

# **Eesti rannikumere reostuse hindamine kalade bioloogiliste kahjustuste kaudu**

KIK projekt nr. 8302

## **Aruanne**

Koostaja: Arvo Tuvikene

Autorid: Arvo Tuvikene, Randel Kreitsberg, Reelika Raig

EMÜ Limnoloogiakeskus

Rannu 2016

## Sisukord

1. Sissejuhatus.....	3
2. Toksiliste ainete füsioloogilised mõjud .....	3
3. Soome lahe uuringuks valitud biomarkerid .....	4
4. Materjalid ja meetodika .....	9
4.1. Proovide kogumine.....	9
4.2. Polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (PAH) määramine setetes ja vees.....	10
4.3. Fikseeritud lainepikkustega fluorestsentsanalüüs .....	10
4.4. Vereanalüüsid.....	11
5. Tulemused ja arutelu.....	12
5.1. Vee ja setete PAH sisaldused.....	12
5.2. Kalade morfomeetrilised näitajad, indeksid ja PAH metaboliidid.....	12
Räim.....	12
Ahven.....	15
Lest .....	20
5.3. Verekahjustused.....	28
Räim.....	28
Ahven.....	32
Lest .....	35
6. Kokkuvõte.....	39
Kasutatud kirjandus.....	39
Lisad.....	41

## 1. Sissejuhatus

Töö eesmärkideks oli:

- 1) testida HELCOMi poolt soovitatud vee reostuse tuumik- biomarkereid:
  - a. polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike (PAH) laguproduktide kontsentratsiooni ahvena, räime ja lesta sapis/uriinis,
  - b. kalade punaliblede kahjustuste alusel hinnata Eesti rannikumere geno- ja tsütotoksilisust
- 2) nende biomarkerite alusel selgitada välja reostunud ja vähemreostunud piirkonnad Soome lahe Eesti rannikumeres.

## 2. Toksiliste ainete füsioloogilised mõjud

Toksilised ained põhjustavad füsioloogilisi, sealhulgas biokeemilisi ja käitumuslikke muutusi kõigil eluslooduse organisatsioonide tasemetel: rakusisestest ensüümide aktiivsusest kuni koosluste liigilise mitmekesisuseni (van der Oost et al., 2002). Füsioloogiliste mõjude all peetakse klassikaliselt silmas organismi talitlust ja organite tööd. Näiteks üks alkoholitarbimise võimalikke füsioloogilisi efekte, maksatsirroos, kujutab endast funktsionaalsete maksarakkude kärbumist ja sidekoestumist. Mõju võib olla lühiajaline ja äge (akuutne) või pikaajaline ja tagasihoidlikum (krooniline). Organismi kokkupuutel toksilise ainega avalduvad esimesena muutused just organismi rakusisestel tasanditel, aja möödudes ning kokkupuute jätkudes järgnevad sellele muutused organite talitluses, mis võib lõppeda organismi või tervete populatsioonide surmaga. Pikemaajalise kokkupuute tulemuseks võib olla ka näiteks liigirühma viljatus, mis põhjustab populatsiooni arvukuses muutusi väga pika aja möödudes. Mingi liigi või liikide halva käekäigu tulemusena võib muutuda kogu ökosüsteem: populatsiooni hukkudes või arvukuse kahanedes avanevad vabad nišid uutele, oportunistlikele pioneerliikidele.

Koosluste liigilise mitmekesisuse kohta annab infot regulaarne seire.

Kõige kiiremini sisenevad organismidesse väikesed molekulid ja nii avalduvad nende toimed ka esimesena. Suuremate molekulide organismi sisenemine toimub aeglasemalt, kuid nende mõju on pikaajalisem ja võimalikud kahjustused püsivamad.

Rasvlahustuvad ained (nt PAH) sisenevad organismi ja rakkudesse passiivse difusiooni teel otse ümbritsevast keskkonnast, näiteks õhuhingamisel kopsualveoolide kaudu või kaladel läbi lõpuste rakumembraanide. Keskkonnas leiduvate PAH mõju kaladele on võimalik hinnata kala sapis olevate PAH metaboliitide sisalduse järgi (Tuvikene, 1995; Tuvikene, 1997; Kreitsberg *et al.*, 2010, 2012, 2013; Hedman *et al.*, 2011; Kammann *et al.*, 2013). PAH võivad organismides aktiveerida toksiliste ainete metabolismi ning sellist muundumist võimaldab üldiselt ensüümiperekond tsütokroom P4501A (Tuvikene, 1995). Biotransformatsiooni käigus, eelnimetatud muundumise korral, võivad tekkida

reaktsioonivõimelised vaheproduktid. Neil vaheproduktidel on võime seonduda raku makromolekulidega, milledeks võivad olla RNA või DNA (Široká & Drastichová, 2004). Seondumisel võivad tekkida rakkudes ning kudedes erinevad tsüto- ja genotoksilised, kantserogeensed või mutageensed muutused. Selliseid reaktsioonivõimelisi vaheprodukte saab määrata just kala sapis (Tuvikene, 1997; Kreitsberg *et al.*, 2010, 2012, 2013; Hedman *et al.*, 2011; Kammann *et al.*, 2013).

Pikaajaline elamine PAHidega reostatud keskkonnas surub organismi immuunsüsteemi alla: väheneb makrofaagide hulk maksas ning T-lümfotsüütide aktiivsus. Nõrgestatud immuunsüsteemiga organism on vastuvõtlikum haigustele ja parasiitidele ning tema võime konkureerida toidu või sigimispartneri pärast kahaneb.

Üheks olulisemaks indikaatororganiks on maks, kuna maks tegeleb pideva toksiliste ainete kehast eraldamise, neutraliseerimise ning mõju vähendamisega – ning just maksas avalduvad reostuse mõjud sageli kõige ilmselt. Maksas võivad toimuda toksiliste ainetega kokkupuute tulemusena mitmed füsioloogilised muutused nagu glükogeeni reservide ammendumine, nii sileda kui kareda endoplasmaatilise retiikulumi vohamine maksarakkudes ehk hepatotsüütides, mitokondrite ülespundumine, pigmendi kadumine, rakutuuma taandareng. Pikaajalise kokkupuute tulemusena püüavad rakud esmalt aktiivse jagunemise kaudu suurenenud reostuskoormusega hakkama saada – selle tagajärjel suureneb maksa massi suhe kehamassi (maksaindeks, ingl.k *liver somatic index*, LSI). Kui toksiliste ainete mõju jätkub, asendatakse mittefunktsioneeruvad maksarakud sidekoega ning maksa üldine talitlusvõime väheneb. Selle nähtuse üldnimetus on maksa sidekoestumine ehk tsirroos.

### 3. Soome lahe uuringuks valitud biomarkerid

Biomarkerid on organismi bioloogilised muutused, mille kutsuvad esile toksilised ained. Biomarkeri vastus toksiliste ainete mõjule võib esineda nii molekulaarsel, rakulisel kui ka organismi tasemel; seda võib mõõta numbriliselt või kirjeldada muutuseid organismi käitumises.

Biomarkerite vastuseid kalade rakkudes ja kudedes on ökotoksikoloogide poolt laialdaselt kasutatud ka Läänemere maades, saades seeläbi infot kalade tervise ja keskkonna stressorite kohta kui inimõju ulatuse kohta kalade elukeskkonnas. Kõige sagedamini on sellistes töödes kasutatud lesta (*Platichthys flesus*), räime (*Clupea harengus membras*), ahvenat (*Perca fluviatilis*) ja emakala (*Zoarces viviparus*) (näit. Broeg and Lehtonen, 2006; Gercken *et al.*, 2006; Schiedek *et al.*, 2006; Kreitsberg *et al.*, 2010; Kreitsberg *et al.*, 2012). Meie valisime võrreldavuse saavutamise eesmärgil käesoleva uuringu liikideks lesta, räime ning ahvena.

- **Lest** (*Platichthys flesus*) on laialt levinud kõikjal Eesti rannikumeres ning eelistab elupaigana liivasemat- savisemat merepõhja. Läänemeres kõige rohkem esinev lest on süvikukudulest (*Platichthys flesus trachurus* Dunker), kuid on ka populatsioone, kes eelistavad elu- ja kudemispaigana madala soolsusega lahtesid (Ojaveer, 2003). Lestad

on põhjalise eluviisiga ning puutuvad pidevalt kokku setetesse kuhjunud saasteainetega. Seetõttu kasutatakse lesta paljude riikide keskkonnareostuse seirel.

- **Räimel** (*Clupea harengus membras*) on Eesti rannikuvetes kolm peamist asurkonda - Liivi lahe räim, Soome lahe räim ja Läänemere kirdeosa avamereräim. Räim on Eestis olulisemaid töönduslikult püütavaid kalu ning seetõttu on tema tarbimine ka peamine mehhanism merre lastud keskkonnamürkide jõudmiseks ringiga tagasi inimese toidulauale. Eesti rannikumerest püütud suuri räimi (>17 cm) ei soovitata süüa rohkem kui paar korda kuus (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H0688&from=ET>)
- **Ahven** (*Perca fluviatilis*) on Eestis laia levikuga kala, keda püütakse ka töönduslikult. Keskkonnaseires kasutatakse ahvenat seni vähem. Tegemist on räimega võrreldes väiksema rasvasisaldusega (seetõttu ka väiksema toksiliste ainete sisaldusega kudedes) ning röövtoidulisema keskveet ja rannaalasiid asustava kalaga – see teeb ahvenast hea liigi toksiliste ainete biomarkerite seires.

Mittesurmavates kogustes keskkonda sattunud toksiliste ainete mõju ei ole kohene, seda näitavad biomarkerid ilmnevad alati ajalise viitega. Seega ei ole välistatud, et biomarkeri avaldumisel (nt rakus mikrotoomade tekkimisel) võib olla selle põhjus juba kadunud või kadumas. Samuti on keeruline hinnata, milline toksiline aine just konkreetse muutuse põhjustas, sest organismid on keskkonnas pidevalt kokkupuutes mitmete erinevate keemiliste ainete ja paljud neist võivad põhjustada bioloogilisi muutusi. Kui kala maks on laiguline, siis võib see olla põhjustatud väga mitmetest toksilistest ainetest, aga ka nende koosmõjust.

Samas on biomarkereid mõistlik kasutada just igapäevases seires ning olukordades, kus uurimisobjekt on olulisem kui konkreetne toksiline aine. Kui teadlast huvitab mingi liigi käekäik, siis biomarker kirjeldabki just seda – keskendumata küsimusele, milline ühend seda käekäiku mõjutab (siiski, osade spetsiifiliste biomarkerite puhul saab oletada ka selle esilekutsumist põhjustanud kemikaali). Toksilise aine kontsentratsiooni keskkonnas saab teada siis, kui minnakse midagi konkreetset mõõtma – kui aga ei teata, millist ainet mõõta või ei ole konkreetne aine tähtis, siis annab selguse biomarkerite analüüs. Biomarker näitab, kas mingitel toksilistel ainetel on mõju organismide tervisele, samal ajal kui keskkonnast mõõdetud toksiliste ainete kontsentratsioonid lubavad meil vaid eeldada (tuginedes varasematele kogemustele) mõju elusorganismidele.

Hetkel seiratakse Eesti rannikumere keemilist reostatust kahe kalaliigi abil, kelleks on räim ja ahven. Raskmetallide kontsentratsioon kalade maksas määratakse aatomabsorptsioon-spektrofotomeetrilisel meetodil, kloororgaanilised ühendid analüüsitakse kala lihase proovist gaaskromatograafilisel meetodil. Seire eesmärgiks on ohtlike ainete sisalduse pikaajaliste muutuste jälgimine, merekeskkonna saasteseisundi hindamine ja probleemsete piirkondade lokaliseerimine (seire.keskkonnainfo.ee). Biomarkerite analüüsimine on keskmiselt märksa soodsam kui keemiliste analüüside tegemine ning võib anda infot pikaajalisema reostuse ja kalade tervisliku seisundi ja keemiliste ainete kumulatiivse mõju kohta (Räägel, 2014).

Soome lahe uuringus meie poolt kasutatud biomarkerid:

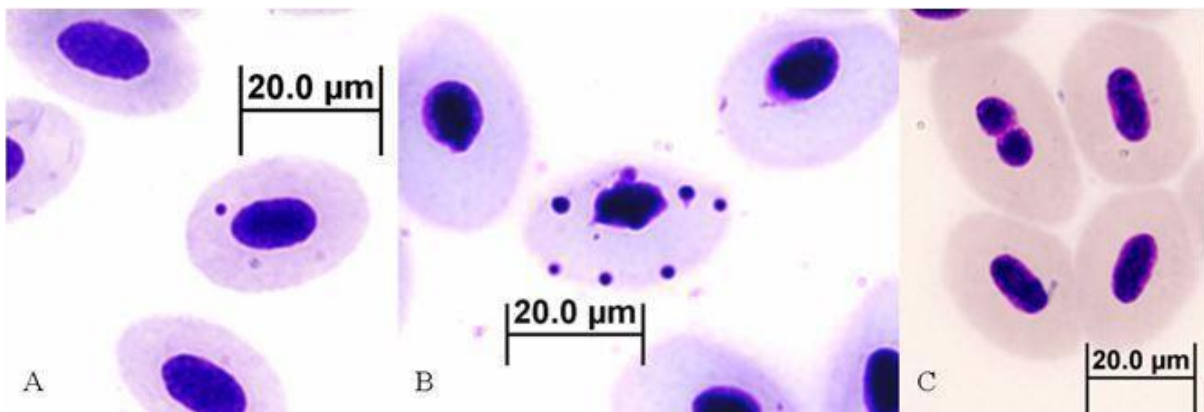
- PAH metaboliidid sapiis ja uriinis: biotransformatsiooni produktid – konjugaadid, mida mõõdetakse vahetult enne, kui neid organismist eritatakse. Fluorestsents-spektrofotomeetriga mõõtsime naftaleeni, fenantreeni, püreeni ja benso-a-püreeni metaboliite sapi ning uriini lahuses. Biomarker on indikaatoriks orgaanilisele toksilisele reostusele, mida põhjustavad naftaproduktid, põlevkivi jt kütused.
- Erütrotsüütide genotoksilised ja tsütotoksilised kõrvalekalded: muutused vererakkude ehituses, eelkõige tuumas. Mikroskoopia abil analüüsiti erinevat tüüpi kõrvalekaldeid vererakkude tuumas (nt mikrotoomad, kaksiktuumalised ja fragmenteerunud tuumaga rakud) (joonised 3.1. – 3.3.). Biomarker on indikaatoriks mitmesuguste toksiliste ainete (naftaproduktid, raskmetallid), aga ka nt radioaktiivsuse kohta.
- Parasiteeritus – analüüsitud isenditel kirjeldati maksal, gonaadidel ning kõhuõõnes silmaga nähtavad parasiidid ning parasiitide tsüstid. Parasiteerituse määr biomarkerina näitab organismi tervislikku seisundit, sh võttes arvesse ka keskkonna reostatust. Toksiliste ainete poolt nõrgestatud organism on vastuvõtlikum haigustele ja parasiitidele ning seega on biomarker heaks konditsiooni kirjeldavaks tunnuseks.
- Füsioloogilised ja morfoloogilised muutused: väärarengud, haiged organid, kasvajakud ja kudede kahjustused on pikaajaliste kahjulike mõjude tunnusteks. Ka konditsiooniindeksite (tüsedusindeksite), maksa- (LSI) ja gonaadiindeksite (GSI) kõrvalekaldumised kuuluvad siia loetelusse. Muutused kala tüsedusindeksis (CF ehk konditsioonifaktor või Fultoni indeks kirjeldab kala massi ja pikkuse suhet) on klassikaline laialt kasutatud leidnud mittespetsiifiline biomarker.
- Lesta maksa värvus on alles viimastel aastatel kasutusele võetud kui potentsiaalne pool-spetsiifiline (mõjutatud organokloriidide ja PAHide poolt) biomarker. Vähekasutatud biomarker on teadustöodes esitatud kui üldist maksa konditsiooni (rasvumist, sidekoestumist) kirjeldav tunnus. Mida kahvatum on kala maks, seda halvemas seisundis on organ.





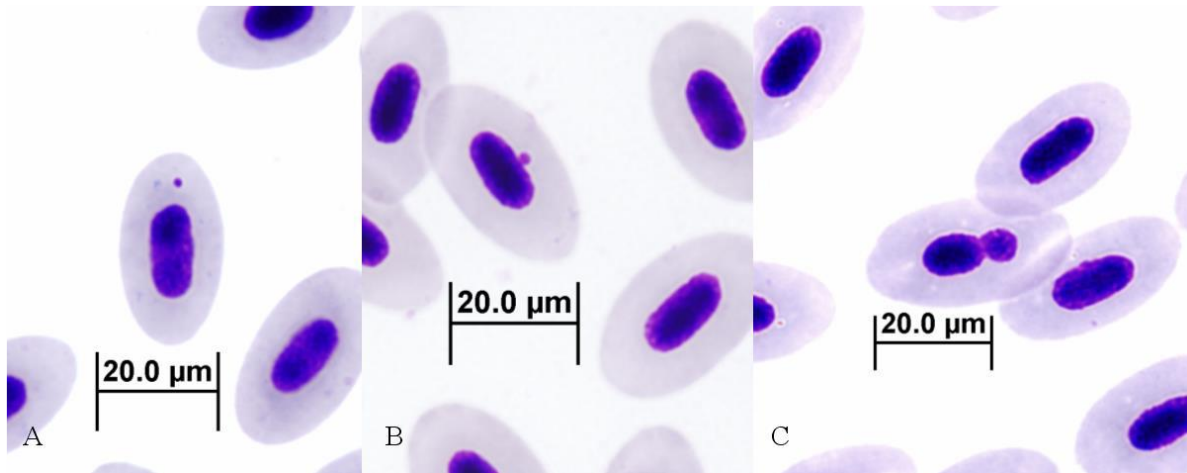


Joonis 3.1. Kõikidel kaladel mõõdeti täis- ja standardpikkus ja kaal ning võetud vereproovist tehti äigepreparaat.



Joonis 3.2. Kala erütrotsüüdid: mikrotuum (A), fragmenteerunud apoptootiline erütrotsüüt (B) ja 8-kujuline erütrotsüüt (C). Joonis muudetud. Allikas: (foto: Janina Baršienė)





Joonis3.3. Kala erütrotsüüdid: mikrotuum (A), tuumapung (B) ja 8-kujuline erütrotsüüt (C).  
Allikas: (foto: Janina Baršienė)

## 4. Materjalid ja meetoodika

### 4.1. Proovide kogumine

Vee- ja setteproovid koguti ajavahemikul 31. juuli – 3. august 2015 (Tabel 1). Veeproovid võeti ca 1 m sügavuselt batomeetriga ja pandi klaaspudelisse, mis säilitati kuni analüüsini jääkastis +4 °C juures. Setteproovid võeti Ekmani tüüpi põhjaammutiga, asetati plastikkotti ja säilitati kuni analüüsimiseni jääkastis +4 °C juures.

Kalu kogusime läbi usaldusväärsete kohalike kalurite võrgustiku, kokku 7 kohast Soome lahe rannikumeres (Tabel 3.1). Proovipunktide paiknemine liikudes läänest itta: Nõva lahes Läänemaal, Paldiski lahes, Tallinna lahes Naissaare all ning Noblessneri sadama esisel, Muuga lahes Leppneemes, Käsmu lahes ning Purkse jõe suudmealal Ida-Virumaal. Kokku analüüsiti 203 kala: 101 räime, 34 ahvenat ning 68 lesta.

Kalad saadi kaluritelt vahetult pärast püügilt naasmist, valdavalt oli tegemist veel elusate kaladega (vajalik vereproovi kogumiseks!). Vahetult enne proovide kogumist hukati kalad tugeva hoobiga kuklasse: kalad mõõdeti (L ja l), kaaluti nii terve kala, maks kui põrn, võeti vereproov südamest, sapiproov, uriiniproov, tehti parasiitide ning maksa värvi vaatlus ja kirjeldati üldist kala konditsiooni (joonis 3.1). Verepreparaadid fikseeriti 2 minutit metanoolis ning kuivatati koheselt (joonis 3.2 ja 3.3); sapi ning uriini proovid säilitati 2 mL krüoviaalides vedelas lämmastikus, hiljem labori külmkapis -70 °C juures kuni analüüsideni. Kalade, maksa ja põrna kaalu põhjal arvutati vastavad indeksid: maksaindeks ( $LSI = \text{maksa kaal grammides/kogumass} \times 100$ ), põrnaindeks ( $SpSI = \text{põrna kaal grammides/kogumass} \times 100$ ), ning konditsioonifaktor ( $CF = \text{kogumass/täispikkus cm}^3 \times 100$ ).

Proovide kogumine toimus mobiilses välilaboris, analüüsid viidi läbi Eesti Maaülikooli Limnoloogiakeskuse laboris ning vereanalüüsid Leedu Loodusuuringute ja Ökoloogia Instituudis.

Tabel 3.1. Proovikohtade koordinaadid ja proovide iseloom

Koht	Pikkuskraad	Laiuskraad	Proovid
Dirhami	23:29	59:12	Sete
Osmusaar	23:25	59:16	Vesi
Nõva	23:39	59:15	Kalad: räim, ahven, lest
Paldiski laht	23:57	59:23	Vesi, sete, kalad: räim
Naissaar	24:32	59:31	Vesi, sete, kalad: lest
Noblessneri sadam	24:43	59:27	Kalad: räim, ahven
Muuga laht	24:55	59:32	Kalad: räim, ahven, lest
Prangli	25:02	59:36	Vesi, sete
Vergi	26:06	59:36	Vesi, sete
Käsmu	25:56	59:37	Kalad: räim, lest
Purtse	27:01	59:27	Vesi, sete, kalad: räim
Sillamäe	27:47	59:24	Vesi, sete
Narva laht	28:00	59:27	Vesi, sete

#### 4.2. Polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (PAH) määramine setetes ja vees

PAHide eraldamiseks veest kasutati SPE (tahkefaasi ekstraheerimiskolonn) kolonne, millest omakorda PAHid ekstraheeriti heksaaniga. Setetest ekstraheeriti PAHid samuti heksaaniga. PAHide määramine toimus vedelkkromatograafi Shimadzu Prominence abil.

Setete orgaanilise aine hulga määramiseks kuumutati setet 550 °C juures 24 tundi ja kaalukao alusel arvutati orgaanilise aine hulk, mida kasutati setetes summaarsete PAH sisalduste normaliseerimiseks.

#### 4.3. Fikseeritud lainepikkustega fluorestsentsanalüüs

Fikseeritud lainepikkustega floresents-spektrofotomeetria analüüs lahjendatud sapist või uriinist on kõige kiirem ja tehniliselt vähem nõudlik meetod, mille abil saab uurida kalade PAHidele eksponeeritust (Beyer, 2010). Samuti saab floresentsanalüüsi teel hinnata reostuse päritolu. 2- ja 3-tuumset PAH-id pärinevad sageli toornafta ja laevakütuse reostusest. Liiklusest, kodustest majapidamistest ja tööstusest pärinevatele põlemisjääkidele vastavad aga 4 – 6 tuumset PAH. Üldiselt peetakse sapis leiduvate PAH metaboliitide leidmist fikseeritud lainepikkusega fluorentsentsi meetodil üsna usaldusväärseks biomarkeriks, mis korreleerub ka keemilise analüüsiga (Vuorinen et al, 2006).

PAH analüüsiks fluorimeetriga kogusime uuritavatelt kaladelt sapi (Aas et al., 2000) ja uriini. Sapipõiest vedeliku kogumiseks eraldasime soolestikust kääride abil sapipõie ning purustasime selle pintsettide abil viaalis.

Sapist fluorentsentsi abil PAH derivaatide sisalduse mõõtmiseks lahjendasime ülessulatatud sapi proovid kontsentratsioonis 1 : 1600 48 %-lises etanoolis (Aas et al., 2000). Lahustina kasutasime 96% etanooli ja deioniseeritud vee lahust, vahekorras 1:1. See loob piisavalt homoloogilise keskkonna proovide analüüsiks. Sarnaselt toimisime ka kogutud uriiniproovidega, eesmärgiks saada võrreldavad andmed paralleelsete metabolismiradade

aktiivsuse kohta. Proovide ettevalmistamisel kasutatud laboriinventar oli eelnevalt deioniseeritud veega pestud ning pipeteerimisel kasutatud automaatpipeti otsikud olid ühekordsed.

Lahjendatud sapi- ja uriiniproovide analüüsil kasutasime fluorestsents-spektrofotomeetrit 96-kaevulise plaadilugejaga BMG Omega Fluostar. Fluorimeetri tööpõhimõte seisneb teatud kindlal lainepikkusel proovi siseneva valguskiire ergastaval mõjul uuritavale ühendile. Spetsiifiline ühend (PAH derivaat/faas II konjungaat) hakkab proovis seetõttu kiirgama teatud kindla lainepikkusega fluorestseeruvat valgust. Seda eralduvat valgusehulka on võimalik mõõta ja see iseloomustab uuritava aine sisaldust konkreetsetes proovis. Meetod on semikvantitatiivne ja tulemused saadakse suhtelistes fluorestsents-ühikutes (FÜ) (Aas et al., 2000; Vourinen et al., 2006).

Erinevatel ühenditel kasutatakse ergastamiseks erineva lainepikkusega kiirgust, samuti on proovist eralduvate kiirguste lainepikkused ühendigruppide-spetsiifilised. Antud töös on kasutatime fluorimeetrit naftaleeni, fenatreeni, püreeni ning benso(a)püreeni hulga mõõtmisel (Tabel 4.1). Vastavad lainepikkuste paarid nende jaoks olid järgmised:

Tabel 4.1. Lainepikkused vastavate ühendite detekteerimiseks (Aas et al., 2000).

Lainepikkused		Mõõdetav ühend
sisenev	väljuv	
290 nm	380 nm	Naftaleen
256 nm	380 nm	Fenatreen
341 nm	383 nm	Püreen
380 nm	430 nm	Benso(a)püreen

### Statistilised analüüsid

Statistilised analüüsid tehti statistikaprogrammiga Statistica 7. Reostuse üldise dünaamika analüüsil kasutati ühesuunalist variatsioon-analüüsi (ANOVA) ning post-hoc võrdlusena Tukey testi. Usalduspiiriks on kõikide analüüside juures:  $p < 0,05$ .

#### 4.4. Vereanalüüsid

Vereproovid võeti kala südamest hepariniseeritud klaaskapillaariga ning tehti äigepreparaat. Preparaat fikseeriti absoluutse metanooliga pärast kuivamist, ühe minuti jooksul. Fikseeritud proovid saadeti Vilniuse Loodusuuringute Keskuse Ökoloogia Instituudi laborisse. Vereproovid värviti seal 5% Giemsa lahusega fosfaatpuhvrts, mille pH oli 6,8. Punaliblede kahjustuse analüüsimiseks kasutati valgusmikroskoopi Olympus BX51 ja maksimaalselt 1000-kordset suurendust. Igal kalal uuriti kokku 4000 erütrotsüüti. Registreeriti järgmiste rakuliste kõrvalekallete esinemissagedused promillides (‰): MN mikrotuum, BN-

kahetuumne erütrotsüüt, NBf- pungaga erütrotsüüt, 8- kujuline erütrotsüüt, BNb- plasmasillaga, FA- fragmenteerunud apoptootiline erütrotsüüt (Joonised 1.2 ja 1.3).

Vereproovide statistiliseks testimiseks kasutati statistikapaketti PRISM, mitteparameetrilist Mann-Whitney testi.

## 5. Tulemused ja arutelu

### 5.1. Vee ja setete PAH sisaldused

PAHid lahustuvad vees üldiselt halvasti ning seetõttu on nende sisaldused seal madalad. Valdavateks veest eraldatud PAH-ideks atsenaftaleen, fenantreen ja antratseen (Lisa 1). Summaarsed PAH-ide sisaldused jäid vahemikku 11,5 ng/l (Naissaare lähedal) kuni 30,5 ng/l (Purtse jõe suudmealal) (Lisa 1).

Kõige reostunumateks osutusid Purkse jõe suudmeala setted, järgnesid Pakri saarte juurest kogutud setted (Lisa 2 ja 3). Purkse jõe suudmealal olid kõrgendatud sisaldusega naftaleen, atsenafteen, fenantreen, antratseen, fluoranteen, püreen, benso(a)antratseen, benso(a)püreen ja dibenz(ah)antratseen. Pakri saarte juurest kogutud setetes oli kõrgendatud atsenafteeni, fenantreeni, fluoranteeni ja püreeni sisaldused. Prangli, Narva jõe suudmeala ja Narva lahe setetes ületas piirnormati fluoranteeni (Lisa 2 ja 3). Prioriteetsete saasteainete nimistu (<https://www.riigiteataja.ee/akt/108012016010>) alusel oli settes üle keskkonnakvaliteedi piirväärtuse antratseeni Purkse jõe suudmealal.

### 5.2. Kalade morfomeetriselised näitajad, indeksid ja PAH metaboliidid

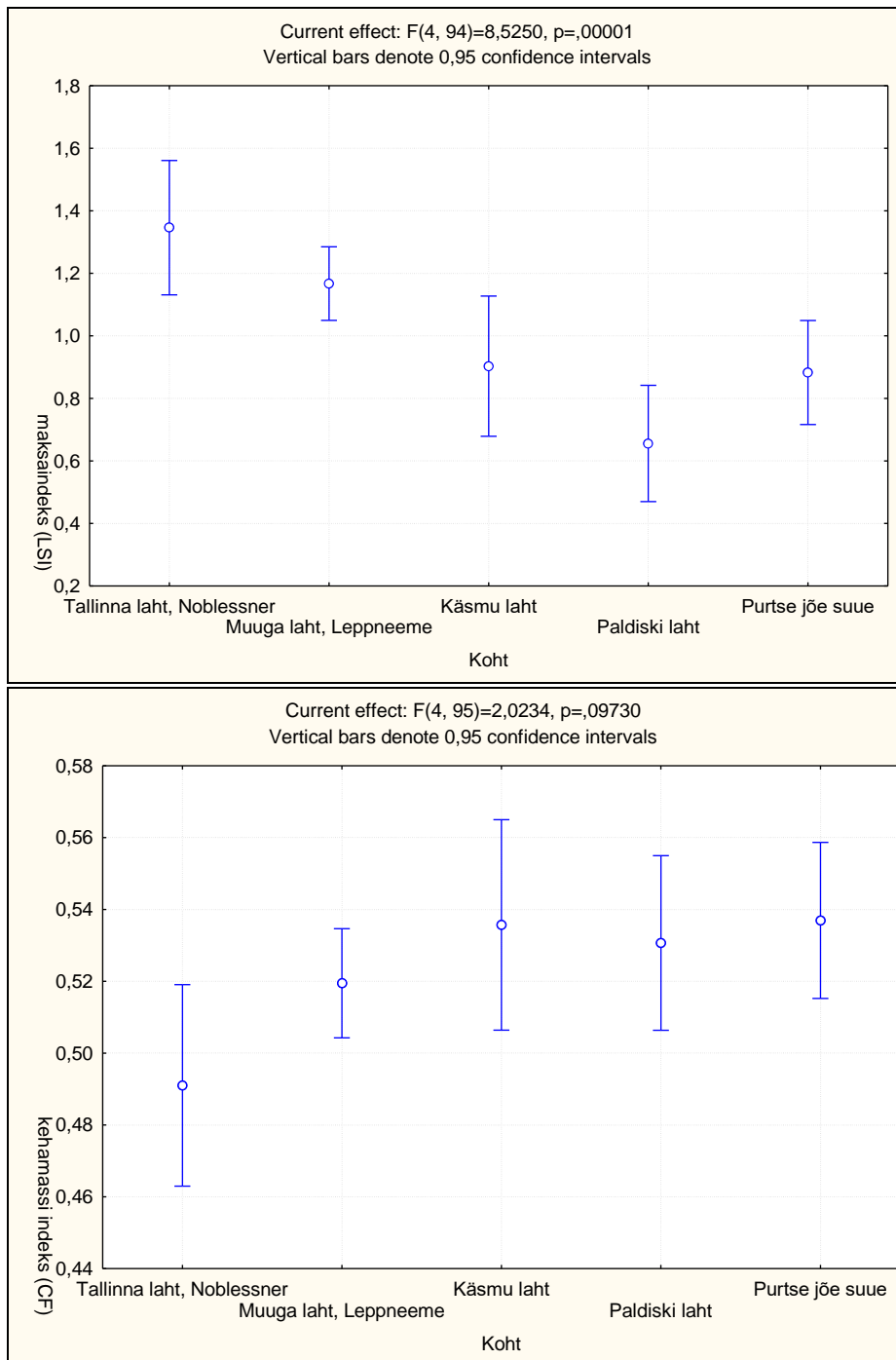
Räim

Kogutud räimede mõõtmistulemuste keskmised olid vastavalt: pikkus (L) 160 mm ( $\pm 22$  SD) ja (l) 135 mm ( $\pm 19$  SD), kaal 23 g ( $\pm 13$  SD), maksa kaal 0,24 g ( $\pm 0,17$  SD), põrna kaal 0,03 g ( $\pm 0,027$  SD), ning keskmised indeksid: CF 0,52 ( $\pm 0,05$  SD), LSI 1,02 ( $\pm 0,4$  SD) ja SpSI 0,05 ( $\pm 0,09$  SD) (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Räime meetrilised mõõtmised ning indeksid.

Räim					
	N	Keskmine	Miinum	Maksimum	Hajuvus (SD)
<b>pikkus (L)</b>	101	160,2079	108,0000	267,0000	22,25458
<b>pikkus (l)</b>	101	135,3069	92,0000	225,0000	19,02406
<b>mass (G)</b>	100	23,0114	6,8400	130,0000	13,25461
<b>kehamassi indeks (CF)</b>	100	0,5231	0,4043	0,6830	0,04997
<b>maks (g)</b>	100	0,2404	0,0100	1,3900	0,17096
<b>maksaindeks (LSI)</b>	99	1,0194	0,1416	2,7092	0,42843
<b>põrn (g)</b>	41	0,0295	0,0100	0,1100	0,02720
<b>põrnaindeks</b>	41	0,0491	0,0000	0,5956	0,09979

Vereloome ja immuunsüsteemiga seotud põrnaindeksid kõikusid väga suures ulatuses, samal ajal kui maksaindeksid püsisid oluliselt stabiilsemad. See võib viidata põrna suuremale tundlikkusele, aga ka üldisele massi hajuvusele.



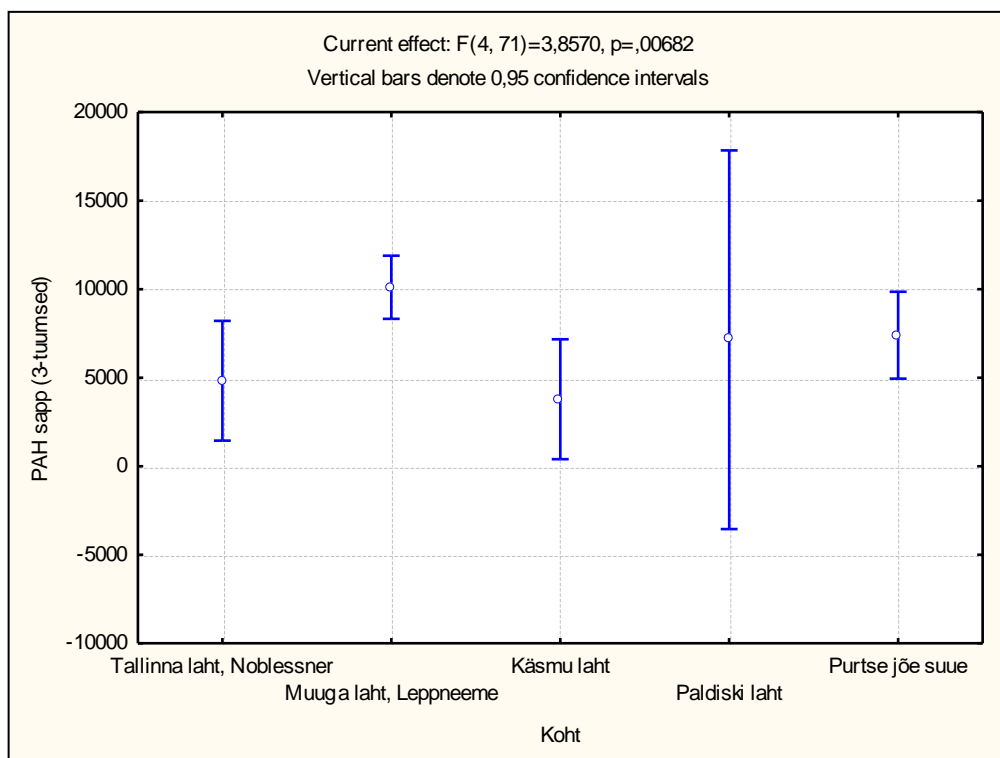
Joonis 5.1. Soome lahe räimede konditsioonifaktor ning maksaindeks näitavad erinevusi lääne-ida gradiendil ( $p=0,09$  ja  $0,00001$ ).

Maksaindeks ja kehamassi indeks (joonis 5.1) näitavad vastassuunalisi gradiente. Madalaima konditsioonifaktori ehk kehamassi indeksiga on Tallinna ning Muuga lahe räimed. Samuti on Tallinna ning Muuga lahe räimed kõrgeimate maksaindeksitega. Antud tulemused toetavad teineteist, kuna kõrge konditsioonifaktor on indikaatoriks kalade heast toitumusest ja tervislikust seisundist, samas kui kõrge maksaindeks näitab halvas seisundis, stressis rakkude

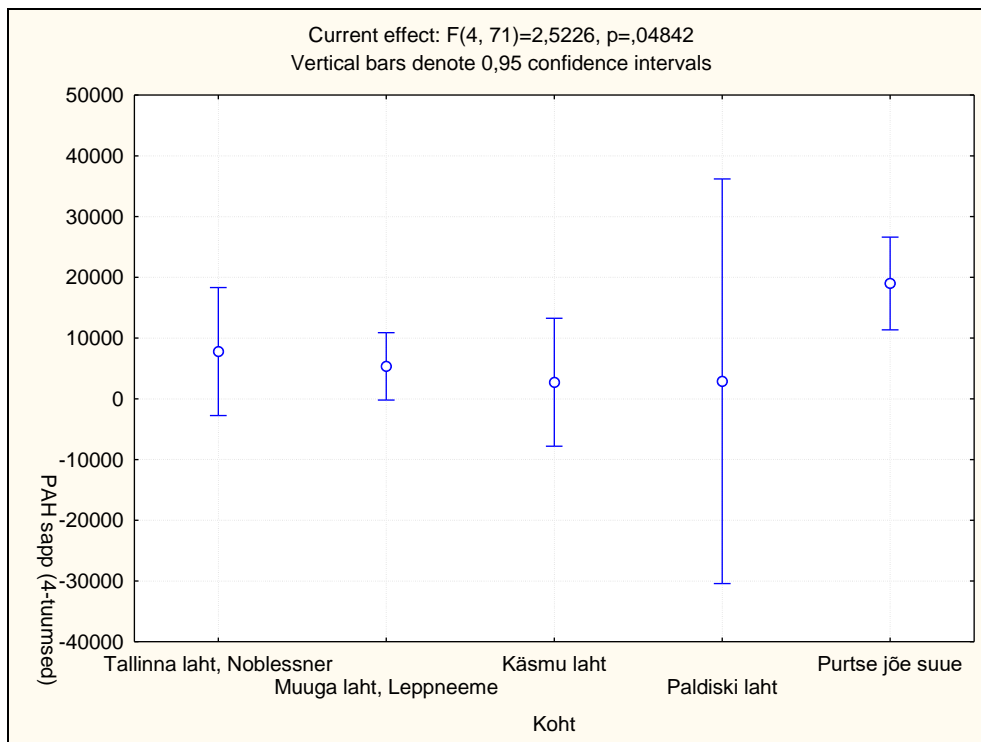
proliferatsiooni tulemusena suurenenud, sidekoestunud või põletikulist maksa. Antud kahe indeksi kokkuvõttes võib öelda, et Tallinna ja Muuga lahe räimed olid üldiselt kehvas tervislikus seisundis teiste analüüsitud räimedega võrreldes.

Põrnaindeksid, nagu tulemuste suurest hajuvusest (SD ehk *standard deviation*) näha, ei erinenud eri proovipunktides statistiliselt.

PAH metaboliidid: 2- ja 5- tuumsete PAHide (vastavalt naftaleeni ja benso-a-püreeni derivaatide grupid) metaboliitide analüüsid ei näidanud eri proovipunktides räimel kontsentratsioonide erinevusi (joonis 5.2). Küll tulid erinevused statistiliselt olulised ning selged 3- ning 4- tuumsete (vastavalt fenantreeni ja püreeni derivaatide grupid) PAHide puhul räime sapist. Kui fenantreen on sünteetiliste vaikude ja pestitsiidide osiseks (on ka paremini vees lahustuv, akuutselt toksiline ning suuremamolekuliliste PAHidega võrreldes vähem kantserogeenne), siis 4- tuumalised püreeni metaboliidid on selgeks indikaatoriks põlevkivireostuse olemasolule, mistõttu on kõrgemate sisalduste leidmine Purtse jõe suudmealadelt ootuspärane.







Joonis 5.2. 3- ja 4-tuumsete PAHide metaboliidid räime sapis erinevates proovipunktides. 3- tuumsete metaboliitide seas on Muuga lahe kaladel statistiliselt kõrgemad kontsentratsioonid Tallinna lahe ( $p=0,05$ ) kui Käsmu ( $p=0,01$ ) kaladel. 4-tuumsete metaboliitide seas eristub Purtse jõe suudme proovipunkt, mille räimedel on oluliselt suurem toksiliste ainete sisaldus kui Muuga lahe kaladel ( $p=0,04$ ).

Kokkuvõtvalt: Räum on rasvarikaste kudedega pelaagiline planktontoiduline kala, kes iseloomustab hästi veekogumi üldist hajusat kvaliteeti. Antud andmete puhul võib väita et Soome lahe räimedest on halvimas seisundis Tallinna ja Muuga lahte asustavad populatsioonid, samas kui parimas konditsioonis ning toksiliste ainetele vähim eksponeeritud on Paldiski lahe ning Käsmu lahe räimed. Ka Ida-Virumaa PAHi metaboliitide esile tõusmine on ootuspärane. Et aga Purtse suudme kalade üldine konditsioon ning maksa seisukord on head, siis on alust arvata, et kalad on suutelised toksiliste ainete reotuskoormust taluma ning on võimelised metabolismi abil kahjulikud ained kehast väljutama enne kui need püsivalt kahjulikku mõju jõuavad avaldada.

#### Ahven

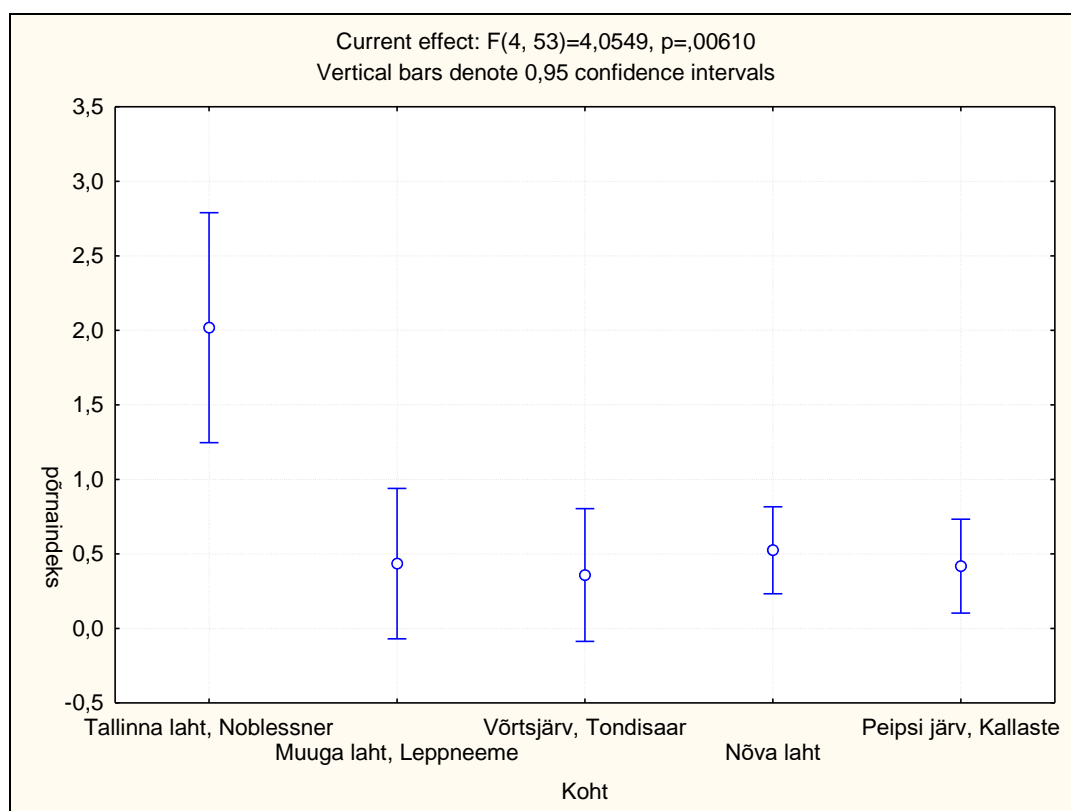
Uurimistöökäigus kogutud ahvenate mõõtmistulemuste keskmised olid vastavalt: pikkus (L) 254 mm ( $\pm 28$  SD) ja (l) 215 mm ( $\pm 24$  SD), kaal 219 g ( $\pm 79$  SD), maksa kaal 3,7 g ( $\pm 1,7$  SD), põrna kaal 0,3 g ( $\pm 0,2$  SD) ning keskmised indeksid: CF 1,3 ( $\pm 0,09$  SD), LSI 1,7 ( $\pm 0,3$  SD) ja SpSI 0,8 ( $\pm 0,8$  SD) (tabel 5.2).

Tabel 5.2. Ahvena meetrilised mõõtmised ja indeksid.

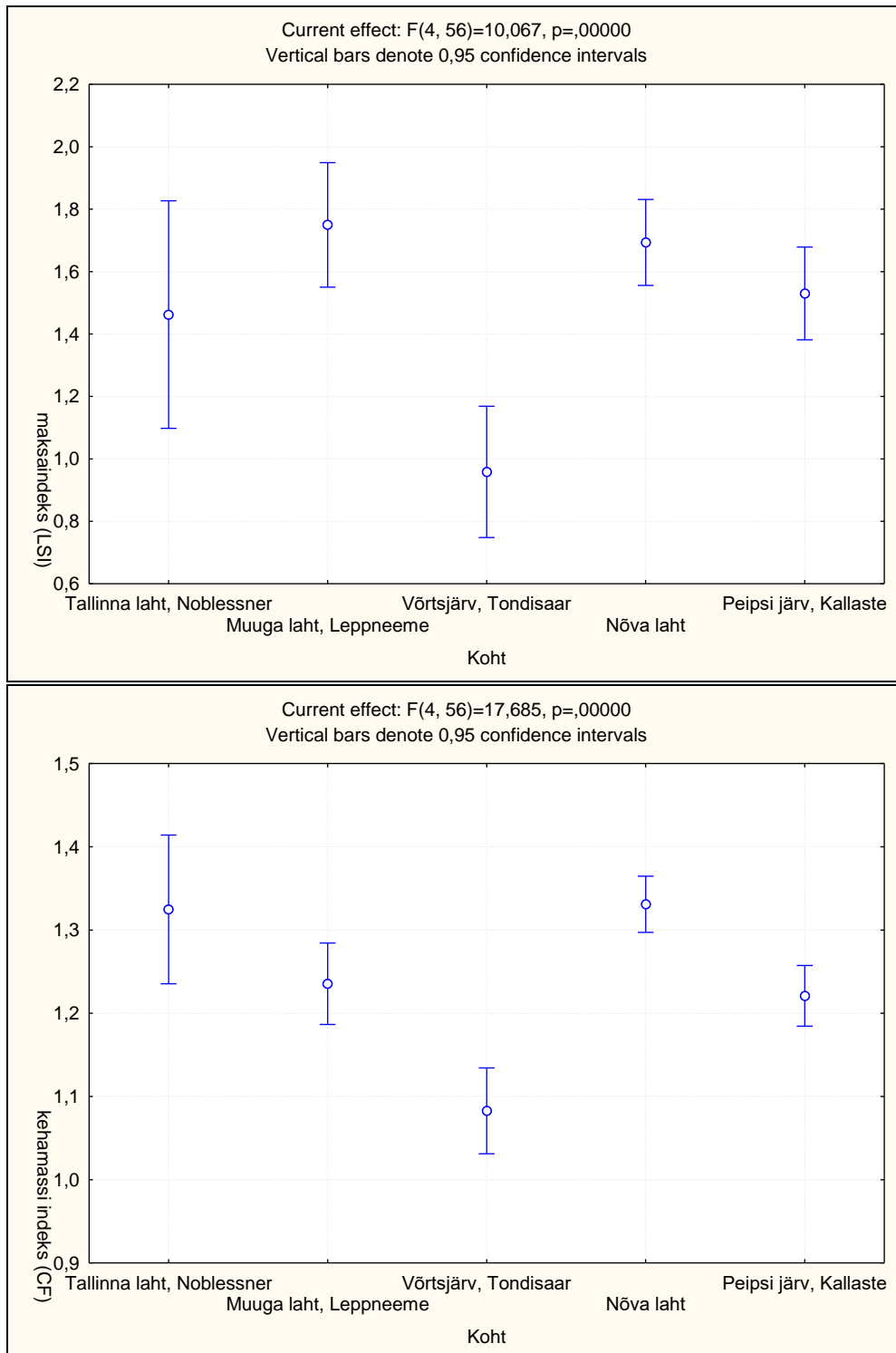
Ahven					
	N	Keskmine	Miinumum	Maksimum	Hajuvus (SD)
<b>pikkus (L)</b>	34	252,4706	193,0000	330,0000	27,89725
<b>pikkus (l)</b>	34	214,9412	164,0000	283,0000	23,73585
<b>mass (G)</b>	34	219,0974	87,6300	495,3200	78,80747
<b>kehamassi indeks (CF)</b>	34	1,3023	1,1067	1,4601	0,09425
<b>maks (g)</b>	34	3,7294	1,2800	10,9600	1,75656
<b>maksaindeks (LSI)</b>	34	1,6896	0,9029	2,5318	0,31782
<b>põrn (g)</b>	32	0,3303	0,0500	1,0800	0,20136
<b>põrnaindeks</b>	31	0,6485	0,0116	3,2845	0,88586

Ka ahvenate puhul on põrnaindeksi hajuvus oluliselt suurem kui teistel indeksitel – seda tähenduslikum on Tallinna lahe Noblessneri sadama esise proovipunkti statistiliselt oluline erinevus ( $p=0,002$ ) teiste uurimisaladega võrreldes (joonis 5.3, 5.4). Põrnaindeks kirjeldab kala konditsiooni mõnevõrra sarnaselt maksale (toksilistele ainetele eksponeerituna toimub suurenemine aktiivse rakujagunemise tulemusena).

Ahvena eeliseks indikaatorliigina on asjaolu, et mageveekalana leidub teda nii meie rannikumeres kui ka siseveekogudes – see annab võimaluse panna merereostuse ja konditsiooni indikaatorid veelgi laiemapildilisse võrdlusesse. Sellepärast oleme kasutanud võimalust ning kuvanud joonistel analoogsete uuringute tulemused ahvenatest ka Võrtsjärvel ning Peipsil.

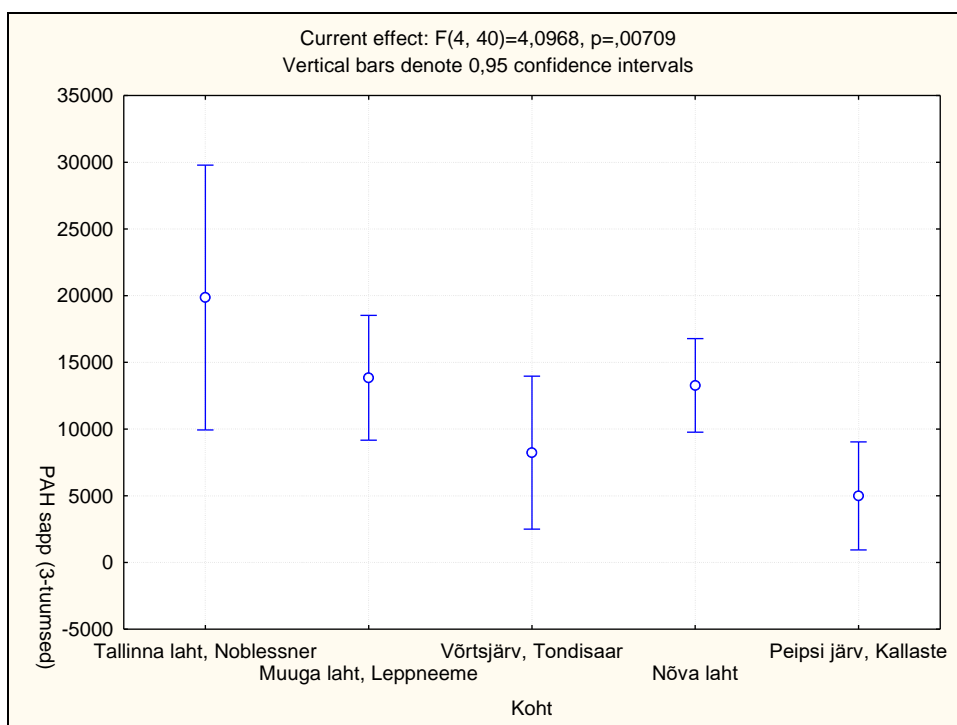
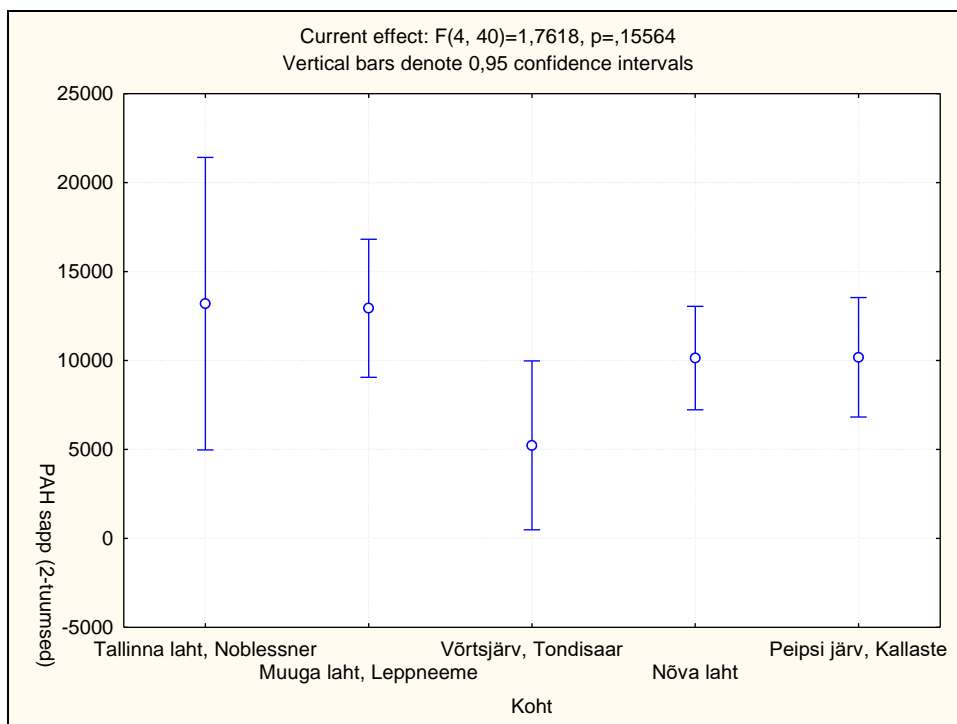


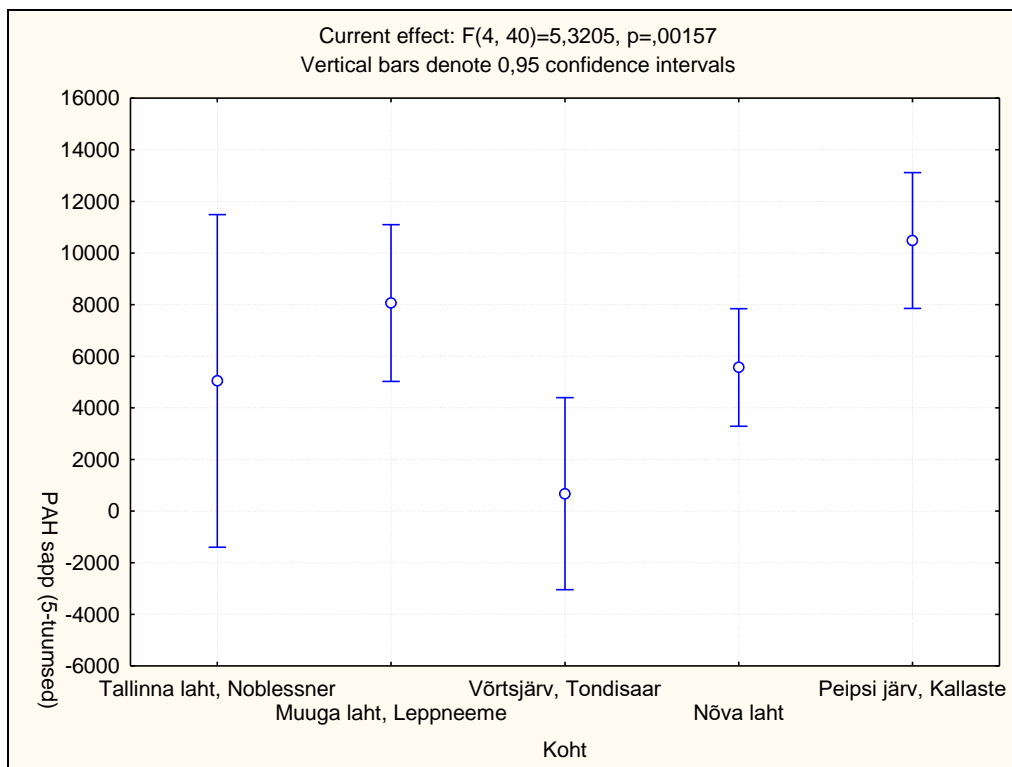
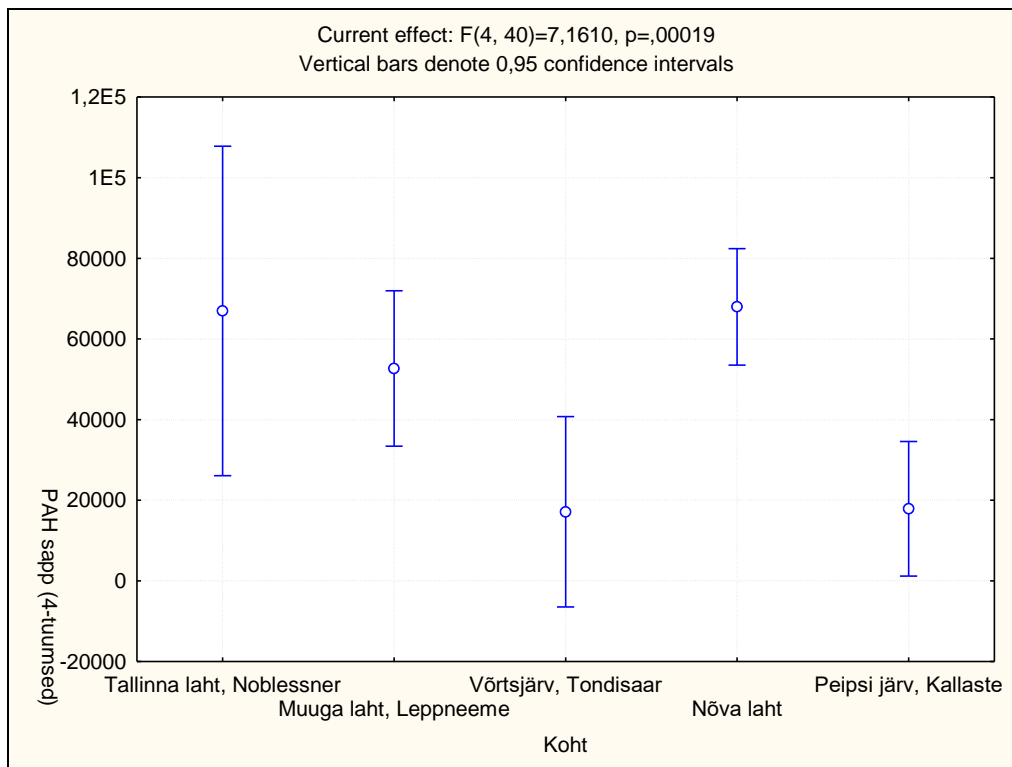
Joonis 53. Põrnaindeksid proovipunktides: Tallinna laht (Noblessner) erines statistiliselt oluliselt (ANOVA,  $p=0,002$ ) proovipunktidest nii mujal Soome lahes kui ka sisevetes.



Joonis 5.4. Kehamassi ning maksaindeksite analüüsimisel on näha osaliselt statistiline erinevus mere ja sisevete vahel: sisevete madalamad indekse väärtused näitavad üheaegselt nii väiksemat toksiliste ainete koormust (LSI) kui ka kehvemat toidubaasi (kajastub CF indeksis). Soome lahe punktide võrdluses on erinevused väiksemad, vaid Muuga lahe kalad on mõnevõrra kehvemas konditsioonis (madal CF ja kõrge LSI) võrreldes teiste Soome lahe punktidega.

Sarnaselt indeksitele joonistub mere ja sisevete vaheline erinevus välja ka PAH metaboliitide analüüsis (joonis 5.5). Ühe erandiga (5-tuumused PAHid Peipsi järves) on selgelt näha toksiliste ainete metaboliitide madalamad kontsentratsioonid sisevetes, eriti Võrtsjärves. Soome lahe ahvenate metaboliitide sisaldused uuritud punktides (Tallinna laht, Muuga laht ja Nõva laht) püsivad samal tasemel (joonis 3.5).





Joonis 5.5. 2-, 3-, 4- ja 5-tuumsete PAHide metaboliidid proovipunktidest kogutud ahvenatel (ANOVA).

Kokkuvõtvalt võib öelda, et ahvenate lülitamine analüüsitava kalaliikide hulka tõi kaasa huvitava võimaluse kõrvutada merest pärinevaid proove sisevete omadega. Segatoitlise rannikulähedase eluviisiga kuid räimega võrreldes oluliselt madalama rasvasisaldusega ahven on ka teadustöodes üheks sageli kasutatavaks kalaliigiks. Ahvena ja lesta eeliseks räime ees

on ka paremini kasutatavas mõõdus proovid: räimed biomarkerite kasutamisel on paratamatult problemaatiline sageli vaid mikrolitrite suurust sappi või sajandikgramme kaaluvat põrna koguda ja analüüsida. Proovi suurus on oluline aspekt ka mõõtmisvigade ja hajuvuse vähendamisel.

## Lest

Uurimistöö käigus kogutud lestade mõõtmistulemuste keskmised olid vastavalt: pikkus (L) 257 mm ( $\pm 35$  SD) ja (l) 213 mm ( $\pm 29$  SD), kaal 217 g ( $\pm 106$  SD), maksa kaal 5,8 g ( $\pm 4,8$  SD), põrna kaal 0,3 g ( $\pm 0,16$  SD) ning keskmised indeksid: CF 1,19 ( $\pm 0,14$  SD), LSI 2,5 ( $\pm 0,9$  SD) ja SpSI 1,2 ( $\pm 1,3$  SD) (tabel 5.3).

Tabel 5.3. Lesta meetrilised mõõtmised ja indeksid.

Lest					
	N	Keskmine	Miinumum	Maksimum	Hajuvus (SD)
<b>pikkus (L)</b>	68	257,6471	177,0000	371,0000	35,0010
<b>pikkus (l)</b>	68	213,2941	144,0000	313,0000	29,5671
<b>mass (G)</b>	66	217,8406	68,1600	595,0000	106,1538
<b>kehamassi indeks (CF)</b>	66	1,1887	0,8757	1,7079	0,1380
<b>maks (g)</b>	68	5,8415	0,7800	23,5800	4,7656
<b>maksaindeks (LSI)</b>	66	2,4616	0,9499	5,4888	0,8983
<b>põrn (g)</b>	68	0,2781	0,0600	0,7200	0,1569
<b>põrnaindeks</b>	67	1,2296	0,0631	6,8615	1,2823

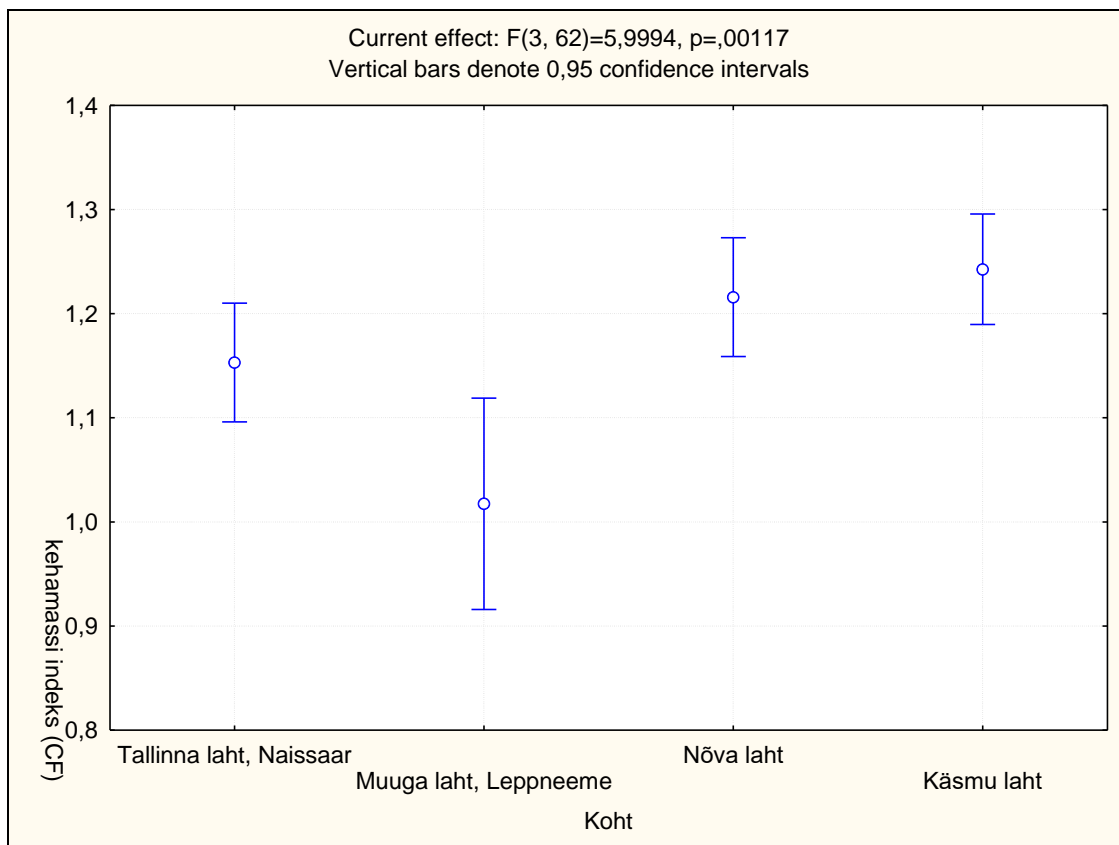
Lest on proovide kogumiseks piisavalt suur, põhjalähedase eluviisiga, mitmekülgse loomse toitumisega kalaliik, kes on ka inimese jaoks oluline toiduobjekt. Seega on lest väga heaks indikaatorliigiks vee reostuse biomarkerite analüüsimisel, kuna oma eluviisist lähtudes on ta paremini reostusele eksponeeritud (suuremad orgaanilise toksilise reostuse kontsentratsioonid sisalduvad just põhjasetetes). Lestade puhul õnnestus meil lisaks tavapärastele biomarkeritele võtta PAH metaboliitide proove ka uriinist kusepõies ning kirjeldada maksa värvust. Uriin sisaldab sarnaseid PAH metaboliite kuna tegemist on paralleelse metabolismirajaga – autorite varasemad uuringud on näidanud, et uriini metaboliitide sisaldused jäävad reeglina madalamaks kui sapis (Kreitsberg et al., 2010).

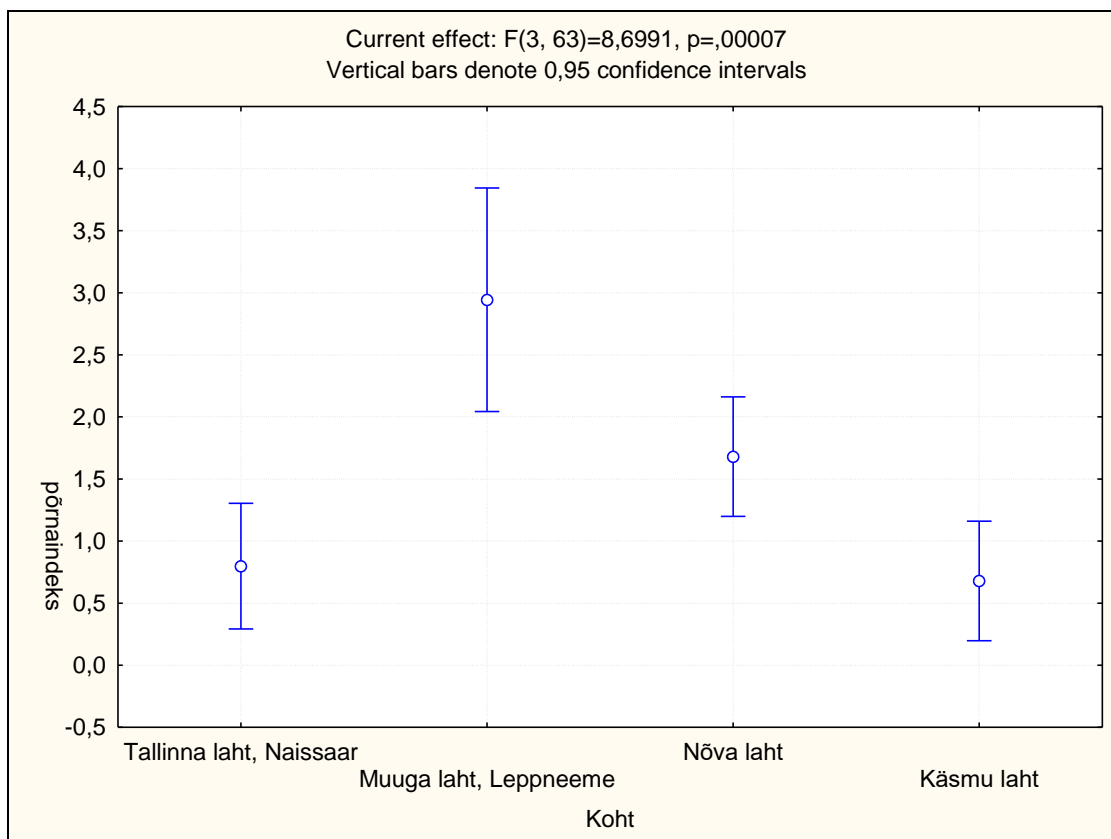
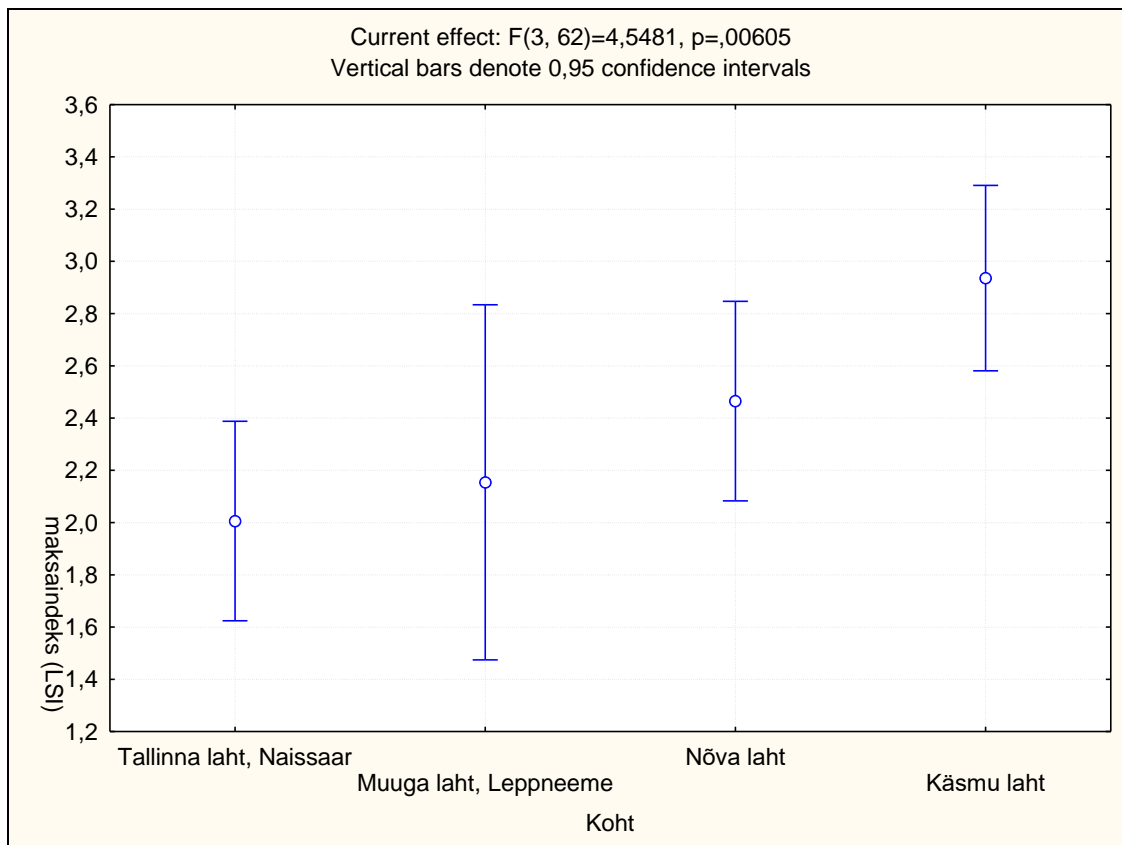
Lestade indeksid varieeruvad proovipunktide kaupa kõige enam, mis annab tunnistust selle kohta, et lokaalsed populatsioonid näitavad lokaalset reostust. Kui nt räimed kirjeldavad suure veemassi keskmisi väärtusi, siis lestade abil on võimalik saada infomatsiooni lokaalsete reostuskollete kohta. Sarnaselt räimedega on Käsma lestad kõige paremas üldises konditsioonis, isegi kui kõrge maksaindeks näitaks justkui lokaalse ja ilmselt põhjalähedase (sest pelaagilistel räimedel oli maksaindeks normis) stressori olemasolu. Sarnast Käsma lestade seletamatult kõrgeid toksiliste ainete biomarkerite väärtuseid on näidanud ka varasemad uuringud (Räägel, 2014). Võimalikuks selgituseks on Käsma head ökoloogilised kasvutingimused ning samal ajal aktiivne rahvusvaheline laevaliiklus lähedastel laevateedel, mis üheaegselt selgitab nii eksponeeritust reostusele, teisalt aga head üldist konditsiooni (joonis 3.6) . Sarnane trend, selgitus ning seos varasemate andmetega kehtivad ka Nõva



lestade puhul (Kreitsberg, 2014), kuid ühe erinevusega: kui Nõva kalade puhul toetavad sapianalüüsid PAH metaboliitide sisalduse osas teooriat, et tegemist on laevaliiklusest põhjustatud naftaproduktide reostusega, siis Käsmu PAH metaboliitide sisaldused on ühed madalaimad, mis tähendab, et suurenenud maksaindeksid peavad olema põhjustatud teist tüüpi reostusainete poolt.

Huvitavaks tulemuseks on taaskord Muuga lahe (räimede puhul Tallinna lahe, Noblessneri) kõrgeenenud põrnaindeks (joonis 5.6). Kuna käesoleva uuringu näol on meie teada tegemist esimese korraga Eestis, mil põrnaindeks on vaatluse all, siis ei ole kahjuks piisavat võrdlusmaterjali antud tulemuse selgitamiseks. Andmetest nähtub, et kõikide kalaliikide puhul toimub põrnaindeksi oluline varieerumine, samuti on tegemist suurima hajuvusega väärtusega (SD ületab keskväärtust), mistõttu tuleks praeguses tulemuste arutelus olla pigem konservatiivne.

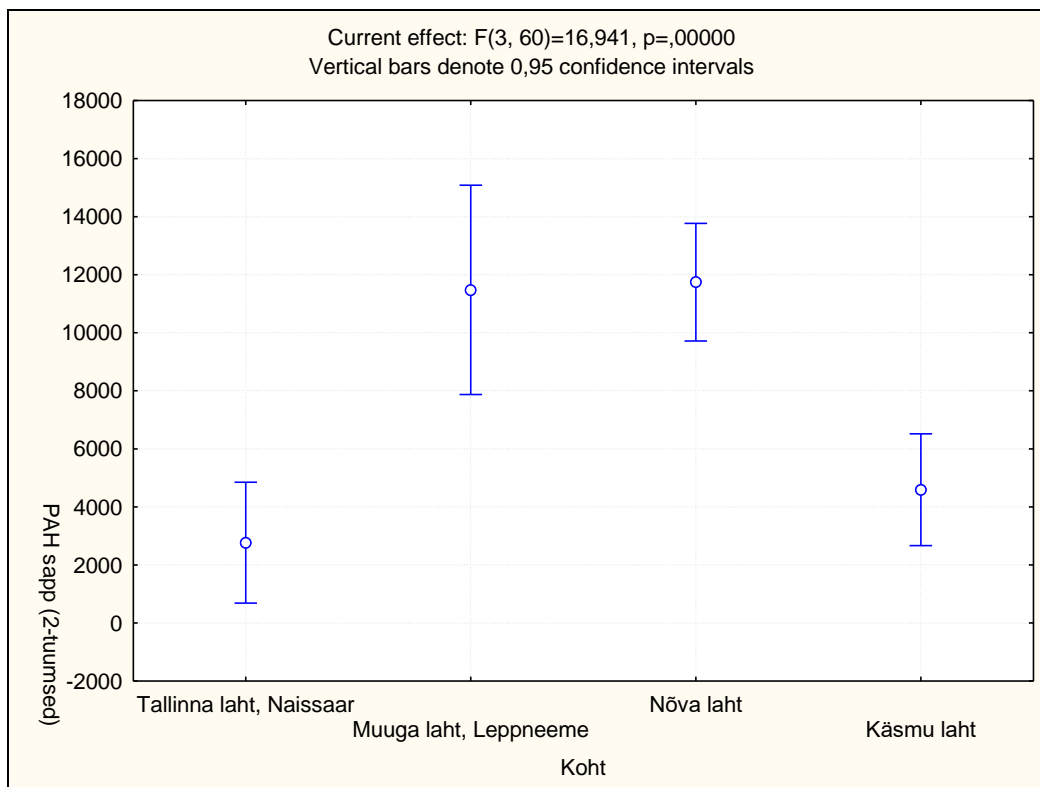


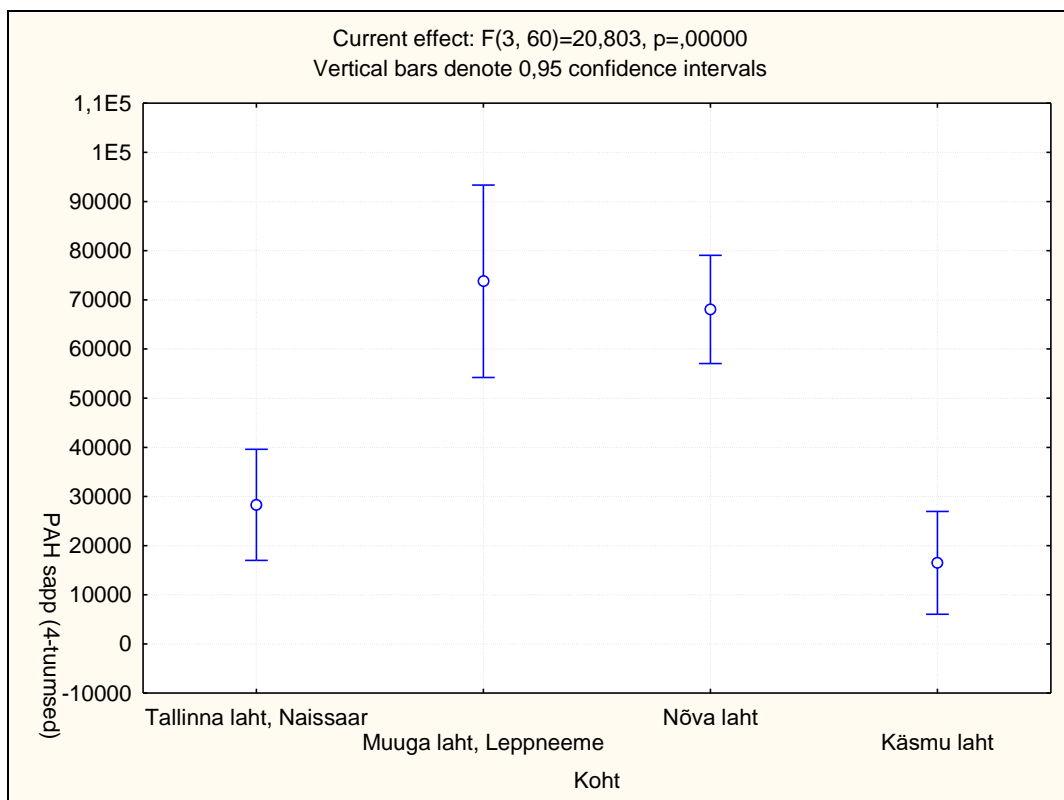
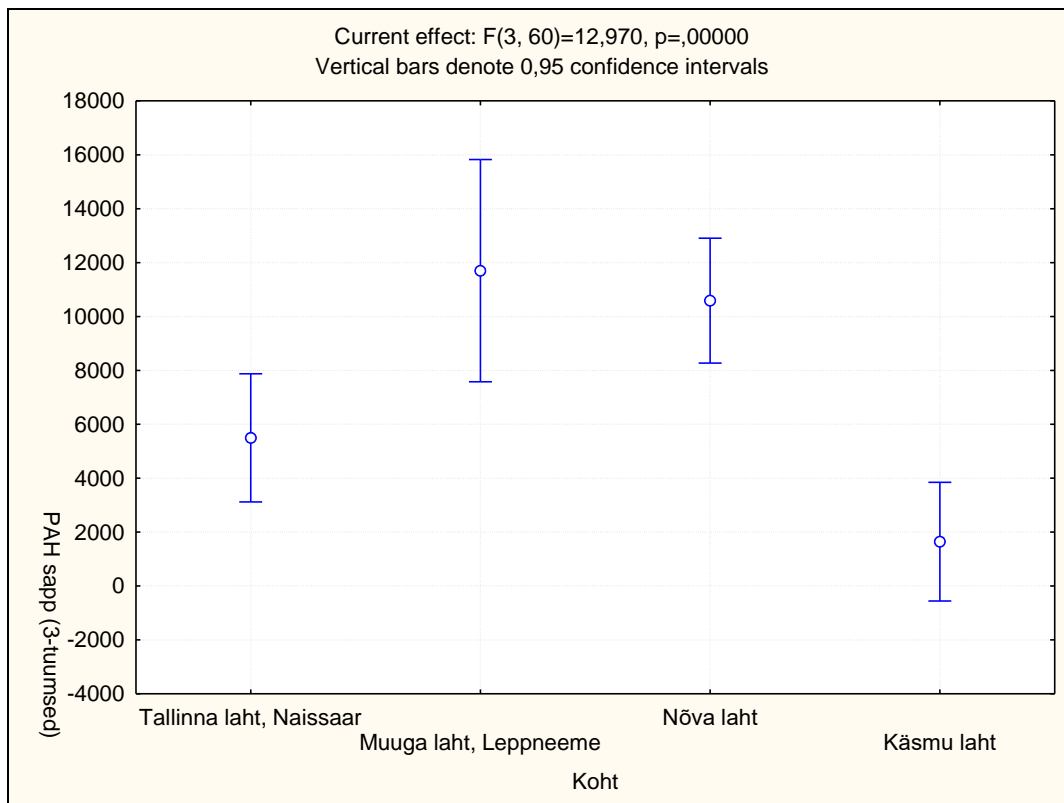


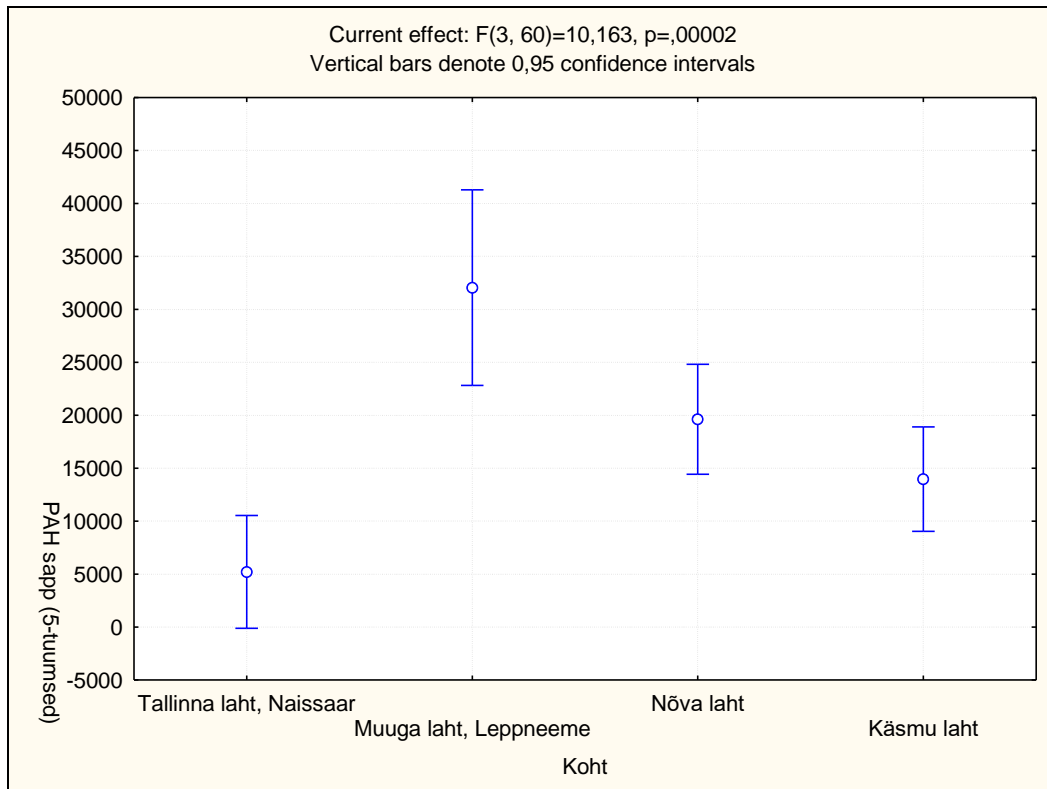
Joonis 5.6. Soome lahe lestade kehamassiindeks (CF), maksaindeks (LSI), põrnaindeks (SpSI) erinevates proovipunktides (ANOVA). Nõva ja Käsmu lahe lestad on oluliselt paremate konditsioonifaktori näitajatega võrreldes Muuga lahega (vastavalt:  $p=0,006$  ja  $0,001$ ).

Samuti on statistiliselt kõrgemad väärtused Käsnu maksaindeksitel ( $p=0,004$ ) ning Muuga lahe põrnaindeksil ( $p=0,0006$ ).

Lestade sapist analüüsitud PAH metaboliitide sisaldused hoiavad läbivalt sarnast joont kõikide eri aineklasside (2- kuni 5-tuumsed PAH) kaupa (joonis 5.7). Muuga laht ning Nõva eristuvad ülejäänud punktidest oluliselt kõrgemate sisalduste poolest. Muuga lahe naftaterminal ning naftaproduktide omadus akumulieruda orgaanikarikastesse setetes (mistõttu on just põhjalähedased kalaliigid nagu lest on reostusele eriti hästi eksponeeritud) selgitavad tulemusi. Nõva kõrgeenenud kontsentratsioonid on aga suure tõenäosusega aktiivse laevaliikluse (selgitatud eespool) tagajärg. Need kaks reostusallikat, laevateed ning lokaalsed punktreostused, ongi üheks enamlevinumateks põhjusteks. Varasemad uuringud (Räägel, 2014; Kreitsberg, 2014) näitavad laevateede reostust kalade biomarkerites nii Sørve poolsaare tipus, Nõval kui ka Käsnu – piirkondades, mis on avatud merealad ning olulistest maismaalt pärinevatest reostuskolletest kaugel. Teisalt on puhtaimate piirkondadena aga kirjeldatud Liivi lahte (Pärnu, Kihnu, Treimani) ja Hiiumaa laidude piirkonda, mis on eemal nii suuremate punktreostusallikatest kui ka laevateedest. Käesolevas uuringus lisandub reostunud piirkondade sekka ka Tallinna lahe Noblessneri piirkond ning Muuga laht – millede puhul on tegemist nii laevaliiklusest kui ka punktallikatest pärineva reostuskoormusega. Tallinna lahe Naissaare alt püütud lestade toksiliste ainete biomarkerite madalaid väärtusi selgitab merepõhja iseloom: Naissaare ümbruse lestad on püütud ulatuslikelt liivamadalatelt, mille väike orgaanikasisaldus ei luba reoainetel akumulieruda (erinevalt Muuga lahest, kus olukord on vastupidine). Kuna lest on eksponeeritud eeskätt setete kaudu, ei täheldatagi Naissaare kalades Tallinna ning aktiivse laevaliikluse reostuse mõju.



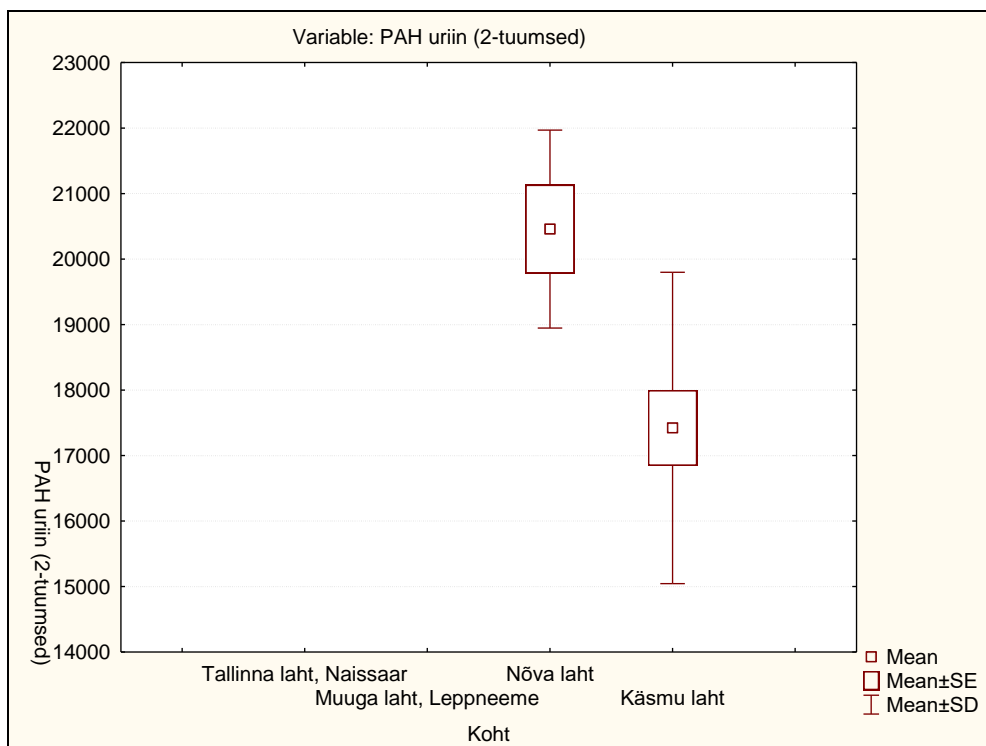




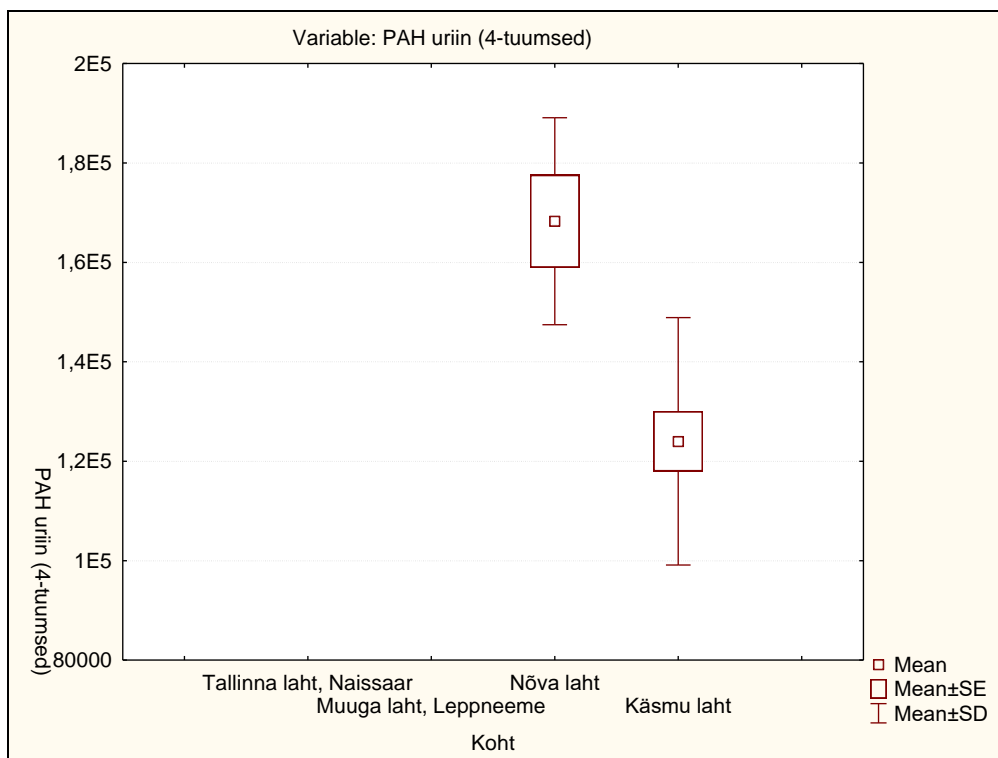
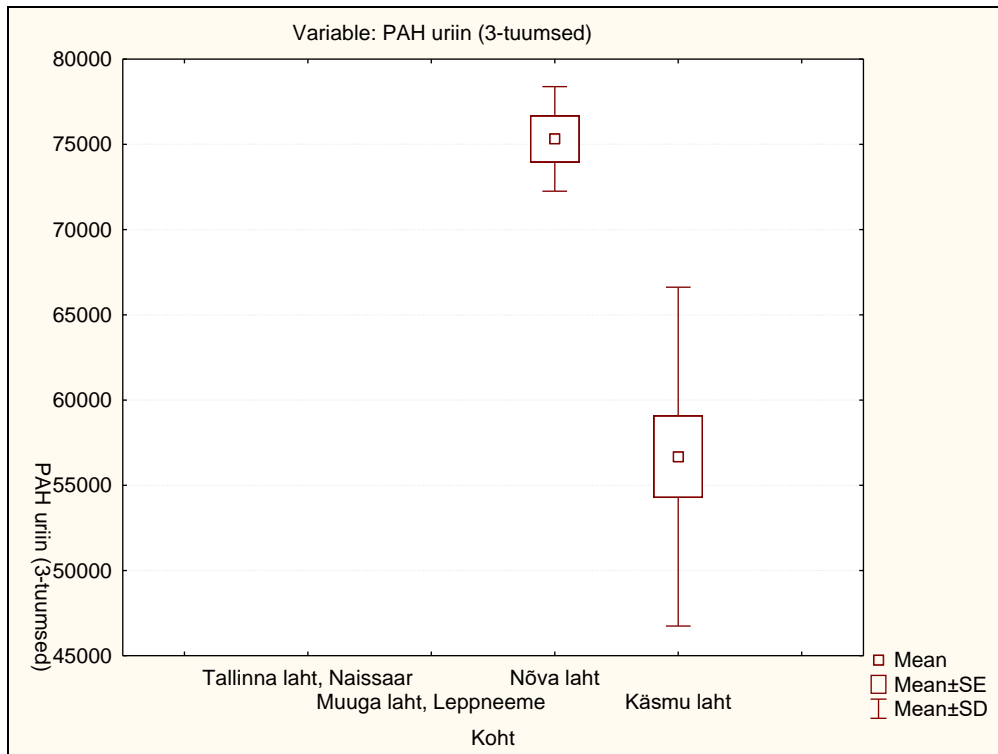
Joonis 5.7. 2-, 3-, 4- ja 5-tuumsete PAH metaboliitide sisaldused Soome lahe lestades (ANOVA). Kõikide aineklasside puhul on Muuga ning Nõva lahe lestade toksilise aine sisaldused teistest proovipunktidest suuremad ( $p<0,05$ ).

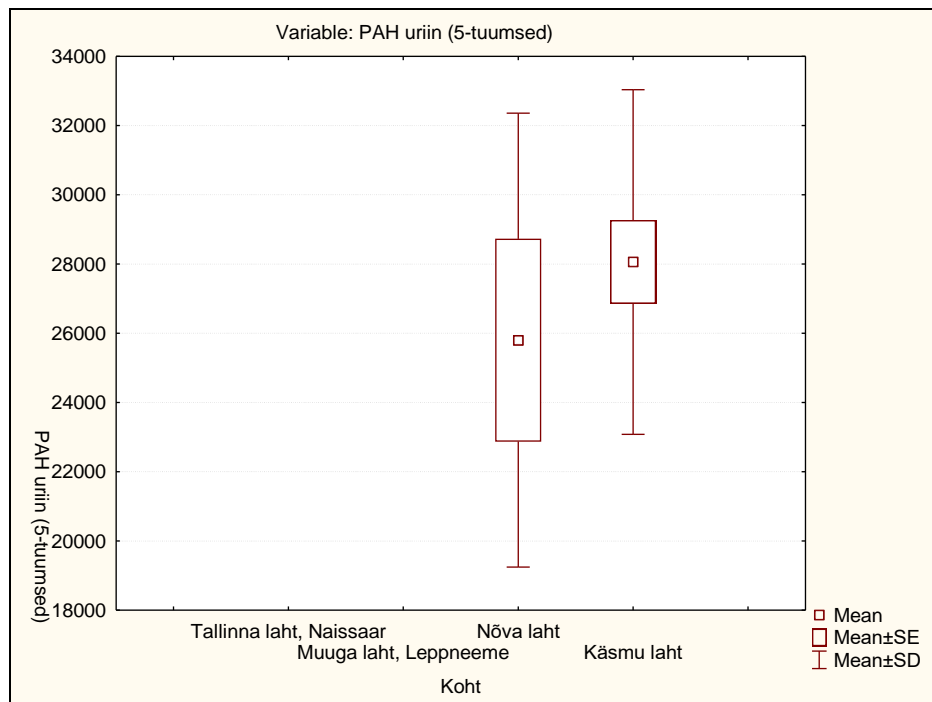
## Lesta uriini PAH metaboliitide sisaldused ja maksa värvuse analüüsid.

Nii sapi kui uriini proovide kogumisel sõltub proovi kogus kala füsioloogilistest ja bioloogilistest omadustest. Kui kala on hiljuti aktiivselt toitunud, siis võib olla sapipõis tühi. Samuti on erinevatel perioodidel või kohtades keeruline saada täitunud kusepõiega isendeid. Uriiniproove õnnestus koguda Nõva ja Käsmu lestadelt (joonis 5.8). Kuna proovipunktid ning isendite arv punktis on piiratud, siis joonistel nähtavad erinevused PAH metaboliitide kontsentratsioonides lesta uriinis ei ole siiski statistiliselt usaldusväärsed (mitteparameetiline Kruskal-Wallis ANOVA,  $p > 0,05$ ). Kui võrrelda Nõva ning Käsmu lestade sapi ja uriini metaboliitide sisaldusi, siis on tulemused suurepäraselt kattuvad: nii sapi kui uriini proovid näitavad toksiliste ainete gruppide kaupa Nõva proovide suuremaid sisaldusi. Seega võib kinnitada, et kaks paralleelset metabolismirada (maksast sapipõide ning neerudest kusepõide) töötavad aktiivselt kalade keha puhastamisel toksilistest ainetest ning uriiniproov on võimalusel realselt kasutatav biomarkerite analüüsimisel. Samuti ei ole alati ühene trend, et metaboliitide sisaldused on sapis kõrgemad. Nii varasemates töödes (Kreitsberg et al., 2010) kui ka käesolevas uuringus on mitmed uriiniproovide sisaldused sapi omadest kõrgemad. Samas peab toonitama, et proovide hulgast lähtuvalt ei saa neid trende kinnitada statistiliste analüüsidega.







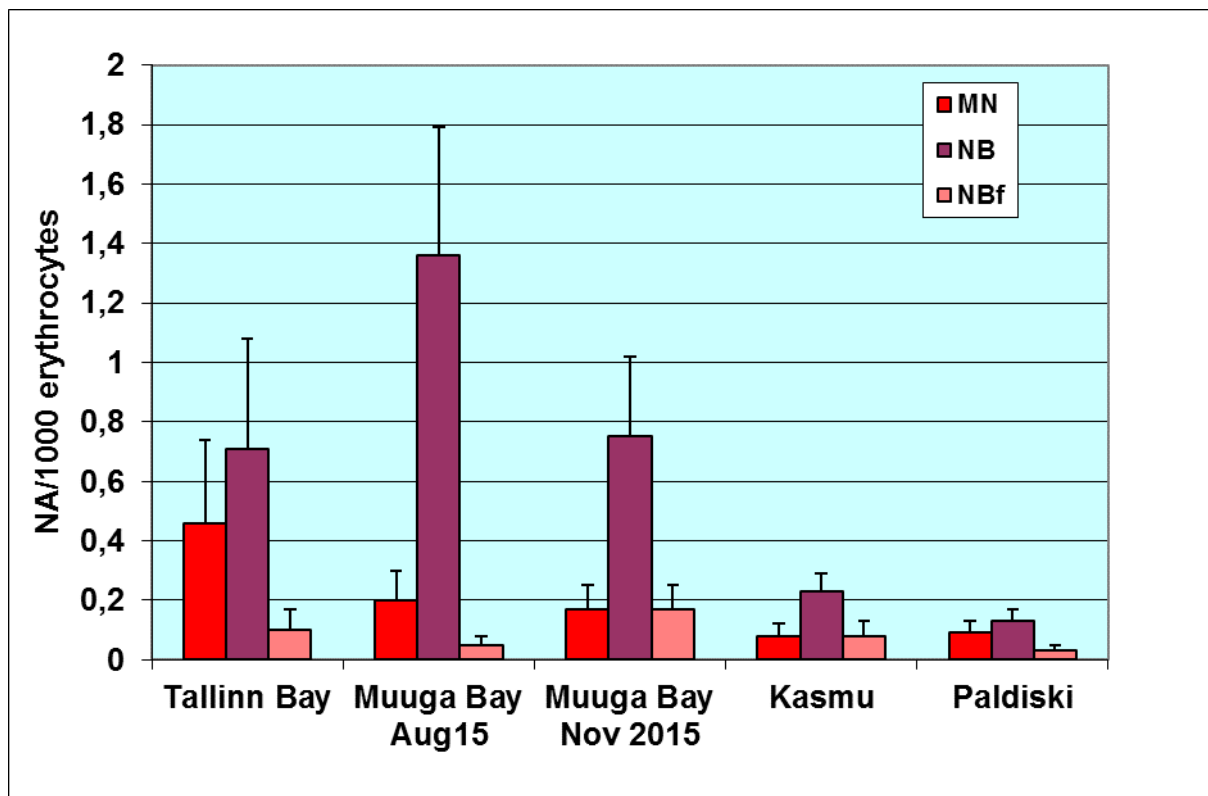


Joonis 5.8. PAH metaboliitide sisaldused lesta uriinis (keskväärtus, standardviga, standardhälve, Kruskal-Wallis ANOVA).

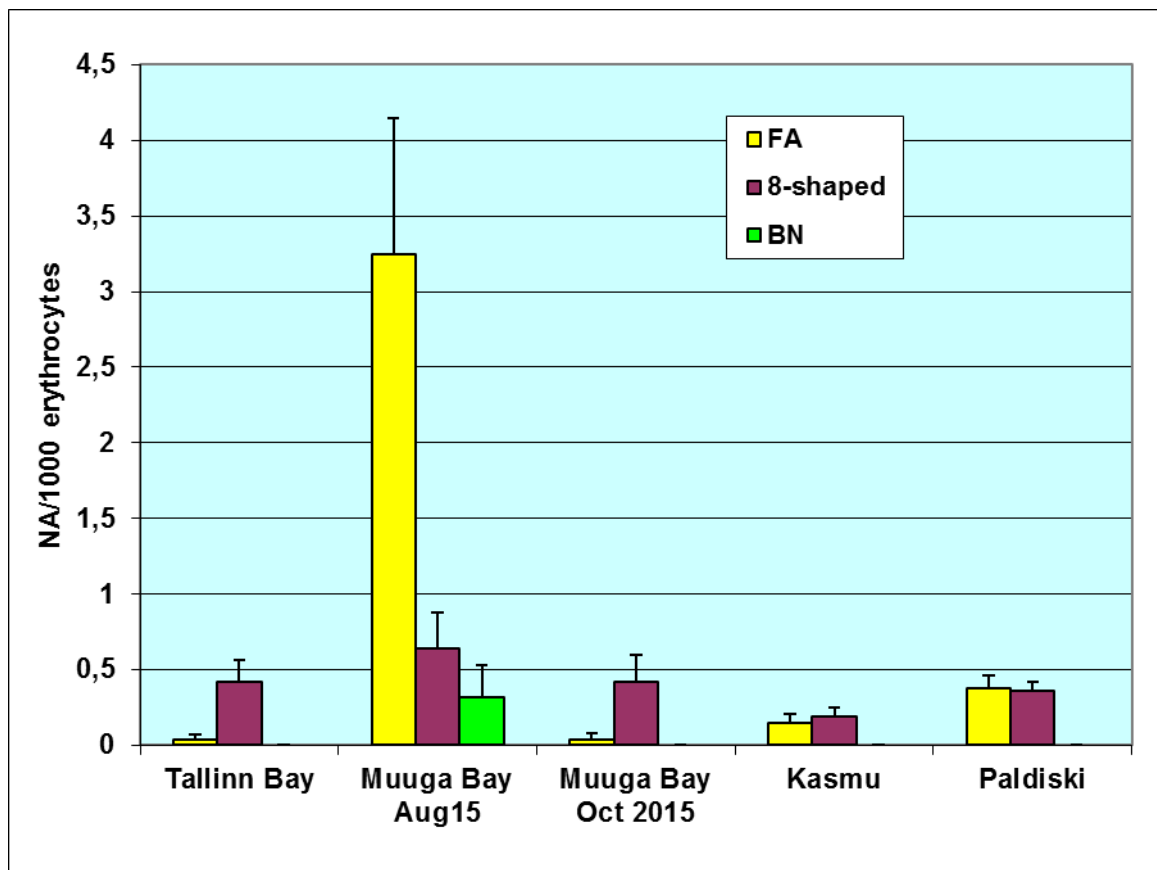
### 5.3. Verekahjustused

#### Räim

Mikrotuumadega erütrotsüüte esines räimel kõige rohkem Tallinna lahes (joonis 5.9). Fragmenteerunud erütrotsüütide ja 8-kujuliste erütrotsüütide esinemissagedus oli samuti kõrgem Muuga lahe räimedel (joonis 3.10). Verenäitajate alusel elasid kõige tervemad räimed Käsmu piirkonnas (joonised 5.9 – 5.11).

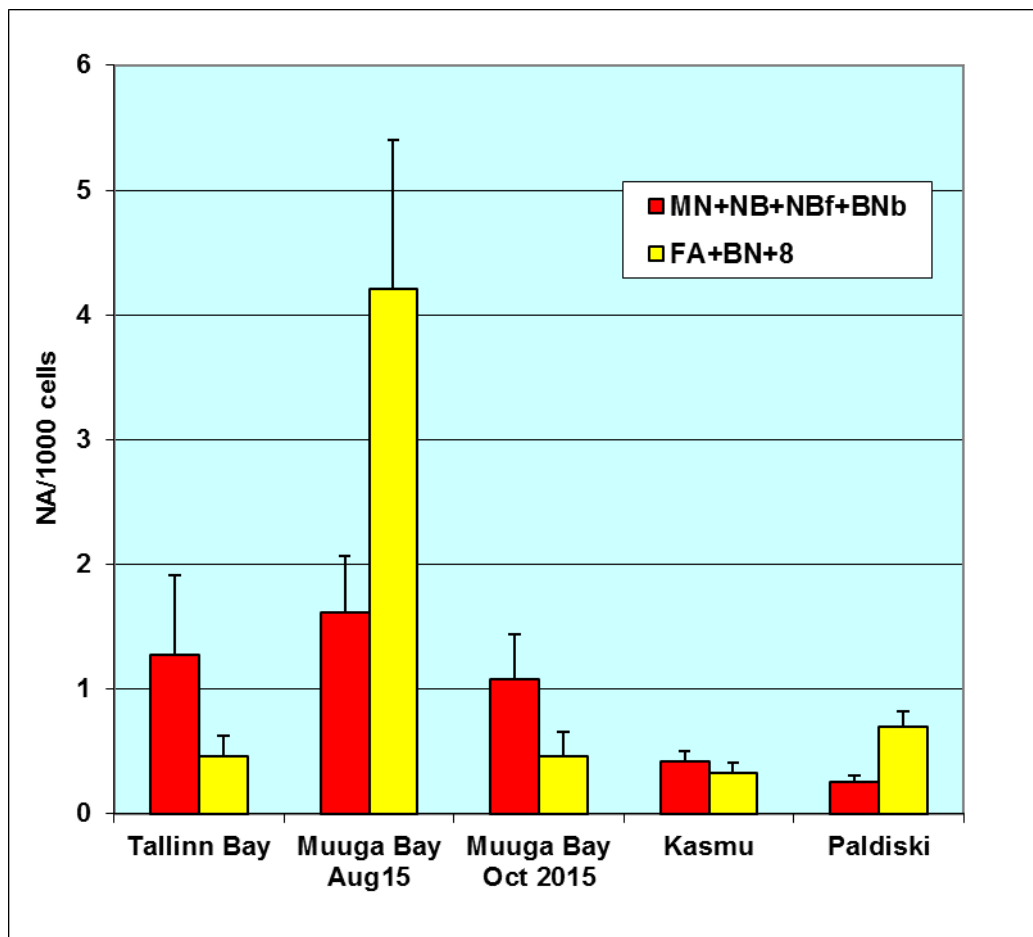


Joonis 5.9. Räime genotoksilisi kahjustusi peegeldavad verenäitajad Soome lahes. NBf – punnaga erütrotsüüt, NB – kahetuumne erütrotsüüt, MN – mikrotoumaga erütrotsüüt. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.



Joonis 5.10. Räime tsütotoksilisi kahjustusi peegeldavad verenäitajad Soome lahes. FA – fragmenteerunud erütrotsüüt, 8-kujulise tuumaga erütrotsüüt, BN – kahetuumne erütrotsüüt. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.

Fragmenteerunud erütrotsüüte esines kõige rohkem Muuga lahest püütud räimedel, aga seda ainult augustis 2015. Suure tõenäosusega eelnes sellele ajale lahes mingi lokaalne reostus (õlireostus?).



Joonis 5.11. Räime summaarsed geno- (MN+NB+NBf+BNb) ja tsütotoksilisuse indeksid (FA+BN+8) Soome lahes. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.

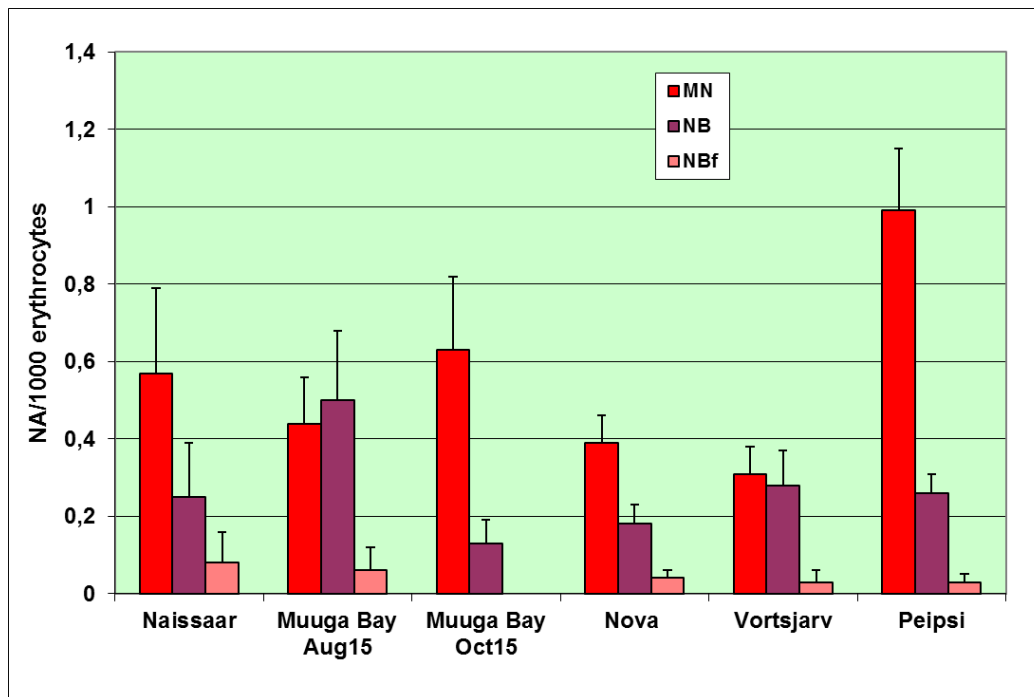
Summaarne genotoksilisuse indeks näitas kõige suuremat reostust Muuga lahes (joonis 5.11), järgnes Tallinna laht. Tsütotoksilisuse indeks näitas kõige suuremat reostust Muuga lahes (joonis 5.11) ja seda eriti augusti 2015 proovides. Muuga lahe räimel esines mitmeid punaliblede kahjustusi, samuti eriti augustis 2015. Sellele ajale võis eelneeda lahes tugev reostus ja kalad elasid pikka aega kroonilise stressi tingimustes. Suhteliselt kõrged olid verekahjustuste näitajad ka räimedel, kes püüti Purtse piirkonnast aprillis 2016 (Tabel 5.4).

Tabel 5.4. Purtse räime geno- ja tsütotoksilisuse näitajad

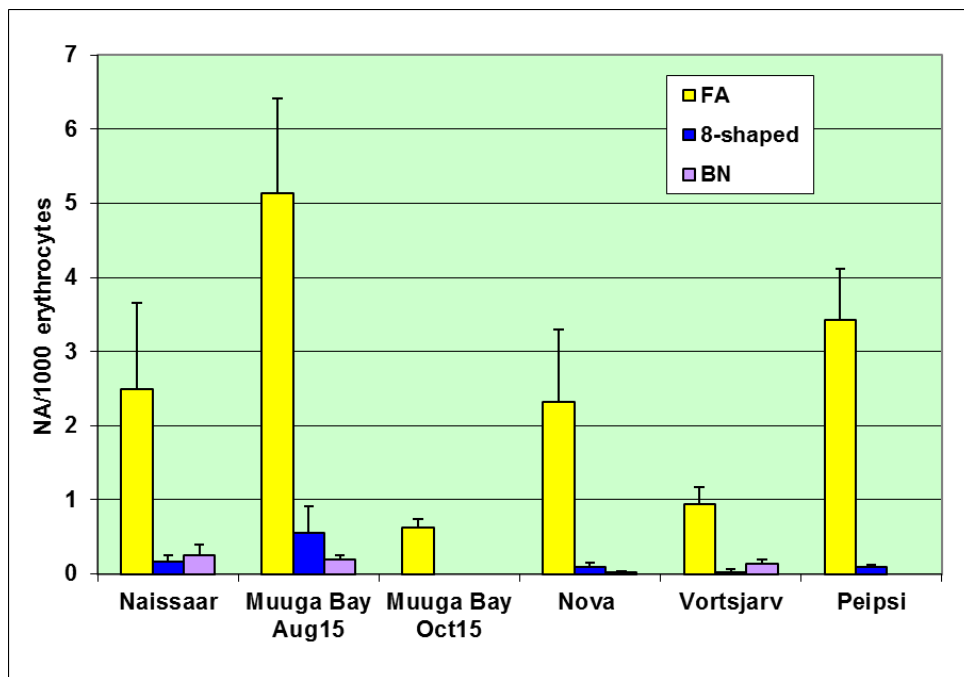
Näitaja	Keskmine±S D
Genotoksilised	
MN	0,3 ± 0,2
NB	0,4 ± 0,2
NBf	0,25 ± 0,15
Tsütotoksilised	
FA	2,1 ± 0,4
8-kujulised	0,5 ± 0,18

## Ahven

Ahvenal esines mikrotoomasid üllatuslikult kõige sagedamini Peipsi järve kaladel, kes püüti Kallaste piirkonnas. Kõrgendatud sisaldus esines ka Muuga ja Tallinna lahe ahvenatel. Kõige vähem uuritud ahvenatest esines mikrotoomadega erütrotsüüte Võrtsjärve omadel (joonis 5.12).

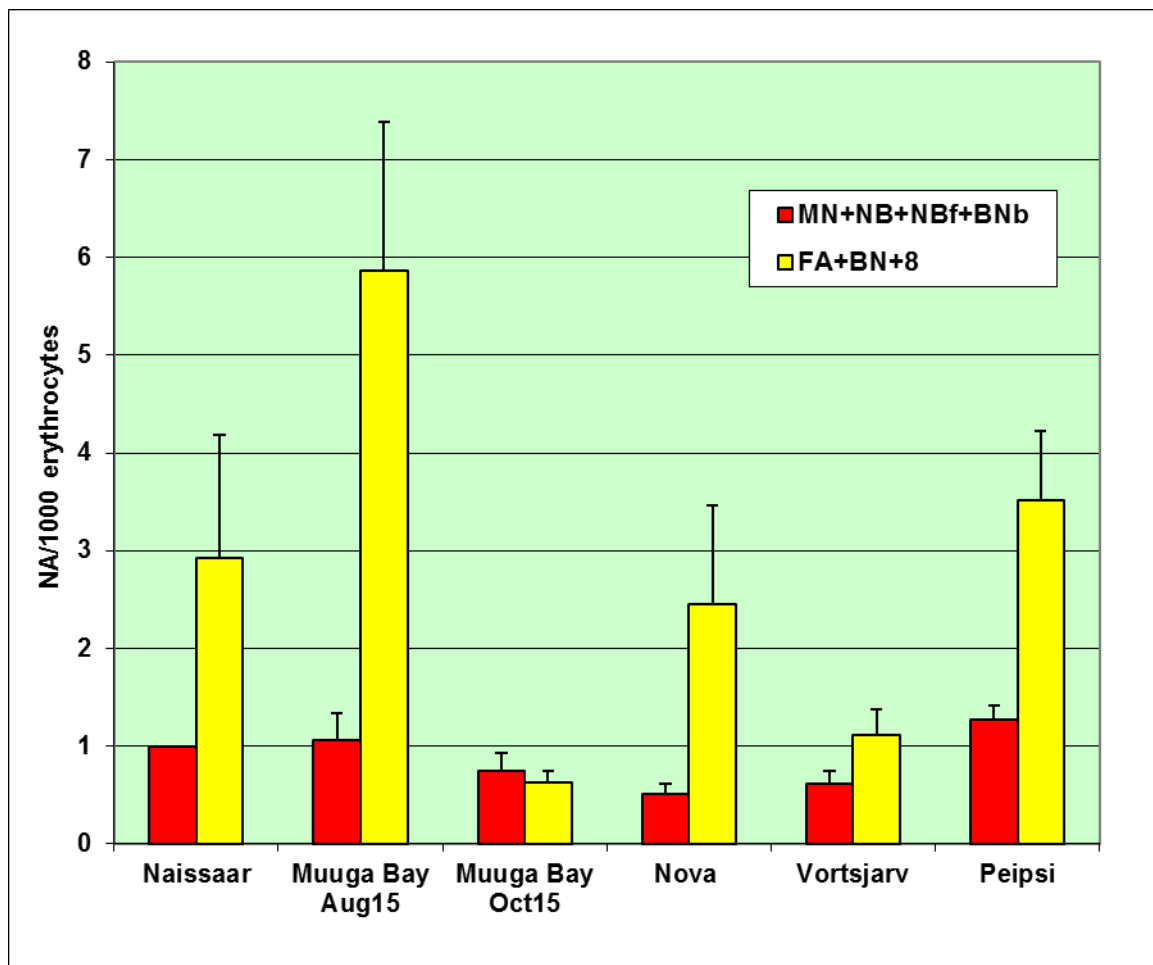


Joonis 5.12. Ahvena genotoksilisi kahjustusi peegeldavad verenäitajad Soome lahes. NBf – pungaga erütrotsüüt, NB – kahetuumne erütrotsüüt, MN – mikrotoomaga erütrotsüüt. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.



Joonis 5.13. Ahvena verekahjustused. FA – fragmenteerunud erütrotsüüt, 8-kujulise tuumaga erütrotsüüt, BN – kahetuumne erütrotsüüt. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.

Fragmenteerunud erütrotsüütide esinemissageduse järgi ahvenal oli kõige reostunud piirkond Muuga laht augustis 2015 (joonis 5.13). Kõrge oli ka reostus Peipsi järves Kallaste piirkonnas.



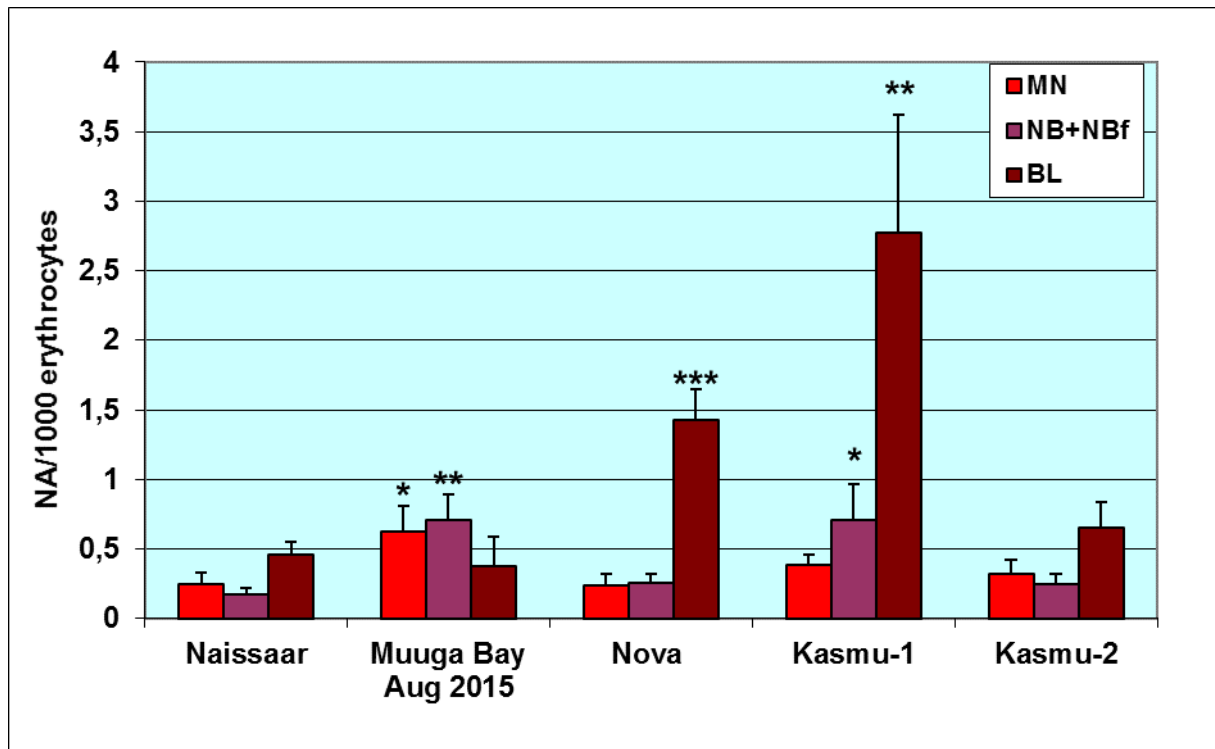
Joonis 5.14. Ahvena summaarsed geno- (MN+NB+NBf+BNb) ja tsütotoksilisuse indeksid (FA+BN+8) Soome lahes. Statistilised erinevused on esitatud Lisas 4.

Uuritud ahvenatest olid summaarne genotoksilisuse indeks kõige kõrgem Peipsi ja Muuga lahe kaladel ja kõige madalam Nõva kaladel. Tsütotoksilisuse indeks oli kõige kõrgemad Muuga lahe ahvenatel augustis 2015 ja kõige madalam samas piirkonnas oktoobris 2015 (joonis 5.14).



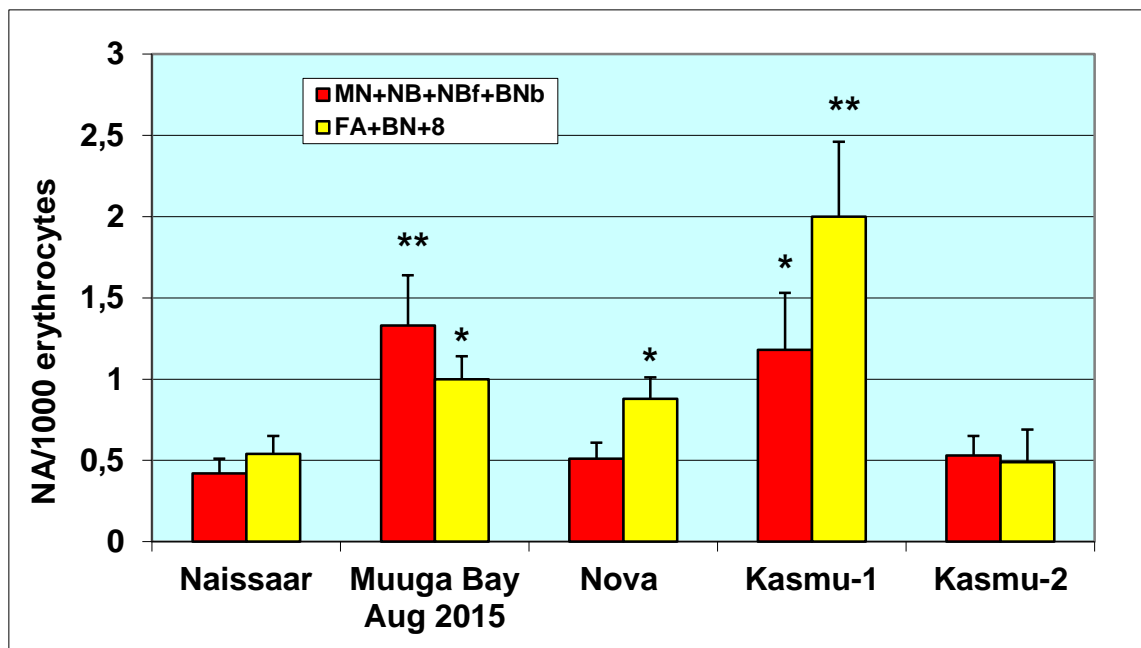
## Lest

Lesta mikrotoomade esinemissagedus oli kõige kõrgem Muuga lahe piirkonna lestadel (joonis 5.15).

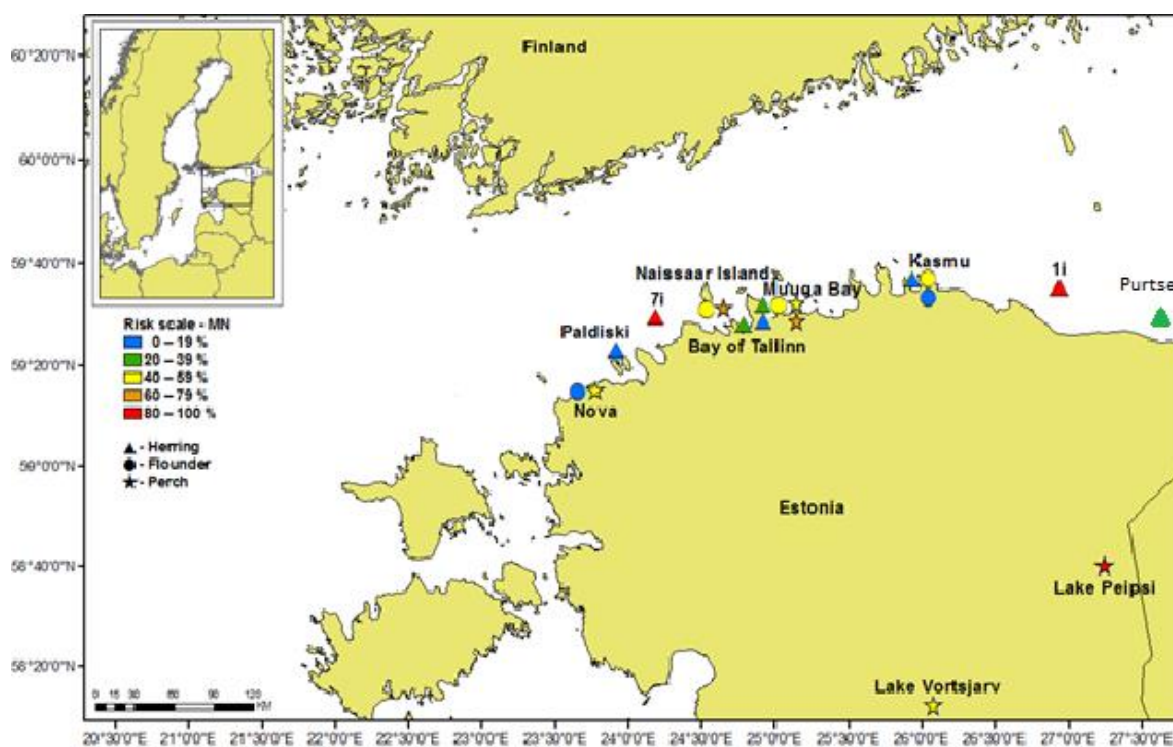


Joonis 5.15. Lesta genotoksilisuse näitajad Soome lahes.

Genotoksilisus (MN, NB ja summaarne genotoksilisus) (joonised 5.16 ja 5.17) näitab isendite %, mis on kõrgem kui baastase. Baastase arvutatakse võrdlusala väärtusest (90%). Referentsväärtused on ligikaudu 3-4 korda madalamad baastaseme kaladest (Barsiene et al., 2012).

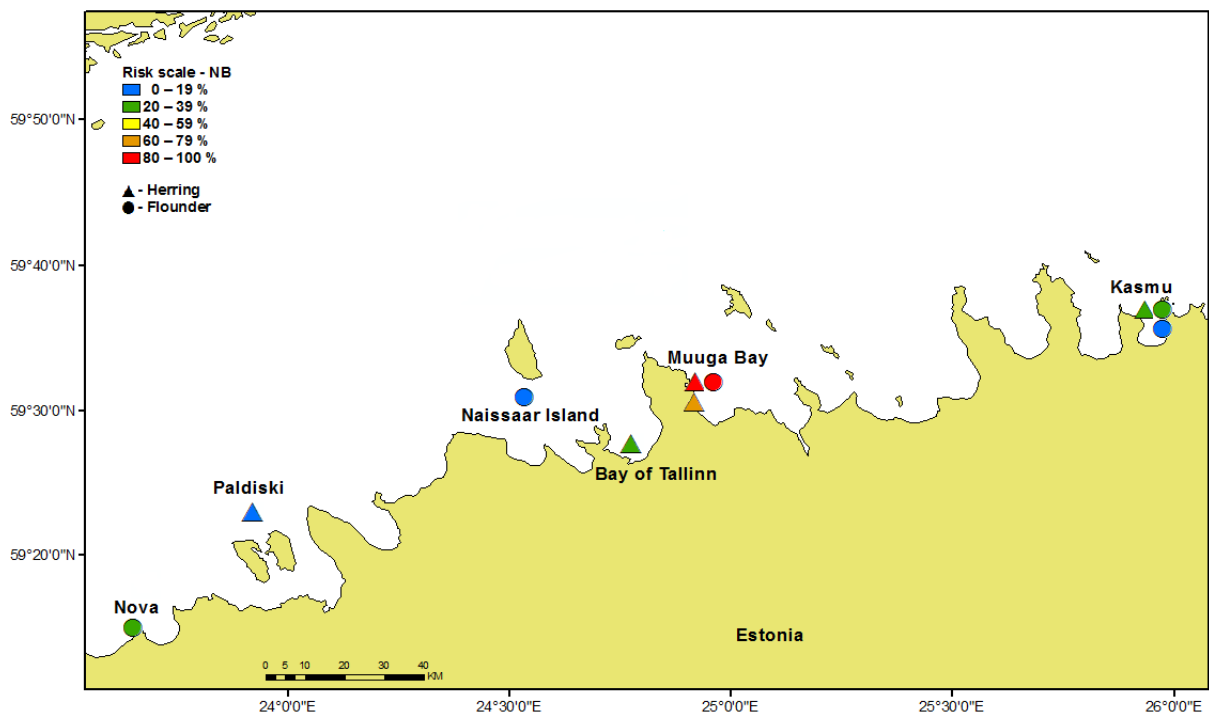


Joonis 5.16. Lesta geno- (MN+NB+NBf+BNb) ja tsütotoksilisuse näitajad (FA+BN+8) Soome lahes. P\* - level 0.05; P\*\* - 0.005, P\*\*\* - 0.0005.



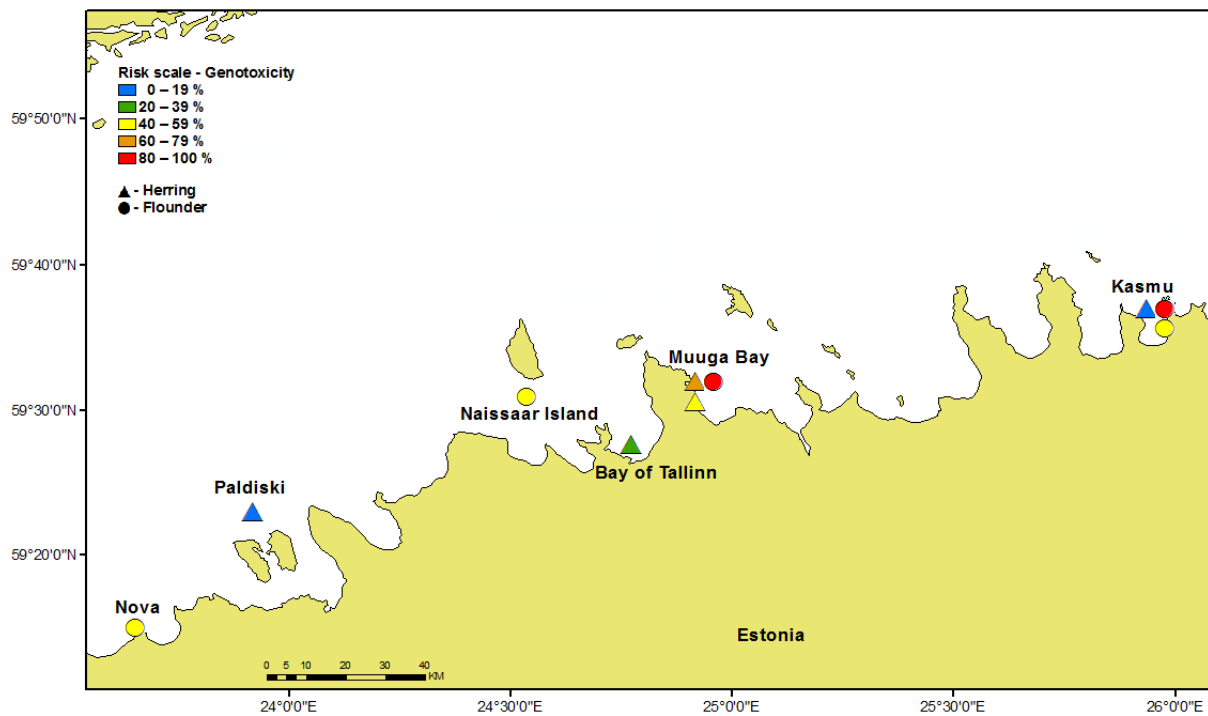
Joonis 5.17. Mikrotuumade esinemissageduse tõenäosused räimel, lestal ja ahvenal Soome lahe erinevates piirkondades (herring –räim, flounder – lesta, perch-ahven). Piirkonnad li ja 7i on analüüsitud proovidest, mis koguti Poola ekspeditsiooni käigus oktoobris 2014.

Kõrgendatud mikrotoomade tase oli uuritud kaladest kõige kõrgem ahvenal. Mikrotoomade esinemissagedus oli kõrgeim Peipsi järves ja ka Tallinna lahe ja Muuga lahe piirkondades. Kui Tallinna piirkonnas võis eeldada suuremat reostust, siis Peipsi järvest, Kallaste piirkonnast, püütud ahvenate kõrge mikrotoomade tase on üllatav. See näitab, et selles suurjärve piirkonnas esineb mingi reostus, mis initsieerib kaladel erütrotsüütide geneetilisi kahjustusi.



Joonis 5.18. Tuumapungade esinemissageduse tõenäosused räimel, lestal ja ahvenal Soome lahe erinevates piirkondades (herring –räim, flounder – lest, perch-ahven)

Tuumapungade esinemissagedus näitab samuti genotoksilisust ja selle näitaja alusel räimel ja lestal avaldus kõige selgemalt Muuga lahe toksilisus (joonis 5.18). Summaarne genotoksilisus on esitatud joonisel 5.19.



Joonis 5.19. Summaarse genotoksilisuse esinemise tõenäosused räimel ja lestal Soome lahe erinevates piirkondades (herring –räim, flounder – lest).

### Makrokahjustused ja nakatatus parasiitidega.

Muuga lahe ühel räimel 15st (6,6%) oli parasiiditsüst maksas. Kahel räimel oli samas kohas nematoodid sooles (13,3%). Kolmel lestal kuuest Muuga lahe piirkonnas olid tsüstid maksas (50%). Paldiski piirkonna räimedest oli ühel parasiiditsüst nahal (6,2%). Ühel Nõva lestal (7,7%) esines suukahjustus. 20 Käsma lestast kolmel esines nahal väikseid kasvajaid (15%) ja ühel oli maksas tsüst (5%). 20 Peipsi ahvena hulgas olid maksa tsüstidega 13 (72%). Makrokahjustused ja parasiitide kõrgendatud esinemine võib viidata nõrgenenud immuunsusele, mida võib esile kutsuda vee reostus toksiliste ainetega. Kõige rohkem makrokahjustusi ja parasiite oli Muuga lahe ja Peipsi järve kaladel.

### Vere patogeenid ja parasiidid

Võrtsjärve ahvenatel esines verepreparaatide sümptomite järgi ühel kalal üheksast (11%) viirusinfektsioon. 17 Peipsi ahvenast oli viirusinfektsioon 5 kalal (29%) ja kaks (11,7%) olid nakatunud ainurakse vereparasiidiga *Trypanosoma* ja kaks rakusiseste parasiitidega. 21 Nõva ahvenast kahel (9,5%) oli viirusinfektsioon. 20 Nõva lestast kaks (10%) olid nakatunud *Trypanosoma*-ga ja 5% kaladest esines viirusinfektsioon. Kolmel 16st Paldiski räimest esines tõenäoliselt viirusinfektsioon. Muuga lahe ahvenatel ühel kuuest (16,6%) esines viirusinfektsioon ja üks (16,6%) oli nakatunud *Trypanosoma*-ga. Parasiitidega nakatumine võib viidata nõrgenenud immuunsusele kõrgenenud reostuse tõttu. Enim nakatunud kalad elasid piirkondades (Muuga laht, Peipsi järv Kallaste piirkonnas), kus ka mitmed teised mõõdetud parameetrid näitasid kõrgendatud reostust.

## 6. Kokkuvõte

Peamised tulemused:

- Kolm kasutatud kalaliiki oli hea valik: rääim kirjeldas hajusa veemassi keemilist ja ökoloogilist seisundit; ahven andis võimaluse võrrelda tulemusi sisevete tingimustega, lest näitas setetes olevat lokaalset reostust.
- Tallinna laht ja Muuga laht on reostunud ning kalad on kehvast konditsioonis.
- Nõva ja Käsmu lahes on märke reostusest, kuid kalad on heas konditsioonis.
- Purkse jõe suudmealal täheldati põlevkivireostuse märke (püreeni metaboliidid).
- Mingit ühtset ida-lääne suunalist reostuse gradienti ei esinenud (mis võiks olla põhjustatud põlevkivitööstuse või Neeva jõe vms poolt), pigem on mõjutajateks lokaalsed reostusallikad ja laevaliiklus.
- Tulemused toetavad meie uurimusgrupi varasemaid töid, mis näitab, et meetodid töötavad ning biomarkerite analüüsidel on pikas ajaskaalas perspektiivi.
- Vees olid valdavateks polütsükliilisteks aroomaatseteks süsivesinikeks atsenaftaleen, fenantreen ja antratseen. Kõige reostunumateks osutusid Purkse jõe suudmeala setted, järgnesid Pakri saarte juurest kogutud setted.
- Kalade verekahjustuste järgi oli kõige reostunum piirkond Muuga laht. Ahvena mikrotoomade alusel saab väita, et ka Peipsi järves Kallaste piirkonnas esineb genotoksilisi aineid. Lesta vereanalüüsid näitasid ka teatud reostust Käsmus, mis enamuse uuritud näitajate alusel osutus üheks puhtamaks kohaks.

## Kasutatud kirjandus

Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O. K. (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*. 51: 241-258.

Baršienė, J.; Lyons B.; Rybakovas, A.; Martínez-Gómez, C.; Andreikenaite, L.; Brooks, S. and Maes, T. (2012). Background document: micronucleus assay as a tool for assessing cytogenetic/DNA damage in marine organisms. ICES report

Broeg, K., Lehtonen, K.K. 2006. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 508-522.

Gercken, J., Förlin, L., Andersson, J., 2006. Developmental disorders in larvae of eelpout (*Zoarces viviparus*) from Germany and Swedish Baltic coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 53, 497-507.

Hedman, J.E.;Rüdel, H.; Gercken, J.; Bergek, S.; Strand, J.; Quack, M.; Appelberg, M.; Förlin, L.; Tuvikene, A.; Bignert, A. (2011). Eelpout (*Zoarces viviparus*) in marine environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (10), 2015–2029.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H0688&from=ET>

Kammann, U.; Askem, C.; Dabrowska, H.; Grung, M.; Kirby, M.F.; Koivisto, M.; Lucas, C.; McKenzie, M.; Meier, S.; Robinson, C.; Tairova, Z.M.; Tuvikene, A.; Vuorinen, P.J.; Strand, J. (2013). Interlaboratory Proficiency Testing for Measurement of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolite 1-Hydroxypyrene in Fish Bile for Marine Environmental Monitoring. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 96 (3), 635–641, 10.5740/jaoacint.12-080.

Kreitsberg, 2014 PhD thesis

Kreitsberg, Randel; Baršienė, Janina; Freiberg, Rene; Andreikēnaitė, Laura; Tammaru, Toomas; Rumvolt, Kateriina; Tuvikene, Arvo (2013). Biomarkers of effects of hypoxia and oil-shale contaminated sediments in laboratory-exposed gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 227–235, 10.1016/j.ecoenv.2013.08.016i.

Kreitsberg, Randel; Tuvikene, Arvo; Baršienė, Janina; Fricke, Nicolai Felix; Rybakovas, Aleksandras; Andreikēnaitė, Laura; Rumvolt, Kateriina; Vilbaste, Sirje (2012). Biomarkers of environmental contaminants in the coastal waters of Estonia (Baltic Sea): effects on eelpouts (*Zoarces viviparus*). *Journal of Environmental Monitoring*, 9, 2298–2308, C2EM30285C.

Kreitsberg, Randel; Zemit, Irina; Freiberg, Rene; Tambets, Meelis; Tuvikene, Arvo (2010). Responses of metabolic pathways to polycyclic aromatic compounds in flounder following oil spill in the Baltic Sea near the Estonian coast. *Aquatic Toxicology*, 99 (4), 473–478, j.aquatox.2010.06.005.

Kreitsberg, Randel; Melikize, Julia; Küppar, Marion; Freiberg, Rene; Tuvikene, Arvo (2008). Toksilised ained Peipsi järves ja Emajões. Juta Haberman, Tarmo Timm, Anto Raukas (Toim.). *Peipsi* (211–216). Tartu: Eesti Loodusfoto.

Ojaveer, H., Drevs, T., 2003. Plaice, *Pleuronectes platessa* L. In: Ojaveer, Pihu, Saat (Eds.) *Fishes of Estonia*. Estonian Academy Publishers, Tallinn, lk. 359-361.

Räägel, A. *Kalade toksikoloogiliste biomarkerite võrdlus Eesti rannikumeres*. Tartu 2014, magistritöö.

Schiedek, D., Broeg, K., Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H., Vuorinen, P.J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., Schneider, R., 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 387-405.

Šíroká, Z., Drastichová, J. (2004). Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination – Cytochrome P450 in Fish. A Review. Acta Vet. Brno, 73: 123-132.

Tuvikene, A. (1995). Responses of Fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board. 32: 295-309.

Tuvikene, A. (1997). Assessment of inland water pollution using biomarker responses in Fish in vivo and in vitro. PhD thesis. Chair of Hydrobiology. Institute of Zoology and Hydrobiology. University of Tartu, pp. 55.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13: 57-149.

Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Baršienė, J., Broeg, K., Förlin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D. (2006). Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in Fish from the Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin, 53: 479-487.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016H0688&from=ET>

<https://www.riigiteataja.ee/akt/108012016010>

[Lisad](#)

Lisad 1, 2, 3