



UNIVERSITY OF  
EASTERN FINLAND

Savukefitteri muovin ja sen sisältämien kemikaalien vaikutus  
*Daphnia magnan* kuolleisuuteen

Su'ad Abdirahman Musse  
Ympäristötieteen koulutusohjelma  
Itä-Suomen yliopisto  
Luonnontieteiden ja metsätieteiden  
tiedekunta  
Ympäristö ja biotieteiden  
Laitos/Ympäristötiede  
27.11.2022

Itä-Suomen yliopisto, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta  
Ympäristö ja biotieteiden laitos  
Ympäristötieteen koulutusohjelma  
Musse, Suad Abdirahman  
Savuke filttteri muovin ja sen sisältämien kemikaalien vaikutus *Daphnia magnan* kuolleisuuteen  
Opinnäytetutkielma, 39 sivua, 5 liitettä (18 sivua)  
Tutkielman ohjaajat, professori Jussi Kukkonen, projektitutkija Victor Carrasco Navarro  
Elokuu 2022

**Asiasanat:** ekotoksikologia, muovirooska, savuketumpit, mikrokuitu, toksisuustesti, EC50, *Daphnia magna*

Savuketumpit ovat yleisimpiä muovirooskia, joita löydetään ympäristöstä. Vuosittain noin 6 biljoonaa savuketta poltetaan globaalisti, josta arviolta noin 4,5 biljoonaa heitetään ympäristöön, josta ne kulkeutuvat tuulen ja sateen mukana vesistöihin. Savukkeen filttteri koostuu pääosin ei biohajoavasta selluloosa-asetaatti muovista, joka pilkkoutuu pienimmiksi paloiksi, mikromuoveiksi. Poltetun savukkeen filttteri vapauttaa toksisia kemikaaleja kuten nikotiinia, raskasmetalleja ja orgaanisia yhdisteitä ympäristöön jopa 10 vuoden ajan.

Poltetun ja ei poltetun savuke filtlerin toksisuutta *Daphnia magnalle* määritettiin 48 h altistustestillä. Filttlerin kemikaalien (suotovesi) ja partikkelien toksisuutta *Daphnia magnalle* testattiin myös suotovesi ja partikkeli testeillä. Kussakin toksisuustestissä oli seitsemän pitoisuutta ja kontrollit. Kustakin pitoisuudesta oli neljä rinnakkaista. Vesikirppujen liikkuvuus/kuolleisuus määritettiin kustakin rinnakkaisesta 24 h ja 48 h kuluttua niiden asettamisesta.

Kaikki vesikirput olivat elossa kaikilla ei poltetun savuke filtlerin suotovesi pitoisuuksilla. Ei poltetun savuke filtlerin mikromuovi/partikkelit eivät vaikuttaneet merkittävästi vesikirppujen kuolleisuuteen ( $p=1,000$ ). Lisätutkimusta tarvitaan määrittämään ei poltettujen savuke filtttereiden suotoveden ja mikromuovin toksisuus *Daphnia magnalle* mm. lisäämällä altistusaikaa.

Poltettu savuke filtlerin suotovesi ja mikromuovi lisäävät *Daphnia magnan* kuolleisuutta tilastollisesti merkittävästi pitoisuuden kasvaessa ( $p=0,000$ ). Toksisuus ilmeni poltettujen savuke filtttereiden testeissä pitoisuuksilla 0,125 % (0,10 g/l) suotovesitesti ja 0,25 % (0,20 g/l) partikkeli/mikromuovi testi. Pitoisuudella 0,46 % (0,37 g/l) saavutettiin poltetun savuke filtlerin suotoveden EC50 arvo *Daphnia magnalle*. EC arvo saavutettiin poltetun savuke filtlerin partikkeli testissä, pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l).

University of Eastern Finland, Faculty of Science and Forestry  
School of Environmental Sciences  
Institute of Environmental and Biological Sciences

Musse, Su'ad Abdirahman

Name of the study: The effect of cigarette filter plastic and chemicals on *Daphnia magna*'s mortality

Thesis, 39 pages, 5 appendix (18 pages)

Supervisors: professor Jussi Kukkonen, project researcher Victor Carrasco Navarro  
August 2022

**Keywords:** ecotoxicology, plastic litter, cigarette litter, cigarette butts, micro fibre, toxicity test, EC50, *Daphnia magna*

Cigarette butts are one of the most common plastic litters found in the environment. Approximately 6 trillion cigarettes are annually smoked globally and approximately 4.5 trillion of them are thrown to the environment. They can flow to the waterbodies with rain or wind. Cigarette filters mainly consist of nonbiodegradable cellulose acetate plastic, which breaks up to smaller microplastic particles. Smoked cigarette filter contains toxic substances such as nicotine, heavy metals and organic compounds that are leached to the environment even up to 10 years.

In this study non smoked and smoked cigarette filter toxicity to *Daphnia magna* is determined. The toxicity of microplastic and chemicals present in the filter (leachate) was determined in different test settings. There was seven different concentrations and control in each toxicity test. There were four replicates for each concentration. The mortality of *Daphnia magna* was measured from each replicate after 24 h and 48 h exposure.

The mortality rate of *Daphnia magna* was zero in all concentration with non-smoked cigarette filter leachate toxicity test. Non-smoked cigarette filter microplastic test didn't show significant affect in the mortality of *Daphnia magna* ( $p=1,000$ ). More research is needed to determine non-smoked cigarette filter's leachate and microplastic toxicity to *Daphnia magna* e.g., by increasing exposure time.

Smoked cigarette filter tests with leachate and microplastic significantly increased *Daphnia magna*'s mortality with increasing concentration ( $p=0,000$ ). The mortality occurred in the smoked cigarette filter leachate and microplastic tests in concentrations 0,125 % (0,10 g/l) and 0,25 % (0,20 g/l) respectively. EC50 for smoked cigarette filter leachate test is achieved in concentration 0,46 % (0.37 g/l). EC50 for smoked cigarette filter microplastic test is achieved in concentration 0,25 % (0.20 g/l).

## **Alkusanat**

Kiitän graduni ohjauksesta ja tuesta Jussi Kukkosta ja Victor Carrascoa. Kiitän hyvästä perehdytyksestä laboratorio työhön Victor Carrascoa. Kiitän myös HOPS ohjaaja Anna-Maria Veijalaista tuesta maisteri opintojeni aikana.



## Sisältö

1	Johdanto.....	6
2	Selluloosa-asetaatti .....	7
3	Savuketumpit .....	8
3.1	Savuketumpien ympäristökohtalo.....	8
3.2	Savukkeiden ominaisuudet .....	11
3.3	Selluloosa ja selluloosa-asetaatti filttorien maatuminen .....	13
3.4	Savukefilttereiden toksisuus .....	15
3.4.1	Subletaali oireet.....	15
3.4.2	Toksisuus .....	16
3.4.3	Yhteenveto .....	18
4	Daphnia vesikirput.....	19
5	Aineisto ja menetelmät .....	22
5.1	Filtterien jauhaminen .....	22
5.2	Suotoveden valmistus .....	25
5.3	Toksisuustestit.....	27
5.3.1	Konsentraatioalueen määrittäminen.....	27
5.3.2	Toksisuustesti suotovedellä.....	28
5.3.3	Toksisuustesti partikkeleilla.....	30
6	Tulokset .....	30
6.1	Konsentraatioalueen määrittäminen.....	31
6.2	Toksisuustestit savukefilteri suotovedellä .....	31
6.3	Toksisuustestit savukefilteri partikkeleilla .....	33
6.4	Poltettujen filttereiden tulosten vertailu ja tulosten tilastollinen analyysi .....	35
7	Tulosten tarkastelu.....	37
8	Yhteenveto.....	40
9	Lähdeluettelo .....	41
10	Liitteet.....	44

## 1 Johdanto

Savuketumpit ovat yleisimpiä muoviroskia, joita löydetään ympäristöstä. Vuosittain noin 6 biljoonaa savuketta poltetaan globaalisti, josta arviolta noin 4,5 biljoonaa heitetään ympäristöön, josta ne kulkeutuvat tuulen ja sateen mukana vesistöihin (Green ym. 2020, Kadir ja Sarani 2015).

Savuketumpit ovat eniten kerätty roska rantojen puhdistuksessa. Suoran roskaamisen, tuulen ja sateen lisäksi ne kulkeutuvat rannikko alueille jokien ja merivirtojen mukana. (Quemeneur ym. 2020). Vaikka tupakoinnin yleisyys on globaalisti laskenut, savuketumppi roskan arvioidaan kasvavan, globaalin populaation kasvun seurauksena (tobaccoatlas 0222). Savuketumpit luokitellaan haitalliseksi jätteeksi (WHO). Niiden hajoaminen kestää useita vuosia luonnossa riippuen ympäristö olosuhteista.

Poltetun savukefiltterin sisältämiä kemikaaleja ovat mm. nikotiini, metallit (esim. kadmium, lyijy, arseeni), ja orgaaniset yhdisteet kuten fenolit, PAH:t, N-nitroamiinit, jotka syntyvät poltettaessa savuketta (Quemeneur ym. 2020).

Savukefilteri koostuu pääosin selluloosa-asetaatti muovista, joka on pakattu tiiviisti. Filteri on huokoinen ja muistuttaa puuvillaa (Abdul Kadir ja Sarani 2015). Selluloosa-asetaatti ei ole biohajoavaa, vaan se pilkkoutuu pienimmiksi muovipaloiksi, jotka vapauttavat niiden sisältämiä kemikaaleja vesistöihin (Lawal ja Ologundudu 2013).

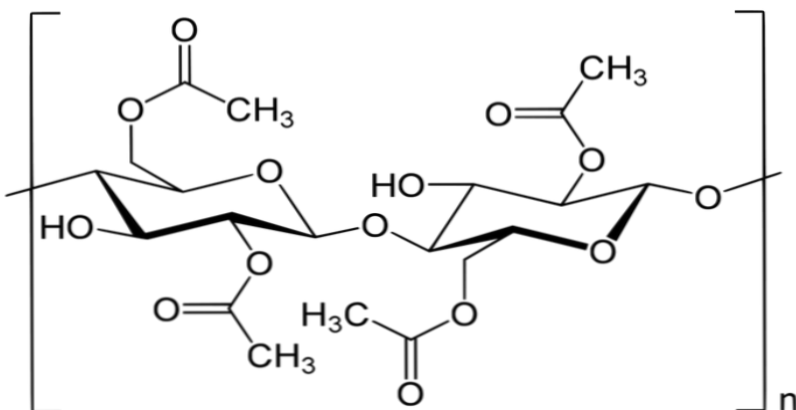
Savuketumppi saasteen muodostama ekologinen riski on laajasti aliarvioitu (Kadir ja Sarani, 2015). Araujo ja Cost (2019) katsaus tutkimuksessa on raportoitu harvoista tutkimuksista liittyen savuketumppi saasteeseen, jotka nekin keskittyivät Amerikan ja Euroopan rannikko ekosysteemeihin.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on määrittää ei poltetun ja poltetun savukefilteri partikkelien sekä kemikaalien vaikutus vesikirppu *Daphnia magna* kuolleisuuteen. Tavoitteena on myös selvittää, onko ei poltetun ja poltetun savukefilterin toksisuudessa merkittävää eroa ja onko suotoveden (kemikaalien) ja mikromuovi/partikkelien toksisuudessa merkittävää eroa.

## 2 Selluloosa-asetaatit

Selluloosa-asetaatit ovat yksi tärkeimmistä selluloosan estereistä. Sitä käytetään eri tarkoituksiin kuten filmien, kalvojen ja kuitujen valmistuksessa. Filmit valmistetaan selluloosa-triasetaatista (kuva 1) ja kalvot sekä kuidut selluloosa-2,0–2,5-asetaatista. Selluloosa-asetaatit muodostuu, kun selluloosa reagoi asetaattianhydridin ja asetaattihapon kanssa rikkihapon ollessa läsnä.

Yleisimmällä selluloosa-asetaatit kuitu muodolla on arviolta 2,0–2,5 asetaatti ryhmää jokaista kolmea hydroksyyli ryhmää kohden. Tämä selluloosa-diasetaatti tunnetaan sekundääri asetaattina tai asetaattina. Kyseisen asetaatin substituutiotaso DS on 2,0–2,5. Substituutiotaso on yksi selluloosa-asetaatin liukoisuuteen vaikuttavista tekijöistä. Asetaattihappo on yleisesti hyvä liuotin selluloosa-asetateille, joiden DS on yli 0,8. Selluloosa-asetaatit, joiden DS on 2–2,5 liukenevat esim. asetoniin, dioksaaniin ja metyyliasetattiin. Selluloosa-asetaatit, joiden DS on yli 2,5 liukenevat dikloorimetaaniin.



Kuva 1. Selluloosa-triasetaatti. <https://fi.thpanorama.com/articles/quimica/acetato-de-celulosa-estructura-quimica-propiedades-y-usos.html>



Sellulossa-2.5-asettaatti on myös raakamateriaali, josta valmistetaan selluloosajyviä (bead), jotka koostuvat ympyrän muotoisista partikkeleista. Selluloosajyvät valmistetaan liuottamalla selluloosa tai selluloosa johdannainen. Ympyrämuotoiset partikkelit muodostuvat dispersion avulla. Syntyneet partikkelit lujitetaan ja puhdistetaan, jolloin selluloosa regeneroituu jyviksi. Selluloosajyvät ovat huokoisia, hydrofobisia, hyvin turpoavia sekä omaavat ison pinta-alan (halkaisija 1–1000 µm). Ominaisuuksiensa takia selluloosajyvät voidaan käyttää erikois-adsorbenttina tai aktiivisten aineiden vapautumisen kontrollointiin (Fischer ym. 2008).

### **3 Savuketumppit**

#### **3.1 Savuketumppien ympäristökohtalo**

Yli 75 % tupakoijista heittää savuketumppit eli poltetut savuke filtterit ympäristöön. Vuosittain noin kuusi biljoonaa savuketta poltetaan globaalisti, josta arviolta noin 4,5 biljoonaa heitetään ympäristöön (Green ym. 2020). Amerikan syöpäjärjestön mukaan savuketumppi roskan odotetaan kasvavan 50 % vuoteen 2025 mennessä. Tämä kasvu pääosin johtuu globaalista väestönkasvusta (Kadir ja Sarani 2015).

Savuketumppit ovat yksi yleisimmistä roskatyypeistä ja muoviroskista, joita löydetään ympäristöstä. Niitä löydetään monista ekosysteemeistä kuten kaupungeista, kaupunkien reuna-alueista, rannoista ja valtameristä (Joly ja Cloys 2018). Suoraan ympäristöön heitetty savuketumppi ei hävitetä kiinteän jätteen huollossa. Näin ollen ympäristöön heitetty jäte voi päätyä vesistöihin ja rannikkoaluille tuulen, pintavirtaaman, virtavesien ja merivirtojen avulla. Savuketumppit muodostavat suuremman riskin virtavesi habitaatteihin, joissa on hidas vedenvaihto kuten lammet ja jotkin purot verrattuna habitaatteihin, joissa vedenvaihto on nopea kuten meret, nopeasti virtaavat purot ja järvet (Green ym.2020). Yhden savuketumppin on arvioitu saastuttavan 1000 l vettä. Heitetty savuketumppi, on kemiallisen saasteen lähteenä, veden lisäksi

myös sedimentille (King ym.2021). Tämä korostuu etenkin hydrofobisille kemikaaleille, jotka matalan vesi liukoisuuden takia, kerääntyvät sedimentin orgaaniseen aineeseen tai partikkeleihin.

Erilaisten jätetyyppien muodostama jätekuorma mereen arvioidaan kasvavan globaalisti. Savuketumppit ovat eniten kerätty roskatyyppi rantojen puhdistuksen aikana. Roskaaminen rannoilla muodostaakin huomattavan osan rannikkoalueiden jätekuormasta (Quemeneur ym.2020). Valtamerien suojele raportin 2011 mukaan arviolta 52 miljoonaa savuketumppia on kerätty rannikko alueilta 27 vuoden aikana. Vuoden 2015 kampanjassa vapaaehtoiset keräsivät rannoilta yli sadassa maassa 14 miljoonaa roskaa, josta 2,1 miljoona oli savuketumppeja (Dobaradaran ym. 2021). Tästä huolimatta savuketumppien vaikutuksesta meri, makeavesi ja maa habitaatteihin on heikosti tutkittu (Green ym. 2020).

Suurin osa savukefilttereistä (noin 90 %) valmistetaan selluloosa-asetaatti muovista, jota mikrobit eivät kykene hajottamaan, ja voi siten pilkkoutua ja akkumuloitua ympäristöön ja eliöihin (Joly ja Cloys 2018). Selluloosa-asetaatin pilkkoutumistaso anaerobisissa olosuhteissa on 1–2 kk, maassa 6–9 kk, makeassa vedessä 12 kk ja huonoissa olosuhteissa kuten kylmällä säällä 36 kk tai enemmän (Kadir ja Sarani 2015). Selluloosa-asetaatti voi näin ollen olla itsestään haitallinen luonnolle ilman savukkeen sisältämiä toksisia ja karsinogeenisiä aineita. Selluloosa-asetaatin on todettu vaikuttavan haitallisesti vastaanottavaan ekosysteemiin esim. vähentämällä kasvien kasvua (Green ym. 2020).

Tällä hetkellä tiedetään vähän, savuketumppien toksisuuden muuttumisesta ympäristössä ajan kuluessa. Gong ym. (2020) tutkimus osoittaa savuketumppien erittävän toksisia kemikaaleja ilmaan ainakin yhden viikon ajan savukkeen sammuttamisen jälkeen. Poltettu savukefilteri sisältää tuhansia kemikaaleja, jotka voivat vuotaa savuketumpeista, niiden joutuessa vesistöihin (Dobaradaran ym.2021, Kadir ja Sarani 2015). Poltettuja savukkeita on pitkään luokiteltu tavalliseksi jätteeksi, mutta nykyisin ne luokitellaan haitalliseksi jätteeksi EU:ssa niiden sisältämien toksisten aineiden takia (Quemeneur ym.2020, King ym.2021).

Kenttätutkimus Selmar ym. (2018) mukaan viljakasvit voivat ottaa maasta nikotiinia, joka on peräisin maahan heitetystä savuketumppeista. Savuketumppi suotoveden akkumuloituminen sedimenttiin voi vaikuttaa voimakkaammin pohja eliöihin, jotka elävät lähellä kasvualustaa. King ym. (2021) tutkimuksessa määritettiin savuketumppeista vapautuvien kemikaalien sitoutumista sedimenttiin. Tutkimuksessa identifioidut orgaaniset kemikaalit eivät siirtyneet sedimenttiin, mutta olivat sen kanssa vuorovaikutuksessa 60 päivän testin aikana. Tulosten perusteella määritettiin potentiaalisiksi sedimentin savuketumppi-polluution markkeri-aineiksi nikotiinia, kotiniiniä, myosiinia ja nicotyrine (tupakan alkaloidi). Näitä voidaan mahdollisesti hyödyntää sedimentin analysoinnissa, silloinkin kun savuketumpeja ei visuaalisesti näe.

Tupakoinnin haitalliset terveysriskit on tunnettu jo vuosikymmeniä. Kun taas poltettujen savukkeiden ympäristö kohtaloon on kiinnitetty enemmän huomiota lähiaikoina. Savukkeet muodostavat riskin ihmisten terveydelle niistä vapautuvan toksisen savun lisäksi, niiden ympäristössä kulkeutumis-, pilkkoutumis- ja ruokaketjuun akkumulointi ominaisuuksiensa takia (Quemeneur ym.2020). Nikotiini ja muut pyridiini johdannaiset voivat metaboloitua ja muuttua karsinogeenisiksi aineiksi eliöissä, aiheuttaen jopa alhaisilla pitoisuuksilla vakavia vaikutuksia. Lapset tai lemmikit voivat vahingossa nielaista savukefilttereitä, ja heillä voi ilmetä sen seurauksena vakavia sydän-, suoliston ja neurologisia oireita (King ym.2021).

Savuketumppien on todettu muodostavan uhkan eri ekosysteemien eliöille kuten mikrobeille, hyönteisille, kaloille ja nisäkkäille (Joly ja Cloys 2018). Osa meri-eliöistä kuten kalat, vesilinnut, ja valaat voivat syödä savuketumpeja, jolloin fyysisten vahinkojen lisäksi toksiset kemikaalit lisäävät niiden haitallisuutta (Dobaradaran ym.2021).

### 3.2 Savukkeiden ominaisuudet

Suurin osa savukefilttereistä (noin 90 %) valmistetaan selluloosa-asetaatti muovista, poissulkien Japanissa, Venezuelassa, Etelä-Koreassa ja Unkarissa. Ulkomuodon ja tekstuurin perusteella tiukasti yhteen pakastusta selluloosa-asetaattista tehty filtti näyttää puuvillalta ja tuntuu sieneltä (Kadir ja Sarani 2015). Filtrit koostuvat kuiduista, joiden halkaisija on 20 mm ja 15000 kuitua on tiukasti yhteen pakattuna filtrissä, jonka pituus on 15–35 mm (Slaughter ym. 2021, Kadir ja Sarani 2015). Selluloosa-asetaatti ei ole biohajoavaa mutta voi pilkkoutua luonnossa ja muodostaa mikro (< 5 mm) - ja nanomuovia (< 0.001 mm) (Green ym. 2020). Pilkkoutumistaso anaerobisissa olosuhteissa on 1–2 kk, maassa 6–9 kk, makeassa vedessä 12 kk ja huonoissa olosuhteissa kuten kylmällä säällä 36 kk tai enemmän (Kadir ja Sarani 2015).

Torjunta-aine jäänteet ei poltetuissa savukkeissa voivat lisätä niiden suotoveden toksisuutta. Ei poltetuissa savukefilttereissä on myös useita kemikaaleja, jotka voivat lisätä sen toksisuutta vesistöissä. Selluloosa-asetaatti kuidusta koostuva filtti on käsitelty titaanioksidilla ja glyseroli triasetaatilla (kuituja yhteen sitova aine). Suurin osa filtereistä on päällystetty kahdella kerroksella paperia, joka sisältää liimoja, jotka pitävät paperin yhdessä, ja orgaanisten happojen alkalimetalleja, syttymisen ylläpitämiseksi tupakoinnin aikana.

Poltettu savukefiltti sisältää tuhansia kemikaaleja kuten nikotiinia, polysyklisiä aromattisia hiilivetyjä (PAH), raskasmetalleja (kadmium, arseeni, alumiini, sinkki, lyijy, seleeni, kromi, nikkeli), nitroamiineja, karbonyyleja, fenoleja, hyönteismyrkkyjä, ja muita toksisia kemikaaleja, jotka sitoutuvat filteriin poltettaessa savuketta (Dobaradaran ym.2021, Kadir ja Sarani 2015).

Savuketta poltettaessa vapautuvan savun koostumus riippuu tupakan tyyppistä, savukkeen paperista, filtrin tehokkuudesta ja kärjen ilmanvaihto tasosta. Savukkeesta vapautuvan savun toksisuus ja karsinogeenisyys johtuvat sen sisältämistä aineista kuten hiilimonoksidi, nikotiini, typpioksidit, vetysyanidi, ammoniakki, jotkut haihtuvat aldehydit ja jotkut aromaattiset hiilivedyt. Filtrin lisäksi savukepaperi vähentää vapautuvasta savusta tervaa, hiilimonoksidia, typenoksideja, vetysyanidia, haihtuvia nitroamiineja ja bentso(a)pyreeniä (Kadir ja Sarani.2015).

Monissa tutkimuksissa toksisuus on määritetty kolmella savuke tyypillä; ei poltettu filtteri (EF), poltettu filtteri (PF) ja poltettu savuketumppi (PT). Toisin kuin poltetussa filtterissä, poltetussa savuke tumpissa on myös tupakkaa jäljellä. Soleimani ym. (2022) tutkimuksessa todettiin suotovesi toksisuuden kasvavan *P.waltoni* kalalle seuraavasti PT > PF > EF. Tämä voi liittyä PT:n suotoveden korkeampaan metalli ja PAH pitoisuuteen verrattuna PF ja EF suotovesiin kuten on todettu Soleimani ym. tutkimuksen suotovesi kemikaali analyysissä. PT:n tupakka jäännös koostuu palaneesta ja palamattomasta tupakasta mm. aldehydit ja karbonyyli yhdisteet yleensä syntyvät tupakan epätäydellisessä palamisessa tai ne voivat suoraan vapautua ei palaneesta tupakasta. Tämä PT:n tupakka jäännös lisää niiden toksisuutta (Soleimani ym. 2022).

Lawal ja Ologundudu (2013) tutkimuksen mukaan raskasmetalli pitoisuudet olivat suuremmat poltetun filtterin suotovedessä kuin ei poltetun filtterin suotovedessä, poissulkien metallit Ag ja Ni. Raskasmetallit voivat joutua savukkeisiin tupakan viljelyn ja kasvatuksen aikana sekä savukkeiden tuotannossa käytettävistä aineista kuten tuholaismyrkyt, kasvimyrryt sekä kosteutta pitävistä aineista, jotka voivat jäädä savukkeisiin. Metallit voivat joutua savukkeisiin myös pakkausmateriaalin valkaisuaineista (Lawal ja Ologundudu 2013).

Micevska ym. (2006) tutkimuksessa havaittiin, että nikotiini etyyliifenolilla voi olla merkittävä rooli toksisuuden aiheuttajana vesikirpuissa ja meribakteereissa. Nikotiini on kasvinsyöjiä karkottava kemikaali, jota on käytetty yleensä hyönteismyrkkinä ja joka on johdettu tupakkakasvista *Nicotiana sp.* On myös raportoitu, että etyyliifenolia on yleisesti käytetty tupakka teollisuudessa mausteaineena ja sitä löydetään myös savukkeen savusta. Merkittävät kosteudenpitäjät, joita käytetään savukkeissa ovat glyseroli, dietyleeniglykoli tai propyleeniglykoli, joka voi olla karsinogeeninen ihmiselle. Kemikaali lisäaineet yleensä käytetään tekemään tupakkatuotteesta houkuttelevampi kuluttajalle. Kuitenkin tiedetään vähän näiden lisäaineiden kohtalosta savuketumppi suotovesissä (Slaughter ym. 2021).

Savuke brändien vaikutuksesta toksisuuteen on ristiriitaista tutkimustietoa. Green ym. (2020) tutkimuksessa eri savukebrändien suotovesi pitoisuus 5 tumppia/l aiheutti kuolleisuutta suurimmassa osassa tutkimuksen makean veden selkärangattomissa. Erot lajien metaboliassa ja tutkimus olosuhteissa voivat myös aiheuttaa eroja organismien LC50 arvoissa (Soleimani ym. 2022).

Osassa tutkimuksissa käytettiin luonnollisesti poltettuja savukkeita, kuten tässä tutkimuksessa, ja osassa savukkeet oli keinotekoisesti poltetu laboratorio olosuhteissa. Keinotekoisesti poltetut on todettu olevan toksisempia kuin luonnollisesti poltetut, mutta syytä tähän ei tiedetä (Slaughter ym. 2021).

### 3.3 Selluloosa ja selluloosa-asetaatti filterien maatuminen

Tupakan filteri valmistetaan yleensä selluloosa-asetaatti muovista, jota mikrobit eivät pysty biologisesti hajottamaan. Tupakkateollisuus on kehittänyt viime vuosikymmeninä puhtaasta selluloosasta koostuvan filterin ympäristöystävällisenä vaihtoehtona tavallisille selluloosa-asetatti muovifilttereille. OCB® brändi on mainostanut heidän selluloosafilterien hajoavan 28 päivän sisällä melkein kokonaan. Kansainvälinen testi standardi, joka on suunniteltu arvioimaan materiaalien biohajoavuutta, ei huomioi savukefilterien biohajoamista polttamisen jälkeen ja eivät siten ole relevantteja arvioimaan niiden ympäristövaikutusta. Polttamisen jälkeen heitetty selluloosa savuketumppi voi säilyä vuosia ympäristössä (Joly ja Coulis. 2018).

Bonami ym. (2015) tutkimuksessa, jossa tutkittiin mm. savuketumpeja ei todettu tavallisen filterin maatumista kahden vuoden testin aikana. Samassa tutkimuksessa todettiin, etteivät ympäristöolosuhteet vaikuta tavallisen savukefilterin hajoamiseen. Lisäksi Bonami ym. (2020) tutkimuksessa havaittiin selluloosa-asetaatti savuketumppien pysyvän toksisina *Raphidocelis subcapitata* mikrolevälle viiden vuoden maaperällä olemisen jälkeen. Lisätutkimusta tarvitaan selvittämään ovatko selluloosa savuketumppit yhtä pitkän aikaan toksisia *Raphidocelis subcapitata*

mikrolevälle sekä näiden kahden filtteri materiaalista olevien tumppien suhteellinen ero niiden vaikutuksesta eliöihin.

Ympäristöolosuhteet vaikuttavat biologisen jätteen kuten selluloosafilttareiden maatumiseen, vaikuttamalla maaperän ja kompostin mikrobeihin, jotka kykenevät hajottamaan selluloosafilteerit. Kompostissa, jossa mikrobeilla on otolliset olosuhteet selluloosafilteri voi hajota paremmin kuin muovifiltterit. Tämä selluloosafilttareiden tehokkaampi hajoaminen voi muuttua, kun kyseessä on poltettu selluloosafilteri, joka sisältää myrkyllisiä yhdisteitä, jotka lisäävät kompostin mikrobien kuolleisuutta (Joly ja Coulis. 2018).

Jolys ja Coulis (2018) tutkimuksessa, jossa verrattiin ei poltettujen ja poltettujen selluloosa- ja muovifiltterien hajoamista, on löydetty vahva vaikutus filtteryypin ja sen hajoamisen välillä. Tässä tutkimuksessa testattiin myös erot hajoamisessa maaperän pinnalla ja kompostissa. Filtteryypin vaikutus hajoamiseen riippui maaperän olosuhteista. Selluloosafilteerit hajosivat huomattavasti nopeammin kuin muovifiltterit. Maaperän pinnalla filttareiden hajoaminen oli alhaisempi ja erot filtteryypien välillä eivät olleet merkittävät. Kompostissa selluloosafilteerit selvästi hajosivat nopeammin kuin muovifiltterit, 157 päivän altistuksen jälkeen, sekä ei poltetuille että poltetuille filttareille. Maanpinnalla molemmat poltetut filtteryypit hajosivat nopeammin kuin ei poltetut. Kompostissa poltetut filteerit hajosivat hitaammin kuin puhtaat. Erityisesti ero näkyi selluloosa filttareilla, joilla massaa oli jäljellä 16,1 % ei poltetuilla ja 50,8 % poltetuilla.

Jolys ja Coulis (2018) tutkimuksen perusteella poltettujen muovifiltterien maatuminen kestää kompostissa 7,5 vuotta ja maanpinnalla 14 vuotta. Poltettujen selluloosafilteerin maatuminen kestää kompostissa 2,3 vuotta ja maanpinnalla 13 vuotta. Selluloosafilteerit voidaan todeta tulosten perusteella olevan ympäristöystävällisempi vaihtoehto, jolla tupakka roskan haittavaikutuksia voi hillitä. Kuitenkin pitää huomioida seuraavia asioita tulosten tulkinnassa:

- Aika, joka kuluu selluloosafilteerin maatumisessa (2,3 v), on pitempi kuin yleiset kompostoinnin syklit.
- Hajoamistason laskeminen poltetuilla selluloosafilttareilla osoittaa, että maatumisen testaamisessa pitäisi huomioida myös tuotteen käytön vaikutus maatumiseen.

- Poltetun filtterin sisältämien aineiden pysyvyyttä pitää huomioida ennen kuin kompostointia voidaan pitää mahdollisena selluloosafiltteri jätteen käsittely systeeminä.
- Selluloosafiltterien maatumisen vaihtelee paljon ympäristöolosuhteiden mukaan, joten tuloksia ei voi tulkita niin, että niitä saisi heittää suoraan ympäristöön.

### 3.4 Savukefilttereiden toksisuus

#### 3.4.1 Subletaali oireet

Meren muovijätteen on todettu aiheuttavan letaali/subletaali oireita nisäkkäille, linnuille, kilpikonnille ja pohja organismeille (Kadir ja Sarani 2015). Poltetun savukefiltterin suotovesi voi olla letaali makeanveden eliölle kuten vesikirpuille, kaloille ja sammakko eläimille. Kuolleisuutta ilmenee yleensä korkeilla pitoisuuksilla (>1 tumppi/ l). Ei letaali oireita ilmenee pienemmillä pitoisuuksilla, jotka vastaavat paremmin oikeita ympäristöolosuhteita (<0.2 tumppi/ l) (Green ym.2020). Toksisia oireita on todettu jopa pitoisuudella 1 tumppi/ 4000 l (Miceyska ym. 2006). Ei letaali oireita ovat mm. mutageeniset vaikutukset, kehityshäiriö ja muutokset käytöksessä. Päättäjät eivät yleensä huomioi ei letaali oireita, mutta niiden huomioiminen, kuten muutokset ravinnonhankinnassa, petojen välttämässä, lisääntymisessä ja muutto käyttäytymisessä ovat tärkeitä, koska ne voivat aikaansaada ekologisesti tärkeitä kaskadi vaikutuksia ja ovat ekologisesti merkittäviä linkittämällä yksilön muutoksia populaatioon (Green ym.2020).

Useat tutkimukset ovat osoittaneet savukefilttereistä vuotavien kemikaalien vaikuttavan vesieliöiden käyttäytymiseen, kehityspoikkeamiin ja kuolleisuuteen (Booth ym.2015, Lee ja Lee 2015, Miceyska ym.2006, Montalvão ym. 2019, Slaughter ym.2011, Wright ym.2015). Altistuminen savuketumppi suotovedelle on vaikuttanut makean veden simpukan ja merisukasjalkaisen kolon kaivamistapaan sekä aiheuttanut nikotiinin akkumuloitumista maton kudoksiin (Montalvão ym.



2019 Wright ym. 2015). Wright ym. (2015) tutkimuksessa merisukasjalkainen oli vähemmän aktiivinen ja vähensi kaivamista, kun suotovesi pitoisuus oli yli 2 tumppia/l.

Muutokset käyttäytymisessä havaittiin myös merikotilolla Booth ym. (2015) tutkimuksessa pitoisuudella 1,25 tumppia/l, mutta tässä oli eroja merikotilo lajien välillä. Montalvão ym. (2019) tutkimuksessa havaittiin raskasmetallien kudoksiin akkumuloitumista ja mutageenisia muutoksia, makean veden simpukoilla, jotka oli alistettu luonnon olosuhteiden suhteen relevantille pitoisuudelle (<0,2 tumppia/l). Gill ym. (2018) laboratorio tutkimuksessa maaetanat välttivät aluetta, jossa oli eniten savuke tumppeja, mutta vastahakoisuus alueelle laski kolmen viikon testin aikana mahdollisesti toksisuuden laskiessa ajan kuluessa. Lisäksi muutoksia hiiren puolustuksessa havaittiin ympäristön kannalta alhaisella savuketumppi suotovesi pitoisuudella (Cardoso ym. 2018) sekä sytotoksisia ja mutageenisia muutoksia *Allium cepa* kasviuuren kasvusolukossa Montalvão ym. (2019) tutkimuksessa.

### 3.4.2 Toksisuus

Green ym. (2020) tutkimuksessa verrattiin selluloosa ja selluloosa-asetatti savuketumppien suotoveden toksisuutta vesi selkärangattomille, koe-eliöinä käytettiin vaeltajasimpukkaa, musta-laakamatoa, tanakkakiekkokotiloa ja hoikkasarvikotiloa. Kyseiset lajit valittiin tutkimukseen, koska ne löydetään tavallisesti Euroopan lampi ekosysteemeistä ja ne edustavat erilaisia ekosysteemin toimijoita kuten karikkeensyöjiä, raapijoita, suodattajia, saalistajia ja saalisorganismeja. Tutkimustulosten perusteella savuketumppi suotovesi, joka valmistettiin selluloosafilttereistä, oli yhtä haitallinen testieliöille kuin suotovesi selluloosa-asetatti filttäreistä. Suotovesi pitoisuus 5 tumppia/l oli letaali ~60 % aikuisille mustalaakamatoille, tanakkakiekkokotiloille ja hoikkasarvikotiloille sekä ~40 % aikuisille vaeltajasimpukoille, 48 h altistuksen jälkeen. Aikuisten yksilöiden kuolleisuus oli alhainen pitoisuudella 1 tumppi/l. Kuolleisuutta ei esiintynyt pitoisuudella 0,2 tumppia/l (Green ym.2020). Nuoret selkärangattomat ovat herkempiä yleensä toksiineille. Tämä myös huomattiin Green ym. tutkimustuloksissa, jossa varhaisemmassa

vaiheessa, olevat hoikkasarvikotilot olivat herkempiä pitoisuudelle 1 tumpppi/l kuin aikuiset yksilöt. Vaikka aikuisten yksilöiden kuolleisuus oli pieni suotovesi pitoisuudella 1 tumpppi/l, huomattiin merkittäviä muutoksia aktiivisuudessa. Tämä osoittaa testieliöihin kohdistuvasta stressistä, joka voi johtaa altistumisen jatkuessa kuolemaan (Green ym. 2020).

Savuketumppien on raportoitu ekotoksikologisissa tutkimuksissa, olevan toksisia meribakteeri *Alivibrio fischeri*:lle ja *Ceriodaphnia* äyriäiselle (Miceyska ym.2005), merikala *Atherinops affinis*:lle (Slaughter ym.2011, taulukko 1), merisukasjalkaiselle *Hediste diversicolor*:lle (Wright ym. 2015) ja kolmelle etana lajille (Booth ym. 2015, taulukko 1). Miceyska ym. (2005) tutkimuksessa poltettu filtteri oli toksisempi kuin ei poltettu ja toksisuus ilmeni meribakteerille pitoisuudella 0,48 mg tumppia/l. Malliorganismi *Alivibro fischeri* ei sovellu käytettäväksi ennustamaan savukkeiden tumppien toksisuutta muille mikrobilajeille, koska kullakin lajilla on monimutkainen vuorovaikutus verkosto ja meriympäristössä on läsnä metaboliaaltaan ja fylogeniikaltaan erilaisia mikrobisyhteisöjä. Tämän takia Quemener ym. (2020) tutkimuksessa käytettiin ympäristönäytteitä meren rannikon sedimentistä, jossa oli alkuperäinen mikrobisyhteisö. Tutkimuksessa arvioitiin laboratoriossa inkuboimalla sedimenttiin, ei poltetun sekä poltetun savukefiltterin vaikutus mikrobisyhteisön rakenteeseen, metallien levinneisyyteen ja ravinnepitoisuuksiin. Savukefiltterit muuttivat mikrobisyhteisön diversiteettiä ja ympäröivän ympäristön olosuhteita laskemalla pH:ta ja liuenneiden Cd, Mo ja V metallipitoisuuksia, missä Fe, Mn ja Zn metallipitoisuudet kasvoivat. Poltetun savukefiltterit aikaansaivat syanobakteerien ja heterotrofisten bakteerien runsauden laskua, missä samanaikaisesti heterotrofiset gammaproteobakteerit, firmikuutit runsastuivat.

Belzagui ym. (2021) tutkimuksessa määritettiin poltetun savukefiltteri suotoveden ja filtteristä liukenevien mikrokuitujen vaikutus *Daphnia magna*:n liikkuvuuteen/kuolleisuuteen. Testi jaettiin kahteen osaan, jossa yhdessä 10 poltettua savukefiltteriä sekoitettiin litraan tislattuun veteen 24 h ajan. Tämän jälkeen filtterit suodatettiin suotovedestä pois. Toisessa osassa 10 filtteriä leikattiin 1 mm mikrokuiduiksi ja sekoitettiin litraan tislattua vettä 24 h ajan. Pitoisuudella 0,620 poltettua filtteriä/l saavutettiin 100 % kuolleisuutta ei suodatetussa testissä ja pitoisuudella 0.888 poltettua filtteriä/l saavutettiin 100 % kuolleisuus suotovedellä ilman mikrokuituja. EC50 *Daphnia magna*:lle saavutettiin pitoisuudella 0,017 savukefiltteriä/l testissä, joka sisälsi mikrokuituja.

Laji	Savuketyppi	Pitoisuus	Suotovesi media	LC50	Tulokset	Lähde
<i>Austrocochlea porcata</i> , <i>Nerita atramentosa</i> , <i>Bembicium nanum</i>	Poltettu savuke (PS)	5 savuke tumppia/l	Tuore merivesi		Kuolleisuus 100 % 8 päivän altistuksen jälkeen. Kuolleisuutta ei esiintynyt 24 h altistuksen aikana.	Booth ym. 2015
<i>Oryzias latipes</i>	Poltettu savuke, ei poltettu savuke (EPS), poltettu filteri (PF), ei poltettu filteri (EPF)	Alhaiset pitoisuudet 0,2 - 2 savuke tumppia/l Korkeat pitoisuudet 5 - 10 savuke tumppia/l	Alkioneste		Alhaisilla pitoisuuksilla alkioilla esiintyi kiihtynyt syke ja muutoksia kuoriutumisessa. Korkeilla pitoisuuksilla sydämen syke laski ja lisäksi kuolleisuutta. Ei poltetuilla ei ollut vaikutusta korkeilla pitoisuuksilla.	Lee ja Lee 2015
<i>Hymenochirus curtipes</i> , <i>Clarias gariepinus</i>	Poltettu filteri, ei poltettu filteri	0,625–10 g/l	Deionisoitu vesi	Poltettu filteri 1,9 g/l ja ei poltettu filteri 4,8 g/l, neljän päivän altistus ajalla. Kahden päivän altistuksella PF 5,23 g/l ja EPF 33,5 g/l	Suotoveden aiheuttama kuolleisuus kasvoi sekä poltetulla että ei poltetulla pitoisuuden ja altistuksen ajan kasvaessa. Tilastollisesti merkittävä ero ilmeni 72 h ja 96 h altistuksen jälkeen. Poltetun toksisuus oli 2,5 korkeampi kuin ei poltetun filterin.	Lawal ja Ologundudu 2013
<i>Atherinops affinis</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Poltettu savuketumppi, poltettu filteri, ei poltettu filteri	8 savuke tumppia/l	Laimennettu vesi	Poltettu savuketumppi noin 1,0 tumppia/l molemmille lajille. Poltettu filteri 1,8 tumppia/l <i>Atherinops affinis</i> -lle ja 4,3 tumppia/l <i>Pimephales promelas</i> -lle. Ei poltettu filteri 5,1 tumppia/l <i>Atherinops affinis</i> -lle ja 13,5 savuke tumppia/l <i>Pimephales promelas</i> -lle. Altistusaika 4 päivää.	Poltetun filterin suotovesi oli toksinen molemmille lajille	Slaughter ym. 2011
<i>Oreochromis niloticus</i>	Poltettu savuketumppi, ei poltettu savuketumppi (EPST)	1 - 5 savuke tumppia/l	Hanavesi, josta on kloori poistettu		Poltetun filterin suotovesi oli toksisempi kuin ei poltetun. Seuraavassa järjestyksessä toksisuus ilmeni merkki 1:n poltettu savuketumppi pitoisuudella 1,346 tumppia/l, merkki 2:n poltettu savuketumppi pitoisuudella 2,271 tumppia/l, merkki 2 ei poltettu savuketumppi pitoisuudella 7,313 tumppia/l, merkki 1 ei poltettu savuketumppi pitoisuudella 5,559 tumppia/l.	Osuala ym. 2017
<i>Daphnia magna</i>	Poltettu filteri	10 poltettu filteri/l	Tislattu vesi	0,017 tumppia/l (0,0017 g/l)	Poltetun filterin pitoisuudella 0,620 tumppia/l saavutettiin 100 % kuolleisuus suotovesi + mikrokuitu testissä ja pitoisuudella 0,888 tumppia/l saavutettiin 100 % kuolleisuus suotovedellä ilman mikrokuituja	Belzagui ym. 2021

Taulukko 1. Savuketumppien toksisuus vesielioille. Muokattu Dobaradaran ym. (2021)

### 3.4.3 Yhteenveto

Savuketumppi roskat pitäisi kerätä haitallisena jätteenä ja niiden heittämistä luontoon pitäisi tiukemmin valvoa, jotta vältetään niiden aiheuttama haitta eliölle. Tupakointi on kielletty rannoilla joissakin maissa, kuten Yhdysvalloissa. Savuketumppit voivat kuitenkin päätyä vesistöihin toisia reittejä pitkin myös näillä alueilla. Toteutettujen tutkimusten perusteella voidaan todeta savuketumppien aiheuttavan riskin vesistöjen hyvinvoinnille.

Vaikka kiinteäjätteen säätely tiukentuu, savuketumppien käsittelystä tekee hankalaa niiden sisältämät ja niistä vuotavat kemikaalit. Ne voivat liueta kaatopaikalta pohjaveteen ja niiden polttaminen vapauttaa ilmaan saasteita sekä tuottaa toksista tuhkaa, joka sisältää raskasmetalleja. Mainitut syyt lisäävät myös savuketumppi roskan käsittelykustannuksia (Kadir ja Sarani 2015). Lisäksi savuketumppien kierrättämiseen ei ole vielä yksinkertaisia ja kustannustehokkaita metodeja sekä sopivia käsittelymenetelmiä sen sisältämille kemikaaleille. Savuketumppien käyttöä poltettuna savitiilinä on ehdotettu yhdeksi tavaksi kierrättää niitä ympäristöystävällisesti pitkäksi ajaksi. Tämä mahdollistaa toksisten kemikaalien sitomisen.

Savitiilen valmistusprosessin polttovaihe haihduttaa haitallisia aineita tumpeista, ja nämä vaativat myös asianomaista käsittelyä. Savuketumppi roskan määrän kasvaminen ja tietoisuuden lisääntyminen sen toksista vaikutuksista aiheuttavat painetta kehittää vaihtoehtoisia tapoja perinteisille kaatopaikalle ja poltto menetelmille.

## 4 Daphnia vesikirput

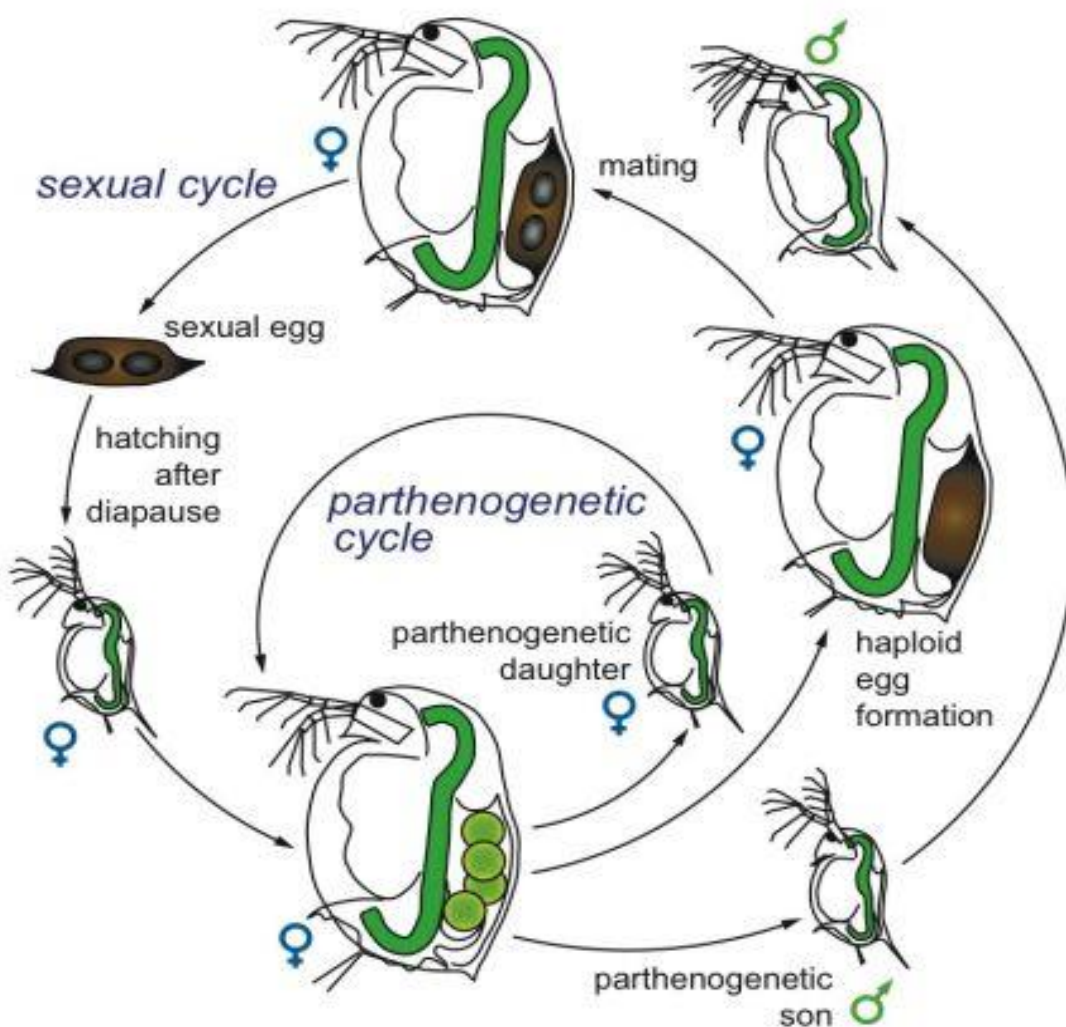
Daphniat ovat läpikuultavia vesikirppuja, jotka kuuluvat planktonisiin äyriäisiin. Vesikirppujen koko vaihtelee lajista riippuen 0,2–3,0 mm (luontoportti). Daphnian englanninkielinen nimi "waterflea", on peräisin niiden pomppivasta liikkeestä uinnin aikana. Tämän liikkeen aikaan saa niiden isot sykkivät tuntosarvet, joita ne käyttävät liikkeen ohjaamiseen vedessä. Ei liikkuva Daphnia uppoaa nopeasti pohjaan. Daphnioilla esiintyy myös pystysuora muuttoliike, jossa ne siirtyvät vesistöissä ylöspäin yön aikana ja takaisin alaspäin päivän aikana. Tämä käytös todennäköisesti kehittyi saalistajien välttämiseksi päivisin ja runsaan ravinnon laiduntamiseksi yöllä pintavedessä (Ebert D. 2005).

Daphniat ovat laajalle levinneet pohjoisessa hemisfäärissä, erityisesti arktisella alueella. Ne esiintyvät eri kokoisissa makean ja murtoveden vesistöissä kuten järvissä ja lammissa. Suuren kokoiset lajit kuten *Daphnia magna* voivat sietää jopa merivettä, jonka suolapitoisuus on 20 % (Ebert D. 2005). Daphniat ovat usein dominoiva eläinplankton ryhmä ja siten välttämätön osa järvien ja lampien ruokaverkkoa. Monissa järvissä Daphniat ovat ajoittain vallitseva ruoka planktonia syöville kaloille. Tästä johtuen lajit, jotka löydetään järvistä, joissa on planktonia syöviä kaloja, ovat pienempiä ja läpikuultavampia kuin lajit, jotka löydetään kalattomista vesistöistä.

Daphniat käyttävät ravintona mikroskooppisia- leviä ja hajoavaa elollista materiaalia, jonka ne suodattavat vedestä. Ravinto koostuu kuitenkin pääosin planktonisesta levästä. Vihreälevä onkin yksi parhaimmista ravinnoista Daphnioille ja osassa laboratorio tutkimuksissa käytetään Daphnia ravintona *Scenedesmus* tai *Chlamydomonas* levää. Daphniat yleensä käyttävät ravintona

partikkeleita, jotka ovat kooltaan 1  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ . Osa Daphnioista on myös petoja, jotka saalistavat mm. toisia vesikirppuja.

*Daphnia magna* yleensä laiduntaa pelaagisella alueella ja käyttää ravintona mikroskooppisia leviä, bakteereja ja hajoavaa elollista materiaalia. Ne osaavat myös hyödyntää myös pohjan päällyskasvustoa (perifyton) ja sedimenttiä ravinnon hankinnassa (Siehoff ym. 2008). Daphniat lisääntyvät pääsääntöisesti suvuttomasti partenogeneettisesti, mutta suvullista lisääntymistä voi esiintyä syksyisin, jolloin koiraitakin tavataan (kuva 2).



Kuva 2. Daphnian suvullinen ja suvuton lisääntyminen. Partiogeneettisen lisääntymisen aikana naaraat tuottavat diploidi munia, jotka kehittyvät suoraan tyttäriksi. Sama naaras voi tuottaa diploidi aseksuaalisia munia, joista kehittyvät poikasia. Lisäksi sama naaras voi tuottaa haploidi munia, jotka vaativat koiraan hedelmöitystä. Nämä munat suojataan kuorella ja tarvitsevat diapaussia ennen kuin naaraat kuoriutuvat niistä (Ebert D. 2005).

Varhaisessa elinvaiheessa olevien yksilöiden reduktio johtaa muutoksiin populaation dynamiikassa pitkillä ajanjaksoilla ja voi johtaa muutokseen makean veden ekosysteemin toimintaan ja biodiversiteettiin. Varhaisessa kehitysvaiheessa olevia yksilöitä käytetäänkin ensisijaisesti ekotoksikologisissa tutkimuksissa sekä laajasti teollisten kemikaalien kuten torjunta-aineiden, biosidien ja lääkkeiden toksisuuden arvioinnissa rekisteröimisprosessin aikana (Green ym.2020).

Tässä tutkimuksessa käytetään savukefilttereiden toksisuuden määrittämisessä *Daphnia magna* vesikirppuja. Niitä on käytetty laajasti jo vuosikymmeniin akuutin toksisuuden testaamiseen. Ne on helppo ylläpitää laboratorio olosuhteissa, koska niillä on lyhyt sukupolvien välinen aika ja niiden syöttäminen ja ylläpito on edullista ja helppoa. Niitä käytetään erilaisissa tutkimusaloissa kuten ekotoksikologiassa ja populaatio genetiikassa.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on määrittää ei poltetun ja poltetun savukefilterin mikromuovi/partikkelien sekä kemikaalien (suotovesi) vaikutus vesikirppu *Daphnia magna*:n kuolleisuuteen. Tavoitteena on myös selvittää, onko ei poltetun ja poltetun savukefilterin toksisuudessa merkittävää eroa ja onko suotoveden (kemikaalien) ja mikromuovi/partikkelien toksisuudessa merkittävää eroa.

## 5 Aineisto ja menetelmät

### 5.1 Filtrerien jauhaminen

Ei poltetun filttareiden lähteenä olivat kaupalliset RIZLA + savukefiltterit (halkaisija 8 mm). Poltetut filttarit olivat yliopiston tupakointialueen tupakka roskasta. Huhmareeseen laitettiin noin 5–11 filttaria, joista oli poistettu paperiosa. Kukin filttari leikattiin 4–5 osaan. Paloiteltujen filttareiden päälle lisättiin nestemäistä tyypeä (kuva 3) filttarien pintaan asti. Nestemäisen tyyden haihduttua ilmaan, filttarit murskattiin (Wright ym. 2015). Nestemäisen tyyden lisääminen ja murskaaminen toistettiin 5 kertaa, kunnes saatiin jauhomainen pulveri (kuva 4). Edellä mainitulla tavalla on tehty myös poltetujen filttarien jauhaminen (kuva 5). Filttari partikkelit (kuva 6) säilytettiin lasi pullossa huoneenlämmössä pimeässä kaapissa.



Kuva 3. Nestemäistä tyypeä käytettiin ehkäisemään muovin ylikuumentuminen filttareiden murskaamisen aikana.

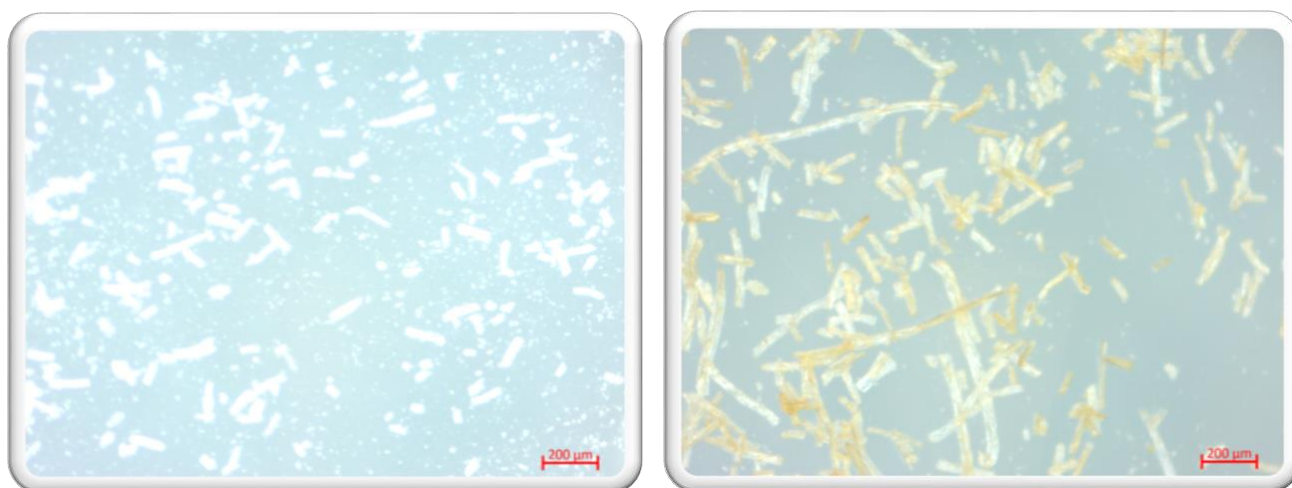


Kuva 4. Järjestyksessä vasemmalta oikealle ja alas filttereiden jauhamisprosessi kuvina. Ensimmäinen kuva vasemmalla ylhäällä on ensimmäisen nestemäisen tyypin lisäyksen ja murskauksen jälkeinen





Kuva 5. Käytettyjen filttareiden neljäs ja viides murskaus kertojen jälkeiset kuvat.



Kuva 6. Valomikroskooppi kuvat jauhetuista filttareistä. Vasen kuva ei poltettu filttari ja oikea kuva poltettu filttari.

## 5.2 Suotoveden valmistus

Poltettujen filttereiden suotoveden valmistamiseksi lisättiin litran pulloon 40,01 g filttäreitä, joista oli poistettu paperiosa, ja 500 ml keinotekoista makeaa vettä. Ei poltettujen filttarien suotoveden valmistamiseksi lisättiin puolen litran pulloon 20,07 g filttäreitä, joista oli poistettu paperiosa, ja 250 ml keinotekoista makeaa vettä. Suotovesikontrolli valmistettiin laittamalla litran pulloon 500 ml keinotekoista makeaa vettä. Pullot päällystettiin foliopaperilla fotokemiallisten reaktioiden ehkäisemiseksi ja laitettiin 160 rpm ravisteluun (kuva 7) 15 päiväksi.

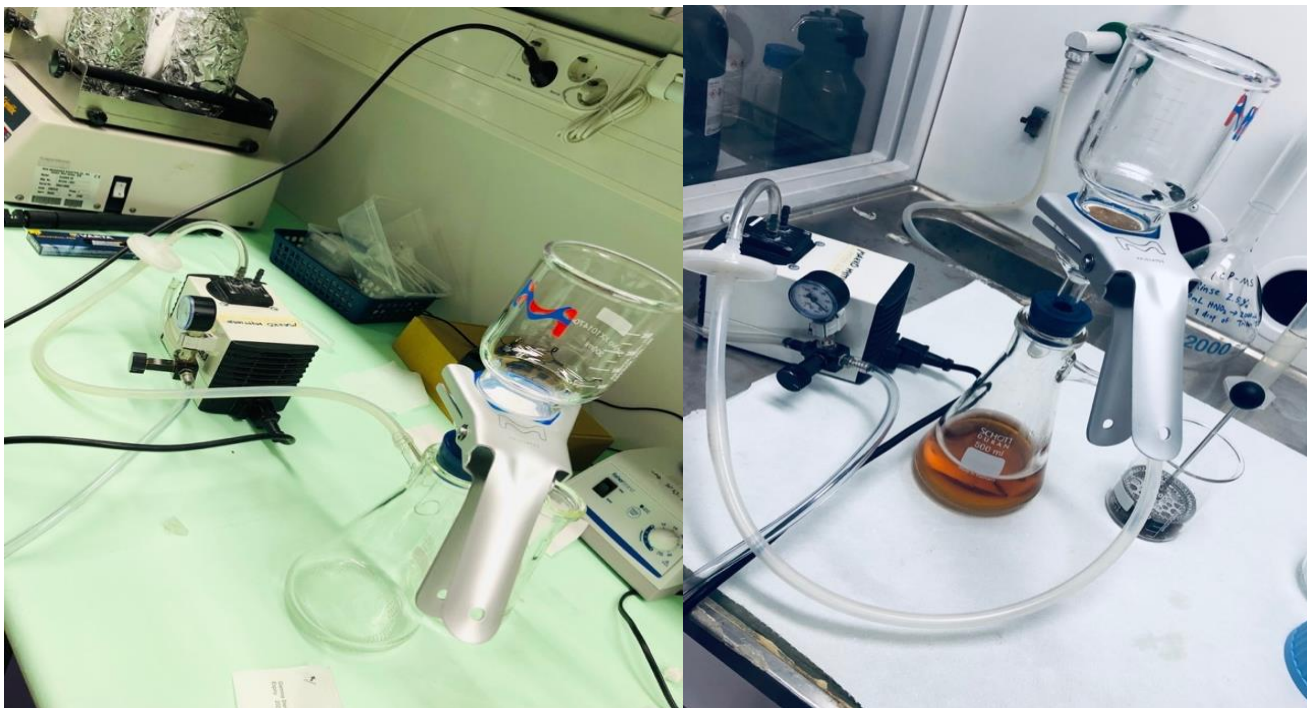
Keinotekoinen makea vesi:

- Milli Q vesi
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,50 \text{ mM}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,3 \text{ mM}$
- $\text{KCl} \rightarrow 3,1 \text{ mM}$
- $\text{NaHCO}_3 \rightarrow 0,77 \text{ mM}$



Kuva 7. Suotoveden valmistuksessa käytetty ravistelija

Filterri vesiseos erotettiin suodattamalla pumpun avulla käyttäen suodatinta, jonka huokoskoko oli  $0,22\ \mu\text{m}$  (kuva 8). Myös suotovesikontrolli suodatettiin samalla tavalla. Suotovedet ja jäljelle jääneet filtteripalat (kuva 9) säilytettiin jääkaapissa.



Kuva 8. Vasemmalla suodatusvälineet. Oikealla käytettyjen filttorien suotoveden suodatus vetokaapissa. Käytettyjen filttorien käsittelyssä käytetään hanskoja ja vetokaappia, niistä hahtuvien ja tarttuvien toksisten aineiden takia.



Kuva 9. Vasemmalla suotovedet ja oikealle filtteripalaset.

### 5.3 Toksisuustestit

Toksisuustestit toteutettiin kaupallisen kitin DAPHTOXKIT F ohjeiden mukaan. Kitin ohjeet noudattavat kansainvälisten organisaatioiden (ISO standardi 6341, OECD ohje 202) protokollaa.

Konsentraatioalue määritettiin poltetun filtterin suotovedellä, jonka pitoisuus oli 80 g/l. Suurimmaksi pitoisuudeksi testeihin valittiin 5 % pitoisuus suotovedestä (80 g/l), jossa kuolleisuus oli 100 % (kuva 12). Pitoisuudet laskettiin siitä, että 80 g/l vastaa 100 % pitoisuutta, josta sitten valmistettiin sekä suotovesi- että partikkelitestin vastaavat pitoisuudet 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l), 0,5 % (0,4 g/l), 0,25 % (0,2 g/l), 0,125 % (0,1 g/l) ja 0,025 % (0,02 g/l).

Veden fysikaaliskemialliset ominaisuudet; pH, sähkönjohtokyky, happi pitoisuus ja happi saturaatio mitattiin ennen vesikirppujen lisäämistä sekä testin lopussa 48 h tunnin päästä. Lämpötila mitattiin ja pidettiin  $20 \pm 1$  °C:ssa koko testin aikana. Valaistusolosuhteet olivat 16 h valossa ja 8 h pimeässä, pois lukien partikkelien toksisuus testeissä, joissa valaistusolosuhteet ei ole varmennettu.

Tulosten tilastollinen analyysi tehtiin SPSS ohjelmalla multivariantti ANOVA testillä. P-arvo  $\leq 0,05$  tulkitaan tilastolliseksi merkittäväksi tulokseksi. EC50 arvot saatiin annosvaste käyristä, jotka määritettiin USEPA 2016 TRAP ohjelman avulla.

#### 5.3.1 Konsentraatioalueen määrittäminen

Purkillinen kitin *Daphnia magna* munia asetettiin petrimaljaan (kuva 10), kuoriutumaan ilmastettuun *Daphnia magna* keinotekoiseen makea veteen. Lämpötila oli  $20 \pm 1$  ja valot olivat päällä koko kuoriutumisen ajan (72 h).

Oikean konsentraatioalueen määrittämiseksi toksisuustesteille, tehtiin erillinen toksisuustesti kolmella poltettujen filtterien suotovesi pitoisuuksilla (5,0 %, 0,5 %, 0,025 %). Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin 3 rinnakkaisesti ja lisäksi oli kolme rinnakkaiskontrollia, joissa oli



pelkästään hapetettua keinotekoista makeaa vettä. Pikkupulloihin pipetoitiin 10 ml testattavan pitoisuuden liuosta ja lisättiin 5 *Daphnia magna* vesikirppua. Vesikirput ruokittiin, noin 2 tuntia ennen siirtoa pikkupulloihin, yhdellä kitin Spirulina leväputkella. Vesikirppujen liikkuvuus määritettiin kustakin pikkupullosta 24 h ja 48 h kuluttua vesikirppujen asettamisesta pikkupulloihin.



Kuva 10. *Daphnia magna* vesikirppuja petrimaljassa.

### 5.3.2 Toksisuustesti suotovedellä

Kaksi purkillista kitin *Daphnia magna* munia asetettiin petrimaljaan kuoriutumaan ilmastettuun keinotekoiseen makea veteen. Lämpötila oli  $20 \pm 1$  ja valot olivat päällä koko kuoriutumisen ajan (72 h).

Toksisuustestit tehtiin seitsemällä poltettujen ja ei poltettujen filttorien suotovesipitoisuuksilla 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l), 0,5 % (0,4 g/l), 0,25 % (0,2 g/l), 0,125 % (0,1 g/l) ja 0,025 % (0,02 g/l). Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin neljä rinnakkaista. Lisäksi oli neljä rinnakkaista kontrollia tuoreella ja hapetetulla keinotekoisella vedellä sekä neljä rinnakkaista suotovesi-kontrollia.

Pikkupulloihin pipetoitiin 10 ml testattavan pitoisuuden liuosta ja lisättiin 5 *Daphnia magna* vesikirppua (kuva 11). Vesikirput ruokittiin, noin 2 tuntia ennen siirtoa pikkupulloihin, kahdella kitin Spirulina mikroleväputkella. Vesikirppujen liikkuvuus määritettiin kustakin pikkupullosta 24 h ja 48 h kuluttua vesikirppujen asettamisesta pikkupulloihin.



Kuva 11. Ei poltettujen filttorien suotovesitestit. Pikkupullot päällystettiin parafilmillä, johon tehtiin neljä reikää ilmanvaihtoa varten ja veden haihtumisen minimoimiseksi.

### 5.3.3 Toksisuustesti partikkeleilla

Kaksi purkillista kitin *Daphnia magna* munia asetettiin petrimaljaan, kuoriutumaan ilmastettuun keinotekoiseen makea veteen. Lämpötila oli  $20 \pm 1$  ja valot olivat päällä koko kuoriutumisen ajan (72 h).

Toksisuustestit tehtiin seitsemällä poltettujen ja ei poltettujen filtterien partikkeleilla, pitoisuuksilla 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l), 0,50 % (0,40 g/l), 0,25 % (0,20 g/l), 0,125 % (0,10 g/l) ja 0,025 % (0,020 g/l). Kantaliuokset, joista tehtiin laimennokset, valmistettiin testiä edeltävänä päivänä (noin 24 h ennen testin aloitusta). Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin 4 rinnakkaista. Lisäksi oli 4 rinnakkaista kontrollia tuoreella ja hapetetulla keinotekoisella makea vedellä.

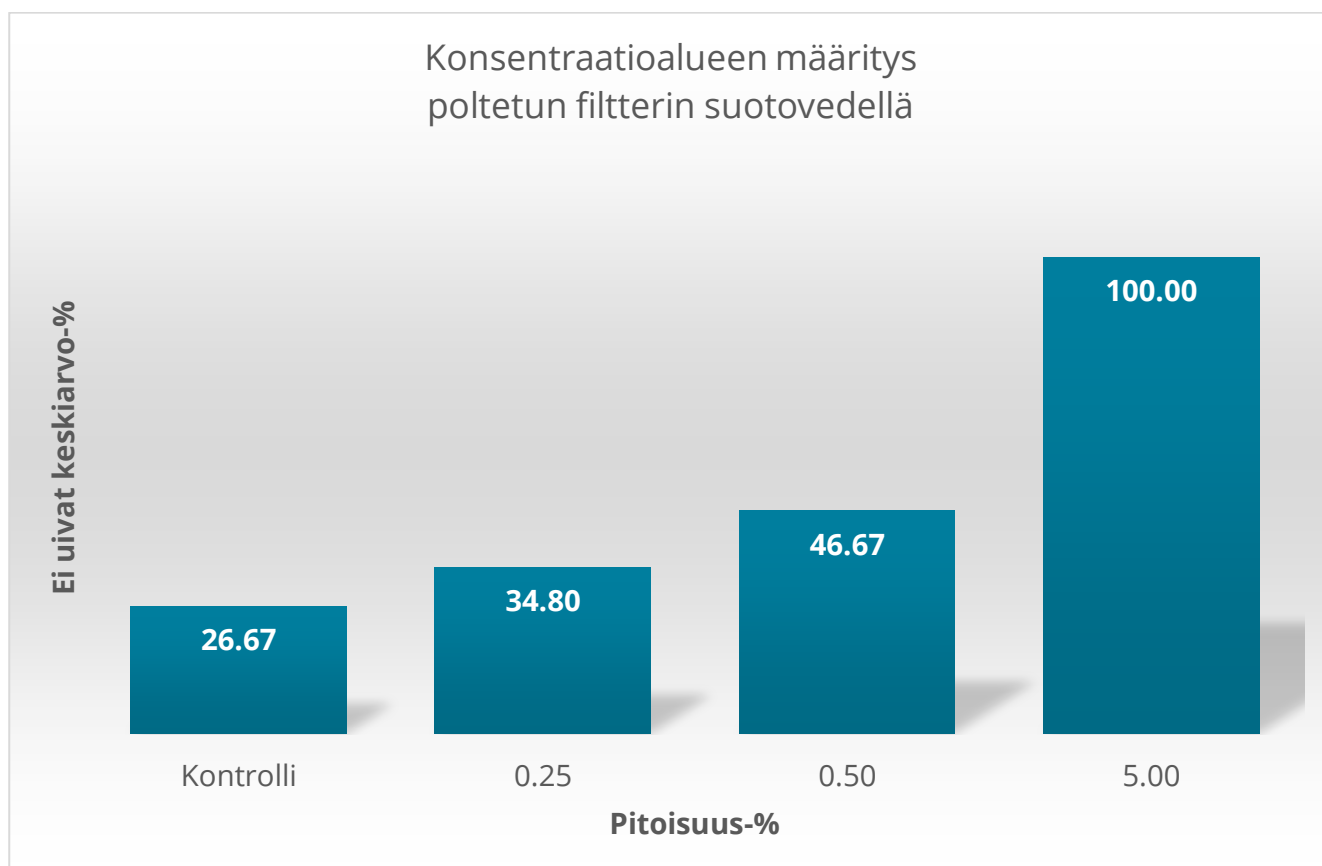
Pikkupulloihin pipetoitiin 10 ml testattavan pitoisuuden liuosta ja lisättiin 5 *Daphnia magna* vesikirppua. Vesikirput ruokittiin, noin 2 tuntia ennen siirtoa pikkupulloihin, kahdella kitin *Spirulina* mikroleväputkella. Vesikirppujen liikkuvuus määritettiin kustakin pikkupullosta 24 h ja 48 h kuluttua vesikirppujen asettamisesta pikkupulloihin.

## 6 Tulokset

Kitin ohjeiden mukaan *Daphnia magnat*, jotka eivät ui 15 sekunnin pehmeän ravistelun jälkeen tulkitaan liikkumiskyvyttöiksi ja kuolleiksi, vaikka osa niiden antennista liikkuvat. Liitteissä tuloksissa on eritelty uivat ja liikkuvat, jolloin liikkuvat kuvaa uimakyvyttömiä yksilöitä, joiden antennista osa liikkuu. Kaikkien testien rinnakkaistulokset ja fysikaaliskemialliset tiedot 24 h ja 48 h altistuksen jälkeen löytyvät liitteistä 1–5.

## 6.1 Konsentraatioalueen määrittäminen

Kaikki vesikirput olivat uima- ja liikkumiskyvyttömiä pitoisuudessa 5,0 % (4,0 g/l) ja sen perusteella varsinaisten toksisuustestien pitoisuusalueeksi valittiin alle 5,0 % (4,0 g/l) pitoisuudet. Kuolleisuus kasvoi lineaarisesti pitoisuuden kasvaessa (kuva 12).

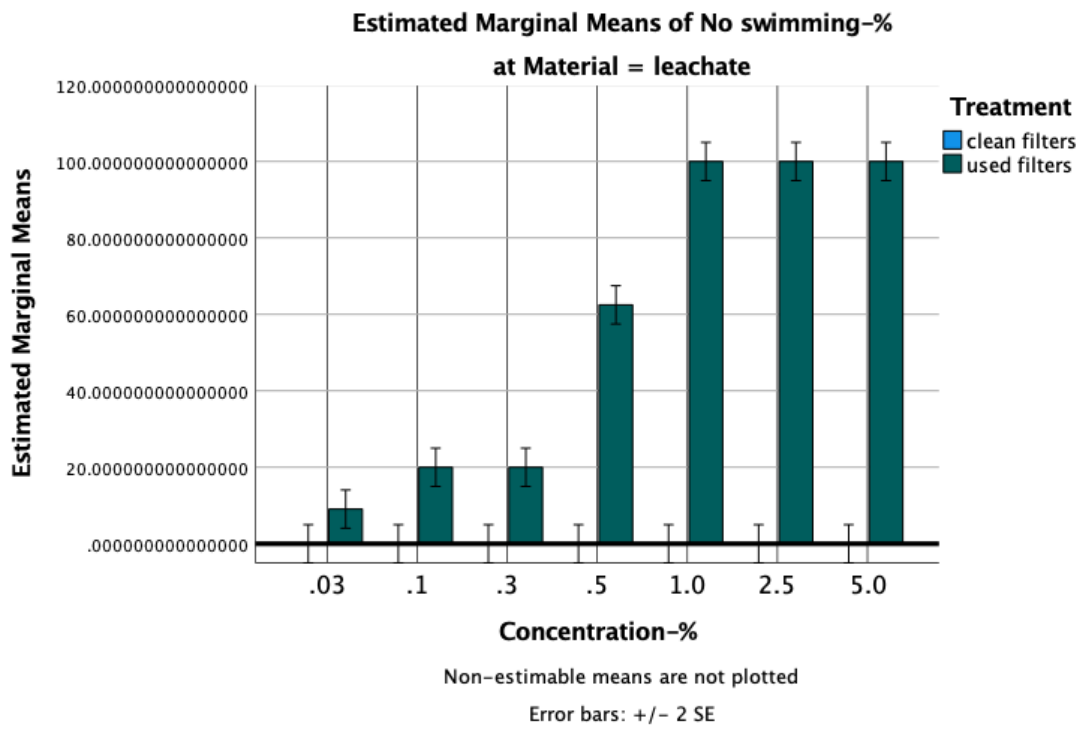


Kuva 12. Daphnia magnan toksisuustesti poltetulla savukefilteri suotovedellä

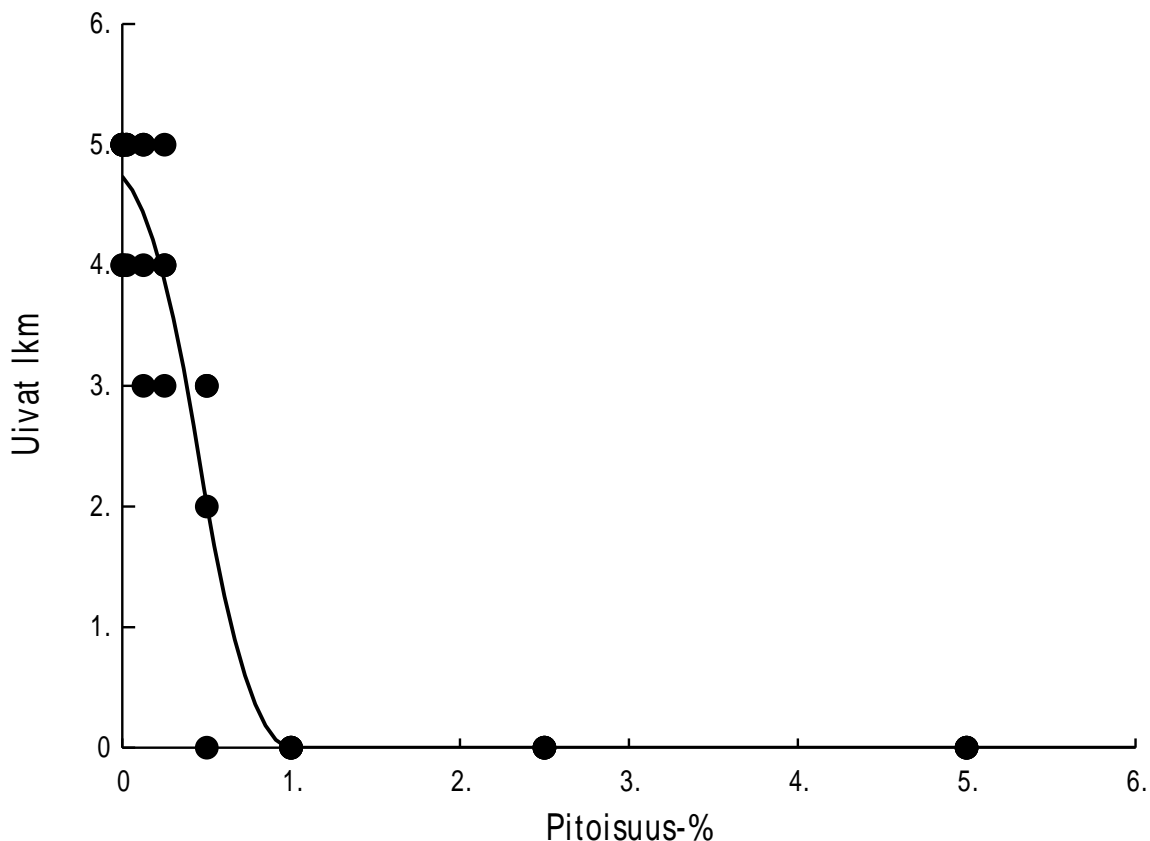
## 6.2 Toksisuustestit savukefilteri suotovedellä

Kaikki vesikirput olivat uima- ja liikkumiskykyisiä kaikilla ei poltetun savukefilterin suotovesi pitoisuuksilla (kuva 13). Poltetun savukefilterin suotovesitestissä, ei uivien osuus kasvaa pitoisuuden kasvaessa (kuva 11). Pitoisuuksilla 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l) ja 1,0 % (0,80 g/l) kaikki vesikirput ovat kuolleita tai eivät ui. Pitoisuudella 0,46 % (0,37 g/l) saavutetaan poltettujen filtereiden suotoveden EC50 arvo Daphnia magnalle (kuva 14). tällöin puolet vesikirpuista olivat uimakyvyttömiä.





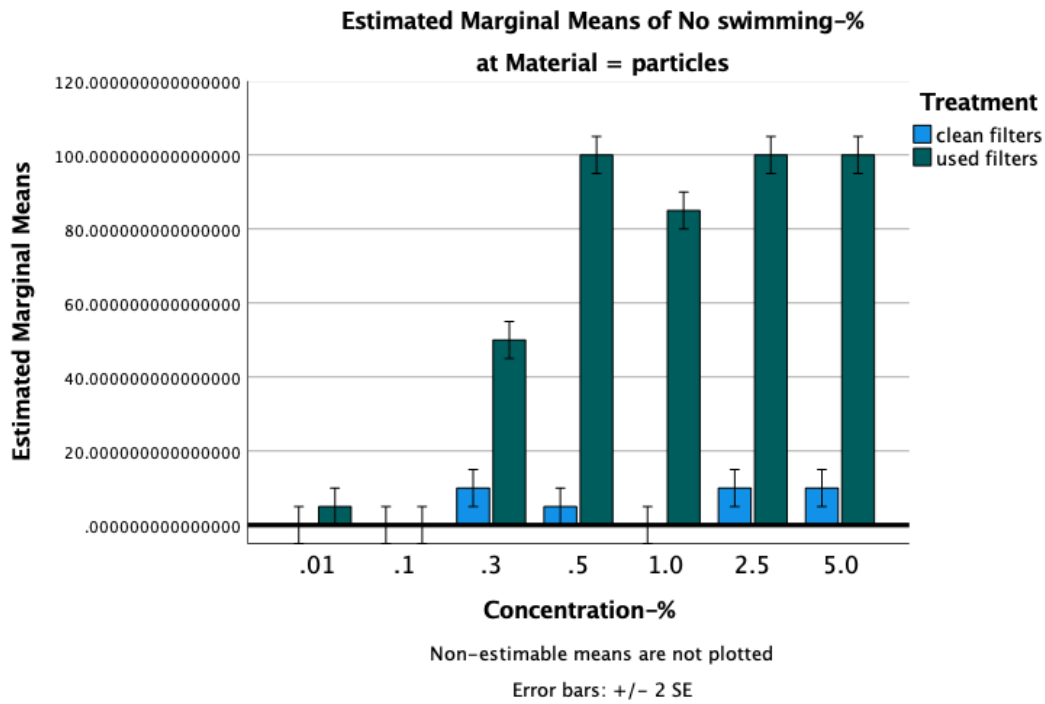
Kuva 13. *Daphnia magna* toksisuudesta seitsemällä ei poltetun ja poltetun filterin suotovesi pitoisuudella. 48 h altistus.



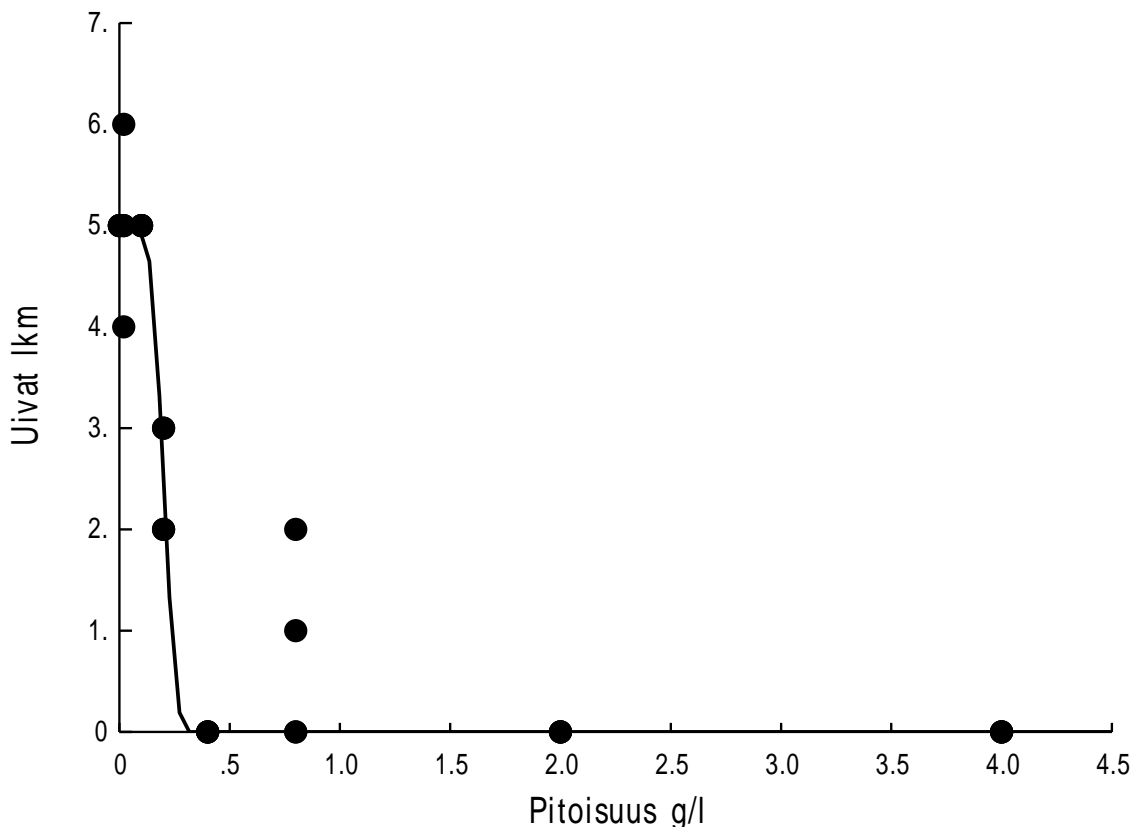
Kuva 14. Poltettujen filttereiden suotovesitestin EC50 kuvaaja. Y-akselissa on neljän rinnakkaisnäytteen uivien vesikirppujen lukumäärä tietyssä pitoisuudessa. Uivat lukumäärä 5 vastaa 0 % kuolleisuutta ja uivat lukumäärä 0 vastaa 100 % kuolleisuutta. Tässä tutkimuksessa uimakyvytön tulkitaan kuolleeksi. X-akselissa on testi pitoisuudet 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l), 0,5 % (0,4 g/l), 0,25 % (0,2 g/l), 0,125 % (0,1 g/l) ja 0,025 % (0,02 g/l). EC50 saavutettiin pitoisuudella 0,46 % (0,37 g/l).

### 6.3 Toksisuustestit savukefilteri partikkeleilla

Ei poltetun savukefilterin partikkelit vaikuttivat enintään 10 % *Daphnia magnan* uimiskykyyn pitoisuuksilla 0,25 % (0,20 g/l), 0,50 % (0,4 g/l), 2,5 % (2,0 g/l) ja 5,0 % (4,0 g/l) (kuva 15). Kontrolleissa ei ilmennyt vaikutusta. Poltetun savukefilterin partikkelit vaikuttivat 100 % pitoisuuksilla 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l) ja 0,50 % (0,40 g/l) (kuva 15). Kun verrataan poltetun ja ei poltetun savukefilterin partikkelien vaikutusta, huomataan että toksisuus on selvästi suurempi poltetun savukefilterin partikkeleilla. EC50 arvo saavutettiin poltetun savukefilterin partikkelitestissä pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l), tällöin puolet vesikirpuista olivat uimakyvyttömiä (kuva 16).



Kuva 15. Daphnia magnan toksisuus testi seitsemällä ei poltetun ja poltetun savukefiltterin partikkeli pitoisuudella. 48 h altistus.



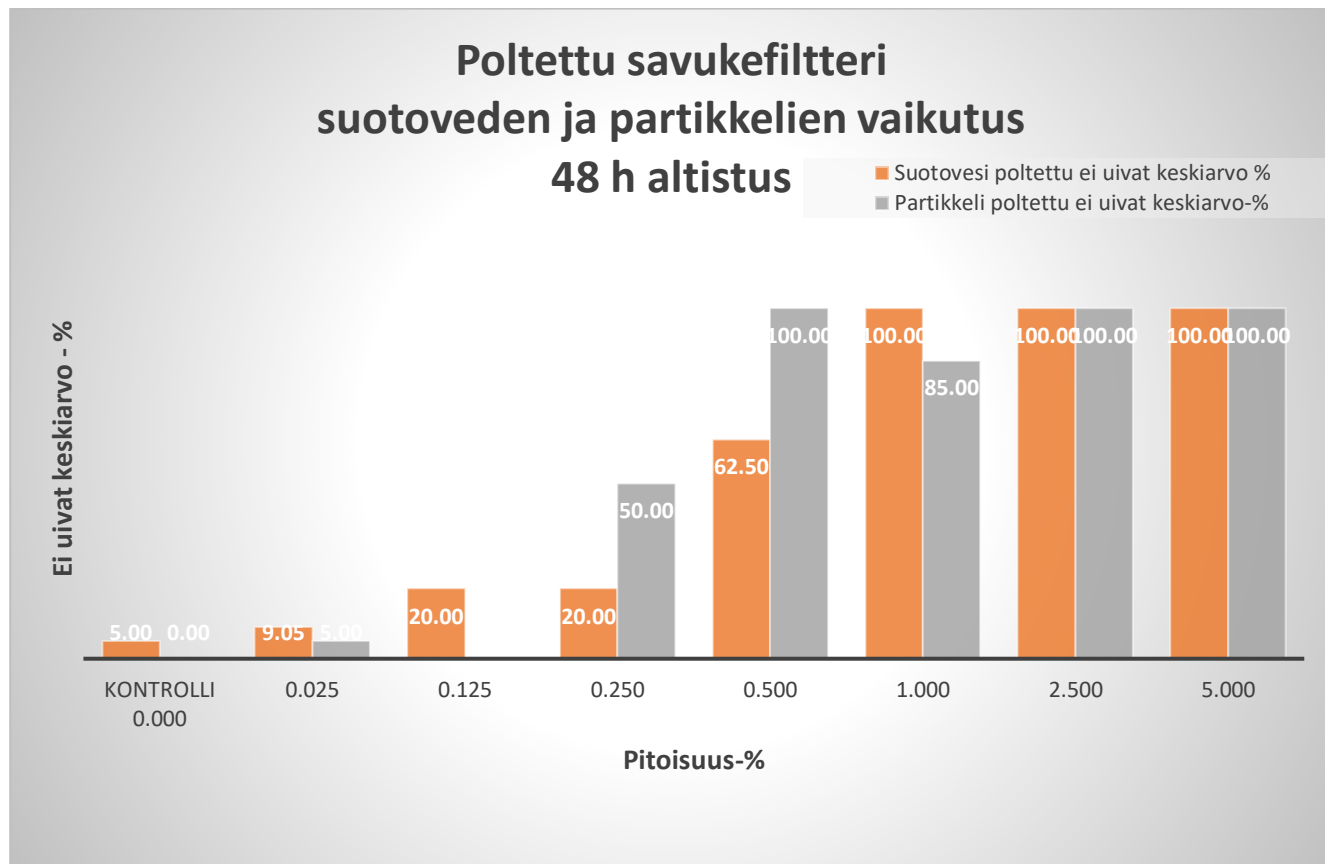
Kuva 16. Poltettujen filttereiden partikkelitestin EC50 kuvaaja. Y-akselissa on neljän rinnakkaisnäytteen uivien vesikirppujen lukumäärä tietyssä pitoisuudessa. Uivat lukumäärä 5 vastaa 0 % kuolleisuutta ja uivat lukumäärä 0 vastaa 100 % kuolleisuutta. Tässä tutkimuksessa uimakyvytön tulkitaan kuolleeksi. X-akselissa on testi pitoisuudet 5,0 % (4,0 g/l), 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l), 0,5 % (0,4 g/l), 0,25 % (0,2 g/l), 0,125 % (0,1 g/l) ja 0,025 % (0,02 g/l). EC50 savutettiin pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l)

#### 6.4 Poltettujen filttereiden tulosten vertailu ja tulosten tilastollinen analyysi

Poltetun savukefiltterin partikkelien ja suotoveden toksisuus on sama 48 h altistuksen jälkeen, pitoisuuksilla 5,0 % (4,0 g/l) ja 2,5 % (2,0 g/l). Pitoisuuksilla 0,50 % (0,40 g/l) ja 0,25 % (0,20 g/l) partikkelien vaikutus on suurempi. Pitoisuuksilla 1,0 % (0,80 g/l) ja 0,125 % (0,10 g/l) suotoveden vaikutus on suurempi kuin partikkelien (kuva 17).

Poltetun savukefiltterin suotovesi testissä pitoisuudella 1,0 % (0,8 g/l) näkyi muutoksia vesikirppujen aktiivisuudessa 24 h altistuksen jälkeen. Pitoisuudella 0,5 % (0,4 g/l) havaittiin muutos liikkeiden aktiivisuudessa 48 h altistuksen jälkeen. Poltetun savukefiltterin partikkeli testissä muutos aktiivisuudessa havaittiin pitoisuudella 0,25 % (0,2 g/l) 24 h ja 48 h altistuksen

jälkeen. Toksisuus/kuolleisuus ilmeni poltettu savukefilteri suotovesitestissä pitoisuudella 0,125 % (0,10 g/l) ja pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l) poltettu savukefilteri partikkelitestissä.



Kuva 17. Daphnia magnan toksisuustestit seitsemällä poltetulla savukefilteri partikkeli ja suotovesi pitoisuuksilla.

Poltettu filteri (keskiarvo kuolleet= 34,00 %) on 24 tunnin altistuksen jälkeen tilastollisesti merkittävästi toksisempi p arvolla 0,000, kuin ei poltettu filteri (keskiarvo kuolleet= 1,00 %). Partikkeli testin kuolleisuus (keskiarvo kuolleet= 23,21 %) on myös tilastollisesti merkittävästi toksisempia p arvolla 0,030, kuin suotovesitesti (keskiarvo kuolleet=11,36 %).

Poltettu filteri (keskiarvo kuolleet= 60,825 %) on 48 tunnin altistuksen jälkeen tilastollisesti merkittävästi toksisempi p arvolla 0,000, kuin ei poltettu filteri (keskiarvo kuolleet= 2,500 %). Partikkelitestin kuolleisuus (keskiarvo kuolleet= 33,929 %) on myös lähellä tilastollisesti merkittävää eroa p arvolla 0,052, kuin suotovesitesti (keskiarvo kuolleet=29,396 %).

## 7 Tulosten tarkastelu

Testi olosuhteet täyttivät alla mainittuja kriteerejä ja voidaan näin ollen todeta testit luotettaviksi (liite 2, 3, 4, 5):

- Kuolleiden vesikirppujen määrä kontrolleissa alle 10 %
- pH alue 6–9 testin alussa ja lopussa
- pH ei saisi vaihdella testissä 1.5 yksikköä enemmän
- Laimennus vedellä pitää olla happi saturaatio
- Happi konsentraation pitää olla testin lopussa  $\geq 3$  mg/l sekä kontrolleissa että kokeissa.

Partikkeli seosten valmistuksessa käytettiin kaksi välilaimennosta. Välilaimennoksesta 5,0 % (4,0 g/l) valmistettiin pitoisuudet 2,5 % (2,0 g/l), 1,0 % (0,8 g/l) ja välilaimennoksesta 0,50 % (0,40 g/l) valmistettiin pitoisuudet 0,25 % (0,2 g/l), 0,125 % (0,1 g/l), 0,025 % (0,02 g/l). Liuosten valmistaminen partikkeleista oli hankalaa, koska osa partikkeleista kerääntyi hyvin nopeasti nesteeseen pinnalle, seoksen ravistelusta huolimatta. Tämä on voinut aiheuttaa, että välilaimennoksesta 5,0 % valmistettu 1,0 % laimennos on laimeampi kuin suoraan välilaimennoksesta otettu 0,50 % pitoisuus. Tämä todennäköisesti selittää sen, että tuloksissa *Daphnia magna* kuolleisuus on suurempi laimeammalla 0,5 % laimennoksella kuin 1,0 % laimennoksella sekä poltetulla että ei poltetulla savukefiltterin partikkeleilla (kuva 15).

Ei poltetun filtterin partikkelitestissä oli enintään 10 % kuolleisuus suuremmilla pitoisuuksilla, joka on testin raja-arvo kontrollin validointiin, joten sen ei voida tulkita yksiselitteisesti johtuvan partikkelien toksisuudesta. Näin ollen tässä testissä ei poltetun filtterin suotovesi- ja partikkelitesteillä ei ollut merkittävää vaikutusta *Daphnia magna* kuolleisuuteen. Lawal ja Ologundudu (2013) tutkimuksessa on kuitenkin todettu ei poltetun filtterin suotoveden toksisuuden lisääntymistä altistumisajan ja pitoisuuden lisääntyessä (taulukko 1).

Testin aikana vesikirppujen käytös muuttui esim. uinnin hidastumisella pitoisuuden kasvaessa. Poltetun filtterin suotovesitestissä pitoisuudella 1,0 % (0,8 g/l) näkyi muutoksia vesikirppujen aktiivisuudessa 24 h altistuksen jälkeen. Pitoisuudella 0,5 % (0,4 g/l) havaittiin muutokset liikkeen

aktiivisuudessa 48 h altistuksen jälkeen. Poltetun filtterin partikkelitestissä muutos aktiivisuudessa havaittiin pitoisuudella 0,25 % (0,2 g/l) 24 h ja 48 h altistuksen jälkeen. Aktiivisuuden laskua on huomattu myös Wright ym. 2015 tutkimuksissa, jossa merisukasjalkainen oli vähemmän aktiivinen ja vähensi kaivamista, kun suotovesi pitoisuus oli yli 2 tumppia/l (0,2 g/l).

Miceyska ym. (2005) tutkimuksessa poltettu filttteri suotoveden toksisuus ilmeni meribakteerille pitoisuudella (0,00048 g/l). Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perustella poltetun savukefiltteri aiheuttaa kuolleisuutta vesikirpulle pitoisuuksilla 0,125 % (0,10 g/l) suotovesitestissä ja 0,25 % (0,20 g/l) partikkelitestissä. Tämän perusteella voidaan tulkita, että *Daphnia magna* sietää paremmin toksisuutta kuin kyseinen meribakteeri.

Poltettu filttteri oli toksisempi kuin ei poltettu kuten on todettu myös tutkimuksissa Lawal ja Ologundudu (2013), Lee ja Lee (2015), Osuala ym. (2017) ja Slauhgtter ym. (2011). Slaughter ym. (2013) tutkimuksessa poltetun filtterin suotoveden EC50 arvo oli 0,11 g/l *Atherinops affinisille* ja 0,097 g/l *Pimephales promelakselle* neljän päivän altistuksen jälkeen. Molemmat EC50 arvot ovat pienemmät, kuin tässä tutkimuksessa saatu poltetun filtterin suotoveden EC50 arvo (0,37 g/l) *Daphnia magnalle* kahden päivän altistus ajalla. Tämä todennäköisesti johtuu pidemmästä altistusajasta, jolloin pienemmällä pitoisuudella saavutetaan suurempi toksisuus altistusajan kasvaessa ja lajien välisestä erosta. Toisaalta Ologundudu (2013) tutkimuksessa saavutettiin EC50 arvo suuremmalla pitoisuudella (5,23 g/l, *Hymenochirus curtipes*, *Clarias gariepinus*) neljän päivän altistusajalla kuin *Daphnia magnalle*. Tämä ero voi johtua lajien välisestä erosta sietää savukefiltterien sisältämiä toksisia aineita.

Tässä tutkimuksessa saatiin poltetun filtterin suotovedellä 50 % kuolleisuus *Daphnia magnalle* 48 h altistuksen jälkeen pitoisuudella 0,37 g/l. Hyvin läheiseen tulokseen päädyttiin Green ym. (2020) tutkimuksessa, jossa poltetun filtterin suotovesi pitoisuus 0,50 g/l oli letaali ~60 % aikuisille musta laakamatoille, tanakkakiekkokotiloille ja hoikkasarvikotiloille sekä ~40 % aikuisille vaeltajasimpukoille, 48 h altistuksen jälkeen.

Tässä tutkimuksessa EC50 arvo saavutettiin poltetuille filterin partikkeleille pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l). Belzagui ym. (2021) tutkimuksessa EC50 *Daphnia magna*:lle saavutettiin pitoisuudella 0,0017 g/l testissä, jossa oli poltetun filterin suotovettä ja filterin mikrokuituja 48 h altistuksen jälkeen. Belzagui toksisuustesti oli samankaltainen kuin toteutettu tutkimus pois lukien suotoveden ja partikkelien/mikromuovin valmistus. EC50 pitoisuus on huomattavasti suurempi tässä tutkimuksessa. Tämä voi mahdollisesti johtua mikrokuitu muodon olevan toksisempi kuin jauhemainen pulveri, jota käytettiin tässä tutkimuksessa, käytettyjen savukebrändien ero toksisuudesta, brändien suhteellinen osuus tutkimuksissa, ero toksisten kemikaalien pitoisuudessa tai keinotekoisesti poltetun ja luonnollisesti poltetun filterien välisestä erosta.

Partikkelitestin kuolleisuus (keskiarvo kuolleet= 33,929 %) verrattuna suotovesitestin kuolleisuuteen (keskiarvo kuolleet=29,396 %) on p (0,052) arvoltaan lähellä tilastollisesti merkittävää eroa (48 h altistus). Partikkelitestin kantaliuokset valmistettiin noin yksi päivä ennen testiä, joten partikkeleista on liuennut myös kemikaaleja tämän ajan. Kuitenkin suotovesitestissä kemikaaleja on ehtinyt liueta filtereistä jo 15 päivän ajan ja kuolleisuuden odottaisi olevan suurempi suotovesitestissä. Toisaalta partikkeleista (kuva 4 ja 5) voi liueta suuremman pinta-alansa takia kemikaaleja tehokkaammin kuin filteri paloista (kuva 9). Tulosten perusteella voidaan olettaa partikkelien ja niistä yhden päivän aikana liuenneiden kemikaalien olevan toksisempia kuin pelkkä suotovesi. Lisätutkimusta tarvitaan, varmentamaan onko partikkelien toksisuutta lisäävä vaikutus tilastollisesti merkittävä.



## 8 Yhteenveto

Poltetun savukefiltterin suotovesitestissä pitoisuudella 1,0 % (0,8 g/l) ilmeni vesikirppujen aktiivisuuden laskua 24 h altistuksen jälkeen. Pitoisuudella 0,5 % (0,4 g/l) havaittiin aktiivisuuden laskua 48 h altistuksen jälkeen. Poltetun savukefiltterin partikkelitestissä lasku aktiivisuudessa havaittiin pitoisuudella 0,25 % (0,2 g/l) 24 h ja 48 h altistuksen jälkeen. Toksisuus/kuolleisuus ilmeni poltettu savukefilteri suotovesitestissä pitoisuudella 0,125 % (0,10 g/l) ja pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l) poltettu savukefilteri partikkelitestissä.

Ei poltetun savukefiltterin suotovesi ei aiheuttanut *Daphnia magnalle* toksisuutta/kuolleisuutta kaikilla pitoisuuksilla. Ei poltetun savukefiltterin mikromuovi/partikkelit eivät vaikuttaneet merkittävästi *Daphnia magnan* kuolleisuuteen ( $p=1,000$ ). Poltettu savukefilteri lisää sekä suotovesi- että partikkelitestissä *Daphnia magnan* kuolleisuutta tilastollisesti merkittävästi pitoisuuden kasvaessa ( $p=0,000$ ). Pitoisuudella 0,46 % (0,37 g/l) saavutettiin poltetun filterin suotoveden EC50 arvo. EC arvo saavutettiin poltetun filterin partikkelitestissä, pitoisuudella 0,25 % (0,20 g/l). Poltettujen filttareiden partikkeli testissä kuolleisuus oli suurempi kuin poltettujen filttareiden suotovesitestissä. Lisätutkimusta tarvitaan, varmentamaan onko partikkelien toksisuutta lisäävä vaikutus tilastollisesti merkittävä.

Lisätutkimusta myös tarvitaan määrittämään ei poltettujen savukefilttereiden suotoveden ja partikkeleiden toksisuus *Daphnia Magnalle* mm. lisäämällä altistusaikaa. Pienien pitoisuuksien vaikutusta on tärkeä huomioida koska ympäristössä altistusaika on pitkä ja filttarien muovi ei maadu ympäristössä. Filttareista liukenevien kemikaalien vaikutus korostuu erityisesti pienissä ekosysteemeissä kuten lammissa, jossa vedenvaihtoa ei ole ja savuketumppit toimivat kontaminaation lähteenä.

## 9 Lähdeluettelo

14:00-17:00 (n.d.). *ISO 6341:2012*. [online] ISO. Available at:

<https://www.iso.org/standard/54614.html> [Accessed 23 Apr. 2022].

archive.epa.gov. (2016). TRAP | Research | US EPA. [online] Available at:

[https://archive.epa.gov/med/med\\_archive\\_03/web/html/trap.html](https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/trap.html) [Accessed 11 Dec. 2022].

Belzagui, F., Buscio, V., Gutiérrez-Bouzán, C. and Vilaseca, M. (2021). Cigarette butts as a microfiber source with a microplastic level of concern. *Science of The Total Environment*, 762, p.144165. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144165.

Bonanomi, G., Incerti, G., Cesarano, G., Gaglione, S.A. and Lanzotti, V. (2015). Cigarette Butt Decomposition and Associated Chemical Changes Assessed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR. *PLOS ONE*, 10(1), p.e0117393. doi:10.1371/journal.pone.0117393.

Booth, D.J., Gribben, P. and Parkinson, K. (2015). Impact of cigarette butt leachate on tidepool snails. *Marine Pollution Bulletin*, [online] 95(1), pp.362–364. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.004.

Chircop, A., Coffen-Smout, S. and McConnell, M. (2011). Annual Report of the International Ocean Institute. *Ocean Yearbook Online*, 25(1), pp.499–529. doi:10.1163/22116001-92500025.

D., E. (2005). *Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. [online] U.S National Library of Medicine, p.Chapter 2. Introduction to Daphnia Biology. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.

Dieter, E. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. [online] National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), p.Chapter 2. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>.

Dobaradaran, S., Soleimani, F., Akhbarizadeh, R., Schmidt, T.C., Marzban, M. and BasirianJahromi, R. (2021). Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. *Environmental Research*, 195, p.110881. doi:10.1016/j.envres.2021.110881.

Gong, M., Daniels, N. and Poppendieck, D. (2020). Measurement of chemical emission rates from cigarette butts into air. *Indoor Air*, 30(4), pp.711–724. doi:10.1111/ina.12648.

Green, D.S., Boots, B., Sigwart, J., Jiang, S. and Rocha, C. (2016). Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environmental Pollution*, 208, pp.426–434. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.010.

- Green, D.S., Kregting, L. and Boots, B. (2020). Smoked cigarette butt leachate impacts survival and behaviour of freshwater invertebrates. *Environmental Pollution*, 266, p.115286. doi:10.1016/j.envpol.2020.115286.
- Henderson, J.R. (2001). A Pre- and Post-MARPOL Annex V Summary of Hawaiian Monk Seal Entanglements and Marine Debris Accumulation in the Northwestern Hawaiian Islands, 1982–1998. *Marine Pollution Bulletin*, 42(7), pp.584–589. doi:10.1016/s0025-326x(00)00204-6.
- Joly, F.-X. and Coulis, M. (2018). Comparison of cellulose vs. plastic cigarette filter decomposition under distinct disposal environments. *Waste Management*, 72, pp.349–353. doi:10.1016/j.wasman.2017.11.023.
- Kadir, A.A. and Sarani, N.A. (2015). Cigarette Butts Pollution and Environmental Impact – A Review. *Applied Mechanics and Materials*, 773-774(1662-7482), pp.1106–1110. doi:10.4028/www.scientific.net/amm.773-774.1106.
- luontoportti.com. (n.d.). *Vesikirput, Cladocera - Itämeri - LuontoPortti*. [online] Available at: <https://luontoportti.com/t/2973/vesikirput> [Accessed 20 Apr. 2022].
- M.S, Lawal and S.O, Ologundudu. (2013). Toxicity of cigarette filter leachates on *Hymenochirus Curtipes* and *Clarias gariepinus* in Nigeria. *Journal of Environmental Extension*, 11.
- Micevska, T., Warne, M.St.J., Pablo, F. and Patra, R. (2005). Variation in, and Causes of, Toxicity of Cigarette Butts to a Cladoceran and Microtox. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(2), pp.205–212. doi:10.1007/s00244-004-0132-y.
- Montalvão, M.F., Chagas, T.Q., Gabriela da Silva Alvarez, T., Mesak, C., Pereira da Costa Araújo, A., Gomes, A.R., Emmanuela de Andrade Vieira, J., Rocha, T.L. and Malafaia, G. (2019). Cigarette butt leachate as a risk factor to the health of freshwater bivalve. *Chemosphere*, [online] 234, pp.379–387. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.06.100.
- Quéméneur, M., Chifflet, S., Akrouf, F., Bellaaj-Zouari, A. and Belhassen, M. (2020). Impact of cigarette butts on microbial diversity and dissolved trace metals in coastal marine sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 240(106785), p.106785. doi:10.1016/j.ecss.2020.106785.
- Selmar, D., Radwan, A., Abdalla, N., Taha, H., Wittke, C., El-Henawy, A., Alshaal, T., Amer, M., Kleinwächter, M., Nowak, M. and El-Ramady, H. (2018). Uptake of nicotine from discarded cigarette butts – A so far unconsidered path of contamination of plant-derived commodities. *Environmental Pollution*, [online] 238, pp.972–976. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.113.
- Siciliano, A., Gesuele, R., Pagano, G. and Guida, M. (2015). *How Daphnia (Cladocera) Assays may be used as Bioindicators of Health Effects?* [online] ResearchGate. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/286890776> [Accessed 20 Oct. 2015].
- Siehoff, S., Hammer-Wirtz, M., Strauss, T. and Ratte, H.T. (2009). Periphyton as alternative food source for the filter-feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*, 54(1), pp.15–23. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02087.x.

- Slaughter, E., Gersberg, R.M., Watanabe, K., Rudolph, J., Stransky, C. and Novotny, T.E. (2011a). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, [online] 20(Supplement 1), pp.i25–i29. doi:10.1136/tc.2010.040170.
- Slaughter, E., Gersberg, R.M., Watanabe, K., Rudolph, J., Stransky, C. and Novotny, T.E. (2011b). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, [online] 20(Supplement 1), pp.i25–i29. doi:10.1136/tc.2010.040170.
- Soleimani, F., Dobaradaran, S., Vazirizadeh, A., Mohebbi, G., Ramavandi, B., De-la-Torre, G.E., Nabipour, I., Schmidt, T.C., Novotny, T.E., Maryamabadi, A. and Kordrostami, Z. (2023). Chemical contents and toxicity of cigarette butts leachates in aquatic environment: A case study from the Persian Gulf region. *Chemosphere*, 311, p.137049. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137049.
- Tobacco Atlas. (2022). Prevalence. [online] Available at: <https://tobaccoatlas.org/challenges/prevalence/> [Accessed 11 Dec. 2022].
- Wright, S.L., Rowe, D., Reid, M.J., Thomas, K.V. and Galloway, T.S. (2015a). Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms. *Scientific Reports*, [online] 5(1). doi:10.1038/srep14119.
- Wright, S.L., Rowe, D., Reid, M.J., Thomas, K.V. and Galloway, T.S. (2015b). Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms. *Scientific Reports*, [online] 5(1). doi:10.1038/srep14119.
- www.euro.who.int. (n.d.). *World No Tobacco Day 2022: Tobacco's threat to our environment*. [online] Available at: <https://www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2022/05/world-no-tobacco-day-2022-tobaccos-threat-to-our-environment>.
- www.oecd-ilibrary.org. (n.d.). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. [online] Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069947-en.pdf?expires=1650562430&id=id&accname=guest&checksum=38E031DB8D782DFD524496D355B4DEE1> [Accessed 23 Apr. 2022].

## 10 Liitteet

### LIITE 1. Pitoisuusalueen määrittäminen

Taulukko 1. Konsentraatioalueen testaaminen poltettu savukefilteri suotovedellä. 24 h altistus.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Uivat</b>	<b>Uivat- %</b>
Kontrolli 1	5/5	100
Kontrolli 2	5/5	100
Kontrolli 3	4/5	80
5 1	0/5	0
5 2	0/5	0
5 3	0/5	0
0.5 1	5/5	100
0.5 2	4/5	80
0.5 3	4/5	80
0.025 1	6/6	100
0.025 2	4/5	80
0.025 3	5/5	100

Taulukko 2. Konsentraatioalueen testaaminen poltettu savukefilteri suotovedellä. 48 h altistus.

<b>Pitoisuus</b>	<b>Uivat</b>	<b>Uivat -%</b>
Kontrolli 1	3/5	60
Kontrolli 2	4/5	80
Kontrolli 3	4/5	80
5 1	0/5	0
5 2	0/5	0
5 3	0/5	0
0.5 1	3/5	60
0.5 2	2/5	40
0.5 3	3/5	60
0.025 1	4/6	66,6
0.025 2	4/5	80
0.025 3	5/5	100

Taulukko 3. Keskiarvot konsentraatioalueen testaaminen poltettu savukefiltteri suotovedellä.  
48 h altistus.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Ei uivat keskiarvo-%</b>
Kontrolli	26.67
0.25	34.80
0.50	46.67
5.00	100.00

## LIITE 2. Toksisuustesti suotovedellä (poltettu)

Taulukko 4. Toksisuustesti poltettu savukefilteri suotovedellä. 24 h altistus.

E= ei ui, jokin kehon osa esim. yksi siipi liikkuu

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Uivat</b>	<b>Uivat %</b>	<b>Uivat Keskiarvo %</b>
Kontrolli 1	4/5	80	
Kontrolli 2	5/5	100	
Kontrolli 3	5/5	100	
Kontrolli 4	5/5	100	
			95
Suotovesi kontrolli 1	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 2	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 3	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 4	5/5	100	100
0,025 1	5/5	100	
0,025 2	5/5	100	
0,025 3	4/5	80	
0,025 4	5/6	83,8	
			90.95
0,125 1	5/5	100	
0,125 2	5/5	80	
0,125 3	5/5	100	
0,125 4	5/5	100	
			100
0,25 1	4/5	80	
0,25 2	5/5	100	
0,25 3	5/5	100	
0,25 4	5/5	100	
			95
0,5 1	5/5	100	
0,5 2	6/6	100	
0,5 3	4/5	80	
0,5 4	5/5	100	
			95
1,0 1	5/5 E	100	
1,0 2	5/5 E	100	
1,0 3	5/5 E	100	

1,0 4	5/5 E	100	
			100
2,5 1	2/5 E	40	
2,5 2	5/5 E	100	
2,5 3	5/5 E	100	
2,5 4	0/5 E	0	
			60
5,0 1	0/5	0	
5,0 2	0/5	0	
5,0 3	0/5	0	
5,0 4	0/5	0	
			0

Taulukko 5. Fysiokemialliset arvot ennen Daphnia magna siirtoja

Pitoisuus mg/l	O <sub>2</sub> mg/l	O <sub>2</sub> saturaatio-%	pH	Sähkönjohtavuus $\mu$ S/cm
Kontrolli	8.3	97.2	7.66	659
0.025			7.73	703
0.125			7.71	686
0.25			7.89	693
0.5	8.07	94	7.82	647
1	8.14	95	7.97	628
2.5	8.14	92		
5	7	86.7	7.47	657

Taulukko 6. Toksisuustesti poltettu savukefilteri suotovedellä. 48 h altistus.

Liikkuvat= ei ui, jokin kehon osa liikkuu, esim. yksi siipi.

Pitoisuus mol/l	Uivat	Uivat %	Liikkuvat	Uivat Keskiarvo %
Kontrolli 1	4/5	80		
Kontrolli 2	5/5	100		
Kontrolli 3	5/5	100		
Kontrolli 4	5/5	100		
				95
Suotovesi kontrolli 1	5/5	100		
Suotovesi kontrolli 2	4/5	80		



Suotovesi kontroli 3	5/5	100		
Suotovesi kontroli 4	5/5	100		
				95
0,025 1	5/5	100		
0,025 2	5/5	100		
0,025 3	4/5	80		
0,025 4	5/6	83,8		
				90.95
0,125 1	3/5	60		
0,125 2	5/5	80		
0,125 3	4/5	80		
0,125 4	5/5	100		
				80
0,25 1	4/5	80		
0,25 2	5/5	100		
0,25 3	3/5	60		
0,25 4	4/5	80		
				80
0,5 1	2/5	40	2	
0,5 2	3/6	50	3	
0,5 3	0/5	0	3	
0,5 4	3/5	60	2	
				37.5
1,0 1	0/5	0	5	
1,0 2	0/5	0	4	
1,0 3	0/5	0	5	
1,0 4	0/5	0	4	
				0
2,5 1	0/5	0	2	
2,5 2	0/5	0	4	
2,5 3	0/5	0	4	
2,5 4	0/5	0	3	
				0
5,0 1	0/5	0		
5,0 2	0/5	0		
5,0 3	0/5	0		
5,0 4	0/5	0		
				0

Taulukko 7. Toksisuustesti poltettu savukefilteri suotovedellä. 48 h altistus.

Keskiarvo ei uivat.

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>Ei uivat keskiarvo %</b>
Kontrolli 0.000	5.00
Suotovesi kontrolli 5.000	5.00
0.025	9.05
0.125	20.00
0.250	20.00
0.500	62.50
1.000	100.00
2.500	100.00
5.000	100.00

Taulukko 8. Fysiokemialliset arvot testin jälkeen

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> saturaatio-%</b>	<b>pH</b>	<b>Sähkönjohtavuus <math>\mu</math>S/cm</b>
Kontrolli	8.12	95.7	7.37	736
0.025	8.42	97.9	7.7	677
0.125	8.26	96.7	7.7	643
0.25	8.21	96.2	7.75	646
0.5	8.14	95.5	7.75	632
1	8.09	94.9	7.73	634
2.5	7.9	92.8	7.68	649
5	7.78	90.8	7.61	675

## Liite 3. Toksisuustesti suotovedellä (ei poltettu)

Taulukko 9. Toksisuustesti ei poltettu savukefilteri suotovedellä. 24 h altistus.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Uivat</b>	<b>Uivat %</b>	<b>Uivat Keskiarvo %</b>
Kontrolli 1	5/5	100	
Kontrolli 2	4/4	100	
Kontrolli 3	5/5	100	
Kontrolli 4	5/5	100	
			100
Suotovesi kontrolli 1	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 2	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 3	5/5	100	
Suotovesi kontrolli 4	5/5	100	100
0,025 1	4/4	100	
0,025 2	5/5	100	
0,025 3	4/4	100	
0,025 4	5/5	100	
			100
0,125 1	5/5	100	
0,125 2	5/5	100	
0,125 3	5/5	100	
0,125 4	5/5	100	
			100
0,25 1	5/5	100	
0,25 2	5/5	100	
0,25 3	5/5	100	
0,25 4	5/5	100	
			100
0,5 1	5/5	100	
0,5 2	5/5	100	
0,5 3	6/6	100	
0,5 4	5/5	100	
			100
1,0 1	5/5	100	
1,0 2	5/5	100	
1,0 3	5/5	100	

1,0 4	5/5	100	
			100
2,5 1	5/5	100	
2,5 2	5/5	100	
2,5 3	5/5	100	
2,5 4	5/5	100	
			100
5,0 1	5/5	100	
5,0 2	5/5	100	
5,0 3	5/5	100	
5,0 4	5/5	100	
			100

Taulukko 9. Fysiokemialliset arvot ennen Daphnia magna siirtoja.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> saturaatio-%</b>	<b>pH</b>	<b>Sähkönjohtavuus <math>\mu</math>S/cm</b>
Kontrolli	8.41	97.9	6.76	857
Suotovesi kontrolli	8.39	97.7	6.86	640
0.025	8.34	97.1	7.07	751
0.125	8.34	97.4	7.28	694
0.25	8.31	96.9	7.36	689
0.5	8.21	96.1		
1	8.21	96.6	7.39	656
2.5	8.17	95.7	7.42	625
5	8.25	96.5	7.4	645

Taulukko 10. Toksisuustesti ei poltettu savukefilteri suotovedellä. 48 h altistus.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Uivat</b>	<b>Uivat %</b>	<b>Uivat Keskiarvo %</b>
Kontrolli 1	5/5	100	
Kontrolli 2	4/4	100	
Kontrolli 3	5/5	100	
Kontrolli 4	5/5	100	
			100
Suotovesi kontroli 1	5/5	100	
Suotovesi kontroli 2	5/5	100	
Suotovesi kontroli 3	5/5	100	
Suotovesi kontroli 4	5/5	100	100
0,025 1	4/4	100	
0,025 2	5/5	100	
0,025 3	4/4	100	
0,025 4	5/5	100	
			100
0,125 1	5/5	100	
0,125 2	5/5	100	
0,125 3	5/5	100	
0,125 4	5/5	100	
			100
0,25 1	4/5	100	
0,25 2	5/5	100	
0,25 3	5/5	100	
0,25 4	5/5	100	
			100
0,5 1	5/5	100	
0,5 2	5/5	100	
0,5 3	6/6	100	
0,5 4	5/5	100	
			100
1,0 1	5/5	100	
1,0 2	5/5	100	
1,0 3	5/5	100	

1,0 4	5/5	100	
			100
2,5 1	5/5	100	
2,5 2	5/5	100	
2,5 3	5/5	100	
2,5 4	5/5	100	
			100
5,0 1	5/5	100	
5,0 2	5/5	100	
5,0 3	5/5	100	
5,0 4	5/5	100	
			100

Taulukko 11. Toksisuustesti poltettu savukefilteri suotovedellä.  
48 h altistus. Keskiarvo ei uivat.

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>Ei uivat keskiarvo %</b>
Kontrolli 0.000	0.00
Suotovesi kontrolli 5.000	0.00
0.025	0.00
0.125	0.00
0.250	0.00
0.500	0.00
1.000	0.00
2.500	0.00
5.000	0.00

Taulukko 12. Fysiokemialliset arvot testin jälkeen

<b>Pitoisuus mol/l</b>	<b>O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> saturaatio-%</b>	<b>pH</b>	<b>Sähkönjohtavuus <math>\mu</math>S/cm</b>
Kontrolli	8.35	97.6	7.34	861
Suotovesi kontrolli	8.24	96.8	7.55	727
0.025	8.11	95.7	7.62	717
0.125	8.05	95.2	7.69	718
0.25	8.08	95.5	7.7	717
0.5	8.07	95.4	7.73	715
1	8.02	94.9	7.75	718
2.5	8.06	95.4	7.7	710
5	7.91	92.5	7.68	656

## Liite 4. Toksisuustesti partikkeleilla (poltettu)

Taulukko 13. Toksisuustesti poltettu savukefilteri partikkeleilla. 24h altistus.

Liikkuvat= ei ui, jokin kehon osa liikkuu esim. yksi siipi liikkuu.

Pitoisuus mg/l	Uivat	Uivat %	Liikkuvat	Uivat Keskiarvo %
Kontrolli 1	5/5	100		
Kontrolli 2	5/5	100		
Kontrolli 3	5/5	100		
Kontrolli 4	5/5	100		
				100
0,025 1	6/6	100		
0,025 2	5/5	100		
0,025 3	5/5	100		
0,025 4	5/5	100		
				100
0,125 1	5/5	100		
0,125 2	5/5	100		
0,125 3	5/5	100		
0,125 4	5/5	100		
				100
0,25 1	4/5	80	1	
0,25 2	5/5	100		
0,25 3	5/5	100		
0,25 4	4/5	80	1	
				90
0,5 1	2/5	40	2	
0,5 2	3/5	60	2	
0,5 3	3/5	60	2	
0,5 4	2/5	40	3	
				50
1,0 1	2/5	40	2	
1,0 2	3/5	60	1	
1,0 3	1/5	20	3	
1,0 4	3/5	60		
				45
2,5 1	0/5	0		
2,5 2	0/5	0		
2,5 3	0/5	0		
2,5 4	0/5	0		



				0
5,0 1	0/5	0		
5,0 2	0/5	0		
5,0 3	0/5	0		
5,0 4	0/5	0		
				0

Taulukko 14. Fysiokemialliset arvot ennen Daphnia magna siirtoja.

Pitoisuus mg/l	O <sub>2</sub> mg/l	O <sub>2</sub> saturaatio-%	pH	Sähkönjohtavuus μS/cm
Kontrolli	8.71	99.7	7.53	797
0.025	8.45	96.9	7.58	645
0.125	8.45	97.0	7.66	655
0.25	8.42	96.8	7.98	642
0.5	8.4	96.5	7.9	619
1	8.43	96.7	7.8	629
2.5	8.4	96.2	7.69	542
5	7.92	91.7	7.54	645

Taulukko 15. Toksisuustesti poltettu savukefilteri partikkeleilla. 48 h altistus.

Liikkuvat= ei ui, jokin kehon osa liikkuu, esim. yksi siipi.

Pitoisuus mg/l	Uivat	Uivat %	Liikkuvat	Uivat Keskiarvo %
Kontrolli 1	5/5	100		
Kontrolli 2	5/5	100		
Kontrolli 3	5/5	100		
Kontrolli 4	5/5	100		
				100
0,025 1	6/6	100		
0,025 2	4/5	80		
0,025 3	5/5	100		
0,025 4	5/5	100		
				95
0,125 1	5/5	100		
0,125 2	5/5	100		
0,125 3	5/5	100		
0,125 4	5/5	100		
				100
0,25 1	2/5	40	1	

0,25 2	3/5	60		
0,25 3	2/5	40	2	
0,25 4	3/5	60	1	
				50
0,5 1	0/5	0	3	
0,5 2	0/5	0	5	
0,5 3	0/5	80	4	
0,5 4	0/5	100	4	
				0
1,0 1	0/5	0		
1,0 2	2/5	40	1	
1,0 3	1/5	20	2	
1,0 4	0/5		2	
				15
2,5 1	0/5	0		
2,5 2	0/5	0		
2,5 3	0/5	0		
2,5 4	0/5	0		
				0
5,0 1	0/5	0	1	
5,0 2	0/5	0		
5,0 3	0/5	0		
5,0 4	0/5	0		
				0

Taulukko 16. Toksisuustesti poltettu savukefilttereiden partikkeleilla.  
48 h altistus. Keskiarvo ei uivat.

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>Uivat Keskiarvo %</b>	<b>Ei uivat keskiarvo- %</b>
Kontrolli		
0.000	100	0.00
0.025	95	5.00
0.125	100	0.00
0.250	50	50.00
0.500	0	100.00
1.000	15	85.00
2.500	0	100.00
5.000	0	100.00

Taulukko 17. Fysiokemialliset arvot testin jälkeen

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> saturaatio- %</b>	<b>pH</b>	<b>Sähkönjohtavuus μS/cm</b>
Kontrolli	8.13	97.4	7.53	879
0.025	8.15	98.9	7.58	659
0.125	7.95	97.0	7.58	642
0.25	7.84	95.3	7.57	641
0.5	7.13	88.9	7.62	630
1	7.14	88.0	7.57	654
2.5	7.0	86.6	7.56	658
5	6.45	78.9	7.44	653

## Liite 5. Toksisuustesti partikkeleilla (ei poltettu)

Taulukko 18. Toksisuustesti ei poltettu savukefilteri partikkelit. 24 h altistus.

Liikkuvat= ei ui, jokin kehon osa liikkuu, esim. yksi siipi.

Pitoisuus mg/l	Uivat	Uivat %	Liikkuvat	Uivat Keskiarvo %
Kontrolli 1	5/5	100		
Kontrolli 2	5/5	100		
Kontrolli 3	5/5	100		
Kontrolli 4	5/5	100		
				100
0,025 1	6/6	100		
0,025 2	4/4	100		
0,025 3	4/4	100		
0,025 4	5/5	100		
				100
0,125 1	5/5	100		
0,125 2	5/5	100		
0,125 3	5/5	100		
0,125 4	5/5	100		
				100
0,25 1	5/5	100		
0,25 2	5/5	100		
0,25 3	5/5	100		
0,25 4	4/4	100		
				100
0,5 1	5/5	100		
0,5 2	5/5	100		
0,5 3	4/4	100		
0,5 4	5/5	100		
				100
1,0 1	5/5	100		
1,0 2	5/5	100		
1,0 3	4/4	100		
1,0 4	5/5	100		
				100
2,5 1	4/4	100		
2,5 2	5/5	100		
2,5 3	5/5	100		
2,5 4	4/4	100		

				100
5,0 1	5/5	100		
5,0 2	5/5	100		
5,0 3	3/5	60		
5,0 4	5/5	100		
				90

Taulukko 19. Fysiokemialliset arvot ennen Daphnia magna siirtoja.

Pitoisuus mg/l	O <sub>2</sub> mg/l	O <sub>2</sub> saturaatio-%	pH	Sähkönjohtavuus μS/cm
Kontrolli	8.71	99.7	7.53	797
0.025	8.45	96.9	7.65	655
0.125	8.47	97.1	7.75	714
0.25	8.47	96.9	7.85	630
0.5	8.45	96.8	7.75	649
1	8.57	97	7.76	644
2.5	8.39	96.8	7.68	
5	8.35	96.5	7.65	639

Taulukko 20. Toksisuustesti ei poltetu savukefilteri partikkelit. 48 h altistus.

Liikkuvat= ei ui, jokin kehon osa liikkuu esim. yksi siipi

Pitoisuus mg/l	Uivat	Uivat %	Liikkuvat	Uivat Keskiarvo %
Kontrolli 1	5/5	100.00		
Kontrolli 2	5/5	100		
Kontrolli 3	5/5	100		
Kontrolli 4	5/5	100		
				100
0,025 1	5/6	100		
0,025 2	4/4	100		
0,025 3	4/4	100		
0,025 4	5/5	100		
				100
0,125 1	5/5	100		
0,125 2	5/5	100		
0,125 3	5/5	100		
0,125 4	5/5	100		
				100
0,25 1	5/5	100		

0,25 2	3/5	60		
0,25 3	5/5	100		
0,25 4	4/4	100		
				90
0,5 1	5/5	100		
0,5 2	5/5	100		
0,5 3	4/4	100		
0,5 4	4/5	80		
				95
1,0 1	5/5	100		
1,0 2	5/5	100		
1,0 3	4/4	100		
1,0 4	5/5	100		
				100
2,5 1	4/4	100		
2,5 2	4/5	80		
2,5 3	4/5	80		
2,5 4	4/4	100		
				90
5,0 1	4/5	80	1	
5,0 2	5/5	100		
5,0 3	4/5	80		
5,0 4	5/5	100		
				90

Taulukko 21. Toksisuustesti ei poltettu savukefilteri partikkelit.  
48 h altistus. Keskiarvo ei uivat.

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>Ei poltettu, uivat keskiarvo-%</b>	<b>Ei poltettu, ei uivat keskiarvo-%</b>
Kontrolli		
0.000	100	0.00
0.025	100	0.00
0.125	100	0.00
0.250	90	10.00
0.500	95	5.00
1.000	100	0.00
2.500	90	10.00
5.000	90	10.00

Taulukko 22. Fysiokemialliset arvot testin jälkeen

<b>Pitoisuus mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>O<sub>2</sub> saturaatio-%</b>	<b>pH</b>	<b>Sähkönjohtavuus μS/cm</b>
Kontrolli	8.13	97.4	7.53	879
0.025	7.88	95.9	7.56	658
0.125	8.12	97.6	7,59	697
0.25	7.74	93.9	7.61	636
0.5	7.87	94.8	7.61	634
1	7.54	92.3	7.6	645
2.5	7.05	88.6	7.56	632
5	7.47	90.6	7.5	632