Taulukko 9. Pitkäaikaistestien järjestelyistä vuosina 1978 - 1981.

Aika	Jätevedet ja laimennokset	K a l a t		Lukumäärä akvaari- ossa kokeen alussa	Lopussa	Kokeen kesto vrk	Muita huomioita
		ikä	paino g X-S				
1978 19.9-17.10.	Unnukan vesi 0,5 % jätevesi 2 % jätevesi ennen mekaanista puhdistusta	1+	60 ⁺ ₋₁₇ 65 ⁺ ₋₂₃ 67 ⁺ ₋₂₂	10 11 10	10 11 10	29	Kalat söivät huonoiten kontrolliakvaariossa ja olivat levottomampia kuin muissa
1979 26.10-14.11.	Unnukan vesi 0,5 % tuleva 2 % tuleva 0,5 % lähtevä 2 % lähtevä	1+	197 ⁺ ₋₄₁ 165 ⁺ ₋₃₅ 165 ⁺ ₋₁₈ 221 ⁺ ₋₅₇ 179 ⁺ ₋₄₄	8 8 8 8 8	7 7 7 8 8	20	Kaloja totutettiin 4 vrk, kalat söivät huonoiten 2 % jätevesissä ja olivat vähemmän aktiivisia
1980 10.11-3.12.	Unnukan vesi 0,5 % tuleva, neutr. 2 % tuleva, neutr. 0,5 % lähtevä 2 % lähtevä	1+	152 ⁺ ₋₃₃ 173 ⁺ ₋₃₅ 177 ⁺ ₋₃₈ 178 ⁺ ₋₄₂ 199 ⁺ ₋₃₅	10 10 10 10 10	10 9 10 10 10	23	Kaloja totutettiin akvaa- rio-oloihin 4 vrk, muuta- massa kalassa ihovaurioi- ta, kontrollissa arempia, ei eroja ravinnon käytössä
1981 16.11-11.12.	Unnukan vesi 0,5 % tuleva, neutr. 2 % tuleva, neutr. 0,5 % lähtevä 2 % lähtevä	0+	30 ⁺ ₋₁₁ 28 ⁺ ₋₈ 28 ⁺ ₋₇ 24 ⁺ ₋₈ 27 ⁺ ₋₉	10 11 11 11 11	8 9 8 6 11	25	Kaloja totutettiin 6 vrk, kalat arempia ja levotto- mampia kontrollissa ja 0,5 % jätevesilaimennoksis- sa, ei eroja ravinnon käy- tössä

na sekä laimennusvetenä oli Unnukan vesi. Toisessa koesarjassa tehtiin kaksi laimennosta myös suodatetusta (suotimen tiheys 100 mesh) puhdistamolle tulevasta jätevedestä.

Kussakin koelaimennoksessa oli 10 kalaa, jotka olivat olleet totutusaltaassa noin viikon ja joita ei ruokittu kokeen aikana. Koevesiä ilmastettiin ja niistä mitattiin päivittäin lämpötila, happipitoisuus ja pH (taulukko 10), jolloin kalat myös laskettiin ja kuolleet poistettiin. Staattisessa testissä koevesien lämpötila nousi sangen korkeaksi ja vesiä oli ilmastettava melko voimakkaasti, mikä aiheutti vaahdon muodostumisen etenkin väkevässä laimennoksissa.

4. T U L O K S E T J A N I I D E N T A R K A S T E L U

4.1 BAKTEERITESTIT

Myrkyllisyystestit bakteereilla tehtiin neljänä vuonna. Kuvis-
sa 5 ja 6 on esitetty bakteerimäärät ja niiden muutokset logaritmeina eri vuosina kummassakin inkubointilämpötilassa eri jätevesilaimennoksissa.

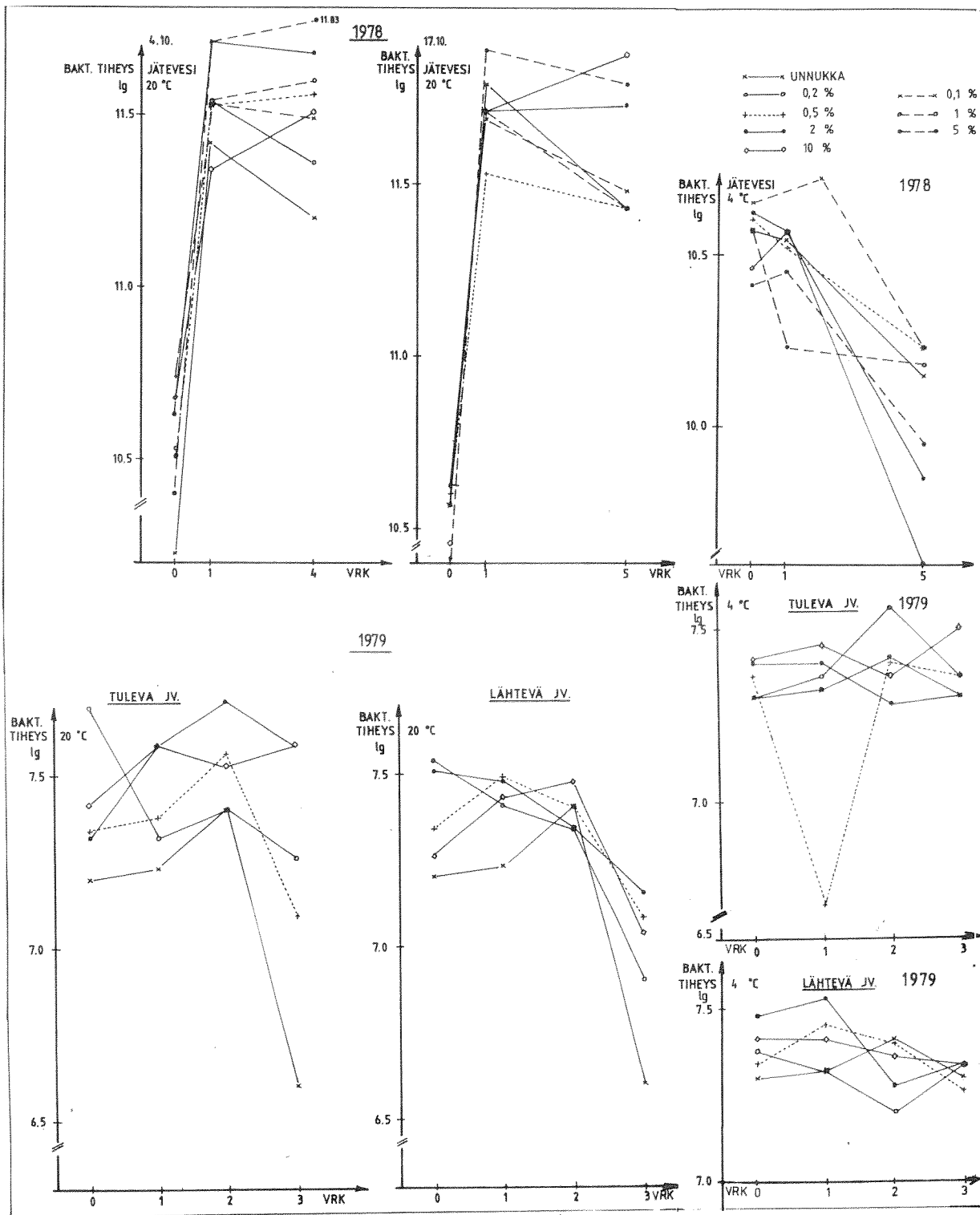
Vuonna 1978 ensimmäisellä koekerralla bakteeritiheydet kasvoivat vuorokauden aikana selvästi (kuva 5), mutta tiheydet pienenevät kahta väkevintä laimennosta lukuunottamatta kokeen loppuun mennessä. Bakteerimäärät kasvoivat eniten 5 % jätevesilaimennoksessa, lähes 30-kertaisesti. Toisella koekerralla (17.10.) testi tehtiin inkuboiden sekä kylmässä 4°C että lämpimässä 20°C. Kylmässä tiheyden muutokset olivat varsin vähäisiä, joskin bakteeritiheydet pienenevät selvästi viiden vuorokauden kuluttua kaikissa laimennoksissa. Lämpimässä tiheyksien muutokset olivat suurempia ja kokeen lopussa bakteeritiheydet laskivat väkevimpä pitoisuuksia lukuunottamatta.

Seuraavana vuonna 1979 testi tehtiin puhdistamolle tulevalla ja sieltä lähtevällä jätevedellä. Tulevan jäteveden laimennoksissa bakteeritiheyksien muutokset kummassakin inkubointilämpötilassa olivat varsin satunnaisia (kuva 5). Kuitenkin kolmannen koovuorokauden aikana bakteeritiheydet pienenevät muissa paitsi 10 % jätevesilaimennoksessa. Lähtevällä jätevedellä tehdyssä testissä bakteeritiheyksien muutokset olivat vielä pienempiä kuin tulevalla jätevedellä, joskin selvä tiheyden lasku kokeen lopussa lämpimässä inkuboitaaessa oli havaittavissa kaikissa laimennoksissa.

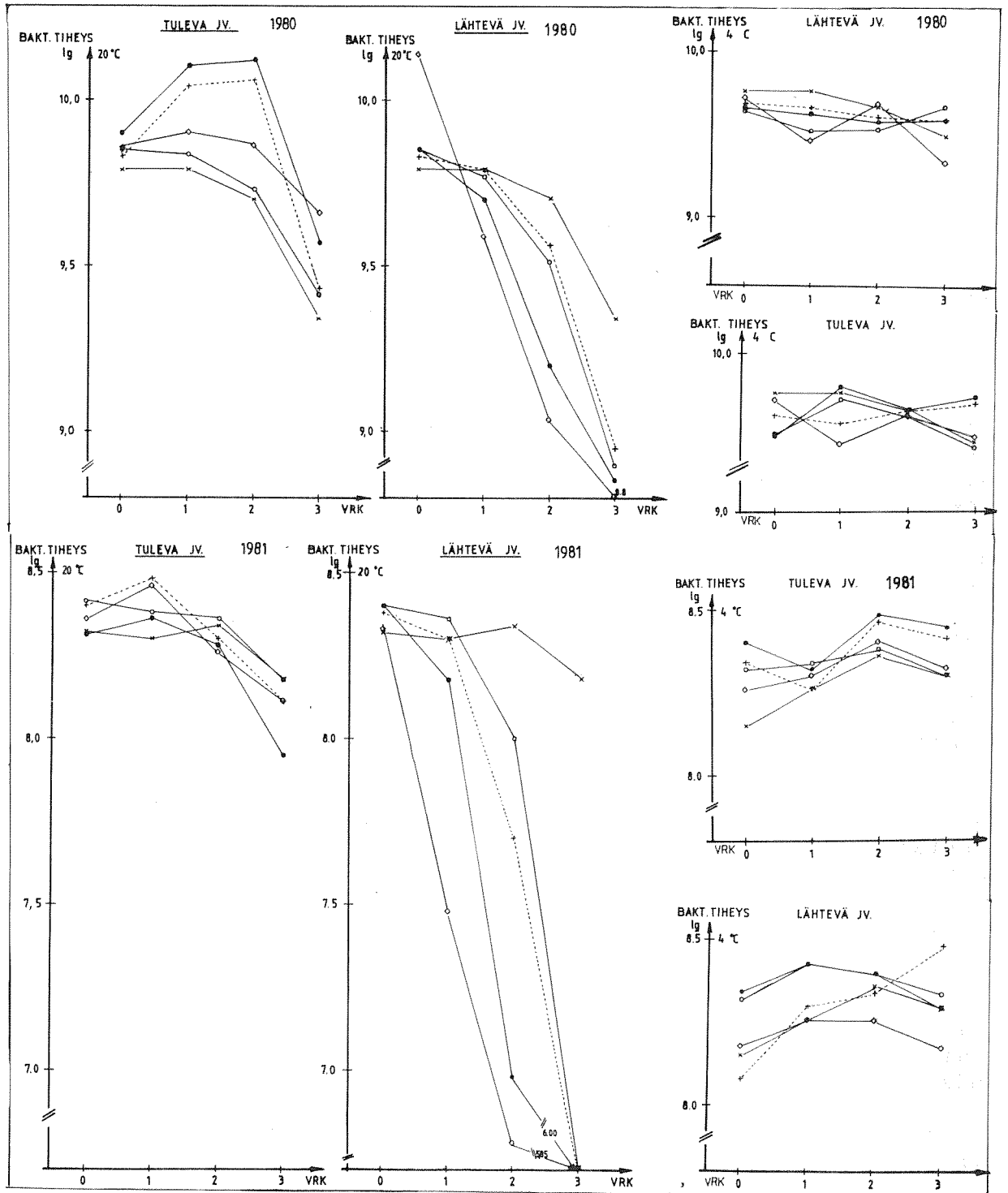
Vuoden 1980 testeissä 4°C inkubointilämpötilassa bakteeritiheyksien muutokset olivat vähäisiä, mutta 20°C:ssa tulevan jäteveden 0,5 % ja 2 % laimennoksissa bakteeritiheydet kasvoivat jonkin verran kahden ensimmäisen vuorokauden aikana, jonka jälkeen ne laskivat, kuten muissakin laimennoksissa (kuva 6). Lähtevän jäteveden väkevimmässä laimennoksissa tiheydet pienenevät selvästi jo kahden ensimmäisen vuorokauden aikana. Myös vuoden 1981 testeissä bakteeritiheyksien muutokset olivat sangen pieniä lukuunottamatta lähtevän jäteveden laimennoksissa havaittua bakteeritiheyksien huomattavaa pienenemistä, joka oli selvintä väkevimmässä laimennoksissa (kuva 6).

Taulukko 10. Lyhytaikaistesti, käytetyt laimennokset ja eräitä koevesien ja käytetyn jäteveden laatua kuvaavia parametrejä.

	laimennokset	O ₂ mg/l		t °C		pH	
		min.	max	min	max	min	max
Tuleva jätevesi	33 %	8,3	9,1	10,0	15,0	6,3	
11.-14.11.	20 %	8,3	9,4	7,8	17,0	6,2	
(neutraloitu)	10 %	1,9	9,4	7,5	17,9	6,1	7,0
	5 %	3,2	9,6	7,1	19,0	6,1	6,8
	kontr.	5,5	10,0	7,0	19,1	6,1	6,8
Lähtevä jätevesi	50 %	6,7	8,5	14,4	19,0	6,9	7,3
18.-21.11.	33 %	7,2	8,6	15,9	20,0	7,0	
	20 %	7,4	9,1	13,2	20,0	7,0	
	10 %	7,4	8,8	16,0	20,0	6,8	6,9
	5 %	7,6	8,7	16,2	20,1	6,6	6,7
	kontr.	7,8	8,8	16,1	20,2	6,5	6,8
Tuleva jätevesi	25 %	6,5	7,9	19,1	22,0	6,8	7,1
24.-27.11.	20 %	6,8	8,1	19,9	22,0	6,8	7,0
(neutraloitu)	10 %	6,4	8,4	19,9	22,0	6,7	6,9
	5 %	6,4	8,0	19,9	21,7	6,3	6,8
	kontr.	7,1	8,3	19,9	22,0	6,7	6,9
	suod.33 %	6,5	7,8	17,1	21,2	6,9	7,2
	" 20 %	4,5	7,8	17,9	21,9	6,5	6,9
Lähtevä jätevesi	40 %	7,3	7,8	17,1	22,1	7,0	7,3
30.11-2.12.	20 %	7,6	8,5	17,9	22,2	6,9	7,2
	10 %	8,0	9,0	18,1	22,1	6,9	7,1
	5 %	7,9	8,8	18,4	22,2	6,8	7,0
	kontr.	8,0	8,4	17,9	22,2	6,5	6,8
jätevedet					kiinto-		
aika	jätevesi	pH	γ	KHT	aine	kok.N	kok.P
			mS/m	mgO ₂ /l	mg/l	μg/l	μg/l
11-14.11.	tuleva	6,4	175	800	780	4 800	1 700
18-21.11.	lähtevä	6,9	171	470	200	5 000	880
24-27.11.	tuleva	7,4	172	660	360	4 600	1 500
30.11-2.12.	lähtevä	6,8	186	450	230	5 400	1 100



Kuva 5. Myrkyllisyystestit bakteereilla. Bakteeritiheydet (lg) vuosina 1978-79.



Kuva 6. Myrkyllisyydestestit bakteereilla. Bakteeritiheydet (lg) vuosina 1980-81.

Myrkyllisyystesteissä suurin bakteeritiheyksien kasvu havaittiin ensimmäisissä v. 1978 tehdyissä testeissä, jolloin koevesissä olivat mukana sulfiittisellutehtaan jätevedet, joissa oli muiden testikertojen koevesiä enemmän orgaanista ainesta. Bakteeritiheyksien kasvu 20°C inkuboinnissa osoittaa koevesien, myös Unnukan veden, sisältäneen bakteereille sopivaa ravintoa. Jätevesien vaikutus näkyy selvimmin kokeen lopulla, jolloin kontrollivedessä ja laimeimmissa jätevesilaimennoksissa bakteeritiheydet pienenevät sopivan ravinnon loppuessa. Samaan aikaan väkevimmissä jätevesilaimennoksissa bakteerimäärät lisääntyivät tai pysyivät ennallaan. Jätevedet eivät inhiboineet bakteerien kasvua lukuunottamatta ensimmäistä testikertaa (4.10.), jolloin väkevin laimennos (10 %) oli koeorganismeille lievästi myrkyllinen, mikä ilmenee koeveden sisältämän ravinnon määrään verrattuna melko vähäisenä bakteeritiheyksien kasvuna.

Seuraavalla testikerralla vuonna 1979, jolloin sellutehdas ei ollut toiminnassa, ja biologinen puhdistamo toimi vajaatehoisesti, bakteeritiheyksien muutokset olivat edellistä testikertaa selvästi pienemmät. Puhdistamolle tuleva ja sieltä lähtevä jätevesi eivät kumpikaan selvästi inhiboineet tai edistäneet bakteerien kasvua. Lähtevän jäteveden laimennoksissa ja kontrollissa bakteeritiheydet tosin laskivat kokeen lopussa sopivan ravinnon vähentyessä.

Vuosien 1980 ja 1981 testikerroilla, jolloin sulfaattiselluloosatehdas oli käynnissä ja koko puhdistamo toiminnassa, myrkyllisyystestien tulokset olivat keskenään hyvin samankaltaisia. Bakteeritiheyksien muutokset tulevan jäteveden laimennoksissa olivat samaa luokkaa kuin vuoden 1979 testeissä, ja siten selvästi pienempiä kuin ensimmäisenä testivuonna. Vuoden 1980 testissä tuleva jätevesi edisti bakteerien kasvua alle 10 % pitoisuuksina, mutta seuraavana vuonna ei voitu havaita eroa sen ja kontrollin välillä. Lähtevä jätevesi oli kumpakin vuonna selvästi myrkyllistä bakteereille, erityisesti tämä ilmeni 10 % laimennoksessa, jossa tiheydet pienenevät huomattavasti jo yhden vuorokauden kuluttua testin alkamisesta. Viimeisen testivuorokauden aikana myös ravinnon väheneminen saattoi pienentää bakteeritiheyksiä.

Tehtaiden ja puhdistamon toiminnan aiheuttamien jäteveden laadun muutosten ohella koevesien laatuun ovat voineet vaikuttaa kertanäyttinä otettujen jätevesien laadun tilapäiset muutokset. On huomattava, että puhdistamolle tuleva ja sieltä lähtevä jätevesi testiä varten on otettu samana päivänä, joten puhdistamon viipymää ei ole otettu huomioon. Lisäksi myrkyllisyystestin tuloksiin ovat saattaneet vaikuttaa koevesien mukana tulleet bakteerit. Erityisesti lähtevässä jätevedessä on ilmastusaltaan tehokkaasti kasvavaa ja jätevesiin sopeutunutta bakteerikantaa, jota ei suodatettu pois kokeisiin käytetyistä jätevesistä, ja jonka vuoksi jäteveden inhiboiva vaikutus voi näkyä todellista vähäisempänä.

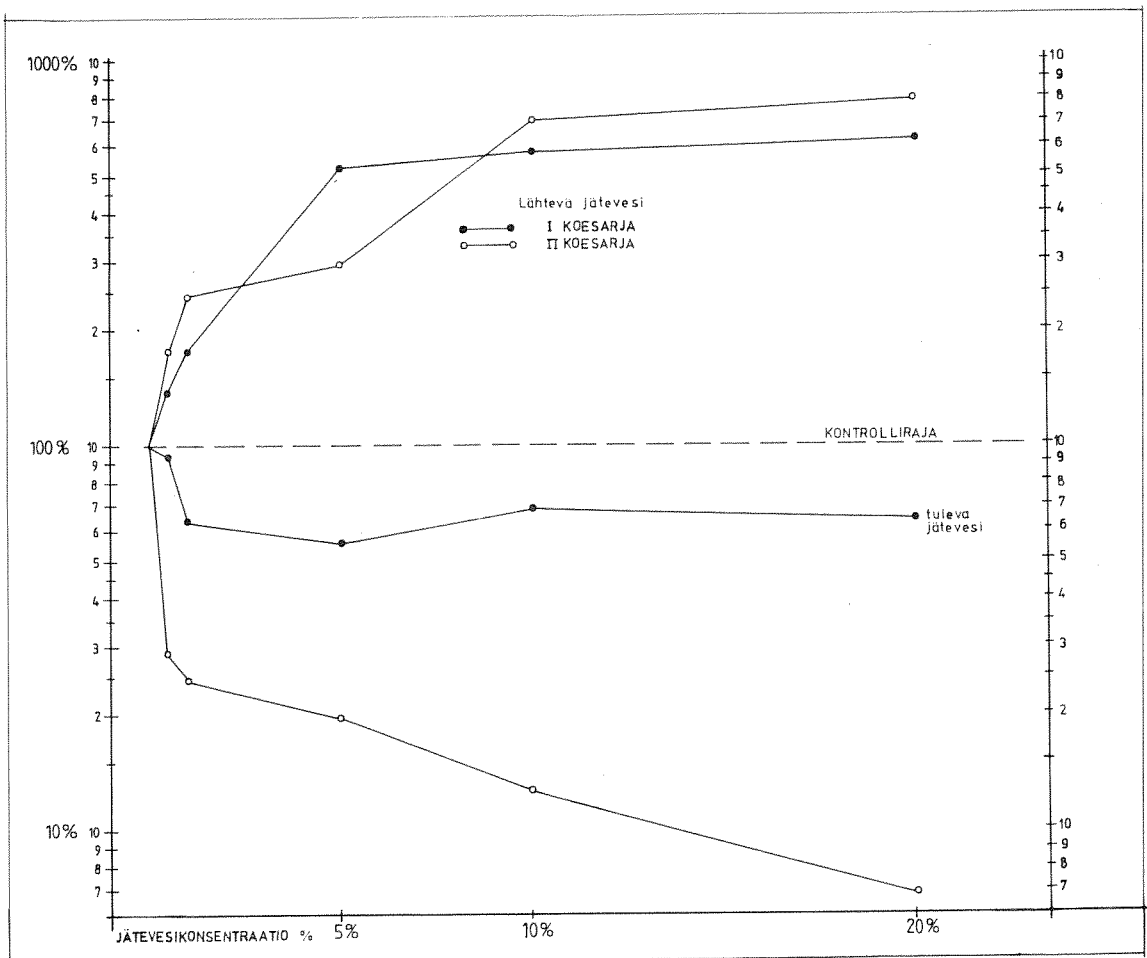
Testin tulokseen vaikuttaa myös testissä käytetty bakteerikanta, jonka elinkelpoisuus voi vaihdella itse testistä riippumattomista syistä. Myrkyllisyystestissä käytettiin lisäksi kahtena ensimmäisenä testivuonna jätevesistä eristettyjä bakteerikantoja, jotka olivat sopeutuneita jätevesiin, vuonna 1979 erityisesti puunjalostusteollisuuden jätevesiin. Siten

ne olivat vähemmän herkkiä jätevesien myrkyvaikutuksille (Lahti, 1980). Vuosina 1980 ja -81 käytännön testijärjestelyistä käytetty koebakteeri *Escherichia coli* ei sovellu puunjalostusteollisuuden jätevesien vaikutusten tutkimiseen, sillä hygieniaa indikoivana bakteerina sen lisääntymistä jätevesissä on vaikea arvioida.

Testin tulosten vaihtelua aiheuttaa myös rinnakkaisten näytteiden vähyys, mikä ilmenee erityisesti vuoden 1979 testin tuloksista, jolloin voitiin käyttää vain yhtä perättäisistä laimennoksista. Toisaalta testit osoittavat, että kylmässä (4°C) inkuboitaessa bakteeritiheyksissä ei muutamassa vuorokaudessa ehdi tapahtua merkittäviä muutoksia, joten sen käyttö ei ole lyhytaikaisessa testissä tarpeellista.

Testin tuloksista kuitenkin käy ilmi se, että tuleva jätevesi sisältää bakteereille sopivaa ravintoa, joskin se suurina pitoisuuksina voi olla niille myrkyllistä. Sen sijaan lähtevässä jätevedessä on vähemmän ravinnoksi kelpaavaa ainesta ja kahdella viimeisellä testikerralla sen melko pienetkin pitoisuudet olivat testiorganismeille myrkyllisiä.

4.2 BAKTEERIEN GLUKOOSINOTTO-TESTI



Kuva 7. Bakteerien glukoosinotto puhdistamolle tulevassa ja sieltä lähtevässä jätevedessä vuonna 1981.

Ensimmäisessä koesarjassa (I, kuva 7) puhdistamolle tuleva jätevesi lamaannutti bakteerien glukoosinottoa jonkin verran. Laimeimmalla jätevesipitoisuudella (0,5 %) ei ollut vaikutuksia, mutta kaikkia muut tutkitut pitoisuudet (1 - 20 %) alensivat bakteerien glukoosinoton 55 - 70 %:iin alkuperäisestä, kontrollinäytteessä mitatusta glukoosinotosta. Puhdistamolta lähtevä jätevesi oli vaikutuksiltaan voimakkaampi, mutta päinvastainen. Bakteerien glukoosinotto vilkastui jonkin verran jo laimeimmissa jätevesipitoisuuksissa (0,5 - 1 %), mutta suuremmissa pitoisuuksissa (5 - 20 %) bakteerien glukoosinotto oli peräti 5 - 6 -kertaista alkuperäiseen verrattuna.

Toisessa koesarjassa (II, kuva 7) tulevan jäteveden vaikutukset olivat huomattavasti voimakkaammat kuin ensimmäisessä sarjassa. Laimeimmatkin jätevesipitoisuudet (0,5 - 1 %) alensivat bakteerien glukoosinoton 25 - 30 %:iin alkuperäisestä, ja jätevesipitoisuuden kasvaessa bakteerien glukoosinotto hidastui yhä enemmän. Suurimmassa tutkitussa pitoisuudessa, 20 %, bakteerien aktiivisuus oli enää 7 % alkuperäisestä. Puhdistamolta lähtevän jäteveden vaikutukset olivat kuitenkin hyvin samankaltaiset kuin ensimmäisessä koesarjassa. Bakteerien glukoosinotto kiihtyi 1,8 - 2,5 -kertaiseksi jo laimeissa jätevesipitoisuuksissa (0,5 - 1 %), ja jopa 7 - 7,5 -kertaiseksi suurimmissa tutkituissa pitoisuuksissa.

Puhdistamolle tulevan jäteveden myrkyllisyys vaihteli selvästi. Ensimmäisen koesarjan aikana selluloosatehtaalla tuotettiin koivusellua, mutta toisen aikana erikoissellua ja silloin mm. jäteveden kemiallinen hapentarve ja kiintoainemäärä olivat selvästi pienempiä kuin ensimmäisessä koesarjassa. Tällainen myrkyllisyyden vaihtelu oli ennakoitavissa, sillä jätevesien laatu saattaa vaihdella voimakkaasti pientenkin sellun valmistusprosessin kulun muutosten, varsinaisten häiriöiden tms. johdosta. Vastaavaa vaihtelua on havaittu mm. Oy Metsä-Botnia Ab:n sulfaattiselluloosatehtaan jätevesien myrkyllisyydessä (Talsi 1981) ja myös rautatehtaan jätevesissä (Lahti & Talsi, 1982), ja se on tekijä, joka vaikeuttaa jäteveden yleisen myrkyllisyydystason arvioimista.

Jäteveden laatu muuttuu suuresti ilmastusaltaassa. Lähtevä jätevesi ei enää lamaannuttanut vastaanottavan vesistön bakteerien glukoosinottoa, päinvastoin bakteeritoiminta näytti kiihtyvän voimakkaasti. Tämä bakteerien glukoosinoton voimistuminen ei kuitenkaan välttämättä johtunut siitä, että järvi-veden bakteeritoiminta olisi jäteveden vaikutuksesta kiihtynyt. Jäteveden mukana nimittäin lisättiin näytteisiin suuri määrä ilmastusaltaan voimakkaasti toimivaa bakteerikantaa, jonka glukoosinotto oletettavasti on hyvin voimakasta. Jätevesi olisi pitänyt ennen koetta suodattaa, jotta sen omaa bakteeristöä ei olisi joutunut tutkittavaan vesistönäytteeseen. Näiden kokeiden perusteella on hyvin vaikea arvioida, mitkä ovat ilmastusaltaasta lähtevän jäteveden todelliset vaikutukset vastaanottavan vesistön bakteereihin. Ilmastusaltaassa on epäilemättä hyvin toimiva bakteeristö, joka on sopeutunut jäteveden sisältämiin myrkyllisiinkin yhdisteisiin. Oy Metsä-Botnia Ab:n jätevedet käsitellään myös ilmastusaltaassa, ja lähtevä jätevesi (suodatettu) on osoittautunut silti lievästi myrkylliseksi puhtaan merialueen bakteereille pitoisuuksissa 1 - 10 % (Talsi 1981).

4.3 LEVÄTESTIT

Jätevesien vaikutusta kasviplanktoniin tutkittiin mittaamalla levien perustuotantokykyä erilaisissa jätevesilaimennoksissa. Nettoerustuotantokykytulokset on esitetty kuvissa 8 ja 9.

Vuoden 1978 tuloksissa perustuotantokyky oli alkusyksyn testi-kerroilla suurempi kuin 17.10 tehdyssä testissä. Kuitenkin tulokset olivat samansuuntaiset, sillä levien hiilensitomiskyky oli voimakkaampaa laimeissa jätevesiliuoksissa ja kontrollissa kuin väkevissä jätevesilaimennoksissa. Ensiksi mainituissa perustuotantokyky kohosi selvästi neljän vuorokauden inkuboinnin aikana, sen sijaan väkevämmissä 10 % laimennoksissa perustuotantokyky laski vastaavassa ajassa.

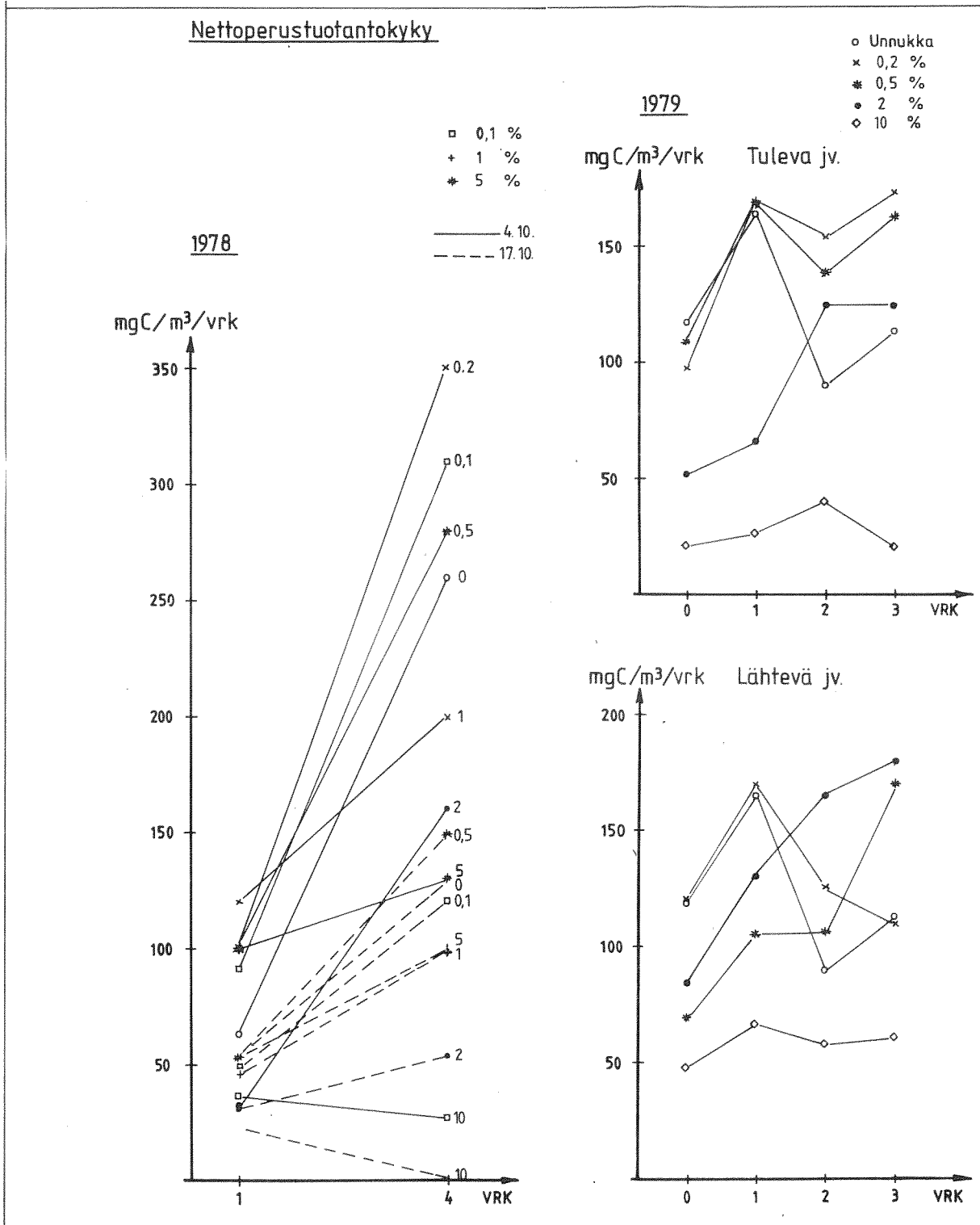
Seuraavana vuonna testi tehtiin sekä puhdistamolle tulevalle että sieltä lähtevällä jätevedellä. Näytteiden inkubointitapaa oli muutettu verrattuna edelliseen vuoteen. Perustuotantokyky oli kummallakin jätevedellä selvästi pienin 10 % jätevesilaimennoksissa. Kahden viimeisen testivuorokauden aikana levien hiilensitomiskyky pieneni kontrollissa ja lähtevän jäteveden 0,2 % laimennoksissa. Muissa laimennoksissa se pysyi lähes aiemmalla tasolla tai kohosi kokeen loppupuoliskolla.

Vuoden 1980 testeissäkin perustuotantokyky oli selvästi pienin kummankin jäteveden väkevämmissä 10 % laimennoksissa. Kokeen loppupuolella levien hiilensitomiskyky oli 2 % jätevesilaimennoksissa pienempi kuin kontrollissa, päinvastoin kuin muissa laimennoksissa, joissa perustuotantokyky oli kontrollia suurempi.

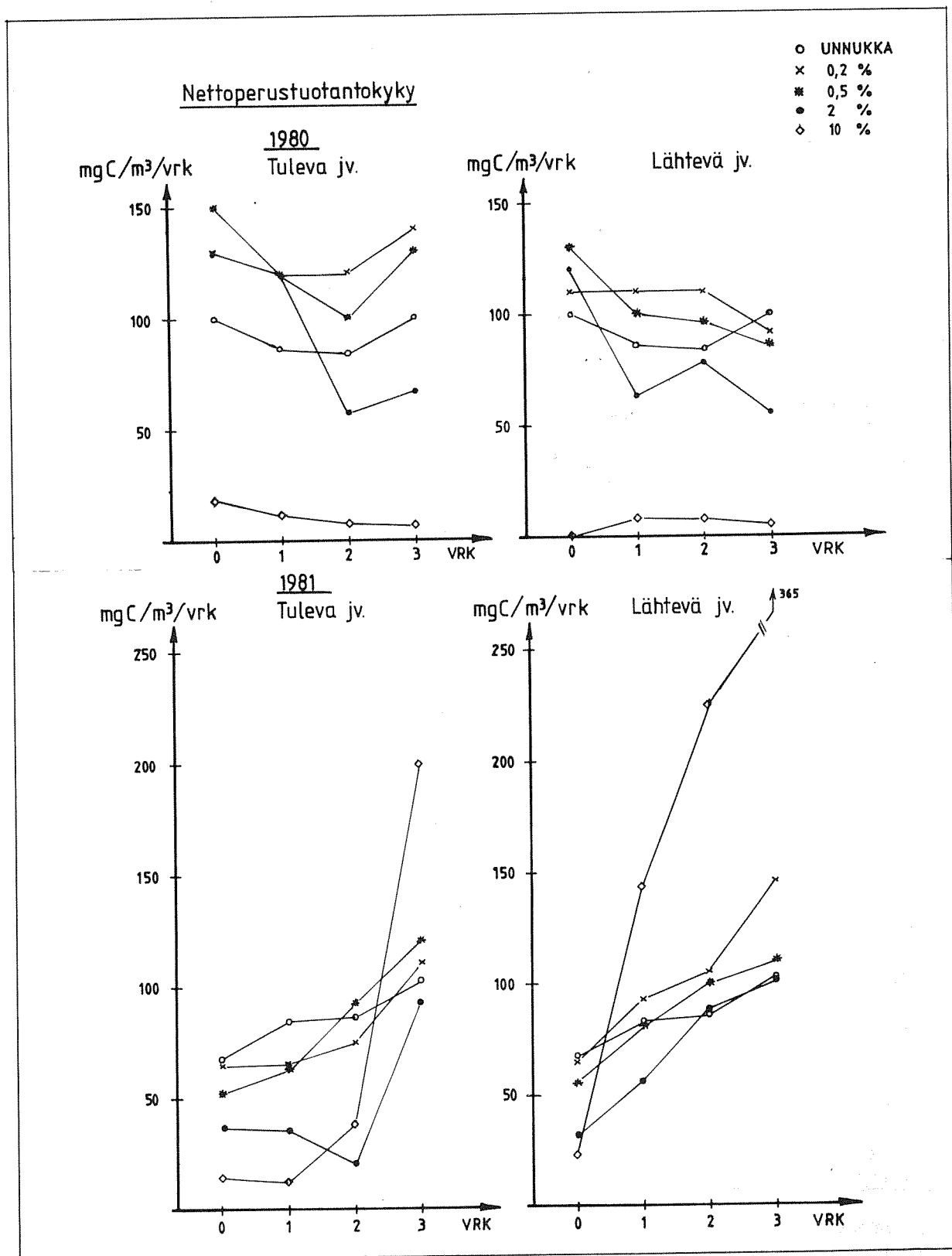
Viimeisellä testikerralla 1981 perustuotantokyky oli tulevan jäteveden 2 % ja 10 % laimennoksissa kokeen alussa pienempi, mutta kohosi kokeen lopussa samalle tasolle (2 %) tai selvästi korkeammaksi (10 %) kuin kontrollissa ja laimeissa laimennoksissa, joissa levien hiilensitomiskyky kasvoi myös kokeen kuluessa. Lähtevän jäteveden laimennoksissa tulokset olivat hyvin samankaltaiset, lukuunottamatta 10 % laimennosta, jossa perustuotantokyky kohosi ensimmäisen testivuorokauden jälkeen huomattavasti muita jätevesilaimennoksia ja kontrollia suuremmaksi.

Kolmen ensimmäisen testivuoden tuloksista havaitaan sekä tulevan että lähtevän jäteveden väkevimmän 10 % laimennoksen inhiboivan selvästi levien perustuotantokykyä. Viimeisellä testikerralla v. 1981 etenkin lähtevän jäteveden 10 % laimennos sen sijaan lisäsi levien perustuotantokykyä. Seuraavaksi väkevimmät laimennokset 5 % ja 2 % olivat kaikilla testikerroilla osin levien hiilensitomiskykyä inhiboivia, joskin niissä perustuotantokyky suhteessa kontrolliin vaihteli eri jätevesillä ja muuttui testin aikanakin. Laimeimmissa jätevesilaimennoksissa levien hiilensitomiskyky oli hieman suurempaa kuin kontrollissa.

Testissä käytettyjen jätevesien laatu vaihteli tehtyjen, tosin suppeiden analyysien perusteella sängen paljon, mikä osin johtuu tehtaiden prosessimuutoksista ja puhdistamon toiminnasta ja osin kertanäytteinä otettujen jätevesien laadun satunnaisista vaihteluista. Kuitenkin levätestitulokset osoittavat jäte-



Kuva 8. Levätestit. Nettoperustuotantokyky vuosien 1978 ja 1979 kokeissa.



Kuva 9. Levätetit. Nettoperustuotantokyky vuosien 1980 ja 1981 kokeissa.

vesien vaikutuksen perustuotantokykyyn eri testikerroilla olleen hyvin samankaltaisen. Laimeiden jätevesilaimennosten lievä perustuotantokykyä edistävä vaikutus johtunee jätevesien sisältämien ravinteiden lisäyksistä koevesiin.

Väkevissä laimennoksissa jätevesien sisältämät myrkylliset aineet kumoavat ravinnelisäyksen kasvua edistävän vaikutuksen. Lisäksi niissä veden sameus estää valon tunkeutumista koeveteen (Eloranta ja Eloranta, 1974) ja näin pienentää sitoutuneen hiilen määrää. Vuoden 1981 testin muista poikkeava tulos lähtevän jäteveden väkevimmässä laimennoksessa johtunee osin jäteveden erityisen korkeasta ravinnepitoisuudesta.

Puhdistamolle tulevan ja sieltä lähtevän jäteveden testitulokset olivat hyvin samanlaisia. On kuitenkin huomattava, että testivedet on otettu samaan aikaan, joten puhdistamon viipymää ei ole huomioitu. Koska testiin käytettyjä jätevesiä ei ole steriloitu, on koevesiin tullut jätevesien mukana bakteereita, joita on ollut erityisesti lähtevässä jätevedessä ja jotka ovat lisänneet pimeäsitoutumisen määrää. Siten ne ovat vähentäneet nettoperustuotantokykytuloksia lähtevän jäteveden väkevissä laimennoksissa testin alkupuolella, mutta lisänneet käytettävissä olevien ravinteiden määrää testin lopulla. Pimeäsitoutumisessa ilmenevä bakteriaktiivisuuden vaihtelu oli varsin samansuuntaista kuin myrkyllisyystesteissä ilmennyt vaihtelu.

Levätestin tuloksiin vaikuttavat jätevesien laadun ohella koeorganismi ja testin suoritus tapa. Vuoden 1978 testissä radiohiili-inkubointi kesti neljä vuorokautta, jolloin ehti tapahtua hajotusta ja hiilen kiertoa, joten tulos ei kuvaa kovin hyvin inkubointiajan levätuotantoa.

Eri vuosien testitulosten vertailua vaikeuttavat koeorganismien erot, vaikka käytetty levälajisto runsaimpien lajien osalta oli eri vuosina varsin samanlainen. Niissä havaitut erot voivat kuitenkin olla merkittäviä, sillä esimerkiksi jätevesien vaikutuksille herkkien piilevien ja kestävämpien viher- ja sinilevien runsaussuhteet ovat voineet vaihdella eri testikerroilla ja testin kuluessakin (vrt. Lahti, 1980). Käytetty C^{14} -menetelmä on hyvin herkkä ja levälajiston erojen lisäksi myös leväkannan aktiivisuus voi vaikuttaa testin kulkuun (Goldman, 1978). Tästä ovat osoituksena vuoden 1978 testien väliset erot; aiemmin syksyllä tehdyn testin jonkin verran suuremmat perustuotantokykytulokset johtuvat ainakin osittain aktiivisemmasta levästä. Edellä mainitut tekijät aiheuttavat myös sen, että tulokset eivät suoraan kuvaa jätevesien vaikutusta vastaanottavassa vesistössä, jossa levälajisto ja sen aktiivisuus vaihtelevat vuodenajoin ja vuosittain muiden ympäristöolosuhteiden vaikutuksesta (Goldman, 1978).

Levätestejä on yleensä tehty yhden lajin (tavallisimmin Ankistrodesmus falcatus tai Selenastrum capricornutum) puhdasviljelmä testeinä, joissa koeolot esim. koevesien laatu ja ravinnepitoisuus ovat olleet sangen tarkasti tunnetut. Myös levien kasvun erilaiset mittaamenetelmät (biomassatiitteri Seppovaara ja Numminen, 1974, klorofyllia -pitoisuus, Eloranta 1976, Jokinen, 1979) vaikeuttavat tulosten vertailua Varkauden

tutkimuksessa käytettyihin perustuotantokykymittaustuloksiin.

Eloranta (1976) on tutkinut sulfaattiselluloosatehtaan jätevesien myrkyllisyyttä ja todennut, että niiden inhibitiiviset ja toksiset vaikutukset leviin johtuvat lähinnä orgaanisista rikkiyhdisteistä, rasvahapoista ja kloorausvaiheen happamista vesistä. Jätevesifraktioista mustalipeä oli myrkyllisintä (Eloranta, 1976). Seppovaaran ja Nummisen (1974) mukaan 15 %:set sulfiitti- ja sulfaattiselluloosatehtaiden jätevedet rajoittivat selvästi kasviplanktonituotantoa. Yleensä tutkimuksissa on todettu, että sulfaattiselluloosatehtaan jätevedet ovat inhibitiivisempiä kuin sulfiittiselluloosatehtaan jätevedet (Eloranta ja Eloranta, 1980). Varkaudessakin puhdistamolle tuleva jäteveden 10 % laimennos oli kaikilla testikerroilla leville myrkyllinen, mutta myrkyllisyseroja ei havaittu suhteessa sulfiitti- tai sulfaattitehtaiden toimintaan. Tämä johtunee osin jätevesien laadun muista vaihteluista sekä muiden tehdasosastojen kuin sellutehtaan osuudesta (noin 75 %) testiin käytetyissä jätevesissä.

Varkauden tutkimuksissa puhdistamolle tulevan ja sieltä lähtevän jäteveden vaikutus levien kasvuun oli samankaltainen viimeistä testikertaa lukuunottamatta. Pietarsaareissa tehdysissä tutkimuksissa, jossa selvitettiin sulfaattiselluloosatehtaan valkaisun jätevesien alkaalisen suodoksen vaikutusta leviin, todettiin käsittelemättömän jäteveden inhiboivan levien kasvua 0,01 - 10 % pitoisuuksina. Sen sijaan biologisesti käsitelty jätevesi samoina pitoisuuksina edisti levien kasvua (Jokinen 1979).

4.4 KALATESTIT

4.41 Kalatestien käytöstä vesitutkimuksissa

4.411 Yleistä

Ympäristön muutos ja siitä johtuva rasitus laukaisee kalassa sopeutumismuutoksia eli fysiologisia muutoksia, joiden voimakkuus on riippuvainen rasituksen laadusta ja kestosta. Fysiologinen muutos ei ole aina haitallinen, vaan se voi auttaa kalaa selviytymään uusissa olosuhteissa. Muutos saattaa kuitenkin heijastua kalan kuolevuuteen, kasvuun, lisääntymiseen ja käyttäytymiseen.

Jätevesien vaikutuksia kaloihin tutkitaan akvaariokokein tai vesistöaltistuksin. Kalatestit voidaan jakaa akuuttia, kalan kuolemaan johtavaa, (letaalia) myrkyllisyyttä mittaaviin lyhytaikaisiin (LC 50 96 h) testeihin sekä subletaaleja vaikutuksia mittaaviin pitkäaikaistesteihin.

Aikaisemmin LC 50 -testejä käytettiin yleisesti myös pitkäaikaisten vaikutusten arviointiin. Testien tuloksista laskettiin mm. turvallisuusrajoja, joiden tuli taata kalaston hyvinvointi ja tilanteen seurantaan riittivät fysikaalis-kemiallisten analyysien tulokset. Tämä lähestymistapa syrjäytyi 1970-

luvun alussa, jolloin ryhdyttiin kehittämään testimenetelmiä, jotka kuvaisivat biosysteemeihin kohdistuvia vaikutuksia niin eliö- kuin kudostasolla. Nykyisin LC 50 -testejä käytetään pitkälle standardoituina myrkyllisyysluokitteluun ja esites- teinä pitkäaikaistesteille. Jätevesitutkimuksissa LC 50 -tes- tien tuloksia voidaan käyttää myös laskettaessa eräitä myrk- kykuormituksen arvioinnissa käytettäviä suureita.

Pitkäaikaistesteillä pyritään yleensä selvittämään myrkkyyvai- kutuksen luonne ja etsimään se pitoisuus, jossa myrkkyyvai- kutuksia ei enää ole havaittavissa. Jälkimmäiseen tavoitteeseen ei kuitenkaan päästäne laboratoriotestein. Tavallisimpia pit- kääikaistestejä ovat fysiologiset, histologiset, kasvu- ja käyttäytymistestit sekä testit vieraiden aineiden kertymisen määrittämiseksi (kemialliset tai haju- ja makuanalyysit). Suomessa yleisimmin käytettyjä ovat fysiologiset, histologi- set ja kertymätestit.

4.412 Kalojen fysiologisten muutosten merkitys

Kalojen fysiologista tilaa säätelevät lukuisat sisäiset ja ul- koiset tekijät. Ulkoisista tekijöistä tärkeimmät ovat veden lämpötila ja happipitoisuus. Koska kala on vaihtolämpöinen, vaikuttaa veden lämpötila sen kaikkien fysiologisten toiminto- jen vilkkauteen. Veden happipitoisuus on kalalle elintärkeä ympäristötekijä, jonka suhteen kalalla on varsin monipuolinen säätelymekanismi. Sisäisistä tekijöistä tärkeimmät ovat kaa- sujen vaihto, vesi/ionisäätely, energia-aineenvaihdunta ja vasta viime vuosina todettu vierasaineenvaihdunta eli detoksi- kaatio, joka huolehtii sisäisesti syntyneiden tai ympäristös- tä peräisin olevien haitallisten aineiden muuttamisesta helposti eritettävään muotoon. Nämä ulkoiset ja sisäiset tekijät yhdessä vaikuttavat mm. kalan kykyyn sietää rasitusta ja kompensoida vieraiden aineiden aiheuttamia haittoja. Vuotuisella lisäänty- missyklillä saattaa myös olla merkittävä vaikutus kalan fysio- logiseen tilaan. Fysiologinen tila heijastuu kalan elinkykyyn, kasvuun, käyttäytymiseen ja lisääntymiseen.

Kalafysiologisten muutosten mittaamiseen käytetään samoja klii- nis-kemiallisia analyysejä, jotka alunperin on kehitetty nisäk- kaiden fysiologisen tilan mittaamiseen. Menetelmiä on kuitenkin täytynyt kehittää kaloille soveltuviksi, ja ne saattavat olla jopa kalalajikohtaisia. Analyysituloksiin saattavat vaikuttaa lisäksi koejärjestelyt ja näytteenotto, jotka on viime vuosien tutkimusten tulosten perusteella pyritty vakioimaan. Kuitenkin kalan fysiologisten normaaliarvojen määrittäminen on vaikeaa, joten tutkimuksissa on aina oltava mukana myös vertailuryhmä.

Kunto- eli rasitusmuuttajat

- Veren hemoglobiinipitoisuus (Hb) on suoraan verrannol- linen veren hapenkuljetuskykyyn ja kuvastaa siten ka- lan selviytymismahdollisuuksia huonoissa ympäristö- oloissa. Alentunut Hb-pitoisuus (anemia) johtuu useim- miten kidusvaurion tai plasman ionitasapainon aiheut- tamasta veren laimenemisestä. Veren Hb-pitoisuuden ko- hoaminen lyhytaikaisissa rasitustiloissa johtuu pääosin plasmatilavuuden pienenemisestä. Seurauksena on veren

hapenkuljetuskyvyn paraneminen.

- Veren hematokriitti (Hkr) on veren punasolujen tilavuuden suhteellinen osuus koko verestä. Lohikalojen punasolut turpoavat nopeasti vähähappisissa olosuhteissa. Tästä syystä Hkr-arvon muutos, joka on epäsuhteessa veren Hb-pitoisuuteen on varsin herkkä rasisitusindikaattori (vrt. MCHC). Mikäli punasolujen koko pysyy muuttumattomana, johtuu Hkr-arvon muutos usein lyhytaikaisissa testeissä samoista fysiologisista vasteista kuin veran Hb-pitoisuuden muutokset.
- Punasolujen keskihemoglobiinipitoisuus (MCHC) kuvastaa punasolun koon muutoksia. Alhainen MCHC johtuu lohikaloilla punasolujen rasisitusperäisestä turpoamisesta. Korkea MCHC kuvastaa useimmiten osmoottista häiriötilaa.
- Leukokriitti (Lkr) ilmoittaa valkoisten verisolujen suhteellisen osuuden veressä. Lyhytaikainen rasisitus usein vähentää verenkierrossa olevien valkosolujen, erityisesti lymfosyyttien, määrää pienentäen Lkr-arvoa. Pitkäaikainen rasisitus saattaa lisätä lymfosyyttien määrää ja siten kohottaa Lkr-arvoa.

Aineenvaihduntamuuttujat

Tärkeimmät aineenvaihduntareaktiot tapahtuvat maksassa. Kalan energia-aineenvaihduntaa seurataan useimmiten seuraavilla suureilla:

- Maksan kokoindeksi (LSI) ilmoittaa maksan painon osuuden ruumiinpainosta prosentteina. Elimen koon kasvun syynä ovat usein aineenvaihdintahäiriöt. Maksan kokonaismassan suurentumisella pyritään esimerkiksi kompensoimaan toiminnallista vajavuutta. Lyhytaikaisissa altistuksissa LSI:n kasvu johtunee usein maksan vesipitoisuuden kohoamisesta; vasta pitkäaikainen altistus voi aikaansaada LSI:n kasvuun vaadittavan proteiinisynteesin. LSI:ssä on todettu vuodenaikaisvaihteluita.

Kalojen hiilihydraattivarastojen (lähinnä glykogeeni) määrä vaikuttaa niiden kykyyn liikkua, sietää rasisitusta ja selviytyä ympäristömyrkyistä.

- Maksan ja lihaksen glykogeenipitoisuudet kuvaavat kalan helposti käytössä olevia energiavaroja. Glykogeeni kuluu helposti akuutissa rasisituksessa. Paasto vaikuttaa kuitenkin hyvin hitaasti maksan glykogeenipitoisuuteen.
- Maksan rasva- eli lipidipitoisuus saattaa kohota rasisituksen tai ympäristömyrkyjen aiheuttamien aineenvaihdintahäiriöiden seurauksena.
- Maksan ja lihaksen proteiinipitoisuus sekä lihaksen lipidipitoisuus kuvaavat kalan pitkäaikaisia energiavaroja ja siten ravitsemustilaa, johon lyhytaikai-

nen rasitus ei yleensä vaikuta. Kudosten entsyymiaktiivisuudet ilmoitetaan kudosten proteiinipitoisuutta kohti.

- Maksan ja lihaksen vesipitoisuuden vaihtelut ennakoivat usein elimen toiminnallisia muutoksia.
- Veriplasman sokeri- eli glukoosipitoisuus kuvastaa kalan hiilihydraattiaineenvaihdunnan tilaa. Plasman sokeripitoisuus yleensä alenee pitkäaikaisen rasituksen seurauksena ja kohoaa lyhytaikaisessa rasitus-tilassa sekä hyvin matalissa ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) tai korkeissa (yli 15°C) lämpötiloissa. Pitkäaikainen paasto johtaa plasman glukoosipitoisuuden alenemiseen, mutta lyhytaikainen (n. 1 kk) paasto saattaa jopa kohottaa sitä.
- Veriplasman maitohappo- eli laktaattipitoisuus kuvastaa sekin hiilihydraattiaineenvaihdunnan tilaa. Häiriintymättömällä kalalla se on yleensä hyvin matala. Ulkoinen tai aineenvaihdunnallinen häiriö kohottaa plasman maitohappopitoisuutta nopeasti jopa yli 10-kertaiseksi lepoarvoon verrattuna. Tällöin plasman korkea laktaattipitoisuus usein korreloi alhaisen MCHC:n kanssa. Toisaalta plasman korkea maitohappopitoisuus saattaa johtua pitkäaikaisesta kudosten hapenpuutteesta sekä matalasta tai korkeasta lämpötilasta (vrt. plasman glukoosi).
- Laktaattidehydrogenaasi (LDH) on hiilihydraattiaineenvaihduntaan liittyvä entsyymi, joka katalysoi pyruvaatin muuttumista maitohapoksi. Pitkäaikaisessa rasituksessa plasman LDH-aktiivisuus kohoaa. LDH:n isoentsyymisuhteista voidaan päätellä mahdollisia kudosa-vaurioita.
- Plasman proteiinipitoisuuden äkilliset muutokset kuvastavat yleensä osmoottisen säätelyn häiriöitä. Pitkäaikainen plasman vähäproteiinisuus saattaa olla nälkätilan seurausta.
- Punasolujen adenosinitrifosfaatin (ATP) määrä kuvaa solun sisäistä energia-aineenvaihduntaa ja hapensaantia. Solujen mitokondrioissa tapahtuvan oksidatiivisen fosforylaation tuloksena syntyy ATP:a, joka on solutason energiavarastoa. ATP:n hajotessa ADP:ksi siinä oleva runsasenerginen fosfaattiryhmä irtoaa ja energiaa vapautuu solujen aineenvaihduntareaktioihin. Jos mitokondrioitten aineenvaihdunta häiriintyy, niin sekä soluhengitys että ATP:n muodostus hidastuvat.

Plasman ionitasapaino on kiduksissa ja munuaisissa tapahtuvan säätelyn tulos. Kaikki säätelymekanismeihin kohdistuvat häiriöt johtavat tasapainosta poikkeamiseen.

Makean veden kaloissa plasman natrium- (Na^+), kloridi- (Cl^-), magnesium- (Mg^{2+}) ja kalsium- (Ca^{2+}) ionipitoisuuksien alentuminen osoittaa munuaisen aktiivisen ionikuljetuksen häiriintyneen. Erityisesti Na^+ - ja Cl^- -ionien aktiivista kuljetusta ta-

pahtuu myös kiduksissa, joten näiden osalta häiriö saattaa viitata myös kidusvaurioon. Plasman Na^+ - ja Cl^- -ionipitoisuudet ovat meriveden kaloilla usein korkeat. Plasman Mg^{2+} -ionipitoisuuden kohoaminen makean veden kalassa viittaa hemolyysiin tai kudusvaurioon. Tällöin myös plasman kalium (K^+)-pitoisuus on kohonnut. Merivesikaloiden plasman Mg^{2+} -pitoisuus saattaa kohota myös munuaisvaurion seurauksena. Plasman Ca^{2+} -pitoisuus on korkea kutuaikana, muulloin korkea pitoisuus viittaa hemolyysiin tai kudusvaurioon.

Kaksiarvoiset ionit Mg^{2+} ja Ca^{2+} ovat myös tärkeitä entsyymiaktiivisuuksien säätelijöitä ja niiden määrien muutokset vaikuttavat täten tiettyjen elinten aineenvaihdunnan muutoksiin. Mg^{2+} -ionien tiedetään aktivoivan esim. peptidaaseja, karboksylaaseja ja fosfataaseja. Ca^{2+} -ioneilla on tärkeä merkitys naaraiden sukurauhasten kehityksessä, ruskuaisen muodostuksessa. Ca^{2+} :n pitoisuuden aleneminen aiheuttaa myös hermo-lihas yliärtyvyyttä ja jatkuvaa lihasten stimuloitumista, mikä taas vaikuttaa asetyylikoliiniesteraasin aktiivisuuteen.

Plasman kaliumpitoisuus kohoaa voimakkaasti kudusvaurion seurauksena. Äkillinen rasitus taas vähentää pitoisuutta nopeasti. K^+ -ionit vaikuttavat hermojen aktiopotentiaalin ylläpitoon ja täten lihas- ja hermotoimintoihin. Ionitasapainon muutokset kuvastavat usein myös punasolujen keskihemoglobiini-pitoisuuden ja hematokriitin vaihteluita (ks. edellä).

Kudosvauriomuuttujat

Mahdollisia kudusvaurioita voidaan osoittaa määrittämällä plasmasta kudospäristen entsyymien aktiivisuuksia tai määrittämällä aktiivisuus itse kudoksesta.

- Laktaattidehydrogenaasi (LDH) osallistuu kudosten hiilihydraattiaineenvaihduntaan. Sen rakenne on kudostypistä riippuva, joten plasmaan vapautuneiden isoentsyymien suhteesta (H/M, heart/muscle; sydän/lihas) voitaneen arvioida kudusvaurion sijainti ja aktiivisuudesta sen laajuus. Aktiivisuus voidaan määrittää mm. sydäimestä, maksasta ja lihaksesta. Useat ympäristömyrkyt kohottavat plasman LDH-aktiivisuutta.
- Alkaalisen fosfataasin (AP) synteesi tapahtuu maksassa ja luiden osteoblasteissa. Näiden kudosten vaurioituminen näkyy plasman AP-aktiivisuuden lisääntymisenä. Samaan aikaan plasman Ca^{2+} -pitoisuus laskee.
- Aspartaattiaminotransferaasi-aktiivisuus (ASAT 1. GOT) kohoaa kalan veressä useiden teollisuuden myrkköjen ja raskasmetallien vaikutuksesta. Aspartaattiaminotransferaasi-synteesiä tapahtuu lähinnä maksassa ja sydänlihaksessa, joiden vauriot näkyvät plasman ASAT-aktiivisuuden muutoksina.
- Koliiniesteraasia (ChE) muodostuu maksassa, ja se koostuu eri isoentsyymeistä. Entsyymimäärityksissä käytetään eri substraatteja, joista yleisin on asetyylikoliini (AChE). Entsyymin aktiivisuus voidaan määrittää useista kudoksista. Asetyylikoliiniesteraasi hajottaa

hermoimpulssin kemialliseen siirtämiseen tarvittavan asetyylikoliinin. Plasman koliiniesteraasiaktiivisuuden lasku saattaa johtua hermostollisista vaurioista. Muun muassa organofosfaatit ja metsäteollisuuden jätevedet vaikuttavat ChE-aktiivisuuteen. Plasman korkea ChE-aktiivisuus saattaa haitata kalan lihasliikkeiden koordinoitua.

- Plasman kohonneet kaliumionipitoisuudet saattavat ilmentää kudonvaurioita (ks. edellä ionitasapaino).

Vierasaineenvaihdunta eli detoksikaatiomuuttajat

Eliöiden aineenvaihdunnan tuloksena syntyy lukuisia elintoiminoille haitallisia yhdisteitä. Nämä yhdisteet (mm. steroidit) ovat vaarallisimmiksi tunnettujen ympäristömyrkkyjen tavoin rasvaliukoisia yhdisteitä. Vierasaineenvaihdunta eli detoksikaatio muokkaa nämä yhdisteet vesiliukoisiksi ja siten helposti eritettäviksi. Detoksikaatioon osallistuu lukuisia entsyymejä, joiden avulla vieraita aineita hapetetaan (hapetusreaktiot) tai niihin liitetään yhdisteitä (konjugaatioreaktiot) erittymisen helpottamiseksi. Yleensä vierasaineenvaihdunta on vilkkainta maksassa, mutta sitä tapahtuu myös muissa elimissä.

Kaloissa vierasaineenvaihduntaan osallistuvien entsyymien aktiivisuustasossa tai siihen liittyvien yhdisteiden pitoisuuksissa tapahtuvat normaalista poikkeavat muutokset ilmentävät vesien kemiallista kuormitusta yleensä aikaisemmin kuin vaikutukset ilmenevät muissa mekanismeissa tai kalan fysiologisessa kunnossa. Vierasaineenvaihdunnan tilan arviointiin käytetään seuraavia parametrejä, jotka liittyvät lähinnä konjugaatioreaktioiden seurantaan:

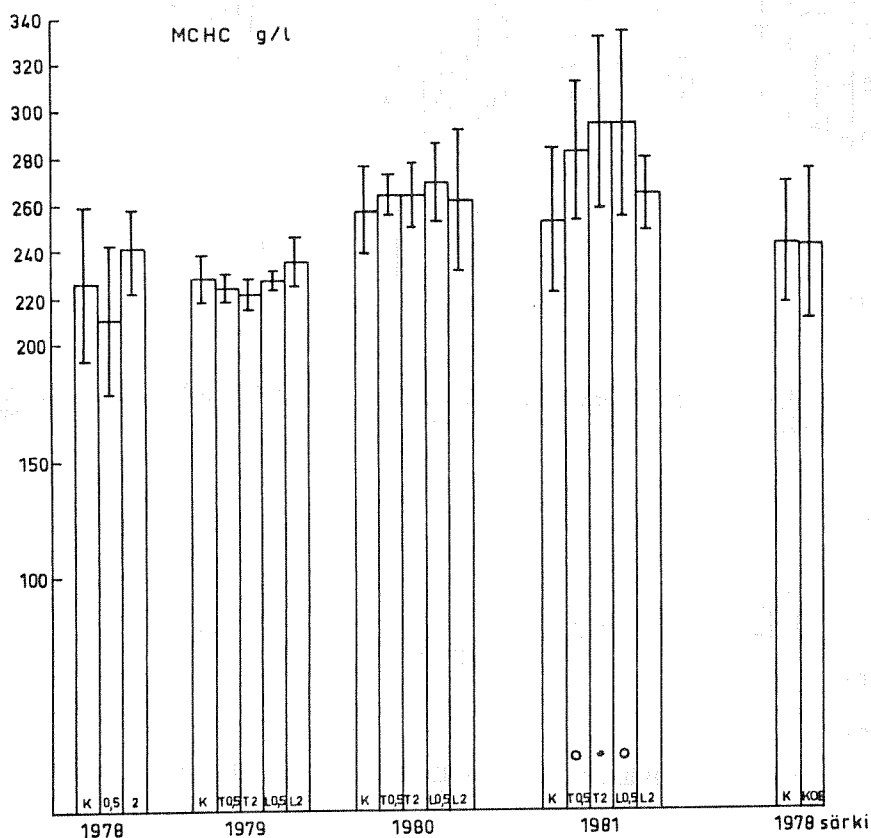
- UDP-glukuronosyylitransferaasi (UDP-GT) on maksan endoplasmaattisessa kalvostossa toimiva entsyymi, joka liittyy elimistölle vieraaseen aineeseen glukuronosyyliryhmän. Muodostunut vesiliukoinen yhdiste on helposti poistettavissa elimistöstä. Ympäristömyrkkyjen on todettu sekä aktivoivan että inhiboivan ko. entsyymejä. Koska mm. elimistön normaalit steroidit detoksikoidaan glukuronosyyliryhmällä, saattavat UDP-GT-aktiivisuuden muutokset häiritä kalojen lisääntymistä.
- β -glukuronidaasi (BG) on "retoksikoiva" entsyymi, joka elimistössä toimii päinvastoin kuin UDP-GT. Se irroittaa yhdisteistä glukuronosyyliryhmän. Aktiivisuuden kohoaminen kuvastaa soluvaurioita ja aleneminen mahdollisesti lisääntyneitä glukuronihappokonjugaatiota ja siten suurempaa kykyä vapautua haitallisista aineista.
- Glutathioni (GSH) on yhdiste, joka liittyy em. konjugaatioreaktioihin. Glutathionista muodostuu konjugaatiossa tarvittavia tioli-ryhmiä ja kun detoksikaatio on aktivoitunut, esim. UDP-GT-aktiivisuus on lisääntynyt, alenee maksan glutathionipitoisuus.

4.42 Pitkäaikaiset

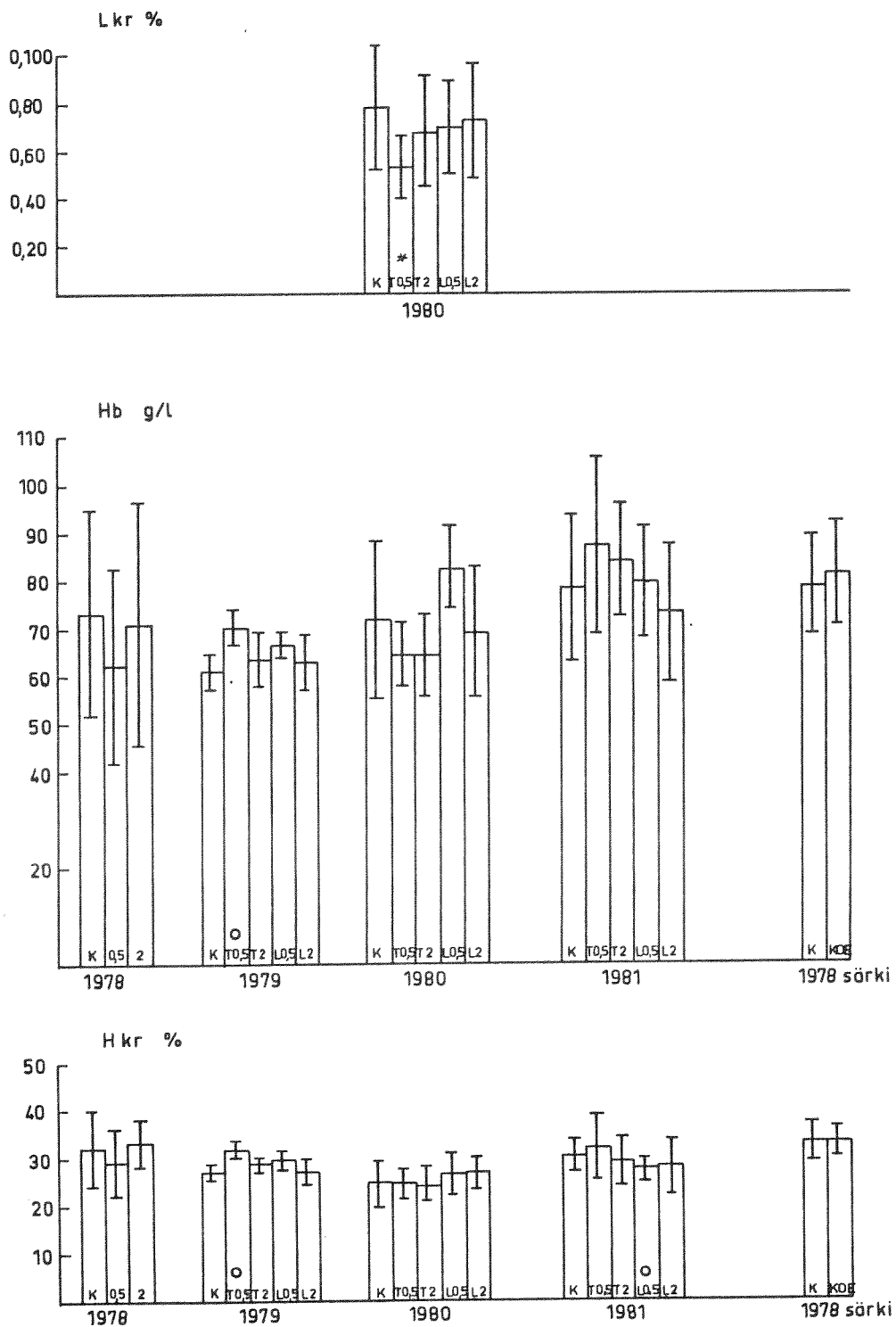
Testeissä määritetty kalojen fysiologinen tila esitetään muutujaryhmittäin.

Kunto- eli rasitusmuuttujat

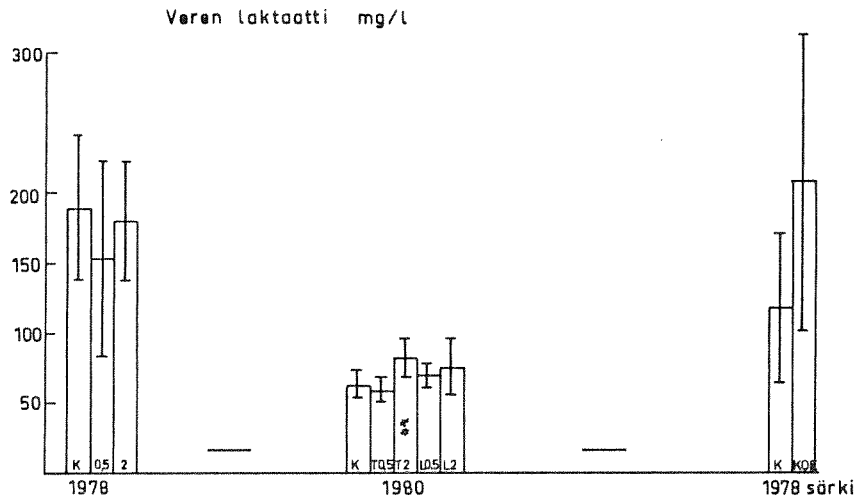
Tulokset on esitetty kuvissa 10 ja 11. Ainoat merkitsevät muutokset hemoglobiini- ja hematokriittiarvoissa oli todettavissa vuoden 1979 kokeen 0,5 % tulevassa jätevedessä altistetuissa kaloissa, joissa Hb-pitoisuus ja hematokriitti olivat kohonneet. Vuoden 1981 0,5 % lähtevän jäteveden kaloissa oli hematokriitti taas merkitsevästi laskenut. Punasolujen keskimääräisen Hb-pitoisuuden (MCHC) todettiin kohonneen. Erityisen selvää tämä oli vuoden 1981 kokeessa, jossa kaikkien muiden paitsi 2 % lähtevässä jätevedessä altistettujen kalojen MCHC oli merkitsevästi kohonnut. Kalojen veren hapenkuljetuskykyä voidaan pitää kohtalaisen normaalina, koska Hb- ja Hkr-arvoissa ei tapahtunut suuria muutoksia verrattuna kontrolliryhmän kaloihin. MCHC:n kohoaminen on jätevesien aiheuttama sopeutuma.



Kuva 10. Kirjolohen ja särjen veren punasolujen keskimääräinen hemoglobiinipitoisuus, MCHC. Kuvassa keskiarvo \pm keskiarvon keskivirhe. K= vertailuryhmän kalat, T= tulevassa jätevedessä altistettut kalat, L= lähtevässä jätevedessä altistettut kalat. Tulosten tilastollinen merkitsevyys suhteessa vertailuryhmään Student t- testillä 0= $P < 0,1$, x= $P < 0,05$, xx= $P < 0,01$, xxx= $P < 0,001$.



Kuva 11. Kirjolohden ja särjen veren hemoglobiinipitoisuudet sekä hematokriitti- ja leukokriittiarvot.



Kuva 12. Kirjolohen ja särjen veren laktaattipitoisuus.

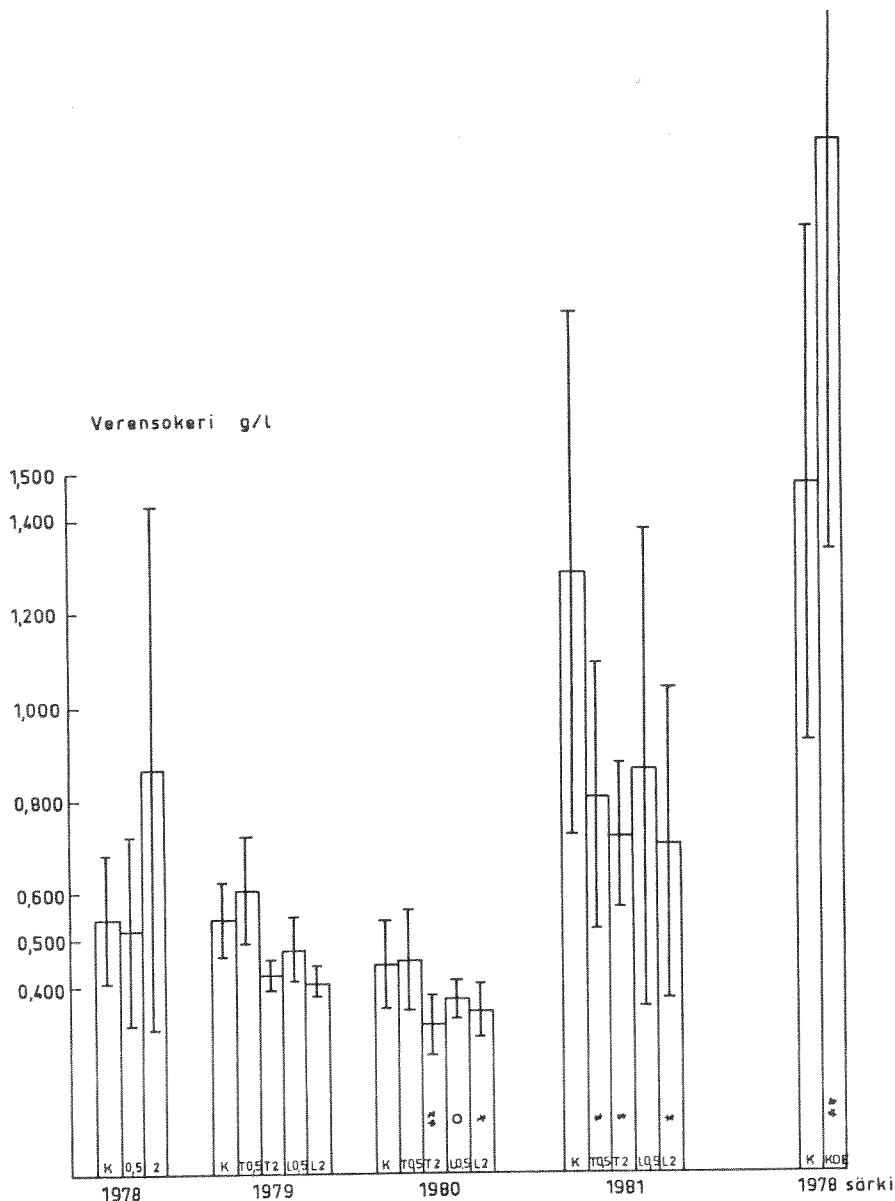
Leukokriittiarvo määritettiin ainoastaan vuoden 1980 kokeissa. Leukokriitti laski merkitsevästi ainoastaan 0,5 % tulevan jäteveden ryhmän kaloissa, muissakin ryhmissä suunta oli laskeva, joten kalojen voidaan olettaa kärsineen jätevesirasituksesta, sillä esimerkiksi lyhytaikainen rasitus usein vähentää verenkierrossa olevien valkosolujen määrää pienentäen Lkr-arvoa.

MCHC:n osoittamaa sopeutumaa ja leukokriitin laskua on todettu myös kuorimo- ja valkaisuvesillä vuonna 1979 tehdyssä pitkäaikaisaltistuksessa (Miettinen ym.1982a).

Aineenvaihduntamuuttujat

Tulokset on esitetty kuvissa 12 - 16. Hiilihydraattiaineenvaihduntaa kuvaava veren sokeripitoisuus, joka yleensä laskee pitkäaikaisen ja kohoaa lyhytaikaisen rasituksen aikana, laski vuosien 1979, 1980 ja 1981 altistuksissa kaikissa muissa ryhmissä paitsi 1979 ja 1980 0,5 % tulevassa ja 1981 0,5 % lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa. Vuonna 1981 hajonnat olivat melko suuret. Vuoden 1978 kokeessa 2 % jäteveden kalojen veren sokeripitoisuus oli kohonnut melkoisesti, mutta hajonnan suuruuden takia ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Plasman sokeripitoisuuden on havaittu laskevan 25 päivän altistuksessa sulfaattisellutehtaan 30 % jätevedessä (Mc Leay 1973).

Veren maitohappo- eli laktaattipitoisuus, jonka kohoaminen liittyy kalan stressaantumiseen, määritettiin ainoastaan vuoden 1978 ja 1980 kokeissa. Pitoisuus kasvoi tilastollisesti merkitsevästi ainoastaan 1980 2 % tulevan jäteveden kaloissa. Mc Leay ja Brown (1979) ovat osoittaneet, että paperiteolli-

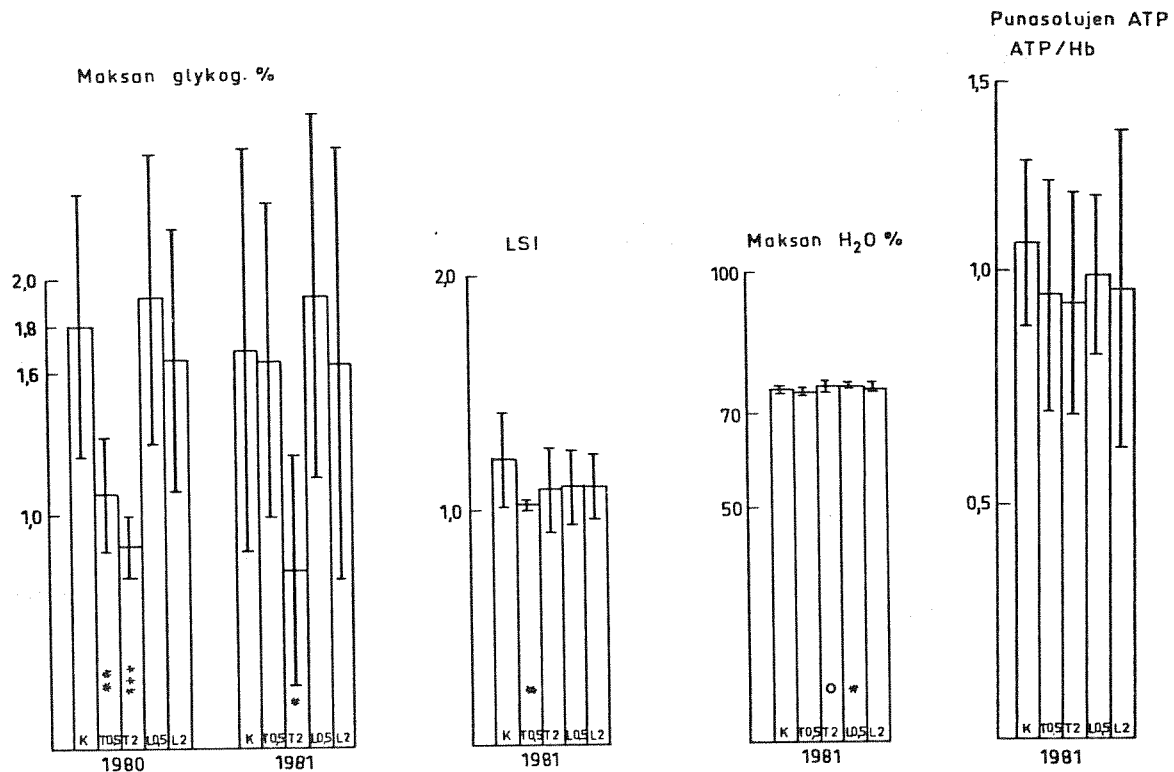


Kuva 13. Kirjolohi ja särjen veren sokeripitoisuus.

suuden jätevedet aiheuttavat lohikalojen plasman sokeri- ja maitohappopitoisuuksien nousua.

Maksan glykogeenipitoisuus vähenee nopeasti kalojen joutuessa rasitukseen. Pitoisuus laski tilastollisesti merkitsevästi tulevassa jätevedessä (enemmän 2 % kuin 0,5 %:ssa) altistetuissa kaloissa vuonna 1980. Vuoden 1981 altistuksissa ainoastaan tulevan 2 % jäteveden kaloissa glykogeenipitoisuuden aleneminen oli merkitsevä. Samanlaisia tuloksia ovat saaneet myös Mc Leay ja Brown (1979) paperiteollisuuden jätevesialtistuksissa.

Vuoden 1981 kokeessa määritettiin myös punasolujen adenosini-trifosfaattipitoisuus, joka osoitti laskua kaikissa altistusrhymissä. Tämä saattaa johtua solujen mitokondrioiden aineenvaihdunnan häiriintymisestä tai jätevesialtistuksen aiheuttamasta sopeutumasta.

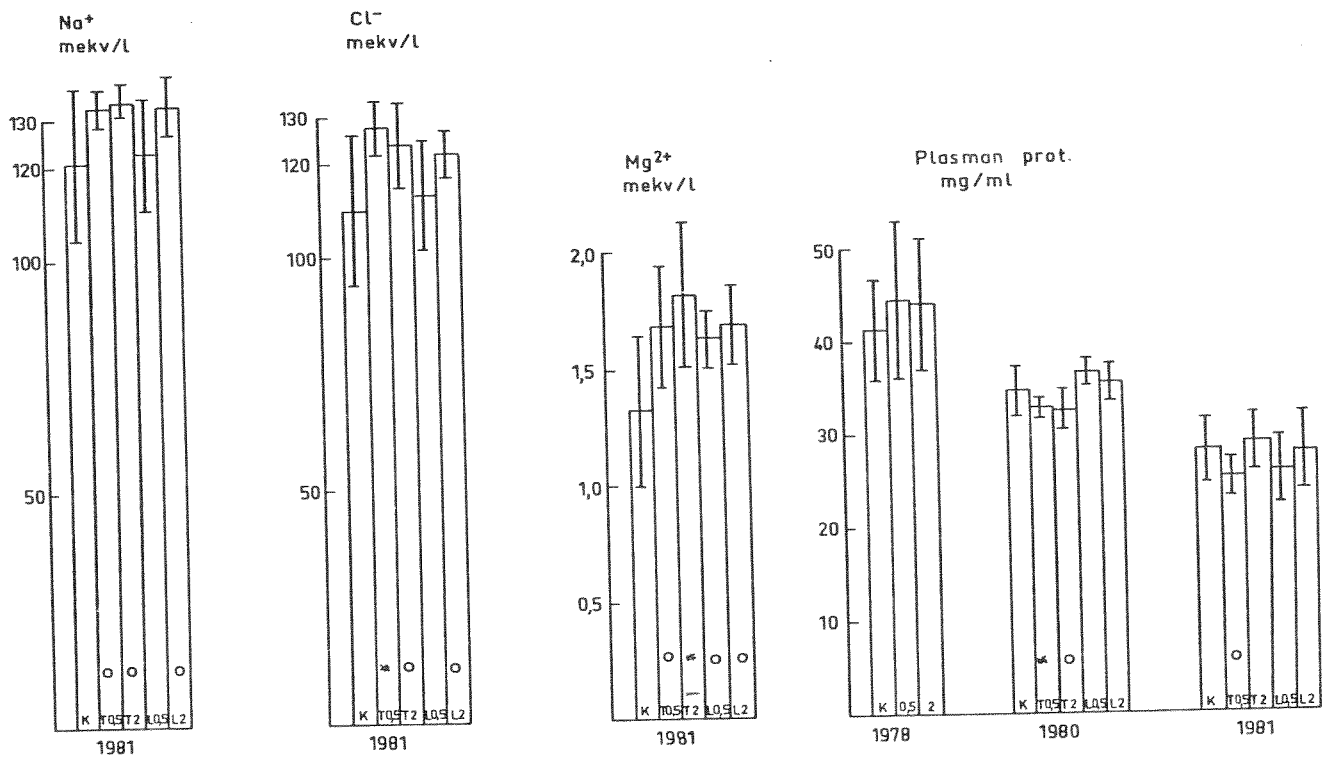


Kuva 14. Kirjolohen maksan glykogeeni- ja vesipitoisuudet, maksan somaattinen indeksi (LSI) sekä punasolujen adenosiinitrifosfaattipitoisuus (ATP).

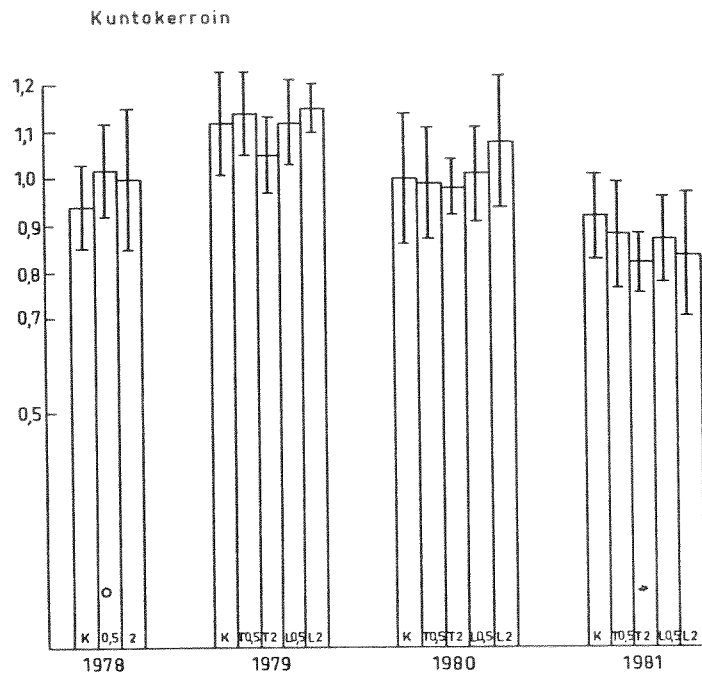
Kalojen pituuksien ja painojen avulla lasketuissa kuntokertoimissa tilastollisesti merkitseviä muutoksia oli havaittavissa vuoden 1978 kokeessa 0,5 % jätevedessä altistetuissa kaloissa, joiden kuntokertoimet nousivat, ja vuoden 1981 2% tulevassa. Näillä kuntokertoimet olivat alentuneet. Muina koevuosina ei tilastollisesti merkitseviä muutoksia esiintynyt. 2 % tulevassa jätevedessä altistettujen kalojen kuntokertoimet olivat alhaisimmat.

Maksan somaattinen indeksi (LSI) määritettiin ainoastaan vuoden 1981 altistuksissa ja suunta oli laskeva kaikissa koeryhmissä. Tilastollisesti merkitsevästi LSI laski vain 0,5 % tulevan jäteveden kaloissa.

Samoin kuin LSI, maksan vesipitoisuuskin määritettiin vain vuoden 1981 kokeessa. Vesipitoisuus nousi merkitsevästi 2 % tulevassa ja 0,5 % lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa.



Kuva 15. Kirjoloheen plasman ioni- ja proteiinipitoisuudet.



Kuva 16. Kirjoloheen kuntokertoimet.

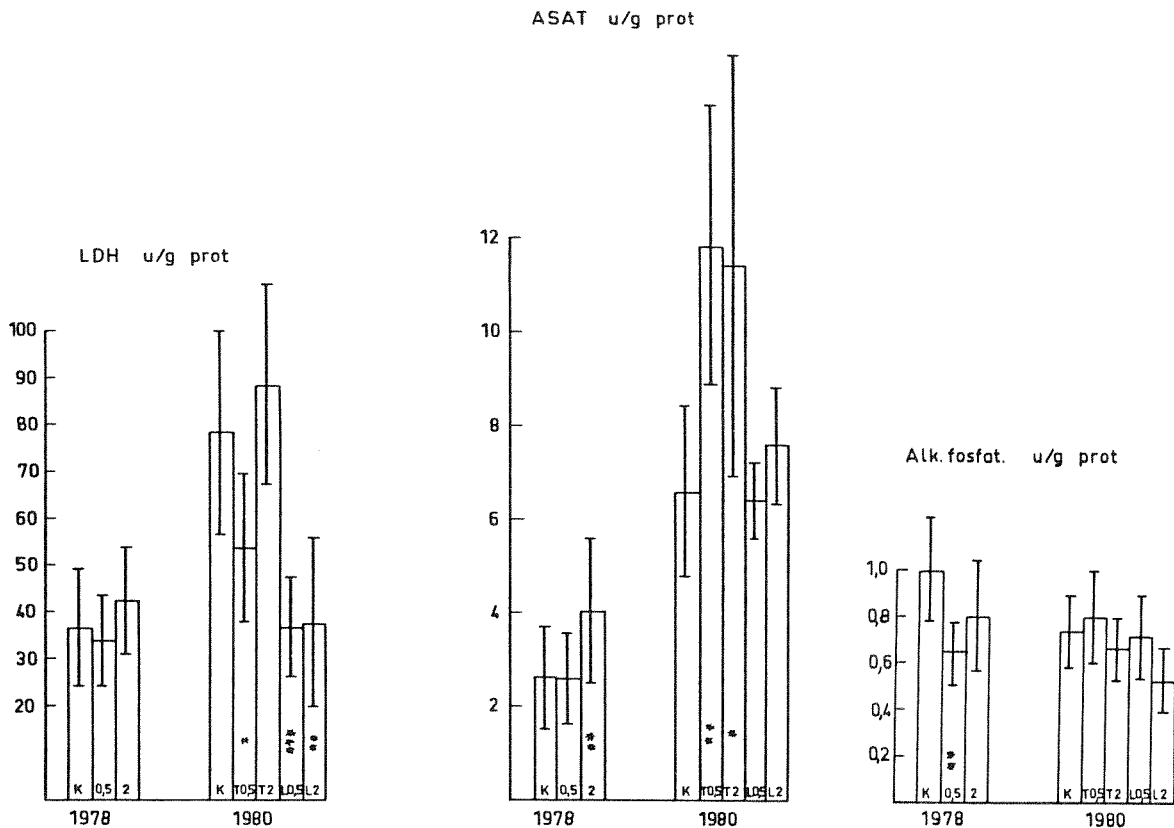
Maksan LSI:n lasku johtuu ilmeisesti osaksi elimen glykogeenipitoisuuden laskusta. Lyhytaikaisissa altistuksissa tapahtuva maksan vesipitoisuuden nousu ei tässä tapauksessa riitä nostamaan LSI:ä.

Plasman proteiinipitoisuus määritettiin vuosien 1978, 1980 ja 1981 altistuksissa. Vuoden 1980 molemmissa tulevissa ja vuoden 1981 0,5 % tulevassa jätevedessä altistetuissa kaloissa plasman proteiinipitoisuudet olivat merkittävästi alentuneet. Tulokset ehkä viittaavat osmoottisen säteilyn häiriöihin, mikä näkyy myös muuttuneissa plasman ionipitoisuuksissa.

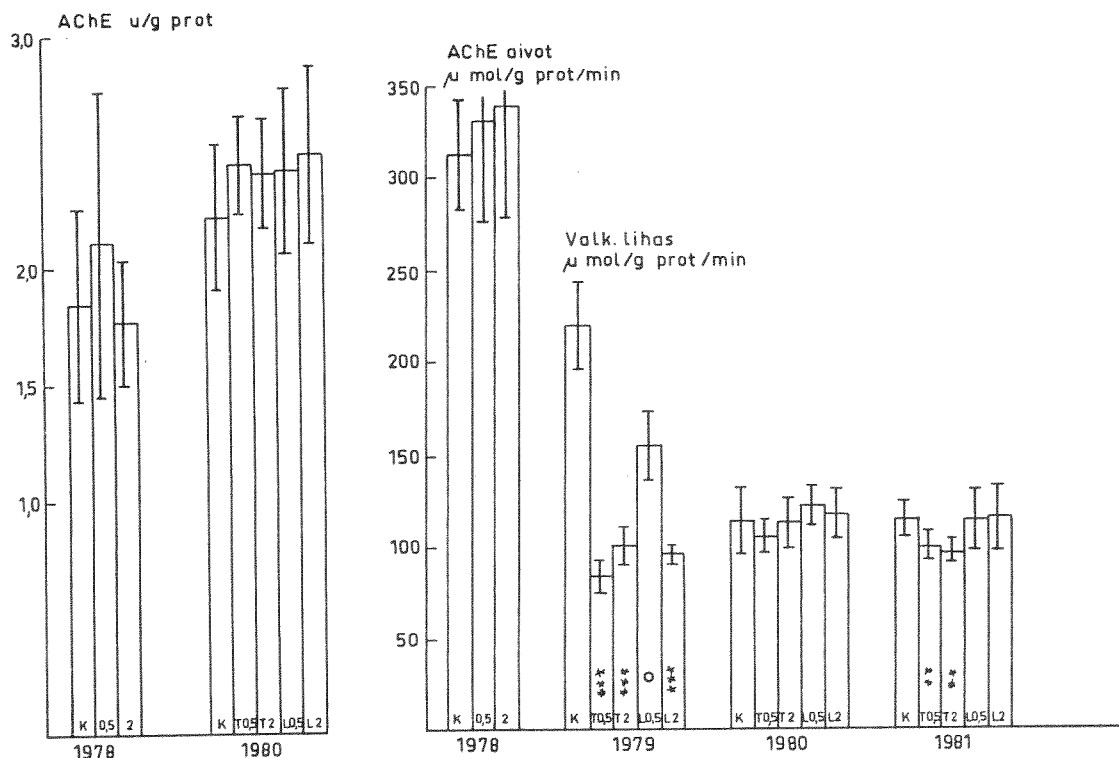
Plasman natrium- ja kloridipitoisuuksien nousu johtuu häiriintyneestä kidusten ionikuljetuksesta. Pitoisuudet määritettiin vain vuoden 1981 altistuksessa. Kaikissa koeryhmissä ionipitoisuudet olivat kohonneet. Magnesium-ioni osoitti samansuuntaista muutosta.

Kudosvauriomuuttujat

Tulokset on esitetty kuvissa 17 ja 18.



Kuva 17. Kirjolohen plasman laktaattidehydrogenaasin (LDH), aspartaattiaminotransferaasin (ASAT) ja alkaalisen fosfaatin aktiivisuudet.



Kuva 18. Kirjolohien plasman, aivojen ja valkean lihaskudoksen asetylikoliiniesteraasin (AChE) aktiivisuudet.

Plasmaentsyymit

Mahdollisia kudosaaurioita osoittavista plasman kudospärisistä entsyymeistä määritettiin vuosien 1978 ja 1980 altistuksissa laktaattidehydrogenaasin aktiivisuus. Aktiivisuudet laskivat merkittävästi v. 1980 0,5 % tulevan jäteveden ja molempien lähteiden jätevesien kalojen plasmoissa. Tämä havainto viittaa aineenvaihdunnassa tapahtuneisiin muutoksiin. Paperiteollisuuden jätevesien on havaittu vesistöissä alentavan kirjolohi- ja järvitaimen plasman LDH -aktiivisuutta (Oikari ja Soivio 1978). Sen sijaan tulevan 2 % jäteveden kaloissa on todettavissa kudosaurioon viittaava aktiivisuuden kohoaminen. Vastaavanlainen erittäin selvä LDH:n aktiivisuuden kohoaminen on todettu edellä rasitusmuuttujien kohdalla mainituissa pitkäaikaisaltistuksissa (Miettinen ym. 1982a), jossa jätevesipitoisuus oli 2,5 %.

Plasman aspartaattiaminotransferaasi-aktiivisuus, jonka lisääntyminen kuvaa soluvaurioita, kohosi merkittävästi v. 1980 molemmissa tulevissa ja v. 1978 2 % tulevassa jätevedessä altistettujen kalojen plasmoissa. Puhdistetuissa jätevesissä altistetuilla kaloilla ASAT:n aktiivisuus ei poikennut kontrollikaloilla saaduista arvoista.

Plasman alkaalisen fosfataasin aktiivisuus määritettiin vuosina 1978 ja 1980, ja se laski lähes kaikissa altistusryhmissä.

Paperiteollisuuden jätevesien on havaittu vesistöaltistuksissa alentavan lohikalojen plasman AP -aktiivisuuksia (Oikari ja Soivio 1978).

Plasman koliiniesteraasin aktiivisuuden todettiin vuosina 1978 ja 1980 jonkin verran kohonneen lähes kaikissa altistusryhmissä. Aktiivisuuden on havaittu lisääntyvän metsäteollisuuden jätevesien pilaamasta vesistöistä pyydetyissä hauissa (Oikari ym. 1979).

Kudosentsyymit

Aivojen asetyylikoliiniesteraasi-aktiivisuus määritettiin vuoden 1978 altistuksessa. Aktiivisuudet kohosivat jonkin verran, mutta eivät tilastollisesti merkitsevästi. Vastaavanlainen melko voimakas aivojen AChE -aktiivisuuden nousu on todettu em. kuorimo- ja valkaisuvesialtistuksissa (Miettinen ym. 1982a). Muina koevuosina AChE -aktiivisuus määritettiin kalojen valkeasta lihaksesta. Vuonna 1979 aktiivisuudet laskivat kaikissa altistusryhmissä, erittäin merkitsevästi molemmissa tulevilla ja 2 % lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa, samoin v. 1981 0,5 % ja 2 % tulevassa jätevedessä. Vuoden 1980 altistuksissa ei merkittäviä muutoksia ollut havaittavissa. Yleisesti voidaan todeta, että puhdistamattomassa jätevedessä altistetuissa kaloissa lihaksen AChE -aktiivisuuden lasku oli voimakkainta, osoittaen hermostotoimintojen inhiboitumista. Tähän muutokseen saattavat liittyä myös kalojen käyttäytymisestä altistusten aikana tehdyt havainnot (vrt. taulukko 9). Aktiivisia olivat yleensä ainoastaan kontrolliryhmän kalat.

Vierasaineenvaihdunta eli detoksikaatiomuuttajat

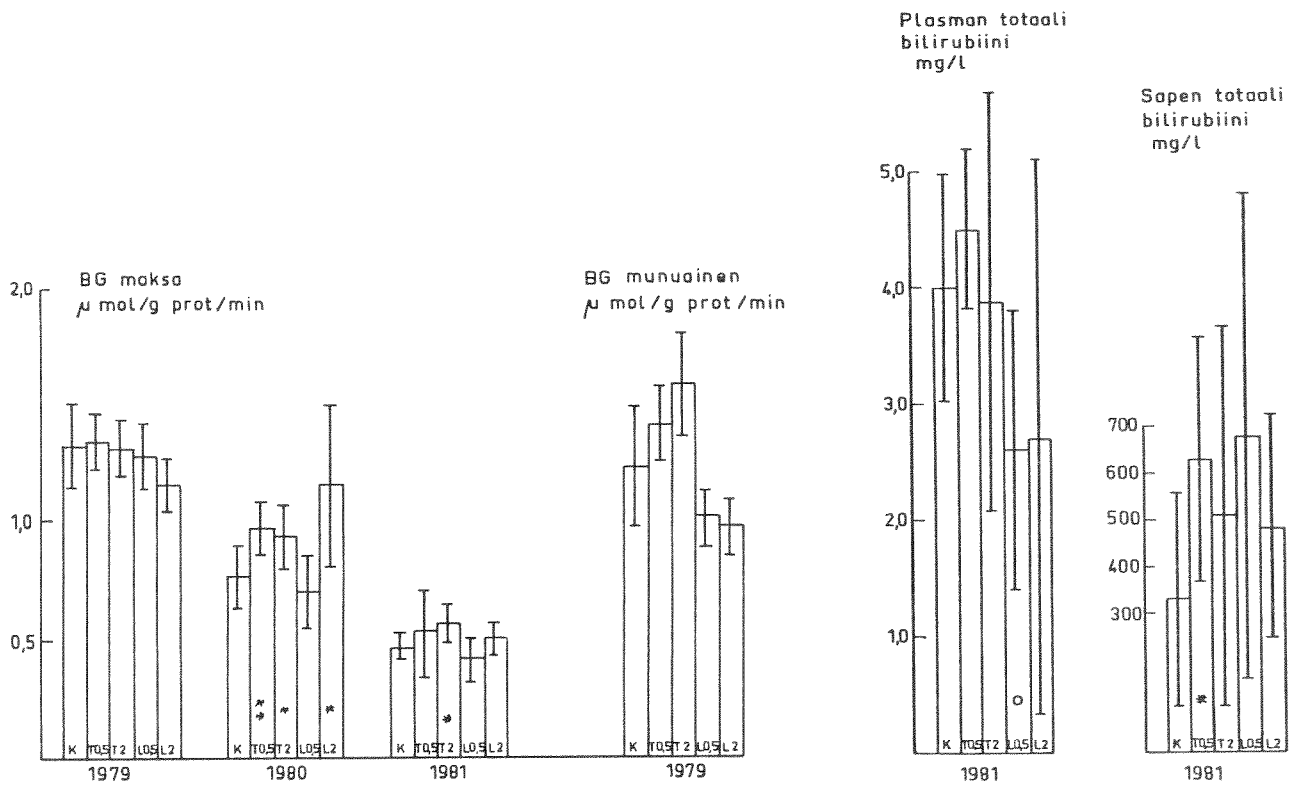
Tulokset on esitetty kuvissa 19 ja 20.

Toisen vaiheen detoksikaatioentsyymeistä UDP-glukuronosyyli-transferaasi (UDP-GT) muodostaa poistumiskelpoisia glukuronideja ja sen aktiivisuus kuvastaa kohotessaan elimistön lisääntyntä kykyä vapautua vierasaineista ja alentuessaan häiriöitä tässä mekanismissa. β -glukuronidaasi (BG) toimii elimistössä päinvastoin kuin UDP-GT. Se irrottaa detoksikoiduista yhdisteistä glukuronosyyli-ryhmän. Aktiivisuuden kohoaminen kuvastaa soluvaurioita ja aleneminen mahdollisesti lisääntyntä kykyä vapautua haitallisista aineista.

Detoksikaatioentsyymeistä määritettiin BG -aktiivisuus v. 1979 sekä maksasta että munuaisista sekä vuosina 1980 ja 1981 vain maksasta. Vuoden 1979 kokeissa tilastollisesti merkitseviä muutoksia ei havaittu, vaikkakin munuaisten entsyymiaktiivisuus kohosi tulevassa jätevedessä altistetuissa kaloissa. Vuosina 1980 ja 1981 aktiivisuus maksassa kohosi molemmissa tulevan ja 2 % lähtevän jäteveden kaloissa.

Munuaisten UDP-GT -aktiivisuudet määritettiin vuosien 1979 ja 1980 altistuksissa ja ne laskivat erityisesti 2 % tulevan jäteveden kaloissa.

Maksan UDP-GT aktiivisuus määritettiin kaikkina koevuosina. tuloksista voidaan todeta, että laimeampien jätevesiryhmien

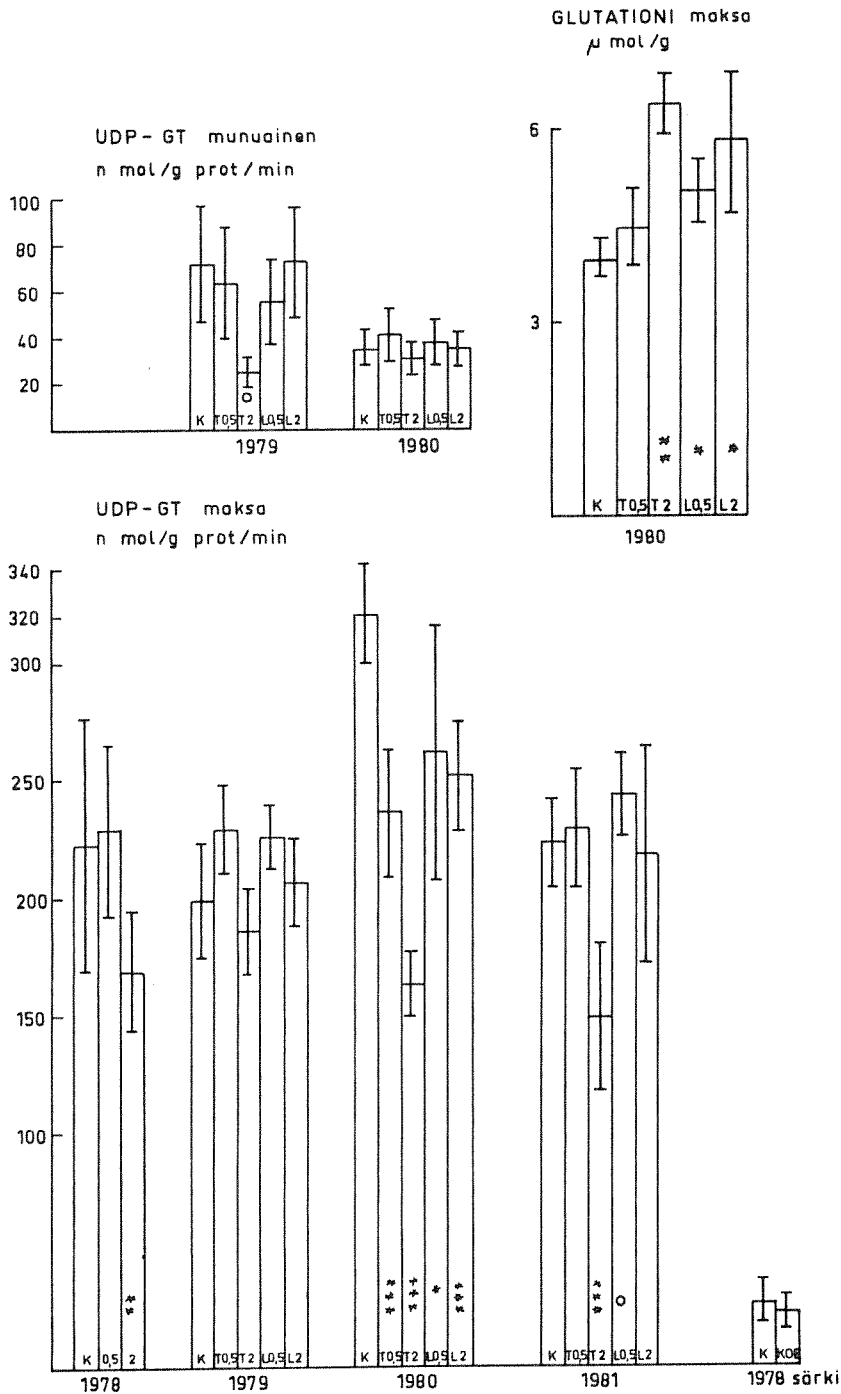


Kuva 10. Kirjolohen maksan ja munuaisen β -glukuronidaasin (BG) aktiivisuudet sekä plasman ja sapen kokonaisbilirubiinipitoisuudet.

kaloilla aktiivisuus kohosi osoittaen detoksikaation aktivoitumista ja väkevämpien jätevesilaimennosten kaloilla aktiivisuus laski osoittaen häiriöitä detoksikaatiossa. Poikkeuksena on vuoden 1980 altistus, jolloin kaikissa altistusrhymissä entsyymin aktiivisuus laski voimakkaasti. Vuonna 1979, jolloin sellutehtaan jätevedet puuttuivat, olivat muutokset vähäisempiä. Sama havainto voidaan tehdä tarkasteltaessa maksan BG-aktiivisuuksia.

Maksan glutathionipitoisuus määritettiin v. 1980 altistetuista kaloista. Pitoisuudet olivat väkevämmissä jätevesissä altistetuilla kaloilla selvästi korkeimmat. Tulos osoittaa häiriintynyttä detoksikaatiota, sillä lisääntyneessä detoksikaatiossa tarvitaan glutathionista saatavia tioli-ryhmiä ja maksan glutathionipitoisuudet laskevat.

Metsäteollisuuden jätevesien on havaittu häiritsevän kalojen detoksikaatioaineenvaihduntaa (Ahokas ym. 1976). Sulfaattiselulun keiton, kuorimon ja valkaisun jätevedet sekä hartsihapposeos alentavat maksan UDP-GT-aktiivisuutta ja lisäävät BG-aktiivisuutta (Castren ja Oikari 1976, Miettinen ym. 1982a).



Kuva 20. Kirjolohen ja särjen maksan ja kirjolohen munuaisen UDP-glukuronosyyli transferaasin aktiivisuudet sekä kirjolohen maksan glutationipitoisuudet.

Selkärankaisten tiedetään metaboloivan esim. bilirubiinia glukuronidaation kautta (Dutton, 1966). Jos bilirubiinin konjugatio glukuronidihapon kanssa estyy alentuneen UDP-GT -aktiivisuuden takia, seurauksena saattaa olla bilirubiinin kertymistä plasmassa. Kruzynski (1979) on havainnut tämän dehydroksiabiettiinihartsihapolla altistetuilla punalohilla. Ilmiön tutkimis-

seksi kaloista määritettiin v. 1981 plasman ja sapen kokonaisbilirubiinipitoisuudet. Plasman bilirubiinipitoisuudet laskivat käsitellyissä jätevesissä altistetuissa kaloissa. Tulos on johdonmukainen bilirubiinin detoksikaation kannalta, vaikka se ei olekaan täysin yhdenmukainen maksan UDP-GT:n aktiivisuudessa tapahtuneiden muutosten kanssa. Kuitenkin 0,5 % lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa, joiden maksan UDP-GT -aktiivisuus oli korkein, oli plasman bilirubiinipitoisuus alhaisin. Saper bilirubiinipitoisuudet olivat kohonneet kaikissa altistusryhmissä.

Vuonna 1978 Unnukasta ja Haukivedeltä pyydystettyjen särkien fysiologisesta tilasta voidaan todeta seuraavaa (kuvat 10, 11, 12, 13 ja 20). Kalojen veren hemoglobiinipitoisuudessa, punasolujen keskihemoglobiinipitoisuudessa ja hematokriittiarvoissa ei ollut eroja, joten jätevesien vaikutuksia kalojen veren hapenkuljetuskykyyn ei ole todettavissa. Kalojen veren sokeri- ja laktaattipitoisuudet olivat nousseet Haukivedellä pyydystetyissä kaloissa. Tulosten suuri hajonta kuvastaa pyyntirasitusta, mutta tulos on kuitenkin samansuuntainen kuin todettiin v. 1977 Etelä-Saimaalla tehdyssä altistuksessa ja osoittaa jätevesien vaikutusta kalojen hiilihydraattiaineenvaihduntaan. Haukivedeltä pyydystettyjen särkien UDP-glukuronosyylitransferaasi-aktiivisuus osoitti laskevaa suuntaa, mikä merkitsee häiriintynyttä vierasaineenvaihduntaa.

4.43 M a k u t e s t i t j a e r ä i d e n a i n e i - d e n k e r t y m i n e n k a l o i h i n

4.431 Sellu- ja paperiteollisuuden jätevesien haitallisista aineista

Pääosan sellu- ja paperiteollisuuden tunnetuista ja pieneliöille myrkyllisiksi todetuista yhdisteistä muodostavat hartsihapot ja kloorifenolit, ja niitä on havuissa enemmän kuin lehtipuussa. Puussa esiintyvät hartsihapot ovat kuitenkin varsin pysymättömiä ja palustriinihappoa lukuunottamatta ne muuttuvat selun keitossa toisiksi, pysyvämmäksi hartsihapoiksi. Sellun mukana valkaisuun joutuvista hartsihapoista vain pysyvimmät, kuten dehydroksiabiетиinihappo, säilyvät kloorausvaiheen hapettavissa oloissa. Valkaisuoprosessissa saattaa syntyä myös kloorautuneita hartsihappoja. Merkittävän hartsihappolähteen muodostavat myös kuorimon jätevedet. Hartsihappojen LC 50 -arvot ovat suuruudeltaan n. 0,5 - 1,0 mg/l. Eri yhdisteiden myrkyllisyydet kirjolliselle Leachin ja Thakoren (1976) mukaan on esitetty taulukossa 14.

Kirjallisuudessa esitetyt LC 50 -arvot poikkeavat yleensä jonkin verran toisistaan mm. testikalasta ja testiveden happamuudesta johtuen. Happamuus on tärkeä tekijä, koska hartsihappojen ja fenolien toksisuus kasvaa huomattavasti pH:n aluetta. Esitetyt arvot kuvaavat kuitenkin varsin hyvin eri yhdisteiden myrkyllisyyden suhdetta toisiinsa. Niistä voidaan todeta, että dehydroksiabiетиinihappo on vähiten myrkyllinen, joskaan erot eivät ole suuret toisiin hartsihappoihin verrattuna. Dehydroksiabiетиinihappo on kuitenkin hartsihapoista pysyvin.

Kloorifenolit syntyvät puun luontaisista yhdisteistä sellun val-

kaisun yhteydessä. Sellun valkaisuprosesseissa on kaksi päävaihetta: kloorivaihe, jossa sellussa vielä olevat ligniini-jäämät pyritään saattamaan liukoiseen muotoon sekä alkali-vaihe, jossa liuenneet aineet pyritään uuttamaan pois. Varsinaiset kloorifenolit (tri-, tetra- ja pentakloorifenolit) ja klooriguajakolit ovat peräisin alkalivaiheesta ja kloorikatekolit kloorivaiheesta. Jätevesistä analysoitujen kloorifenoleiden LC 50-arvot on esitetty taulukossa 14 Leachin ja Thakoren (1975), Vossin (1980, 1981) ja Salkinoja - Salosen ym. (1981) mukaan.

Varsinaisista kloorifenoleista on valkaisuvesissä runsaimmin 2,4,6- trikloorifenolia. Pentakloorifenoli on kuitenkin eniten klooria sisältävä ja siten lipofiilisempänä yhdisteenä myrkyllisin, pysyvin ja kertyvin näistä yhdisteistä. Paasivirran ym. (1980) tekemien tutkimusten mukaan pentakloorifenoli ei rikastu ravintoketjuihin, kun sen sijaan tri- ja tetrakloorifenoli rikastuvat DDT:n ja PCB:n tavoin.

Tri- ja tetraklooriguajakoli ovat myrkyllisempiä kuin niitä vastaavat varsinaiset kloorifenolit. Erityisesti triklooriguajakoli on varsin pysyvä vesistöissä. Se rikastuu ravintoketjuihin DDT:n tavoin, kun taas tetraklooriguajakoli rikastuu eliöihin varsin nopeasti metyylielohopean tavoin ravintoketjujen huipulle (Paasivirta ym. 1980).

Kloorikatekolit ovat valkaisuvesien hallitsevia kloorifenoleita. Tetrakloorikatekoli hajoaa eliöissä hyvin hitaasti, ja se on myös vesistöön jouduttuaan melko pysyvä. Nämä havainnot saattavat johtua siitäkin, että tetrakloorikatekoli on mahdollisesti muiden kloorifenolien hajoamistuote. Rikastumistaipumista sillä ei ole todettu, vaan se absorboituu voimakkaasti planktoniin ja sedimenttiin.

Jätevesissä voitiin todeta myös eräitä muita yhdisteitä, jotka eivät kuitenkaan ole kovin myrkyllisiä. Rasvahappoja on varsin runsaasti jätevesissä. Kloorisymeenit ovat valkaisu-sa muodostuneita neutraaliaineita ja betulinoli on koivun kuoren uuteaine.

4.432 Haju- ja makutestit

Osasta akvaariotesteissä altistetuista kirjolohista tehtiin myös haju- ja makutestit vuosina 1978, 1980 ja 1981. Puhdistamolle tulevan jäteveden 2 % laimennoksessa 3 - 5 viikkoa altistetut kirjolohet luokiteltiin jokaisella testikerralla ihmisravinnoksi kelpaamattomiksi selvän jäteliemen maun vuoksi. Muissakin jätevesilaimennoksissa altistetuissa kaloissa havaittiin jäteliemen makua, voimakkaimpana vuoden 1980 testissä, jossa myös 0,5 % tulevassa ja 2 % lähtevässä jätevesilaimennoksessa altistetut kalat luokiteltiin ihmisravinnoksi kelpaamattomiksi. Akvaariotesteissä kontrollina käytetyssä Unnukan vedessä altistetuissa kaloissa ei hiukan tunkkaisen tai mudan maun ohella havaittu virhemakua ja kaikki arvioijat luokittelivat ne laadultaan tyydyttäväksi. Viimeisellä testikerralla ne luokiteltiin välttäviksi, kuten myös 0,5 % puhdistamolta lähtevän jäteveden laimennoksessa v. 1980 altistetut kalat (taulukko 11).

Kahtena ensimmäisenä testivuonna makutestejä varten pyydystettiin kaloja sekä tehtaiden yläpuolisesta vesistöstä Unnukasta että alapuolelta Siitinselältä. Kumpanakaan vuonna Unnukasta pyydetyissä särjissä ja hauissa ei todettu virrehajua tai -makuu. Sen sijaan Siitinselältä pyydystetyt särjet olivat selvän jäteliemen maun takia ihmisravinnoksi kelpaamattomia, kuten lähes kaikki samalta alueelta pyydetyt hauetkin yhtä luukuunottamatta, jossa havaittiin lievää puunjalostusteollisuuden jäteliemen makua (taulukko 11).

Makutestit osoittavat sekä puhdistamolle tulevan että sieltä lähtevän jäteveden aiheuttavan makuvirheitä kirjolohiin jomelko lyhyen altistuksen jälkeen. Tehtaiden alapuolisesta vesistöstä pyydetyissä särjissä ja hauissa oli selviä makuvirheitä, joita ei ollut yläpuolisen vesistön kaloissa; vastaavia tuloksia on saatu myös muissa samalta alueelta tehdyissä makutesteissä (VTT:n tutkimusselostukset nro ELI661, 1981 ja ELI2858, 1982).

4.433 Kertyminen

Hartsihappojen ja kloorifenoleiden kertymistä kaloihin selvitetiin vuosina 1979 ja 1981. Tutkimuskohteina olivat kalojen plasma ja sappineste. Kertyminen plasmaan kuvaa lähinnä näiden yhdisteiden suoran otton (kidukset) ja erityksen (maksu ja muunainen) suhdetta. Kertyminen sappinesteeseen kuvaa maksan kykyä hajottaa ja erittää näitä yhdisteitä. Tavanomaisia lihaksen ja maksan analyysejä ei tehty, koska näiden kudosten suurten rasvahappopitoisuuksien vuoksi hartsihappojen analysoiminen on erittäin vaikeata. Kertyminen lihakseen saattaa olla kuitenkin voimakasta kuten tehdyt hajuu- ja makuanalyysit osoittavat.

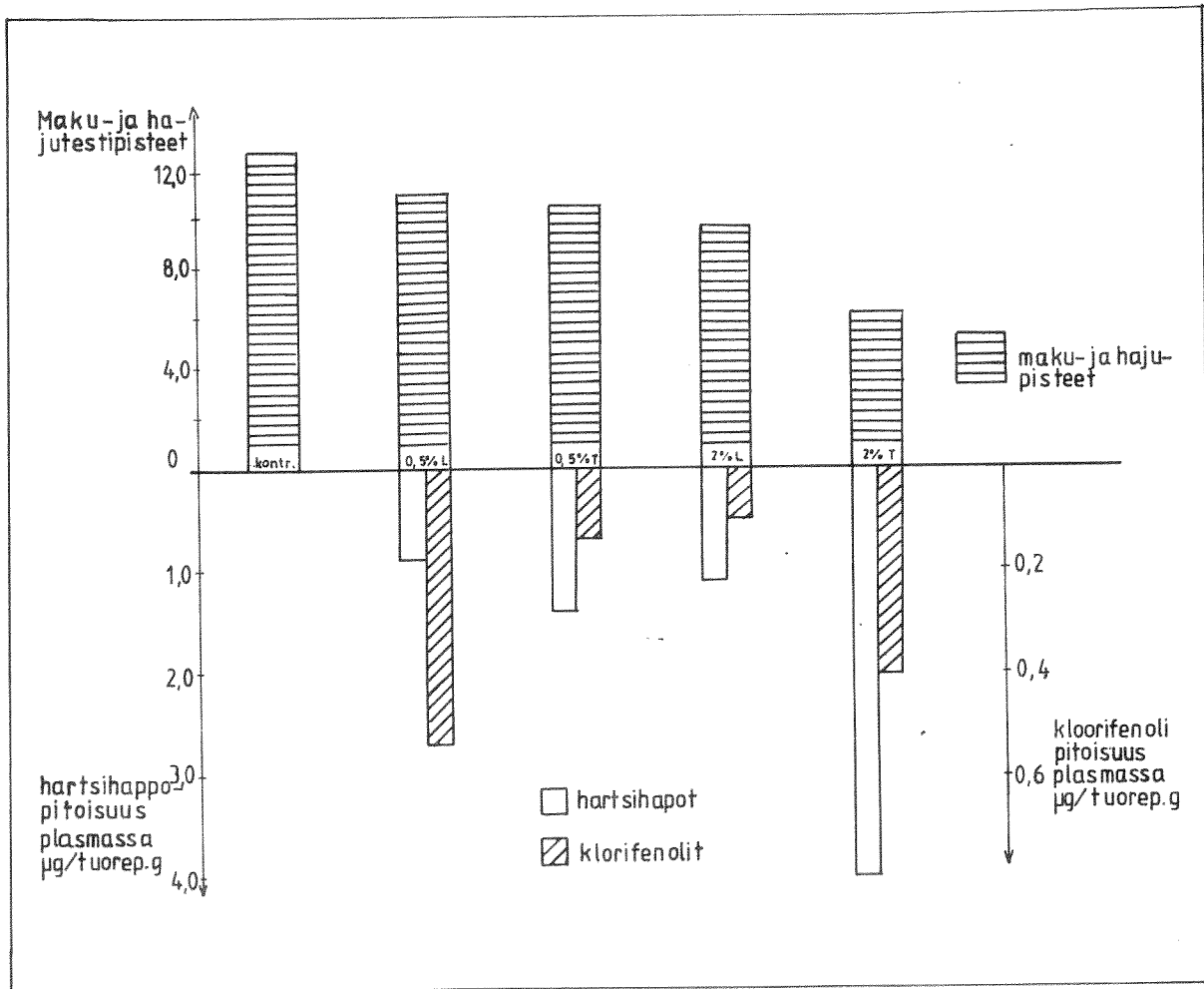
Vuoden 1979 tutkimuksessa, jolloin sulfiittisellutehdas ei enää ollut toiminnassa, selvitettiin vain hartsihappojen kertymistä. Vesi- ja kudospnäytteistä analysoitiin pimaarityypiset (pimaari- ja isopimaarihappo) ja abietiinityypiset (abietiini- ja dehydroabietiinihappo) hartsihapot. Puhdistamolle tulevassa ja sieltä lähtevässä jätevedessä hartsihappopitoisuudet olivat varsin suuria (7,52 ja 20,4 mg/l). Samaan aikaan otetut näytteet kuvasivat varsin erilaisia jätevesitilanteita, joten niistä ei voida vetää johtopäätöksiä ilmastetun lammikon toiminnasta.

Kalojen plasmasta ja sapesta määritetyt hartsihappopitoisuudet olivat myös varsin korkeita. Vähäinen näytemäärä vaikeutti kuitenkin analysointia ja tuloksen tulkintaa. Kuitenkin voitiin todeta, että plasma- ja sappinäytteissä korkein hartsihappomäärä oli 2 % lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa. Eniten oli dehydroabietiinihappoa. Abietiini- ja isopimaarihappoa oli molemmissa näytteissä yhtäläiset pitoisuudet ja pimaarihappoa oli näytteissä vähiten (Kuopion vesipiiri 1980).

Vuonna 1981 tehty selvitys, jollainen tehtiin myös Kajaaninjoesa altistetuista kaloista (Miettinen ym. 1982b), lienee perinpohjaisempi kuin missään aikaisemmin on tehty. Jätevesien hartsihappo- ja kloorifenolipitoisuudet on analysoitu LC 50-testeihin otetuista kokoomänäytteistä (taulukko 14). Kaloista saadut analyysitulokset on esitetty taulukossa 12 ja kuvassa 21. Hartsihappoista kertyvin yhdiste useimmissa altistus- ja näyteryhmissä oli dehydroabietiinihappo. Seuraavina olivat isopimaari- ja abie-

kalalaji	mistä	arviointi				maku	pist. yht.	ei kelpaavaksi arviointi	sanallinen arvostelu
		raakana		keitettynä					
		ulko-näkö 0-2	haju 0-4	ulko-näkö 0-2	haju 0-4	0-10			
1978									
kirjolohi	kontr.	1,7	3,5	2,0	3,7	7,4	18,3 (14,6)	0/6	raa'assa kalassa ruodot osittain irronneet, keitettyä heikokko mudan tai rehun haju ja maku, muuten melko hyvä
"	2 % jätevesi	1,9	3,0	1,8	1,8	2,8	11,3 (7,6)	6/6	Pihkan hajuihin raakana ja varsinkin keitettyä, ruskehava liha keitettyä, hyvin selvä jäteliemen maku ja haju
särki	Unnukka	2,0	3,3	2,0	3,7	7,0	18,0 (14,0)	0/6	Tyypillinen särjen haju ja maku, mudan makua
"	Siitinselkä	1,8	2,8	1,7	1,7	2,4	10,4 (6,9)	6/6	Epäpuhdas haju raakana, keitettyä selvä pihkan ja puuteollisuuden jäteliemen haju sekä voimakas jäteliemen maku
1979									
särki (2 kpl)	Unnukka	1,7	3,5	1,6	3,1	6,8	16,7 (13,4)	0/6	Mudan makua, muuten hyvä
" (2 kpl)	Siitinselkä	1,5	2,8	1,5	1,9	3,0	10,7 (7,7)	6/6	Oudon värinen liha, voimakas jäteliemen maku ja haju, täysin saastunut kala
hauki	Unnukka	1,7	3,4	1,8	3,5	6,4	16,8 (13,3)	0/6	Lievä mudan maku, muuten melko hyvä
"	"	1,7	3,4	1,5	3,4	7,0	17,0 (13,8)	0/6	Keitettyä tumma liha, ei selvää sivumakua eikä hajua
"	"	1,8	3,5	1,7	3,5	7,1	17,6 (14,1)	0/6	Ei virrehajua eikä makua, hieman mauton kala
"	Siitinselkä	1,7	3,4	1,7	3,3	5,8	15,9 (12,5)	1/6	Lievä puunjalostusteollisuuden jäteliemen maku
"	"	1,6	3,4	1,5	2,4	5,0	13,9 (10,8)	4/6	Keitettyä tumma, selvä jäteliemen haju ja maku, outo kalkkia muistuttava maku, pihkan maku
"	"	1,7	3,5	1,8	2,8	5,1	14,9 (11,4)	4/6	Selvä jäteliemen maku ja haju, pihkan makua
"	"	1,7	3,3	1,6	2,5	5,1	14,2 (10,9)	4/6	Selvä jäteliemen haju ja maku, karvas pihkamainen maku
"	"	1,7	3,3	1,6	2,5	4,9	14,0 (10,7)	6/6	Selvä jäteliemen haju ja maku, outo kalkin maku, paha pihkamainen sivumaku
"	"	1,6	2,9	1,6	2,0	3,7	11,8 (8,6)	6/6	Voimakas jäteliemen ja pihkan haju ja maku, täysin saastunut kala
1980									
kirjolohi	kontr.	1,8	3,5	1,6	3,5	7,6	18,0 (14,6)	0/6	Puhdas haju ja maku, ei yhtä maukas kuin iso kirjolohi
"	0,5 % lähtevä	1,5	3,3	1,5	2,8	6,6	15,7 (12,7)	0/6	Lievästi epäpuhdas haju keitettyä, mauton kala
"	2 % lähtevä	1,4	3,3	1,5	2,7	4,8	13,7 (10,8)	5/6	Raakana limainen, keitettyä selvä paperitehtaan jäteliemen haju ja maku, myös karvas ruohomainen sivumaku
"	0,5 % tuleva	1,6	3,2	1,5	2,9	5,0	14,2 (11,1)	5/6	Keitettyä pihkamainen haju selvä sellun jäteliemen maku
"	2 % tuleva	1,6	2,5	1,5	1,8	3,4	10,8 (7,7)	6/6	Raakana jäteliemen hajua, keitettyä selvä pihkan ja jäteliemen maku, jää karvas, erittäin epämiellyttävä jälkimaku
1981									
kirjolohi	kontr.		3,5		3,0	6,1	12,6	0/6	Hiukan tunkkaista, savumaista sivumakua, ei tyypillinen kirjolohi maultaan
"	0,5 % lähtevä		3,1		2,3	5,5	10,9	2/6	Pistävä, kirpeä maku, myös jäteliemen hajua ja makua
"	2 % lähtevä		2,9		2,2	4,5	9,6	3/6	Lievä jäteliemen haju ja maku, tunkkainen, palanut maku
"	0,5 % tuleva		3,0		2,3	5,2	10,5	2/6	Heikko paperiteoll. jäteliemen haju, jäteliemen maku selvempi, myös karvasta makua
"	2 % tuleva		2,4		1,3	2,4	6,1	6/6	Voimakas jäteliemen haju ja maku polttava tärpättimäinen

(ilman ulkonäköpisteitä)



Kuva 21. Haju- ja makupisteet sekä plasman hartsihappo- ja kloorifenolipitoisuudet vertailuryhmässä ja eri jätevesilaimennoksissa altistetuissa kaloissa v. 1981.

etiinihapot. Kertymisjärjestys vastaa vuonna 1979 saatua tulosta ja sama järjestys todettiin Kajaaninjoellakin. Etelä-Saimaalla tehdyssä altistuksessa oli dehydroabieteeni-happo myös kertyvin yhdiste (Oikari, ym. 1980). Neoabietiinihappoa, jota jätevesissä todettiin melko runsaasti, ei näytteissä tavattu, vaikka sitä on todettu em. Etelä-Saimaan altistuksessa.

Kloorifenoleista jätevesissä esiintyy runsaimmin kloorikatekoleja, kuten tässäkin tutkimuksessa todettiin valkaisimon ollessa toiminnassa. Sama havainto tehtiin myös Kajaani Oy:n jätevesistä (Miettinen ym. 1982b). Kudosnäytteistä todettiin kuitenkin eniten varsinaisia kloorifenoleita ja klooriguajakoleja, kuten Kajaaninjoellakin. Klooriguajakolit ovat myrkyllisempiä yhdisteitä kuin niitä vastaavat kloorifenolit. Paasivirta ym. (1980) ovat todenneet tetraklooriguajakolin kertyvän metyylielohopean tapaan ravintoketjujen huipulle. Tässä tutkimuksessa tetraklooriguajakolia todettiin runsaammin kuin mitään muuta kloorifenolia kalo-

Taulukko 12. Hartsihappojen ja kloorifenolien kertyminen kalojen veriin ja sappiin kontrollissa (K) ja eri jätevesilaimennoksissa (T=tuleva jätevesi, L=lähtevä jätevesi). Tulokset on laskettu μg :ina kuivapainoja (g) kohti, kokonaismäärät myös tuorepainoja (g) kohti.

Aine	Veriplasma					Sappi				
	K	0,5%T	0,5%L	2%T	2%L	K	0,5%T	0,5%L	2%T	2%L
<u>Hartsihapot</u>										
paluistriinihappo	-	2	2	7	2	-	11	1	10	7
abietiinihappo	-	4	2	10	(-)	-	65	10	38	50
dehydroabietiinihappo	-	10	7	24	8	-	36	15	55	70
sandarapimaarihappo	-	5	1	(14)	2	-	11	2	18	15
pimaarihappo	-	3	2	11	6	-	12	4	12	15
isopimaarihappo	-	4	3	28	4	-	53	8	54	40
neoabietiinihappo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\mu\text{g/g}$	-	28	17	80	22	-	188	40	187	197
$\mu\text{g/tuorep.g}$	-	1,4	0,9	4,0	1,1	-	30,1	6,4	29,9	31,5
<u>Kloorifenolit</u>										
trikloorifenoli	-	0,2	-	-	-	1,1	1,8	0,5	3,5	22,0
tetrakloorifenoli	-	0,4	2,0	1,7	0,4	0,7	2,0	1,3	3,2	4,7
pentakloorifenoli	-	0,9	1,9	2,1	1,2	1,4	1,9	1,8	7,0	14,0
$\mu\text{g/g}$	-	1,5	3,9	3,8	1,6	3,2	5,7	3,6	13,7	40,7
triklooriguajakoli	-	-	4,0	-	-	-	4,9	0,5	15,9	30,0
tetraklooriguajakoli	-	1,5	2,8	3,8	0,5	0,9	13,0	1,4	24,6	10,0
$\mu\text{g/g}$	-	1,5	6,8	3,8	0,5	0,9	17,9	1,9	40,5	40,0
kloorifenolien kokonaismäärä $\mu\text{g/g}$	-	3,0	10,7	7,6	2,1	4,1	23,6	5,5	54,2	80,7
" $\mu\text{g/tuorep./g}$	-	0,14	0,54	0,40	0,10	0,65	3,8	0,9	8,7	12,9
<u>Triklloorisymeeni</u>	-	0,8	3,4	-	0,6	-	3,7	2,0	5,2	13,0

jen sapesta, joten sen pitoisuus maksassa (ja lihaksessa) saattaa olla melko korkea.

Vuoden 1981 tutkimuksessa hartsihappojen ja kloorifenoleiden kertymiskuvaa on häirinnyt jätevesissä altistuksen lopulla tapahtunut muutos (vrt. taulukko 14), joka saattaa lyhyessä ajassa heijastua kalaan kertyneissä yhdisteissä (vrt. taulukko 12).

Taulukko 13. Hartsihappojen ja kloorifenoleiden konsentraatio-kertoimet sekä sappi/plasma-suhteet (T= tuleva jätevesi, L= lähtevä jätevesi) vuoden 1981 tutkimuksessa.

	H a r t s i h a p o t			K l o o r i f e n o l i t		
	Sappi	Plasma	S/P	Sappi	Plasma	S/P
0,5 % T	1 430	67	21,5	21 710	800	27,1
0,5 % L	530	75	7,1	4 500	1 450	3,1
2,0 % T	355	48	7,5	12 430	570	21,8
2,0 % L	685	24	28,6	16 130	125	129,0

Taulukkoon 13 on laskettu hartsihappojen ja kloorifenolien kokonaismäärien konsentraatiokertoimet ja näiden yhdisteiden erityyksen luonnetta kuvaavat sappi/plasma-konsentraatiosuhteet (S/P). Konsentraatiokertoimet ovat suuntaa-antavia, sillä jätevesien laatu (mm. hartsihappo- ja kloorifenolipitoisuudet) vaihtelee suuresti ja kertoimia laskettaessa käytetyt jätevedet edustavat vain noin neljännestä koko altistuksen aikaisista jätevesistä. Hartsihappojen konsentraatiokertoimet ovat samaa suuruusluokkaa kuin Kajaaninjoenllakin, kun sen sijaan kloorifenolien kertyminen Varkaudessa oli huomattavasti voimakkaampaa. Sappi/plasma-konsentraatiosuhteiden arvot, jotka hartsihappojen osalta olivat alhaisimmillaan 7,1 - 7,5, olivat samansuuntaisia kuin Oikarin ja Holmbomin (1981) esittämässä arviointimenetelmässä akuutin (S/P<1) ja subletaalin (S/P>1) vaikutuksen erottamiseksi mm. kalakuolemien syitä tutkittaessa.

4.44 Lyhytaikaistestit

Lyhytaikaistesteihin kerättyjen jätevesinäytteiden hartsihappojen, kloorifenolien, rasvahappojen ja muiden yhdisteiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 14. Vertailtaessa puhdistamolle tulevia jätevesiä voidaan niissä todeta samansuuntaisia muutoksia kuin tehtaiden tärkeimmissä prosesseissa. Hartsihappojen kokonaismäärä on laskenut alle neljännekseen samalla kun sellun tuotanto on laskenut kolmanneksen. Kloorifenolien määrä on laskenut alle puoleen valkaisimon ollessa seisokissa jälkimmäistä vesinäytettä kerättäessä. Vertailtaessa puhdistamolle tulevia ja sieltä lähteviä jätevesipareja, voidaan todeta, että ensimmäisellä kerralla ilmastetussa lammikossa on saatu varsin tyyppillinen reduktio; hartsihapot > 50 % ja kloorifenolit < 10 %. Toisella kerralla jätevesiparit eivät näytä olleen viipymän mukaisia; hartsihappopitoisuudet ovat samansuuruiset ja kloorifenolien pitoisuus on lähtevässä jätevedessä huomattavasti korkeampi.

Taulukko 14. Eräiden orgaanisten yhdisteiden pitoisuudet ($\mu\text{g}/\text{l}$) lyhytaikais-
testeihin käytetyissä jätevesissä vuonna 1981 sekä niiden kirjallisuudessa
esitettyjä LC_{50} -arvoja kaloille.

Yhdiste	1.tuleva jv kerätty 11.-14.11.	1.lähtevä jv kerätty 18.-21.11.	2.tuleva jv kerätty 24.-27.11.	2.lähtevä jv kerätty 30.11-2.12.	LC_{50} -arvo mg/l
<u>Hartsihapot</u>					
pimaarihappo	605	230	84	161	0,8
sandarakopimaarihappo	280	92	89	114	
isopimaarihappo	417	254	260	310	0,4
palustriinihappo	1020	415	143	121	0,5
dehydroabietiinihappo	1420	1200	581	385	1,1
abietiinihappo	2200	648	274	235	0,7
neobietiinihappo	970	250	37	138	
Σ mg/l	6,9	3,1	1,5	1,5	
<u>Kloorifenolit</u>					
trikloorifenoli	7	9	6	8	2,6
tetrakloorifenoli	6	4	4	6	0,6
pentakloorifenoli	< 2	< 2	2	< 2	0,1
triklooriguajakoli	8	14	4	5	0,8
tetraklooriguajakoli	8	10	4	4	0,3
trikloorikatekoli	8	5	(<2)	6	0,9
tetrakloorikatekoli	10	4	3	5	0,4
Σ	48	45	21	35	
<u>Rasvahapot</u>					
öljyhappo	9000	95	131	52	
linoleenihappo	1390	40	30	40	
linolihappo	1980	200	181	133	
palmitiinihappo	950	139	81	190	
steariinihappo	428	109	35	110	
Σ	13748	583	458	525	
β -sitosteroli	2220	350	148	309	
betulinoli	920	175	274	~800	
trikloorisymeeni	17	10	4	8	

Jätevesillä tehtyjen lyhytaikaistestien LC 50-arvot on esitetty taulukossa 15. Taulukkoon on laskettu myös jäteveden toksisuusyksiköiden arvot $(TU = \frac{100}{LC\ 50\text{-vol}\%})$. Toksisuusyksikkö on yleis-

leismyrkyllinen mittayksikkö, jota käytetään mm. vertailtaessa eri prosessien jätevesien myrkyllisyyttä. Toksisuusyksikkö osoittaa myös akuuttien vaikutusten poistamiseksi tarvittavan laimennuskertoimen. TU-yksikköä tarvitaan laskettaessa toksisuuskuormitusta $(TER = TU \times Q(\frac{1000m^3}{d}))$.

Taulukko 15. Jätevesien myrkyllisyyden LC 50- (96h) arvot 95 % luotettavuusrajoineen.

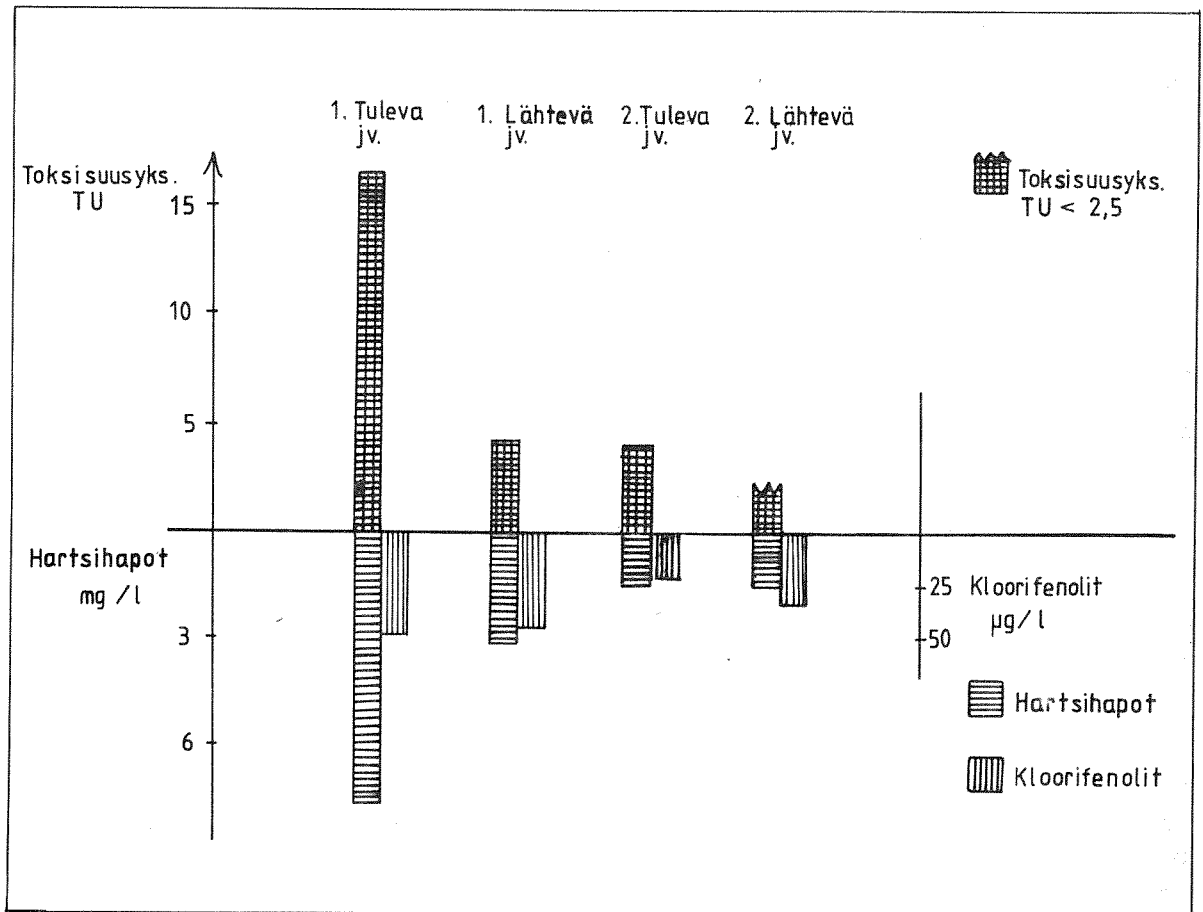
	LC 50 % vol/vol	95 % LR	TU	TER
1. Tuleva jätevesi 11. - 14.11.1981	6,0	5,1 - 7,1	16,7	1038
1. Lähtevä jätevesi 18. - 21.11.1981	23,8	21,1 - 26,9	4,2	261
2. Tuleva jätevesi 24. - 27.11.1981	23,3	19,6 - 27,6	4,3	263
2. Tuleva jätevesi 24. - 27.11.1981 suodatettu	46,5	16,7 - 13,0	2,2	(130)
2. Lähtevä jätevesi 30.11 - 2.12.1981	40,0 (LC 0)	-	2,5	

Kuvassa 22 on esitetty toksisuusyksiköiden ja hartsihappojen ja kloorifenolien kokonaismäärien välinen riippuvuus.

Jätevesien myrkyllisyyden vaihtelu johtuu lähes yksinomaan hartsihappomäärien vaihteluista. Tämä on luonnollistakin, koska sellutehtaan jätevedet muodostavat neljänneksen ja valkaisuon jätevedet, joista kloorifenolit ovat peräisin, vain 10 % jätevesien kokonaismäärästä.

Tuloksista voidaan lisäksi havaita, että jätevesien suodatus vähentää myrkyllisyyttä huomattavasti. Tämä johtuu siitä, että jätevesien kiintoaine saattaa vaurioittaa kiduksia, jolloin myrkylliset aineet pääsevät kidusten kautta helpommin kalaan ja niiden vaikutus tehostuu.

Jätevesien toksisuuskuormituksen (TER) arvot olivat 1. tulevaa jätevesinäytettä lukuunottamatta samaa suuruusluokkaa kuin Holmbom ja Lehtinen (1980) totesivat eräällä sulfaattiselluloosatehtaalla, jossa raaka-aineesta (mänty-koivu) riippuen jäteveden TER-arvot olivat 252 - 340 ja ilmastetussa lammikossa käsittelyn jälkeen 103 - 116.



Kuva 22. Jätevesien TU-arvot sekä hartsihappojen ja kloorifenoleiden kokonaismäärät.

5. YHTEENVETO TULOKSISTA JA NIIDEN TARKASTELU

5.1 JÄTEVESIEN VAIKUTUKSET ELIÖIHIN

Jätevedet voivat vaikuttaa bakteereihin ja leviin joko estämällä tai hidastamalla niiden kasvua ja aineenvaihduntaa, jolloin ne ovat näille eliöille myrkyllisiä, tai edistämällä kasvua ja aineenvaihduntaa, jolloin ne sisältävät näille eliöille sopivaa ravintoa. Testien perusteella voidaan todeta, että käsittelemätön jätevesi edisti koebakteerien kasvua 10 % laimeampina pitoisuuksina, mutta väkevämmät pitoisuudet saattavat estää bakteerien kasvua. Puhdistamolta lähtevä jätevesi inhiboi selvästi bakteerien kasvua kahtena viimeisenä testivuonna. On kuitenkin huomattava, ettei käytetty koeorganismi ole sovelias puunjalostusteollisuuden jätevesien vaikutusten tutkimiseen (vrt. s.27).

Jätevesiä vastaanottavan vesistön bakteerikannalle käsittelemätön jätevesi osoittautui myrkylliseksi, mutta puhdistamolta lähtevän jäteveden vaikutusta ei voida arvioida testin suoritustavan vuoksi. Tutkitut jätevedet sisälsivät leville käyttökelpoisia ravinteita, mutta 10 %:n pitoisuuksina ne alkoivat estää levien perustuotantokykyä. Kokeissa käytetyt levät olivat pääosin piileviä, jotka ovat myrkyllisyydelle herkimpiä vesistössä tavattavista leväryhmistä, mutta jotka ovat vallitsevia viilleän veden aikana. Kesällä hallitsevat viher- ja sinilevät olisivat ilmeisesti vähemmän herkkiä jätevesien vaikutuksille.

Kalatesteissä jätevesialtistus ei veriarvojen perusteella vaikuttanut suuresti kalojen kuntoon. Veren hapenkuljetuskykyä voidaan pitää kohtalaisen normaalina. Punasolujen keskimääräisen hemoglobiinipitoisuuden arvo osoitti kalojen sopeutuneen jätevesialtistuksen aiheuttamaan uuteen tilanteeseen. Valkosolujen määrän lasku osoitti lievää jätevesirasitusta.

Altistusryhmien kalojen veren sokeripitoisuus laski, mikä osoittaa jätevesien aiheuttamaa rasitusta. Samantyyppistä aineenvaihduntahäiriötä osoitti veren maitohappopitoisuuden nousu eräissä altistusryhmissä sekä maksan glukogeenipitoisuuden lasku käsittelemättömissä jätevesissä altistetuissa kaloissa. Plasman natrium-, kloridi- ja proteiinipitoisuuksien nousu osoittivat häiriötä vesi- ja ionitasapainon säätelyssä. Kalojen kuntokerroin oli alhaisin 2 % tulevassa jätevedessä altistetuissa kaloissa. Maksan kokoindeksin arvo laski kaikissa altistusryhmissä.

Aineenvaihduntahäiriötä osoittava plasman laktaattidehydrogenaasi-aktiivisuuden lasku todettiin muissa altistusryhmissä, paitsi 2 % tulevassa jätevedessä altistetuissa kaloissa, joissa aktiivisuus nousi viitaten kudosvaurioon. Plasman aspartaatti-aminotransferaasin aktiivisuuden nousu ja alkaalisen fosfaatin aktiivisuuden lasku lähes kaikissa altistusryhmissä kuvaavat kudosvaurioita. Hermostollisia ja siten kalojen käyttäytymiseen liittyviä muutoksia osoittivat aivojen asetyylikoliinesteriaasin aktiivisuuden nousu ja aktiivisuuden lasku lihaskudoksessa.

Vierasaineenvaihdunnan aktivoitumista osoitti maksan β -glukuronidaasin aktiivisuuden lasku laimeammassa lähtevässä jätevedessä altistetuissa kaloissa. Muissa ryhmissä aktiivisuus kohosi, mikä saattaa osoittaa kudosvaurioita. Vuoden 1979 testeissä, jolloin sellutehtaan jätevedet puuttuivat, olivat erot ryhmien välillä pienimmillään. Munuaisesta määritetty β -glukuronidaasin aktiivisuus osoitti vierasaineenvaihdunnan aktivoituneen käsiteltyssä jätevedessä altistetuissa kaloissa. Käsittelemättömässä jätevedessä altistetuissa kaloissa BG:n aktiivisuuden nousu osoitti kudosvaurioita. Maksan UDP-glukuronosyyli transferaasin aktiivisuus osoitti vierasaineenvaihdunnan yleensä aktivoituneen 0,5 % jätevesissä ja häiriintyneen 2 % jätevesissä altistetuilla kaloilla. Vuoden 1980 testissä aineenvaihdunta oli kuitenkin häiriintynyt kaikissa altistusryhmissä. Plasman bilirubiinipitoisuus osoitti vierasaineenvaihdunnan aktivoituneen käsiteltyssä jätevedessä altistetuissa kaloissa.

Kalojen fysiologisissa toiminnoissa tapahtuneet muutokset olivat samanlaisia kuin on todettu aikaisemmissa puunjalostusteollisuuden jätevesillä tehdyissä tutkimuksissa. Muutoksia havaittiin sekä eri jätevesiväkevyyksissä että toisaalta käsittelemättömässä ja käsitellyssä jätevedessä altistetuilla kaloilla analysoidusta muuttujasta riippuen. Tuloksista voidaan todeta, että muutokset olivat vähäisimpiä 0,5 % lähteessä ja suurimpia 2 % tulevassa jätevedessä altistetuilla kaloilla. Tätä havaintoa vahvistavat haju- ja makuanalyysit sekä kalojen plasmasta ja sapesta määritettyjen hartsihappojen ja kloorifenoleiden pitoisuudet. Jäteveden akuutti myrkyllisyys LC 50 96h kirjolohelle oli tälle teollisuuden alalle tavanomaisella tasolla 10 - 30 %. Käsittely ilmastetussa lammikossa vähensi jäteveden myrkyllisyyttä. Samoin vaikuttivat myös hartsihappojen ja kloorifenoleiden määrän pieneneminen ja jäteveden suodatus.

5.2 TESTIMENETELMIEN ARVIOINTI

Bakteerit ja levät ovat keskeisiä tekijöitä vesiekosysteemissä orgaanisen aineen hajotuksessa ja ravinteiden kierrossa, sekä perustuotannossa ja vesieliöiden ravintona. Häiriöt bakteerien ja levien toiminnassa vaikuttavat siten koko ekosysteemin ravinne- ja energiatalouteen. Nämä eliöt ovat sängen herkkiä ja reagoivat nopeasti muutoksiin vesiekosysteemissä ja ovat siten hyvin käyttökelpoisia esimerkiksi jätevesien vaikutusten tutkimisessa.

Näiden eliöiden herkkyys aiheuttaa toisaalta melko suuret vaatimukset testien suorittamiselle. Tulosten luotettavuus- ja vertailukelpoisuus edellyttävät varsin tarkasti kontrolloituja testiolosuhteita, esim. lämpötilan, valon ja ravinnepitoisuuden suhteen. Lisäksi tutkittavien aineiden, tässä tapauksessa jätevesien käsittelyllä ennen testiä on huomattava merkitys tulosten kannalta. Kuten tämänkin tutkimuksen eri testeissä on havaittu jätevesien sisältämät bakteerit vaikuttavat merkittävästi bakteeri- ja levätestien tuloksiin, joten testit olisi syytä suorittaa sekä suodatetulla että suodattamattomalla jätevedellä.

Bakteeri- ja levätesteissä on keskeistä koeorganismien ja vaikutusten mittaustavan valinta. Näissä testeissä on yleensä käytetty yhden lajin puhtasviljelmiä. Ne ovat toteutukseltaan helppoja ja toistettavia, mutta ekologiselta relevanssiltaan melko huonoja, sillä ne kuvaavat huonosti ekosysteemissä ilmenviä vaikutuksia. Luonnon bakteeri- ja leväpopulaatioiden käyttö on vesistövaikutusten tutkimisen kannalta selvästi parempi vaihtoehto, mutta testioloja on silloin vaikeampi kontrolloida. Tulosten keskinäinen vertailukelpoisuus vähenee, sillä eri bakteeri- ja leväryhmät, jopa lajit reagoivat eri tavoin ympäristön muutoksiin ja myös testien aikana saattaa koeryhmissä tapahtua muutoksia sopeutuvampien korvatesa huominnin sopeutuvia.

Testissä olisi siis valitun vaikutusten mittaustavan ohella tarkkailtava myös koeorganismien lajistossa tapahtuvia muutoksia. Bakteeritesteissä olisi tärkeää mitata jätevesien vaiku-

tusta bakteerien suorittamaan orgaanisen aineen hajotukseen, esimerkiksi tutkimalla vaikutusta bakteerien glukoosinottoon, joka on myös menetelmänä herkempi kuin tässä tutkimuksessa varsinaisesti käytetty pesäkelukumäärien muutosten seuranta (vrt. Lahti 1980).

Levätesteissä mitataan lähinnä levien kasvua tai yhteyttämistä. Tässä tutkimuksessa mitattu perustuotantokyky on nopea ja herkkä menetelmä välittömien vaikutusten toteamiseksi, mutta toisaalta se vaatii kontrolloidummat koeolot kuin levien kasvuun perustuvat menetelmät (Lahti 1980).

Jätevesien vaikutusten tutkimisessa on pyrittävä saamaan myös tutkittavat vedet siten, että ne edustaisivat varsinaista jätevesikuormitusta mahdollisimman hyvin. Puunjalostusteollisuuden jätevedet vaihtelevat laadultaan melko paljon tuotannon ja prosessin muutosten mukaisesti ja kokonaisvaikutusten selvittämiseksi on testattava erilaisilla jätevesillä ja käytettävä erilaisia kokoomanäytteitä.

Kaloja on käytetty koe-eläiminä toksisuuden määrittämisessä pitempään kuin mitään muuta eliöryhmää. Aikaisemmin kalaston merkitys vesien "elintoiminnoissa" oli korostunut. Kalastolla on tärkeä taloudellinen merkitys. Tuolloiselle akuutin myrkyllisyyden määrittämiselle kalojen suurehko koko oli merkittävä etu. Nykyisin ekosysteemin toimivuuden kannalta leviä ja bakteereja voidaan pitää eräissä suhteissa kaloja merkittävämpinä eliöryhminä. Samoin akuutin myrkyllisyyden määrittämisessä kalan koko on nykyisin pikemminkin haitta kuin etu. Kalatestit vaativat monimutkaisemmat koejärjestelyt ja tulevat siten kalliimmiksi kuin alemmilla eliöillä suoritetut testit. Suurehkon kokonsa vuoksi kaloja käytetään nykyisin muita eliöryhmiä yleisimmin määritettäessä vieraiden aineiden kertymistä. Kalat ovat myös merkittävin eliöryhmä tutkittaessa vieraiden aineiden vaikutusmekanismeja.

Tuloksen tulkittavuuden kannalta kalatestit vaativat hyvin kontrolloidut koeolosuhteet. Pitkäaikaistesteissä näytteenotto sekä näytteiden käsittely ja analysointi vaativat vakioitun menetelmän, johon viime vuosien tutkimusten perusteella on jo suurimaksi osaksi päästykin. Puunjalostusteollisuuden jätevesien kemiallisessa analysoinnissa on myös päästy varsin pitkälle, joskin eliöiden kudosten analysoimisessa on vielä lukuisia ongelmia eikä kaikkia eliöille haitallisia yhdisteitä ole vielä kyetty tunnistamaan.

Akuutin myrkyllisyyden määrittämisessä käytetty LC 50 96 h- testi kirjolohella kuvasi hyvin niitä muutoksia jäteveden laadussa, jotka todettiin kemiallisilla analyyseilla. Lähinnä puunjalostusteollisuuden jätevesillä tehdyissä tutkimuksissa saatiin kokeuksiin pohjautuen tullaan tästä menetelmästä laatimaan vesihaltuuden suositus.

Pitkäaikaisessa kalatestissä saadut tulokset kalojen fysiologiset tilasta, haju- ja makuanalyyseistä sekä sappeen ja plasmaan kertyneistä aineista seurasivat lähes poikkeuksetta jätevesien laadussa todettuja muutoksia. Fysiologisessa tutkimuksessa analyysimenetelmät on jo saatu suosituksiksi. Tulosten kalataloudellisen merkityksen arvioimiseksi tarvitaan kuitenkin lisätutkimuksia.

Haju- ja makuanalyysien menetelmiä voidaan pitää käyttökelpoisina jätevesitutkimuksissakin. Nykyisin haitallisten aineiden kemiallista analytiikkaa voidaan pitää luotettavana. Menetelmiä uusille yhdisteryhmille ja näytetyypeille tulisi kuitenkin kehittää.

Määritettäessä vieraiden aineiden haittavaikutuksia ekosysteemiin eli niiden ekotoksisuutta pyritään testausmenettelyyn, jonka ekologinen merkittävyys on mahdollisimman suuri ja jossa on edustettuna useiden eri eliöryhmien eliöitä. Akuutin myrkyllisyyden määrittämisen lisäksi tulisi tutkia myös vaikutuksia eliöiden elintoimintoihin.

Vieraiden aineiden hajoavuus ja kertyminen eliöihin ovat myös tärkeitä tekijöitä haittavaikutuksen arvioinnin kannalta ja laajentavat olennaisesti testikokonaisuuden edustavuutta. Jätevesitutkimuksissa ei jäteveden kemiallista luonnehdintaa tulisi jättää kokonaisuudesta.

Tässä tutkimuksessa levillä, bakteereilla ja kaloilla suoritettujen akuutin myrkyllisyyden määritykset täydensivät hyvin toisiaan. Tuloksista voidaan havaita eri eliöryhmien välisiä herkkyseroja. Tosin erot jätevesinäytteiden edustavuudessa vaikuttavat tuloksiin. Kalojen pitkäaikaistesteissä saadut tulokset kalojen fysiologisista toiminnoista sekä niitä ainakin osittain selittävät kertymä, haju- ja makuanalyysit sekä jätevesien kemialliset analyysit täydentävät oleellisesti kuvaa jätevesien vaikutuksista eliöihin, puhdistamon toiminnasta myrkyllisten aineiden kannalta sekä jätevesien vesistövaikutuksista.

5.3 JÄTEVESIEN PUHDISTUKSEN TEHOKKUUS ELIÖIDEN KANNALTA

Jätevedenpuhdistamon kiintoaine- ja KHT -reduktiot tutkimusajalta on esitetty taulukossa 16. Koejakson aikaiset reduktiot on laskettu tulevan ja lähtevän jäteveden päivittäisistä kiintoaine- ja KHT-pitoisuuksista puhdistamon viipymä huomioiden. Koko vuoden arvot on laskettu kuukausittaisista keskiarvoista. Vuoden 1981 kiintoainereduktio on laskettu vain tammi-helmikuun tiedoista, koska sen jälkeen ilmoitetut jätevesi kiintoainemäärät eivät ole vertailukelpoisia mittauksessa käytetyn suotimen vaihtamisen vuoksi. Hartsihappojen ja kloorifenoleiden reduktiot on laskettu lyhytaikaistestejä varten kerätyistä jätevesistä.

Taulukko 16. KHT- ja kiintoainereduktiot (%) jätevedenpuhdistamolla koejaksojen aikana ja tutkimusvuosina sekä puhdistamon kuormitus/kapasiteetti (%) koejaksojen ja niitä edeltävien kahden kuukauden keskiarvoina. Hartsihappojen ja kloorifenoleiden reduktio puhdistamolla marraskuussa 1981.

	1979		1980		1981	
	koejakson aikana	koko vuonna	koejakson aikana	koko vuonna	koejakson aikana	koko vuonna
KHT	50	35	40	44	30	37
kiintoaine	87	77	74	81	50	43
hartsihapot					55	
kloorifenolit					5	
kuormitus/ kapasiteetti (35 m ³ /min)	41		105			118

Jäteveden käsittelyn vaikutusta voidaan tarkastella tulevan ja lähtevän jäteveden laatutietojen vertaamisen ohella myös biologisten testien tulosten perusteella. Tässä tutkimuksessa käytetyistä testeistä puhdistamon toimintaa on tarkoituksenmukaisinta arvioida kalojen fysiologisten testien, kertymis- ja makutestien sekä LC 50- testien perusteella. Bakteeri- ja levätestit eivät tähän sovellu huonon edustavuutensa vuoksi, koska niissä käytetyt koevedet otettiin kerta-näytteinä, jolloin puhdistamon viipymä ja jätevesien laadun vaihtelu estävät vertailun luotettavasti.

Jäteveden laadun vaihtelut vaikeuttavat myös puhdistamon toiminnan arviointia kalatestien avulla. Tämä todettiin selvästi sekä vuoden 1979 että 1981 tutkimuksissa, jolloin jäteveden laatu muuttui kala-altistusten lopulla. Hartsihapot ja kloorifenolit, jotka osaltaan vaikuttavat myös kalan haju- ja makuominaisuuksiin kertyvät kaloihin hyvin nopeasti. Nämä yhdisteet vaikuttavat merkittävästi useimpiin fysiologisiin muuttujiin, joskin vaikutus on kertymistä hitaampi. Vaikka tässä tutkimuksessa todettiin, että kaikki pitkäaikaisvaikutukset olivat vähäisempiä 0,5 % lähtevässä jätevedessä kuin tulevassa tai 2 % lähtevässä jätevedessä, voidaan puhdistamon toimintaa myrkyllisten aineiden osalta käytännössä arvioida luotettavimmin lyhytaikaisilla LC 50- testeillä sekä riittävän tiheään otetuilla vesinäytteiden kemiallisilla analyyseillä. Häiriöttömissä oloissa voidaan tutkittua ilmaistettua lammikkoa pitää melko tehokkaana jätevesien myrkyllisyyden poistajana. Kloorifenoleiden poistossa eli valkaisuvesien käsittelyssä tarvittaisiin kuitenkin vielä muita menetelmiä.

5. T I I V I S T E L M Ä

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää integroidun puunjalostusteollisuuslaitoksen jätevesien biologisia vaikutuksia levä-, bakteeri-, pohjaeläin- ja kalatestein. Keskeisenä lähtökohtana oli selvittää vaikutuksia pitoisuustasolla, joka saattaa esiintyä vesistössä tehtaiden lähialueella. Lisäksi selvitettiin jätevesien alinta vaikutustasoa ja akuuttia myrkyllisyyttä. Tutkimuksen toisena tavoitteena oli selvittää käytettyjen menetelmien käyttökelpoisuutta jätevesien vaikutusten arvioinnissa sekä erillisinä testeinä että osana sellaista testikokonaisuutta, jota viranomainen voisi käyttää perustana arvioidessaan jätevesien kokonaisvaikutuksia ja suunnitellun vesiensuojelutoimenpiteitä. Lisäksi tutkimuksen tulosten pohjalta pyrittiin arvioimaan jätevesien puhdistukseen rakennetun ilmastetun lammikon tehoa vähentää jätevesien eliöille haitallisia vaikutuksia.

Tutkimus suoritettiin vuosina 1978 - 1981 useiden erilaisten prosessi- ja jätevedenkäsittelyvaiheiden aikana. Vuonna 1978 sellun keitto tapahtui sulfiittiprosessilla ja jäteveden puhdistamolla oli toiminnassa vain mekaaninen osa. Vuonna 1979 sulfiittiprosessi oli lopetettu ja jätevesien biologinen käsittely oli alkanut. Vuosien 1980 - 81 uusi sulfaattiprosessi oli toiminnassa samoin kuin jätevesien biologinen käsittely ilmastetussa altaassa.

Bakteeritesteissä todettiin käsittelemättömän jäteveden edistävän koebakteerien kasvua 10 %:a laimeampina pitoisuuksina. Sen sijaan puhdistamolta lähtevä jätevesi oli kahdella viimeisellä testikerralla (1980 ja -81) selvästi myrkyllistä bakteereille. Käytettyjä testiorganismeja ei kuitenkaan voida pitää kovin sopivina puunjalostusteollisuuden jätevesien testaukseen.

Jätevesien vaikutusta vastaanottavan vesistön bakteereiden glukoosinottoon tutkittiin kaksi kertaa vuonna 1981. Puhdistamolalle tuleva jätevesi 1 - 20 % pitoisuuksina vähensi bakteereiden glukoosinoton ensimmäisellä testikerralla 55 - 70 %:iin verrattuna kontrolliin. Jätevesien laatu muuttui tehtaiden prosessimuutosten vuoksi ja toisella testikerralla puhdistamolalle tuleva jätevesi oli bakteereille selvästi myrkyllisempää kuin edellisellä kerralla lamauttaen bakteerien glukoosinoton 7 - 30 %:iin kontrollista.

Levätesteissä todettiin sekä puhdistamolalle tulevan että sieltä lähtevän jäteveden lisäävän vastaanottavan vesistön levästön (lähinnä piileviä) perustuotantokykyä alle 10 % pitoisuuksina.

Kalatestit suoritettiin kirjolohilla ja niiden pääasiallisena tarkoituksena oli selvittää jätevesien pitkäaikaisia vaikutuksia subletaaleissa pitoisuuksissa kalojen fysiologiaan eli terveyden tilaan. Näissä 3 - 4 viikkoa kestäneissä jät-vesialtistuksissa 0,5 ja 2 % jätevedelle selvitettiin myös jätevesistä peräisin olevien yhdisteiden kertymistä kaloihin sekä kalojen haju- ja makuhaittojen syntymistä. Vuonna 1981 tutkittiin myös jätevesien akuuttia myrkyllisyyttä kaloille.

Fysiologisia muutoksia todettiin kalojen rasitusmuuttujissa, energia-aineenvaihdunnassa, vesi- ja ionisäätelyssä sekä kudonvaurioita ja vierasaineenvaihdunnan tilaa kuvaavissa muuttujissa. Muutoksia todettiin toisaalta jäteveden konsentraation ja toisaalta jäteveden käsittelyn suhteen. Tuloksista voitiin todeta, että muutokset olivat vähäisimpiä 0,5 % lähtevässä ja suurimpia 2 % tulevassa jätevedessä altistetuilla kaloilla. Muutokset olivat yleensä samantyyppisiä kuin on aikaisemminkin todettu sellu- ja paperitehtaiden jät-vesialtistuksissa. Samantapaisia, joskin vähäisempiä, muutoksia todettiin tehtaiden alapuolisesta vesistöistä pyydetyissä särjissä, joita tutkittiin vuonna 1978.

Puhdistamattomassa 2 % jätevedessä altistetut kalat todettiin jokaisella testikerralla ihmisravinnoksi kelpaamattomaksi selvän jäteliemen maun vuoksi. Lievempiä haju- ja makuvirheitä todettiin muissakin jätevesille altistetuissa kalaryhmissä. Lähes kaikissa tehtaiden alpuoliselta vesialueelta pyydetyissä särki- ja haukinäytteissä todettiin haju- ja makuvirheitä.

Vuonna 1981 tutkituista kalojen sappi- ja plasmanäytteistä todettiin hartsihapoista palustrini-, abiетиini-, sandarako-pimaari-, pimaari-, isopimaari- ja dehydroabietiinihappoa, joista jälkimmäisen pitoisuus oli korkein. Hartsihappojen kokonaispitoisuudet olivat plasmassa 0,9 - 4,0 $\mu\text{g/g}$ ja sapessa 6,4 - 31,5 $\mu\text{g/g}$ (tuorep. kohti). Vastaavat konsentraatio-

kertoimet olivat 24 - 75 ja 355 - 1430. Kloorifenoleista todettiin plasmasta ja sapesta tri-, tetra-, ja pentakloorifenolia sekä tri- ja tetraklooriguajakolia. Jätevesissä esiintyneitä kloorikategorioita ei näissä näytteissä todettu. Muissa yhdisteissä todettiin pieniä määriä trikloorisymeeniä. Kloorifenoleiden kokonaispitoisuudet olivat plasmassa 0,10 - 0,54 µg/g ja sapessa 0,65 - 12,9 µg/g (tuorep. kohti). Vastaavat konsentraatiokertoimet olivat 125 - 1450 ja 4500 - 21 700.

Vuonna 1981 määritettiin jäteveden akuuttimyrkyllisyys (LC 50 96 h) kirjolohelle. Puhdistamolle tulevien jätevesien LC 50-arvot olivat 6,0 - 23,8 tilavuusprosenttia ja sieltä lähtevien 23,8 - yli 40 tilavuusprosenttia. Myrkyllisyys vaihteli jätevesien hartsihappopitoisuuden vaihtelujen mukaisesti.

Bakteeri- ja levätesteillä on keskeinen asema arvioitaessa jätevesien vaikutuksia vesiekosysteemiin. Tässä tutkimuksessa mitattu levien perustuotantokyky on nopea ja herkkä menetelmä välittömien vaikutusten toteutamisessa, mutta toisaalta se vaatii kontrolloidummat koeolot kuin levien kasvuun perustuvat menetelmät. Bakteeritesti, joka mittaa jätevesien vaikutusta bakteerien glukoosinottoon ja jota käytettiin v. 1981 tutkimuksessa on menetelmänä herkempi kuin tässä tutkimuksessa varsinaisesti käytetty pesäkelukumäärän seuranta. Jätevesien sisältämät bakteerit saattavat vaikuttaa suuresti levä- ja bakteeritesteihin, joten testit tulisi suorittaa myös suodatetuilla näytteillä.

Pohjaeläintestien todettiin vaativan vielä perustutkimusta ennen kuin niitä voidaan soveltaa jätevesitutkimuksiin. Kalatestit vaativat hyvin kontrolloidut koeolot. Sekä lyhyt- että pitkäaikaisvaikutusten mittaamenetelmiä että näiden tutkimusten yhteydessä käytettävää kemiallista analytiikkaa voidaan pitää rutinitutkimukseen soveltuvina. Jätevesitutkimuksissa tulisi akuutin myrkyllisyyden määrittämisen lisäksi pyrkiä selvittämään joko pitkäaikaisvaikutuksia tai haitallisten aineiden kertymistä.

Tässä tutkimuksessa levillä, bakteereilla ja kaloilla suoritettujen akuutin myrkyllisyyden määritykset täydensivät hyvin toisiaan. Jätevesitutkimuksissa tulisikin pyrkiä useiden testien kokonaisuuteen, jolloin saatavan tiedon ekologinen merkittävyys eli relevanssi on suurempi kuin yhdellä testillä saatu tieto.

Jätevesien puhdistukseen rakennetussa ilmastetussa lammikossa oli v. 1979 - 1981 tutkimusten aikana KHT:n reduktio 30 - 50 % ja kiintoaineen reduktio 50 - 87 %. Eliöille haitallisten hartsihappojen ja kloorifenolien reduktiot olivat (1981) 55 % ja 410 %. Jätevesien käsittely vähensi akuutin myrkyllisyyden kaloille alle puoleen. Käsittely myös lievensi kaloissa todettuja pitkäaikaisvaikutuksia.

S U M M A R Y

Effects on aquatic biota of effluents from integrated wood processing plant has been studied by biotests using bacteria, algae and fish as test organisms. Applicability and ecological relevance of the methods used were evaluated. A third objective was to study the reduction of toxicity in an aerated stabilization basin, which was built for the purification of effluents.

The effluents studied were combinations of different pulping (sulphite, kraft, mechanical, thermomechanical) and effluent purification (mechanical, biological) alternatives. Effluents contained also waters of paper and cardboard manufacturing.

In tests with bacteria both mixed populations extracted from municipal wastewater and coliforms were used. Due to high content of organic material in untreated effluent which serves as a nutrient for the organisms effluent concentrations up to 10 % usually stimulated the growth of bacteria. Only in a couple of cases an inhibition of growth at this highest concentration tested was observed. When the purification decreased the content of organic material the inhibition became evident already at 0.2 % effluent concentration. Difficulties in the interpretation of the results make this test less suitable for effluent studies in pulp and paper industry.

In another bacterial test effects of effluent on the uptake of glucose of bacterial population extracted from upstream control watercourse was studied. Untreated effluent gave a clear inhibitive response, at 20 % effluent concentration down to 7 % of the control value. Treated effluent gave a clear stimulating effect up to 7.5 times compared to control. This method has proved to be sensitive and well reproduceable.

In algal test effects of effluent on primary production ability was measured. Natural population of algae was extracted from upstream control watercourse. Highest test concentration, 10 % of both untreated and treated effluent gave usually a clear inhibitive response, while lower concentrations gave stimulating response. This test reveals a clear response, at the moment, but owing to the changing structure of natural algal populations the results cannot be generalized. The ecological relevance of this test is however higher than in tests where pure cultures of algae are used.

Acute toxicity to fish, rainbow trout, was measured by static LC 50 96 h tests. LC 50 -values of untreated effluent were 6.0-23.8 % and those of biologically treated effluent 23.8-over 40 %. The toxicity varied according to varying resin acid concentrations which in the untreated effluent were 6.7-1.5 mg/l and in the treated effluent 3.1-1.5 mg/l. Respective total chlorophenol concentrations were 48-21 $\mu\text{g/l}$ and 45-35 $\mu\text{g/l}$. The test is considered suitable for routine effluent studies.

Effects on physiology of rainbow trout were studied in 3-4 weeks tests in sublethal 0.5 and 2 % effluent concentrations. Biochemical analysis revealed both adaptive and adverse effects on blood values, metabolism, osmoregulation and detoxication. Tissue and neural function were also affected. The effects were both concentration and effluent treatment dependent. 2 % untreated effluent gave strongest impact and 0.5 % treated effluent the slightest one. More physiological research is needed to correlate results of this kind test to toxicant exposure and all over welfare of fish.

Long-term tests with rainbow trout included bioaccumulation and organoleptic studies. Total resin acid concentrations in fish plasma were 0.9-4.0 $\mu\text{g/g}$ (fresh weight) and in bile 6.4-31.5 $\mu\text{g/g}$. Respective bioconcentration factors were 24-75 and 355-1430. Total chlorophenol concentrations were in plasma 0.10-0.54 $\mu\text{g/g}$ and in bile 0.65-12.9 $\mu\text{g/g}$ and bioconcentration factors 125-1450 and 4500-21700. The fish exposed to 2.5 % untreated effluent were judged unfit for human consumption for their off-flavor and odor. Organoleptic properties of other fish exposed to effluents were slightly better. When bioconcentration can not be determined by chemical analyses, organoleptic studies can give a rough estimate of bioaccumulation in effluent studies of pulp and paper mills.

In aerated stabilization basin the reduction of resin acids was 55 % and that of chlorophenols below 10 %. The reduction of acute toxicity to rainbow trout was over 50 %. The biological treatment reduced also effects on bacteria and algae and long-term effects on fish.

The results of this study clearly show that ecotoxicological approach, where different tests with many organisms complete each other is necessary to get sufficient information on the effects of industrial effluents to aquatic biota.

K I R J A L L I S U U S

- Ahokas, J.T., Kärki, N.T., Oikari, A. & Soivio, A. 1976: Mixed function mono-oxygenase of fish as an indicator of pollution of aquatic environment by industrial effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 3: 270-274.
- Castrén, M. & Oikari, A. 1978: Hartsihappojen sekä metsäteollisuuden jätevesien pilaaman veden vaikutuksista kalojen detoksikaatioaineenvaihduntaan. Moniste Pupro. Helsinki
- Dutton, G.J. (Ed.) 1966: Glucuronic acid. Free and combined. Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Medicine. Academic Press. New York and London.
- Eloranta, P. & Eloranta, V. 1974: Influence of effluents of sulphite cellulose factory on algae in cultures and receiving waters. *Vatten* 30, 1: 36-48.
- Eloranta, V. 1976: The influence of sulphate cellulose effluents on the growth of green algae (*Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs. var *acicularis* (A. Braun, G.S. West)). *Vatten* 32, 1: 20-37.
- Eloranta, V. & Eloranta, P. 1980: Algal assays on waters receiving sulphite and sulphate cellulose effluents. *Ann. Bot. Fennici* 17, 1: 26-34.
- Erkomaa, K., Mäkinen, I. & Sandman, O. 1977: Vesiviranomaisten ja julkisen valvonnan alaisten vesitutkimuslaitosten fysikaaliset ja kemialliset analyysimenetelmät. Vesihallituksen tiedotus 121. 54 s.
- Goldman, C. 1978: The use of natural phytoplankton populations in bioassay. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21,1: 364-371.
- Holdich, D.M. & Tolba, M.R. 1981: Effects of temperature and water quality on the in vitro development and survival of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda) eggs. *Hydrobiologia* 78: 227-236.
- Holmbom, B. 1980: A procedure for analysis in toxic compounds in pulp and paper mill wastewaters. *Paperi ja Puu* 62, 9: 523-531.
- Holmbom, B. & Lehtinen, K.-J. 1980: Acute toxicity to the fish of kraft pulp mill wastewater. *Paperi ja Puu* 62, 11: 673-684.
- Jokinen, S. 1979: Pietarsaaren edustan merialueen tilasta ja Oy Wilh. Schauman AB:n sulfaattiselluloosan valkaisun alkaalisen suodoksen biologisen käsittelyn vaikutuksista siihen levätestien perusteella. Esitelmä Biologiset tutkimusmenetelmät -kurssilla, Espoo 5-6.6.1979.

- Kohonen, T. 1971: Myrkyllisyydestin suoritusohjeet. Moniste Vesihallitus. Oulu 25-26.11.1971. 7 s.
- Kruzynski, G. 1979: Ph. D. thesis. University of B.C. Vancouver B.C.
- Kuopion vesipiiri 1980: Tutkimus integroidun metsäteollisuuden jätevesien vaikutuksesta purkuvesistön eliöihin. Vuosien 1978-79 tutkimukset A. Ahlström Osakeyhtiön Varkauden tehtailla. Vesihallituksen monistesarja 1980: 32. 49 s.
- Kuparinen, J. 1981: Sulfiittiselluloosatehtaan jätevesien ja eräiden raskasmetalli- ja orgaanisten yhdisteiden vaikutus vesistön bakteeritoimintaan. Vesihallituksen tiedotus 204. 55 s.
- Kuusi, T. 1973: Kalojen aistivaraaisesta arvostelusta ja arvostelun perusteista. Suomen kalastuslehti 80: 45-50.
- Lahti, K. 1980: Bakteeri- ja levämyrkyllisyydestit. Kirjallisuusselvitys. Vesihallituksen tiedotus 201. 49 s.
- Lahti, K., Talsi, T. 1982: Rautaruukki Oy:n Raahen rautatehtaan jätevesien vaikutukset merialueen levä- ja bakteeritoimintaan. Vesihallituksen monistesarja 1982: 116. 59 s.
- Leach, J.M. & Thakore, A.N. 1975: Isolation and identification of constituents toxic to juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in caustic extraction effluents from kraft pulp mill bleach plants. J. Fish. Res. Bd. Can. 32: 1249-1297.
- Leach, J.M. & Thakore, A.N. 1976: Toxic constituents in mechanical pulping effluents. Tappi 59, 2: 129-132.
- Mc Leay, D.J. 1973: Effects of a 12-hr and 25-day exposure to kraft pulp mill effluent on the blood and tissues of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can. 30: 395-400.
- Mc Leay, D.J. & Brown, D.A. 1979: Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulp mill effluents on the biochemistry and of stamina juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can. 36: 1049-1059.
- Miettinen, V., Lönn, B-E. & Oikari, A. 1982a: Effects of biological treatment on the toxicity for the fish of combined debarking and kraft pulp bleaching effluent. Paperi ja Puu 54, 4: 251-254.
- Miettinen, V., Nakari, I. & Ruoppa, M. 1982b: Kajaani Oy:n sulfiittisellu- ja paperitehtaan jätevesien vaikutuksista kirjolohen fysiologiaan. Vesihallituksen monistesarja 1982: 150.

- Moilanen, P. 1982: A. Ahlström Osakeyhtiö. Ympäristönsuojelu. Moniste. Esitelmä oppaiden peruskurssilla 1.3.1982 3 s.
- Oikari, A. & Holmbom, B. 1981: Analysis of trout bile can be used for monitoring resin acid load in receiving waters. Proceedings of workshop on effects of pulp mill bleaching effluents on the northern receiving waters. Helsinki 1981.
- Oikari, A., Holmbom, B., Änäs, E. & Bister, H. 1980: Distribution in a recipient lake and bioaccumulation in fish of resin acids from kraft pulp mill waste-waters. Paperi ja Puu 62, 4: 193-202.
- Oikari, A. & Soivio, A. 1978: Metsäteollisuuden pilaaman Valtianjärven veden vaikutuksesta järvitäminen ja kirjoloihen fysiologiaan. Moniste. Pupro. Helsinki.
- Oikari, A., Soivio, A., Tuurala, H., Nyholm, K., Kajava, R. & Miettinen, V. 1979: Fysiologisia tutkimuksia liikaantuneiden vesistöjen hauesta (*Esox lucius* L.) ja tulosten soveltuvuudesta veden laadun arvioinnissa. Vesihallituksen tiedotus 166: 1-49.
- Paasivirta, J., Särkkä, T., Leskijärvi, T. & Roos, A. 1980: Transportation and enrichment of chlorinated phenolic compounds in different aquatic food chains. Chemosphere 9: 441-456.
- Salkinoja-Salonen, M., Saxelin, M-L., Pere, J., Jaakkola, T., Saarikoski, J., Hakulinen, R. & Koistinen, O. 1981: Analysis of toxicity and biodegradability of organic chlorine compounds released into the environment in bleaching effluents of kraft pulping. Keith, L.M. (Ed.) Advances in the identification & analysis of organic pollutants in water. 2: 1131-1164.
- Seppovaara, O. & Numminen, S. 1974: The effect of municipal and forest industry effluents upon algae production and the primary production ability of plankton. Paperi ja Puu 56, 6: 523-530.
- SITRA 1970: Ympäristön pilaantuminen ja sen ehkäiseminen. Sarja B nro 2. Helsinki 1970.
- Talsi, T. 1981: Bakteerien glukoosinotto selluteollisuuden jätevesien vaikutusten arviointimenetelmänä. Vesihallituksen monistesarja 1981: 83. 98 s.
- Voss, R.H., Wearing, J.T., Mortimer, R.D., Kovacs, T. & Wong, A. 1980: Chlorinated organics in kraft bleachery effluents. Paperi ja Puu 62, 12: 809-814.
- Voss, R.H., Wearing, J.T. & Wong, A. 1981: Effect on softwood chlorination conditions on the formation of toxic chlorinated compounds. Pulp and Paper Can. 82, 2: 97-105.

Marja Ruoppa
Sinikka Tähkä¹⁾

RASKASMETALLIEN VAIKUTUSTEN SELVITTÄMINEN TUTKIMALLA
KALOJEN ALKIONKEHITYSTÄ JA POIKASVAIHEITA HISTOLOGISIN
MENETELMIN

1) Helsingin yliopisto, eläintieteenlaitos, kehitysfysio-
logian osasto, Arkadiankatu 7, 00100 Helsinki 10

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT

1. JOHDANTO

2. MATERIAALI JA MENETELMÄT

- 2.1. Koe-eläimet
- 2.2. Koejärjestelyt
- 2.3. Kalojen kudetus
- 2.4. Histologinen menetelmä
- 2.5. Kokeiden suoritus

3. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

- 3.1. Kuparialtistukset
- 3.2. Nikkelialtistukset
- 3.3. Kobolttialtistukset
- 3.4. Jätevesialtistukset

4. YHTEENVETO

KIRJALLISUUS

KUVAT 1 - 13

TAULUKOT 1 - 3

A L K U S A N A T

Tutkimus rahoitettiin pääosin Maj & Tor Nesslingin Säätiöltä saadulla apurahalla.

Tämän lisäksi haluamme kiittää Helsingin yliopiston eläintieteen laitoksen kehitysfysiologian osaston henkilökuntaa tilojen järjestämisestä ja avusta kalojen hoidossa sekä erityisesti dos. Anto Leikolaa ja FK Marja Muonaa antoisasta yhteistyöstä.

Tutkimustuloksilla on osallistuttu Nordforskin yhteispohjoismaiseen projektiin "Ekotoksikologiska metoder i akvatisk miljö" 1979-1981.

1. J O H D A N T O

Viime vuosina on kehitetty lukuisia uusia menetelmiä aineiden myrkyllisyyden määrittämiseksi vesistöissä. Jotta tällaisille vesistöön päästettäville kemikaaleille ja jätevesille voitaisiin asettaa luotettavammalla sallittavat pitoisuusrajat, tulee myrkyllisten aineiden akuutit ja krooniset vaikutukset testata vesieliöiden avulla. Tutkimustuloksia aineiden akuutista myrkyllisyydestä vesieliöille on käytettävissä runsaasti. Suurin osa näistä tuloksista perustuu staattisiin LC-50 kokeisiin, joiden avulla saadaan kuitenkin vain osittaista tietoa kemikaalien ja jätevesien myrkyllisyydestä. Nykyisin pidetäänkin välttämättömänä myös kroonisten subletaalien vaikutusten selvittämistä aineiden myrkyllisyyden kartoituksessa.

Erilaisten ympäristömyrkköjen vaikutuksia kalojen lisääntymiseen ja varhaiskehitykseen on viime aikoina ryhdytty innolla tutkimaan. Tällaisia tutkimuksia on tehty sekä luonnonkaloilla että ns. akvaariokaloilla lähinnä laboratorio-oloissa. Tutkimukset ovat käsitelleet mm. öljyn ja emulgointiaineiden (Ernst et al. 1977, Linden 1976, 1978), rikki-vedyn (Adelman & Smith 1970), erilaisten torjunta-aineiden (Shehar et al. 1979) ja "myrkköjen" (Olson & Marking 1973, Hodson & Blunt 1981, von Westernhagen et al. 1981) sekä raskasmetallien myrkyllisyyttä (mm. Sauter et al. 1976, Ozoh 1979, 1980a, 1980b, McKim et al. 1978). Tutkittuja parametrejä ovat mm. olleet mädin kuolleisuus ja kuoriutumisen (Hodson & Blunt 1981), alkion liikkeit ja sydämen lyöntitiheys (Lindén 1976), erilaiset rakenteelliset epämuodostumat sekä aineiden kertyminen (Bengtsson 1975, Weis & Weis 1977, Ozoh 1979, von Westernhagen et al. 1981). Tutkimustulosten perusteella mätimunilla ja eri poikasvaiheilla suoritettavat kokeet ovat osoittautuneet osaltaan tehokkaaksi ja luotettavaksi keinoksi selvittää aineiden kroonisia vaikutuksia eri kalalajeilla lyhytaikaisin kokein. Kalojen mädinkehityksen ja eri poikasvaiheiden on osoitettu olevan erittäin herkäät ympäristömyrkköjen vaikutuksille. Nämä kehitysvaiheet ovat niin ikään tärkeitä lajien säilymisen kannalta.

Kalojen mäti- ja poikastutkimusten etuna on mahdollisuus käyttää suurta ja homogeenista tutkimusaineistoa kerralla. Kalojen mädinkehitystä voidaan niin ikään seurata mikroskooppisesti verraten vaivattomasti sekä in vivo että in vitro ja rekisteröidä muutoksia kehitysnopeudessa tai -tavassa. Tällaisten koejärjestelyjen avulla on kyetty kartoittamaan, mitkä kehitysvaiheet ovat helpoimmin vahingoittuvia (Grande 1966, Mount 1968, Mount & Stephan 1969, Hazel & Meith 1970, McKim & Benoit 1971).

Seeprakalan mätimunat sopivat erinomaisesti myrkyllisyystutkimuksiin sekä alkionkehitys- ja poikaskokeisiin, sillä ne ovat läpinäkyviä, kehittyvät nopeasti ja ne ovat helposti altistettavissa kemikaaleille ilman mekaanisia vaurioita (Laale 1971). Hisaoka & Battle (1958) sekä Hisaoka & Firlit (1960) ovat kuvanneet seeprakalan normaalin alkionkehityksen sekä histologisesti että mikroskooppivalokuvauksella. Erilaisten aineiden vaikutuksia seeprakalan mätiin ja poikasiin ovat puolestaan tutkineet mm. Cairns et al. (1965), Anderson & Battle (1966), Laale (1971), Roales & Perlmutter (1974), Niimi & LaHam (1976), Speranza et al. (1978) sekä Yosha & Cohen (1979). Tutkimukset ovat keskityneet lähinnä mädin kuolleisuuden, kuoriutumisen sekä poikasten eloon jäämisen seurantaan. Raskasmetallien, etenkin kuparin ja lyijyn, vaikutuksia seeprakalojen mädin varhaiskehityksen histopatologiaan on sen sijaan tutkittu verraten vähän (Ozoh 1979, 1980a, 1980b).

Seeprakalaa käytetään nykyään kansainvälisesti standarditesteissä. Parhaillaan on valmistumassa mm. ISO:n (International Organization for Standardization) standardit aineiden akuutin myrkyllisyyden määrittämiseksi.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on ollut kehittää käyttökel-poinen kalojen lisääntymiseen liittyvä testimenetelmä kemikaalien ja jätevesien myrkkyyvaikutusten toteamiseksi. Kokeiden pääpaino on ollut koejärjestelmän kehittämisessä, jotta lisääntymistestiä voitaisiin käyttää yleisenä, mahdollisimman yksinkertaisena myrkyllisyyttä osoittavana testimenetelmänä.

2. M A T E R I A A L I J A M E N E T E L M Ä T

2.1. KOE-ELÄIMET

Tutkimuskohteeksi valittiin särkikaloihin (Cyprinidae) kuuluva Intian rannikolta kotoisin oleva seeprakala (Brachydanio rerio, Hamilton Buchanan). Tämä trooppinen, meilläkin akvaariokalana yleisesti tunnettu kalalaji on verraten kestävä ja se tulee toimeen hyvin vaihtelevissa ympäristöoloissa. Veden pH voi mm. vaihdella välillä 6,6-8,5, mutta veden kovuudella ei ole todettu olevan vaikutusta kalojen elossa pysymiseen. Lämpötilarajoiksi on esitetty 15^o-30^o C (Laale, 1977) embryogeneesin edetessä normaalisti 23^o-34^o C välisellä alueella (Schirone & Gross 1968). Seeprakalat kasvavat noin 4,5 cm mittaisiksi ja saavuttavat sukukypsyyden 2,5-3 kk ikäisinä (74-75 vrk 25,3^o-25,7^o C). Sukupuolet on tällöin helppo erottaa toisistaan.

Seeprakaloja myyvät useimmat akvaarioliikkeet, joten kalojen saanti on vaivatonta ja ne ovat helposti hoidettavissa laboratorio-oloissa. Seeprakalat lisääntyvät akvaariossa tuottaen runsaasti läpinäkyviä mätimunia (keskimäärin 150-400/naaras). Aika mädin hedelmöityksestä poikasten kuoriutumiseen vaihtelee mm. lämpötilan mukaan 48 h ja 96 h välillä (25^o-27^o). Kalojen optimaalinen kudetusrytmi on noin 10 vrk (26^o C), mikä takaa tasalaatuisen poikastuotannon sekä alhaisen poikaskuolleisuuden. Poikaskuolleisuus esimerkiksi kasvaa 5 %- 100 % jos kudetusvälin annetaan laboratorio-oloissa kasvaa 10 - 40 vuorokauteen. Ruokinnalla, veden lämpötilalla sekä valaistuksella on tärkeä merkitys valmisteltaessa seeprakaloja kutuun (Laale 1977).

2.2. KOEJÄRJESTELYT

Kokeet suoritettiin Helsingin yliopiston eläintieteen laitoksen kehitysfysiologian osastossa sekä vesihallituksen tutkimuslaboratoriossa.

Seeprakalojen kasvatusta ja kudetusta varten rakennettiin lasialtaat sekä vesitys- että ilmastusjärjestelmät. Koska

laboratorio-oloissa kasvatettua seeprakalakantaa ei yleensä ole saatavissa, ensimmäinen emokalaryhmä hankittiin akvaarioliikkeestä. Kalakantaa ylläpidettiin kokeiden ajan noin 200 l vetoisissa lasialtaissa 100 kalaa/allas. Käytetty vesi oli aktiivihiihliisuodatettua Helsingin kaupungin vesijohtovettä. Altaissa oli seisova vesi sekä Eheim-pumpuilla (tyyppi 1022, Eheim W.-Germany) järjestetty sisäinen kierto ja suodatus. Kussakin altaassa oli paineilmailmastus. Veden lämpötila oli kasvatusaltaissa $24 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ja kerran kuussa noin 2/3 vedestä vaihdettiin. Allashuoneeseen säädettiin 12L:12D keinovalorytmi. Kaloja ruokittiin kahdesti päivässä Tetra Min kuivarehulla (Tetra Werke, W.-Germany) sekä pakastetuilla surviaissääsken toukilla. Poikasten varhaisravintona käytettiin Liquifry poikasruokaa (Interpet Ltd., UK) sekä eläviä Artemia salina-äyriäisiä (Artemix, Hobby/Dohse Aquaristik, W.-Germany).

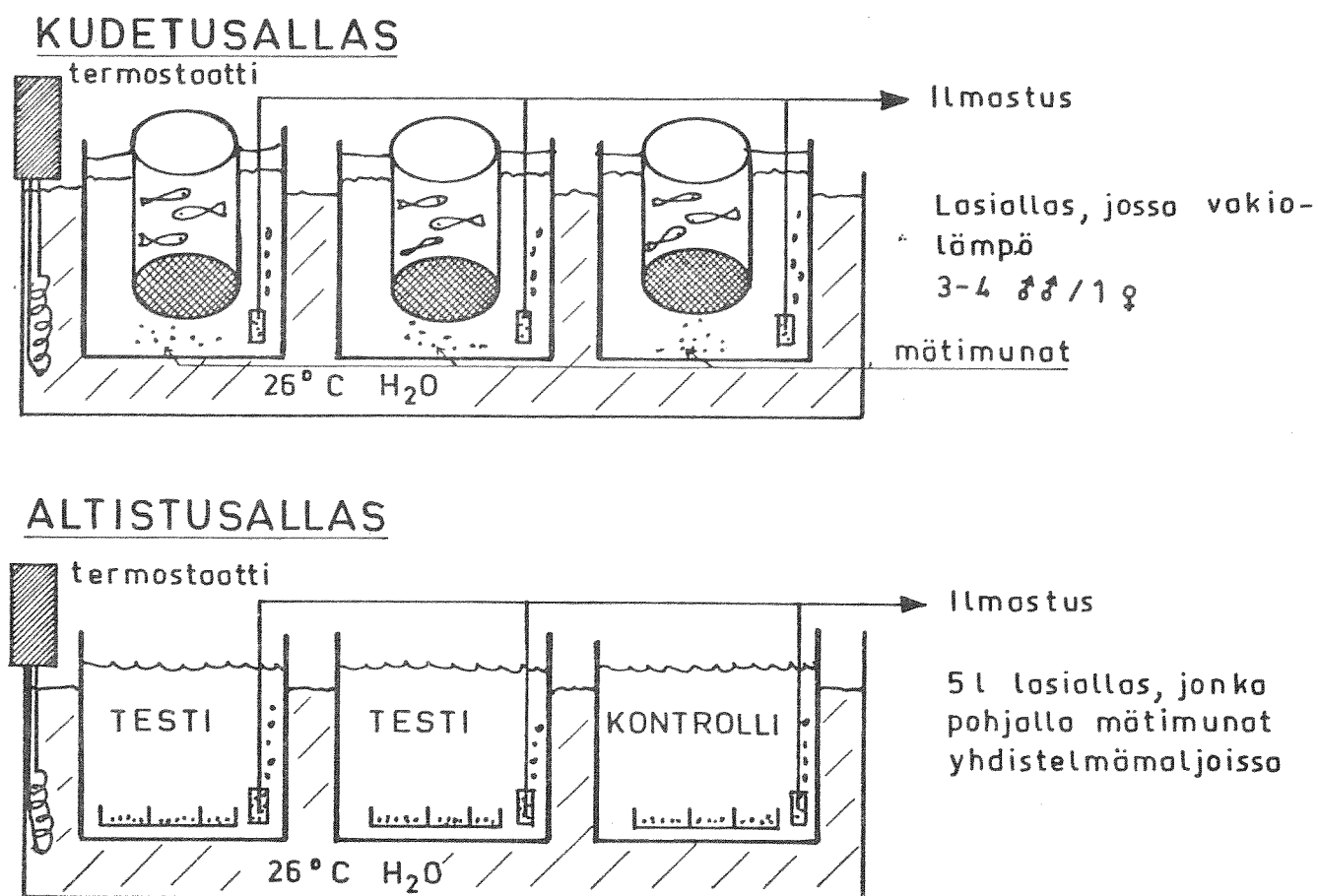
2.3. KALOJEN KUDETUS

Koska akvaarioliikkeestä hankittujen kalojen kunto ja ikä ovat yleensä tuntemattomat, kalojen terveyttä jouduttiin aluksi tarkkailemaan sekä kokeilemaan kalojen kutukypsyyttä kuturytmin aikaansaamiseksi. Kun kalat olivat sopeutuneet vakio-oloihin ja ne ulkoisesti vaikuttivat kutukypsiltä, kudetuksen onnistumista kokeiltiin. Seeprakalojen kudun käynnistyminen laboratorio-oloissa edellyttää veden lämpötilan nostamista parilla asteella sekä tietynlaista valaistusta ja ruokintaa.

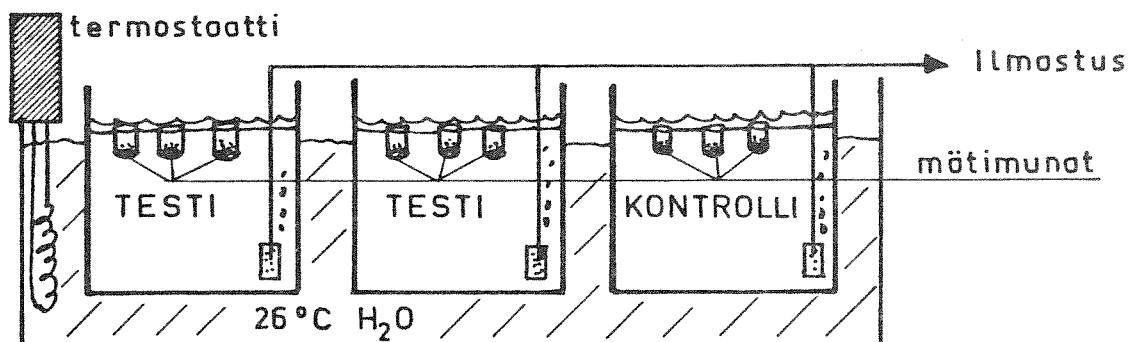
Seeprakalojen kudetukset tapahtuivat seuraavasti: kasvatusaltaista (24°C) erotettiin aamulla ulkonaisesti kutukypsän näköisiä naaraita ja koiraita erilleen vesihauteessa oleviin (26°C) pienempiin lasialtaisiin, joissa niitä ruokittiin surviaissääsken toukilla. Kello 16 ip kalat siirrettiin lasisiin keräilyastioihin sijoitettuihin kutuastioihin, joihin käytettiin n. 1 litran vetoisia verkkopohjaisia muovilieriöitä. Kussakin kutuastiassa oli koekudetuksissa 1 naaras/3-4 koirasta, alustavissa kokeissa naaraita oli useampia/kutuastia. Välittömästi tämän jälkeen allashuoneen valot sammutettiin. Kalojen kutu käynnistyi yleensä seuraavana

aamuna heti valojen syttymisen jälkeen (n. klo 7 ap). Hedelmöityneet mätimunat laskeutuivat tällöin kutuastian verkkopohjan läpi keräilyastian pohjalle, josta ne siirrettiin 1-4 h kuluttua valojen syttymisestä pipetoimalla vesihauteessa oleviin altistusastioihin. Yksittäisten mätimunien määrä vaihteli 164-785. Mätimunien kehitystä seurattiin kuoriutumiseen asti eli vajaan 3 vrk ajan poimien tietyin aikaväleihin näytteitä fiksointiin. Osan esikokeissa saadusta mädistä annettiin kehittyä normaalisti, jotta saatiin uusi vakio-oloihin kasvatettu emokalakanta.

Kuva 1. Kudetus- ja altistusalttaat



ALTISTUSALLAS



2.4. HISTOLOGINEN MENETELMÄ

Mätimunat fiksoitiin Bouin'in liuoksella. Jatkokäsittely tapahtui Hisaokan & Firlitin kehittämän menetelmän (1960) mukaan, jossa chorion poistetaan munista fiksoinnin jälkeen ja munat käsitellään ennen paraffiiniin vientiä mm. metylsalisylaatilla. 7 μ leikkeet värjätettiin Masson-Gomori värjäyksellä, mikroskopoitiin sekä valokuvattiin.

2.5. KOKEIDEN SUORITUS

Kun kalojen kudetus ja histologinen tekniikka olivat hioutuneet riittävästi, aloitettiin raskasmetallialtistukset. Koska tarkoituksena oli tutkia Outokumpu Oy:n Kokkolan tehtaiden jätevesipäästöjen vaikutuksia, tutkittavat metallit valittiin sen mukaisesti. Aluksi suoritettiin puhtasainekokeita kuparilla, nikkelillä ja koboltilla. Näiden metallien osalta oli jätevesien käsittelyssä ilmennyt vaikeuksia. Tutkimuksissa käytettiin metallien nitraattisuoloja ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ sekä $\text{Co}_3(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, W-Germany)).

Kuparialtistukset aloitettiin toukokuussa 1980. Testiliuokset valmistettiin siten, että pitoisuudet vastasivat kuparipitoisuuksia, joita on esiintynyt meressä jätevesien purkalueella. Kokeissa käytetyt kuparipitoisuudet olivat 30 $\mu\text{g}/\text{l}$ ja 70 $\mu\text{g}/\text{l}$. Näiden lisäksi kokeiltiin pitoisuutta 300 $\mu\text{g}/\text{l}$ selvempien vaikutusten aikaansaamiseksi. Kustakin

konsentraatiosta tutkittiin 7 eri aikaryhmää, joista ensimmäinen ajoittui n. 7 h ja viimeinen n. 49 h päähän heidelmöityksestä. Käyttämässämme koeoloissa 49 h osoittautui riittäväksi ajaksi poikasten kuoriutumiselle. Kussakin koeryhmässä oli vähintään 50 mätimunaa/naaras ja naaraita vähintään 5/aikaryhmä/konsentraatio. Histologinen tarkastelu suoritettiin neljästä eri aikaryhmästä (7h-21h - 35h-49h).

Mätimunien kuparinottoa tutkittiin myös dithio-oxamidilla (rubeanic acid, $C_2H_4N_2S_2$; Merck, W.-Germany) käsitellyistä mätimunista. Okamoto & Utamura (1938) ja Uzman (1956) ovat kehittäneet menetelmän kudoksiin sitoutuneen kuparin osoittamiseksi. Tässä menetelmässä munia käsitellään 0,1 % dithio-oxamidilla ja Na-asetaatilla, jonka jälkeen näytteet viedään etanoli-kloroformikäsittelyn kautta paraffiiniin. Kuparisuolojen ja -proteiinikompleksien tulisi leikkeissä näkyä mustina sakkautumina.

Nikkelialtistukset aloitettiin maaliskuussa 1981. Kokeet suoritettiin vastaavalla tavalla kuin kuparialtistukset. Aluksi käytettiin pitoisuuksia 60 $\mu\text{g/l}$ ja 600 $\mu\text{g/l}$ ja myöhemmin kokeiltiin myös pitoisuuksia 60 mg/l ja 120 mg/l . Histologinen tarkastelu suoritettiin kolmesta eri aikaryhmästä (21h-53h-70h).

Kobolttialtistukset aloitettiin toukokuussa 1981. Mahdollisten vaikutusten aikaansaamiseksi valittiin aluksi melko korkeat pitoisuudet. Ensimmäiset kokeet suoritettiin pitoisuuksissa 1 mg/l ja 10 mg/l . Tämän jälkeen pitoisuuksia pienennettiin 0,5 mg/l ja 0,1 mg/l , jotka vastasivat purkupaikalla mitattuja pitoisuuksia.

Metalleista valmistettiin kantaliuokset tislattuun veteen. Kokeita varten kantaliuoksista tehtiin laimennokset päivittäin. Kontrollialtistukset suoritettiin tislatussa vedessä. Tätä ennen oli kokeiltu kalojen kehityksen olevan normaali sekä tislatussa että aktiivihiilisuodatetussa vedessä kasvatetuista mätimunista.

Puhdasainealtistuksien lisäksi kokeita suoritettiin myös Outokumpu Oy:n Kokkolan tehtaiden jätevedellä. Helsinkiin toimitettu vesinäyte-erä (150 l) oli otettu purkuputken suulta juuri ennen kuin jätevesi lasketaan mereen. Jättevettä säilytettiin viileässä (+4^o C) ja pimeässä mustissa muovisäiliöissä. Altistukset tehtiin 100 %, 50 % sekä 25 %:lla jätevedellä. Laimennokset tehtiin tislattuun veteen. Koska jäteveden pH vaihteli välillä 3-4, koeliuosten pH jouduttiin säätämään 0,5 M NaOH:lla noin 7:ään ennen kutakin vedenvaihtoa. Tällöin osa raudasta saostui koeastioiden pohjalle.

Vesinäytteiden metallipitoisuudet analysoitiin vesihallituksen tutkimuslaboratoriossa.

Altistusastioina käytettiin 5 l vetoisia lasialtaita, joista yksi oli kontrolli ja kaksi koeallasta/koekerta. Testiliuosta käytettiin 2 l/allas. Ensimmäisissä koesarjoissa mätimunia pidettiin altistuksissa muovisten yhdistelmämaljojen pohjalla (6-well tissue culture dish nr. 3506; Costar USA). Myöhemmin mätimunat sijoitettiin koeliiuoksiin lasikuituverkkopohjaisissa läpimitaltaan 5 cm olevissa muovilieriöissä, mikä paransi koeliiuksen vaihtuvuutta altistuksen aikana. Kuhunkin testialtaaseen sijoitettiin useita haudontalieriöitä samanaikaisesti aina 1 naaraan mäti/lieriö. Kuhunkin aika- ja pitoisuusryhmään pyrittiin saamaan vähintään 5 naaraan mätimunia, jolloin jokaisen naaraan mädin kehitystä kyettiin seuraamaan omana kokonaisuutenaan. Kokeet tehtiin semistaattisina, jolloin puolet koeliiuksesta vaihdettiin päivittäin.

Seeprakalan alkionkehityksestä ja mätimunaa suojaavista kalvoista

Hisaoka & Battle (1958) ja Hisaoka & Firlit (1960) ovat kuvanneet seeprakalan normaalin alkionkehityksen jakaen sen 25 eri vaiheeseen. Hisaokan ja Battlen vaihe 1. edustaa vasta hedelmöitynyttä munasolua, joka tässä vaiheessa on homogeeninen sytoplasmasta ja ruskuaisesta muodostunut massa. Seeprakalan mätimuna on telolesitaalinen ja sen

jakautuminen tapahtuu meroblastisesti ja diskoidaalaisesti. Alkiolevyn eriytyminen ruskuaisesta lähtee käyntiin noin 5'-10' kuluttua hedelmöityksestä (vaiheet 2.-7.) munan rytmisten supistusliikkeiden työntäessä sytoplasmaa animaalista napaa kohti ja se päättyy vaiheessa 8. (64-256 solua), jolloin mitoottinen jakautuminen muuttuu asynkroniseksi. Ruskuainen ei sen sijaan lainkaan jakaudu. Blastulan muodostuessa (vaiheet 9.-12.) yksittäiset blastomeerit vähitellen mitoosi mitoosilta pienenevät kooltaan pakkautuen yhä tiiviimmin yhteen. Gastrulaatio (vaiheet 13.-16.) alkaa noin 5 h kuluttua hedelmöityksestä ja sen kuluessa blastodermi vähitellen ympäröi ruskuaisen kokonaan. Gastrulaatio päättyy noin 10 h kuluttua hedelmöityksestä perätulpan hävitessä näkyvistä ja ensimmäisten somiittien ilmaantuessa näkyviin. Myöhemmät kehitysvaiheet on jaoteltu mm. somiittien lukumäärän perusteella seuraavasti: vaiheessa 18. (5 somiittia) syntyvät silmäräkkulat, vaiheessa 19. (15 somiittia) korvaplakodit ja vaiheessa 20. (20 somiittia) varsinaiset silmämaljat. Sydän aloittaa lyöntinsä vaiheessa 21., jolloin somiitteja on jo 30 ja korvan otoliitit ovat erilaistuneet. Pigmentaatio lähtee käyntiin vaiheessa 22. (32 somiittia), jolloin silmän retinaan ilmestyy melaniinia. Vartalon pigmentaatio tapahtuu vaiheissa 23. (melanoforit; 33 somiittia) ja 24. (xantoforit; 34 somiittia). Sydämen lyöntitiheys on tällöin 191 lyöntiä/min (26° C). Seeprakalan alkionkehitys päättyy kuoriutumiseen vaiheessa 25.

Hedelmöityksen jälkeen kalojen mätimunaa ympärille muodostuu siivilämäinen, vettä vapaasti läpäisevä chorion. Se on elastinen kolloidisista proteiinimolekyyleistä muodostunut kalvo, joka suojaa kehittyvää alkiota mm. bakteeri- ja sieni-infektioita vastaan. Chorionin paksuus seeprakalalla on noin 0,01 mm ja siinä on 1,5-3,0 μ m välein lukuisia pyöreitä läpimitaltaan 1,5 μ m mittaisia aukkoja (Hisaoka 1958). Hedelmöityksen tapahduttua mätimunaan muodostuu myös perivitelliinialue, joka erottaa toisistaan ulomman chorionkalvon ja sisemmän vitelliinikalvon. Vitelliinikalvo on homogeeninen jyvämäinen "kerros", joka välittömästi peittää kehittyvää alkiota. Vitelliinikalvo on puoliläpäisevä. Luukalojen mätimunaa suojaavien kalvojen elektrolyytti- ja vesiläpäisevyys vaihtelevat lajikohtaisesti. Seeprakalan

mätimunaa voidaan pitää melko suojattuna, sillä vesi- ja ionisäätelyä tapahtuu vain vähän. Sellaiset luukalat, joiden mätimuna läpäisee vettä vapaasti, ovat erittäin herkkiä ympäristömyrkköjen vaikutuksille. Chorion suojaa kehittyvää alkiota hedelmöityksestä aina siihen asti, kunnes alkio pyrstön lihasliikkeiden ja chorionin lyyttisen hajoamisen seurauksena kuoriutuu.

Kalojen mädillä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet monilla lajeilla munavaiheen olevan verraten kestävä etenkin epäorgaanisten aineiden myrkkövaikutuksille. Monille raskasmetallien aiheuttamille myrkkövaikutuksille kriittisin vaihe ajoittuu hetkeen juuri ennen kuoriutumista sekä välittömästi aikaan kuoriutumisen jälkeen (Grande 1966, Mount 1968, Mount & Stephan 1969, Hazel & Meith 1970, McKim & Benoit 1971). Monet muut mm. orgaaniset myrkyt voivat sen sijaan vahingoittaa kehittyvää mätiä varsin suuresti (Hodson & Blunt 1981). Eron voidaan olettaa johtuvan kalvojen suojaavasta vaikutuksesta. Koetulokset ovat kuitenkin olleet varsin ristiriitaisia. Skidmore (1966) on todennut, että seeprakalan mätimunat selvisivät ilman chorionia merkittävästi paremmin sinkkialtistuksessa kuin kuorimattomat mätimunat. Ozoh (1980a, 1980b) on kuitenkin saanut täysin päinvastaisia tuloksia tutkiessaan chorionin merkitystä seeprakalan munavaiheiden kehitykselle. Vuorotteisissa lyijy- ja kuparialtistuksissa (58 µg/l) chorion lisäsi jonkin verran suojaa kuparia vastaan ja pelkässä lyijyaltistuksessa (50 µg/l ja 72 µg/l) myös lyijyä vastaan.

3. T U L O K S E T J A T U L O S T E N T A R K A S - T E L U

3.1. KUPARIALTISTUKSET

Tässä tutkimuksessa käytetyt kuparipitoisuudet (30 µg/l ja 70 µg/l) eivät lisänneet mätimunien kuolleisuutta. Näillä pitoisuuksilla näytti pikemmin olevan päinvastainen vaikutus, mikä saattaa johtua kuparin suojaavasta vaikutuksesta bakteeri- ja sieni-infektioita vastaan. Pitoisuudessa 300 µg/l kupari sen sijaan lisäsi mädin kuolleisuutta ollen 1 vrk:n kuluttua hedelmöityksestä 36-60 % (kts. taulukko 1).

Taulukko 1. Kolmen seeprakalanaaraan mädin kuolleisuusprosentit eri kuparipitoisuuksissa.

	kontrolli	30 µg/l	70 µg/l	300 µg/l
naaras A	22,5 %	27,5 %	21,3 %	60,0 %
naaras B	17,1 %	7,1 %	7,1 %	40,0 %
naaras C	10,0 %	4,5 %	6,4 %	36,4 %

Mätimunien kuoriutumisenopeuteen ei tutkituilla kuparipitoisuuksilla ollut vaikutusta. Histologisen tarkastelun perusteella, joka suoritettiin yhteensä 1000 altistetusta ja 500 kontrollimätimunasta, mädin kehitys eteni normaalisti eikä oletettuja vaurioita esim. hermostossa ollut todettavissa.

Kuparin sitoutumista mätimuniin tutkittiin dithio-oxamidilla. Tulosten perusteella kupari näytti kerääntyvän pääasiassa chorionin pintaan eikä mätimunien sisällä alkioissa kuparia ollut osoitettavissa.

Ozoh (1980a) on tutkinut vuorottaisten kupari- ja lyijyaltistusten (58 µg/l) vaikutuksia seeprakalan mädin kehitykseen. Kupariliuoksesta lyijyliuokseen siirretyissä alkioidissa havaittiin mm. selkäjänteen kiertymistä, epänormaaleja onteloita ruskuaisessa sekä sydämen lyöntitiheyden hidastumista. Lyijyliuoksesta kupariin siirretyt alkiot sen sijaan kuolivat heti. Tutkimuksessa käytetyt metalli-ionit hidastivat niin ikään kuoriutumista. Kuparin on pitoisuuksissa 36 µg/l ja 72 µg/l todettu aiheuttavan epämuodostumia myös seeprakalan aivoissa ja muualla hermostossa ja lyijyn vastaavissa pitoisuuksissa heikentävän ruskuaisen imeytymistä, tuottavan epitheloomia sekä evien ja pyrstön "kulumia" (Ozoh 1979). Ozohin tutkimuksista ei kuitenkaan käy ilmi, miten tai minkälaisista suoloista käytetyt koeliuokset oli valmistettu. Tällä seikalla saattaa olla merkitystä kyseisten metallien myrkyvaikutuksia tutkittaessa.

Tämän tutkimuksen yhteydessä ei kuitenkaan vastaavia muutoksia ollut todettavissa. Tällöin kokeiltiin myös chorionin poiston vaikutusta kuparialtistettuihin mätimuniin, mutta eroja kuorittujen ja kuorimattomien mätimunien välillä ei havaittu.

3.2. NIKKELIALTISTUKSET

Kokeiden perusteella nikkelillä ei todettu vaikutuksia seeprakalan mätimunien kehitykseen. Kaikissa käytetyissä konsentraatioissa (60 µg/l, 600 µg/l, 60 mg/l ja 120 mg/l) kehittyi histologisen tarkastelun perusteella (12 eri aika/pitoisuusryhmää) normaaleja poikasia. Ei liioin mädin kuolleisuudessa eikä kuoriutumisenopeudessa havaittu eroja kontrolleihin verrattuna.

Nikkelin myrkyllisyyttä vesieliöille on tutkittu varsin vähän. Puhtaana metallina nikkeli on veteen liukenematon, mutta nikkelisuolat ovat sen sijaan helposti veteen liukenevia. McKee'n ja Wolfin (1963) mukaan nikkelin myrkyllisyys vesieliöille vaihtelee voimakkaasti mm. eliölajista, veden pH:sta, sen kovuudesta sekä monista muista ympäristötekijöistä johtuen. Useimmat kaloilla suoritettut tutkimukset on tehty erilaisilla kemikaali- ja metalliseoksilla metallien yhteisvaikutuksia kartoitettaessa (mm. Hughes et al. 1979, Verma et al. 1982). Aikuisilla kaloilla tehdyt myrkyllisyystutkimukset ovat antaneet pitoisuusrajoiksi 0,5 mg/l-35,5 mg/l Ni (96 h LC50). Pickering (1974) on todennut, että pitoisuudella 0,73 mg/l (NiCl₂) ei ollut merkittävää vaikutusta Pimephales promelas kalan kasvuun tai elossa pysymiseen. Se vähensi kuitenkin merkittävästi sekä mätimunien lukumäärää että kuoriutuneiden poikasten määrää.

Blaylock & Frank (1979) ovat kartoittaneet nikkelisulfaatin (tärkein kaupallinen Ni-yhdiste) vaikutuksia karpin (Cyprinus carpio) mätimuniin ja varhaisiin poikasvaiheisiin ja todenneet kehittyvän munan herkemmäksi nikkelin vaikutuksille altistusaikojen ollessa samoja. Vastaavia tuloksia on saatu myös Cd, Cr, Cu ja Pb osalta 6 eri kalalajilla suoritetuissa kokeissa, joissa altistusajat sekä alkionkehitysvaiheet kuitenkin vaihtelivat (Sauter et al. 1976).

Tässä tutkimuksessa rajoituttiin ainoastaan seeprakalan mätimunien eri kehitysvaiheisiin, eikä näin ollen testattu poikasvaiheiden herkkyyttä nikkelille.

3.3. KOBOLTTIALTISTUKSET

Tämän tutkimuksen perusteella voitiin todeta, että kaikissa tutkituissa kobolttipitoisuuksissa (0,1 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l) mädin kehitys hidastui merkittävästi kuolleisuuden samalla kasvaessa. Toisen vuorokauden aikana mätimunien perivitelliinialue muuttui harmaanvalkoiseksi. Vitelliinikalvon sisällä kehittyvät alkiot näkyivät kuitenkin mustina ja liikkuvina. Koeliumuksissa ollut mäti jäi suurimmaksi osaksi kuoirutumatta ja kuoli vähitellen. Samat oireet olivat havaittavissa yhtä voimakkaina myös alhaisemmissa kobolttipitoisuuksissa. Tarkasteltaessa mätimunia histologisesti voitiin todeta niiden aluksi kehittyvän melko pitkälle normaalisti. Toisen vuorokauden kuluessa kudokset kuitenkin alkoivat vähitellen hajota. Kudoksiin, etenkin silmän linsseihin ja ihoon ilmestyi suuria rakkuloita ja soluliitokset purkautuivat aiheuttaen kehittyvän alkion kuoleman (kts. kuvat).

Kirjallisuudessa on löydettävissä verraten vähän tietoa koboltin vaikutuksista kaloihin. Aikuisille kaloille haitalliseksi pitoisuudeksi on esitetty 30-100 mg/l. LC50-testeissä letaaliksi pitoisuudeksi kaloille on osoitettu 10 mg/l. Kunze et al. (1978) on tutkinut koboltin vaikutuksia kirjolohen (*Salmo gairdneri*, Rich.) alkionkehitykseen. Tässä tutkimuksessa koboltti-ionien osoitettiin sitoutuvan mätimunien pinnalle, missä ne kiinnittyivät chorionin mukopolysakkarideihin. Munista kuoriutuneet poikaset eivät sisältäneet kohonneita kobolttimääriä. Veden kalsiumpitoisuuden noustessa koboltin kerääntyminen chorioniin kuitenkin väheni. Tutkimuksessa käytetyt kobolttipitoisuuden vaihtelivat 0,5 µg/l-1 mg/l.

3.4. JÄTEVESIALTISTUKSET

Raskasmetallien puhdasainealtistuksien jälkeen suoritettiin testejä myös Outokumpu Oy:n Kokkolan tehtaiden jätevedellä. Eri jätevesilaimennoksilla (100 %, 50 % ja 25 %) ei todettu vaikutusta mädin kuolleisuuteen. Mädin kuoriutuminen sen sijaan hidastui selvästi sekä 100 % että 50 % jätevedessä

altistetuissa munissa. Kuoriutumisen jälkeen 100 % ja 50 % jätevedessä olleet poikaset siirrettiin aktiivivihiilisuodatettuun veteen, jossa niiden jatkokehitystä seurattiin vielä 8-9 vrk ajan. Poikaset kasvoivat ja kehittyivät normaalisti. Histologisessa tarkastelussa (8 naarasta/3 pitoisuutta) ei myöskään havaittu normaalista poikkeavia muutoksia.

Koska seeprakalan mätimunavaiheet todettiin melko kestäviksi jäteveden vaikutuksille, kokeita suoritettiin vielä seuraavalla tavalla: mädin annettiin kehittyä normaalisti aktiivivihiilisuodatetussa vedessä kuoriutumiseen asti. Välittömästi tämän jälkeen poikaset siirrettiin 100 % ja 50 % jäteveeseen. Tällöin kaikki poikaset kuolivat 100 % jätevedessä 1 vrk ja 50 % jätevedessä noin 2 vrk kuluttua altistuksen alkamisesta. Histologisessa tarkastelussa todettiin kudoksiin muodostuneen suuria rakkuloita ja soluliitosten hajonneen, mikä aiheutti poikasten kuoleman.

4. Y H T E E N V E T O

1. Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää käyttökelpoinen kalojen lisääntymiseen liittyvä testimenetelmä jätevesien ja kemikaalien myrkkyyvaikutusten selvittämiseksi.
2. Tutkimuksen yhteydessä selvitettiin eräiden raskasmetallien (Cu, Ni, Co) sekä Outokumpu Oy:n Kokkolan tehtaiden jäteveden vaikutuksia seeprakalojen mätimunien ja pikkupoikasten kehitykseen.
3. Tulosten perusteella ei kuparilla pitoisuuksissa 30 µg/l ja 70 µg/l todettu merkittäviä vaikutuksia mätimunien kehitykseen. Pitoisuudessa 300 µg/l kupari sen sijaan lisäsi mädin kuolleisuutta huomattavasti. Histologisen tarkastelun perusteella mädistä kehittyi normaaleja poikasia.
4. Nikkelillä ei liioin pitoisuuksissa 60 µg/l, 600 µg/l, 60 mg/l eikä 120 mg/l todettu vaikutuksia seeprakalojen mädin kehitykseen.

5. Koboltin todettiin selvästi hidastavan mädin kuoriutumista. Käytetyissä pitoisuuksissa (0,1, 0,5, 1, ja 10 mg/l) mätimuniin kehittyi kahdessa vuorokaudessa harmaa samennos ja suurin osa mädistä jäi kuoriutumatta kuollen vähitellen. Histologinen tarkastelu osoitti kehittyviin alkioihin muodostuvan isoja rakkuloita soluliitosten vähitellen tuhoutuessa.
6. Jätevesipitoisuudet 100 %, 50 % sekä 25 % eivät liioin vaikuttaneet tämän tutkimuksen mukaan mädin kuolleisuuteen. Kuoriutumisen sen sijaan hidastui ollen noin 6 vrk 100 %:ssa ja 50 %:ssa jätevedessä. Altistettaessa juuri kuoriutuneita pikkupoikasja vastaaviin pitoisuuksiin niiden todettiin kuolevan 1-2 vrk kuluessa. Histologinen tarkastelu osoitti kudoksiin syntyneen suuria rakkuloita ja soluliitosten (kudosten) hajoamiseen.
7. Tämä tutkimus tukee havaintoa jonka mukaan kalojen mätimunavaiheet ovat verraten kestäviä raskasmetallien myrkyvaikutuksille. Juuri kuoriutuneet poikaset sen sijaan ovat näille vaikutuksille erittäin herkkiä.
8. Kehitettyä menetelmää voitaneen pitää eräänä suhteellisen nopeana keinona selvittää vesistöön päästettävien kemikaalien myrkyllisyyttä.

K I R J A L L I S U S

- Adelman, I.R. & Smith, Lloyd L. Jr (1970) Effect of hydrogen sulfide on northern pike eggs and sac fry. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 3:501-509.
- Anderson, P.D. & Battle, H.I. (1967) Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 45:191-204.
- Bengtsson, B.-E. (1975) Some effects of zinc on different stages in the life history of the minnow, *Phoxinus phoxinus* L. (Pisces). SNV PM 570, Res. Comm. Contract no. 7-34/72 Nat. Swed. Environm. Prot. Board. pp. 1-56.
- Blaylock, B.G. & Frank, M.L. (1979) A comparison of the toxicity of nickel to the developing eggs and larvae of carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 21:604-611.
- Cairns, J.Jr, Scheier, A. & Loos, J.J. (1965) A comparison of the sensitivity to certain chemicals of adult zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) and zebrafish eggs with that of adult bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Raf.). *Notulae Naturae* 381:1-9.
- Ernst, V.V., Neff, J.M. & Anderson, J. (1977) The effects of the water soluble fractions of no 2 fuel oil on the early development of the estuarine fish, *Fundulus grandis* Baird and Girard. *Environ. Pollut.* 14:25-35.
- Grande, M. (1966) Effect of copper and zinc on salmonid fishes. 3rd Intn. Conf. of Water Poll. Res. Soc. 1 (paper 5) *Water Poll. Control Fed.*, Washington.
- Hazel, C.R. & Meith, S.J. (1970) Bioassay of king salmon eggs and sac fry in copper Solution. *Calif. Fish Game* 56:121.
- Hisaoka, K.K. (1958) Microscopic studies of the teleost chorion. *Trans. Amer. microsc. Soc.* 77:240-243.
- Hisaoka, K.K. & Battle, H.I. (1958) The normal developmental stages of the zebra fish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 102:311-327.

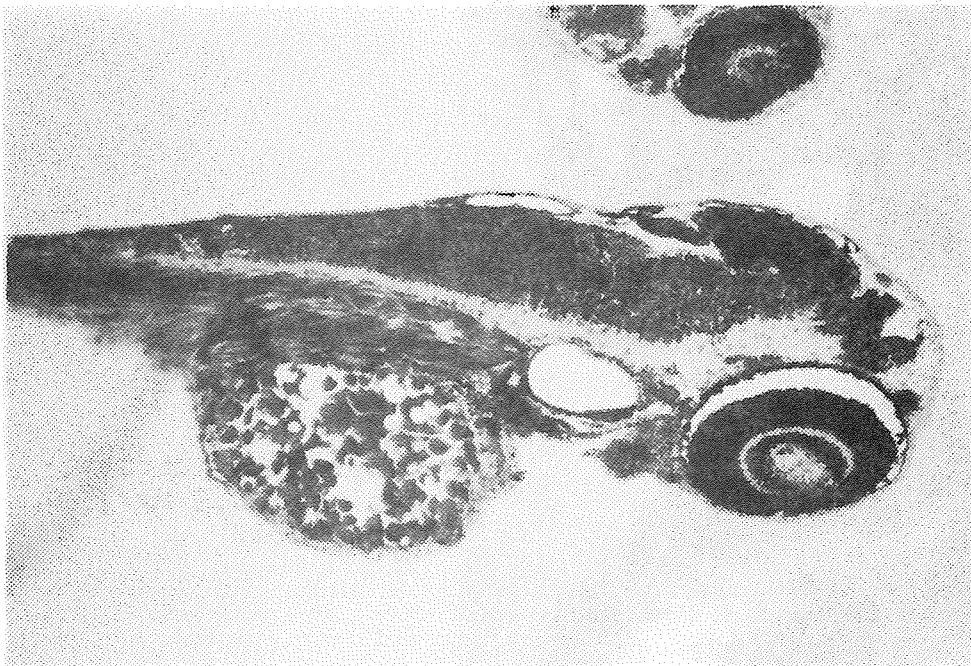
- Hisaoka, K.K. & Firlit, C.F. (1960) Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 107:205-225.
- Hodson, P.V. & Blunt, B.R. (1981) Temperature-induced changes in pentachlorophenol chronic toxicity to early life stages of rainbow trout. *Aquatic Toxicol.* 1:113-127.
- Hughes, G.M., Perry, S.F. & Brown, V.M. (1979) A morphometric study of effects of nickel, chromium and cadmium on the secondary lamellae of rainbow trout gills. *Water Res.* 13:665-679.
- Kunze, J., Bühringer, H. & Harms, U. (1978) Accumulation of cobalt during embryonic development of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Aquaculture* 13:61-66.
- Laale, J.W. (1971) Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Zool.* 177:51-64.
- Laale, H.W. (1977) The biology and use of sebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10:121-173.
- Lindén, O. (1976) The influence of crude oil and mixtures of crude oil/dispersants on the ontogenic development of the Baltic herring (*Clupea harengus membras* L.) *Ambio* 5(3):136-140.
- Lindén, O. (1978) Biological effects of oil on early development of the Baltic herring, *Clupea harengus membras*. *Mar. Biol.* 45:273-283.
- McKee, T.E. & Wolf, H.W. (1963) Water quality criteria resources agency of California. State Water Quality Control Board Publ. nro 3A, Sacramento.
- McKim, J.M. & Benoit, D.A. (1971) Effects of long-term exposures to copper on survival, growth and reproduction of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish Res. Bd. Can.* 28:655-662.
- McKim, J.M., Eaton, J.G. & Holcombe, G.W. (1978) Metal toxicity to embryos and larvae of eight species of freshwater fish II. Copper. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 19:608-616.

- Mount, D.I. (1968) Chronic toxicity of copper to fathead minnows, (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Water Res.* 2:215-223.
- Mount, D.I. & Stephan, C.E. (1969) Chronic toxicity of copper to fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft water. *J. Fish Res. Bd. Can.* 26:2449-2457.
- Niimi, A.J. & LaHam, Q.N. (1976) Relative toxicity of organic and inorganic compounds of selenium on newly hatched zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Can. J. Zool.* 54:501-509.
- Okamoto, K. & Utamura, M. (1938) Biologische Untersuchungen des Kupfers. I. Mitt. über die histochemische Kupfernachweismethode. *Act. Schol. medicin. Univ. Imp. Kioto Bd. 20 S:573-580.*
- Olson, L.E. & Marking, L.L. (1973) Toxicity of TFM (Lampricide) to six early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Res. Bd. Can.* 30(8):1047-1052.
- Ozoh, P.T.E. (1979) Malformations and inhibitory tendencies induced to *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) eggs and larvae due to exposures in low concentrations of lead and copper ions. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 21:668-675.
- Ozoh, P.T.E. (1980a) Effects of reversible incubations of zebrafish eggs in copper and lead ions with or without shell membranes. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24:270-275.
- Ozoh, P.T.E. (1980b) Effect of lead on pigment pattern formation in sebrafish (*Brachydanio rerio*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24:276-282.
- Pickering, Q.H. (1974) Chronic toxicity of nickel to the fathead minnow. *J. Water Poll. Control. Fed.* 46:760-
- Roales, R.R. & Perlmutter, A. (1974) Toxicity of zinc and cygon applied singly and jointly to zebrafish embryos. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 12:475-480.

- Sauter, S., Buxton, K.S., Macek, J. & Petrocelli, S.R.
(1976) Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish. Toxicity of copper, cadmium, chromium, and lead to eggs and fry of seven fish species. Ecol. Res. Series EPA-600/3:76-105.
- Schirone, R.C. & Gross, L. (1968) Effect of temperature on early embryological development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. J. Exp. Zool. 169:43-52.
- Skidmore, J.F. (1966) Resistance to zinc sulfate of the zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos after removal or rupture of the outer egg membrane. J. Fish Res. Bd. Can. 23:1037-1041.
- Spehar, R.L., Veith, G.D. Defoe, D.L. & Bergstedt, B.V.
(1979) Toxicity and bioaccumulation of hexachlorocyclopentadiene, hexachloronorborene and heptachloronorborene in larval and early juvenile fathead minnows, *Pimephales promelas*. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 21:576-583.
- Speranza, A.W., Seeley, R.J., Seeley, V.A. & Perlmutter, A.
(1977) The effect of sublethal concentrations of zinc on reproduction in the zebrafish, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan. Environ. Poll. 12:217-222.
- Uzman, L.L. (1956) Histochemical localization of copper with rubeanic acid. Lab. Invest. 5:299.
- Weis, J.S. & Weish, P. (1977) Effects of heavy metals on development of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. J. Fish Biol. 11:49-54.
- Verma, S.R., Jain, M. & Dalela, R.C. (1982) A laboratory study to assess separate and in-combination effects on zinc chromium, and nickel to the fish, *Mystus vittatus*. Acta hydrochim. hydrobiol. 10:23-29.
- von Westernhagen, H., Rosenthal, H., Dethlefsen, V, Ernst, W., Harms, U. & Hansen, P.D. (1981) Bioaccumulating substances and reproductive success in Baltic flounder *Plathichthys flesus*. Aquatic Toxicol. 1:85-99.
- Yosha, S.F. & Cohen, G.M. (1979) Effect of intermittent chlorination on developing zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). Bull. Environm. Contam. Toxicol. 21:703-710.



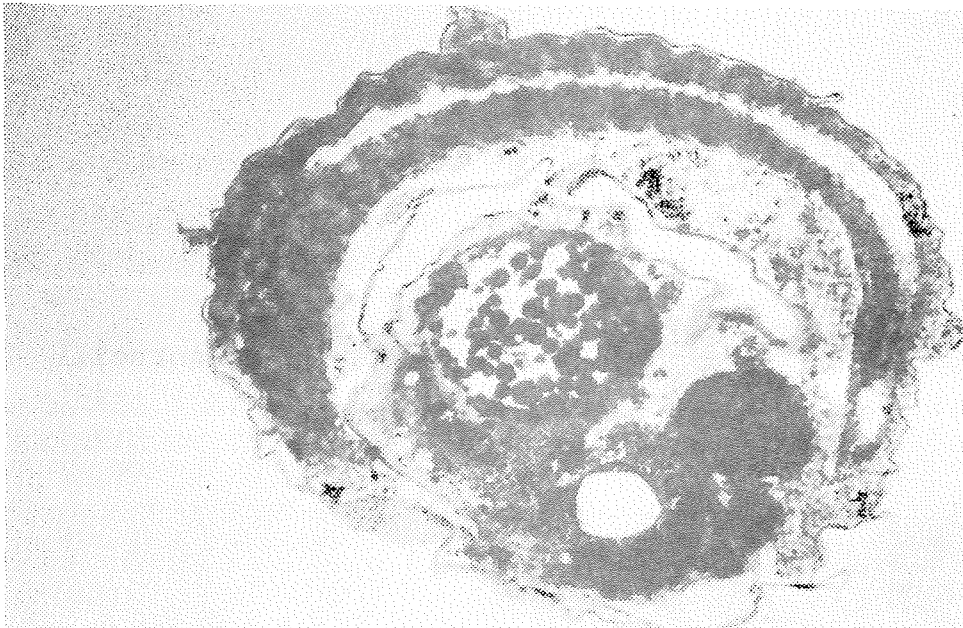
Kuva 1
Seeprakala kontrolli
1 vrk kuoriutumisesta
131X



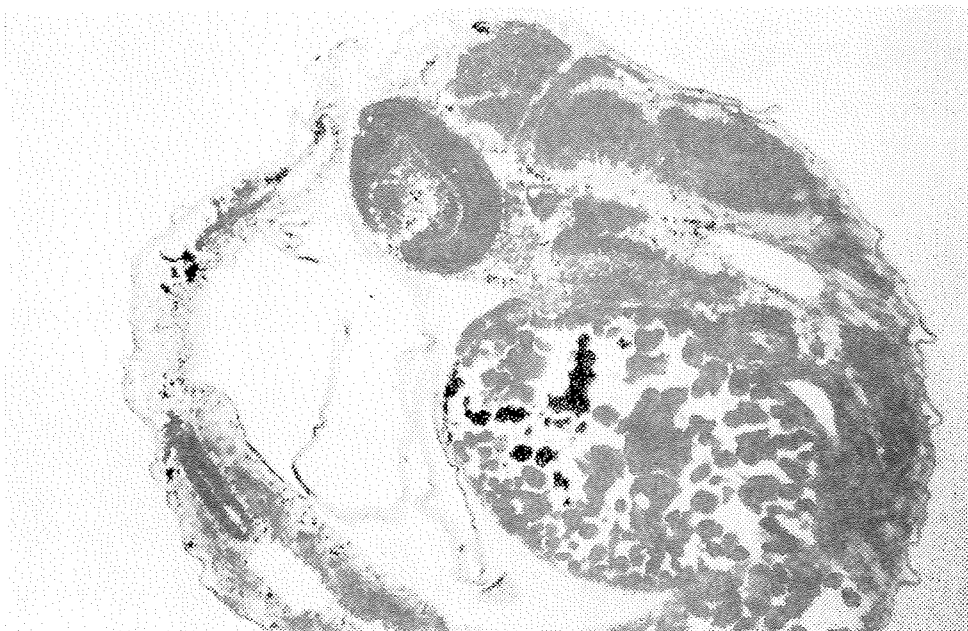
Kuva 2
Seeprakala kontrolli
1 vrk kuoriutumisesta
131X



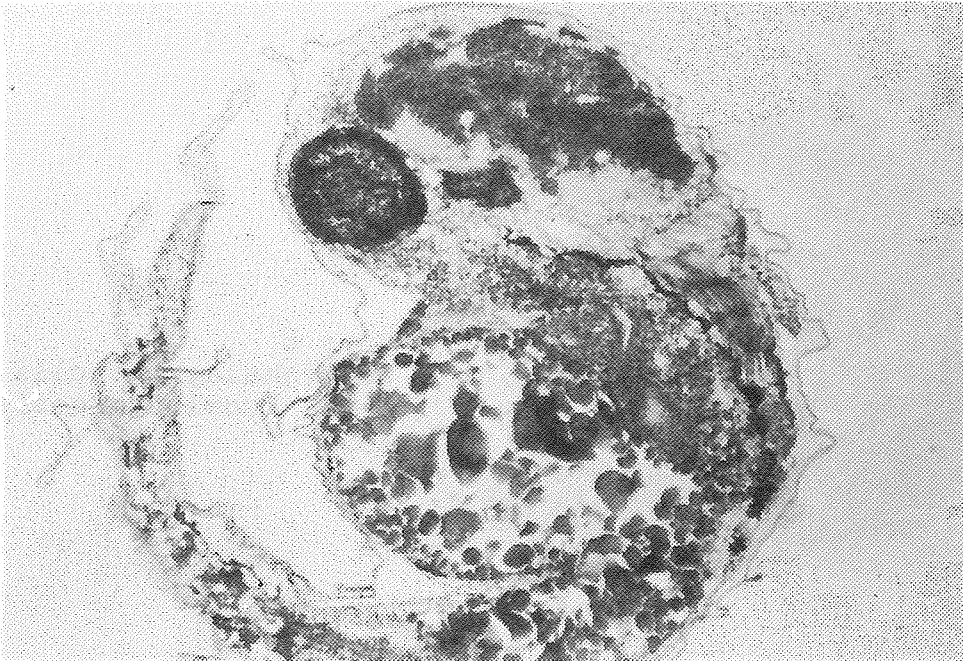
Kuva 3
 Seeprakala, koboltti-
 altistus 10 mg/l Co
 4 vrk. 131X



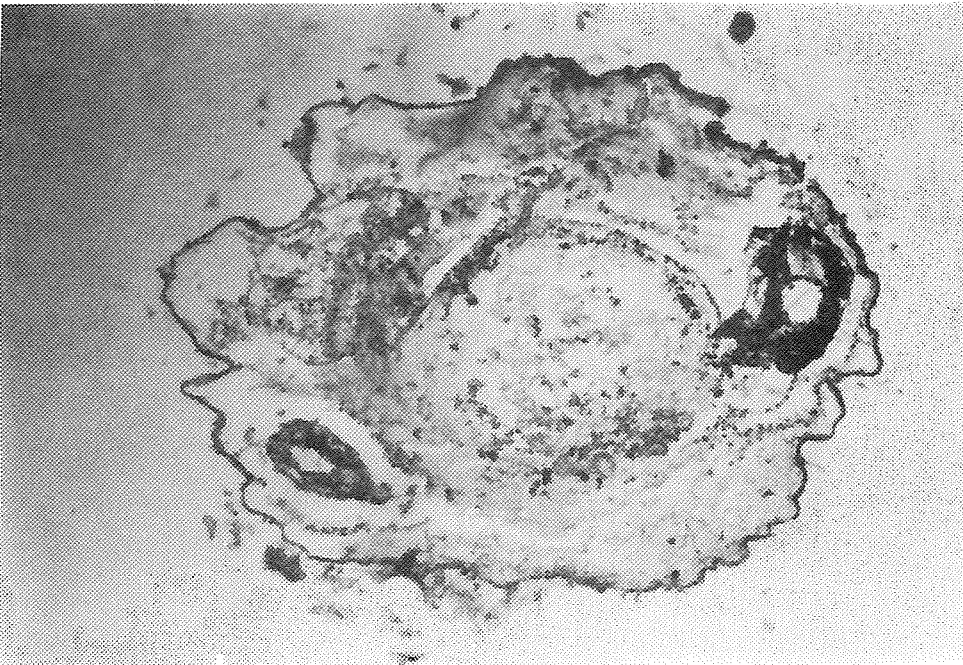
Kuva 4
 Seeprakala, koboltti-
 altistus 1mg/l Co
 4 vrk. 131X



Kuva 5
 Seeprakala, koboltti-
 altistus 0,5 mg/l
 4vrk. 131X



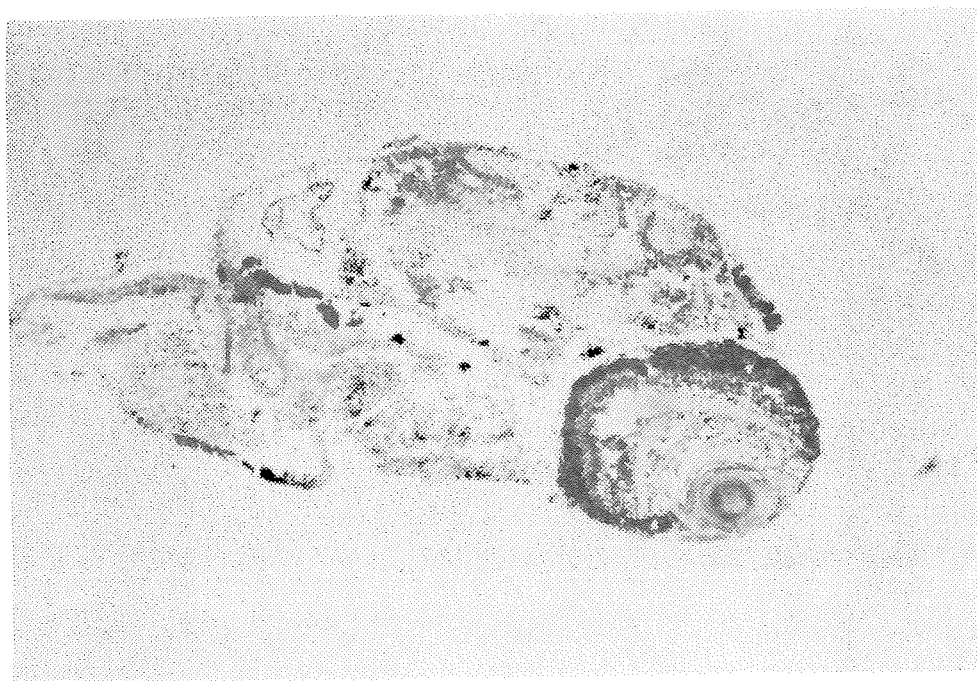
Kuva 6
Seeprakala, koboltti-
altistus 0,1 mg/l Co
4vrk. 131X



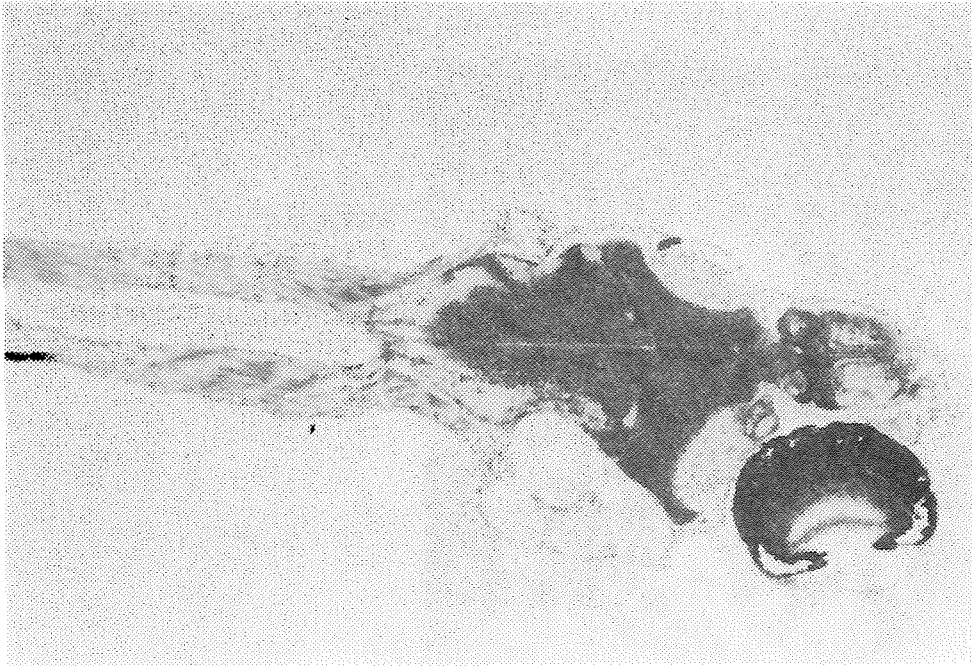
Kuva 7
Seeprakala, koboltti-
altistus 0,1 mg/l Co
4 vrk. 131X



Kuva 8
Seeprakala, kontrolli
1 vrk kuoriutumisesta
131X



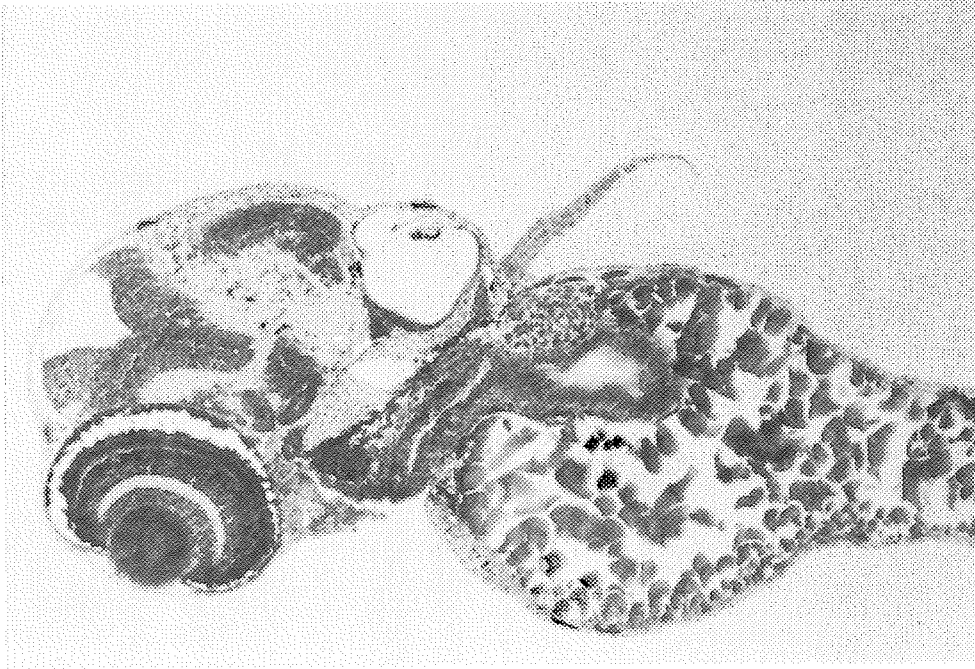
Kuva 9
Seeprakala, jätevesi-
altistus. Kala siirret-
ty kuoriutumisen jäl-
keen 100%:een jäteve-
teen. 1 vrk. 131X



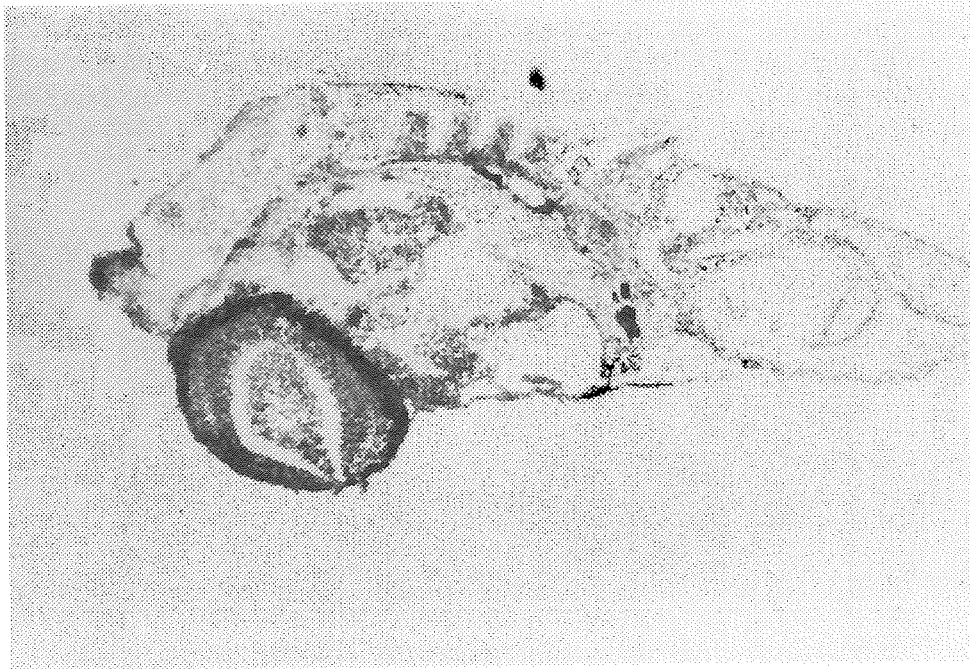
Kuva 10
Seeprakala, kontrolli
1 vrk kuoriutumisesta
131X



Kuva 11
Seeprakala, siirretty
kuoriutumisen jälkeen
100 %:een jäteveteen,
1 vrk, 131X



Kuva 12
Seeprakala, siirretty
kuoriutumisen jälkeen
50%:een jäteveeteen
1 vrk. 131X



Kuva 13
Seeprakala, siirretty
kuoriutumisen jälkeen
50%:een jäteveeteen
1 vrk. 131X

Taulukko 2. Käytettyjen jätevesilaimennoksien raskasmetallipitoisuudet $\mu\text{g/l}$.
Kokeiden keskiarvot, ennen näytteenottoa
veden pH on säädetty 7:ään.

	Cu	Cd	Co	Ni	Zn	Fe
100 % jätevesi altistus	23,0	4,2	800,0	556,3	1437,5	607,1
50 % jätevesi altistus	8,4	1,2	401,3	273,8	606,3	542,5
25 % jätevesi altistus	4,8	0,7	240,0	150,0	325,0	301,7

Taulukko 3. Jäteveden säilyvyys, raskasmetallipitoisuudet $\mu\text{g/l}$.

	Cu	Cd	Co	Ni	Zn	Fe
100 % jätevesi 11.11.1981	122	4,7	900	730	2000,0	13,6 mg/l
100 % jätevesi 17.11.1981	145	4,4	850	650	1600,0	30,0 mg/l