

Bioindikaatorite rakendamine Väinameres ja Liivi lahes

KIK projekt nr. 17253

Aruanne



Teostaja: **TTÜ MERESÜSTEEMIDE INSTITUUT**

Direktor: Rivo Uiboupin

Lepingu vastutav täitja: Natalja Kolesova

SISUKORD

SISUKORD.....	2
SISSEJUHATUS.....	3
ATSETÜÜLKOLIINI ESTERAASI (ACHE) AKTIIVSUSE HINDAMINE.....	4
PALJUNEMISHÄIRED: VÄÄRARENENUD EMBRÜOD KIRPVÄHILISTEL (ReproIND).....	11
TBT JA IMPOSEX.....	19
SOOVITUSED TULEVIKUKS.....	25
OLULISED TULEMUSED JA KOKKUVÕTE.....	26
KASUTATUD KIRJANDUS.....	27

SISSEJUHATUS

Käesolev töö on tehtud SA Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolt rahastatud projekti nr 17253 „Bioindikaatorite rakendamine Väinameres ja Liivi lahes“ raames. Projekt on läbi viidud ajavahemikus 2020-2022 Liivi lahes ja Väinameres. Projekti eesmärgiks oli katsetada ja kohendada Eesti mereala keskkonnaseisundi hindamiseks kolme bioindikaatiivset meetodikat: „AChE aktiivsus“, „Paljunemishäired: vääraarenenud embrüod kirpvähilistel“ (ReproIND) ning „Tributüültina (TBT) ja imposex (isastunnuste teke emasorganismidel)“ Väinamere ja Liivi lahe näitel. Projektis saadud tulemusi võrreldi HELCOMi HKS-väärtustega “TBT ja imposex” ja „Paljunemishäired: vääraarenenud embrüod kirpvähilistel“ ning anti esmahinnangud uuritud piirkonna põhjaloomastiku seisundile. Esmahinnangu kohaselt HKS uuritud piirkonnas ei ole saavutatud mõlema indikaatori puhul. Projekti tulemused annavad väärtusliku sisendi Eesti Merestrategie meetmekava ja mereseire programmi arendamiseks, Merestrategie raamdirektiivi - MSRD (2008/56/EÜ) nõudmiste täitmiseks eelkõige lähtuvalt tunnusest 8 (D8C2) ning Läänemere tegevuskava eesmärkide saavutamiseks.

Uuendatud Läänemere tegevuskava (BSAP 2021) määrab tegevusi, mis aitavad saavutada püstitatud eesmärki „Läänemeri mõjutamata ohtlikest ainetest ja prügist“. Üks nendest tegevustest, HL13, näeb ette 2028. aastaks välja arendada asjakohase ohtlikest ainetest tingitud bioloogiliste mõjude seire, et hõlbustada usaldusväärset ökosüsteemi tervise hinnangut“ (By 2028 develop further relevant monitoring for the biological effects of hazardous substances in order to facilitate a reliable ecosystem health assessment). Samuti rõhutab ICES (ICES Viewpoint 2021) ja JP Oceans (JP Oceans Policy Paper, 2021) bioloogiliste mõjude seire olulisust ja vajadust. Antud projekti käigus saadud tulemusi kasutatakse bioloogiliste mõjude seire arendamiseks ja Läänemere seisundi hindamiseks HELCOMi tasemel.

Teostajad:

Natalja Kolesova - merebioloogia spetsialist (projektijuht)

Maarja Lipp - insener

Ivan Kuprijanov - teadur

ATSETÜÜLKOLIINI ESTERAASI (ACHE) AKTIIVSUSE HINDAMINE

Atsetüülkoliini esteraasi (AChE) aktiivsus on üks laialdaselt uuritavatest biomarkeritest ökotoksikoloogias (Fulton & Key 2001). Erinevad pestitsiididena kasutatavad organofosfaadid ja karbamaadid on tuntud kui neurotoksilised ühendid, mis elukeskkonda sattudes pärsvad AChE aktiivsust organismides (Costa et al. 2018). Vähenenud aktiivsus põhjustab häiringuid närvisüsteemi toimimises, kuna AChE reguleerib neurotransmitter atsetüülkoliini lagundamisega närviimpulsside kestust. Praegu see on eel-tuumikindikaator (pre-core indicator) HELCOMi indikaatorite nimekirjas.

Keskonnareostuse mõju võib aga väljenduda ka AChE aktiivsuse tõusuga. Näiteks võivad sellist efekti looduses omada mõned raskemetallid ning paljud erinevad orgaanilised ühendid (Löf et al. 2016, Fu 2018). Hapestumisest ning temperatuuri tõusust tingitud oksüdatiivne stress võib samuti AChE aktiivsust tõsta (Carmona 2019).

Laialdase hulga mõjurite tõttu, mis antud biomarkeri väärtusi ühele või teisele poole võivad kallutada, on looduslike proovide puhul mõistlik vaadelda mitmeid bioloogilisi mõjusid korraga. Löf et al. (2016) näidanud, et väärarenenud embrüote esinemisel on ka AChE aktiivsused muutunud. Mitmed uurimiserühmad määravad ka teisi (ensümaatilisi) biomarkereid, mille tulemusi on võimalik koos AChE aktiivsustega koondada ning arvutada välja intergeeritud biomarkerite vastus (*integrated biomarker response*, IBR) (Beliaeff & Burgeot 2002).

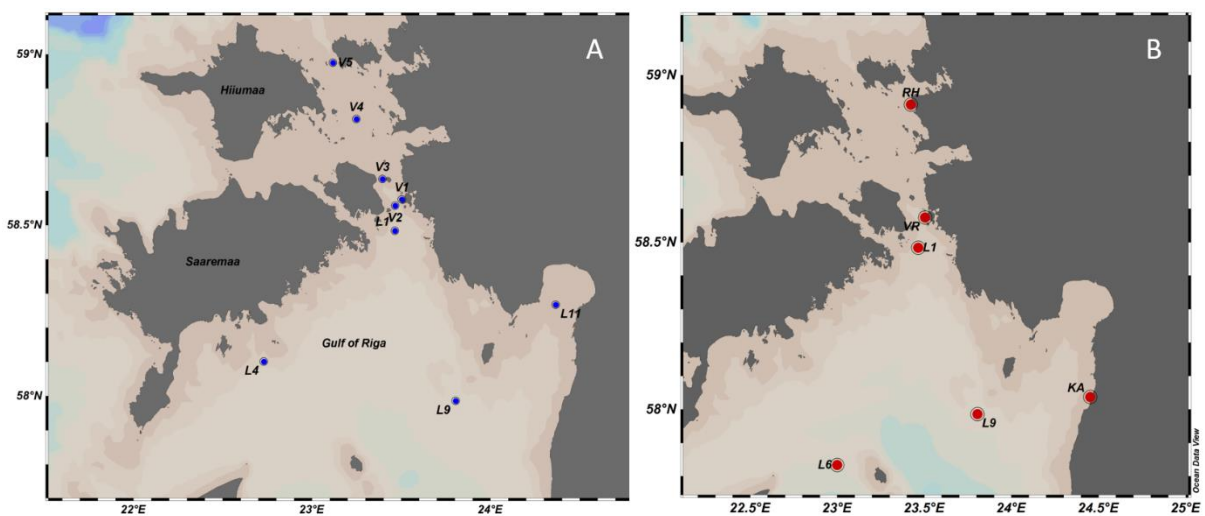
Antud projekti käigus optimeeriti ning kinnistati meetodika, millega on võimalik ensümaatilise biomarkeri AChE aktiivsusi määrata ning seda vastavalt Läänemere konkreetses piirkonnas levivatele põhjaloomastiku liikidele. Koostati AChE aktiivsuse määramise lühikirjeldust eesti keeles ning projekti käigus saadud AChE aktiivsuste tulemusi võrreldi teiste saadud andmetega ning tehti järeldused, kuidas selle biomarkeri uurimine ning rakendamine kõige tulemuslikum oleks. Tänu Keskkonnainvesteeringute Keskuse poolsele rahastusele oli võimalik soetada selleks vajalik aparatuur (mikserveski, spektrofotomeeter), mis on aluseks ka tulevastele projektidele ning biomarkerite seireks.

Meetodid

Limecola balthica isendeid koguti viiest Väinamere ning neljast Liivi lahe jaamast. Kirpvähilised olid kogutud kolmest avamere (*Monoporeia affinis*) ja kolmest rannikumere (*Gammarus tigrinus*) jaamast (Joonis 1). Kogutud loomad prepareeriti vastavalt nende liigile. *Limecola balthica* indiviididest eraldati AChE analüüside jaoks lihaskude, kirpvähiliste *M. affinis* ning *G. tigrinus* puhul kasutati tervet

organismi. Bioloogiline materjal külmutati viivitamatult vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures.

Kudede lõhkumiseks, nendest ensüümi vesilahusesse toomiseks ning proovide esinduslikkuse tagamiseks viidi läbi säilitatud bioloogilise materjali homogeniseerimine. Koed sulatati jääl, määrati nende mass ning lisati sellele vastav kogus homogeniseerimise puhvrit. *Limecola balthica* koed valmistati ette ühekaupa, kirpvähilised koondati nende väikse massi tõttu ühte proovi 5-8 indiviidi kaupa. Rakkude purustamiseks kasutati mikserveskit Retsch MM400, 2 x 30 või 3 x 30 sekundit, sagedusel 30 Hz. Homogenisaati tsentrifugeeriti 20 minutit, 10 000 x g ja 4 °C juures. Supernatant jagati tuubidesse, külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures.



Joonis 1. Seirejaamad, kust koguti *Limecola balthica* (A) ja kirpvähilisi AChE määramiseks (B).

AChE aktiivsused mõõdeti vastavalt Bocquene & Galgani (1998) poolt avaldatud meetodikale. Reaktsioonisegusse lisati *M. affinis* proovide puhul 10 µl ning *L. balthica* ja *G. tigrinus* puhul 5 µl homogeniseerimise käigus saadud supernatanti. Mikrotiiterplaadil jälgiti lainepikkusega 412 nm valgust neelava kollase värvusega ühendi kogust, mis tekib 5,5-ditiobis (2-nitrobensoehape) (DTNB) reageerimisel tiokoliiniga (atsetüülkoliini jodiidi ensümaatilise lagundamise produkt). Tulemuste arvutamiseks kasutati iga reaktsiooni maksimaalset neelduvuse muutust ajaühikus.

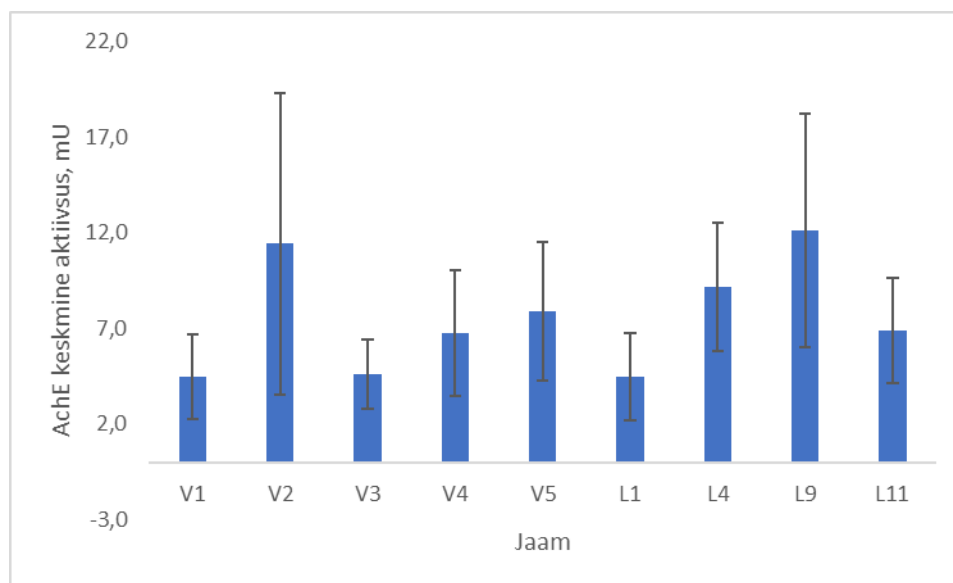
Aktiivsuste väljendamiseks kasutatavad valgusisaldused homogeniseeritud kudedes määrati vastavalt Bradford (1976) meetodikale. Supernatanti lahjendati vastavalt mõõdetava proovi liigile. Saadud lahust pipeteeriti plaadile 10 µl ning lisati sellele 200 µl värvireagendi kontsentradi (Bio-Rad 5000006) viiekordset lahjendust. Kalibreerimiseks kasutati veise seerumi albumiini (BSA).

Kõikideks mõõtmisteks kasutati poolemahulisi 96-kaevulisi mikrotiiterplaate, Tecan Infinite 200 Pro spektrofotomeetrit ning andmete kogumiseks ja töötlemiseks tarkvara Magellan Pro 7.3. AChE aktiivsused väljendati hüdrolüüsitud atsetüülkoliini jodiidi (ACTC) kogusena: $\mu\text{mol ACTC min}^{-1} \text{mg valk}^{-1}$ kohta ehk mU. Laboratoorse tegevuse lihtsustamiseks koostati homogeniseerimise, valgusisalduse ja AChE määramise jaoks lühiprotookolle eesti keeles (Lisa 1).

Tulemused

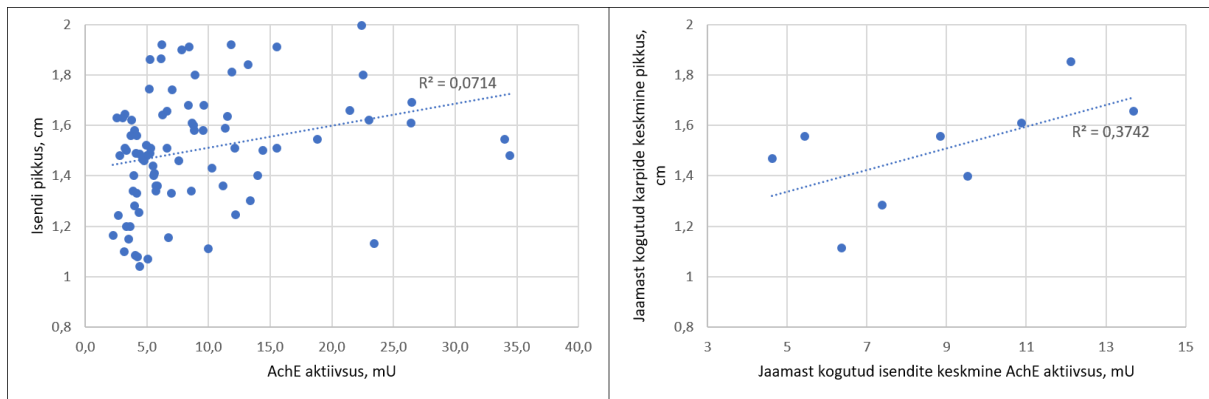
Balti lamekarp (*Limecola balthica*)

Kõige madalamad *L. balthica* aktiivsused olid jaamades V1, V3 ja L1, kõige kõrgemad V4 ja L9 (Joonis 2). *Limecola balthica* mõõdetud AChE aktiivsustes esines suur varieeruvus ühe jaama sees.



Joonis 2. AChE aktiivsused *Limecola balthica* proovides.

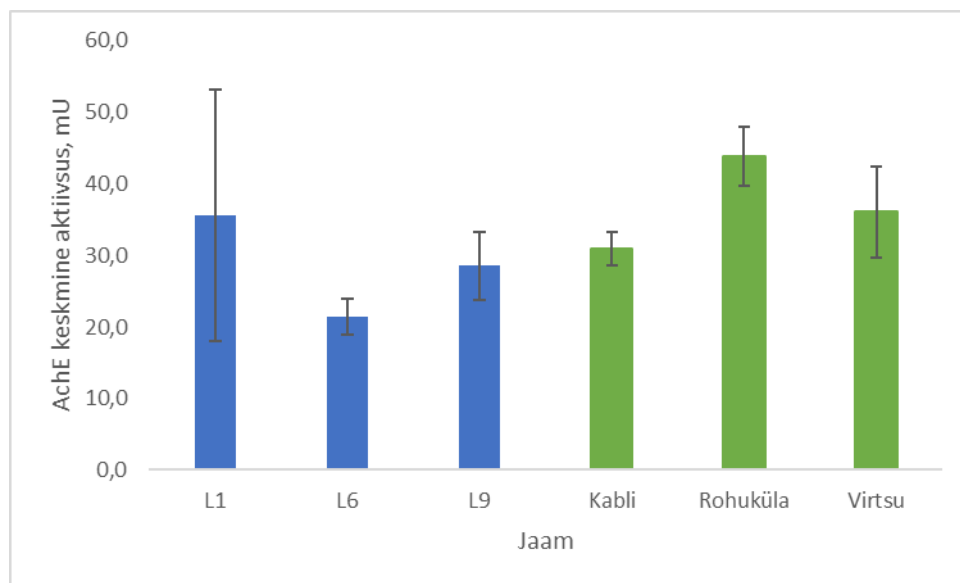
AChE aktiivsuseid võrreldi karpide pikkustega. Üksikute loomade lõikes seost isendi suuruse (pikkus) ja AChE aktiivsuse vahel ei esinenud (Joonis 3). Jaamade keskmiste väärtuste (10 looma) põhjal võib näha aga üsna vähest tendentsi, mille puhul võiks suurema mõõduga loomadelt eeldada kõrgemaid AChE aktiivsuseid. See võib omakorda näidata, et suuremad loomad taluvad paremini ebasoodsaid keskkonnatingimusi ja vähem tundlikud häiringute suhtes.



Joonis 3. *Limecola balthica* koja pikkuse ning AChE aktiivsuse seos.

Kirpvähilised (*Amphipoda*)

Kõike kirpvähilisi AChE analüüsi jaoks koguti 2020 (*M. affinis*) ja 2021. aastal (*G. tigrinus*). Oma eluviisi tõttu võib *M. affinis* olla tundlikum reostuse suhtes, kuid siiski on nende kahe liigi (tavapärased) AChE aktiivsused samas suurusjärgus ning seetõttu omavaheliseks võrdluseks samal joonisel esitatud (Joonis 4).



Joonis 4. AChE aktiivsused kirpvähiliste *Monoporeia affinis* ja *Gammarus tigrinus* proovides.

AChE aktiivsuseid *M. affinis* kudedes võrreldi settete keemiliste analüüside tulemustega. Liivi lahe jaama L6 setetest leiti oluliselt suuremates kogustes nii toitained, raskemetalle kui ka orgaanilisi toksilisi ühendeid polüaromaatsete süsivesinike (PAH-ide) ja polüklooritud bifenüülide (PCB) klassist (Tabel 1). Kõige madalam ohtlike ainete sisaldus oli jaamas L1. Keskmine AChE aktiivsus oli madalam kõrgema ohtlike ainete kontsentratsiooniga jaamas L6 ja kõrgem jaamas L1, kus ohtlike ainete

sisaldus oli kõige väiksem. Selle põhjal võime eeldada suuremat neurotoksilist mõju liigile *M. affinis* jaamas L6.

Tabel 1. Keemiliste ühendite sisaldused ning *Monoporeia affinis* keskmised AChE aktiivsused Liivi lahe jaamades L1, L6 ja L9. Keemiliste ühendite kontsentratsioonid on toodud ühikutes mg/kg sette kuivkaalu (DW) kohta ning AChE aktiivsuse ühik on mU. Jaamades L1, L6 ja L9 kogutud settetest keemilised analüüsid teostati KIK nr 16300 projekti raames GBA laboris, Saksamaal.

	L1	L6	L9
AChE	35.6 ± 17.6	21.4 ± 2.5	28.5 ± 4.7
Arseen (As)	1.4	8.9	3.7
Plii (Pb)	4.1	30	8.4
Kaadmium (Cd)	<0.10	0.59	0.19
Kroom (Cr)	8.9	58	24
Vask (Cu)	6.5	27	14
Nikkel (Ni)	5.5	36	16
Tsink (Zn)	22	149	49
Elavhõbe (Hg)	<0.010	0.05	0.015
PAH (summaarne)	0.015	0.206	0.0308
PCB (summaarne)	-	0.00161	-
Üldlämmastik	1000	18000	1200
Üldfosfor	430	840	460

Arutelu

TTÜ Mereökoloogia laboris loodi võimekus biomarkeri „AChE aktiivsus“ määramiseks kahte erinevsse taksonoomilisse rühma (*Bivalvia*, *Amphipoda*) kuuluvatel liikidel. Kuid *L. balthica* paljude mõõtmisseeriatega puhul täheldati väga suurt AChE aktiivsuste kõikumist sama jaama erinevate indiviidide vahel. Selle põhjus võib peituda nii bioloogilises varieeruvuses kui ka erinevate kudede

ebaefektiivses homogeniseerimises. Bioloogiline varieeruvus saab endas hõlmata nii looma vanust/suurust, anatoomilisi ja füsioloogilisi eripärasusi ning stressiseisundit, mis võib põhjustada suuri erinevusi üksikindivididena analüüsitud *L. balthica* tulemuste vahel. *Limecola balthica* tulemuste varieeruvuse vähendamise üheks võimaluseks on teostada analüüsi proovist, mis koosneb mitmest kokku pandud isendist. Samuti tuleb aga märkida, et *L. balthica* ning *M. affinis* koed homogeniseeriti mikserveskil esialgse protokoll järgi režiimiga 2 x 30 sekundit. *M.affinis* biomarkerite proovide puhul, kuhu oli kokku pandud viis looma, võiks aga tulemustes eeldada bioloogilise varieeruvuse ühtlustumist keskväärtuse juurde. Heterogeense proovi puhul võib reaktsioonisegusse sattuda vähem või rohkem ensüümiga kontsentreerunud osakesi, mis annavad väiksema või suurema signaali ning seda ei ole võimalik korrigeerida ka mõõdetud valgusisaldustega.

Seega otsustati homogeniseerimise protseduuri optimeerida nii, et mikserveskis toimuks kudede lõhkumine 3 x 30 sekundit, eelnevalt 4 °C juures jahutatud proovihoidikutes. Esmaste andmete põhjal, nagu näiteks AChE aktiivsuste määramise tulemused *G. tigrinus* kudedes, võib järeldada, et intensiivsem homogeniseerimine võimaldab saada adekvaatsemaid analüüsitulemusi. Lisaks on töörühmas läbiviidava teise projekti käigus ning optimeeritud homogeniseerimisega proovide mõõtmisel saadud silmnähtavalt väiksemate standardhälvetega katalaasi aktiivsuste tulemusi. AChE aktiivsuseid *M. affinis* kudedes võrreldi settete keemiliste analüüside tulemustega. Suuremate ohtlike ainete kontsentratsiooniga jaamades täheldati väiksemaid AChE aktiivsuseid, mille põhjal eeldame suuremat neurotoksilist mõju liigile *M. affinis* nendes jaamades.

Erinevatel raskemetallidel võib erinevatel tingimustel ning erinevates liikides olla aga täiesti erinev toime – Löf et al. 2016 leidsid, et Co, Zn, Ni, Cr ja V tõstavad AChE aktiivsust; Frasco et al. 2005 näitasid *in vitro*, et Hg, Cd, Cu ja Zn käituvad hoopiski inhibiitoritena. Seetõttu on oluline keskkonnaseisundi ja loomade tervise hindamiseks koondada mitmete biomarkerite ja ka teiste bioloogiliste mõjude mõõtmistulemusi. Töörühma teiste projektide raames on samades liikides määratud ka teiste ensümaatiliste biomarkerite, nagu oksüdatiivsele stressile indikaativsete katalaasi (CAT) ja glutatiooni reduktaasi (GR) ning ksenobiootikumidega kokkupuutele viitava glutatiooni S-transferaasi (GST) aktiivsuseid.

Saadud tulemusi on edastatud ka Läänemere merekeskkonna kaitse komisjoni (HELCOM) bioloogiliste mõjudega tegelevale alamtöörühmale (HELCOM BE sub-team), et integreerida biomõjusid selleks suuremamahulisi andmeid kasutades. HELCOM-i poolt koostatud Baltic Sea Action Plan (2021) raames on 2028. aastaks ökosüsteemide seisundi hindamiseks planeeritud välja arendada toksilistest ainetest tulenevate bioloogiliste mõjude monitoring (tegevus HL13). Biomarkerite analüüside läbiviimine on üks persepektiivsemaid vahendeid, millega neid rahvusvahelisi eesmärke saavutada.

Projekti raames külastati 2022. aasta suvel interkalibreerimise ning kogemuste jagamise eesmärgil ka Soome Keskkonnainstituudi (SYKE) laborit. Interkalibreerimisel SYKE kolleegidega ühtsustati AChE määramise meetodikat, aktiivsuse arvutamise viise ning viidi läbi biomarkerite analüüse, mida TalTech mereökoloogia labor saaks tulevikus täiendavalt oksüdatiivse stressi hindamiseks rakendada. Lisaks jagati andmeid, mis viitavad homogeniseerimise efektiivsemaks muutmise vajadusele ning lepiti kokku, et rohkemate tõendusmaterjalide kogumisel võetakse mõlemas asutuses kasutusele optimeeritud homogeniseerimise protokollid. Tugev koostöö Soome kolleegidega on äärmiselt oluline, kuna neil on olemas pikaajaline kogemus erinevate biomarkerite analüüsides, mis aitab kaasa ühtlase meetodikate kasutusele võtmisele.

Visiooniks olevate biomarkerite piirväärtused ei ole veel arvutatud ega ühiselt heakskiidetud, kuna Läänemere-äärsetes riikides kasutatavad meetodikad ei ole ühtlustunud ning eri piirkondades levivate liikidele on omased erinevad ensüümide aktiivsuste tasemed. Proovide ettevalmistusel tuleb silmas pidada ka bioloogilist varieeruvust. Seni tuleb aga koguda andmeid, võrrelda laborisiseselt erinevate jaamade tulemusi ning võimalusel alustada interkalibreerimise katseid teiste asutustega.

PALJUNEMISHÄIRED: VÄÄRARENENUD EMBRÜOD KIRPVÄHILISTEL (ReproIND)

Nimetatud indikaator on täiendav (supplementary indicator) bioindikaator HELCOMi indikaatorite nimekirjas. Inimtegevuse tagajärjel satub merre suur hulk erinevaid saasteaineid, mis teatud kontsentratsioonidel võivad kahjustada põhjaloomastiku paljunemisvõimekust. Paljunemisvõime langus ning kõrvalekalletega embrüote osakaalu tõus kirpvähilistel võib tingida olulisi mõjusid populatsiooni tasemel ja peegelduda järgmise põlvkonna seisundis. Samuti võib see põhjustada liigi lokaalse arvukuse languse, mis avaldab negatiivset mõju sellest liigist või organismide rühmast toituvatele teistele organismidele.

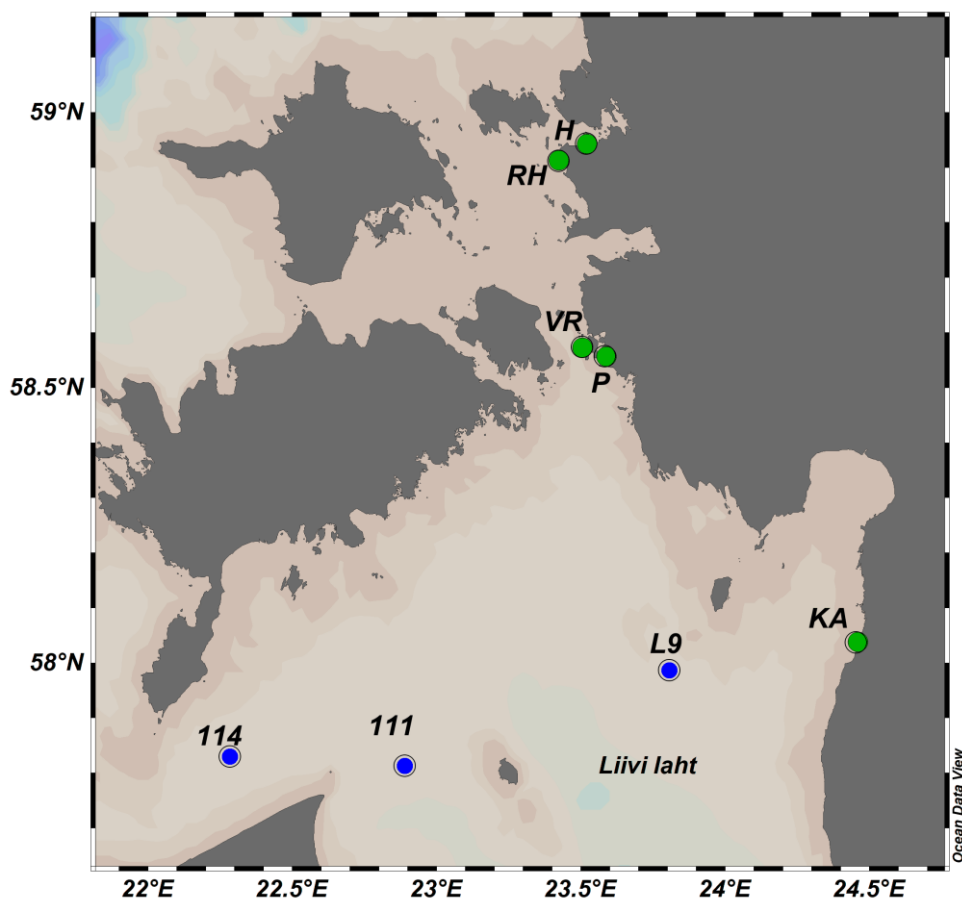
Indikaatorit kasutatakse Rootsi riiklikus seires juba üle 20 aasta. Meetodi sisuks on kirpvähiliste (*Amphipoda*) väärarenenud embrüote mikroskoopiline tuvastamine ning nende osakaalu määramine. Eestis esmakordselt hakati kasutama 2015-2016 aastal Soome lahes KIK10313 projekti raames ning osutus efektiivseks antud basseini keskkonnaseisundi hindamiseks. Käesoleva projekti üheks eesmärgiks oli indikaatori kasutusala laiendamine Väinamererele ja Liivi lahele.

Meetodid

Projektis kasutatud meetoodika põhjaproovide kogumiseks ja analüüsimiseks põhineb ICES (International Council for the Exploration of the Sea) meetoodikal:

No. 41, june 2008. „Biological effects of contaminants: the use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effect of environmental stressors” (Sundelin et al., 2008). Lisaks kasutati Lof et al. (2016) teadusartiklis meetoodika täiendamise informatsiooni. Indikaatori meetoodika on kirjeldatud eesti keeles KIK10313 projekti raames.

Kirpvähiliste proovid olid kogutud 2021 ja 2022 aastal. *M. affinis* proovivõtt toimus 2021 ja 2022 aasta talvel Liivi lahe sügavatest jaamadest. Väinameres *M. affinis* analüüsi jaoks piisavas koguses ei leitud. 2021 aastal proovid olid kogutud kahest jaamast (111 ja L9) ja 2022 aastal kolmest jaamast (111, L9 ja 114). Madalast veest kirpvähkide (*Gammarus sp.*) proovivõtt toimus suvel ja sügisel, 2021 aastal kolmest piirkonnast Rohuküla (RH), Virtsu (VR) ja Kabli (KA) ja 2022 aastal neljast piirkonnast: Rohuküla (RH), Haapsalu (H), Virtsu (VR) ja Pivarootsi (P) (Joonis 5, Tabel 2). Proovivõtujaamade valikul lähtuti kirpvähiliste esinemisest ja arvukusest. Samuti proovivõtujaamade valikul arvestati, et jaamade asukohad kattuksid olemasolevate seirejaamadega või oleksid nende lähedal. Madalas vees proovivõtupunktid olid valitud nii, et paikneksid nii Väinameres kui ka Liivi lahes.



Joonis 5. Kirpvähiliste (Amphipoda) proovivõtupunktid Väinameres ja Liivi lahes. Sinise värviga on märgitud avamere jaamad, kust on kogutud *M. affinis*. Rohelise värviga on märgitud rannikumere jaamad, kust on kogutud kirpvähid (*Gammarus sp.*).

Avameres proovide kogumine toimus Meresüsteemide Instituudi uurimislaevaga Salme. Setete kogumiseks kasutati Van Veen settekoopa haardepindalaga 0.1 m². Laeva tekil sõeluti ettevaatlikult setete pealmine (2-5 cm) kiht 1 mm võrgusilmaga sõelaga, et sette pealmiselt pinnalt korjata elusad *M. affinis* isendid. Kuni laboratoorse analüüsini hoiti *M. affinis* isendid proovivõtukoost kogutud vees temperatuuril 4-6°C. Jaamast 111 võeti ka setteproovid keemilise ja lõimisanalüüsi jaoks.

NB Ülioluline on kuni laboratoorse analüüsini hoida loomi elusana proovivõtu kohast võetud vees ning proovivõtukoost lähedastel keskkonnatingimustel, kuna temperatuuri, hapniku ja soolsuse kõikumised võivad mõjutada analüüsi tulemusi!

Madalas vees koguti emaseid isendeid sõelaga vetikate pealt sügavuselt u 0.5 meetrit. Vetikaid raputati sõela kohal nii, et loomad sattuksid sõelale ja pärast paigutati neid proovivõtukoost veega täidetud ämbrisse. Proovid transporditi pidevalt aereeritavas vees (kasutati portatiivset patareiga aeraatorit). Laboris hoiti loomi elusana proovivõtukoost võetud vees temperatuuril 15-20 °C.

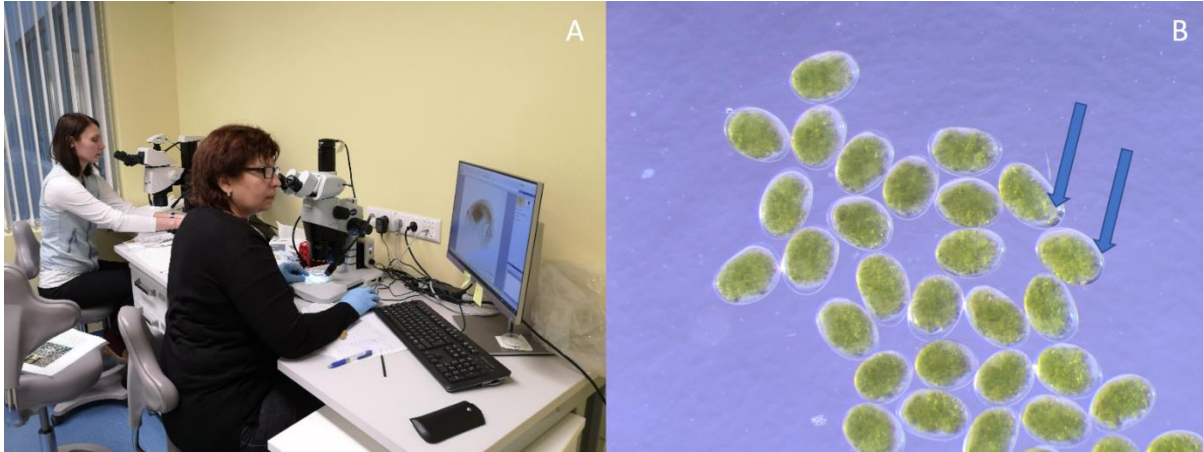
Tabel 2. Proovivõtujaamade metaandmed

Jaam	Lat	Lon	Piirkond	Aasta	Sügavus [m]	Soolsus	T [°C]	O ₂ [mg/l]	Liik
111	57.8130	22.8892	Liivi laht	2021, 2022	39	6,7	2,7	11,7	<i>M. affinis</i>
L9	57.9870	23.8062	Liivi laht	2021, 2022	27	5,8	2,6	12,5	<i>M. affinis</i>
114	57.8300	22.2833	Liivi laht	2022	29	6,8	1,2	11,8	<i>M. affinis</i>
KA	58.0370	24.4525	Kabli, Liivi laht	2021	0,5	5.1	26.8	nd	<i>G. tigrinus</i>
RH	58.9118	23.4227	Rohuküla, Väinameri	2021, 2022	0,5	6,5	nd	nd	<i>Gammarus sp.</i>
H	58.9433	23.5186	Haapsalu, Väinameri	2022	0,5	5,3	14,8	nd	<i>G. tigrinus</i>
VR	58.5740	23.5040	Virtsu, Väinameri	2021, 2022	0,5	5,9	21,3	nd	<i>Gammarus sp.</i>
P	58.5575	23.5827	Pivarootsi, Väinameri	2022	0,5	5,8	19,8	nd	<i>G. tigrinus</i>

Kogutud loomi hoiti elusana kuni laboratoorse analüüsini Meresüsteemide Instituudi Mereökoloogia labori kliimaruumis. Kirpvähiliste embrüote mikroskoopiline analüüs teostati stereomikroskoobiga (Joonis 6). Laboratoorse analüüsi meetodikat arendati antud projekti raames CO₂ kasutusele võtmisega. Enne analüüsi uimastati loomi CO₂-ga rikastatud veega, et nad oleksid liikumatud, mis oluliselt kiirendab ja lihtsustab laboratoorset analüüsi. Mikroskoobi all eemaldati kõik embrüod ettevaatlikult, et neid mitte lõhkuda, liikumatu kuid elusa emase seest peenikese pipettiga, millejärel igast pesakonnast määrati järgmised parameetrid:

- Embrüote arv igas emases (viljakus)
- Embrüote arengustaadium (ICES, 2008)

- Embrüote kõrvalekalded (Sundelin et al., 2008; Löf et al., 2016; TTÜ MSI, 2016) – kõrvalekalle tähendab normaalsest arengust erinevat
- Emase pikkus [mm]



Joonis 6. Laboratoorne analüüs mikroskoobiga (A) ja embrüod väärarengu tüübiga “kahjustatud membraan” (B) Indikaatori kasutusala laiendamiseks Liivi lahele ja piirväärtuste arendamiseks kasutati koos Läti poolt kogutud andmetega ka 2021 aastal jaamast 111 saadud ohtlikke ainete, lõimisanalüüsi ja embrüote väärarengute tulemused (Lisad 3, 5, 6). Liivi lahe piirväärtuste arvutamine toimus koostöös Rootsi ekspertidega Stockholm Ülikoolist, kes on ka antud indikaatori arendajad. Piirväärtuste arvutamiseks kasutati HELCOM (2018a) kirjeldatud meetodikat. Piirväärtuste arvutamised on vajalikud iga Läänemere basseini jaoks, kuna füüsikalise-keemilised protsessid ja reostusastmed on basseiniti erinevad.

Antud indikaator põhineb kahel muutujal: 1. Väärarenenud embrüote sagedus (AbEmb); 2. Emaste sagedus, kellel on rohkem kui üks väärarenenud embrüo ($Fem > 1$). HKS (Hea keskkonnaseisundi) kahe muutuja (AbEmb, $Fem > 1$) arvutamiseks võeti vastavalt meetodikale arvesse kolme tüüpi kõrvalekaldeid: väärareng, membraanikahjustus ja eristumatud embrüod, mida edaspidi nimetatakse ühiselt väärarenenud embrüoteks. Kuna surnud pesakondade esinemine proovides oli harv, need on edaspidisest analüüsist välja jäetud. Kui vähemalt üks muutujatest ületab piirväärtust, siis ei ole antud proovivõtukohtas HKS saavutatud. Kogu basseini seisundi hindamiseks on oluline jälgida 50% reeglit (Helcom, 2018), eriti selle ajalise mõõde: hindamine HOLAS hindamisperioodi raames on võimalik, kui kuueaastase hindamisperioodi vältel on olemas vähemalt kolme aasta andmed.

TULEMUSED

Monoporeia affinis

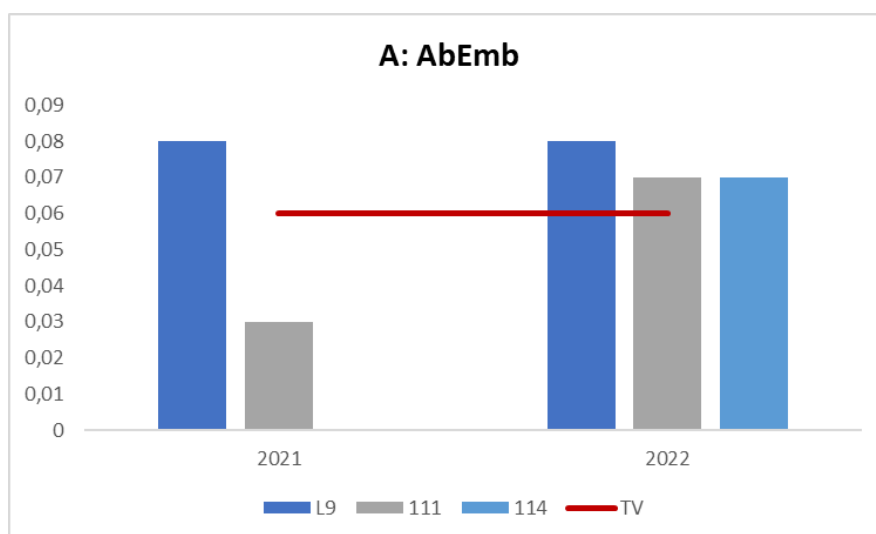
M. affinis esines arvukalt vaid Liivi lahes, Väinameres ei õnnestunud antud liiki analüüsi jaoks piisavas koguses leida. Kokku analüüsiti 168 *M. affinis* isendit ja 4582 embrüot. Kurnaga emaste viljakus (munade arv emase kohta) uuritud piirkonnas oli vahemikus 22-34 muna emase kohta, 2022 aastal viljakus oli kõrgem võrreldes 2021 aastaga.

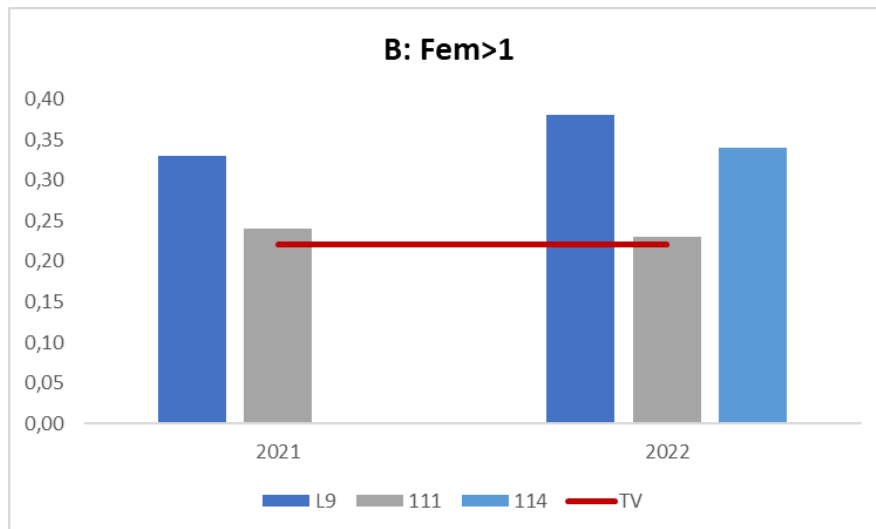
Piirväärtuste arvutamise tulemusena on saadud 0.06 väärarenenud embrüote sageduse (AbEmb) jaoks ja 0.22 emaste sageduse, kellel on rohkem kui üks väärarenenud embrüo (Fem>1) (Tabel 3). Piirväärtuste arvutamise põhjalikud tulemused on esitatud Lisas 7.

Tabel 3. HKS klassi näitajad kahe muutuja põhjal

	L9_21	L9_22	111_21	111_22	114_22	HKS-piir
AbEmb	0.08	0.08	0.03	0.07	0.07	0.06
Fem >1	0.33	0.38	0.24	0.23	0.34	0.22

Kõige kõrgemad indikaatori muutujad olid jaamas L9, kahe aasta vahel olulist erinevust selles jaamas ei täheldatud (Joonis 7, Tabel 3). Jaamas 111 väärarenenud embrüote sagedus oli rohkem kui kaks korda madalam, kuid emaste sagedus Fem>1 jäi samaks. Tulemuste võrdlusena piirväärtustega HKS ei olnud saavutatud ükski jaamas, kuna vähemalt üks muutuja kahes ületas piirväärtust mõlemal aastal.

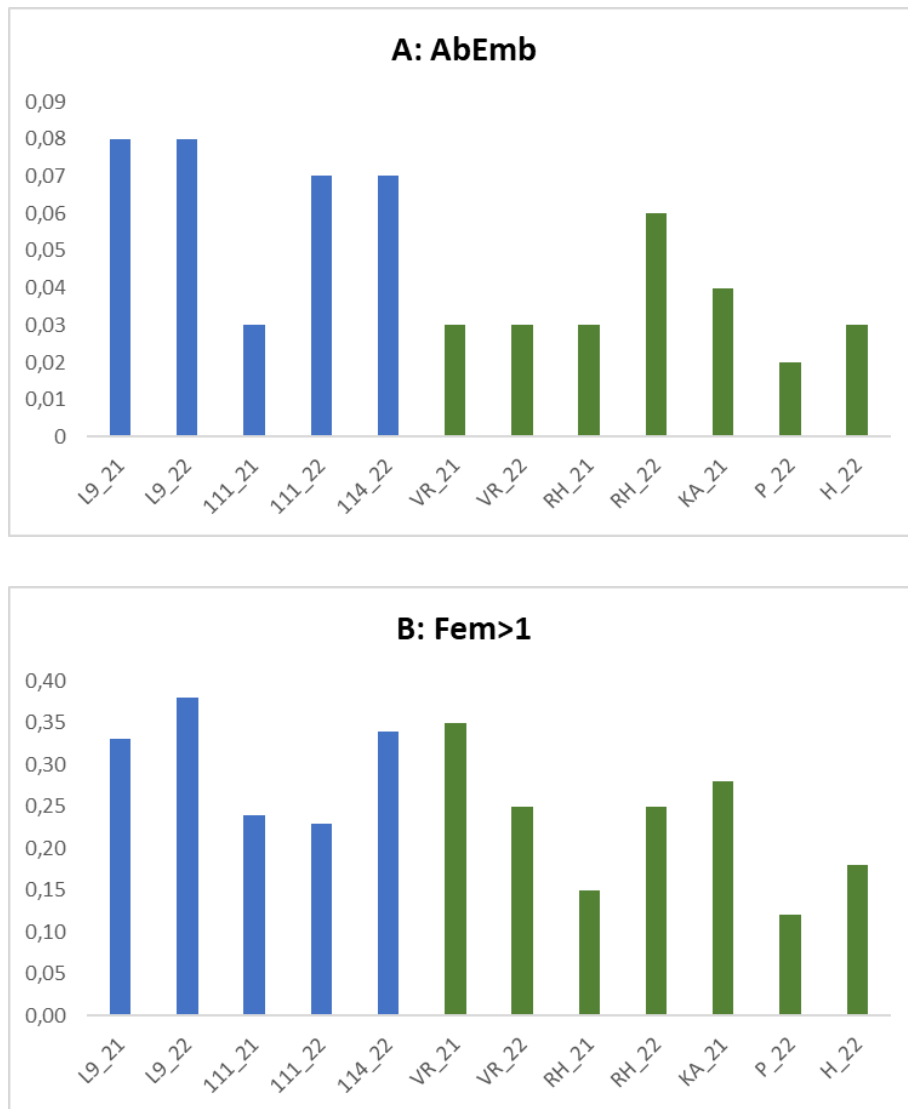




Joonis 7. Kahe indikaatori muutujate, AbEmb (A) ja Fem>1 (B), võrdlus piirväärtustega.

Gammarus sp.

Projekti käigus leiti rannikumere jaamadest vähemalt kolm kirpvähkide liiki, mis sobivad analüüsi jaoks ja mille emased olid tiined (*G. salinus*, *G. zaddachi* ja *G. tigrinus*). Üksikult leiti *G. locusta*. *Gammarus tigrinus* leidus kõikides jaamades ja antud liigi emased olid tiined kogu hooaja vältel, mis teeb antud liigi mugavaks indikaatorliigiks antud piirkonnas. Jaamades, kus esinesid erinevate liikide tiined emased (VR_21, RH_22), kasutati muutujate arvutamisel kõikide emaste analüüsitulemused. Kõige kõrgem väärenenud embrüote sagedus (AbEmb) rannikumere jaamades oli Rohuküla sadama lähistel 2022 aastal (0.06) ja kõige madalam Pivarootsi piirkonnas jaamas P (0.2) (Joonis 8). Ülejäänud jaamades AbEmb väärtused oli sarnased. Kui võrrelda rannikumere jaoks saadud tulemused süvavee jaamade tulemustega, siis olid rannikumere jaamades AbEmb väärtused üldiselt madalamad. See on omakorda kooskõlas saadud AChE analüüsi tulemustega kirpvähiliste jaoks. Muutuja Fem>1 puhul olid madalamad väärtused Pivarootsi ja Haapsalu piirkonnas. Sadamate lähedal olid Fem>1 kõrgemad. Antud muutuja puhul sadamate lähedal kogutud kirpvähkide tulemused ei erinenud tähelepanuväärselt *M. affinis* jaoks saadud tulemustest. Väinamere ja Liivi lahe rannikumere keskkonnaseisundit ei ole võimalik hinnata antud indikaatori põhjal, kuna HKS piirväärtuseid veel ei eksisteeri madalaveeliste liikide jaoks.



Joonis 8. *Gammarus sp.* (roheline) ja *M. affinis* (sinine) muutujate AbEmb (A) ja Fem>1 väärtused (B)

Arutelu

Käesolev indikaator on lihtsasti kasutatav ja ei vaja keerulisi keemilisi analüüse, kuid väga oluline on analüüsi teostaja pädevus, proovide õige käsitlemine ja säilitamine. Samuti on sügavatest piirkondadest *M. affinis* proovide kogumiseks on vaja kasutada vastava varustusega laeva. Kahe projekti põhjal (KIK10313, 17252) on tõestatud indikaatori rakendatavus Väinameres ning Soome ja Liivi lahtedes. Kuna Läänemere basseinid erinevad oma füüsikaliste ja biokeemiliste protsesside kui ka reostusastme poolest, vajab antud indikaator kohaldamist iga basseini jaoks ning eraldi piirväärtuste arvutamist. Pikaajaliselt indikaator oli kasutusel *M. affinis* neljas Läänemere basseinis (Western Gotland Basin, Northern Baltic Proper, Bothnian Sea and the Quark), kuid piirväärtused nende piirkondade jaoks olid arendatud 2018. aastal. Samuti Soome lahe jaoks alates 2018. aastast on püstitatud piirväärtused rannikumere kirpvähkide jaoks (*Gammaridean*). Tänu KIK poolt rahastatud

projektidele ning tihedale koostööle rahvusvahelisel ja piirkondlikul tasemel, indikaatori kasutamine on hetkel laiendatud Soome ja Liivi lahtede süvavee piirkondadele, kus parimaks indikaatorliigiks on *M. affinis*.

Väinameres seda liiki vajalikus arvukuses ei esinenud, seega antud piirkonna hindamiseks sobivad paremini rannikumere liigid. Soome ja Liivi lahe rannikumere piirkondade hindamiseks on soovitatav kasutada ka madalas vees elavaid kirpvähke. Käesoleva projekti tulemused on näidanud, et Väinamere ja Liivi lahe rannikumere hindamiseks võiks kasutada mitmest kirpvähkidest koosneva proovi, kuna nendes piirkondades on levinud mitu liiki, mis paljunevad kogu hooaja vältel. See omakorda lihtsustab proovide kogumist ja nende säilitamist enne analüüsi. Kuna näiteks *M. affinis* puhul proovid peavad olema kogutud talveperioodil jaanuaris-veebruaris ja kuni analüüsini hoitud +4°C juures. Edasiseks loogiliseks sammuks oleks indikaatori andmete kogumine rannikumere liikide jaoks 2022-2027 perioodi jooksul ja piirväärtuste püstitamise järgmiseks HOLAS 4 hindamiseks.

Oluline on välja tuua, et käesoleva projekti raames toimus tihe rahvusvaheline koostöö piirväärtuste arendamiseks Liivi lahe jaoks ja meetodika ühtlustamiseks. Piirväärtuste arendamiseks *M. affinis* jaoks kasutati peamiselt Läti kolleegide poolt kogutud andmed.

TBT JA IMPOSEX

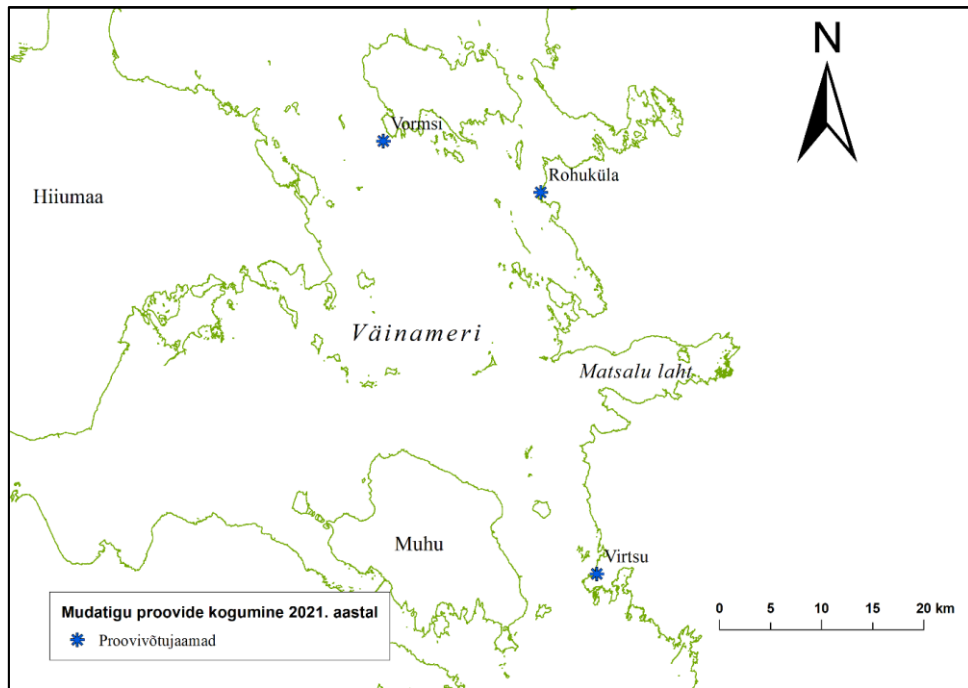
Nimetatud indikaator on bioloogilise mõju tuumikindikaator HELCOM-i indikaatorite nimekirjas. Käesolev uuring oli teostatud eesmärgiga teada saada, kas Eesti rannikumeres esinev mudatigu (Molluska, Gastropoda: *Peringia ulvae*) on sobilik objekt loomade seisundi uurimiseks hormonaalsel tasemel ja indikaatori „TBT ja imposex“ potentsiaalseks hindamiseks.

TBT on toksiline tinaorgaaniline ühend mida lisati värvidesse ja kasutati biotsiidina, et takistada meres asuvatel objektidel pealiskasvu moodustamist (Viglino et al., 2004; Radke et al., 2008). TBT-põhiseid värve kasutati alates 1960. aastatest ja vaatamata sellele, et alates 2008. aastast on TBT kasutamine keelatud kogu maailmas, leidub seda ainet intensiivse meretranspordi piirkonnas meresettetes üle HELCOM-i kehtestatud hea keskkonna seisundi piirnormi (1,6 µg/kg kuivkaalu kohta; Kuprijanov et al., 2021). TBT puhul on kontsentratsioonid, mis põhjustavad tugeva mürgituse ilmingud limustel rohkem kui 1000 korda madalamad kui ühelgi teisel teadaoleval merekeskkonnas leiduval saasteainel (His et al., 1999). Võrreldes imetajatega on limustel TBT metaboliseerimine palju aeglasem, seega on bioakumulatsioon limustes kõrgem. Näiteks kõrgeimad sisaldused, mis tigude organismis on mõõdetud, olid kuni 100 tuhat korda kõrgemad kui TBT sisaldus ümbritsevas veekeskkonnas (Sternberg et al., 2010). Mereseire programmides kasutatakse tigude arenguhäireid nagu imposex (sugu muutus) ja intersex (mõlema soo tunnuste esinemine) laialdaselt biomarkeritena, mis peegelduvad kokkupuudet TBT-ga (OSPAR, 2008; Strand, 2009; HELCOM, 2018b).

Mesogastropoda rühma kuuluv mudatigu on kasutuses TBT-spetsiifilises bioloogilise efekti seires, kuna need selgrootud on piisavalt tundlikud üliväikestele TBT sisaldusele veekeskkonnas (Schulte-Oehlmann et al., 1997). Selle liigi emastel isenditel arenevad anomaalselt isaste tunnused, mis on põhjustatud TBT neurotoksilisest mõjust. Endokriinse süsteemi häire tõttu hilisematel imposex staadiumitel areneb viljatus ja enneaegne isendite surm, mis võib negatiivselt mõjutada tervet populatsiooni läbi arvukuse drastilise kahanemise.

Meetodid

Mudateo isendeid koguti mööda rannajoont Väinamere piires - kahes kohas läänerannikul (Virtsu, Rohuküla) ja ühes kohas Vormsi saare juures, vahemikus juuni-august 2021 (Joonis 9). Proovivõtupaigad Virtsu ja Rohuküla asuvad vastavalt 1 ja 0.5 km kaugusel sadama akvatooriumist. Proovipunktides Virtsu ja Rohuküla koguti tigusid käsikahvaga madalas vees (sügavus kuni 1 meeter, Joonis 10), ning punktis Vormsi koguti põhjaelustiku proove kasutades sukeldumisvarustust 6 meetri sügavuselt.



Joonis 9. Mudateo (*Peringia ulvae*) proovivõtu jaamade paiknemine uuringualal

Setted koguti 2020. aastal kahest piirkonnast, Vormsi ja Virtsu tigude proovivõtu jaamade läheduses. Keemilised analüüsid teostati setetes KIKi projekt nr 16300 „Prioriteetsete ainete ja toitainete vertikaalsest jaotusest Väinameres ja Liivi lahes“ raames. Rohukülast ei õnnestunud esinduslikku setteproovi saada.



Joonis 10. Virtsu sadama akvatoorium tigude kogumise ajal juunis 2021

Tigude inter- ja imposex analüüs teostati järgides HELCOMi meetodikat (Magnusson and Strand, 2016). Analüüsidele sobivate *Peringia ulvae* isendite vähesuse tõttu uuritud aladel polnud võimalik

järgida HELCOMi juhendite soovitusi täies mahus, nt. polnud võimalik järgida soovitusi koguda täiskasvanud loomi (üle 3mm pikkuse kojaga) mahus 50 isendit uuritava ala kohta, sest uuritavatelt aladelt oli võimalik saada keskmiselt ainult 15 täiskasvanud isendit. Peale kogumist transporditi tigused aereeritud merevees ning säilitati kliimaruumis kuni 10 päeva, stabiilse 5-10°C temperatuuri juures laboratoorse analüüsini.

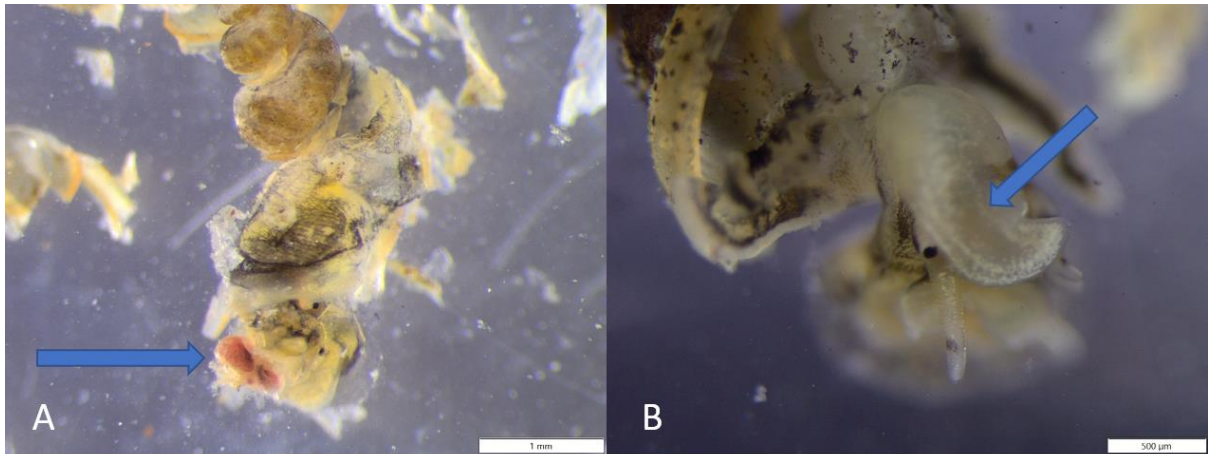
Enne analüüsi teod sorteeriti, määratud liigini ja nende kodade pikkus mõõdeti 0.01 mm täpsusega. Sobivad emaseid tigused uimastati 7% MgCl lahusega, murti lahti kobjad ja uuriti loomade pehmet keha stereomikroskoobi all. Stereomikroskoobi all tehti kindlaks emasloomadel isastunnuste olemasolu: peenise või peenise sõlme olemasolu. Emasloomade seas imposex häire tugevuse ja leviku hindamiseks kasutati indeksit Vas Deferens Sequence Index (VDSI), mida arvutati järgmise valemi järgi:

VDSI = Kõigi uuritud emasloomade summeeritud imposex tasemed /emasloomade arv

Peringia ulvae jaoks hea keskkonnaseisundi (HKS) piirväärtus HELCOM soovitus järgi (Good Environmental Status (GES); HELCOM, 2018b) on: VDSI = 0.1. Kuid vastavalt OSPAR hindamiskriteeriumitele, mis on kasutuses TBT bioloogilise mõju hindamiseks Põhjameres ja Taani väinades, on mudateo jaoks VDSI väärtused alla 0.3 aktsepteeritavates parameetri piirides (Strand and Gercken, 2012). Antud töös on kasutatud HELCOM juhendi HKS piirväärtust.

Tulemused

Virtsu sadamas registreeriti 28. mail 2020. aastal värske TBT reostus meresette proovis (14 µg/kg DW), seega ületas sadamaala pindmises settes TBT hulk ohutu piirväärtuse (1.6 µg/kg DW; HELCOM, 2018b) mitmekordselt. Vormsi setetes jäid TBT ja teiste tinaorgaaniliste ühendite sisaldused alla määramispiiri, vastavalt alla 1 µg/kg DW. Laboratoorse analüüsi käigus leiti kolmel teol Rohukülast ja ühel Vormsist ektoparasiite, seega neid isendeid jäeti imposex analüüsist välja (Joonis 11-A). Seoses raskustega lahkamisel polnud võimalik säilitada puutumatusena suurema osa emasloomade genitaalset poori ning seega määrata selle seisundi. Kõikidel isastel olid peenis ja seemnejuha hästi arenenud (Joonis 11-B).

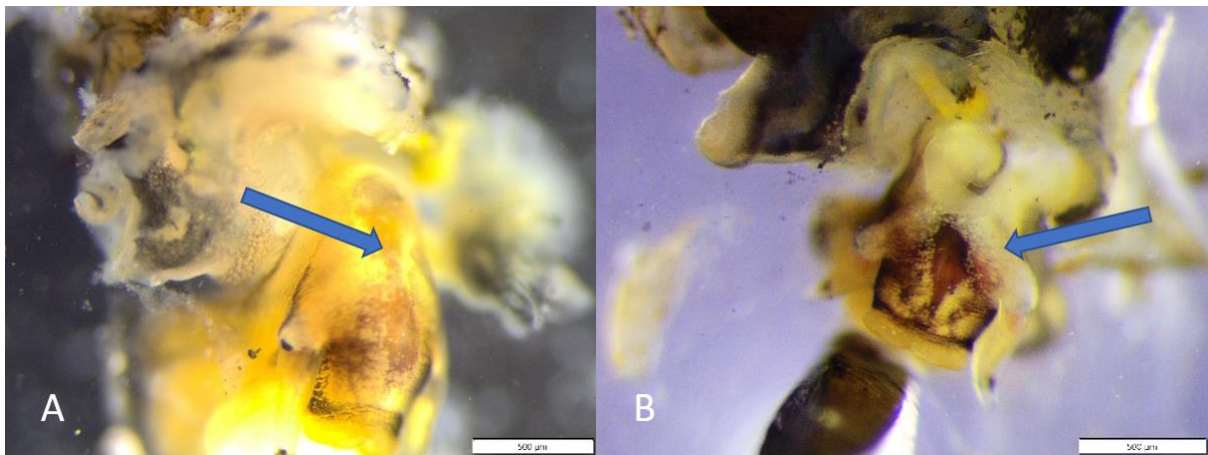


Joonis 11. Parasiidiga (punast värvi moodustis) nakatatud emane isend Rohuküla sadama akvatooriumilt (A) ja suguküps isane mudatigu arenenud peenisega (B).

Imposex seisundi määrati 22% Virtsus, 27% Rohukülast ja 20% Vormsi emasloomade isendites, mis vastas VDSI väärtustele 0,2, 0,4 ja 0,2 (Tabel 5). Suurim osa imposex tunnustega tigudest olid selle arenguhäire esimesel staadiumil, nimelt oli arenenud isaste peenisekohas nähtav peenisesõlm (Joonis 12). Ühel teol Rohuküla sadama piirkonnast registreeriti 3-nda imposex staadium, mille kohaselt isendil esines 6-mm suurune penis ja seemnejuha.

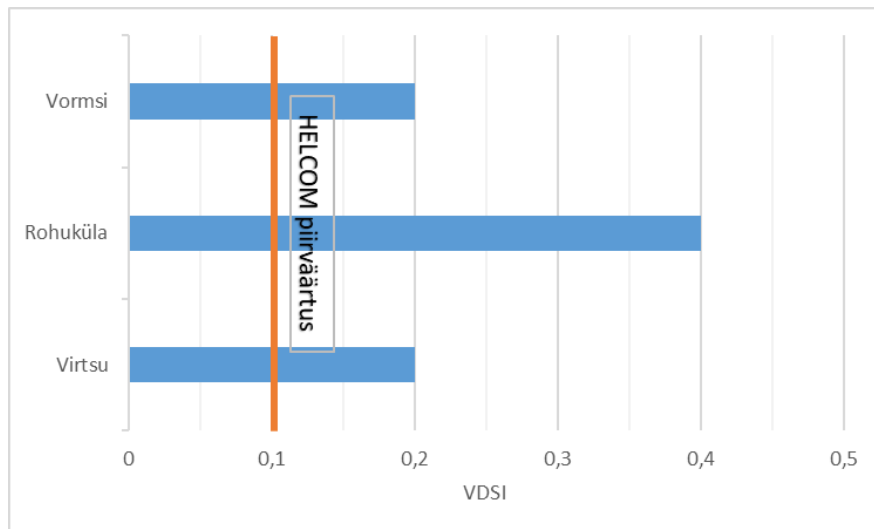
Tabel 5. Imposex analüüside tulemused mudatigudes. *nd-pole määratud

<i>Parameetrid</i>	<i>Virtsu</i>	<i>Rohuküla</i>	<i>Vormsi</i>
<i>isendite arv</i>	11	21	14
<i>koja keskmine pikkus, mm</i>	4,38	4,08	3,64
<i>isaste keskmine peenise pikkus, mm</i>	1,33	1,36	1,34
<i>isaste arv</i>	2	6	7
<i>emaste arv</i>	9	15	5
<i>imposex häiretega isendite arv</i>	2	4	1
<i>summeeritud imposex väärtused</i>	2	6	1
<i>VDSI indeks</i>	0,2	0,4	0,2
<i>TBT sisaldus settes, µg/kg DW</i>	14	nd	<1



Joonis 12. Imposex seisundis emased teod Rohuküla sadama mõjuala piirkonnast. A: arenguhäire esimesel staadiumil (peenise sõlm märgitud noolega); B: imposex kolmas staadium, kus on eristatav arenenud peenis ja seemnejuha (arenenud peenis märgitud noolega)

Saadud VDSI väärtused kolmest piirkonnast võrreldi HELCOM HKS piirväärtusega 0.1 (Joonis 13). Kõik 2021 aasta andmete põhjal leitud väärtused ületasid piirnormi, mis viitab sellele, et HKS antud bioloogilise mõju indikaatori jaoks uuritud piirkondades ei ole saavutatud.



Joonis 13. TBT bioloogilise mõju hindamiseks määratud VDSI väärtused ja vastav HELCOM HKS piirväärtus uuritaval alal

Arutelu

Selle uuringu raames oli keeruline saada esindusliku proovi erinevatel põhjustel. Esmalt, tihti puuduvad kõige rohkem TBT reostuse poolt häiritud sadamaala piirkondades sobilikud elupaigad *Peringia ulvae* jaoks, seega isegi kui liik antud alal esineb, siis võib arvukus olla väga madal. Teiselt, mudateo populatsioonid läbivad rannikumeres suuri soolise ja vanuselise struktuuride kõikumisi, mille

tagajärjel proovivõtuajal võib esineda kas rohkem isaseid või juveniilses arengustaadiumis loomi, keda ei saa kasutada imposex arengu hindamiseks. Vaatamata mudateo vähesele esinemisele uuritavatel aladel proovivõtu ajal, oli siiski võimalik registreerida TBT potentsiaalne bioloogiline mõju tigudele. Suurem osa mõjutatud isendeid oli imposex arengu algstaadiumis. Rohuküla sadama mõjualas registreeriti kõige rohkem imposex tunnustega isendeid.

Arvutatud VDSI indeksi järgi ei olnud mõju, mis võiks avalduda värske meresette reostuse tunnustega Virtsu sadam uuritavatele tigudele, väga ilmne ja võrdus näitajaga, mis oli saadud Vormsi isendite analüüsist. Võimalik, et proovivõtu ajal oli mudateo populatsioon Virtsus drastiliselt kahanenud kas looduslikke (nt. kalade/lindude kiskluse surve suurenemisest) või lokaalse TBT reostuse tõttu. Samas on kirjanduse järgi teada, et mudateo VDSI väärtused üle 0.5 võivad olla seostatud suure TBT reostusega, mida vastavad kontsentratsioonidele üle 50 µg/kg kuivkaalu kohta meresettes (Barroso et al., 2000). Mudateo täiskasvanute isendite madal arvukus sadamaga piirnevatel aladel võib potentsiaalselt olla põhjustatud TBT poolt indutseeritud reproduktiivsete häirete laialdasest levikust, mille tagajärjel tigude populatsiooni arvukus on järsus languses, mida omakorda vähendab tõenäosust leida piisavas koguses materjali bioloogilise mõju tuvastamiseks sellistel aladel.

Antud biomõju indikaatori kasutamine Eesti rannikualal on raskendatud, kuna Eestis esineb vaid üks küige sobilikum liik — *Peringia ulvae*. Liik esineb väga lokaalselt ja väikestes kogustes, mis ei ole esindusliku analüüsi jaoks piisav. Seega sobib antud indikaator vaid piiratud arvu piirkondade jaoks, kus on piisavalt suur tigude populatsioon ja esineb võimalik TBT reostus (nt. eelnevalt kindlaks tehtud sette keemiliste analüüsidega). Antud biomõju indikaatori võib kasutada lisaindikaatorina teiste biomõju indikaatori täiendamiseks (näiteks ReproIND).

SOOVITUSED TULEVIKUKS

1. Ensümaatiliste biomarkerite abil (näit. AChE) keskkonnaseisundi ja loomade tervise hindamiseks soovitatakse koondada mitmete biomarkerite ja ka teiste bioloogiliste mõjude mõõtmistulemused. Töörühma teiste projektide raames on samades liikides määratud ka teiste ensümaatiliste biomarkerite, nagu oksüdatiivsele stressile indikatiivsete katalaasi (CAT) ja glutatiooni reduktaasi (GR) ning ksenobiootikumidega kokkupuutele viitava glutatiooni S-transferaasi (GST) aktiivsused.
2. Saadud AChE aktiivsuse tulemused *L. balthica* kudedes on väga varieeruvad, tulevikus on oluline välja selgitada sellise varieeruvuse põhjus suurema andmestiku põhjal. Lisaks on vajalik metoodika ühtlustamine ja tulemuste võrdlemine Läti ekspertide poolt kogutud andmetega.
3. Liivi lahest 2022. aastal kogutud ReproIND indikaatori andmed *M. affinis* jaoks on sisendiks järgmiseks HOLAS 4 hindamise jaoks. Andmeid on võimalik kasutada juhul kui kuueaastase hindamisperioodi jooksul (2022-2027) on olemas vähemalt kolme aasta andmed. Näiteks, vaatamata arendatud piirväärtustele, ei ole võimalik teha Liivi lahe hindamist HOLAS 3 hindamisperioodil, kuna kättesaadav andmestik hõlmab kahte aastat, 2020 ja 2021.
4. Mereala laiapõhjaliseks hindamiseks on soovitatav kasutada nii sügavate alade liiki *M. affinis*, kui ka rannikumere madalaveelisi kirpvähilisi (*Gammarus sp.*, *Pontogammarus sp.*). Lisaks juba olemasolevatele andmetele on soovituslik Liivi lahe rannikumerest koguda aastatel 2022-2027 kirpvähiliste väärarenenud embrüote andmed ja ühindada need Läti andmetega piirväärtuste arvutamiseks rannikumere liikide jaoks.
5. Indikaatori „TBT ja imposex“ kasutamine Eesti rannikualal on raskendatud, kuna Eestis esineb vaid üks sobilik liik — *Peringia ulvae*. Liik esineb väga lokaalselt ja tihtipeale väikestes kogustes, mis esinduslikku analüüsi jaoks ei ole piisav. Seega sobib antud indikaator vaid piiratud arvu piirkondade jaoks, kus on piisavalt suur tigude populatsioon ja esineb võimalik TBT reostus (nt. eelnevalt kindlaks tehtud sette keemiliste analüüsidega). Selle indikaatori võib vajadusel kasutada lisaindikaatorina teiste biomõjude indikaatorite täiendamiseks (näiteks ReproIND, biomarkerid).

OLULISED TULEMUSED JA KOKKUVÕTE

1. Käesoleva projekti tulemusena on arendatud AChE aktiivsuse määramise võimekus TalTech mereökoloogia laboris. Mereökoloogia laboril on olemas vajalikud instrumendid ning võimekus jätkata biomarkerite analüüsiga. Esmakordselt Eestis katsetati ja optimeeriti meetodika AChE aktiivsuste hindamiseks kohalikes põhjaloomastiku liikides, nagu balti lamekarp ning erinevad kirpvähilised.
2. Kogutud AChE analüüsi tulemused on saadetud HELCOM bioloogiliste mõjude alamtöörühmale pilootuuringu jaoks. Uuringu eesmärk on katsetada bioloogiliste mõjude hindamise jaoks integreeritud lähenemist, mis põhineb erinevatel biomõju indikaatoritel.
3. Hetkel on rahvusvahelisel tasemel algamas Interreg BSR projekt (BEACON), mille eesmärk on tõsta teadlikkust, usaldust ja arusaama bioloogilise mõju tööriistade vajalikkusest Läänemere merekeskkonna seires, hindamises ja majandamises. KIK projekti käigus saadud tulemused kasutatakse integreeritud biomõju hindamiseks nõ. tööriista katsetamiseks.
4. Projekti käigus saadud väärarenenud embrüote andmestikku on kasutatud indikaatori ReproIND kasutusala laiendamiseks Liivi lahele ja piirväärtuste arvutamiseks *M. affinis* jaoks. Samuti on andmed saadud ka HOLAS 3 andmevooru.
5. Projekti teostamise ajal on loodud tihe rahvusvaheline koostöö eriti Läti (LIAE), Soome (SYKE), Rootsi (Stockholm University) ja Taani (Arhus University) ekspertidega, kes osalesid meetodikate parendamisele, ühtlustamisele ja interkalibreerimisele suunatud tegevustes. Rootsi ja Läti ekspertide pädevus aitas laiendada indikaatori ReproIND (Paljunemishäired: väärarenenud embrüod kirpvähilistel) kasutusala.
6. Projekti täitjad on saanud HELCOM bioloogiliste mõjude indikaatorite alamtöörühma liikmeteks ning panustavad bioloogiliste mõjude seire ühtlustamisele piirkondlikul tasemel, osaledes nii kohalikes kui ka rahvusvahelistes projektides.
7. Projekti käigus on tehtud esialgsed bioloogiliste mõjude hinnangud erinevate põhjaloomastiku liikide põhjal lokaalsel tasemel. Kahe indikaatori puhul (ReproIND, TBT ja imposex) on olemas HELCOM-is heakskiidetud piirväärtused. Nende hinnangute kohaselt ei olnud hinnatavates piirkondades HKS saavutatud. Oluline on meeles pidada, et hinnangud on tehtud pilootuuringu käigus piiratud aja jooksul kogutud andmete põhjal. Esinduslike ja usaldusväärsete hinnangute jaoks on vajalik pikem andmerida.

KASUTATUD KIRJANDUS

Barroso, C.M., Moreira, M.H., Gibbs, P.E. (2000). Comparison of imposex and intersex development in four prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201, 221–232.

Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 21(6): 1316-22. PMID: 12069320.

Bocquene, G., Galgani, F. (1998). Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Tech. Mar. Sci.* 22, 12. Borchardt, T., 1983. Influence of food quantity on the kinetics of cadmium uptake and loss via food and seawater in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 76, 67–76.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Carmona, Mariana Marques. 2019. Physiological Responses to Ocean Warming and Acidification of *Diplodus cervinus*.

Costa, Lucio & Giordano, Gennaro & Guizzetti, Marina & Vitalone, Annabella. (2008). Neurotoxicity of pesticides: A brief review. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 13. 1240-9.

Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers.* 2005 Sep-Oct;10(5):360-75. doi: 10.1080/13547500500264660. PMID: 16243721.

Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., ... Zhao, B. (2018). Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology*, 52(15), 8065–8074. doi:10.1021/acs.est.7b04004

Fulton, M.H., Key, P.B., (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37–45.

HELCOM, 2018a. Reproductive disorders: malformed embryos of amphipods. HELCOM supplementary indicator report. Online. [1.09.2022], [<https://www.helcom.fi/wp->

content/uploads/2019/08/Reproductive-disorders-malformed-embryos-of-amphipods-HELCOM-supplementary-indicator-2018.pdf].

HELCOM, 2018b. Tributyltin TBT and imposex. HELCOM core indicator report. Online. [10.09.2022]. <https://helcom.fi/wp-content/uploads/2019/08/Tributyltin-TBT-and-imposex-HELCOM-core-indicator-2018.pdf>.

HELCOM, 2021. HELCOM Baltic Sea Action Plan – 2021 update. Online. [11.08.2022]. [https://helcom.fi/wp-content/uploads/2021/10/Baltic-Sea-Action-Plan-2021-update.pdf]

His, E., Beiras, R., Seaman, MNL (1999). The assessment of marine pollution: bioassays with marine embryos and larvae. *Advances in Marine Biology* 37:1–178

Kuprijanov, I., Väli, G., Sharov, A., Berezina, N., Liblik, T., Lips, U., Kolesova, N., Maanio, J., Junttila, V., Lips, I. (2021). Hazardous substances in the sediments and their pathways from potential sources in the eastern Gulf of Finland. *Mar. Pollut. Bull.* 170, 112642.

Löf, M., Sundelin, B., Liewenborg, B., Bandh, C., Broeg, K., Schatz, S., Gorokhova, E., 2016. Biomarker-enhanced assessment of reproductive disorders in *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment in the Baltic Sea. *Ecol. Indic.* 63, 187–195.

Magnusson, M., Strand, J. (2016). Guidelines for monitoring of biological effect– imposex and intersex. Online. [10.09.2022]. <https://marine-monitoring.se/wp-content/uploads/2019/03/Bergkvist-J.-Magnusson-M.-2016.-Monitoring-guidelines-for-biological-effect-monitoring-%E2%80%93imposex-and-intersex.-HELCOM..pdf>

OSPAR (2008) 2007/2008 CEMP Assessment: trends and concentrations of selected hazardous substances in sediments and trends in TBT-specific biological effects. Assessment and Monitoring Series, OSPAR Commission 2008, 36 pp

Radke, B., Łęczynski, L., Wasik, A., Namiesnik, J., Bolalek, J., (2008). The content of butyl and phenyltin derivatives in the sediment from the Port of Gdansk. *Chemosphere* 73, 407–414.

Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Fioroni, P., Bauer, B. (1997). Imposex and reproductive failure in *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia). *Mar. Biol.* 128, 257–266.

Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G. A. (2010) Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19:4–23

Strand, J. (2009) Coupling marine monitoring and environmental risk assessment of TBT: a case study using the contamination of organotin compounds in the Danish marine environment. VDM Verlag Dr. Müller, 84 pp

Strand, J., Gercken, J. (2012). Imposex in marine mud snails: Standard Operating Procedure (SOP) for the measurement of biological effects of contaminants in the Baltic Sea. Prepared as contribution to Deliverable 2.2 of the BONUS+ project BEAST (2009-2011). Online. [12.09.2022]. <https://portal.helcom.fi/meetings/EN-HZ%2013-2020-782/MeetingDocuments/Supporting%20information%20related%20to%20Biological%20Effects/BEAST%20D%20%20%20Standard%20Operation%20Procedures%20-%20Annex.pdf>

Sundelin B., Eriksson Wiklund A-K, Ford A (2008b). The use of embryo aberrations in amphipod crustaceans for measuring effects of environmental stressors. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences no 41 (TIMES)

Viglino, L., Pelletier, E., St.-Louis, R., (2004). Highly persistent butyltins in northern marine sediments: a long-term threat for the Saguenay Fjord (Canada). Environ. Toxicol. Chem. 23 (11), 2673–2681.