Elina Lind

HELSINGIN YLIOPISTON
YMPÄRISTÖEKOLOGIAN LAITOKSEN
TUTKIMUKSIA JA RAPORTTEJA
60

Kasviplanktonpigmentit Vesijärven Enonselän paleolimnologisessa tutkimuksessa

KASVIPLANKTONPIGMENTIT VESIJÄRVEN ENONSELÄN PALEOLIMNOLOGISESSA TUTKIMUKSESSA

ELINA LIND

56.9
LIN
TYL

HELSINGIN YLIOPISTO
YMPÄRISTÖEKOLOGIAN LAITOS
PRO GRADU –TUTKIELMA
2.5.2008

LAHDEN TIEDEKIRJASTO
Lahti Science Library

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Biotieteellinen tiedekunta	Laitos Institution – Department Ympäristöekologian laitos	
TekijäFörfattare – Author Elina Lind		
Työn nimi Arbetets titel – Title Kasviplanktonpigmentit Vesijärven Enonselän paleolimnologisessa tutkimuksessa		
Oppiaine Läroämne – Subject Ympäristöekologia		
Työn laji Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika Datum – Month and year 2.5.2008	Sivumäärä Sidoantal – Number of pages 59

Tiivistelmä Referat – Abstract

Vesijärvi on jätevesien rehevöittämä järvi ja 1960-luvun lopulla se oli yksi Suomen rehevöityneimmistä järvist Enonselkä on ollut Vesijärven pahiten pilaantunut osa, sillä sinne johdettiin vuoteen 1976 saakka Lahde kaupungin jätevedet. Vesijärven Enonselän veden laatu oli huono 1960 ja 1970 –luvulla, jolloin kasviplanktoni biomassa oli suuri ja syanobakteerien massaesiintymiä havaittiin usein. Kasviplanktonin biomassa pieneni vuode 1984 jälkeen, mutta syanobakteerien muodostamia massaesiintymiä havaittiin edelleen. Järvellä aloitettuje kunnostustoimenpiteiden ansiosta syanobakteerien muodostamia massaesiintymiä ei havaittu 1990-luvulla, kunn vuonna 2000 niitä havaittiin jälleen.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, voidaanko sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmentti perusteella tutkia Vesijärven Enonselän kasviplanktonin runsaudessa ja koostumuksessa tapahtuneita muutoksi Kasviplanktonyhteisön runsautta kuvaavaa kasviplanktonin biomassaa on Vesijärven Enonselällä mitattu jo pitkä (1980-luvun alkupuolelta lähtien), minkä ansiosta sedimentin pigmenttipitoisuuksia pystyttiin vertaamaan järvel mitattuun kasviplanktonin määrään. Kasviplanktonpigmenttien analysoinnissa käytettiin HPLC -menetelmää, jo modifioitiin Merentutkimuslaitoksen HPLC -laitteistolle sopivaksi. Kasviplanktonpigmenttien analysoinnin lisäk tutkimuksessa selvitettiin kasviplanktonpigmenttien analysoinnissa käytetyn esikäsittelymenetelmän tehokkuu sekä näytteiden säilyvyyttä.

Kasviplanktonpigmenttien lisäksi Vesijärven Enonselän sedimentistä analysoitiin syanobakteerien muodostam maksamyrkyn, mikrokystiinin, pitoisuutta. Tavoitteena oli selvittää onko Vesijärven Enonselän sedimentis havaittavissa mikrokystiiniä, ja jos näin on, onko syanobakteereille tyypillisten pigmenttien, ekinenonin kantaksantiinin, pitoisuuden ja mikrokystiinipitoisuuden välillä havaittavissa positiivista korrelaatio Mikrokystiinit analysoitiin ELISA-menetelmällä.

Tutkimuksen havaittiin, että Vesijärven Enonselän kasviplanktonin runsauden muutoksia voidaan selvit sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmenttien perusteella. Kasviplanktonin runsaud rekonstruktoinnissa tulee käyttää klorofylli a:n ja sen hajoamistuotteen, feofytiini a:n, kokonaispitoisuutta, si klorofylli a:ta oli hajonnut sitä enemmän mitä syvemmältä sedimenttiä tarkasteltiin. Sen sijaan tutkimuks tulosten perusteella näyttäisi siltä, että Vesijärven Enonselällä syanobakteerien runsaudessa tapahtuneita muutok ei voida luotettavasti selvittää syanobakteereille tyypillisten pigmenttien, ekinenonin ja kantaksantiinin, perustee Ekinenonin ja kantaksantiinin pitoisuutta ei ole myöskään mielekästä verrata sedimentin mikrokystiinipitoisuute sillä sedimentin mikrokystiinipitoisuus on suurin pintasedimentissä ja se pienenee syvemmälle sedimenti mentäessä.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords
Kasviplanktonpigmentit, sedimentti, syanobakteerit, HPLC, mikrokystiini

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Lahden tiedekirjasto, Viikin tiedekirjasto, Ympäristöekologian laitoksen käsikirjasto, Merentutkimuslaitoksen kirjasto

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Sisällysluettelo:

TIIVISTELMÄ 1

1. JOHDANTO
1.1 Vesijärven rehevöityminen ja kunnostus 4
1.2 Kasviplanktonpigmentit 7
1.2.1 Pigmenttien esiintyminen sedimentissä 7
1.2.2 Pigmentit 7
1.2.3 Klorofyllit, karotenoidit ja fykobiliinit 8
1.3 Syanobakteerit 10
1.3.1 Yleistä syanobakteereista 10
1.3.2 Syanotoksiinit: Maksa- ja hermomyrkyt 11
1.3.3 Syanobakteerien pigmentit 13
1.4 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet 13
1.4.1 Vesijärven Enonselän sedimentin analyysit 13
1.4.2 Pigmenttien analysointimenetelmän modifiointi ja näytteiden esikäsittelymenetelmien vertailututkimus 14

2. AINEISTO JA MENETELMÄT
2.1 Sedimenttinäytteenotto 15
2.2 Sedimentin ajoitus 16
2.2.1 Lustoajoitus 16
2.2.2 Cesium-137 ajoitus 16
2.3 Pigmenttianalyysi 17
2.3.1 Näytteiden esikäsittely 17
2.3.2 Näytteiden säilytys 18
2.3.3 Näytteiden analysointi 18
2.3.4 Pigmenttipitoisuuksien laskeminen 20
2.3.5 Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuus 21
2.4 Näytteiden esikäsittelymenetelmien vertailututkimus 21
2.5 Orgaanisen aineen määritys sedimentistä 24
2.6 Mikrokystiinianalyysi 25

3. TULOKSET
3.1 Sedimenttinäytteen ajoitus 28
3.1.1 Lustoajoitus 28
3.1.2 Cesium-137 -ajoitus 28
3.1.3 Orgaanisen aineen määritys 29
3.2 Esikäsittelymenetelmien vertailututkimus 31
3.2.1 Vertailututkimuksessa määritetyt pigmentit 31
3.2.2 Uuttoliuottimen tehokkuus: asetoni ja etanoli 33
3.2.3 Sonikaattorin tehokkuus: allas- ja kärkisonikaattori 33
3.3.4 Allassonikoinnin lämpötila: sonikointi 0 °C:ssa ja 21 °C:ssa 34
3.4 Uuttoliuosten säilytys 36
3.5 Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuus 37
3.6 Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen analyysit 38
3.6.1 Pigmenttianalyysi 38

3.6.2 Mikrokystiinianalyysi 44

4. TULOSTEN TARKASTELU
4.1 Näytteiden esikäsittelymenetelmä 45
4.2 Uuttoliuosten säilytys 46
4.3 Mittalaitteen toistettavuus 46
4.4 Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen ajoitus 47
4.5 Vesijärven Enonselän sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmenttien käytettävyys paleolimnologisessa tutkimuksessa 48
4.5.1 Kasviplanktonpigmenttien säilyminen sedimentissä 48
4.5.2 Sedimentin klorofylli a ja feofytiini a -pitoisuus kasviplanktonin biomassan muutosten kuvaajana 49
4.5.3 Sedimentin ekinenoni- ja kantaksantiinipitoisuus syanobakteerien biomassan muutosten kuvaajana 50
4.6 Vesijärven Enonselän sedimentin mikrokystiinipitoisuus 50

5. JOHTOPÄÄTÖKSET
5.1 Näytteiden esikäsittely ja säilytys 51
5.2 Vesijärven Enonselän sedimentin kasviplanktonpigmentit ja mikrokystiini paleolimnologisessa tutkimuksessa 52

6. KIITOKSET 53

7. KIRJALLISUUS 54

Liitteet 59

1. Johdanto

1.1 Vesijärven rehevöityminen ja kunnostus

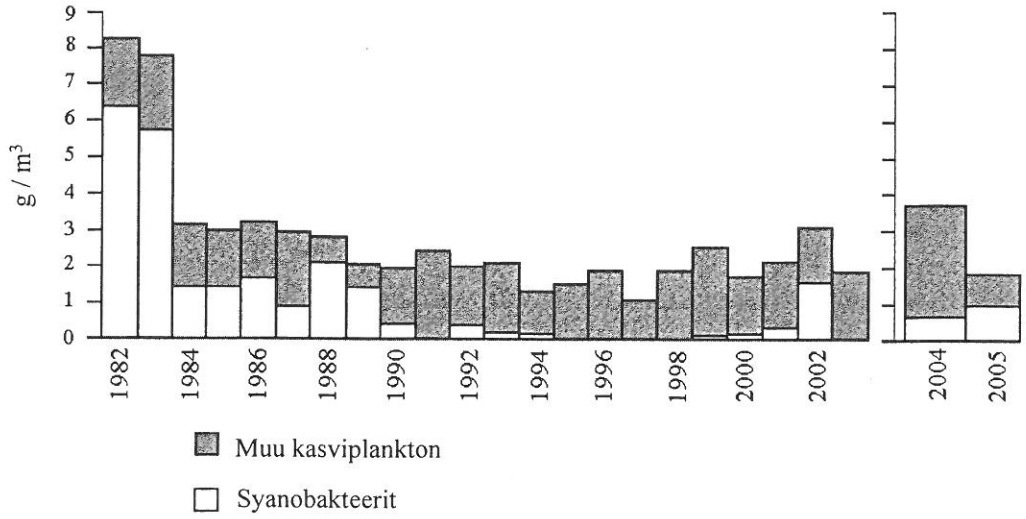
Vesijärvi sijaitsee Etelä-Suomessa, Päijät-Hämeessä, Lahden kaupungin sekä Hollolan ja Asikkalan kuntien alueella. Lahden kaupungin asukasluku ja sen seurauksena Vesijärveen laskettavien jätevesien määrä alkoi kasvaa nopeasti Toisen maailmansodan jälkeen, minkä seurauksena 1960-luvun lopulla Vesijärvi oli yksi Suomen rehevöityneimmistä järvistä (Finni 1979 ref. Keto 1982). Enonselkä on ollut Vesijärven pahiten pilaantunut osa, sillä sinne johdettiin vuoteen 1976 saakka Lahden kaupungin jätevedet (Keto & Sammalkorpi 1988). 1960-luvun lopulla ja 1970-luvun alkupuolella Enonselän veden laatu oli niin huono, että se ei soveltunut kalastukseen eikä virkistyskäyttöön (Keto 1982).

Vesijärvi on luontaisesti rehevähkö järvi ravinteikkaitten pohjavesien ja valuma-alueen ravinteikkaan maaperän vuoksi. Limnologisia tutkimuksia on tehty Vesijärvellä jo 1900-luvun alkupuolella (Levander & Wuorentaus 1918, Järnefelt 1929), jolloin veden laatu oli hyvää ja vesi kirkasta (ref. Keto & Sammalkorpi 1988). Tuolloin on myös raportoitu Vesijärvellä ensimmäiset syanobakteerihavainnot: Levanderin & Wuorentauksen (1918) havainnot kertovat *Aphanizomenon*-syanobakteerien esiintymisestä vuonna 1913 ja Järnefelt (1929) havaitsi syyskuussa 1922 voimakkaan syanobakteerien muodostaman pintaesiintymän koko Vesijärven alueella. Vuonna 1925 kesä- ja talvinäytteissä havaittiin *Oscillatoria* -syanobakteereita, kun taas vuoden 1926 kesä- ja syyskuussa valtalajina oli *Microcystis* ja *Anabaena* –syanobakteereita esiintyi vähän (ref. Keto & Sammalkorpi 1988). Vuonna 1928 Vesijärvellä kerrotaan sattuneen laaja syanobakteerien aiheuttama myrkytystapaus. Tuolloin Vesijärven eteläosaa ympäröivillä laitumilla sairastui noin 40 lehmää, joista suurin osa kuoli. Lehmät olivat juoneet vettä Vesijärvestä, jossa oli voimakas *Anabaena*–suvun syanobakteerien muodostama massaesiintymä. Tapauksen jälkeen tehtiin kokeellisia tutkimuksia, joissa todettiin syanobakteerien

aiheuttaneen lehmien kuoleman (Hindersson 1933 ref. Keto & Sammalkorpi 1988).

Kariniemen vedenpuhdistamon valmistuttua vuonna 1976 jätevesien laskeminen Vesijärveen lopetettiin, minkä jälkeen veden fosforipitoisuus Enonselällä laski noin 60 % ja typpipitoisuus laski noin 30 %. Myös kasviplanktonin biomassa pieneni, mutta siitä huolimatta kesäisin esiintyi edelleen syanobakteerien muodostamia massaesiintymiä (Keto 1982). Sisäisen kuormituksen vähentämiseksi aloitettiin Enonselällä alusveden ilmastus huhtikuussa 1979. Ilmastus kuitenkin lopetettiin viisi vuotta myöhemmin, sillä sen ei havaittu vähentävän syanobakteerien runsautta (Keto & Sammalkorpi 1988).

Järven tilan parantumisen havaittiin olevan hidasta 1980-luvulla korkean sisäisen kuormituksen vuoksi (Keto & Sammalkorpi 1988). Enonselällä mitattu kasviplanktonin biomassa oli suuri (kesän keskiarvo 7-8 g/m^3) vielä 1980-luvun alussa, mutta se pieneni merkittävästi vuonna 1984, jonka jälkeen biomassa on ollut alle 4 g/m^3 (kuva 1). Myös syanobakteerien biomassa pieneni huomattavasti vuonna 1984, mutta siitä huolimatta syanobakteerien muodostamat pintaesiintymät jatkuivat edelleen kesäisin. 1960-luvun puolivälistä lähtien kasviplanktonin valtalajina ollut *Planktothrix agardhii (Oscillatoria)* –syanobakteerin biomassa alkoi pienentyä vuonna 1983 ja vuonna 1985 valtalajiksi vaihtui *Aphanizomenon flos-aquae* (Keto ym. 2005).



Kuva 1. Kasviplanktonin biomassan vuotuinen keskiarvo ja syanobakteerien suhteellinen osuus kasviplanktonin biomassasta Vesijärven Enonselällä vuosina 1982-2003 (Keto ym. 2005) ja 2004-2005 (julkaisemattomia Vesijärven seurantatuloksia).

Vesijärvellä aloitettiin vuonna 1989 ravintoverkkokunnostus, jonka aikana vuosina 1989-1993 järvestä poistettiin satoja tonneja kalaa (Horppila & Peltonen 1994). Ravintoverkkokunnostuksen ansiosta kasviplanktonin biomassa pieneni noin 25 prosenttia ja syanobakteerien osuus kasviplanktonista pieneni merkittävästi (Kairesalo ym. 1999). Vuonna 1991 syanobakteerien muodostamaa pintaesiintymää ei havaittu, mikä tapahtui ensimmäisen kerran kolmeen vuosikymmeneen.

Enonselällä 1990-luvulla syanobakteerien osuus kasviplanktonista oli vähäinen. Syanobakteerien osuus kasviplanktonbiomassasta alkoi kasvaa uudelleen vuosituhannen taitteessa ja kesällä 2002 Vesijärven Enonselällä havaittiin pitkästä aikaa syanobakteerien muodostama pintaesiintymä, jonka muodostivat *Microcystis*-, *Anabaena*- ja *Aphanizomenon*-syanobakteerit (Keto ym. 2005).

1.2 Kasviplanktonpigmentit

1.2.1 Pigmenttien esiintyminen sedimentissä

Sedimentoituneita kasviplanktonpigmenttejä voidaan käyttää paleolimnologisessa tutkimuksessa paleoekologisina indikaattoreina, sillä ne kuvastavat järven fototrofista yhteisöä. Yleisten pigmenttien, esimerkiksi klorofylli a:n, avulla voidaan selvittää muutoksia kasviplanktonyhteisöjen tuotannossa, kun taas taksonomisesti spesifisten karotenoidien avulla saadaan selville kasviplanktonyhteisön koostumuksen muutoksia (Leavitt & Hodgson 2001). Lisäksi klorofyllien hajoamistuotteita voidaan käyttää eläinplanktonin laidunnuksen indikaattorina (Vernet & Lorenzen 1987, Chen ym. 2003).

Sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmenttien paleolimnologista tutkimusta suunniteltaessa on huomioitava sedimenttinäytteenottopaikan olosuhteet. Pigmentit ovat labiileja orgaanisia yhdisteitä, jotka hajoavat akvaattisessa ympäristössä kemiallisissa, fotokemiallisissa ja biologisissa prosesseissa. Sedimentissä pigmenttien hajoaminen on hitaampaa kuin vesipatsaassa, mutta olosuhteet vaikuttavat merkittävästi niiden hajoamisnopeuteen. Pigmentit säilyvät sedimentissä parhaiten muuntumattomina, silloin kun pohjalle ei pääse valoa, happipitoisuus on pieni (Kowalewska 1997) ja lämpötila on alhainen. Myös pohjaeläinten ravinnonkäytöllä ja bioturbaatiolla voi olla merkittävä vaikutus pigmenttien säilymiseen sedimentissä (Leavitt & Hodgson 2001).

1.2.2 Pigmentit

Fotosynteesissä kasvien, levien ja joidenkin bakteerien fotosynteettiset pigmentit absorboivat valoenergiaa, joka muunnetaan biokemialliseksi energiaksi. Pigmenttimolekyylit muodostavat proteiinien kanssa ns.

fotosysteemikompleksin, jonka rakenne voidaan jakaa antennikompleksiin ja reaktiokeskukseen. Antennikompleksi on pigmenttimolekyylien yhteenliittymä, joka vastaanottaa fotonien energian ja siirtää sen reaktiokeskukselle. Reaktiokeskuksessa tapahtuu varsinainen elektronin virittyminen, josta fotosynteesin valoreaktio alkaa. Kasveilla ja levillä reaktiokeskuksen pigmenttinä toimii klorofylli a. Muut pigmentit toimivat valoa keräävässä antennikompleksissa niin sanottuina avustavina pigmentteinä (Campbell & Reece 2002). Planktonlevien pigmenttikoostumus vaihtelee paljon ja niillä on taksonomisesti spesifejä pigmenttejä (taulukko 1). Kasviplanktonpigmentit voidaan jakaa klorofylleihin, karotenoideihin ja fykobiliineihin.

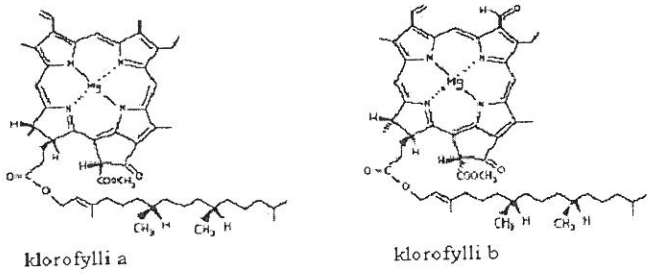
Taulukko 1. Pigmenttien esiintyminen leväryhmittäin (x = > 10 %, o = 1-10 % ja v = < 1 % pigmenteistä) sekä pigmenttien stabiilisuus asteikolla 1 (stabiilein) – 4 (labiilein) (Jeffrey ym. 1997, Leavitt & Hodgson 2001).

	stabiilisuus	Bacillariophyta	Chlorophyta	Chrysophyta	Cryptophyta	Cyanophyta	Dinophyta	Euglenophyta	Eustigmatophyta	Prasinophyta	Prymnesiophyta	Raphidophyta	Rhodophyta
Klorofyllit													
Klorofylli a	3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Klorofylli b	2		x					x		x			
Karotenoidit													
β-karoteeni	1	v	o	v		o	v	o	o	o	v	o	
Afanitsofylli	2					x							
Alloksantiini	1				x								
Ekinenoni	1		o/v			x		o/v					
Fukoksantiini	2	x		x			v				x	x	
Kantaksantiini	1					x							
Luteiini	1		x							o			
Violaksantiini	4		x						x	x			

1.2.3 Klorofyllit, karotenoidit ja fykobiliinit

Klorofyllit kuuluvat suureen joukkoon metalli-tetrapyrroleja, joita kutsutaan "elämän pigmenteiksi" niiden keskeisen aseman vuoksi elollisessa järjestelmässä (Rüdiger & Schoch 1988). Kaikkien klorofyllimolekyylien perusrakenteena on porfyriinirengas, johon on liittynyt fytolihäntä (kuva 2).

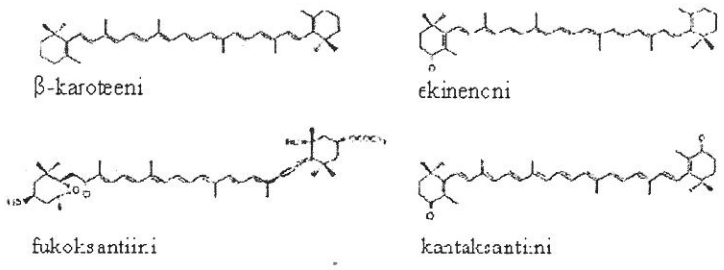
Porfyriinirengas koostuu tetrapyrrolirenkaasta ja sen keskellä sijaitsevasta magnesiumatomista (Campbell & Reece 2002). Klorofyllien rakenteiden erot ovat porfyriinirenkaiden sivuketjuissa. Kaikilla yhteyttävillä organismeilla esiintyy klorofylli a:ta, minkä vuoksi se on hyödyllisin kasviplanktonin biomassan ja perustuotannon ilmentäjä (Leavitt & Hodgson 2001).



Kuva 2. Klorofylli a:n ja klorofylli b:n molekyylirakenne (Jeffrey ym. 1997).

Klorofyllien hajoamistuotteita kutsutaan feopigmenteiksi. Näitä ovat muun muassa feofytiinit (klorofyllit, jotka ovat menettäneet magnesiumatominsa), klorofyllidit (klorofyllit, jotka ovat menettäneet fytolinsa) sekä feoforbidit (klorofyllit, jotka ovat menettäneet sekä magnesiumatominsa että fytolinsa) (Jeffrey ym. 1997). Akvaattisessa ympäristössä feopigmenttejä voi muodostua abioottisen hajoamisen, eläinplanktonin laiduntamisen tai mikrobihajoituksen seurauksena (Leavitt & Hodgson 2001).

Karotenoidi on yhteisnimitys yksinomaan hiiltä ja vetyä sisältäville karoteeneille sekä niiden happea sisältäville johdoksille ksantofylleille (kuva 3). Karotenoidit ovat väriltään keltaisia tai oranssinpunaisia (Campbell & Reece 2002). Karotenoidit ovat stabiilimpia kuin klorofyllit, mutta niiden hajoamistuotteet ovat värittömiä ja näin ollen niiden hajoamistuotteita ei pystytä havaitsemaan spektrofotometrisillä analyysimenetelmillä toisin kuin klorofyllien hajoamistuotteet (Jeffrey ym. 1997).



Kuva 3. Karotenoidien rakenne. Karotenoidi on yhteisnimitys hiiltä ja vetyä sisältäville karoteeneille (β-karoteeni) ja niiden happea sisältäville johdoksille ksantofylleille (fukoksantiini, ekinenoni, ksantaksantiini) (Jeffrey ym. 1997).

Syanobakteereilla (Cyanophyta), punalevillä (Rhodophyta) ja joillakin nielulevillä (Cryptophyta) esiintyy fykobiliinipigmenttejä (Jeffrey ym. 1997). Fykobiliinipigmentit (fykoerytriini, fykosyaniini ja allofykosyaniini) sijaitsevat fykobilisomeissa, jotka keräävät valoenergiaa. Ne antavat sinileville ja punaleville niille tyypillisen värityksen: fykosyaniini antaa sinisen ja fykoerytriini punaisen värin. Fykobiliinit ovat vesiliukoisia, eikä niille ole kehitetty vastaavanlaisia analyysimenetelmiä kuin rasvaliukoisille klorofylleille ja karotenoideille (Jeffrey ym. 1997).

1.3 Syanobakteerit

1.3.1 Yleistä syanobakteereista

Syanobakteerien luokkaan (Cyanophyceae) kuuluvat mikro-organismit ovat yksisoluisia yhteyttämään kykeneviä prokaryootteja, jotka esiintyvät yksittäin tai yhdyskuntina. Ne muistuttavat siis morfologisesti ja biokemiallisesti enemmän bakteereja kuin leviä. Syanobakteerit ovat ekologiselta ja toiminnalliselta kannalta katsoen levien kaltaisia, minkä vuoksi ne luetaan yleensä leviin kuuluviksi.

Syanobakteerit ovat luonnollinen osa kasviplanktonyhteisöä ja niitä esiintyy niin vähä- kuin runsasravinteisissakin vesissä. Syanobakteerilajeja on noin kaksi tuhatta (Mur ym. 1999), joista planktisia lajeja on pari sataa (Tikkanen 1986).

Syanobakteereista voi muodostua ongelma silloin, kun ne runsastuvat massaesiintymäksi. Massaesiintymän voi muodostaa yksi tai useampi syanobakteerilaji (Sivonen & Jones 1999).

Syanobakteerimassaesiintymän muodostumisen ajankohtaan ja kestoon vaikuttavat merkittävästi muun muassa alueelliset ilmasto-olosuhteet. Temperaattisella ilmastovyöhykkeellä, kuten Suomessa, syanobakteerien muodostamat massaesiintymät havaitaan yleensä loppukesällä tai alkusyksyllä (Sivonen & Jones 1999). Suomen sisävesissä massaesiintymän muodostavat yleensä *Aphanizomenon-*, *Microcystis-*, *Anabaena-* ja *Planktothrix-* (*Oscillatoria-*) syanobakteerit (Sivonen 1990). Näissä suvuissa on potentiaalisesti myrkyllisiä lajeja. Lajeja kutsutaan potentiaalisesti myrkyllisiksi, sillä lajin kaikki kannat eivät muodosta myrkyllisiä yhdisteitä. Suomessa havaituista syanobakteerimassaesiintymistä noin puolessa on havaittu myrkkyjä muodostavia syanobakteereita (Sivonen ym. 1990).

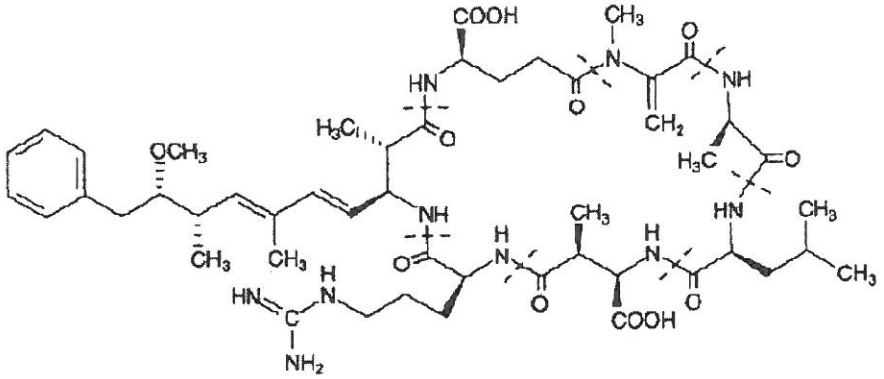
Syanobakteerien myrkyllisyys voidaan todeta ainoastaan myrkyllisyystestien avulla (Sivonen & Jones 1999). Yleisimmin analysoituja syanotoksiineja ovat mikrokystiinit ja nodulariinit, jotka voidaan analysoida samoilla menetelmillä niiden rakenteiden samankaltaisuuden vuoksi. Mikrokystiinien ja nodulariinien analysoinnissa käytettyjä menetelmiä ovat muun muassa HPLC- ja ELISA-menetelmät (Harada ym. 1999).

1.3.2 Syanotoksiinit: Maksa- ja hermomyrkyt

Syanobakteerien muodostamat myrkylliset yhdisteet eli niin sanotut syanotoksiinit luokitellaan niiden vaikutusmekanismin perusteella maksa- tai hermomyrkkyihin (taulukko 3). Akvaattisessa ympäristössä syanobakteerien muodostamat myrkylliset yhdisteet ovat yleensä solujen sisällä, mutta ne voivat vapautua esimerkiksi solujen rikkoutuessa syanobakteerikukinnan loppuvaiheessa (Sivonen & Jones 1999). Makeissa vesissä ja murtovesissä

maksamyrkkyjen on todettu olevan yleisempiä kuin hermomyrkkyjen (Sivonen 1990). Syanobakteerien tuottamia maksamyrkkyjä ovat mikrokystiinit, nodulariinit ja sylindrospermopsiinit.

Mikrokystiinejä voivat tuottaa useat syanobakteerisuvut, kuten *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) ja *Nostoc* (Rinehart ym. 1994). Ne ovat syklisiä heptapeptidejä (kuva 4), joista tunnetaan jo yli 70 erilaista molekyylirakennetta (Meriluoto ym. 2004).



Kuva 4. Mikrokystiinien rakenteessa on seitsemän peptidisidoksin toisiinsa liittynyttä aminohappoa. Kuvassa mikrokystiini-LR:n molekyylirakenne.

Nodulariini-R eli nodulariini on murtovedessä esiintyvän *Nodularia spugimena* -syanobakteerilajin tuottama maksamyrkky. Nodulariinilla on pentapeptidi rakenne, jossa viisi aminohappoa on liittynyt toisiinsa peptidisidoksin. Nodulariinin rakenne muistuttaa mikrokystiinin rakennetta, minkä vuoksi myös sen vaikutustapa muistuttaa mikrokystiiniä. (Sivonen & Jones 1999)

Sylindrospermopsiinit luokitellaan mikrokystiinien ja nodulariinien tapaan maksamyrkkyihin, mutta ne poikkeavat hieman näistä kemialliselta rakenteeltaan. Sylindrospermopsiineja tuottaa muun muassa *Aphanizomenon*-syanobakteerisuku. Sylindrospermopsiinit vaurioittavat pääasiassa maksaa, mutta voivat olla myös vahingollisia munuaisille, sydämelle ja muille elimille. (Sivonen & Jones 1999)

Syanobakteerien tuottamat anatoksiini- ja saksitoksiinihermomyrkyt ovat alkaloideja, jotka syntetisoituvat yleisistä aminohapoista (Sivonen & Jones 1999).

1.3.3 Syanobakteerien pigmentit

Syanobakteerien pigmenttejä ovat klorofylli a, fykobiliinit ja osa karotenoideista. Fykobiliinien ansiosta syanobakteerit voivat käyttää tehokkaasti valon aallonpituuksia klorofylli a:n ja karotenoidien absorptiomaksimien väliltä (Mur ym. 1999). Makean veden syanobakteereille tärkeitä karotenoideja ovat ekinenoni, kantaksantiini, myksoksantofylli ja oskillaksantiini (Jeffrey ym. 1997).

1.4 Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet

1.4.1 Vesijärven Enonselän sedimentin analyysit

Tutkimuksen tarkoituksena oli analysoida Vesijärven Enonselän sedimenttiin sedimentoituneiden kasviplanktonpigmenttien jäämiä. Tavoitteena oli selvittää, voidaanko sedimenttiin varastoituneiden pigmenttien perusteella tutkia Vesijärven Enonselän kasviplanktonyhteisön runsaudessa ja koostumuksessa tapahtuneita muutoksia. Kasviplanktonyhteisön runsautta kuvaavaa kasviplanktonin biomassaa on Vesijärven Enonselällä mitattu jo pitkään (1980-luvun alkupuolelta lähtien: kuva 1), minkä ansiosta sedimentin pigmenttipitoisuuksia pystyttiin vertaamaan järvellä mitattuun kasviplanktonin määrään.

Kasviplanktonpigmenttien lisäksi tutkimuksessa analysoitiin Vesijärven Enonselän sedimentistä analysoitiin mikrokystiinipitoisuus, joka on syanobakteerien (*Anabaena, Microcystis* ja *Planktothrix* –sukujen) tuottama maksamyrkky. Tavoitteena oli selvittää onko Vesijärven Enonselän

sedimentissä havaittavissa mikrokystiiniä, ja jos näin on niin, onko syanobakteereille tyypillisten pigmenttien, ekinenonin ja kantaksantiinin, pitoisuuden ja mikrokystiinipitoisuuden välillä havaittavissa positiivista korrelaatiota.

1.4.2 Pigmenttien analysointimenetelmän modifiointi ja näytteiden esikäsittely-menetelmien vertailututkimus

Pigmenttien analysointia varten tarkoituksena oli modifioida kasviplanktonpigmenttien, klorofyllien ja karotenoidien, analysointimenetelmä Merentutkimuslaitoksen korkean erotuskyvyn nestekromatografiselle (HPLC) laitteistolle sopivaksi. Tavoitteena oli, että menetelmällä saataisiin määritettyä laaja valikoima pigmenttejä yhdellä analyysillä.

Näytteiden esikäsittelymenetelmän tehokkuuden selvittämiseksi tehtiin vertailututkimus. Vertailututkimuksen tavoitteena oli selvittää uuttoliuottimen ja uutossa käytettävän sonikaattorin tehokkuutta sekä allassonikoinnin lämpötilan vaikutusta pigmenttien uuttumiseen näytteestä. Näytemateriaalina vertailututkimuksessa oli sedimentin lisäksi Itämereltä kerättyä kasviplanktonia, sillä esikäsittelymenetelmän tehokkuuden lisäksi tutkimuksessa haluttiin selvittää mitä pigmenttejä Merentutkimuslaitoksen HPLC-laitteistolle modifioidulla menetelmällä näytteestä on mahdollista määrittää.

2. *Aineisto ja menetelmät*

2.1 *Sedimenttinäytteenotto*

Tutkimusta varten otettiin Vesijärven Enonselän syvänteestä (N61°01'36,22'' E25° 35' 26,942'') sedimenttinäyte 18. toukokuuta 2006. Näyte otettiin veneestä käsin jääsormimenetelmällä (mm. Huttunen & Meriläinen 1978). Näytteenotin täytettiin hiilihappojäällä (-79 °C) ja jäiden sekaan lisättiin alkoholia. Tämän jälkeen näytteenotin laskettiin köyden varassa pystysuorassa asennossa pohjaan. Näytteenottimen annettiin olla paikallaan noin 45 minuutin ajan, jonka aikana sedimentti jäätyi sen ympärille noin 2-5 cm paksuiseksi kerrokseksi. Näytteenottopaikassa (kuva 5) veden syvyys oli noin 31 metriä. Näyte kuljetettiin muovilla ja alumiinipaperilla suojattuna ja hiilihappojäällä peitettynä laboratorioon, jossa sedimenttinäyte irrotettiin näytteenottimesta. Näytteen pinta höylättiin tasaiseksi puuhöylällä ja sedimenttinäyte jaettiin osanäytteiksi puolen senttimetrin välein. Sedimenttinäytteet säilöttiin ilmatiiviisiin Minigrip® -pusseihin, joita säilytettiin pakastimessa (-20 °C) valolta suojattuna.

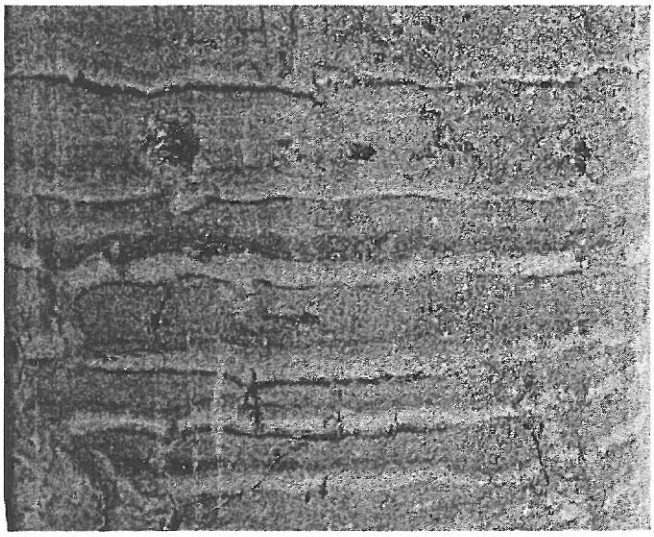
	Vesijärvi	Enonselkä
Valuma-alue (km^2)	515	84
Pinta-ala (km^2)	110	26
Suurin syvyys (m)	40	33
Keskisyvyys (m)	6,0	6,8
Teoreettinen viipymä (v)	5,4	5,6

Kuva 5. Vesijärven karttakuva sekä Vesijärven ja Enonselän hydrologiset tiedot. Tummennetuilla alueilla järven syvyys on yli kymmenen metriä. Karttaan on merkitty näytteenottopaikka mustalla pisteellä.

2.2 Sedimentin ajoitus

2.2.1 Lustoajoitus

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen ajoituksessa käytettiin lustotekniikkaa. Lustoajoitus perustuu siihen, että pohjalle sedimentoituva aines vaihtelee säännöllisesti vuodenaikojen mukaan. Keväällä sedimentoituva aines on vaaleaa, kun taas kesällä ja talvella se on tummaa (kuva 6). Keväällä kasviplanktonista suurin osa on piileviä, jotka antavat keväällä sedimentoituvalle ainekselle sille tyypillisen värin. Lustoajoitus tehtiin analyyseissä käytetyn sedimenttinäytteen rinnakkaisnäytteestä. Sedimentin lustoajoituksen teki FM Mikko Liukkonen (Helsingin yliopisto, ympäristöekologian laitos).



Kuva 6. Vesijärven Enonselän vuosilustoista sedimenttiä.

2.2.2 Cesium-137 ajoitus

Ukrainassa vuonna 1986 tapahtuneen Tsernobylin ydinreaktorionnettomuuden seurauksena laajalle alueelle levisi radioaktiivisia aineita. Näitä radioaktiivisia

aineita levisi myös Suomeen. Tsernobylin ydinreaktorionnettomuuden aiheuttamaa radioaktiivista cesium-137 -laskeumaa voidaan hyödyntää sedimentin ajoituksessa, sillä cesium-137 -laskeumapiikin perusteella voidaan ajoittaa sedimentistä tarkasti vuosi 1986. Aina sedimentissä ei kuitenkaan ole havaittavissa selkeää cesium-137-pitoisuuspiikkiä, jota voitaisiin käyttää sedimentin ajoittamiseen.

Vuonna 1986 sedimentoituneen aineksen tiedettiin alustavan lustoajoituksen perusteella sijoittuvan Vesijärven Enonselältä otetussa sedimenttinäytteessä 32,0-55,5 cm syvyydelle, minkä vuoksi sedimenttinäytteestä määritettiin tältä alueelta sedimentin cesium-137 pitoisuus. Cesium-137 määritykset tehtiin Säteilyturvakeskuksessa (STUK).

2.3 Pigmenttianalyysi

2.3.1 Näytteiden esikäsittely

Pigmenttianalyyseissä käytetyssä menetelmässä pyrittiin yksinkertaiseen ja nopeaan uuttomenetelmään, jotta minimoitaisiin pigmenttien muuttuminen ja hajoaminen uuton aikana. Uuton kaikki vaiheet tehtiin himmeässä valaistuksessa ja liuottimina käytettiin HPLC-laatuisia liuottimia (Leavitt & Hodgson 2001). Sedimenttinäytteet analysoitiin kuuden kuukauden sisällä näytteenotosta, jolloin säilytys ei vaikuta sedimenttinäytteiden pigmenttipitoisuuksiin (Leavitt & Hodgson 2001, Reuss & Conley 2005).

Sedimenttinäytteet kylmäkuivattiin, sillä kylmäkuivauksen on todettu parantavan pigmenttien uuttumista sedimentistä (Buffan-Dubau & Carman 2000). Kylmäkuivattu sedimentti jauhettiin ja homogenoitiin, jonka jälkeen ne säilytettiin pakastimessa – 20 °C:ssa (Reuss & Conley 2005).

Kylmäkuivattua sedimenttiä punnittiin tarkasti noin 0,3 g (näytteet 0-29,0 cm) tai noin 0,1 g (29,0-67,0 cm), lisätiin 5 ml asetonia ja sitä sonikoitiin allassonikaattorissa 20 °C:ssa 15 minuutin ajan. Näytteitä inkuboitiin pimeässä – 20 °C:ssa noin 18 tunnin ajan, jonka jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 4 °C:ssa (3362 rcf) 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen uuttoliuos kerättiin talteen ja suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen (PTFE) läpi. Suodatetut näytteet säilytettiin pimeässä, - 20 °C:ssa ja korkillisissa 1,5 ml vialeissa. Näytteet analysoitiin viiden vuorokauden kuluessa esikäsittelystä Leavitt & Hodgson:in (2001) suositusten mukaisesti.

2.3.2 Näytteiden säilytys

Näytteiden säilyvyys esikäsittelyn jälkeen haluttiin varmistaa, minkä vuoksi Vesijärven sedimenttinäytteen kerroksista 55,0-57,5 cm analysoitiin pigmenttien pitoisuus (ekinenoni, fukoksantiini, kantaksantiini ja klorofylli a) heti esikäsittelyn jälkeen sekä 1, 3, 6 ja 13 vuorokauden jälkeen.

2.3.3 Näytteiden analysointi

Analyysissä käytetty HPLC-menetelmä perustuu muun muassa Mantoura & Llewellyn (1983), Heuklem & Thomas (2001) ja Leavitt & Hodgson (2001) käyttämiin menetelmiin. Näytteet analysoitiin Merentutkimuslaitoksen HPLC-laitteistolle sopivaksi muunnetulla menetelmällä, joka mahdollisti useiden pigmenttien samanaikaisen analysoinnin. Ennen näytteiden analysointia uuttoliuoksia laimennettiin etanolilla siten, että näytteiden liuotinkoostumus oli HPLC-ajon alkaessa 50 % etanolia 50 % asetonia. Näytteistä analysoitiin 1/2-laimennos sekä 1/4- tai 1/6-laimennos.

Pigmenttien analysoinnissa käytettiin Watersin HPLC-laitteistoa. Detektorina laitteistossa oli valodiodispektrofotometri (photo-diode array; PDA)

spektrofotometri (Waters 996), jolla rekisteröitiin aallonpituudet väliltä 350-700 nm. Analysoitujen pigmenttien retentioajan tuli vastata pigmenttistandardien retentioaikaa ja spektrien pigmenttistandardien spektrejä sekä Jeffrey ym. (1997) kirjallisuudessa antamia absorbanssimaksimi arvoja.

Kolonnina käytettiin Zorbax SB-C18 käänteisfaasikolonnia (150 x 4,6 mm, partikkelikoko 3,5 µm). Esikolonnina oli Sentry Symmetry C18 esikolonni (3,9 x 20 mm, partikkelikoko 5 µm). Kolonni ja esikolonni oli termostoitu ja niiden lämpötila oli 30 °C.

Analyysissä käytettiin kahta eri ajoliuosta. Ajoliuoksina oli (A) 15 % IPR / 85 % metanoli ja (B) 30 % asetoni / 70 % metanoli. A-ajoliuoksen IPR:ssä (ion-pairing reagent) oli 0,75 g tetrabutyyliammonium asetaattia (Sigma-Aldrich) ja 7,7 g ammonium asetaattia (Sigma-Aldrich) liuotettuna 100 ml:aan ionivaihdettua vettä (Millipore mQ). Ajoliuoksia sonikoitiin allassonikaattorissa ilman poistamiseksi liuoksista. HPLC-analyysissä käytettiin seuraavaa ajo-ohjelmaa: 0-1,5 minuuttia ajoliuos A, jonka jälkeen lineaarinen gradientti 1,5-8,0 minuuttia A:sta B:hen. Gradientti pidettiin B:ssä 19 minuuttia, jonka jälkeen kaksi minuuttia lineaarinen gradientti B:stä A:han alkutilaan palauttamiseksi. Tämän jälkeen laitteiston annettiin palautua kuuden minuutin ajan. Ajoliuoksen virtausnopeus oli 1,2 ml/min. Näytteiden injektiotilavuus oli 50 µl ja injektioväli 35 minuuttia. Analyysissä käytettiin automaattista näytteensyöttäjää.

HPLC-analyysissä käytettiin kahta eri kalibraatiostandardia, joista analysoitiin jokaisen ajosekvenssin yhteydessä neljä laimennosta (taulukko 2). Toisessa kalibraatiostandardissa oli klorofylli a ja toisessa oli β-karoteeni, ekinenoni, feofytiini a, fukoksantiini, kantaksantiini ja klorofylli b. Kalibraatiostandardit tehtiin kaupallisista pigmenttistandardeista (DHI Water and Environment, Tanska), jotka oli liuotettu yksitellen joko 100 % etanoliin tai 90 % asetoniin. Kalibraatiostandardien liuotinkoostumus oli sama kuin näytteiden eli 50 % etanolia ja 50 % asetonia.

Taulukko 2. Pigmenttien pitoisuus kalibraatiostandardeissa. Kantaliuosten pitoisuus vaihteli tuotantoerien välillä.

			Pitoisuus kalibrointiliuoksessa (ppm)			
	Kantaliuos (ppm)	Liuotin	1,00*	0,75*	0,50*	0,25*
a)						
Fukoksantiini	1,438	etanoli	0,240	0,180	0,120	0,060
Kantaksantiini	0,899	etanoli	0,150	0,112	0,075	0,037
Klorofylli b	1,524	asetoni	0,254	0,191	0,127	0,064
Ekinenoni	0,928	etanoli	0,155	0,116	0,077	0,039
Feofytiini a	3,529	asetoni	0,588	0,441	0,294	0,147
Beta-karoteeni	1,138	asetoni	0,190	0,142	0,095	0,047
b)						
Klorofylli a	3,036	asetoni	0,759	0,569	0,380	0,190

2.3.4 Pigmenttipitoisuuksien laskeminen

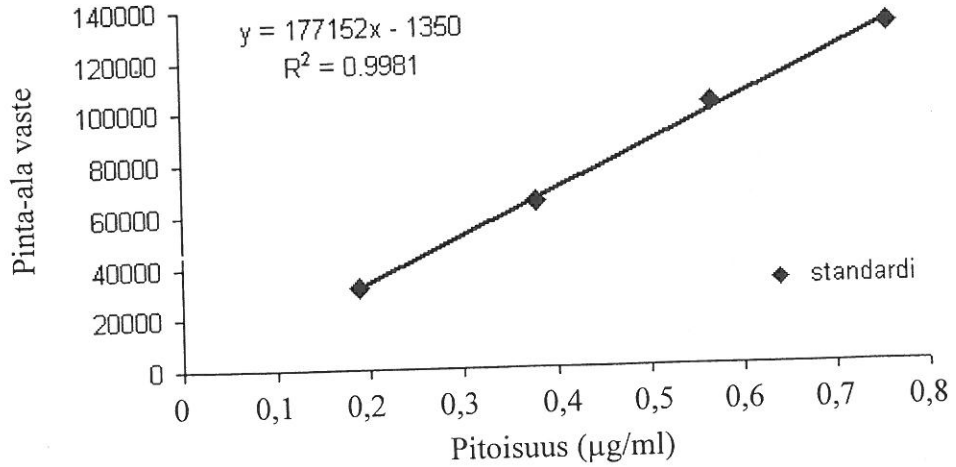
Sedimentin pigmenttipitoisuudet (µg/g kuiva-ainetta) laskettiin seuraavan yhtälön avulla:

$$P = (x_{HPLC} * L * V) / m_s,$$

jossa x_{HPLC} on ajetun näytteen pigmenttipitoisuus (µg/ml), L ajetun näytteen laimennoskerroin, V on näytteen alkuperäinen tilavuus (ml) ja m_s on näytteeseen punnitun sedimentin massa (g).

HPLC:llä analysoidun näytteen pigmenttipitoisuus (x_{HPLC}) laskettiin kalibraatiosuoranyhtälön perusteella. Kalibraatiosuoranyhtälö laskettiin pigmenttistandardin pinta-ala vasteen (y) ja sitä vastaavan pigmenttipitoisuuden (x) perusteella (kuva 7). Esimerkiksi klorofylli a:n pitoisuus sedimentissä laskettiin seuraavasti. Näytteen kanssa samassa ajosekvenssissä analysoidun kalibraatiostandardin kromatogrammista integroitiin klorofylli a -standardin kromatogrammipiikki, jolloin saatiin selville tiettyä klorofylli a-pitoisuutta vastaava pinta-ala vaste. Koska kalibraatiostandardista ajettiin neljä laimennosta, saatiin selville neljää klorofylli a –pitoisuutta vastaava pinta-ala vaste, joiden perusteella piirrettiin kalibraatiosuora. Kalibraatiosuoranyhtälön

avulla saatiin laskettua HPLC:llä analysoidun näytteen klorofylli a -pitoisuus (x_{HPLC}).



Kuva 7. Klorofylli a:n kalibraatiosuora ja suoran yhtälö. Näytteitä analysoitaessa pyrittiin siihen, että näytteen pigmenttipitoisuus oli pienimmän ja suurimman kalibraatiostandardin pitoisuuden välillä. Tämän ajosekvenssin näytteiden klorofylli a -pitoisuus olisi tullut olla 0,2 – 0,8 µg/ml välillä.

2.3.5 Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuus

Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuuden selvittämiseksi Vesijärven sedimenttinäytteen 39,5-40,0 cm -kerroksesta tehtiin 10 rinnakkaista näytettä (menetelmän toistettavuus), joista yhdelle näytteelle tehtiin 10 peräkkäistä analyysiä (mittalaitteen toistettavuus). Näytteistä analysoitiin β-karoteeni-, ekinenoni-, feofytiini a-, fukoksantiini-, kantaksantiini- ja klorofylli a -pitoisuus, joiden perusteella laskettiin pigmenttien pitoisuuden keskiarvo ja -hajontaprosentti.

2.4 Näytteiden esikäsittelymenetelmien vertailututkimus

Pigmenttitutkimuksissa näytteiden esikäsittelyssä on yleisesti käytetty useita erilaisia menetelmiä. Esikäsittelymenetelmien välillä niin uuttoliuotin, näytteille

tehtävät lisäkäsittelyt (mm. sonikointi, ravistelu ym.) kuin uuttoajat ja -lämpötilat eroavat paljon toisistaan (mm. Jeffrey ym. 1997, Leavitt & Hodgson 2001).

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteiden esikäsittelymenetelmän tehokkuuden varmistamiseksi tehtiin vertailututkimus, jossa näytteenä käytettiin sedimenttiä ja kasviplanktonia. Vertailututkimuksessa näytteinä käytettiin Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen sedimenttiä syvyydeltä 65,5-66,0 cm (A) ja 31,0-31,5 cm (B) sekä Itämereltä vuonna 2003 (C) ja 2006 (D) haavilla veden pinnalta kerättyä kasviplanktonia. Vertailututkimuksessa verrattiin I) asetonilla ja etanolilla uutettujen näytteiden pigmenttipitoisuuksia, II) allas- ja kärkisonikaattorilla sonikoitujen näytteiden pigmenttipitoisuuksia sekä III) allassonikoinnin lämpötilan vaikutusta pigmenttipitoisuuksiin.

Vertailututkimuksessa näytteiden esikäsittely tehtiin muutoin samalla tavoin kuin Vesijärven Enonselän sedimentin pigmenttianalyysissä (katso kappale 2.3), mutta uuttoliuottimena käytettiin joko asetonia tai etanolia ja näytteiden sonikoinnissa käytettiin allas- tai kärkisonikaattoria (taulukko 3).

Taulukko 3. Vertailututkimuksessa näytteille tehdyt esikäsittelyt. Sedimenttinäytteistä (A ja B) käsiteltiin kolme rinnakkaista näytettä ja kasviplanktonnäytteistä (C ja D) viisi rinnakkaista näytettä.

Näyte	Käsittely				
	1	2	3	4	5
A	x	x			x
B	x		x	x	
C	x	x			
D	x		x		x

Käsittelyt:

1. Liuottimena asetoni ja sonikointi allassonikaattorissa (15 min, 21 °C).
2. Liuottimena asetoni ja sonikointi allassonikaattorissa (15 min, 0 °C).
3. Liuottimena asetoni ja sonikointi allassonikaattorissa (120 min, 0 °).
4. Liuottimena etanoli ja sonikointi allassonikaattorissa (15 min, 21 °C).
5. Liuottimena asetoni ja sonikointi kärkisonikaattorissa (4 x 15 s, 21 °C).

I) Liuotin: asetoni ja etanoli

Pigmenttinäytteiden esikäsittelyssä yleisimmin liuottimena on käytetty asetonia ja metanolia (Jeffrey ym. 1997). Buffan-Dubau & Carman (2000) havaitsivat tutkimuksessaan asetonin olevan pigmenttinäytteiden käsittelyssä vähintäänkin yhtä hyvä uuttoliuotin kuin metanoli. Koska asetoni ei ole yhtä myrkyllinen kuin metanoli, valittiin asetoni liuottimeksi pigmenttinäytteiden esikäsittelyyn. Etanolin on myös havaittu liuottavan kasviplanktonpigmentit tehokkaasti näytteestä. Wasmund ym. (2006) havaitsivat, että etanoli uuttaa klorofylli a:n kasviplanktonnäytteestä tehokkaammin kuin asetoni. Koska etanoli on asetonia turvallisempi näytteen käsittelijälle, haluttiin verrata etanolilla käsiteltyjen näytteiden pigmenttipitoisuuksia asetonilla käsiteltyjen näytteiden pigmenttipitoisuuksiin.

II) Sonikaattori

Vesijärven Enonselän sedimentin pigmenttitutkimuksessa näytteet sonikoitiin allassonikaattorissa, minkä vuoksi allassonikoinnin tehokkuus haluttiin varmistaa. Vertailututkimuksessa verrattiin allassonikaattorilla käsiteltyjen ja kärkisonikaattorilla käsiteltyjen näytteiden pigmenttipitoisuuksia.

III) Allassonikoinnin lämpötila

Pigmentit ovat labiileja molekyylejä ja sen vuoksi näytteiden esikäsittelyssä on huomioitava lämpötilan vaikutus pigmenttien hajoamiseen. Toisaalta on myös huomioitava, että pigmenttien uuttuminen näytemateriaalista voi huonontua matalammassa lämpötilassa. Näiden edellä mainittujen tekijöiden vuoksi vertailututkimuksessa selvitettiin, miten allassonikoinnin lämpötila vaikuttaa pigmenttien uuttumiseen. Sedimentti- ja kasviplanktonnäytteitä sonikoitiin allassonikaattorissa 0 °C ja 21 °C lämpötilassa.

Vertailututkimuksessa näytteistä analysoitiin afanitsofylli, alloksantiini, ß-karoteeni, ekinenoni, feofytiini a, fukoksantiini, kantaksantiini, klorofylli a, klorofylli b, luteiini, violaksantiini ja 4-keto-myksoksantofyllin kaltainen pigmentti. Näytesarjojen yhteydessä ajettiin kolme kalibraatiostandardia, joista

jokaisesta neljä eri laimennosta. Ensimmäisessä kalibraatiostandardissa oli yhdistettynä klorofylli a:n, feofytiini a:n ja ß-karoteenin standardit, toisessa kalibraatiostandardissa oli yhdistettynä fukoksantiinin, afanitsofyllin, alloksantiinin, luteiinin ja klorofylli b:n standardit, ja kolmannessa kalibraatiostandardissa oli yhdistettynä violaksantiinin, 4-keto-myksoksantofyllin kaltaisen pigmentin, ekinenonin ja kantaksantiinin standardit. Näytteet analysoitiin samalla menetelmällä kuin Vesijärven Enonselän sedimentin pigmenttianalyysissä (katso kappale 2.3). Laborantti Kirsi Hyvärinen (MTL) ja harjoittelija Galina Pesonen (MTL) analysoivat vertailututkimuksen näytteet.

Yleisesti tutkimuksissa analysoitujen pigmenttien lisäksi vertailututkimukseen otettiin mukaan 4-keto-myksoksantofyllin kaltainen pigmentti, joka on tyypillinen pigmentti Itämeressä esiintyvälle *Nodularia spugimena* – syanobakteerille. 4-keto-myksoksantofyllin kaltaisen pigmentin molekyylirakennetta ei ole vielä selvitetty, mutta se muistuttaa todennäköisesti 4-keto-myksoksantofylliä. 4-keto-myksoksantofyllin kaltaisen pigmentin absorbanssispektri on samanlainen kuin 4-keto-myksoksantofyllillä, mutta HPLC-analyysissä niiden retentioajat poikkeavat toisistaan (Piippola & Kononen 1995, Schlüter ym. 2004). *N. spugimenan* muodostaman myrkyllisen nodulariinin ja 4-keto-myksoksantofyllin kaltaisen pigmentin pitoisuuden välillä on havaittu positiivinen korrelaatio, jonka perusteella 4-keto-myksoksantofyllin kaltaisen pigmentin uskotaan liittyvän nodulariinin tuotantoon (Schlüter ym. 2004).

2.5 Orgaanisen aineen määritys sedimentistä

Sedimentin orgaanisen aineen määrittämiseksi selvitettiin sedimentin kuivapaino ja hehkutushäviö (Loss On Ignition: LOI). Orgaanisen aineen pitoisuutta käytettiin apuna sedimentin ajoituksessa. Lahdessa sijaitsevan Niemen sataman pohjaa ruopattiin laajalta alalta talvella 1990-1991, jolloin

savea ja muuta epäorgaanista ainesta lähti runsaasti liikkeelle. Tämän ansiosta Vesijärven Enonselän sedimentistä voidaan ajoittaa vuosi 1991, sillä tällöin orgaanisen aineen pitoisuus jäi pienemmäksi kuin muina vuosina.

Hehkutushäviön selvittämiseksi tyhjiä posliiniupokkaita hehkutettiin yksi tunti 550°C lämpötilassa, minkä jälkeen ne jäähdytettiin eksikaattorissa. Upokkaisiin punnittiin homogenisoitua kylmäkuivattua sedimenttiä, minkä jälkeen niitä kuivattiin uunissa kahden tunnin ajan (105 °C). Lopuksi upokkaita hehkutettiin muhveliuunissa kaksi tuntia (550°C). Upokkaat punnittiin jokaisen työvaiheen välissä analysivaa'alla 0,001 g tarkkuudella.

Hehkutushäviö laskettiin seuraavan yhtälön avulla (Håkanson & Jansson 1983):

$$LOI_{550} = ((DW_{105}-DW_{550})/DW_{105})*100,$$

jossa DW_{105} on sedimentin massa kuivatuksen jälkeen ja DW_{550} on sedimentin massa hehkutuksen jälkeen. Keskihajonta laskettiin kolmen rinnakkaisen näytteen tuloksen perusteella.

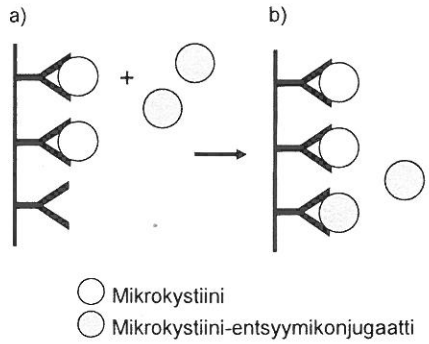
2.6 Mikrokystiinianalyysi

Vesijärven sedimentin mikrokystiinipitoisuuden määrittämisessä käytettiin kompetetiivista ELISA-menetelmää (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Analyysissä käytettiin EnviroLogix™ EP022-kuoppalevykittiä (96-kuoppainen), jolla voidaan mitata mikrokystiinipitoisuuksia kitin toiminta-alueella (0,16-2,5 µg mikrokystiini-LR:ää/litra). EnviroLogix™ EP022-kuoppalevykitinin kuopat on pinnoitettu mikrokystiini- ja nodulariinispesifisillä vasta-aineilla.

Sedimenttinäytteet esikäsiteltiin ennen ELISA-mittausta. Kustakin kylmäkuivatusta sedimenttikerroksesta punnittiin tarkasti noin 1 g jauhettua sedimenttiä, jonka jälkeen lisättiin 5 ml 75 % metanolia. Näytettä sonikoitiin

ultraäänihauteessa (15 minuuttia), sentrifugoitiin kymmenen minuutin ajan (3362 rfc) ja otettiin uutos talteen. Näytteen sonikointi, sentrifugointi ja uutoksen talteenotto toistettiin kolmesti, jonka jälkeen uutoksen lopullinen määrä mitattiin. Näytteet haihdutettiin pyöröhaihduttimella alle 5 ml:ksi, minkä jälkeen näytteet haihdutettiin kuiviin hiekkahauteessa (60 °C). Näyte liuotettiin uudelleen 800 µl:lla 75 % metanolia ja sonikoitiin ultraäänihauteessa (5 min). Lopuksi näytteet suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimen (GHP) läpi. Näytteitä laimennettiin ennen ELISA-mittausta ionivaihdetulla vedellä 1:10, 1:100 tai 1:1000.

Näytteet, kontrollinäytteet (negatiivinen kontrolli) ja mikrokystiinistandardit pipetoitiin tyhjälle kuoppalevylle, jonka jälkeen kuoppalevylle lisättiin monikanavapipetillä laimennin liuos. Laimennetut näytteet ja standardit siirrettiin kuoppalevyltä monikanavapipetillä EP 022-kuoppalevykitille, jolloin mikrokystiinit kiinnittyivät kuoppalevyn vasta-aineisiin (kuva 8a). Tämän jälkeen monikanavapipetillä lisättiin kuoppalevykitille piparjuuriperoksidaasi-entsyymillä leimattua mikrokystiiniä (mikrokystiini-entsyymikonjugaatti), joka kiinnittyi vapaisiin vasta-aineisiin (kuva 8b). Jotta vasta-aineisiin sitoutumattomat mikrokystiini-entsyymikonjugaatit saatiin pois, kuoppalevykitti ravisteltiin tyhjäksi ja huuhdeltiin pesuliuoksella (TWEEN). Pesun jälkeen kuoppalevykitille lisättiin monikanavapipetillä substraatti, joka reagoi mikrokystiini-entsyymikonjugaatin piparjuuriperoksidaasientsyymin kanssa ja muodosti keltaisen värin. Tämän jälkeen EP 022-kuoppalevykitille lisättiin monikanavapipetillä pysäytinliuos, jolloin keltainen väri muuttui siniseksi. Näytteen sisältämän mikrokystiinin pitoisuus oli käänteisesti verrannollinen muodostuneen värin voimakkuuteen. Kuopissa olevien liuosten absorbanssi mitattiin Bio-Rad–lukulaitteella. Sedimenttinäytteiden uutelaimennoksista mitattiin kolme rinnakkaista mittaustulosta, joiden perusteella laskettiin näytteiden mikrokystiinipitoisuus.



Kuva 8. Näytteen sisältämät mikrokystiinit sitoutuvat EnviroLogix™ EP 022-kuoppalevykitin vasta-aineisiin (a). Kun kuoppalevykitille lisätään mikrokystiini-entsyymikonjugaattiliuosta, mikrokystiini-entsyymikonjugaatit sitoutuvat vapaina oleviin vasta-aineisiin (b).

3. *Tulokset*

3.1 *Sedimenttinäytteen ajoitus*

3.1.1 *Lustoajoitus*

Vesijärven Enonselän syvänteestä otetun sedimenttinäytteen ajoituksessa käytettiin lustoajoitusmenetelmää. FM Mikko Liukkosen tekemän lustoajoituksen perusteella sedimenttinäyte yltää vuoteen 1976 asti (taulukko 4, liite 1). Lustoajoituksessa käytettiin Vesijärven Enonselän kasviplanktonpigmenttien tutkimuksessa käytetyn sedimenttinäytteen rinnakkaisnäytettä.

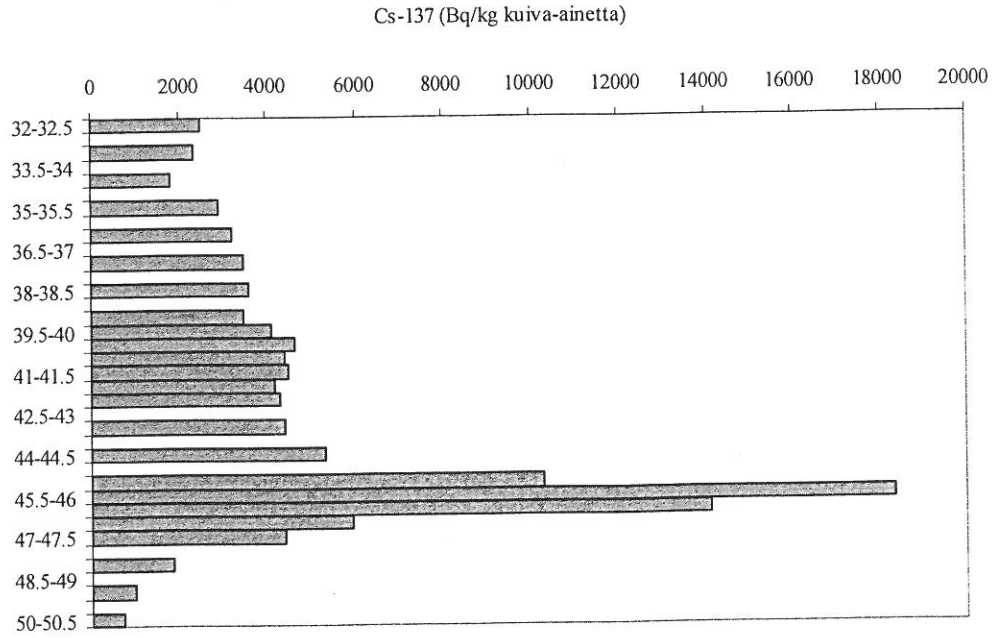
Taulukko 4. Vesijärven Enonselän sedimenttinäyte ajoitettiin lustoajoitusmenetelmällä. Taulukkoon on merkitty luston etäisyys (syvyys) sedimenttinäytteen pinnasta ja sitä vastaava vuosi.

Vuosi	Syvyys (cm)	Vuosi	Syvyys (cm)	Vuosi	Syvyys (cm)
2005	4,5	1994	26,5	1983	51
2004	7	1993	27,5	1982	53
2003	9	1992	28,5	1981	54,5
2002	10,5	1991	30	1980	57
2001	12	1990	34,5	1979	58,5
2000	14	1989	37	1978	60,5
1999	16	1988	39	1977	63
1998	17,5	1987	41,5	1976	66
1997	19,5	1986	43		
1996	22	1985	46		
1995	24,5	1984	48,5		

3.1.2 *Cesium-137 -ajoitus*

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteessä cesium-137 -pitoisuus oli selkeästi suurempi 45,0-46,5 cm syvyydellä kuin muualla sedimenttinäytteessä (kuva 9). Cesium-137 -pitoisuus oli suurin 45,5-46,0 cm syvyydellä (18,4 kBq/kg kuiva-ainetta), minkä perusteella vuonna 1986 sedimentoituneen aineksen voitiin päätellä olevan sedimenttinäytteessä tällä syvyydellä. Tämän perusteella

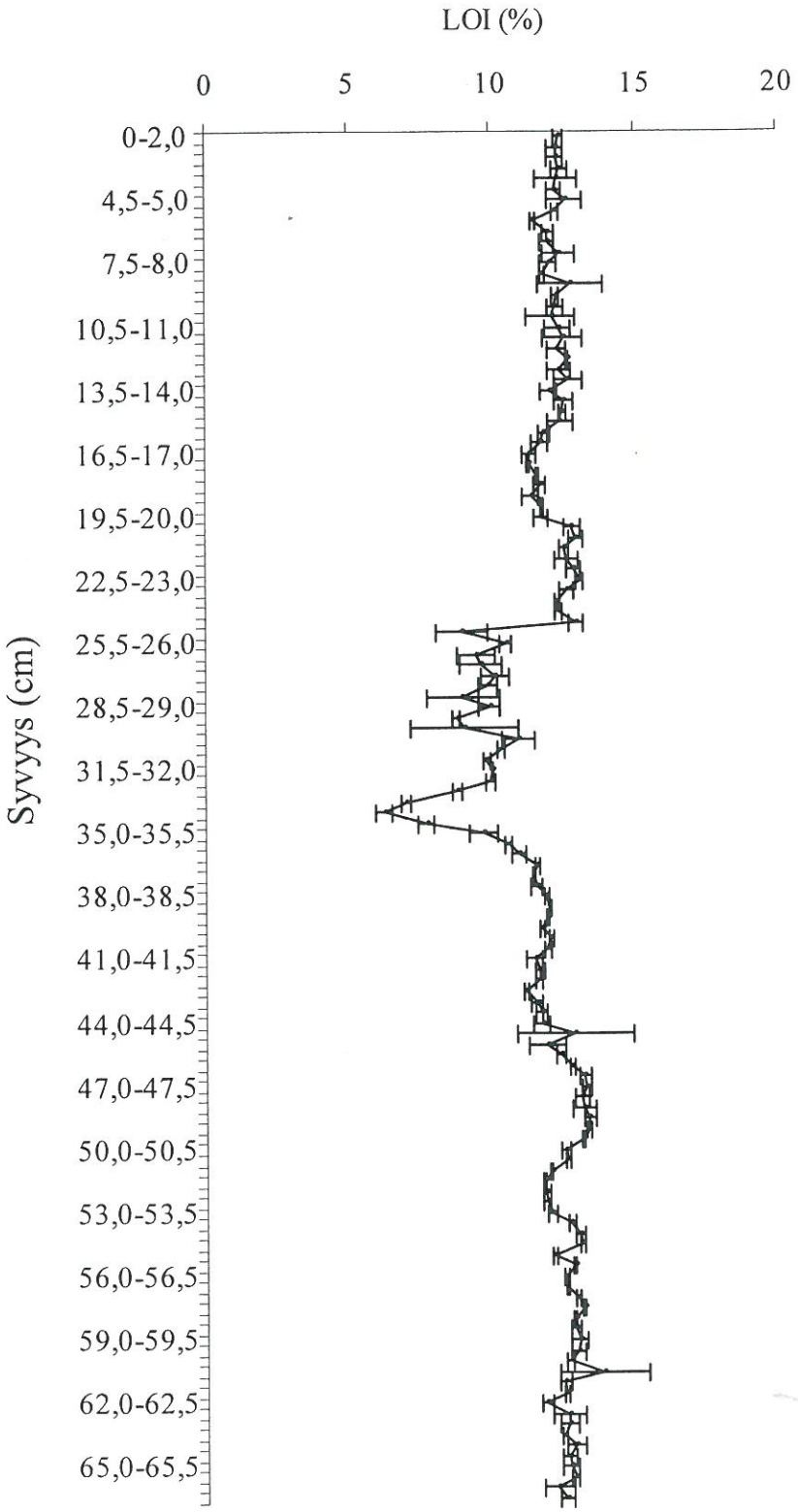
laskettiin keskimääräinen sedimentoitumisnopeus, joka on ollut Vesijärven Enonselällä 2,3 cm vuodessa vuosien 1986-2006 välillä.



Kuva 9. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen cesium-137-pitoisuudet 32-50,5 cm syvyydellä.

3.1.3 Orgaanisen aineen määrä

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteessä hehkutushäviö (LOI) vaihteli 9,0-13,4 prosentin välillä (kuva 10). Orgaanisen aineen määrä sedimenttinäytteessä oli pienin 34,0-35,5 cm syvyydellä, jossa hehkutushäviö oli alle yhdeksän prosenttia. Tällä syvyydellä näytteessä oli havaittavissa saviraita, joka on muodostunut sedimenttiin Niemen sataman ruoppauksen seurauksena talvella 1990-1991 (Liukkonen ym. 1997).



Kuva 10. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen hehkutushäviö (LOI).

LAHDEN TIEDEKIRJASTO
Lahti Science Library

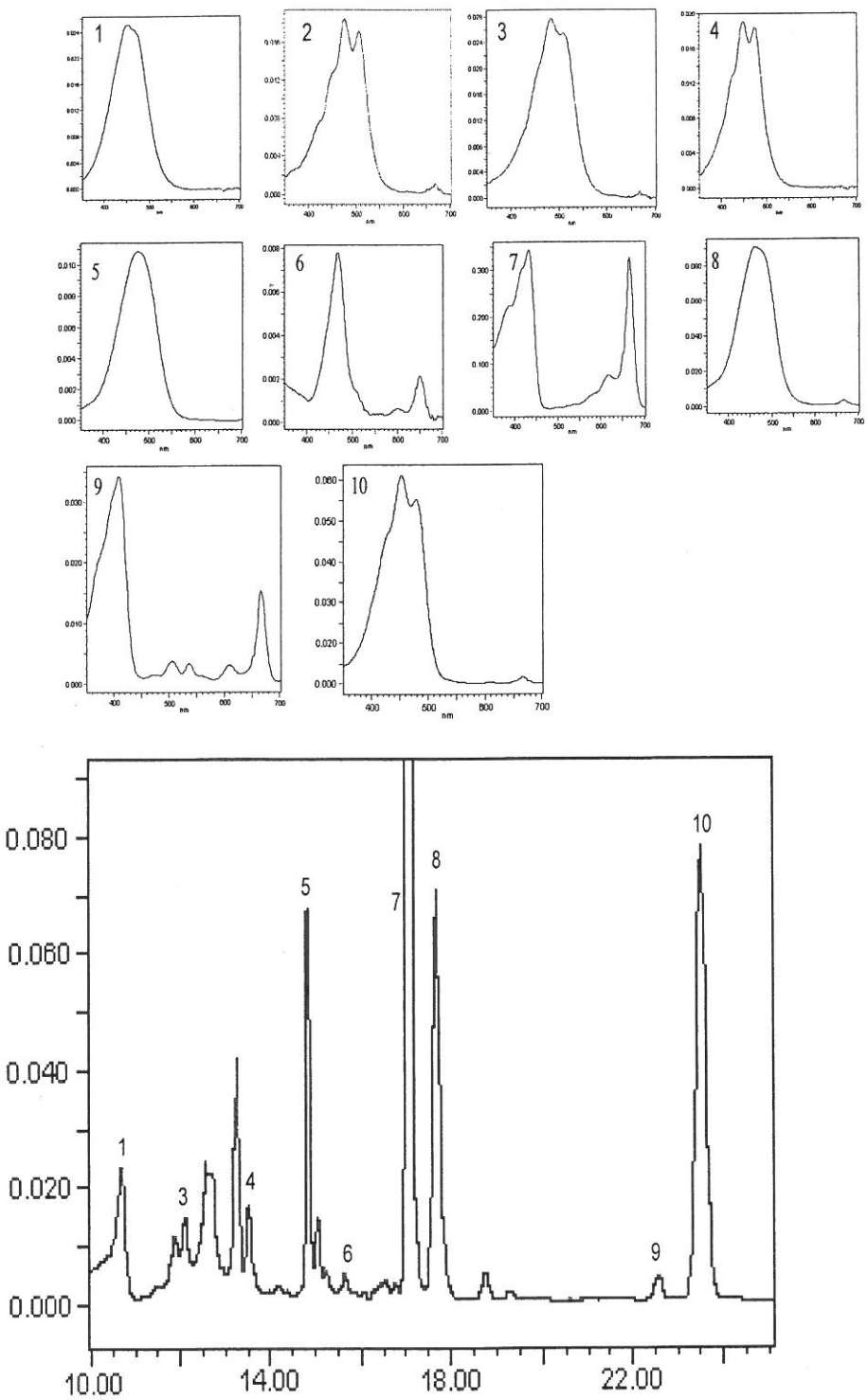
3.2 Esikäsittelymenetelmien vertailututkimus

3.2.1 Vertailututkimuksessa määritetyt pigmentit

Merentutkimuslaitoksen HPLC-laitteelle sopivaksi modifioidulla pigmenttianalyysimenetelmällä pystyttiin määrittämään kaksitoista pigmenttiä (taulukko 5). Vertailututkimuksessa, jossa selvitettiin pigmenttinäytteiden esikäsittelymenetelmän tehokkuutta, pyrittiin näytteistä määrittämään kyseiset pigmentit. Näytteistä analysoidut pigmentit on esitetty taulukossa 5. Kuvassa 11 on esimerkki kasviplanktonnäytteen kromatogrammista sekä näytteestä analysoitujen pigmenttien absorbanssispekrit.

Taulukko 5. Esikäsittelymenetelmien vertailututkimuksessa näytteenä oli Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen sedimenttiä syvyydeltä 65,5-66,0 cm (A) ja 31,0-31,5 cm (B) sekä Itämereltä vuonna 2003 (C) ja 2006 (D) kerättyä kasviplanktonia. Taulukossa on esitetty näytteissä havaitut pigmentit.

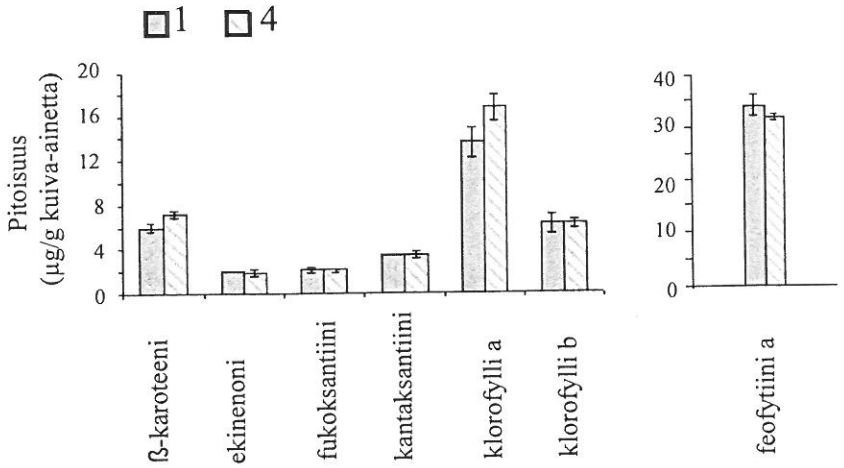
	A	B	C	D
4-keto-myksoksantofyllin kaltainen			x	
Alloksantiini				
Aphanizofylli			x	
Beta-karoteeni	x	x	x	x
Ekinenoni	x	x	x	x
Feofytiini a	x	x	x	x
Fukoksantiini	x	x	x	x
Kantaksantiini	x	x	x	x
Klorofylli a	x	x	x	x
Klorofylli b	x	x	x	x
Luteiini			x	x
Violaksantiini				



Kuva 11. Vuonna 2003 Itämereltä kerätyn kasviplanktonnäytteen kromatogrammi (alhaalla) sekä siitä analysoitujen pigmenttien spektrit (ylhäällä). 1) fukoksantiini, 2) afanitsofylli, 3) 4-keto-myksoksantofyllin kaltainen pigmentti, 4) luteiini, 5) kantaksantiini, 6) klorofylli b, 7) klorofylli a, 8) ekinenoni, 9) feofytiini a ja 10) ß-karoteeni.

3.2.2 *Uuttoliuottimen tehokkuus: asetoni ja etanoli*

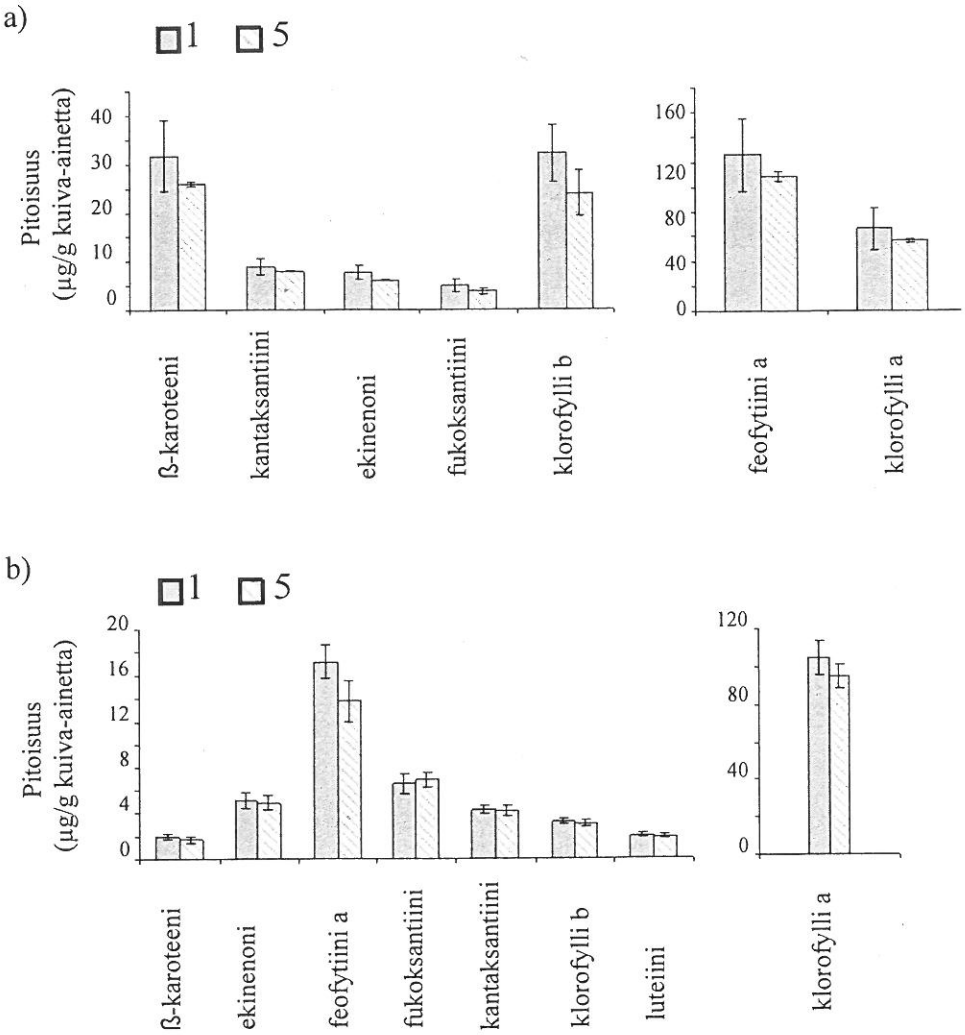
Etanolilla uutetuissa sedimenttinäytteissä klorofylli a- ja ß-karoteeni -pitoisuudet olivat merkittävästi suurempia kuin asetonilla uutetuissa (kuva 12). Muiden näytteistä analysoitujen pigmenttien pitoisuuksissa ei havaittu merkittäviä eroja uuttoliuottimien välillä.



Kuva 12. Uuttoliuottimen (1) asetoni 4) etanoli) vaikutus pigmenttien uuttumiseen sedimentistä (sedimentti 31,0-31,5 cm). 1 = asetoni, 4 = etanoli (katso taulukko 3).

3.2.3 *Sonikaattorin tehokkuus: allas- ja kärkisonikaattori*

Allassonikaattorissa sonikoitujen sedimenttinäytteiden pigmenttipitoisuudet olivat hieman korkeammat kuin kärkisonikaattorilla sonikoiduissa sedimenttinäytteissä (kuva 13 a). Pigmenttipitoisuuksien ero ei kuitenkaan ollut merkittävä. Myöskään kasviplanktonnäytteiden pigmenttipitoisuuksissa ei allas- ja kärkisonikoinnin välillä havaittu merkittävää eroa (kuva 13 b).

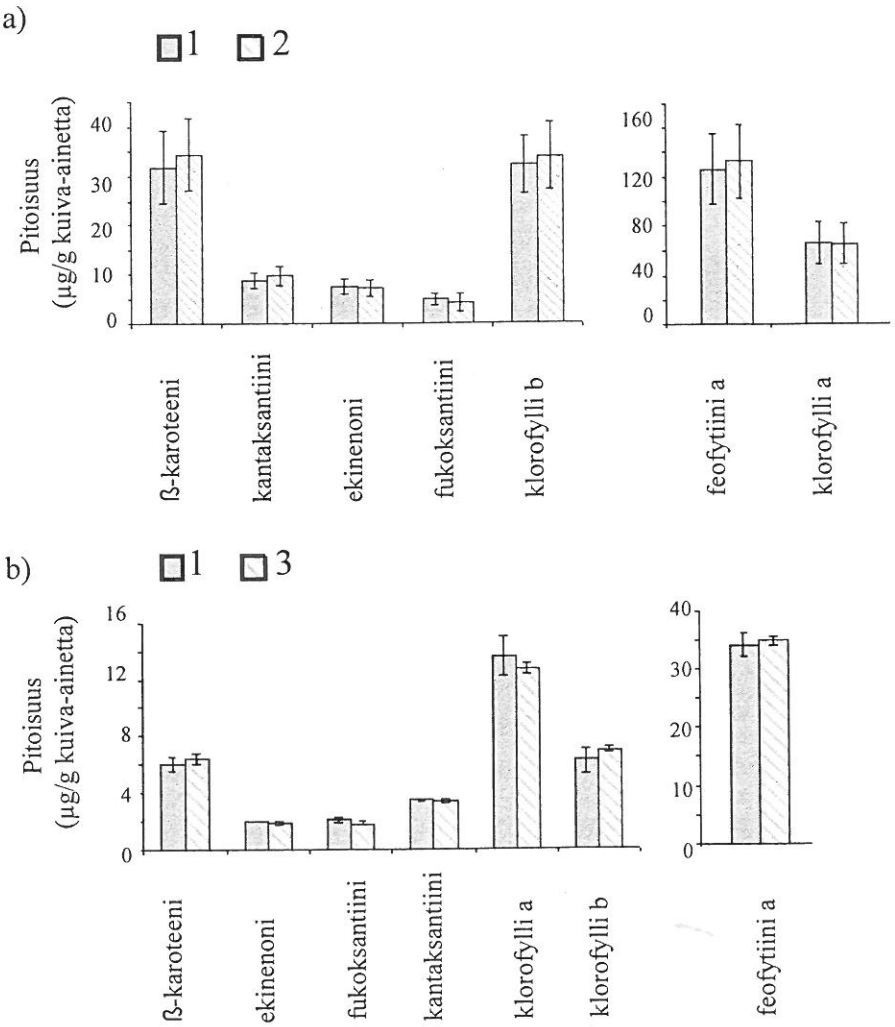


Kuva 13. Allas- (1) ja kärkisonikoitujen (5) näytteiden pigmenttipitoisuudet. Kuvan a pigmenttipitoisuudet on mitattu Vesijärven Enonselän sedimentistä (syvyys 65,5-66,0 cm) ja kuvan b vuoden 2006 kasviplanktonnäytteestä.

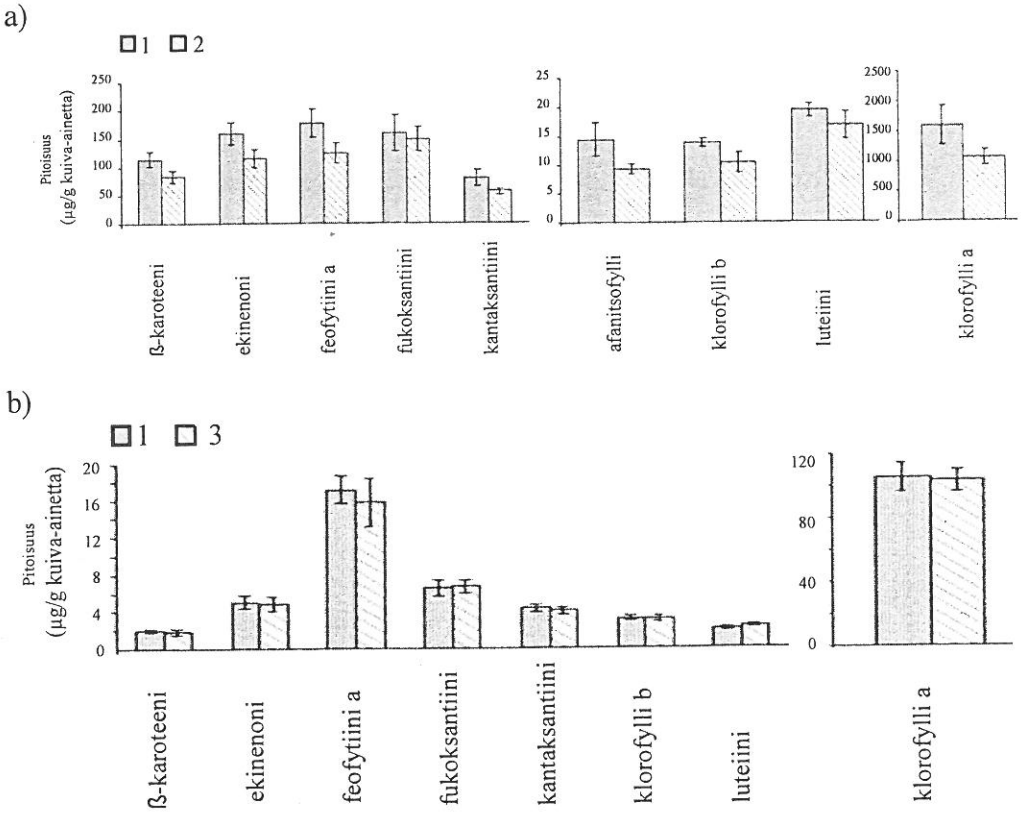
3.3.4 Allassonikoinnin lämpötila: Sonikointi 0 °C:ssa ja 21 °C:ssa

Valituissa lämpötiloissa (0 °C ja 21 °C) sonikoitujen sedimenttinäytteiden pigmenttipitoisuuksissa ei havaittu merkittävää eroa (kuva 14 a). Koska molekyylit uuttuvat alhaisemmassa lämpötilassa heikommin kuin korkeammassa lämpötilassa, 0 °C:ssa sonikoitujen näytteiden sonikointiaikaa pidennettiin 120 minuuttiin. Sonikointiajan pidennyksestä huolimatta sedimenttinäytteiden pigmenttipitoisuudet eivät olleet 0 °C:ssa sonikoiduissa näytteissä merkittävästi suuremmat kuin 21 °C:ssa (15 minuuttia) sonikoiduissa

näytteissäkään (kuva 14 b). Toisin kuin sedimenttinäytteiden kohdalla, allassonikoinnin lämpötilan havaittiin vaikuttavan kasviplanktonnäytteiden pigmenttipitoisuuksiin. Kun kasviplanktonnäytteitä sonikoitiin allassonikaattorissa 15 minuutin ajan, pigmenttipitoisuudet olivat 21 °C:ssa sonikoiduissa näytteissä suuremmat kuin 0 °C:ssa sonikoiduissa (kuva 15 a). Kun sonikointiaikaa 0 °C:ssa pidennettiin 120 minuuttiin, kasviplanktonnäytteiden pigmenttipitoisuuksissa ei havaittu merkittävää eroa 21 °C:ssa (15 minuuttia) sonikoitujen kasviplanktonnäytteiden pigmenttipitoisuuksiin (kuva 15 b).



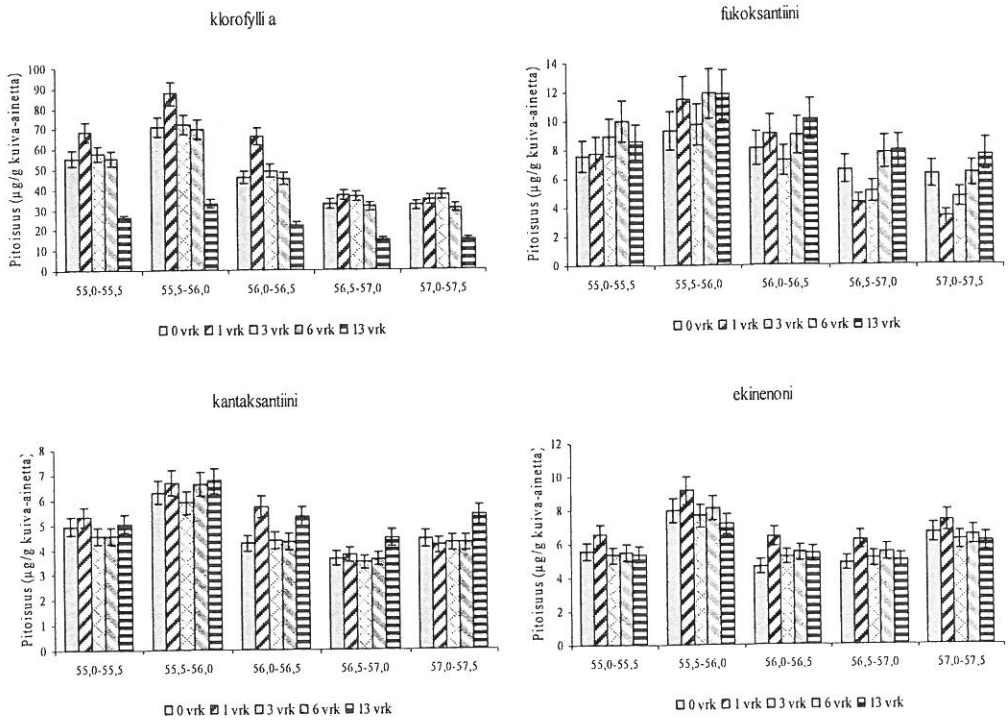
Kuva 14. Lämpötilan vaikutus pigmenttien uuttumiseen Vesijärven Enonselän sedimentistä. Sedimenttinäytettä 65,5-66,0 cm (kuva a) on sonikoitu allassonikaattorissa 1) 21 °C:ssa 15 minuuttia 2) 0 °C:ssa 15 minuuttia ja sedimenttinäytettä 31,0-31,5 cm (kuva b) 1) 21 °C :ssa 15 minuuttia 3) 0 °C :ssa 120 minuuttia.



Kuva 15. Lämpötilan vaikutus pigmenttien uuttumiseen kasviplanktonnäytteestä. Vuoden 2003 (kuva a) kasviplanktonnäytettä on sonikoitu allassonikaattorissa 1) 21 °C:ssa 15 minuuttia 2) 0 °C:ssa 15 minuuttia ja vuoden 2006 kasviplanktonnäytettä (kuva b) 1) 21 °C:ssa 15 minuuttia 3) 0 °C:ssa 120 minuuttia.

3.4 Uuttoliuosten säilytys

Uuttoliuoksen säilytyksen ei havaittu vaikuttavan merkittävästi fukoksantiinin, kantaksantiinin tai ekinenonin pitoisuuteen (kuva 16). Sen sijaan klorofylli a:n pitoisuus oli kolmentoista vuorokauden jälkeen merkittävästi vähentynyt.



Kuva 16. Säilytysajan vaikutus uuttoliuosten pigmenttipitoisuuksiin. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteestä mitattiin ekinenoni-, fukoksantiini-, kantaksantiini- ja klorofylli a-pitoisuus 55,0-55,5 cm, 55,5-56,0 cm, 56,0-56,6 cm, 56,5-57,0 cm ja 57,0-57,5 cm syvyydestä 0, 1, 3, 6 ja 13 vuorokautta esikäsittelyn jälkeen.

3.5 Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuus

Menetelmän toistettavuuden keskihajontaprosentit olivat pieniä (< 15 %). Myös mittalaitteen toistettavuuden keskihajontaprosentit olivat pieniä (< 7 %) lukuun ottamatta fukoksantiinia, jonka keskihajontaprosentti oli 17,8. Menetelmän ja mittalaitteen toistettavuustulokset on esitetty taulukossa 6.

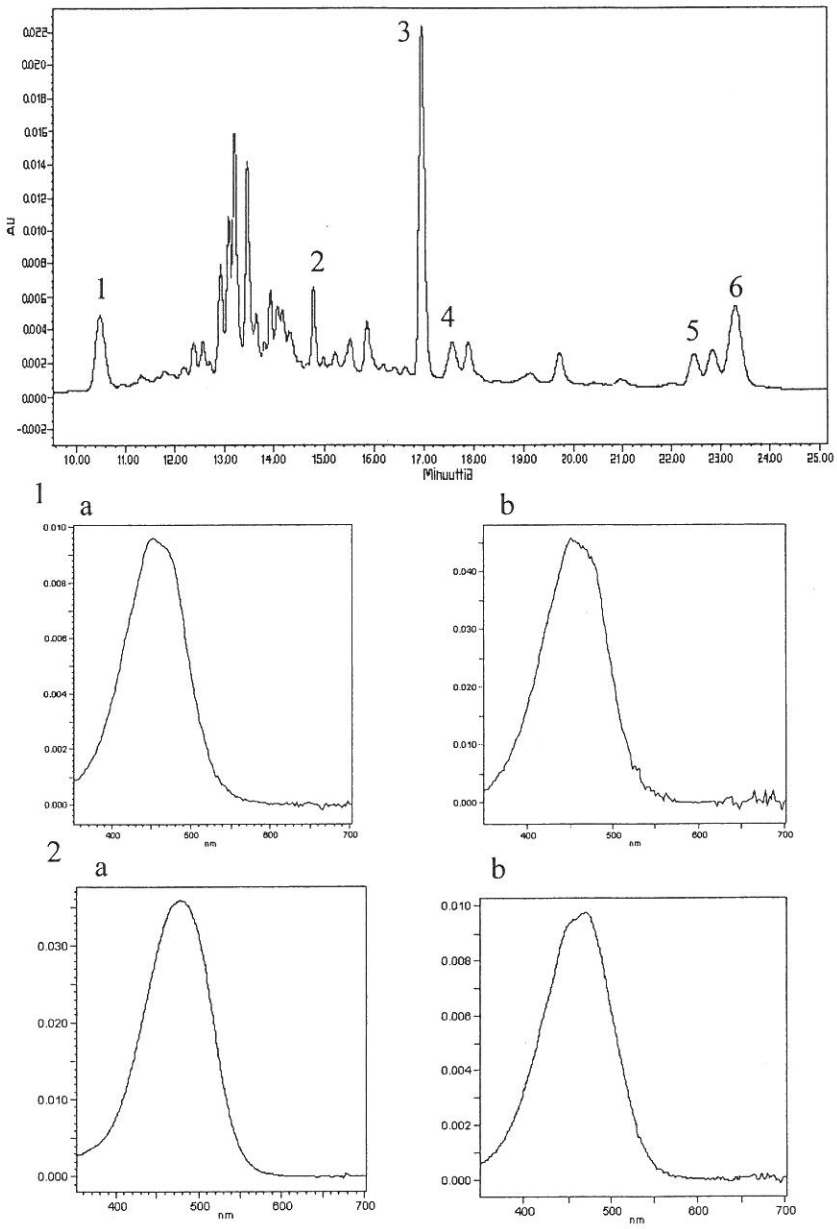
Taulukko 6. Menetelmän (1) ja mittalaitteen (2) toistettavuus (%). Pigmenttipitoisuuksien keskiarvot ovat µg/g kuiva-ainetta.

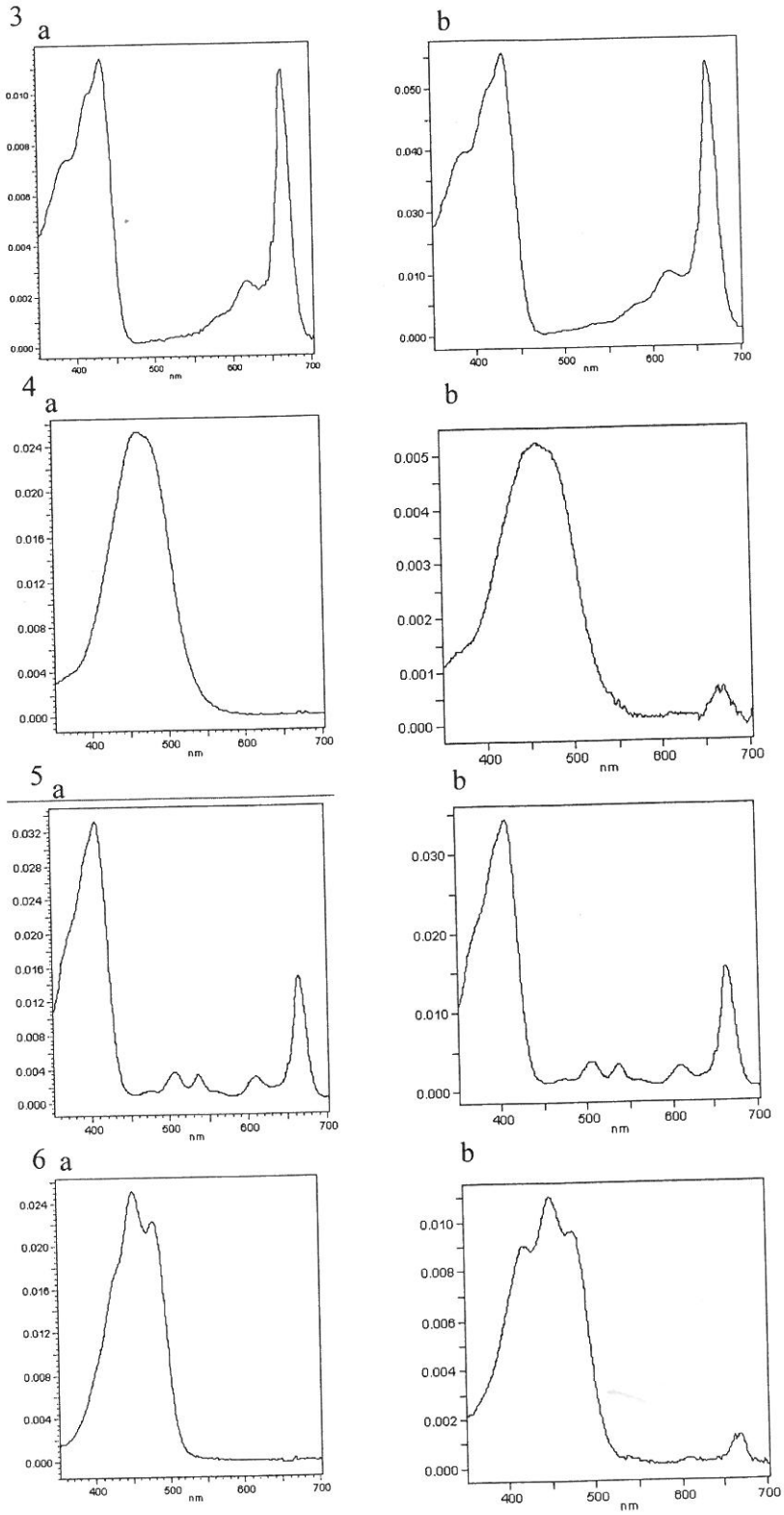
	beta-karoteeni	ekinenoni	feofytiini a	fukoksantiini	kantaksantiini	klorofylli a
1)						
Keskiarvo	7.6	2.0	38.9	5.4	4.1	30.3
Keskihajonta%	8.7	12.9	6.6	14.3	7.4	2.9
2)						
Keskiarvo	7.7	2.1	41.4	5.1	4.1	31.1
Keskihajonta%	5.5	5.5	4.7	17.8	6.5	2.2

3.6 Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen analyysit

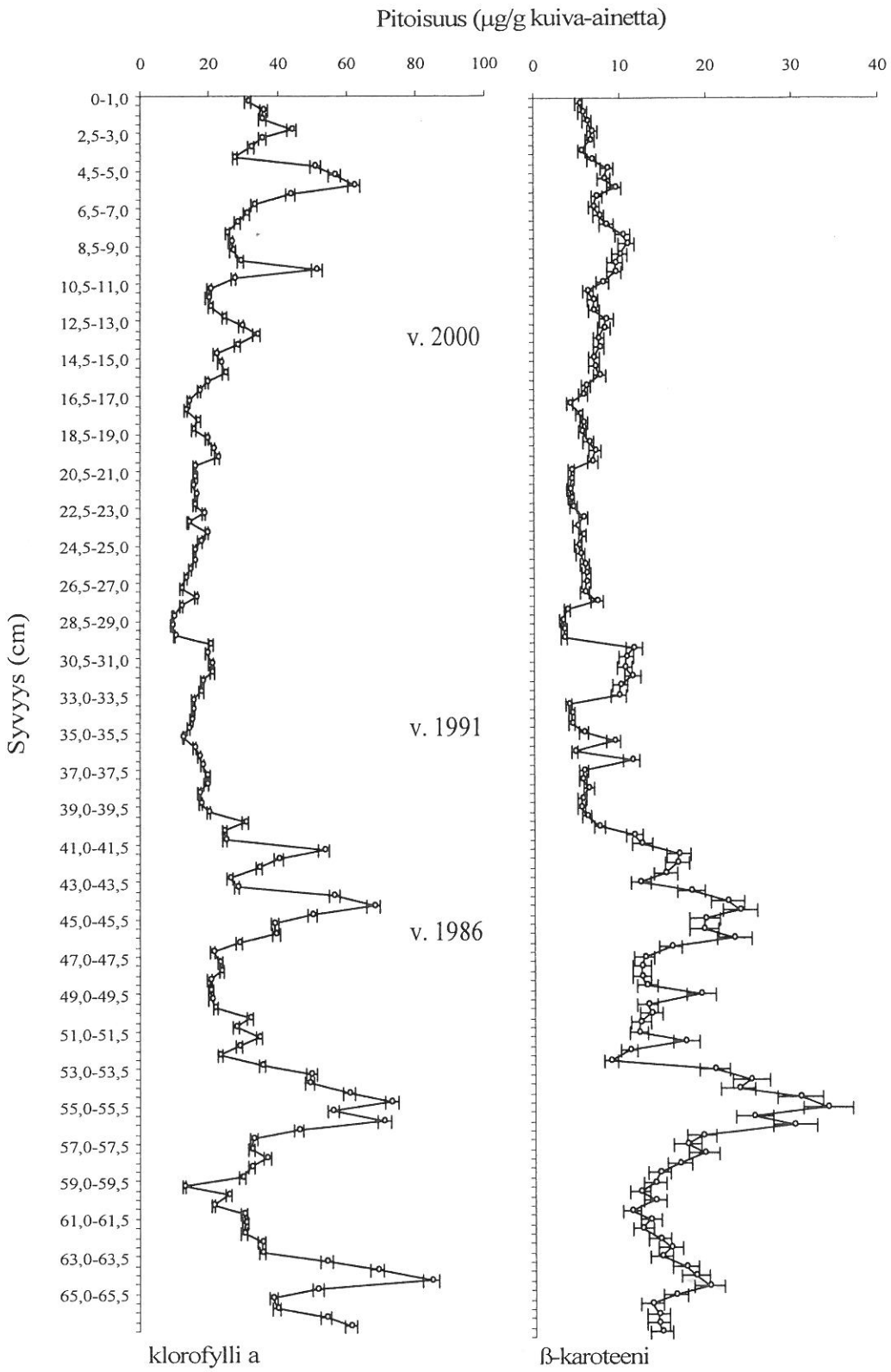
3.6.1 Pigmenttianalyysi

Vesijärven sedimenttinäytteestä analysoitiin HPLC-menetelmällä kuusi pigmenttiä: fukoksantiini, kantaksantiini, klorofylli a, ekinenoni, feofytiini a ja ß-karoteeni. Kuvassa 17 on esitetty esimerkki sedimenttinäytteen kromatogrammista sekä pigmenttistandardien ja näytteestä analysoitujen pigmenttien absorbanssispektrit. Sedimenttinäytteen pigmenttipitoisuus on esitetty kuvissa 18 ja 19.

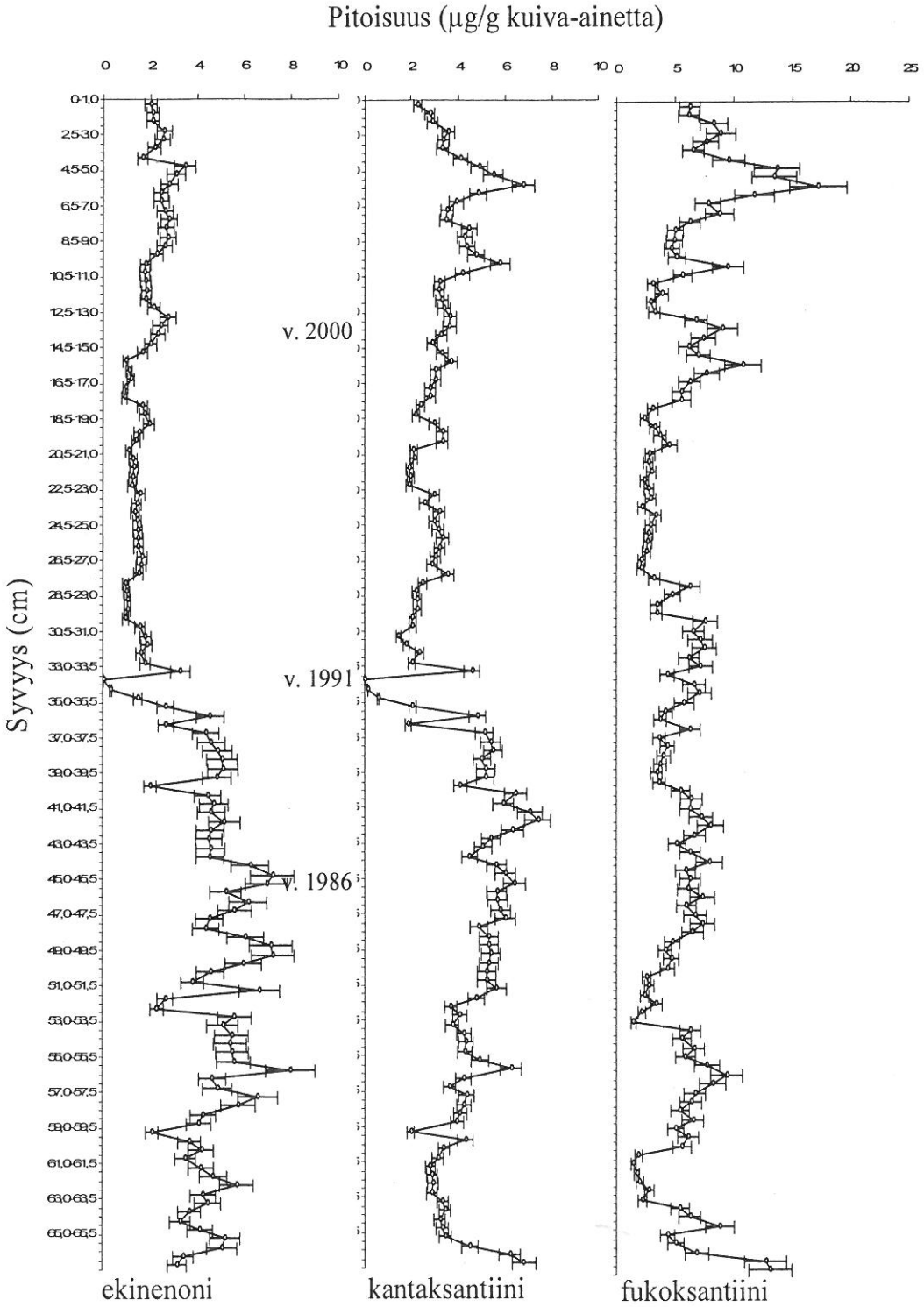




Kuva 17. Sedimenttinäytteen (3,5-4 cm) kromatogrammi (ylhäällä) sekä analyyttien (a) ja pigmenttistandardien (b) spektrit (alhaalla). Sedimenttinäytteestä analysoitiin kuusi pigmenttiä: 1) fukoksantiini 2) kantaksantiini 3) klorofylli a 4) ekinenoni 5) feofytiini a 6) ß-karoteeni.

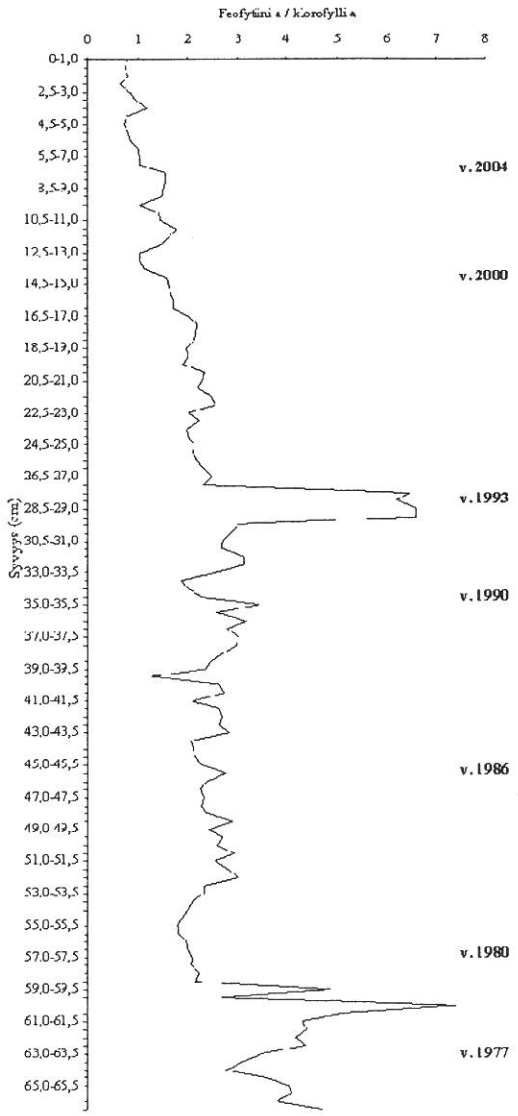


Kuva 18. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen klorofylli a- ja β-karoteenipitoisuus (µg/g kuiva-ainetta). Keskihajonta on laskettu menetelmän toistettavuus tulosten perusteella (katso taulukko 5).



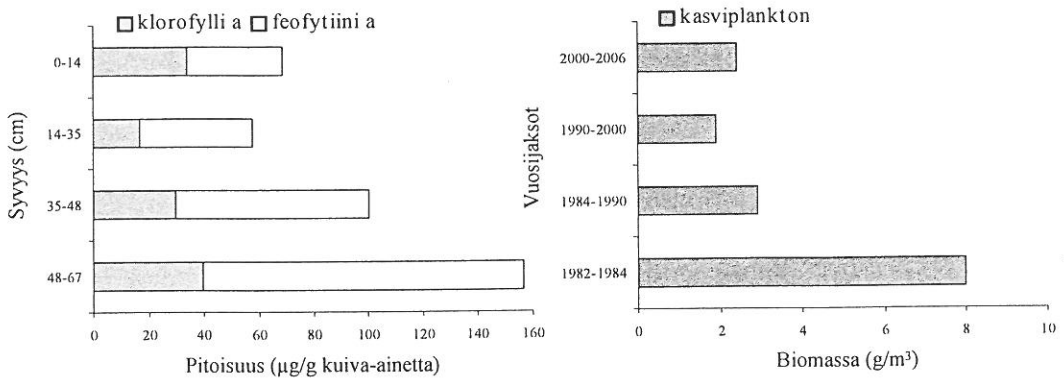
Kuva 19. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen ekinenoni-, kantaksantiini- ja fukoksantiinipitoisuus (µg/g kuiva-ainetta). Keskihajonta on laskettu menetelmän toistettavuustulosten perusteella (katso taulukko 5).

Pigmenttien hajoaminen sedimentissä voidaan todeta feofytiini a:n ja klorofylli a:n pitoisuuksien suhteen perusteella, sillä feofytiini a on klorofylli a:n hajoamistuote. Mitä pienempi suhdeluku on, sitä vähemmän klorofylli a:ta on hajonnut ja päinvastoin. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteessä feofytiini a:n ja klorofylli a:n suhdeluku oli pieni (< 8). Suhdeluku on pienimmillään (< 2) näytteen yläosassa ja se kasvaa näytteen alaosaa kohti (kuva 20). Suhdeluku kasvaa melko tasaisesti, mutta linjassa on havaittavissa poikkeama syvyyksissä 27-30 cm ja 59-64 cm. Näillä syvyyksillä suhdeluku on poikkeuksellisen korkea.

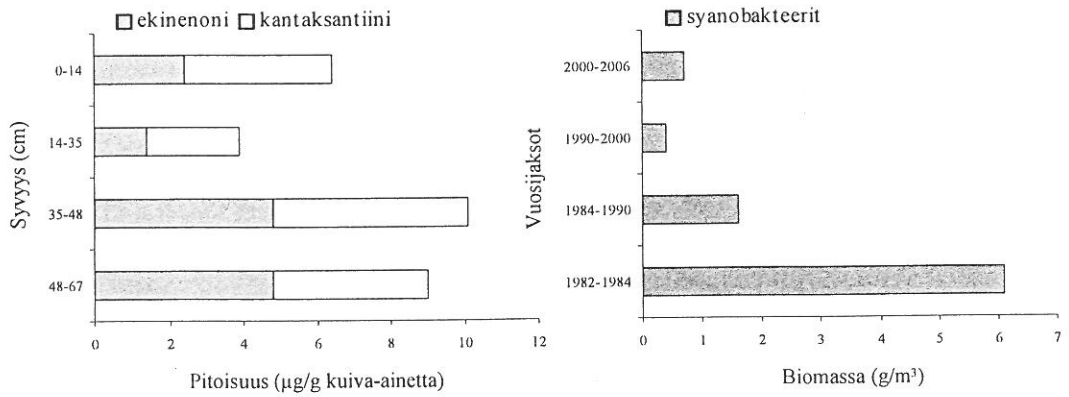


Kuva 20. Feofytiini a ja klorofylli a pitoisuuksien suhde Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteessä.

Jotta pigmenttianalyysituloksia voitaisiin verrata kasviplanktonin runsauden muutoksiin, laskettiin sedimenttinäytteestä kaikissa leväryhmissä (taulukko 1) esiintyvän pigmentin, klorofylli a:n, ja sen hajoamistuotteen, feofytiini a:n, pitoisuuksien keskiarvot syvyyksistä 0-14 cm , 14-35 cm, 35-48 cm ja 48-67 cm (kuva 21). Lustoajoituksen perusteella nämä vastaavat ajanjaksoja 2000-2006, 1990-2000, 1984-1990 ja 1976-1984. Näiltä syvyyksiltä laskettiin myös syanobakateereille tyypillisten pigmenttien, ekineonin ja kantaksantiinin, pitoisuuksien keskiarvot (kuva 22), jotta sedimenttinäytteen pigmenttianalyysituloksia voitaisiin verrata syanobakteerien biomassan muutoksiin.



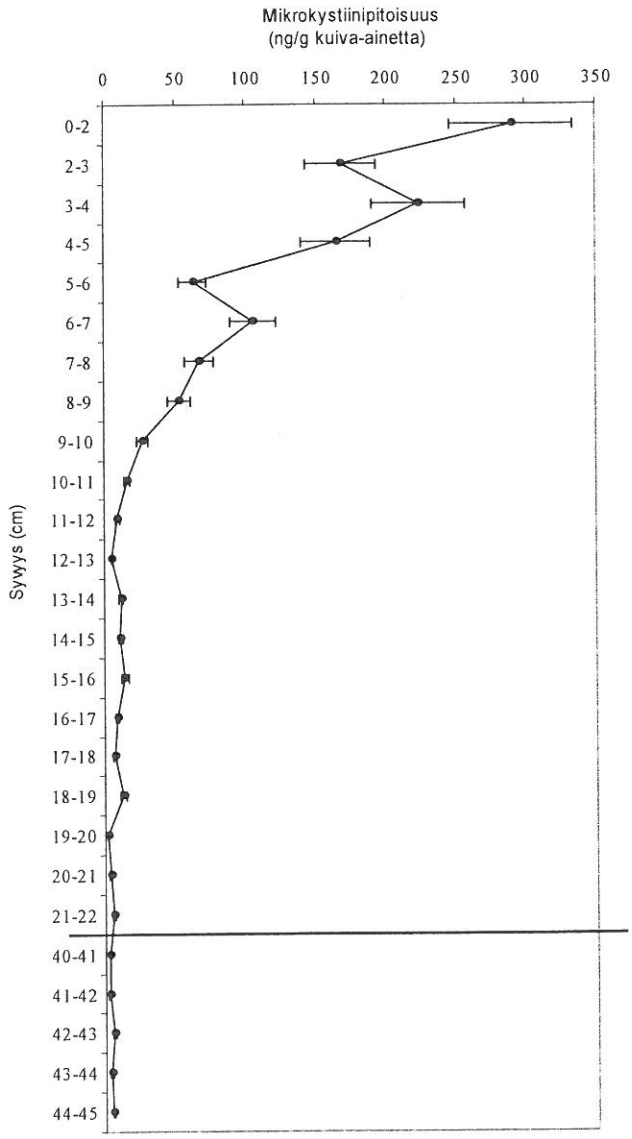
Kuva 21. Klorofylli a:n ja feofytiini a:n pitoisuuksien keskiarvo sedimenttinäytteessä eri syvyyksissä sekä kasviplanktonin biomassan keskiarvo Vesijärven Enonselällä eri vuosijaksoina.



Kuva 22. Ekinenonin ja kantaksantiinin pitoisuuksien keskiarvo sedimenttinäytteessä eri syvyyksissä sekä syanobakteerien biomassan keskiarvo Vesijärven Enonselällä vastaavina vuosijaksoina, kuin kuvassa 21.

3.6.2 Mikrokystiinianalyysi

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteestä määritettiin mikrokystiinipitoisuus 0-22 cm ja 40-45 cm syvyyksissä (kuva 23). Mikrokystiinipitoisuus oli suurin (290 ng/g) sedimentin pintakerroksessa ja se pieneni sedimenttinäytteessä syvemmälle mentäessä. Yli kymmenen senttimetrin syvyydessä mikrokystiinipitoisuus oli alle 20 ng/g.



Kuva 23. Vesijärven Enonselän sedimentistä mitattiin mikrokystiinipitoisuus 0-22 cm ja 40-45 cm syvyydeltä. Keskihajonta on ± 15 %.

4. Tulosten tarkastelu

4.1 Näytteiden esikäsittelymenetelmä

Vertailututkimuksessa asetonilla uutettujen näytteiden klorofylli a- ja β-karoteenipitoisuudet olivat merkittävästi pienemmät kuin etanolilla uutetuissa näytteissä (kuva 12). Muiden näytteistä analysoitujen pigmenttien kohdalla pitoisuuksissa ei ollut havaittavissa merkittävää eroa. Vertailututkimuksen tulosten perusteella etanoli näyttäisi olevan vähintäänkin yhtä tehokas liuotin kuin asetoni ja uuttavan näytteestä klorofylli a:n ja β-karoteenin jopa tehokkaammin kuin asetoni. Tämä tutkimuksen tulosten perusteella näyttäisi siltä, että sedimenttinäytteiden uutossa voitaisiin asetonin sijaan käyttää etanolia.

Sedimenttinäytteiden kohdalla allassonikoitujen näytteiden pigmenttipitoisuudet olivat hieman suuremmat kuin kärkisonikaattorilla sonikoitujen näytteiden (kuva 13 a), mutta tämä ero ei ollut merkittävä. Kasviplanktonin kohdalla allassonikaattorilla sonikoitujen ja kärkisonikaattorilla sonikoitujen näytteiden pigmenttipitoisuudet olivat samansuuruisia (kuva 13 b) lukuun ottamatta feofytiini a:ta. Allassonikaattorilla soinikoitujen kasviplanktonnäytteiden feofytiini a -pitoisuus oli merkittävästi korkeampi kuin kärkisonikaattorilla sonikoitujen näytteiden. Todennäköisesti tämä ei johtunut klorofylli a:n hajoamisesta allassonikoinnin aikana (feofytiini a on klorofylli a:n hajoamistuote), sillä myös klorofylli a:n pitoisuus allassonikoiduissa kasviplanktonnäytteissä oli suurempi kuin kärkisonikoiduissa näytteissä. Tutkimuksen tulosten perusteella allassonikaattorilla sonikointi näyttäisi olevan tehokas sonikointimenetelmä ja se soveltuu niin sedimentti- kuin kasviplanktonnäytteidenkin käsittelyyn.

Tutkimuksessa havaittiin, että allassonikoinnin lämpötila vaikutti erilailla pigmenttien uuttumiseen sedimentti- ja kasviplanktonnäytteissä. Lämpötilalla ei

ollut merkittävää vaikutusta pigmenttien uuttumiseen sedimenttinäytteestä, mutta kasviplanktonnäytteiden kohdalla tilanne oli toisenlainen. Pigmenttien uuttuminen kasviplanktonnäytteistä oli hitaampaa 0 °C:ssa kuin 21 °C:ssa. Kun kasviplanktonnäytteiden sonikointiaikaa pidennettiin 0 °C:ssa 15 minuutista 120 minuuttiin, pigmenttien uuttuminen näytteestä parani ja näytteiden pigmenttipitoisuudet eivät poikenneet merkittävästi 21 °C:ssa (15 minuuttia) sonikoitujen näytteiden pitoisuuksista. Tutkimuksen tulosten perusteella näyttäisi siis siltä, että kasviplanktonpigmenttinäytteitä voidaan allassonikoida 21 °C lämpötilassa (15 minuuttia).

4.2 Uuttoliuosten säilytys

Tutkimuksen tulosten perusteella kasviplanktonpigmenttien pitoisuudessa ei näyttäisi tapahtuvan merkittävää muutosta kuuden vuorokauden säilytyksen aikana (kuva 16). Tätä pidempää aikaa uuttoliuoksia ei tulisi säilyttää, sillä kolmentoista vuorokauden jälkeen joidenkin pigmenttien pitoisuus oli merkittävästi laskenut.

4.3 Mittalaitteen toistettavuus

Mittalaitteen toistettavuuden keskihajontaprosenttien tulisi olla pienempiä kuin menetelmän toistettavuuden. Tämä ei toteutunut fukoksantiinin kohdalla (taulukko 6), sillä menetelmän toistettavuus oli pienempi (14,3 %) kuin mittalaitteen toistettavuus (17,8 %). Tähän vaikutti todennäköisesti se, että fukoksantiinin kromatogrammipiikin muoto ei ollut kaikissa näyteajoissa hyvä. Ongelmaan ei löydetty syytä, sillä huonon mallinen piikki piirtyi kromatogrammiin satunnaisesti.

4.4 Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen ajoitus

Lustoajoitus tehtiin sedimenttinäytteestä, joka oli pigmenttianalyysissä käytetyn sedimenttinäytteen rinnakkaisnäyte. Rinnakkaisten näytteiden tulisi vastata toisiaan, mutta Vesijärven Enonselän rinnakkaisissa sedimenttinäytteissä oli havaittavissa pieniä eroja. Nämä erot sedimenttinäytteissä ovat voineet syntyä näytteenotossa, sillä käytetyllä menetelmällä ei voida varmistaa, että näytteenotin menee molemmilla näytteenottokerroilla täsmälleen samalla tavalla sedimenttiin. Eroa voi syntyä esimerkiksi jos näytteenotin uppoaa sedimenttiin hieman eri kallistuskulmassa. Tämän vuoksi rinnakkaisnäytteestä tehtyä lustoajoitusta tulosta voidaan pitää vain suuntaa antavana. Lustoajoituksen virhemarginaali on noin kahdesta kolmeen senttimetriin, jota vastaava ajanjakso on enintään puolitoista vuotta.

Tsernobylin onnettomuuden aiheuttama radioaktiivisten aineiden laskeumapiikki on selvästi havaittavissa Vesijärven Enonselän sedimentissä (kuva 9), minkä perusteella sedimenttinäytteestä voidaan määrittää tarkasti vuosi 1986. Kaikista järvisedimenteistä ei ole havaittavissa vuoden 1986 cesium-137 -maksimia yhtä selkeästi kuin Vesijärven Enonselän sedimentistä. Esimerkiksi Ilus & Saxén (2005) tutkivat kahdestatoista järvestä sedimentin cesium-137 -pitoisuutta, joista vain yhdessä järvessä, Kuoreveden Mäntänlahdella Mäntässä, oli havaittavissa vastaavanlainen sedimentin Cs-137 -profiili kuin Vesijärven Enonselällä. Muiden järvien sedimenteissä Cs-137 -pitoisuudet olivat hyvin pieniä tai suurin Cs-137 -pitoisuus oli sedimentin pintakerroksissa. Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteessä suurin cesium-137 -pitoisuus oli 45,5-46,0 cm syvyydessä, jossa se oli noin 18 kBq/kg kuiva-ainetta. Tämä on lähellä cesium-137 -pitoisuutta, jonka Ilus & Saxén (2005) havaitsivat Kuoreveden Mäntänlahden sedimentissä, jossa 25-26 cm syvyydessä Cs-137-pitoisuus oli noin 15 kBg/kg kuiva-ainetta. Se, että Vesijärven Enonselän sedimentissä on 45,5-46,0 cm kerroksen alapuolella havaittavissa cesium-137:a, voi johtua muun muassa cesiumin pystysuuntaisesta diffuusiosta sedimentissä (Ikäheimonen 2006).

4.5 Vesijärven Enonselän sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmenttien käytettävyys paleolimnologisessa tutkimuksessa

4.5.1 Kasviplanktonpigmenttien säilyminen sedimentissä

Kasviplanktonpigmenttien voi olettaa säilyneen hyvin Vesijärven Enonselän syvänteen sedimentissä, sillä sedimentin pinnalle ei pääse valoa. Lisäksi pohjanläheinen vesikerros on ajoittain hapeton. Alusveden ajoittaisesta hapettomuudesta johtuen sedimentissä on vähän pohjaeläimiä, jonka vuoksi pohjaeläinten aiheuttama bioturbaatio on vähäistä.

Sedimenttinäytteestä mitattujen pigmenttipitoisuuksien perusteella kasviplanktonpigmentit näyttävät säilyneen sedimentissä hyvin, sillä pigmenttien pitoisuus ei pienene syvyyden kasvaessa (kuva 18 ja 19). Pigmenttien säilymiseen sedimentissä viittaa myös se, että fukoksantiinia havaittiin koko sedimenttinäytteessä. Fukoksantiinia on useissa tutkimuksissa havaittu vain sedimentin pintakerroksissa (mm. Mc Gowan & Britton 1999, Poutanen & Nikkilä 2001), sillä se on melko herkästi hajoava pigmentti ja sitä sedimentoituu vain vähän.

Sedimenttinäytteen feofytiini a:n ja klorofylli a:n suhdeluvun perusteella voitiin kuitenkin havaita, että olosuhteet eivät ole olleet sedimentissä parhaat mahdolliset kasviplanktonpigmenttien (ainakaan klorofyllien) säilymisen kannalta. Sedimenttinäytteessä feofytiini a:n ja klorofylli a:n suhdeluku kasvaa syvyyden kasvaessa (kuva 20), josta voidaan päätellä, että klorofylli a:ta oli hajonnut sitä enemmän, mitä syvemmältä sedimenttiä tarkasteltiin. Lisäksi feofytiini a:n ja klorofylli a:n suhdeluku oli sedimenttinäytteessä poikkeuksellisen suuri (> 4) sedimenttinäytteessä 27-30 cm ja yli 59 cm syvyyksissä. Näiden syvyyksien sedimentti on muodostunut vuosina 1991-1993 (± 1,5 vuotta) ja ennen vuotta 1979 (± 1,5 vuotta).

4.5.2 Sedimentin klorofylli a ja feofytiini a -pitoisuus kasviplanktonin biomassan muutosten kuvaajana

Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteen klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuudessa oli havaittavissa vastaavat muutokset kuin kasviplanktonin biomassassa (kuva 21). Klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuus oli suurin (noin 160 µg/g kuiva-ainetta) sedimenttinäytteen sedimenttikerroksessa 48-67 cm (1976-1984 ± 1,5 vuotta), jota vastaavana ajanjaksona kasviplanktonin biomassakin oli suurimmillaan (1982-1984 > 7 g/m^3). Vuoden 1984 jälkeen kasviplanktonin biomassa Vesijärven Enonselällä pieneni (vuosina 1984-1990 kasviplanktonin biomassa oli noin 3 g/m^3), joka oli myös havaittavissa sedimentin klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuudessa (klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuus 35-48 cm syvyydellä oli noin 100 µg/g kuiva-ainetta). Kun kasviplanktonin biomassa edelleen pieneni vuonna 1990 (biomassa oli vuosina 1990-2000 noin 2 g/m^3), oli sekin havaittavissa tätä ajanjaksoa vastaavalla syvyydellä (14-35 cm) sedimentin klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuudessa (noin 60 µg/g kuiva-ainetta). Myös kasviplanktonin biomassan suureneminen vuoden 2000 jälkeen (2000-2006 biomassa oli noin 2,25 g/m^3) oli nähtävissä sedimentin klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuudessa (0-14 cm syvyydessä 70 µg/g kuiva-ainetta).

Tutkimuksen tulosten perusteella näyttää siltä, että Vesijärven Enonselän sedimentin klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuuden perusteella voidaan arvioida luotettavasti kasviplanktonin tuotannossa tapahtuneita muutoksia. Tutkimuksessa havaittiin, että kasviplanktonin tuotannossa tapahtuneita muutoksia ei voida rekonstruoida ainoastaan sedimentin klorofylli a:n pitoisuuden perusteella, koska klorofylli a:ta oli hajonnut sitä enemmän, mitä syvemmältä sedimenttiä tarkasteltiin.

4.5.3 Sedimentin ekinenoni- ja kantaksantiinipitoisuus syanobakteerien biomassan muutosten kuvaajana

Sedimenttinäytteen ekinenonin ja kantaksantiinin kokonaispitoisuudessa oli havaittavissa vastaavat muutokset 0-14 cm, 14-35 cm ja 35-48 cm syvyyksillä kuin syanobakteerien biomassassa näitä syvyyksiä vastaavina ajanjaksoina (2000-2004, 1990-2000 ja 1984-1990 ± 1,5 vuotta) (kuva 22). Sedimenttinäytteessä syvyydellä 48-67 cm tilanne oli toisin. Ekinenonin ja kantaksantiinin kokonaispitoisuus oli 48-67 cm syvyydellä noin 9 µg/g kuiva-ainetta ja sen yläpuolisessa sedimenttikerroksessa (35-48 cm) kokonaispitoisuus oli hieman suurempi (noin 10 µg/g kuiva-ainetta). Tämä ei vastaa syanobakteerien runsaudessa havaittua muutosta, sillä syanobakteerien biomassa oli huomattavasti suurempi (noin 6 g/m^3) 48-67 cm syvyyttä vastaavana ajanjaksona (1979-1984 ± 1,5 vuotta) kuin 35-48 cm syvyyttä vastaavana ajanjaksona (1,5 g/m^3 vuosina 1984-1990).

4.6 Vesijärven Enonselän sedimentin mikrokystiinipitoisuus

Mikrokystiinipitoisuus oli suurin sedimentin pintakerroksessa (0-2 cm), jossa se oli 290 ng/g kuiva-ainetta (kuva 23). Sedimentin mikrokystiinipitoisuus pieneni syvyyden kasvaessa, mutta se oli vielä kohtalaisen suuri (yli 20 ng/g kuiva-ainetta) kymmenen senttimetrin syvyydessä. Vertailuaineistoa järvisedimentin mikrokystiinipitoisuuksista ei löytynyt, mutta vastaavanlaisia tutkimuksia on tehty Itämeren sedimentistä. Itämeren sedimentistä on yleensä analysoitu nodulariinin pitoisuutta, joka on Itämeressä esiintyvän *Nodularia spugimena* – syanobakteerin tuottama maksamyrkky. Mazur-Marzec ym. (2007) mittasivat tutkimuksessaan Suomenlahden pintasedimentin (0-1 cm) nodulariinipitoisuudeksi 127-342 ng/g kuiva-ainetta ja kolmen senttimetrin syvyydessä pitoisuus oli merkittävästi pienempi (1,4-7,4 ng/g kuiva-ainetta). Itämeren sedimentin nodulariinipitoisuus vaihtelee paljon alueellisesti, sillä vastaavana ajankohtana eteläisellä Itämerellä pintasedimentissä (0-1 cm)

nodulariinipitoisuus oli 16-75 ng/g kuiva-ainetta ja kolmen senttimerin syvyydessä 1,5-1,6 ng/g kuiva-ainetta (Mazur-Marzec ym. 2007). Pohjoisella Itämerellä sedimentin nodulariinipitoisuuden yleinen taso on ollut noin 1-20 ng/g kuiva-ainetta (suull. tiedonanto, Harri Kankaanpää, Merentutkimuslaitos, Helsinki).

Koska mikrokystiinipitoisuus pienenee Vesijärven Enonselän sedimentissä syvyyden kasvaessa, mikrokystiinit ovat ilmeisesti hajonneet sedimentissä (pääosin anaerobisen) biohajoituksen seurauksena. Mikrokystiinit hajoavat sedimentissä bakteeritoiminnan seurauksena (Cousins ym. 1996, Lahti ym. 1997, Christoferssen ym. 2002, Holst ym. 2003), sillä mikrokystiini on heptapeptidirakenteensa ansiosta todennäköisesti kelvollinen energialähde bakteereille. Bakteerit hajottavat mikrokystiinin peptidisidoksia, jolloin heptapeptidi hajoaa peptideiksi ja edelleen aminohapoiksi (Imanishi ym. 2005).

5. Johtopäätökset

5.1 Näytteiden esikäsittely ja säilytys

Tutkimuksen tulosten perusteella Vesijärven Enonselän sedimentin kasviplanktonpigmenttien analysoinnissa käytetty esikäsittelymenetelmä on hyvä ja se soveltuu niin sedimentti- kuin kasviplanktonnäytteille. Kasviplanktonpigmenttinäytteiden esikäsittelyssä voidaan Vesijärven Enonselän sedimenttinäytteiden esikäsittelymenetelmästä poiketen käyttää asetonin sijaan etanolia, joka on työntekijän kannalta ajatellen turvallisempi.

Näytteet, jotka on esikäsitelty HPLC-analysointia varten, on analysoitava kuuden vuorokauden kuluessa (säilytys – 20 °C) näytteen esikäsittelystä, sillä tätä pidempiaikaisella uuttoliuosten säilytyksellä voi olla vaikutusta kasviplanktonpigmenttien pitoisuuksiin.

5.2 Vesijärven Enonselän sedimentin kasviplanktonpigmentit ja mikrokystiini paleolimnologisessa tutkimuksessa

Tämän tutkimuksen perusteella Vesijärven Enonselän kasviplanktonin biomassan muutoksia voidaan selvittää sedimenttiin varastoituneiden kasviplanktonpigmenttien perusteella. Kasviplanktonin biomassan rekonstruktoinnissa tulee käyttää klorofylli a:n ja feofytiini a:n kokonaispitoisuutta, sillä klorofylli a:ta oli hajonnut sitä enemmän mitä syvemmältä sedimenttiä tarkasteltiin. Sen sijaan syanobakteerien biomassassa tapahtuneita muutoksia ei voida täysin luotettavasti selvittää ekinenonin ja kantaksantiinin perusteella, sillä sedimentin ekinenonin ja kantaksantiinin pitoisuudessa ei havaittu kaikissa sedimenttikerroksissa vastaavia muutoksia kuin syanobakteerien biomassassa.

Vesijärven Enonselän sedimentin pintakerroksessa havaittiin mikrokystiiniä, mutta sen pitoisuus pieneni nopeasti syvemmälle sedimentissä mentäessä. Näin ollen näyttäisi siltä, että mikrokystiini hajoaa sedimentissä, minkä vuoksi sedimentin mikrokystiinipitoisuutta ja syanobakteereille tyypillisten pigmenttien, ekinenonin ja kantaksantiinin, pitoisuutta ei ole mielekästä verrata, koska sedimentin mikrokystiinipitoisuus ei kerro mikrokystiinituotannosta tuottavassa kerroksessa.

Koska Vesijärven Enonselän sedimentin kasviplanktonpigmenttejä analysoimalla voidaan selvittää Vesijärven Enonselän kasviplanktonin biomassassa tapahtuneita muutoksia, tulisi sedimentin kasviplanktonpigmenttien tutkimusta jatkaa. Kasviplanktonpigmenttien analysointiin perustuvalla paleolimnologisella tutkimuksella voitaisiin selvittää Vesijärven Enonselän rehevöitymisen historiaa ja arvioida järven luonnollista tilaa. Näitä tietoja voitaisiin hyödyntää esimerkiksi järven hoito- ja kunnostustoimenpiteitä suunniteltaessa.

6. Kiitokset

Erityisesti haluan kiittää dosentti Harri Kankaanpäätä asiantuntemuksesta ja työn ohjauksesta. Kiitos myös professori Timo Kairesalolle, joka myös toimi työn ohjaajana. Lisäksi haluan kiittää Merentutkimuslaitosta, jonka tiloja ja laitteita sain käyttää sekä Merentutkimuslaitoksen kemian osaston laboratoriohenkilökuntaa, Miikka Olinia, Kirsi Hyväristä sekä Galina Pesosta, laitteiden käytön opastuksesta ja avusta näytteiden analysoinnissa. Haluan myös kiittää Mikko Liukkosta avusta sedimenttinäytteenotossa sekä sedimentin lustoajoituksesta. Lisäksi kiitos Säteilyturvakeskuksen Jukka Mattilalle ja STUK:n laboratoriohenkilökunnalle sedimenttinäytteiden Cs-137 -mittauksista sekä Paula Jäntille Lahden tutkimuslaboratoriosta Vesijärven seuranta-aineiston luovuttamisesta. Kiitos myös kaikille muille henkilöille, jotka ovat edesauttaneet tämän työn loppuun viemistä.

Buffan-Dubau, E. & Carman, K.R. 2000: Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. – *Marine Ecology Progress Series* 204: 293-297.

Campbell, N.A. & Reece, J.B. 2002: *Biology.* – Benjamin Cummings. San Francisco. 1247 s.

Chen, N., Bianchi, T.S & Bland, J. M. 2003: Implications for the role of pre- versus post-depositional transformation of chlorophyll-a in the Lower Mississippi River and Louisiana shelf. – *Marine Chemistry* 81: 37-55.

Christoferssen, K., Lyck, S. & Winding, A. 2002: Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. – *Aquatic Microbial Ecology* 27: 125-136.

Cousins, I.T., Bealing, D.J., James, H.A. & Sutton, A. 1996: Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations. – *Water Research* 30: 481-485.

Finni, T. 1979: Vesijärven kasviplanktontutkimukset vuosina 1960-1977. Selvitys Lahden kaupungille. s. 74.

Harada, K., Kondo, F. & Lawton, L. 1999: Laboratory analysis of cyanotoxins. – Teoksessa: Chorus, I. & Bartram, J. (toim.): *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public helath consequences, monitoring and management.* Spon Press, Lontoo. 416 s.

Heuklem, L.V. & Thomas, C.S. 2001: Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. – *Journal of Chromatography A* 910: 31-49.

Hindersson, R. 1933: Förgiftning av nötkreatur genom sötvattensplankton. – *Finsk veterinär Tidskrift* 39: 179-189.

Holst, T., Jørgensen, N.O.G., Jørgensen, C. & Johansen, A. 2003: Degradation of microcystin in sedimnts at oxic and anoxic, denitrifying conditions. – *Water Research* 37: 4748-4760.

Horppila, J. & Peltonen, H. 1994: The fate of roach Rutilus rutilus stock under an extremely strong fishing pressure and its predicted development after the cessation of mass removal. – *Journal of Fish Biology* 45: 777-786.

Huttunen, P. & Meriläinen, J. 1978: Freezing device providing large unmixed sediment samples from lakes. – *Annales botanici Fennici* 15(2): 128-130

Håkanson, L. & Jansson, M. 1983: *Principles of lake sedimentology.* – Springer-Verlag. Berliini.

Ikäheimonen, T. K. 2006: Ympäristön radioaktiivisuus Suomessa-20 vuotta Tsernobylista. Symposium Helsingissä 25.-26.4.2006. STUK-A217. Helsinki. 223 s.

Ilus, E. & Saxén 2005: Accumulation of Chernobyl-derived ^{137}Cs in bottom sediments of some Finnish lakes. – *Journal of Environmental Radioactivity* 82: 199-221.

Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Tsuji, K. & Harada, K. 2005: Bacterial degradation of microcystins and nodularin. – *Chemical Research in Toxicology* 18: 591-598.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W. (toim.) 1997: *Phytoplankton pigments in oceanography.* - UNESCO Publishing, Pariisi. 661 s.

Järnefelt, H. 1929: Zur limnologie einiger gewässer Finlands V. Vesijärvi. – *Ann. Zool. Soc. Vanamo* 8:8-17.

Kairesalo, T., Laine, S., Luokkanen, E., Malinen, T. & Keto, J. 1999: Direct and indirect mechanisms behind succesful biomanipulation. – *Hydrobiologia* 395/396: 99-106.

Keto, J. 1982: The recovery of L. Vesijärvi following sewage diversion. – *Hydrobiologia* 86: 195-199.

Keto, J., Tallberg, P., Malin, I., Vääränen, P. & Vakkilainen, K. 2005: The horizon of hope for L. Vesijärvi, southern Finland: 30 years of water quality and phytoplankton studies. – *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 29: 448-452.

Keto, J. & Sammalkorpi, I. 1988: A fading recovery: A conceptual model for lake Vesijärvi management and research. – *Aqua Fennica* 18: 193-204

Kowalewska, G. 1997: Chlorophyll a and its derivates in recent sedimnts of the southern Baltic Sea collected in the years 1992-1996. – *Oceanologia* 39: 413-432.

Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M. & Sivonen, K. 1997: Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. – *Water research* 31: 1005-1012.

Leavitt, P.R. & Hodgson, D.A. 2001: Sedimentary pigments. – Teoksessa: Smol, J.P., Birks, H.J.B. & Last W.M. (toim.): *Tracking environmental change using lake sediments*: 15. Kluwer Academic Publishers, Alankomaat.

Levander, K.M. & Wuorentaus, A. 1918: Planktonsammansättning i finska sjöar och floder på grund av håfningar utforda sommaren 1913. – *Fennia* 40: 1-95.

Liukkonen, M., Kairesalo, T. & Haworth, E. Y. 1997: Changes in the diatom community, including the appearance of *Actinocyclus normanii* f. *subsalsa*, during the biomanipulation of Lake Vesijärvi, Finland. – *European Journal of Phycology* 32: 353-361.

Mantoura, R.F.C. & Llewellyn, C.A. 1983: The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. – *Analytica Chimica Acta* 151: 297-314.

Mc Gowan, S. & Britton, G. 1999: Ancient blue-green blooms. – *Limnology and Oceanography* 44: 436-439.

Mazur-Marzec, H., Tymińska, A., Szafranek, J. & Pliński, M. 2007: Accumulationof nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. – *Environmental Toxicology* 22: 101-111.

Meriluoto, J., Karlsson, K. & Spoof, L. 2004: High-throughput screening of ten microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. – *Chromatographia* 59: 291-298.

Mur, L.R., Skulberg, O.M. & Utkilen, H. 1999: Cyanobacteria in the environment. – Teoksessa: Chorus, I. & Bartram, J. (toim.): *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public helath consequences, monitoring and management.* Spon Press, Lontoo. 416 s.

Piippola, S. & Kononen, K. 1995: Pigment composition of phytoplankton in the Gulf of Bothnia and Gulf of Finland. – *Aqua Fennica* 25: 39-48.

Poutanen, E. & Nikkilä, K. 2001: Carotenoid pigments as tracers of cyanobacterial blooms in recent and post-glacial sediments of the Baltic Sea. – *Ambio* 30: 179-183.

Reuss, N. & Conley, D.J. 2005: Effects of storage of sediment samples for pigment analyses. – *Limnology and Oceanography* 3: 477-487.

Rinehart, K.L., Namikoshi, M. & Choi, B.W. 1994: Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). – *Journal of Applied Phycology* 6: 159-176.

Rüdiger, W & Schoch, S. 1988: Chlorophylls. – Teoksessa: Goodwin, T.W. (toim.) 1988: *Plant pigments*. Academic press, Lontoo. 362 s.

Schlüter, L., Garde, K. & Kaas, H. 2004: Detection of the cyanobacteria *Nodularia spugimena* by means of a 4-keto-myxoxanthophyll-like pigment in the Baltic sea. – *Marine Ecology Progress Series* 275: 69-78.

Sivonen, K. 1990: *Toxic cyanobacteria in finnish fresh waters and the baltic sea.* - Helsingin yliopiston mikrobiologian laitoksen julkaisuja 39.

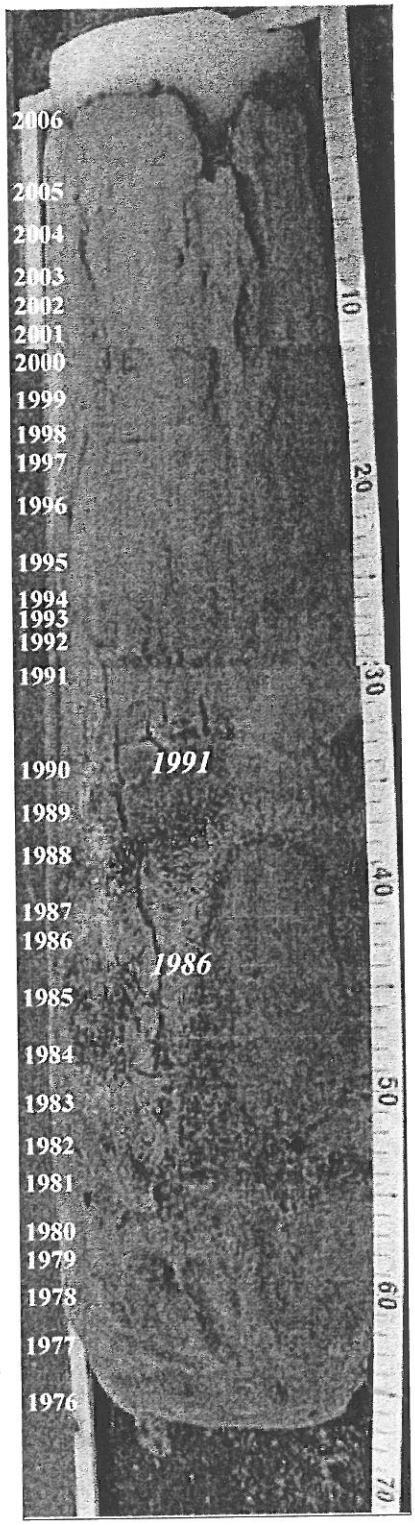
Sivonen, K., Niemelä, S.I., Niemi, R.M., Lepistö, L., Luoma, T.H. & Räsänen, L.A. 1990: Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. – *Hydrobiologia* 190: 267-275.

Sivonen, K. & Jones, G. 1999: Cyanobacterial toxins. – Teoksessa: Chorus, I. & Bartram, J. (toim.): *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public helath consequences, monitoring and management.* Spon Press, Lontoo. 416 s.

Tikkanen, T. 1986: Kasviplanktonopas. – Suomen Luonnonsuojelun Tuki Oy. Forssan kirjapaino. Forssa. 278 s.

Vernet, M. & Lorenzen, C.J. 1987: The relative abundance of pheophorbide a and pheophytin a in temperate marine waters. – *Limnology and Oceanography* 32: 352-358.

Wasmund, N., Topp, I. & Schories, D. 2006: Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. – *Oceanologia* 48: 125-144.



Liite 1. Vesijärven Enonselän sedimenttinäyte. Kuvan vasemmassa laidassa olevat vuosiluvut on sijoitettu lustoajoituksen perusteella, kun taas kuvan keskellä olevat vuosiluvut on sijoitettu perustuen orgaanisen aineen määrän (v. 1991) ja Cs-137 mittaukseen (v. 1986).

HELSINGIN YLIOPISTON YMPÄRISTÖEKOLOGIAN LAITOKSEN TUTKIMUKSIA JA RAPORTTEJA (1.-17. RAPORTTEJA JA SELVITYKSIÄ)

No. 1 1999 TURPEINEN RIINA: Mikrobiston vaikutus arseenin metylaatioon ja liikkuvuuteen maaperässä sekä mikrobiston arseeniresistenttiys. (pro gradu)

No. 2 2000 RAILO HELENA: Kaatopaikkojen ympäristövaikutukset, esimerkkinä Pasilan kaatopaikka. (pro gradu)

No. 3 2001 ONKILA HANNU: Tuhkan ja sen sisältämän kadmiumin vaikutukset metsämaan änkyrimato-populaatioihin. (pro gradu)

No. 4 2001 TÖRN ANNE: Kohotetun hiilidioksidipitoisuuden ja typpilannoituksen vaikutukset ombrotrofiseen suokasvillisuuteen. (pro gradu)
Effects of elevanted CO2 and increased N deposition on ombrotrofic bog vegetation

No. 5 2001 HOVI SANNA: Valuma-alueen metsätaloustoimenpiteiden vaikutukset pieniin järviin - paleo-limnologinen selvitys. (pro gradu)

No. 6 2001 ANTTILA SAKU: Päällyslevästön biomassan kertyminen eri ravinnetasoilla sekä vaikutukset veden ravinnepitoisuuksiin. (pro gradu)

No. 7 2002 KOSKINEN SARI: Hiilidioksidialtistuksen vaikutukset järvikortteen (Equisetum fluviatile) ja järvikaislan (Schoeneplectus lacustris) aerobiseen ja anaerobiseen hajoamiseen. (pro gradu)

No. 8 2002 KORKAMA TIINA: Maaperän hajottajaeliöyhteisön vuorovaikutussuhteet ja hajotustoiminta lyijyllä saastuneessa maassa. (pro gradu)

No. 9 2002 LEHTIMÄKI ELENA: Auringonkukan vaikutus atratsiinin ja simantsiinin hajoamiseen kaupunkimaaperässä. (pro gradu)

No. 10 2003 KAJALA SAIJA: Rihmamaisten syanobakteerien ja niiden toksiinien ravintoketjuvaikutukset. (pro gradu)

No. 11 2003 TAHVANAINEN JUULIA: Elisa-konsernin ympäristökuormitustekijöiden nykytilan kartoitus.. (pro gradu)

No. 12 2003 SUSILUOTO SANNAMAIJA: Comparison of drought avoidance and tolerance strategies in Eucalyptus microtheca. (pro gradu)

No. 13 2003 KUUKKA HANNA: Särjen ravinnon käytön vaikutus vedenlaatuun ja kasviplanktoniin. (pro gradu)

No. 14 2003 FLYKT ENNI: Mineraaliöljy- ja bioöljypohjaisten hydrauliikkaöljyjen vaikutukset boreaalisen metsämaan hajottajaravintoverkkoon. (pro gradu)

No. 15 2003 HOLMA ANNE: Tuhkan ja typen vaikutukset kuusen (Picea abies L. Karst) ektomykorritsaan. (pro gradu)

No. 16 2003 LATTUNEN PETRA: Yritysten ympäristöjärjestelmät – erilaisten indikaattorimenetelmien vertailu. (pro gradu)

No. 17 2003 TAIPALE SAMI: Lipidimarkkerit kompostin mikrobisukkession määrityksessä. (pro gradu)

No. 18 2003 KÄKI TIINA: Boreaalisen järven rantavyöhykkeen metaaniemissiot sekä niiden suhde ympäristöoloihin ja kasvillisuuden kehitykseen. (lis.tutkimus)

No. 19 2004 JÄRVI ANNE: Populaatiotiheyden vaikutus pentakloorifenolin myrkyllisyyteen änkyrimadolla. (pro gradu)

No. 20 2004 HÖLSÄ JENNI: Kompostin sieniyhteisön kehittyminen ja karakterisointi molekyylibiologisin menetelmin (pro gradu)

No. 21 2004 MÄKINEN JUSSI: Vesijärven kilpiäistenpohjan ekologinen tila ja hoitosuunnitelma (pro gradu)

No. 22 2004 LÖNNGREN HANNA: Ympäristöasioiden hallinta kaupunkikuntien toimintayksiköissä – Tapaustutkimuksena Hyvinkään kaupungin tilapalvelu (pro gradu)

No. 23 2004 HUOTARI JUSSI : *DAPHNIA LONGISPINA* ja *D. PULEX*- vesikirppujen lisääntyminen simuloiduissa ilmastonmuutos olosuhteissa: ekosysteemitason co_2-altistus (pro gradu)

No. 24 2004 SAARINEN TUOMAS: Petoäyriäisen merkitys Vesijärven ulappavyöhykkeen eläinplanktonyhteisössä (pro gradu)

No. 25 2004 VAKKILAINEN KIRSI: The role of zooplankton in controlling phytoplankton biomass in lake littoral (lis.tutkimus)

No. 26 2004 HAGNER MARLEENA: Koivutisle torjunta-aineena: vaikutukset lehtokotiloon (Arianta arbustorum) ja maaperään (pro gradu)

No. 27 2004 JÄRVINEN KIRSI: Vesikasvien pintojen ja pehmeiden pohjien päällys- ja pohjaeläimistöt matalien järvien tilan kuvaajina (pro gradu)

No. 28 2004 SUUTARI MILLA: Kasviplanktonin ravinnerajoitteisuus Lahden Vesijärvessä kesällä 2000 (pro gradu)

No. 29 2005 VAURAMO SAARA: Decomposition of chitinase transgenic silver birch (Betula pendula) leaf litter and effects on decomposer populations in a field trial (pro gradu)

No. 30 2005 IKONEN SUVI: Kasvukauden aikaiset muutokset ravinnonkäytössä kahdessa jäännehalkoisjalkaisen populaatiossa (pro gradu)

No. 31 2005 PARTANEN PASI: Bakteeridiversiteetin määrittäminen molekyylibiologisin menetelmin kompostointiprosessin eri vaiheissa (pro gradu)

No. 32 2005 MÄNTYLÄ MINNA: Humuskuormituksen vaikutus nuottaruohon (Lobelia Dortmanna L.) fotosynteesiaktiivisuuteen sekä sedimentin happioloihin ja bakteerien entsyymiaktiivisuuksiin (pro gradu)

No. 33 2005 TAIPALE TIINA: Lahopuu luonnonmetsäsukkessiossa (pro gradu)

No. 34 2006 VALENTINI MARCO: The assessment of toxicity in lead contaminated soils (master science thesis)

No. 35 2005 AALTONEN HERMANNI: Kohonneiden alailmakehän otsoni- ja hiilidioksidipitoisuuksien vaikutukset maaperän mikrobiyhteisön rakenteeseen (pro gradu)

No .36 2006 ENBERG EIJA: Ympäristö- ja laatujärjestelmän liittäminen yhteiseksi toimintajärjestelmäksi julkisen hallinnon organisaatiossa, Kymenlaakson sairaanhoitopiirin kuntayhtymässä (pro gradu)

No. 37 2006 NIITTYMIES HEIDI: Ympäristövaikutukset ja –vastuu: esimerkkinä suolakyllästämön alue (pro gradu)

No. 38 2006 KOSKINEN KAISA: Öljyvuotojen puhdistus tupasvillan avulla ja öljyn bioremediaatio Itämeren rannikkoalueilla (pro gradu)

No. 39 2006 KAUPPI SARI: Öljyllä pilaantuneen maan biologisen hajotuksen tehostaminen (pro gradu)

No. 40 2006 PASANEN TIINA: Koivutisle lehtokotiloiden (Arianta arbustorum) karkotteena ja sen käytön ympäristövaikutukset maaperässä ja vesieliöissä

No. 41 2006 KARJALAINEN ANNE-MARI: Ecotoxicity and Bioavailability of CCA in Soils at an Old Wood Impregnation Site (pro gradu)

No. 42 2007 LJUNGBERG REETTA: Vuollejokisimpukan elinympäristövaatimukset ja liikkuminen Nummenjoen yläosassa

No. 43 2007 HANNULA EMILIA: The effect of diesel and its removal on the population dynamics of the bacteria in the Baltic Sea (pro gradu)

No. 44 2007 PELTOMAA ELINA: Kasviplanktonin vuotuiset ja vuosienväliset vaihtelut pienessä humuspitoisessa metsäjärvessä vv. 1990-2003 (pro gradu)

No. 45 2007 FINGERROOS TERO: Biosensoribakteerin käyttö raskasmetallin pitoisuuden määrityksessä maaperästä – lyijyn ekotoksisuus suhteessa sen biosaatavuuteen (pro gradu)

No. 46 2007 TORKKELI MINNA: Lyijysaastumisen vaikutukset maaperäekosysteemin toimintaan ja eliöyhteisön rakenteeseen entisellä ampumarata-alueella (pro gradu)

No. 47 2008 VUORIMAA PAULA: Torjunta-aineiden esiintyminen pohjavedessä–vertailua kaupunkien ja kuntien välillä (pro gradu)

No. 48 2008 ANTTILA JARNA: Ekologinen riskinarviointi: lyijyn biosaatavuuden määritys ampumaradan lyijyllä pilaantuneesta maasta (pro gradu)

No. 49 2008 SWANSON SAARA: Yksittäisen sateen vaikutus ekosysteemin liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrään (pro gradu)

No. 50 2008 PELTONEN SANNA: Lahden ekologinen verkosto ja sen merkitys kaupungissa esiintyville nisäkkäille (pro gradu)

No. 51 2008 RANTANEN MARI: Lyijyn vaikutukset typen transformaatioihin havumetsäekosysteemissä (pro gradu)

No. 52 2008 TOLONEN IRMA: Monimuotoiset luontokohteet tiivistyvässä kaupunkiympäristössä - kaupunkiekologinen tarkastelu lehtojen merkityksestä (pro gradu)

No. 53 2008 RISTOLA JUHA-PEKKA: Lahden kaupungin kehittymisen vaikutus alueensa pohjavesien laatuun (pro gradu)

No. 54 2008 JÄÄSKELÄINEN VIRPI: Polyaromaattisten hiilivety-yhdisteiden vaikutukset kaupunkiekosysteemissä – fenantreeni ja pyreeni malliaineina (pro gradu)

No. 55 2008 VÄRTTÖ HEIDI: Kasviplanktondynamiikka suhteessa fysikaalis-kemiallisten tekijöiden vaihteluihin eri vesikerroksissa Vesijärven Enonselällä (pro gradu)

No. 56 2008 TOIVAINEN KATRI: Metallien toksisuus vesiselkärangattomilla – kudospitoisuusperusteinen tarkastelu

No. 57 2008 MARI VESA: Elektrokineettisen käsittelyn optimoiminen öljyllä pilaantuneen maan puhdistamiseksi

No. 58 2008 MIA SUONTAUS: Biologisten ja kemiallisten lisäaineiden vaikutus kompostin mikrobistoon-kokeellinen tutkimus plfa-menetelmällä (pro gradu)

No. 59 ANU JULMALA-JÄNTTI: Ristilimaskan (lemina trisulca) ja pikkulimaskan (lemina minor) välinen resurssikilpailu – esimerkkeinä typpi ja fosfori (pro gradu)

LAHDEN TIEDEKIRJASTO
Lahti Science Library