

Jatkuvatoiminen leväpitoisuuden mit- taus kosteikkovedestä

Tiina Siimekselä

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2017
Luonnonvara- ja ympäristöala
Agrologi (ylempi AMK)
Biotalouden kehittäminen

Tekijä(t) Siimekselä, Tiina	Julkaisun laji Opinnäytetyö, ylempi AMK	Päivämäärä 30.04.2017
	Sivumäärä 71	Julkaisun kieli Suomi
		Verkojulkaisulupa myönnetty: x
Työn nimi Jatkuvatoiminen leväpitoisuuden mittausta kosteikkovedestä		
Tutkinto-ohjelma Agrologi (ylempi AMK), Biotalouskehittäminen		
Työn ohjaaja(t) Vertainen, Laura; Honkanen, Hannariina		
Toimeksiantaja(t) BioA -hanke		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Tutkimuksen tavoite oli selvittää, voidaanko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua seurata jatkuvatoimisesti. Lisäksi tavoitteena oli edistää levänkasvatusmenetelmän kehittämistä luonnollisten leväkantojen hallittuun kasvattamiseen luonnon olosuhteissa maatalouden vesiensuojelukosteikolla tuottamalla tietoa veden ravinteiden ja lämpötilan vaihtelun sekä sääoloissa tapahtuvien muutosten vaikutuksista levien määrään tutkimuskohdeella. Jatkuvatoimisen mittauksen luotettavuutta selvitettiin vertaamalla EXO2 <i>In Situ</i> Total Algae automaattisen mittausturinin a-klorofyllimittauksia laboratorioissa määritettyihin vesinäytteiden tuloksiin.</p> <p>Tutkimusaika oli 103 vuorokautta ajalla 19.5. – 29.8.2016. Tutkimusaineisto kerättiin kahdella maatalouden vesiensuojelukosteikon tulouomaan asennetulla automaattisella <i>In Situ</i> mittausturinilla, joiden mittaustaajuus oli kerran tunnissa. Mittauskohteesta otettiin 15 yksittäistä vesinäytettä, jotka analysoitiin laboratorioissa. Seitsemästä vesinäytteestä analysoitiin a-klorofyllipitoisuus ja kahdeksasta näytteestä sameus, kiintoaineen, kokonais- ja nitraattityypen, kokonaisfosforin ja liukoisen orgaanisen hiilen pitoisuudet. Tuloksia tarkasteltiin tilastotieteen menetelmin yhden ja useamman selittävän muuttujan regressioanalyysien avulla.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin, että automaattiantureiden mitaamat tulokset vastasivat hyvin laboratorioissa määritettyjä tuloksia. Veden lämpötilan tai ravinnepitoisuuksien vaihtelun ja levämäärän välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää yhteyttä. Tutkimusjakson tulosten perusteella kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua voidaan mitata luotettavasti jatkuvatoimisella a-klorofyllin ja fykosyaniinin fluoresenssin mittausturinilla.</p>		
Avainsanat (asiasanat) a-klorofylli, fluoresenssi, kalibrointi, laadunvarmistus, jatkuvatoiminen mittausta, kasviplankton, fykosyaniini		
Muut tiedot		

Author(s) Siimekselä, Tiina	Type of publication Master's thesis	Date 30.04.2017 Language of publication: Finnish
	Number of pages 71	Permission for web publication: x
Title of publication Continuous algal measurement of wetland water		
Degree programme Master of Natural Resources		
Supervisor(s) Vertainen, Laura; Honkanen, Hannariina		
Assigned by BioA project		
Abstract <p>The objective of the study was to find out whether the algae concentration of wetland water and its variation can be monitored constantly. A further objective was to promote the development of an algae cultivation method for controlled cultivation of algae strains in natural conditions, in agricultural water protection wetland. This was done by providing information about the effects of water nutrients and temperature variation and weather conditions changes on the amount algae. The reliability of the continuous measurements was examined by comparing the measurement results of chlorophyll a received from the EXO2 <i>In Situ</i> Total Algae automatic measurement sensor with the results of water samples defined in a laboratory.</p> <p>The research time was 103 days from 19 May 2016 to 29 August 2016. The research data was collected with two automatic <i>In Situ</i> probes installed in the wetland. The measuring frequency was once an hour. In addition, 15 separate water samples were taken from the research object which were analyzed in a laboratory. Seven water samples were analyzed for chlorophyll a and eight samples for turbidity and the concentration of suspended solids, total and nitrate nitrogen, total phosphorus and dissolved organic carbon. The results were examined using regression analysis for one or several explanatory variables.</p> <p>It was discovered that the results measured by automatic probes corresponded well with the results defined in the laboratory. There was no statistically significant connection between the variation of water temperature or nutrient concentrations and the amount of algae in this study. On the basis of the research period results, wetland water algae concentration and its variation be reliably can measured with the continuous measurement equipment of chlorophyll a and phycocyanin fluorescence.</p>		
Keywords/tags (subjects) chlorophyll a, fluorescence, calibration, quality assurance, continuous measurement, phytoplankton, phycocyanin		
Miscellaneous		

Sisältö

Käsitteet	5
1 Levämittaus on osa vesiensuojelua ja paljon muutakin	6
2 Levät ja niiden mittaaminen	8
2.1 Levät ovat moninainen joukko	8
2.1.1 Esitumallisten pääryhmä	8
2.1.2 Alkueliöiden pääryhmä	9
2.1.3 Korkeampaa kehitystasoa edustavien pääryhmä	11
2.2 Levien elämäntavat	12
2.3 Levät vesistöissä	14
2.4 Levien hyödyntäminen	16
2.5 Levien pigmentaatio	18
2.6 Klorofyllin mittaus	20
2.7 Fluoresenssiaineiston primääri- ja paikalliskalibrointi	22
3 Tutkimusaineisto ja -menetelmät	24
3.1 Tutkimuksen tausta ja tarve	24
3.2 Tutkimusalue	24
3.3 Tutkimusajanjakso	27
3.4 Aineiston kerääminen	29
3.5 Aineiston käsittely	33
3.5.1 Regressioanalyysi	35
3.5.2 P-arvo	36
4 Tutkimustulokset ja tulosten tarkastelu	37
4.1 Automaattianturi- ja laboratoriotulosten vastaavuus	37
4.1.1 EXO2; a-klorofylli	37
4.1.2 S::can UV-VIS	39
4.2 Vedenlaatumuuttujien vaihtelu tutkimusjaksolla	44
5 Johtopäätökset	48
6 Pohdinta	52
Lähteet	66

Kuviot

Kuvio 1. <i>Nodularia spumigena</i> -syanobakteeri	9
Kuvio 2. Vasemmalla nielulevä (<i>Cryptomonas</i>), keskellä limaevä (<i>Gonyostomum semen</i>) ja oikealla kultalevä (<i>Dinobryon divergens</i>).....	10
Kuvio 3. Vasemmalla panssarisiimalevä (<i>Peridiniella catenata</i>), oikealla piilevät (<i>Fragillaria crotonensis</i> , <i>Tabellaria flocculosa</i>)	10
Kuvio 4. <i>Micrasterias</i> -suvun koristeleviä	11
Kuvio 5. Vasemmalla ahdinpartakasvusto (<i>Cladophora glomerata</i>) mereen asetetulla koealustalla, oikealla suolilevää (<i>Ulva intestinalis</i> L.)	12
Kuvio 6. Vasemmalla rakkolevä (<i>Fucus vesiculosus</i> L.), oikealla punahelmilevä (<i>Ceramium tenuicorne</i>)	12
Kuvio 7. Leväbiomassan vuodenaikainen vaihtelu vesistössä	13
Kuvio 8. Esimerkki leväbiomassan vaihtelusta, jota a-klorofyllipitoisuus kuvaa, tutkimuskohteessa yhden vuorokauden aikana..	14
Kuvio 9. Fosfori- ja typpikuormitus eri lähteistä sekä arvio laskeumasta ja luonnon huuhtoumasta Suomessa vuonna 2015.....	15
Kuvio 10. Mikrolevien ja niistä saatavien arvoaineiden hyödyntämismahdollisuuksia	18
Kuvio 11. Eri leväryhmien sisältämät pigmentit vaikuttavat niiden väreihin. Vasemmalta oikealle: sinilevä (fykosyaniini), sinilevä (fykoerytriini), nielulevä (fykoerytriini), sinilevä (fykosyaniini), piilevä (c-klorofylli ja fukoksantiinikarotenoidi), viherlevä (b-klorofylli) ja sinilevä (fykosyaniini).....	19
Kuvio 12. Tarvaalan Biotalouskampuksen eteläinen ja pohjoinen kosteikko.....	25
Kuvio 13. Tutkimusalueen sijainti	25
Kuvio 14. Saarijärven reitin vedenlaatuluokitus	26
Kuvio 15. Tarvaalan Biotalouskampuksen kosteikkojen valuma-alueet	27
Kuvio 16. Vuorokautinen sadesumma (mm) ja ilman keskilämpötila (°C) Tarvaalan Biotalousinstituutin sääasemalla mitattuna sekä mittauskohteen vedenpinnankorkeus (cm) tutkimusjaksolla 19.5. – 29.8.2016	29
Kuvio 17. Mittauspaikan sijainti Tarvaalan Biotalouskampuksen pohjoisen kosteikon tulouomassa	31

Kuvio 18. Scan- ja EXO-anturit 15.4.2016 asennettuna siltarakennelmaan mittauspaikalla	31
Kuvio 19. Akut, dataloggerit ja paineilmapullo sijoitettiin suojakaappeihin mittauspisteen viereen.	32
Kuvio 20. Miia Jämsén määritti vesinäytteiden a-klorofyllipitoisuuden JAMK:n Rajakadun laboratoriossa.....	34
Kuvio 21. Kokonaisfosforipitoisuuden ($\mu\text{g/l}$) kalibrointiyhtälö, jossa sijaismuuttujana S::can-anturin mittaama sameus (FTU).....	35
Kuvio 22. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen a- klorofylliarvojen vastaavuus.....	38
Kuvio 23. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen sameusarvojen vastaavuus	40
Kuvio 24. Automaattianturin sameusarvojen perusteella laskettujen ja laboratoriossa määritettyjen kiintoainepitoisuuksien vastaavuus	41
Kuvio 25. Automaattianturin sameusarvojen perusteella laskettujen ja laboratoriossa määritettyjen kokonaisfosforipitoisuuksien (P-tot) vastaavuus	41
Kuvio 26. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen liukoisen orgaanisen hiilen arvojen (DOC) vastaavuus	42
Kuvio 27. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen nitraattityppiarvojen ($\text{NO}_3\text{-N}$) vastaavuus	43
Kuvio 28. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen kokonaistyppiarvojen (N-tot) vastaavuus	43
Kuvio 29. Tutkimuskohteen ilman keskilämpötila ($^{\circ}\text{C}$), veden lämpötila ($^{\circ}\text{C}$), veden pinnankorkeus (cm), päivittäinen sadesumma (mm) ja automaattianturin mittaama sekä laboratoriossa määritetty a-klorofyllipitoisuus ($\mu\text{g/l}$) tutkimusjaksolla	45
Kuvio 30. Kokonaisfosfori- ja a-klorofyllipitoisuudet ($\mu\text{g/l}$) sekä kokonaistypen ja liukoisen orgaanisen hiilen pitoisuudet (mg/l) tutkimusjaksolla.	47

Taulukot

Taulukko 1. Tärkeimmät pigmentit eri leväryhmissä.....	19
Taulukko 2. Ilman kuukausittainen keskilämpötila (°C) ja sademäärä (mm) vuosina 2016 ja 2015 sekä Ilmatieteen laitoksen ilmastollisella vertailukaudella 1981-2010	28
Taulukko 3. Automaattiantureilla mitatut keskiarvot sekä minimi ja maksimiarvot veden sameudelle (FTU), kiintoaine-, N-tot-, NO ₃ -N- ja DOC-pitoisuudelle (mg/l) sekä P-tot- ja a-klorofyllipitoisuudelle (µg/l) tutkimusjaksolla.	46

Käsitteet

absorptio	imeytyminen
a-klorofylli	lehtivihreän eli klorofyllin pigmentti
DOC	liukoinen orgaaninen hiili, Dissolved Organic Carbon
fDOM	liunneen orgaanisen aineen fluoresenssi, Fluorescence of Dissolved Organic Matter
FTU	Sameuden yksikkö, Formazin Turbidity Units
fluoresenssi	fysikaalinen ilmiö, jossa virittyneen elektronin viritystilan purkautuessa osa energiasta vapautuu uutena matala-energisempänä fotonina
fluorometri	fluoresenssia mittava laite
fykosyaniini	sinilevien sisältämä pigmentti
<i>In-situ</i>	paikassa, tässä yhteydessä tutkimuspaikassa sijaitseva (jatkuvatoiminen anturi)
jatkuvatoiminen mittaus	automaattisilla laitteistoilla <i>in situ</i> –mittaus, joka ei vaadi ihmisen jatkuvaa läsnäoloa
kasviplankton	pääasiassa levien ryhmään kuuluvia mikro-organismeja
lineaarinen regressio	mallintaa yhden tai useamman selittävän muuttujan ja yhden selitettävän muuttujan välistä riippuvuutta
makrolevät	kehittyneitä, monisoluisia leviä
mikrolevät	mikroskooppisen pieniä, pääasiassa vedessä vapaasti keijuvia leviä
NO ₃ -N	nitraattityppi
paikalliskalibrointi	aineiston käsittely jälkikäteen laskennallisesti vertailunäytteiden ja samanaikaisten anturin mittaustulosten välille johdettuja kalibrointiyhtälöitä käyttäen
primäärikalibrointi	mittauslaitteen säätäminen siten, että vaste mitattavaan standardiin on aina sama
syanobakteeri	sinilevä eli sinibakteeri
taksonomia	eliöiden luokittelua tutkiva tieteenala
UV-VIS-spektrometri	valon absorbanssia UV- ja näkyvän valon aallonpituusalueella mittaava laite

1 Levämittaus on osa vesiensuojelua ja paljon muutakin

Puhdas vesi on elämän perusta. Suomessa vettä riittää kaikille, mutta globaalisti puhtaasta juomaveden puutteesta kärsii noin 1,1 miljardia ja sanitaation puutteesta noin 2,6 miljardia ihmistä (Aylward, Bandyopadhyay & Belausteguigotia 2005, 218). Maailman vesivaroista ainoastaan kolme prosenttia on makeaa vettä, josta kaksi kolmasosaa on sitoutuneena jäätikköihin ja mannerjähän. Vain yhdeksän promillea maailman vedestä on järvissä, joissa ja muissa makeissa pintavesissä. (Turkki 2013.) Vesistöjen saastuminen, erilaiset raskasmetalli-, ympäristömyrky-, lääke- ja hormonijäämät ja ihmistoiminnan aiheuttama ravinnekuormitus näkyvät vesistöissä kaikkialla maailmassa ja uhkaavat maapallon vähäisiä makean veden pintavesivaroja (mm. Aylward 2005, 217; Turkki 2013). Ilmastonmuutoksen vaikutukset kohdistuvat nykyisten ennusteiden mukaan voimakkaimmin alueille, joilla ennestään on vaikeuksia muun muassa puhtaan veden riittävydessä. Lisäksi yhä kiihtyvä maapallon väestönkasvu aiheuttaa lisääntyvää puhtaan veden tarvetta. Makean veden varat ovat maapallolla jakautuneet hyvin epätasaisesti ja paljon vesivaroja omaavilla mailla ja alueilla onkin suuri vastuu hoitaa ja suojella vesivarantojaan koko maailman puolesta.

Sisävesien tuottamia ekosysteemipalveluja ovat puhtaan veden lisäksi muun muassa kalastus ja virkistyskäyttö (Aylward ym. 2005, 216). Suomen luonnolle tyypillistä on vesistöjen runsaus, ja niiden tuottamien ekosysteemipalveluiden hyödyntämiselle on maassamme pitkät perinteet. 85 % Suomen järvistä ja 65 % joista on ekologiselta tilaltaan erinomaisia tai hyviä (Pintavesien ekologinen ja kemiallinen tila 2016). Viimeisimmässä vuosien 2000–2003 vedenlaatuluokituksessa käyttökelpoisuudeltaan erinomaisia tai hyviä oli 80 % järvistä, mutta jokivesistä vain 43 % (Mitikka 2015, 2).

Kasviplankton on yksi keskeisistä laatutekijöistä sekä vesistöjen ekologisen tilan, että käyttökelpoisuuden arvioinnissa ja kasviplanktonin määrässä ja lajistossa tapahtuvat muutokset ilmentävät esimerkiksi veden laadun fysikaalisia ja kemiallisia muutoksia melko luotettavasti (Mitikka 2013; Järvinen 2015). Jatkuvatomimisella a-klorofyllin ja muiden levien yhteyttämisspigmenttien mittauksella voidaan saada yksittäisiä vesinäytteitä tarkempaa, lähes reaaliaikaista tietoa kasviplanktonin määrän ja lajiston nopeastakin vaihtelusta ja näin vesistöjen tilaan vaikuttavista muuttujista esimerkiksi

vesistökuormituksen hallinnan tueksi. Jatkuvatoimisten mittausantureiden käyttö vedenlaadun seurannassa on yleistynyt viime vuosina, niiden luotettavuus on parantunut ja niitä on nykyisin saatavilla kattavasti erilaisten muuttujien mittaamiseen.

Mataluutensa ja pinta-alaan nähden pienen vesimassansa vuoksi Suomen vesistöt ovat herkkiä ulkoiselle kuormitukselle. Rehevöityminen onkin Suomen vesistöjen laaja-alaisin ongelma (Vesistöjen ravinnekuormitus ja luonnon huuhtouma 2013), josta usein ensimmäisenä kertovat tavanomaisesta poikkeavat levien massaesiintymät. Suurin osa vesistöjen typpi- ja fosforikuormituksesta on peräisin maataloudesta, jossa ravinnehuuhtoumia on pyritty vähentämään esimerkiksi perustamalla vesien-suojelukosteikkoja pidättämään pelloilta tulevien valumavesien ravinteita. Kosteikoilla on myös maisemallista arvoa, ne lisäävät biodiversiteettiä eli luonnon monimuotoisuutta tarjoamalla elinympäristöjä linnuille ja pikkunisäkkäille ja lisäksi niitä voidaan hyödyntää tulvasuojelussa vesivarastoina. Kosteikkojen ravinteita pidättävä vaikutus perustuu nykytiedon mukaan pitkälti siellä kasvavan kasvillisuuden ravinteiden käyttöön. Kosteikkojen kasviplanktonia, eli lähinnä leviä ja cyanobakteereita, ja sen vaikutusta kosteikon ravinteidenpidätyskykyyn ei ole aiemmin juurikaan tutkittu.

Jyväskylän ammattikorkeakoulussa tutkittiin BioA-hankkeen puitteissa maatalouden vesiensuojelukosteikon luonnollisten leväkantojen hyödyntämistä ravinnekierron näkökulmasta. Tämä tutkimus tehtiin BioA-hankkeen tilauksesta ja tukemaan hankkeen tavoitteita luonnollisten leväkantojen hallitusta kasvattamisesta ja hyödyntämisestä maatalouden vesiensuojelukosteikolla. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli automaattianturien ja laboratoriossa määritettyjen vesinäytteiden tuloksia vertaamalla selvittää, voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua seurata jatkuvatoimisesti. Lisäksi tavoitteena oli edistää levänkasvatusmenetelmän kehittämistä luonnollisten leväkantojen hallittuun kasvattamiseen luonnon olosuhteissa maatalouden vesiensuojelukosteikolla tuottamalla tietoa veden ravinteiden ja lämpötilan vaihtelun sekä sääoloissa tapahtuvien muutosten vaikutuksista levien määrään tutkimuskohteella.

Tämän opinnäytetyötutkimuksen pääpaino oli levämäärän, eli a-klorofyllipitoisuuden, jatkuvatoimisessa mittaamisessa fluoresenssin avulla sekä siihen liittyvässä teknologiassa ja haasteissa, joita esimerkiksi erilaiset ympäristötekijät voivat mittaustuloksille aiheuttaa. Luotettavien mittaustulosten sekä niiden analysoinnin ja niistä teh-

tyjen johtopäätösten tueksi työssä oli kuitenkin tarpeen tutkia paitsi fluoresenssia ilmiönä ja sen mittaamista yleisesti myös levien ja leväyhteisöjen elintapoja, esiintymistä vesistöissä sekä käyttö- ja hyödyntämismahdollisuuksia.

2 Levät ja niiden mittaaminen

2.1 Levät ovat moninainen joukko

Levät ovat laaja joukko melko alkeellisia, yhteyttäviä ja siten happea tuottavia organismeja, jotka elävät pääasiassa vedessä. Leviä löytyy myös esimerkiksi kasvien rungoilta, maaperästä ja kallioilta, mutta tässä työssä keskitytään nimenomaan vedessä eläviin leviin. Levät muodostavat yhdessä kasvien kanssa pääosan maapallon biomassasta, joka tuottaa suurimman osan ilmakehän hapesta. Levät ovatkin maapallon happentuottajina elintärkeitä ja hiilidioksidin sitojina niillä on suuri vaikutus myös ilmastoomme. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 7; 100 kysymystä levistä 1999, 11, 16.)

Levillä ei ole yhteistä kantamuotoa, eivätkä ne ole tieteellisen luokittelun kannalta yhtenäinen ryhmä, vaan niitä yhdistävät lähinnä ulkoiset piirteet ja elintavat. Erilaisia levälajeja arvioidaan olevan noin 50 000 - 300 000. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 7.) Levät jaetaan kolmeen eri pääryhmään, jotka on pääpiirteissään esitelty seuraavissa alaluvuissa.

2.1.1 Esitumallisten pääryhmä

Esitumallisten (prokaryoottien) pääryhmä koostuu viruksista, bakteereista sekä syano- eli sinibakteereista (ks. kuvio 1), joita kutsutaan myös sinileviksi. Prokaryoottien DNA ei sijaitse tumassa, vaan rengasmaisissa kromosomeissa solulimassa. Syanobakteerit ovat sekä makeissa että suolaisissa vesissä eläviä yksisoluisia, yhteyttämis-

kykyisiä eliöitä, joiden fotosynteesi kehittyi 2-3 miljardia vuotta sitten. Monet syanobakteerit käyttävät yhteyttämisesään ilman typpeä. (Tyystjärvi 2016; Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 9.)



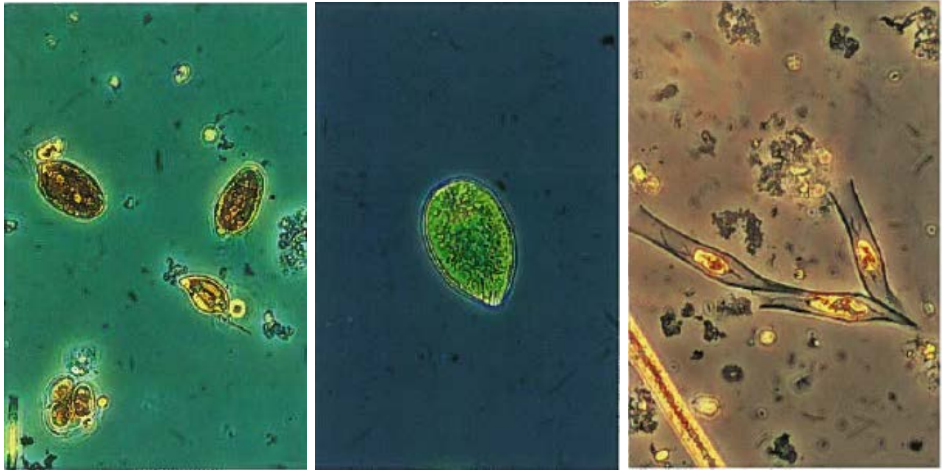
Kuvio 1. *Nodularia spumigena* -syanobakteeri (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 9)

2.1.2 Alkueliöiden pääryhmä

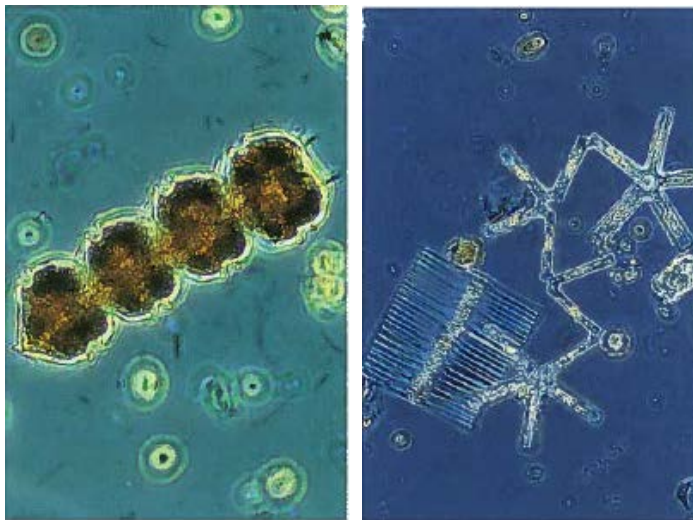
Alkueliöiden pääryhmään lukeutuvat alkueläinten lisäksi nielu-, panssarsiima-, tarttuma-, kulta-, kelta-, pii-, lima- ja silmälevät, jotka ovat aiotumallisia (eukaryootteja), pääosin yksisoluisia leviä (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 7; 100 kysymystä levistä 1999, 13).

Alkueliöiden pääryhmään kuuluvat levät ovat hyvin monimuotoinen joukko. Nielulevät (ks. kuvio 2) muodostavat tärkeän osan eläinplanktonin ravinnosta ja viihtyvät - kuten muun muassa limalevätkin (ks. kuvio 2) - humuspitoisessa, ruskeassa vedessä. Sitä vastoin esimerkiksi kalanhajusta helposti tunnistettavat kultalevät (ks. kuvio 2) suosivat ravinneköyhiä, happamia ja kylmiä vesiä. Monimuotoiset panssarsiimalevät (ks. kuvio 3) ja esimerkiksi kalojen kiduksiin kiinnittyvät tarttumalevät elävät mieluiten suolaisissa vesissä. Pienet piikuoriset piilevät (ks. kuvio 3) keijuvat (keijusto I.

plankton) sekä makeissa että suolaisissa vesissä vapaasti ja erilaisille pinnoille kiinnittyneinä runsaimpina keväisin ja syksyisin. (100 kysymystä levistä 1999, 13.)



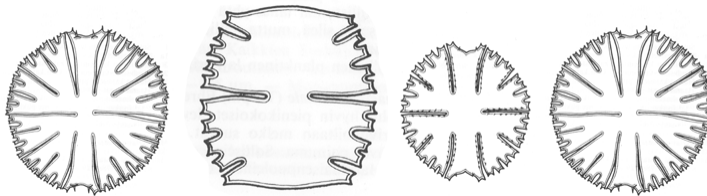
Kuvio 2. Vasemmalla nielulevä (*Cryptomonas*), keskellä limaevä (*Gonyostomum semen*) ja oikealla kultalevä (*Dinobryon divergens*) (100 kysymystä levistä 1999, 12, 14)



Kuvio 3. Vasemmalla panssarsiimalevä (*Peridiniella catenata*), oikealla piilevät (*Fragillaria crotonensis*, *Tabellaria flocculosa*) (100 kysymystä levistä 1999, 12, 14)

2.1.3 Korkeampaa kehitystasoa edustavien pääryhmä

Tähän pääryhmään kuuluvat kasvit sekä viherlevät, jotka ovat varsinaisten kasvien esimuotoja. Viherleviin kuuluu yksisoluisia alkeellisia muotoja eli mikroleviä sekä kehittyneitä monisoluisia muotoja eli makroleviä. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 8.) Ensimmäinen viherlevä syntyi, kun tumallinen eliö (eukaryootti) otti syanobakteerin (prokaryootti) endosymbiontikseen 1,5 miljardia vuotta sitten (Tyystjärvi 2016). Viherleviä esiintyy yleisesti rehevissä järvissä ja rannikoilla. Koristelevät (ks. kuvio 4) elävät makeissa vesissä usein alustaan kiinnittyneinä. (100 kysymystä levistä 1999, 13, 16.)

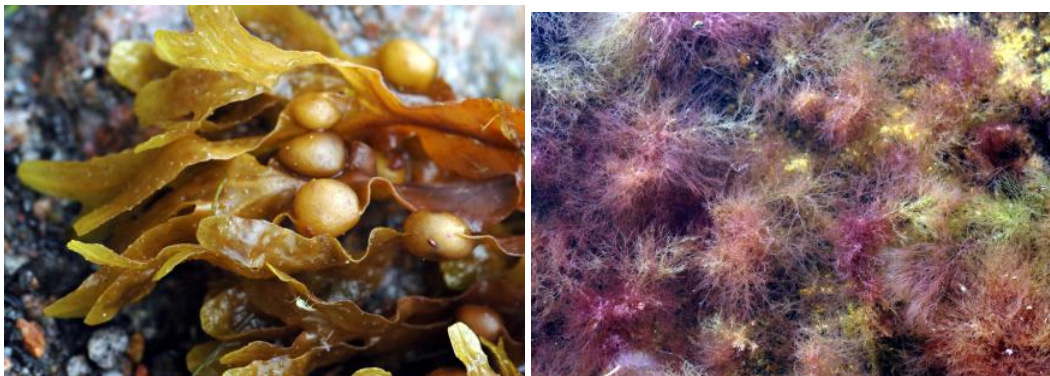


Kuvio 4. *Micrasterias* -suvun koristeleviä. (Kasviplanktonopas n.d.)

Kehittyneimmät viherlevät, kuten kovilla pinnoilla kasvava rihmamainen ahdinparta (ks. kuvio 5) ja rannikon suojaississa kalliolammikoissa elävä putkimainen suolilevä (ks. kuvio 5) muistuttavat ulkoasultaan varsinaisia kasveja. Ruskoleviä esiintyy pääasiassa merissä pohjaan tai, kuten esimerkiksi rakkolevä (ks. kuvio 6), rannikoiden kalliopin-
toihin kiinnittyneinä. Punalevät (ks. kuvio 6) viihtyvät rannikoiden lisäksi myös jär-
vissä ja kasvavat niin ikään kalliopinnoilla. (100 kysymystä levistä 1999, 16.)



Kuvio 5. Vasemmalla ahdinpartakasvusto (*Cladophora glomerata*) mereen asetetulla koealustalla (kuva Milla Suutari), oikealla suolilevää (*Ulva intestinalis* L.) (Pinkka lajintuntemuksen oppimisympäristö n.d.)



Kuvio 6. Vasemmalla rakkolevä (*Fucus vesiculosus* L.), oikealla punahelmilevä (*Ceranium tenuicorne*) (Pinkka lajintuntemuksen oppimisympäristö n.d.)

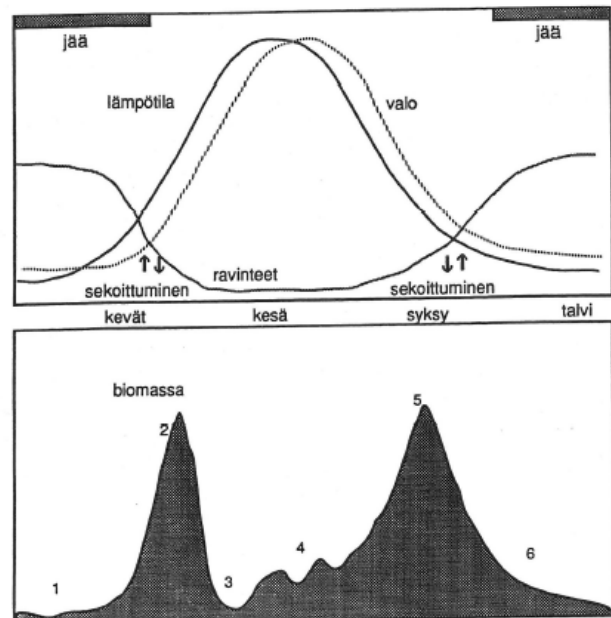
2.2 Levien elämäntavat

Levät tarvitsevat elääkseen vettä, hiilidioksidia ja ravinteita, joista tärkeimpiä ovat fosfori ja typpi. Suurin osa levistä tarvitsee valoa, jolloin myös valon laadulla ja määrällä on merkitystä kasvuun, mutta jotkut lajit pystyvät kasvamaan pimeässäkin. Eri levälajeilla on erilaisia vaatimuksia niin ravinteiden, valon, kuin esimerkiksi veden pH:n, happipitoisuuden, lämpötilan ja virtauksen suhteen. Suurin osa levistä pystyy käyttämään vain epäorgaanisessa muodossa olevia ravinteita. (Rosenqvist 2012, 17.)

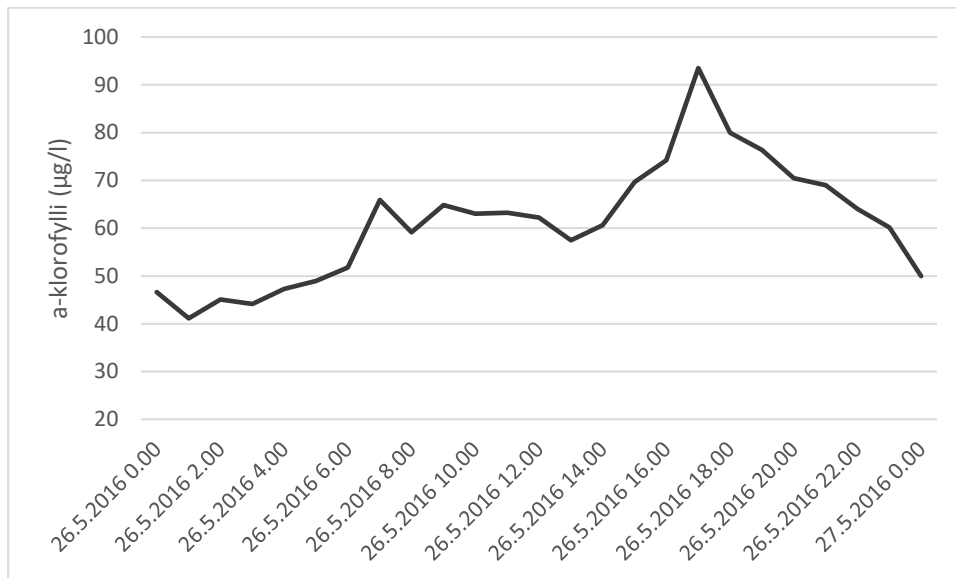
Syanobakteerit (l. sinilevät) lisääntyvät suvuttomasti jakaantumalla, jolloin muodostuu kaksi identtistä solua. Yksisoluiset levät lisääntyvät niin ikään pääosin suvuttomasti joko jakaantumalla tai kasvullisen lisääntymisen kautta, jossa emäsolusta irronnut kappale kehittyy uudeksi yksilöksi. Suvullisesti lisääntyvät levälajit ovat useimmiten monisoluisia, kehittyneempiä lajeja. Ne voivat olla joko yksi- tai kaksikotisia ja niiden sukusolut voivat olla kooltaan ja rakenteeltaan samanlaisia (isogaminen) tai erilaisia (anisogaminen) tai ne voivat erota toisistaan niin muotonsa, kokonsa kuin toimintansa puolesta (oogaminen). (Rikkinen 1999, 61–63; Rosenqvist 2012, 18.)

Suuri osa planktonlevistä (ml. syanobakteerit) talvehtii lepoitioina vesistön pohjalla, mutta alhaista lämpötilaa ja vähäistä valoa kestävä lajit kasvavat jäässä tai jään alla koko talven (Pohjoisen luontomme talvi n.d). Levät voivat mennä ”lepotilaan” myös olosuhteiden muuttuessa niille epäsuotuisiksi, esimerkiksi veden ravinteiden vähenyessä (Rosenqvist 2012, 18.) Leväbiomassan vuodenaikainen ja vuorokautinen vaihtelu on merkittävää, kuten kuviot 7 (Autio 2011, 8) ja 8 osoittavat.

1. Talvi: valon määrä ja lämpötila alhaisia
2. Kevätmaksimi: valo lisääntyy, alhainen lämpötila, paljon ravinteita, vähän laidunnusta
3. Alkukesän minimi: laidunnuspaine kasvaa ja ravinteet käytetty
4. Kesä: laidunnuspaine alentunut, hidasta kasvua ravinteiden ja sään vaikuttaessa
5. Syysmaksimi: veden sekoittuminen nostaa ravinteita päällisveteen, valoa ja lämpöä vielä tarpeeksi



Kuvio 7. Leväbiomassan vuodenaikainen vaihtelu vesistössä (Autio 2011, 8)



Kuvio 8. Esimerkki leväbiomassan vaihtelusta, jota a-klorofyllipitoisuus kuvaa, tutkuskohdeesssa yhden vuorokauden aikana.

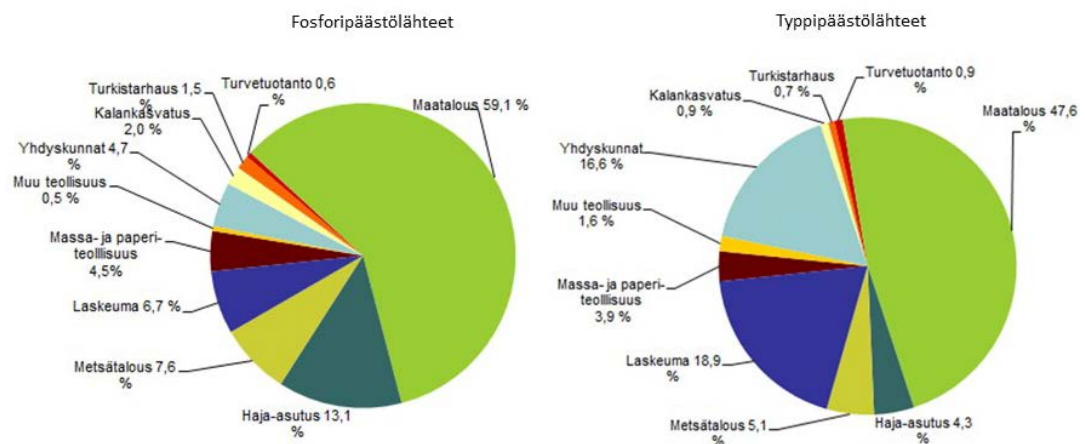
2.3 Levät vesistöissä

Vesiekosysteemin ravintoverkon energia perustuu yhteyttämiseen, jossa auringon energia ja ravinteet sitoutuvat tuottajiin, kasveihin ja kasviplanktoniin. Ravintoketjun huippua kohti energiamäärä vähenee trofiatasolta toiselle siirryttäessä, sillä kukin taso kuluttaa samaansa energiaa. (Niinimäki & Penttinen 2014, 23.) Toimivassa ja hyvinvoivassa vesistössä ravintoverkon ekologiset tasot, eli tuottajat, kuluttajat ja hajottajat, ovat tasapainossa keskenään.

Levät (ml. syanobakteerit) ovat ravintoverkon tuottajina korvaamaton osa vesiekosysteemiä (100 kysymystä levistä 1999, 16-18). Ne käyttävät vedessä olevia ravinteita elääkseen ja siirtävät ravinteiden energian seuraaville trofiatasoille. Tasapainon häiriintyessä, usein vesistöön tulevan ulkoisen ravinnekuormituksen seurauksena, kasviplanktonin määrä lisääntyy voimakkaasti. Runsaat leväsiintymät merkitsevät, että vesistön ravintoketju ei toimi, mistä seuraa vesistön samentuminen ja rehevöityminen. (Niinimäki ym. 2014, 25-29.) Rehevöityminen on Suomen vesistöjen laaja-alaisin ongelma, joka aiheutuu pääosin hajakuormituksesta peräisin olevista rehevöittävästä ravinteista, typestä (> ½) ja fosforista (>¼). Ihmistoiminnan aiheuttama kuormitus on

selvästi luonnon huuhtoumaa suurempi molempien ravinteiden osalta (ks. kuvio 9). (Vesistöjen ravinnekuormitus ja luonnon huuhtouma 2013.)

Levien massaesiintymät eivät ole uusi ilmiö, vaan luonnollinen osa vesiekosysteemiä. Ongelmia aiheutuu massaesiintymien yleistyessä ja runsastuessa. Levät muun muassa limoittavat ja likaavat verkkoja ja rantoja sekä aiheuttavat veteen haju- ja makuhaittoja haitaten vesistön virkistys- ja talouskäyttöä. Useat levälajit esimerkiksi sini-, panssari- ja tarttumalevistä ovat myrkyllisiä ja voivat aiheuttaa vakavia, jopa kuolemaan johtavia oireita esimerkiksi juomavedessä. Lisäksi isot levämassat edistävät vesistön happikatoa, sillä ne kuluttavat hajotessaan runsaasti happea. (100 kysymystä levistä 1999, 19-27; Itämeressä luultua enemmän myrkyllisiä leviä 2007; Setälä & Kremp 2011.)



Kuvio 9. Fosfori- ja typpikuormitus eri lähteistä sekä arvio laskeumasta ja luonnon huuhtoumasta Suomessa vuonna 2015 (Vesistöjen ravinnekuormitus ja luonnon huuhtouma 2013).

Vesistöjen ekologisen tilan arvioinnissa kasviplankton on yksi keskeisistä laatutekijöistä. Muutokset kasviplanktonin määrässä ja lajistossa ilmentävät veden laadussa tapahtuvia muutoksia melko luotettavasti, koska kasviplankton lisääntyy nopeasti, minkä vuoksi se antaa nopean vasteen ympäristöpaineille. Kasviplankton on myös

herkkä fysikaalisille ja kemiallisille ympäristötekijöille ja sillä on monimuotoinen lajisto, joilla on selvästi erilainen vaste ympäristömuutoksille. Lisäksi näytteenotto on edullista, yksinkertaista ja nopeaa. (Järvinen 2013.)

Veden a-klorofylli-pitoisuus kuvaa kasviplanktonin biomassaa. Levälajien välillä on eroja siinä, kuinka paljon ne sisältävät a-klorofyllia, joten lajikoostumus vaikuttaa siihen, kuinka hyvän arvion a-klorofyllipitoisuus antaa biomassasta. Järvi luokitellaan reheväksi, jos sen a-klorofyllipitoisuus ylittää 8 µg/l, erinomaiseksi luokitellussa järvestä pitoisuus on korkeintaan 4 µg/l. (Mitikka 2013.) Jatkuvatoimisella a-klorofyllin mittauksella voidaan saada yksittäisiä vesinäytteitä tarkempaa, lähes reaaliaikaista tietoa kasviplanktonin määrän vuoden- ja vuorokaudenaikaisesta, nopeastakin vaihtelusta, sekä ympäristötekijöiden vaikutuksesta tähän vaihteluun. Näin saadaan vesistöjen tilaan vaikuttavista muuttujista uutta, tärkeää tietoa esimerkiksi vesistökuorituksen hallinnan tueksi.

2.4 Levien hyödyntäminen

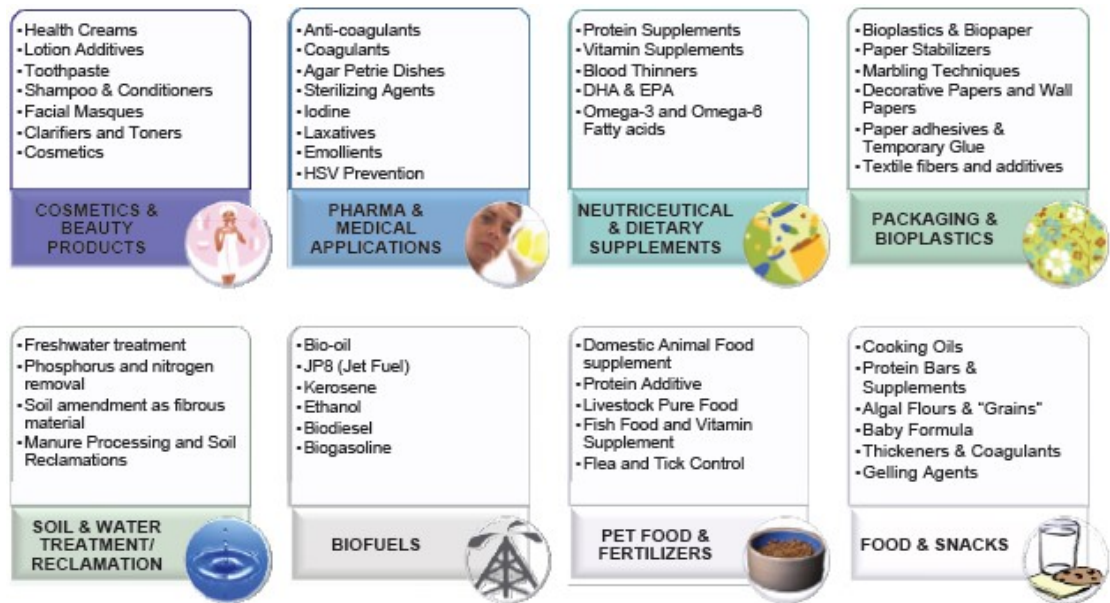
Aasialaisessa ruokakulttuurissa merilevää on käytetty ravintona jo vuosituhansien ajan, joten levien hyödyntäminen ei ole uusi ajatus. Viime vuosina ja vuosikymmeninä levät ovat kuitenkin herättäneet kiinnostusta niiden monien sovellusmahdollisuuksien vuoksi. Levät voivat teoreettisten laskelmien mukaan tuottaa biomassaa nopeammin kuin maalla elävät kasvit, joten ne voivat tulevaisuudessa olla merkittävä biomassan lähde sähkö- ja lämmitysenergian sekä biopolttoaineiden tuotantoon. Lisäksi levistä on löydetty lääke-, kosmetiikka- ja elintarviketeollisuudelle käyttökelpoisia öljyjä sekä hiilihydraatteja ja proteiineja. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 6, 8; Tyystjärvi 2016.)

Useita makroleviä käytetään nykyisin sekä ihmisten että eläinten ruuissa ja esimerkiksi saippuan, hammastahnan ja lasin valmistuksessa. Esimerkiksi Virossa ja Latviassa makrolevistä valmistetaan agaria (Seppälä, Spilling, Natunen, Kostamo, Suutari & Leskinen 2015, 10). Makrolevien kasvattaminen ja kerääminen on mikroleviä helpompaa ja yksinkertaisempaa, sillä ne kasvavat luonnonolosuhteissa rannikoiden lä-

heisydessä. Osa tuotannosta perustuu myös luonnonkantojen keruuseen. Makrolevät sisältävät huomattavasti vähemmän öljyä kuin mikrolevät ja kasvavat hitaammin, joten biopolttoainetuotannon kannalta mielenkiinnon pääpaino kohdistuu mikroleviin ja niiden öljypitoisuuden jalostamiseen esimerkiksi geenitekniikan avulla. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 9, 10.) Suomessa ei ole juuri kokemusta makrolevien hyötykäytöstä, mutta eteläisellä Itämerellä rantaan ajautunutta makrolevämassaa on kerätty hyödynnettäväksi biokaasun tuotannossa (Seppälä ym. 2015, 10).

Mikrolevää kasvatetaan pääasiassa maa-alueilla suljetuissa fotobioreaktoreissa tai avoimissa altaissa. Suomessa ei toistaiseksi ole mikrolevän tuotantoa, mutta jo Ruotsista löytyy joitakin kaupallisia kasvattamoja. Maailmanlaajuisesti suurimmat tuotantolaitokset ovat hehtaarin kokoluokkaa ja tuotantomäärät vielä pieniä, noin 5000 tn (kuivapaino) vuodessa. Tuotteiden vuotuinen markkina-arvo on noin 1000–2000 M€. (Seppälä ym. 2015, 9.) Suurimmat haasteet levänkasvatuksessa liittyvät tällä hetkellä kustannustehokkaiden kasvatus- ja korjuumenetelmien kehittämiseen. Leväkilon tuotantokustannukset ovat nykyisin vähintään kymmenkertaiset verrattuna hintaan, jolla esimerkiksi biopolttoaineiden tuottaminen olisi taloudellisesti kannattavaa (Seppälä ym. 2015, 9). Kaupallisen mittakaavan levänkasvatus vaatii suuret alkuinvestoinnit, mikä hidastaa alan kehitystä ja ammattimaisten levänkasvatusyritysten määrää (European Algae Biomass-konferenssi 2016).

Mikrolevien (ml. syanobakteerit) hyödyntämismahdollisuudet ovat hyvin moninaiset, eikä kaikkia niiden sisältämiä arvoaineita todennäköisesti vielä edes tunneta. Kuviossa 10 on esitetty joitakin tällä hetkellä tiedettyjä (mikro)levien ja niistä saatavien arvoaineiden soveltamismahdollisuuksia.



Kuvio 10. Mikrolevien ja niistä saatavien arvoaineiden hyödyntämismahdollisuuksia Verheinin (2016, 3) mukaan.

2.5 Levien pigmentaatio

Levien yhteyttämispigmentit jaetaan kemiallisen rakenteensa perusteella kolmeen pääryhmään, - klorofylleihin, karotenoideihin ja fykobiliineihin - joista muodostuu eri leväryhmille tyypillinen perusväri (ks. kuvio 11). Klorofylleistä a-klorofylliä esiintyy kaikissa leväryhmissä, kuten kaikissa fotosynteettisissä organismeissa, kun taas esimerkiksi b-klorofylliä on vain silmä- ja viherlevissä. Myös osa karotenoideista esiintyy useimmassa leväryhmässä, sitä vastoin fykobiliinejä löytyy lähinnä vain sinilevistä. Eri leväryhmien tärkeimmät pigmentit on esitetty taulukossa 1. (Seppälä 2014, 11, 12.)



Kuvio 11. Eri leväryhmien sisältämät pigmentit vaikuttavat niiden värihin. Vasemmalta oikealle: sinilevä (fykosyaniini), sinilevä (fykoerytriini), nielulevä (fykoerytriini), sinilevä (fykosyaniini), piilevä (c-klorofylli ja fukoksantiinikarotenoidi), viherlevä (b-klorofylli) ja sinilevä (fykosyaniini). (Seppälä 2014, 12.)

Taulukko 1. Tärkeimmät pigmentit eri leväryhmissä. (+) tarkoittaa, että pigmenttiä esiintyy leväryhmässä vain muutamissa lajeissa ja pigmentin merkitys leväryhmässä on pieni. (Seppälä 2014, 13.)

Pigmentti	Pigmenttiryhmä	Sinilevät (Cyanobacteria)	Nielulevät (Cryptophyta)	Panssarisimalevät (Dinophyta)	Tarttumalevät (Haptophyta)	Kultalevät (Chrysochyta)	(Eustigmatophyceae)	Silmälevät (Euglenophyta)	Viherlevät (Chlorophyta)
a-klorofylli	Klorofyllit	+	+	+	+	+	+	+	+
b-klorofylli								+	+
c ₁ -klorofylli					+	+			
c ₂ -klorofylli			+	+	+	+			
c ₃ -klorofylli						+	(+)		
Alloksaantiini	Karotenoidit		+	(+)					
Antheraksaantiini									+
19'-butanoyloksyflukosaantiini						+	+		
Diadinksaantiini					+	+	+	+	
Diatoksaantiini					(+)	+	+	+	
Ekinenoni		+							
Fukoksaantiini						+	+		
19'-heksanoyloksyflukosaantiini						+			
Luteiini									+
Peridiniini					+				
Myksoksaantofylli		+							
Neoksaantiini								+	+
Violaksaantiini							+	+	+
Zeaksaantiini		+						(+)	+
Allofykosyaniini		Fykobiiniit	+						
Fykosyaniini	+		(+)						
Fykoerytriini	(+)		(+)	(+)					
Fykoerytrosyaniini	(+)								

2.6 Klorofyllin mittaus

Levämäärän jatkuvatoimisessa seurannassa mitataan käytännössä levien yhteyttämispigmenttien fluoresenssia. Fluoresenssilla tarkoitetaan tilannetta, jossa osa valon fotoneista eli valokvanteista absorboituu aineeseen valon kulkiessa aineen läpi. Tällöin fotonin energia siirtyy absorboivaan molekyyliin ja fotonin häviää. Atomin elektronin varaus nousee viritystilaan, joka purkautuu femto–pikosekunneissa. Pääosa energiasta vapautuu useimmiten lämpönä, mutta joskus osa energiasta vapautuu uutena matalaenergisenä fotonina, jolloin puhutaan fluoresenssista. (Seppälä, Kuoppamäki & Kuha 2014, 17.)

Fluoresenssimittauksista on käytetty a-klorofyllipitoisuuden jatkuvatoimiseen seurantaan jo 1960-luvun alkupuolelta asti. Nimenomaan a-klorofylliä käytetään useimmiten vedessä olevien levien määrän arviointiin, koska sitä esiintyy kaikissa leväryhmissä runsaana. Myös muiden eri leväryhmien sisältämien pigmenttien määrää voidaan mitata, jolloin saadaan tietoa eri leväryhmien esiintymisestä ja taksonomiasta (Richardson, Lawrenz, Pinckney, Guajardo, Walker, Paerl & MacIntyre 2010, 2461–2462; Seppälä 2014, 12.)

Fluoresenssimittauksella pystytään havaitsemaan hyvin pieniä ainemääriä. Fluoresenssin määrän ja aineen pitoisuuden välillä on suora riippuvuus laimeissa liuoksissa ja kun näyte on valokemiallisesti vakaa. Fluoresenssin mittaus tehdään 90 asteen kulmassa suhteessa viritysvaikutukseen, vaikka fluoresenssia emittoituu kaikkiin suuntiin, joten vain pieni osa kokonaisfluoresenssista on havaittavissa. Lisäksi fluorometrin laitekohtaiset ominaisuudet, kuten peilit, suodattimet ja monokromaattorit vaikuttavat laitteen detektorille tulevan fluoresenssin määrään. Fluoresenssin absoluuttisen kokonaismäärän mittaus on hyvin vaikeaa, eikä fluoresenssille voidakaan antaa fyysikaalista yksikköä, vaan se ilmoitetaan suhteellisina yksiköinä, joita ovat tyypillisesti detektorin mittaama jännite (voltti), sen muunto digitaaliseksi (bitti) tai ”relative fluorescence units, RFU”. Kvantitatiivisissa analyyseissä fluoresenssi kalibroidaan standardien avulla vastaamaan fyysikaalisia yksiköitä, kuten $\mu\text{g/l}$. (Seppälä ym. 2014, 18.)

Fluoresenssin mittaus elävistä levistä on nykyisillä laitteilla teknisesti helppoa, mutta kerätyn aineiston tulkinta voi olla hyvin haastavaa. Fluoresenssin ja levämäärän vaihteluiden yhteydestä ei useinkaan saada aivan täyttä varmuutta, sillä vertailunäytteet

analysoidaan laboratoriossa liottimeen uutetusta näytteestä, jossa solujen sisältämien pigmenttien fluoresenssi poikkeaa huomattavasti elävien solujen pigmenttien fluoresenssista. Fluoresenssin avulla ja muilla menetelmillä mitattujen levämäärien erojen luotettava selittäminen vaatii niin mittauslaitteiden ja –tekniikan yksityiskohdaisen huomioimisen, kuin tietoa levien fluoresenssin fysiologisista vasteista erilaisille ympäristömuuttujille. Muun muassa fluorometrin valon voimakkuus ja valonlähteen heikentyminen laitteen ikääntyessä sekä laitteen optisten ominaisuuksien muutokset, kuten fluorometrin linssien likaantuminen, vaikuttavat suoraan mittaustulokseen. (Seppälä ym. 2014, 17-24.) Vedessä olevat humusaineet voivat vaikuttaa mittaustulokseen (Kuha 2016,20), samoin mitattavan aineen kvanttisuhteen vaihtelu, johon elävillä levillä voivat vaikuttaa muun muassa niiden kokema valoympäristö, kasvuvaihe ja ravinnetilanne (Richardson ym. 2010, 2468).

Markkinoilla on useiden eri laitevalmistajien levien yhteyttämisspigmenttien fluoresenssia mittaavia laitteita eli fluorometrejä, sekä kenttäkäyttöisiä jatkuvatoimisia *in situ* –mittauksiin tarkoitettuja antureita, että laboratoriolaitteita ja erilaisia läpivirtaussovelluksia. Yleisimmillä kenttäkäyttöisillä anturityypeillä voidaan arvioida vain yhden pigmentin - esim. a-klorofylli, fykosyaniini tai fykoerytriini - fluoresenssia kerrollaan, sillä ne käyttävät vain yhtä aallonpituusalueetta valoaktiivisten pigmenttien virittämisessä ja fluoresoidun valon havaitsemisessa. Tämä voi muodostua ongelmaksi esimerkiksi silloin, kun leväyhteisössä on myös sinileviä, joille ominainen viritysaallonpituus poikkeaa a-klorofyllin aallonpituudesta. Tällöin yhden aallonpituuden käyttäminen voi johtaa leväpitoisuuden aliarvioimiseen. (Richardson ym. 2010, 2468; Huotari, Kuha & Seppälä 2014, 25-26.) Luotettavampi arvio levien kokonaisbiomassasta saadaan mittaamalla a-klorofyllin fluoresenssin lisäksi fykosyaniinin fluoresenssia. Tämä voidaan tehdä käyttämällä joko kahta erillistä anturia mittaamaan a-klorofylliä ja fykosyaniinia, tai kahden tai kolmen kanavan antureita, joiden toimintaperiaatteena on virittää vuorotellen a-klorofyllin ja sinilevien apupigmenttejä niille ominaisilla aallonpituuksilla. (Huotari ym. 2014, 25-26; Seppälä 2009, 62, 63.)

Kenttäkäyttöiset jatkuvatoimiset fluorometrit voivat toimia yksittäisinä antureina tai osana mittaussondia, jolla mitataan useita eri muuttujia. Tiedonkeräimet eli dataloggerit vastaanottavat ja varastoivat antureiden mittaamaa tietoa, joka voidaan siirtää

esimerkiksi matkapuhelinverkkoja hyödyntäen loppukäyttäjän tietokoneelle tai verkkopalvelimelle. Yksinkertaisimmillaan tiedot voidaan tallentaa vasta mittausjakson jälkeen kerralla ilman tiedonsiirtoa, mutta varsinkin useita muuttujia mittaavilta mitausasemilta tietoa on turvallisinta siirtää ja tallentaa säännöllisin väliajoin. (Huotari ym. 2014, 27.)

2.7 Fluoresenssiaineiston primääri- ja paikalliskalibrointi

Kaikki jatkuvatoimiset (*in-situ*) anturit vaativat mitattavasta suureesta tai toimintaperiaatteesta riippumatta kahdenlaista kalibrointia: laboratoriossa tehtävän primäärikalibroinnin sekä mittaus tuloksille jälkeenpäin tehtävän, vertailuvesinäytteiden tuloksiin perustuvan paikalliskalibroinnin. Paikalliskalibrointi tehdään tilastotieteen keinoin. Yleisimmin käytetään lineaarisia regressioyhtälöitä, jolloin anturin mittaamien tulosten ja laboratoriossa määritettyjen vertailuvesinäytteiden tulosten välillä tulee olla korrelaatio (r) ja niiden suhteen tulee olla lineaarinen. Joissain tapauksissa, esimerkiksi fluoresenssimittausten kalibroinneissa, johon α -klorofyllin mittausta lukeutuu, voidaan joutua käyttämään myös usean muuttujan regressioyhtälöitä. (Ketola, Kuoppamäki, Huotari, Seppälä, Kotamäki & Kallio 2014, 41-44.)

Laitteiden primäärikalibrointi tehdään yleensä jo valmiiksi tehtaalla. Siinä varmistetaan, että laitteen mittausvaste mitattavaan signaaliin on aina sama. Mittausantureiden mittausvaste ei kuitenkaan ole välttämättä täysin samanlainen edes tehtaalta tullessa, joten eri anturit voivat antaa samasta mittausaineistosta toisistaan poikkeavan tuloksen, mikä vaikeuttaa eri laitteilla mitattujen aineistojen keskinäistä vertailua ja tulkintaa. Myös laitteen optiset ominaisuudet voivat muuttua laitteen ikääntyessä, jolloin laitteen mittausvastekin muuttuu. Mittauslaitteet onkin syytä primäärikalibroida luotettavalla standardilla vähintään kerran vuodessa, jotta eri mittausjaksoilla saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia. (Ketola ym. 2014, 41.)

Primäärikalibrointiin käytettävän standardin tulee olla fluoresenssiominaisuuksiltaan vakaa sekä absorboida ja fluoresoida samoilla aallonpituuksilla kuin laitteella normaalisti mitattava aine. Kalibroinnissa voidaan käyttää kiinteää toisiostandardia, joka on laitemallikohtainen, fluoresoiva muovi- tai lasikappale. Kiinteää toisiostandardia ei

voi yksinään käyttää usean laitteen samanaikaisessa primäärikalibroinnissa, vaan eri laitteiden lukemien yhteensovittamiseksi tarvitaan aina nestemäinen primääristandardi, esimerkiksi kaupallinen a-klorofyllin standardiliuos, jossa klorofylli on stabiloitu asetoniin tai etanoliin. (EXO User Manual n.d., 28; Ketola ym. 2014, 41-42.)

Fluoresenssiin perustuvassa mittauksessa tuloksena saatu fluoresenssin määrä ei vastaa suoraan vedessä olevaa leväpitoisuutta tai leväbiomassan määrää. Huolellisella kalibroinnilla a-klorofyllin fluoresenssi voidaan saada vastaamaan laboratoriossa määritettyä a-klorofyllin pitoisuutta, joka kuvastaa kohtalaisen hyvin veden leväpitoisuutta. Tässä tärkeässä roolissa on paikalliskalibrointi. (Ketola ym. 2014, 41.)

Paikalliskalibrointi tehdään mittaustuloksille jälkikäteen varsinaiselta mittauspaikalta otettujen, laboratoriossa analysoitujen vertailuvesinäytteiden perusteella. Ilman vertailunäytteitä mittaustuloksia voidaan pitää korkeintaan suuntaa-antavina ja niiden käyttömahdollisuudet ovat hyvin rajalliset. Vertailunäyte otetaan mahdollisimman läheltä jatkuvatoimisesti mittaavaa anturia samalta syvyydeltä. Kun jatkuvatoimisen mittauksen tavoitteena on havaita vuodenaikaisia muutoksia klorofyllipitoisuudessa, tarvitaan kasvukauden ajalta useita vertailunäytteitä. Vertailunäytteiden määrää vielä tärkeämpää on niiden kattavuus. Vertailunäytteitä tulisi olla sekä suurista että pienistä pitoisuuksista ja niiden tulisi kattaa mittausjakson aikainen mitattavan suuren vaihteluväli mahdollisimman tarkasti. Vertailunäytteitä otettaessa ensiarvoisen tärkeää on merkitä kaikki havaitut poikkeavuudet, kuten antureiden likaisuus tai poikkeavat sääilmiöt, huoltopäiväkirjaan. Mikäli mittausaineistossa havaitaan myöhemmin poikkeavia arvoja, huoltopäiväkirjan avulla voidaan mahdollisesti selvittää niiden syy sekä päättää, poistetaanko kyseiset arvot mittausdatasta. (Ketola ym. 2014, 43.)

3 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

3.1 Tutkimuksen tausta ja tarve

Tutkimus toteutettiin BioA-hankkeessa, jonka yhtenä tavoitteena oli kehittää menetelmä luonnollisten leväkantojen hallittuun kasvattamiseen luonnon olosuhteissa maatalouden vesiensuojelukosteikolla. Levänkasvatusmenetelmää testattiin Tarvaalan Biotalouskampuksen pohjoisella kosteikolla, jonka tulouomaan rakennettiin kasvihuonemuovista katos pyrkimyksenä parantaa levien kasvuolosuhteita. Kyseinen paikka valittiin, sillä aiempien vuosien maastoseurannan perusteella tiedettiin siinä kasvavan luonnostaan leviä. Lisäksi lähes puolet pohjoisen kosteikon valuma-alueesta on viljelykäytössä olevaa peltoa, mistä johtuen kosteikolle tulevan veden arvioitiin olevan ravinnepitoista ja siten levien kasvua edistävää.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua seurata jatkuvatoimisesti. Edellisen vuoden levänkasvatus- ja levälannoituskokeissa oli käynyt ilmi, että reaaliaikainen tieto levänkasvatuskohteella tapahtuvista levämäärän muutoksista on tarpeen esimerkiksi ajoitettaessa levän keräämistä lannoituskokeita varten. Lisäksi tavoitteena oli selvittää, kuinka veden ravinteiden ja lämpötilan vaihtelu sekä sääoloissa tapahtuvat muutokset vaikuttavat levien määrään tutkimuskohteella. Pyrkimyksenä oli edistää BioA-hankkeen levänkasvatusmenetelmän kehittämistä selvittämällä levien kasvuun vaikuttavia tekijöitä. Tutkimus toteutettiin nykyaikaista tekniikka hyödyntäen automaattisilla, jatkuvatoimisilla seurantalaitteistoilla. Tutkimuksen toteutus on kuvattu seuraavissa luvuissa.

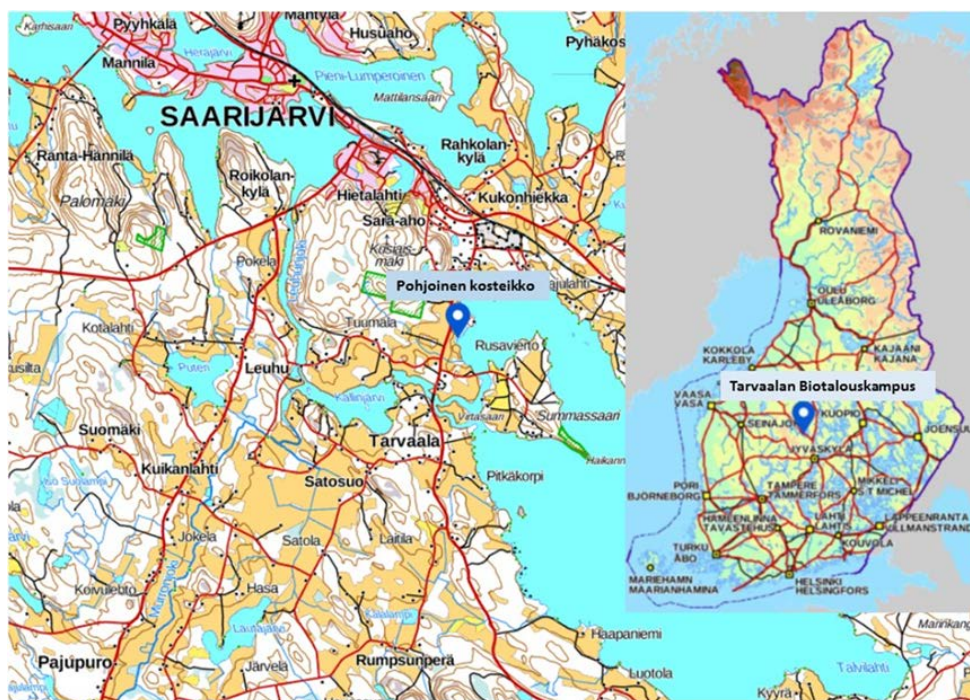
3.2 Tutkimusalue

Tutkimus toteutettiin Tarvaalan Biotalouskampuksen pohjoisella kosteikolla (ks. kuvio 12), joka sijaitsee Keski-Suomessa Saarijärven Tarvaalassa (ks. kuvio 13) Summanjärven rannalla, joka on osa Saarijärven vesireittiä. Vaihtelevista joki-, koski- ja järviosuuksista koostuva maisemallisesti arvokas Saarijärven reitti kuuluu Natura 2000-verkostoon. Reitillä on useita koskiensuojelulailta suojeltuja koskia, jotka ovat

tärkeitä kalojen lisääntymisalueita. Saarijärven vesireitin vedet ovat karuja ja humuspitoisia, rannat ovat suurelta osin asuttuja ja viljeltyjä. (Saarijärven reitti 2013.)

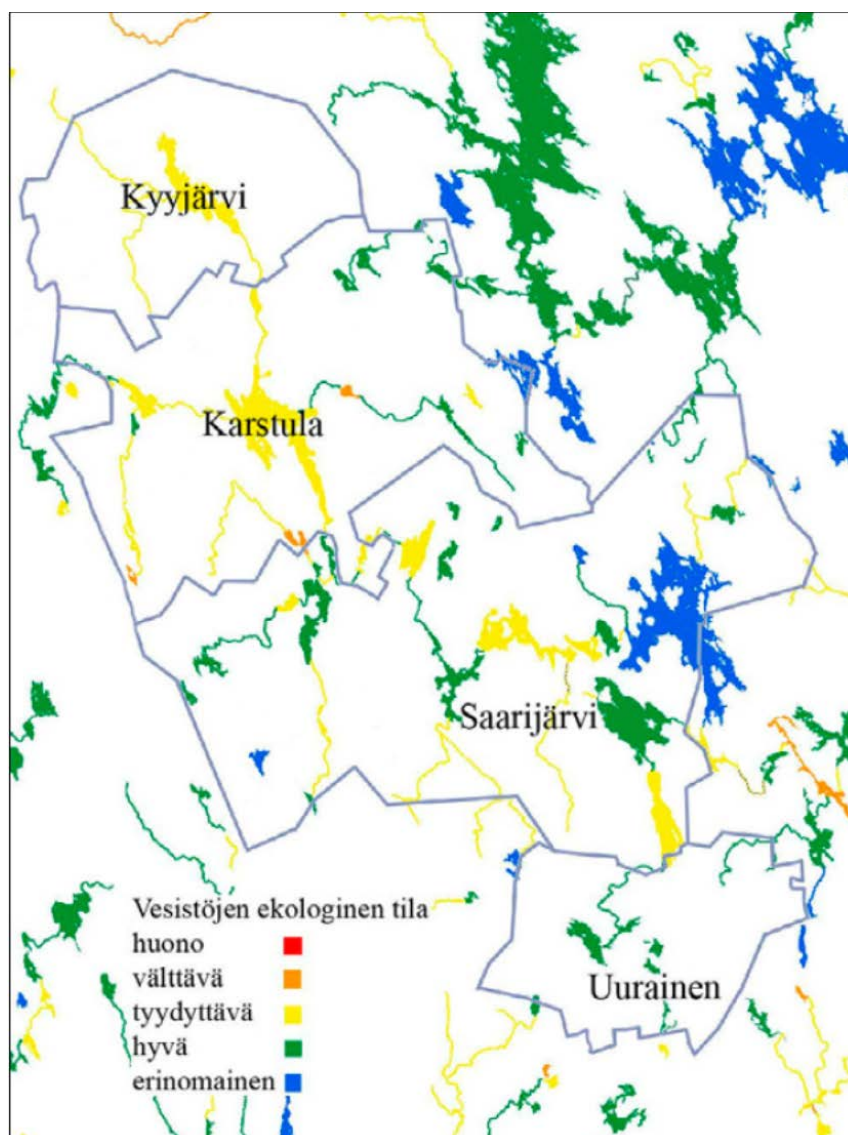


Kuvio 12. Tarvaalan Biotalouskampuksen eteläinen ja pohjoinen kosteikko



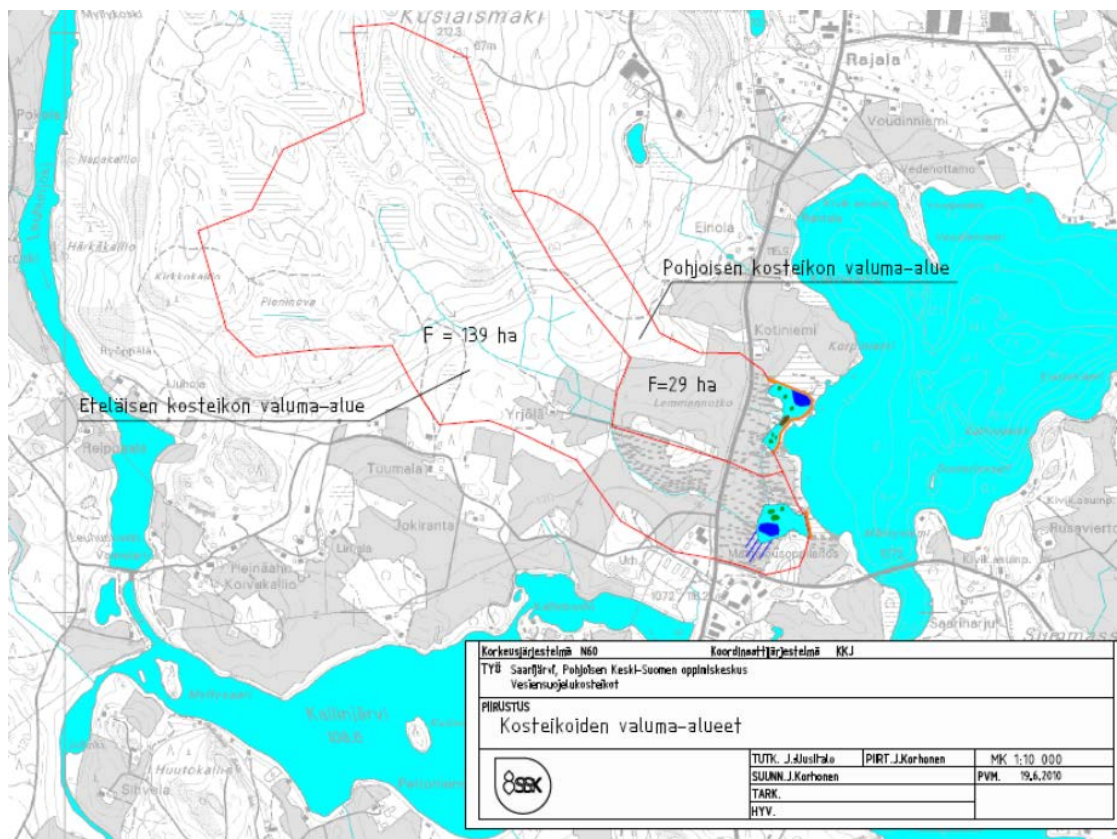
Kuvio 13. Tutkimusalueen sijainti (Tulostettu Maanmittauslaitoksen asiointipalvelusta, muokattu)

Summanen-järvi on luokiteltu ekologiselta tilaltaan tyydyttäväksi. Lähes 60 % Saarijärven reitin järvistä on ekologiselta tilaltaan tyydyttävässä tai sitä huonommassa tilassa pääasiassa hajakuormituksen aiheuttaman rehevöitymisen vuoksi (ks. kuvio 14). Suurin osa Keski-Suomen alueen tyydyttävän tai sitä huonomman ekologisen luokituksen saaneista vesistöistä sijaitsee Saarijärven reitillä. (Möttönen, Konttinen & Salo 2016, 11.)



Kuvio 14. Saarijärven reitin vedenlaatuluokitus (Möttönen ym. 2016, 11)

Pohjoinen kosteikko on pinta-alaltaan 1,34 ha, mikä on 4,6 % sen 29 hehtaarin kokoisesta valuma-alueesta. Valuma-alueesta noin 52 % on metsätalousmaata ja noin 48 % maatalousmaata, joka oli vuonna 2016 kokonaan nurmiviljelyssä. Suomen Salaojakeskuksen toimittama valuma-alueen määrittäminen on esitetty kuviossa 15. Pohjoisen kosteikon valuma-alueen vallitsevat maalajit ovat metsäalueiden hiekkamoreeni ja peltojen hiesu.



Kuvio 15. Tarvaalan Biotalouskampuksen kosteikkojen valuma-alueet (Suomen Salaojakeskus)

3.3 Tutkimusajanjakso

Tutkimus toteutettiin 19.5. – 29.8.2016. Tutkimusjakson pituudeksi tuli näin ollen 103 vuorokautta. Tutkimusaika lyheni alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaisesta 20 vuorokaudella jakson alussa sattuneen EXO-mittarin asennusvirheen vuoksi,

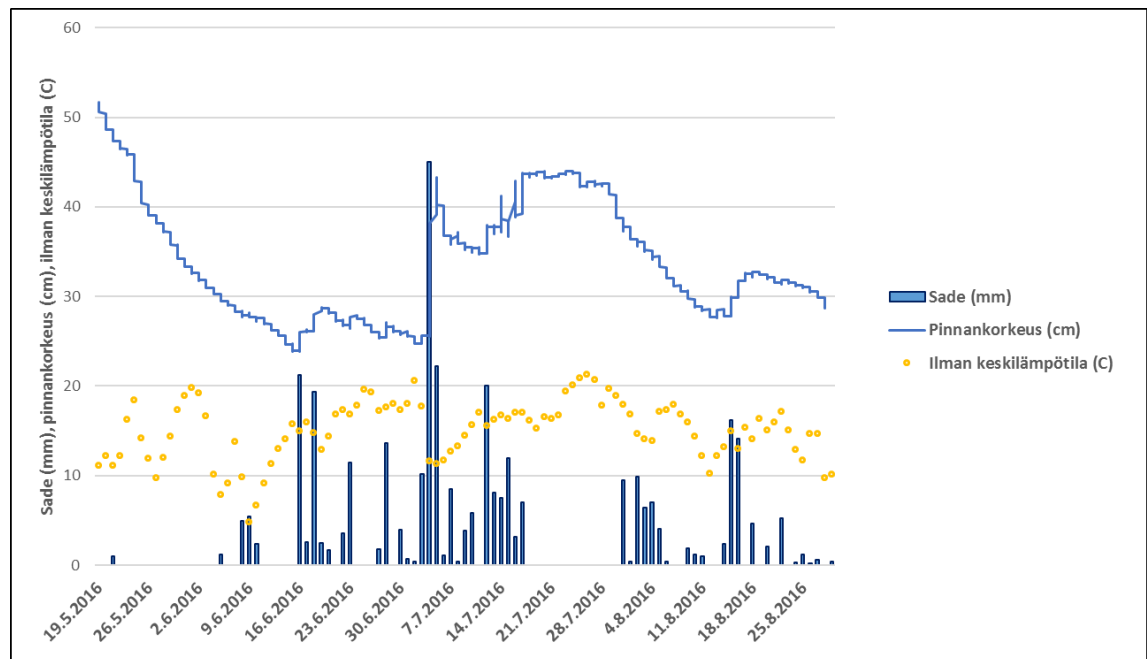
jonka takia mittarin tulokset eivät tulleet oikeaan verkko-osoitteeseen ja ne menetettiin 18 vuorokauden ajalta, sekä jakson lopussa (2 vrk) vuokratun mittausanturin kiireisen palautusaikataulun vuoksi. Tutkimussuunnitelman mukainen tutkimusaika määräytyi aikaisempina vuosina tehtyjen silmämääräisten havaintojen perusteella, joiden mukaan veden pinnalle on tullut näkyvää levää kevään sääoloista riippuen toukokuun alun - toukokuun puolen välin tienoilla ja viimeiset levähavainnot on tehty elokuun puolivälin - elokuun lopun välillä. Neljän kuukauden tutkimusjakso katsottiin sekä riittäväksi ajaksi selvittää, toimiiko automaattinen leväpitoisuuden mittaus tutkimuskohteella, että kohtuulliseksi mittausanturin vuokratustannusten osalta.

Aiempien tutkimusten (mm. Yang, Colom, Pierson & Pettersson 2016, 499, 500; Kuha 2016, 9) mukaan sääolosuhteilla on vaikutusta kasviplanktonin esiintymiseen vesistöissä, joten sääolojen vaikutusta tutkimuskohteen levämäärään ja sen vaihteluihin haluttiin selvittää. Jyväskylän lentoasemalla mitatut tutkimusjakson kuukausittaiset sademäärät (mm) sekä ilman keskilämpötila (°C) on esitetty taulukossa 2. Tutkimuskuukausien lämpötilat vastasivat heinä- ja elokuun osalta täysin Ilmatieteen laitoksen pitkäaikaista keskiarvoa ilmastollisella vertailukaudella 1981-2010. Toukokuun keskilämpötila oli vajaat 4 astetta ja kesäkuun vajaan asteen tavanomaista lämpimämpi. Kesäkuussa myös sademäärä oli hyvin lähellä Ilmatieteen laitoksen pitkäaikaista keskiarvoa. Sen sijaan toukokuun sademäärä jäi alle puoleen tavanomaisesta, kun taas heinä- ja elokuussa satoi 25-30 mm tavanomaista enemmän.

Taulukko 2. Ilman kuukausittainen keskilämpötila (°C) ja sademäärä (mm) vuosina 2016 ja 2015 sekä Ilmatieteen laitoksen ilmastollisella vertailukaudella 1981-2010 (Toukokuun 2016 sää ja tilastot n.d.; Kesäkuun 2016 sää ja tilastot n.d.; Heinäkuun 2016 sää ja tilastot n.d.; Elokuun 2016 sää ja tilastot n.d.)

	Keskilämpötila (°C)			Sademäärä (mm)		
	2016	2015	1981-2010	2016	2015	1981-2010
Toukokuu	12,4	8,7	8,9	20	51	44
Kesäkuu	14,3	12,2	13,7	61	69	67
Heinäkuu	16,5	14,7	16,5	109	122	84
Elokuu	14,1	15,6	14,1	108	40	78

Tarvaalan Biotalousinstituutin sääasemalla tutkimusjakson suurimmat sateet mitattiin heinäkuun alussa 4. ja 5.7., jolloin kahdessa päivässä satoi lähes 70 mm, mikä näkyi tutkimuskohteen vedenpinnankorkeuden nopeana nousuna. Heinäkuu myös jatkui sateisena aina kuun puoliväliin saakka. Suurimmat vedenpinnankorkeudet tutkimuskohteessa mitattiin kuitenkin vasta sadejakson päättymisen jälkeen 17. – 30.7., sekä tutkimusjakson alussa toukokuun puolessa välissä olleiden sadepäivien jälkeen. Tutkimusjakson vuorokautiset sadesummat (mm) ja ilman keskilämpötila (°C) Tarvaalan Biotalousinstituutin sääasemalla mitattuna sekä veden pinnankorkeus mittauskohteessa (cm) on esitetty kuviossa 16.



Kuvio 16. Vuorokautinen sadesumma (mm) ja ilman keskilämpötila (°C) Tarvaalan Biotalousinstituutin sääasemalla mitattuna sekä mittauskohteen vedenpinnankorkeus (cm) tutkimusjaksolla 19.5. – 29.8.2016

3.4 Aineiston kerääminen

Kosteikolle tulevan veden leväpitoisuutta kuvaavaa a-klorofyllin ja fykosyaniinin määrää mitattiin Total Algae -yhdistelmäanturilla, joka vuokrattiin Luode Consulting

Oy:ltä JAMK:n omaan EXO2 –mittaussondiin. Ratkaisulla saatiin kustannussäästöä, sillä vältyttiin kokonaisen mittaussondin vuokraamiselta tai ostamiselta. Lisäksi tutkimusryhmällä oli ennestään käyttökokemusta EXO2:sta ja sen toimintavarmuus sekä mittaustulokset olivat aiempien kokemusten perusteella hyviksi havaittu. Yhdistelmäanturi valittiin, koska Jyväskylän yliopiston Kristiina Vuorion suorittaman mikroskooppitarkastelun perusteella tiedettiin tutkimuskohteen leväyhteisössä olevan myös sini-leviä. Mittaussondissa oli tutkimusjaksolla a-klorofylli- (viritys λ 470 ± 15 nm, emissio λ 685 ± 20 nm) ja fykosyaniiniantureiden (viritys λ 590 ± 15 nm, emissio λ 685 ± 20 nm) lisäksi veden lämpötilaa ($^{\circ}\text{C}$), johtokykyä ($\mu\text{S}/\text{cm}$), fluoresenssia (fDOM) ja sameutta (FTU) mittaavat anturit sekä pinnankorkeusanturi (cm).

Veden ravinnepitoisuuksien vaihtelun vaikutus levämäärään tahdottiin selvittää, joten ravinnepitoisuutta mitattiin JAMK:n omalla S::can UV-VIS spektrometrillä. Sillä kosteikolle tulevasta vedestä mitattiin optisesti sameutta (FTU) ja nitraattitypen ($\text{NO}_3\text{-N}$) sekä liukoisen orgaanisen hiilen pitoisuutta (DOC). Veden kokonaisfosfori (P-tot) ja kiintoainepitoisuutta ei pystytä nykyisillä käytössä olevilla antureilla suoraan mittaamaan, joten ne laskettiin regressioyhtälön avulla käyttämällä sijaismuuttujana sameutta, jonka on havaittu korreloivan hyvin kiintoainepitoisuuden ja joissakin tapauksissa kokonaisfosforipitoisuuden kanssa (mm. Valkama, Lahti & Särkelä 2007; Siimekselä, Stenman & Ylimartimo 2011, 27).

Jatkuvatoimiset mittausanturit asennettiin mittaustaikalle (ks. kuvio 17) Tarvaalan Biotalouskampuksen pohjoisen kosteikon tulouomaan 15.4.2016 ja kiinnitettiin uoman yli rakennettuun siltarakennelmaan (ks. kuvio 18).



Kuvio 17. Mittauspaikan sijainti Tarvaalan Biotalouskampuksen pohjoisen kosteikon tulouomassa (Ilmakuva Arto Ahonen, Saarijärven Eräpalvelut Ky)



Kuvio 18. Scan- ja EXO-anturit 15.4.2016 asennettuna siltarakennelmaan mittauspaikalla (Alkuperäinen kuva Samuli Lahtela, muokattu)

Mittausantureiden virtalähteinä käytettiin akkuja, koska mittauspaikalla ei ollut mahdollista käyttää verkkovirtaa. Akut, paineilmapullo S::can-anturin automaattista puhdistusta varten sekä antureiden tiedot tallentavat ja lähettävät dataloggerit sijoitettiin suojakaappeihin (ks. kuvio 19) uoman varteen. Mittausasemien mittaustaajuus oli kerran tunnissa ja tiedonsiirto tapahtui reaaliaikaisesti GSM-yhteydellä JAMK:n Mango-verkkopalvelimelle. Molemmat mittausanturit puhdistuivat automaattisesti tunnin välein, S::can paineilmalla ja EXO2 harjamenetelmällä. Lisäksi anturit puhdistettiin manuaalisesti kerran viikossa.



Kuvio 19. Akut, dataloggerit ja paineilmapullo sijoitettiin suojakaappeihin mittauspaik-
teen viereen. (Kuvat Samuli Lahtela)

Mittauspaikalta otettiin a-klorofyllipitoisuutta mittaavan fluorometrin (EXO2) paikalliskalibrointia ja validointia varten seitsemän vesinäytettä, joista määritettiin a-klorofyllipitoisuus JAMK:n Rajakadun laboratoriossa, koska Biotalousinstituutin laboratoriossa ei ole a-klorofyllin määrittämiseen sopivaa spektrometriä. S::can-anturin paikalliskalibrointia ja validointia varten otettiin kahdeksan vesinäytettä, joista määritet-

tiin sameus (FNU) sekä kiintoaine, kokonaistyyppi (N), nitraattityppi ($\text{NO}_3\text{-N}$), kokonaisfosfori (P) ja liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) pitoisuudet Biotalousinstituutin laboratoriossa.

3.5 Aineiston käsittely

Antureiden keräämät tiedot tallentuivat tunnin välein Mango-verkkopalvelimelle (mango.labranet.jamk.fi), josta ne olivat saatavilla sekä halutun aikavälin kuvaajina, että ladattavissa Excel-taulukkoina. S::can-anturilla mitattavia ja tutkimuksessa käsiteltyjä muuttujia oli kuusi (sameus, DOC, $\text{NO}_3\text{-N}$, kokonais-N, kokonais-P ja kiintoaine) ja EXO2-anturilla neljä (veden lämpötila, pinnankorkeus, a-klorofylli ja fykosyaniini), joista kaikista saatiin tutkimusjakson aikana lähes 2500 mittaustulosta.

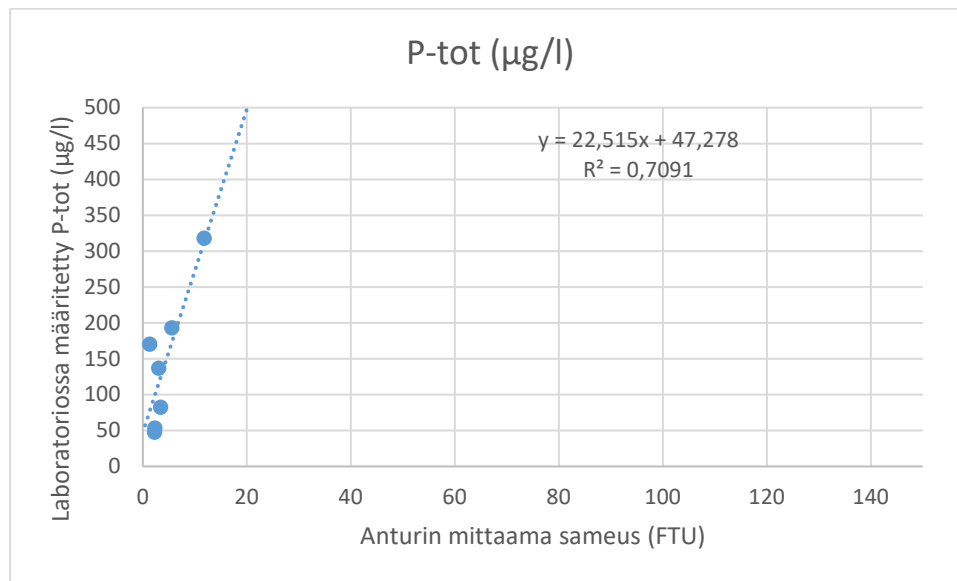
Veden a-klorofyllipitoisuus määritettiin vesinäytteistä JAMK:n Rajakadun laboratoriossa, jossa on kyseiseen määrittämiseen soveltuva välineistö. Vesinäytteet otettiin ilta-päivisin, kuljetettiin kylmälaukussa ja siirrettiin laboratoriossa välittömästi jääkaappiin suojaan valolta. Näytepulloina käytettiin yhden litran ruskeita lasipulloja. Näytteet analysoitiin näytteenottoa seuraavana päivänä (ks. kuvio 20) standardin SFS 5772 mukaisesti ja tulos ilmoitettiin $\mu\text{g/l}$ yhden desimaalin tarkkuudella. Rinnakkaisia analyysejä tehtiin kolme, joiden keskiarvosta määrytyi a-klorofyllipitoisuus.

S::can-anturin kalibrointia ja validointia varten otetut vesinäytteet analysoitiin heti näytteiden ottamisen jälkeen Biotalousinstituutin laboratoriossa. Kaikista määrittämisestä suureista tehtiin kaksi rinnakkaista määrittämistä. Kiintoainepitoisuus määritettiin $1,2 \mu\text{m}$:n lasikuitusuodattimella standardin SFS-EN 872 mukaisesti. Liukoinen orgaaninen hiili (DOC), nitraattityppi ($\text{NO}_3\text{-N}$), kokonaistyyppi (N-tot) ja kokonaisfosfori (P-tot) määritettiin Hach Lance DR 3900 spektrofotometrillä pikakyvettitesteillä maa-hantuojalta saatujen työohjeiden mukaisesti. Liukoisen orgaanisen hiilen määrittämistä varten vesinäyte suodatettiin ensin Puradisc Aqua 30 $0,45 \mu\text{m}$:n ruiskusuodattimella.



Kuvio 20. Miia Jämsén määrittä vesiäytteiden a-klorofyllipitoisuuden JAMK:n Rajakadun laboratoriossa.

Aineiston käsittelyssä ja tulosten analysoinnissa hyödynnettiin Excel-taulukkolaskentaohjelmaa. S::can-anturin mitaamat tulokset, eli ns. raakadata, kalibroitiin käyttämällä yhden selittävän muuttujan regressioanalyysia (ks. luku 3.4.1). Kiintoaine- ja kokonaisfosforipitoisuuden laskemisessa sijaismuuttujana käytettiin sameutta (ks. kuvio 21). EXO2:n tuottama raakadata kalibroitiin vastaamaan laboratoriossa määritettyä a-klorofyllipitoisuutta käyttäen selittävinä muuttujina anturin mitaamia a-klorofylli- ja fykosyaniinipitoisuuksia. Myös veden lämpötilan ja liukoisen organisen aineen fluoresenssin (fDOM) lisäämistä selittäviksi muuttujiksi testattiin, mutta kummankin vaikutus yhtälöön oli niin pieni, että niiden käytöstä luovuttiin.



Kuvio 21. Kokonaisfosforipitoisuuden (µg/l) kalibrointiyhtälö, jossa sijaismuuttujana S::can-anturin mittaama sameus (FTU)

3.5.1 Regressioanalyysi

Regressioanalyysillä tutkitaan yhden tai useamman selittävän muuttujan (riippumaton muuttuja) toiminnallista vaikutusta selitettävään muuttajaan (riippuva muuttuja/vastemuuttuja). Regressioanalyysia käytetään, kun muuttujien välisen riippuvuuden muoto on tiedossa, tai siitä ollaan kiinnostuneita. Muuttujien välistä riippuvuutta voidaan arvioida myös korrelaatioanalyysin avulla, mutta tätä käytettäessä muuttujien välinen riippuvuus ei ole toiminnallista, tai riippuvuussuhteen muodosta ei olla kiinnostuneita (Ranta, Rita & Kouki 1992, 365-366).

Regressioanalyysia voidaan käyttää joko selittävänä tai ennustavana mallina. Molemmissa tapauksissa otoskoon on oltava riittävä; yhden selittävän muuttujan malleissa vähintään noin 20 ja useamman selittävän muuttujan malleissa vähintään 50, mielellään 100 (Taanila 2010, 1). Regressioanalyysi on kvantitatiivinen menetelmä, jota käytetään määrällisessä tutkimuksessa, joten vähintään selitettävän muuttujan tulee olla määrällinen. Selittävässä muuttujissa voi olla myös esimerkiksi järjestysasteikollisia muuttujia. (Taanila 2010, 1; Regressioanalyysi 2008.)

Perinteinen (lineaarinen) regressioanalyysi sisältää oletuksen, että regression jäännösvarianssit ovat normaalisti jakautuneita ja että selittävä muuttuja (x) ei sisällä mitausvirhettä, tai virhe on ainakin merkittävästi pienempi kuin selitettävässä muuttujassa (y). Lineaarisen regressiomallin käyttö onnistuu esimerkiksi kalibroitaessa jatkuvatoimisia sameusmittauksia sameuden laboratoriomääritykseen perustuvilla vertailunäytteillä. Kalibrointisuora on muotoa $y = ax + b$, jossa y on laboratoriotulos, x on hetkellinen anturin mittaustulos, a on kalibrointisuoran kulmakerroin ja b on vakio, eli suoran y -akselin leikkauspiste. Regressiokäyrää ei tule pakottaa kulkemaan origon kautta, sillä anturimittauksissa on satunnaista tai systemaattista vaihtelua. (Ketola ym. 2014, 44.)

A-klorofyllin fluoresenssimittausten kalibroinnissa joudutaan usein käyttämään usean muuttujan regressioyhtälöä, jossa selitettävänä muuttujana (y) on laboratoriossa mitattu a-klorofyllipitoisuus ja selittäviä muuttujia ovat klorofyllin sekä fykosyaniinin fluoresenssit. Tällöin kalibrointiyhtälö on muotoa $y = ax + bz + c$, jossa y on laboratoriotulos, x on klorofyllianturin mittaustulos, z on fykosyaniinianturin mittaustulos ja c on vakio, eli suoran y -akselin leikkauspiste. Selittäviksi muuttujiksi voidaan lisätä myös muita fluoresenssiin mahdollisesti vaikuttavia ympäristötekijöitä, kuten lämpötila ja valaistus, jos halutaan arvioida taustamuuttujien merkitys korjausyhtälössä. Kyseistä muuttujaa ei kannata sisällyttää yhtälöön, jos sen kerroin ei eroa tilastollisesti merkitsevästi nolasta. Anturihavaintojen korjaamiseen käytettävän mallin selitysasteen (r^2) tulisi olla mahdollisimman lähellä yhtä. (Ketola ym. 2014, 44-46.)

3.5.2 P-arvo

P-arvo kuvaa mallin tai muuttujien tilastollista merkitsevyyttä ja ilmaisee todennäköisyyden nollahypoteesin toteutumiselle. Nollahypoteesi voi olla esimerkiksi, että muuttujien välillä ei ole (lineaarista) riippuvuutta, toisin sanoen tulokset voisivat olla millä tahansa satunnaisilla arvoilla samat. Vastahypoteesina muuttujien välillä on (lineaarinen) riippuvuus, jolloin toisen muuttujan perusteella voidaan määritellä toisen muuttujan arvo. P-arvo kuvaa riskiä hylätä voimassa oleva nollahypoteesi, toisin sanoen tulos on sitä luotettavampi, mitä pienempi p-arvo on. (Ranta ym. 1992, 112.)

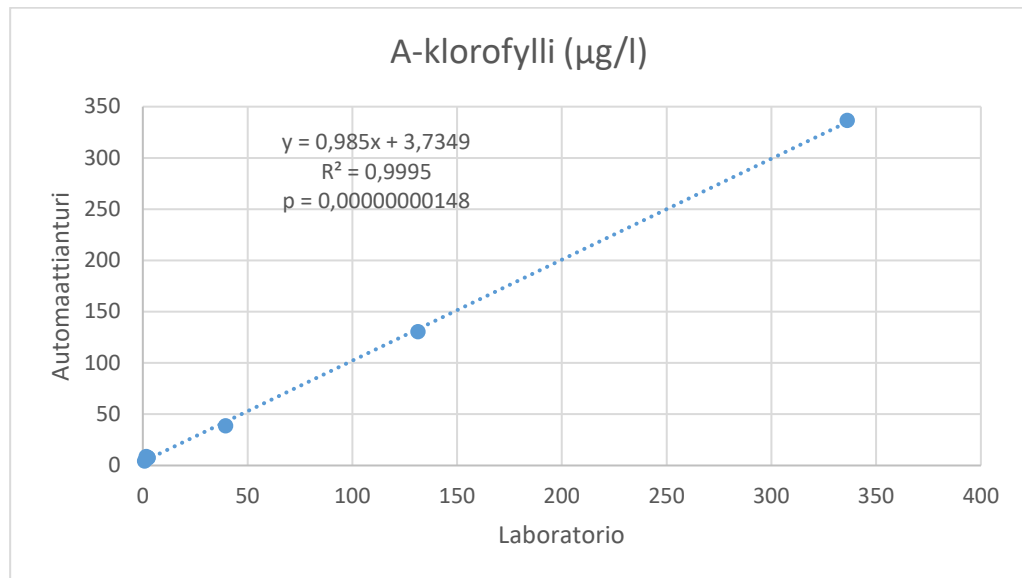
Usean selittävän muuttujan regressiomalleja käytettäessä on syytä varmistua selittävien muuttujien merkitsevyydestä suhteessa selitettävään muuttujaan. Tämä tehdään t-testillä, jonka tuloksena jokaiselle selittävälle muuttujalle saadaan t-arvo. Toisen usean selittävän muuttujan regressiomalliin liittyvä testi on F-testi, joka kertoo mallin toimivuudesta ylipäätään. Toisin sanoen, pystytäänkö malliin otetuilla selittävillä muuttujilla lainkaan selittämään selitettävää muuttujaa. Sekä t- että F-testistä saadaan selville myös merkitsevyytaso (p), joka ilmoittaa virheellisen päätelmän todennäköisyyden. P-arvon tulee olla $< 0,05$ (5 %:n riskitaso) tai $< 0,01$ (1 %:n riskitaso), jotta mallia tai muuttujaa voidaan pitää tilastollisesti merkitsevänä. (Hypoteesien testaus 2003.)

4 Tutkimustulokset ja tulosten tarkastelu

4.1 Automaattianturi- ja laboratoriotulosten vastaavuus

4.1.1 EXO2; a-klorofylli

Jatkuvatoimisen automaattianturin mittaama, paikalliskalibroitu a-klorofyllipitoisuus vastasi laboratoriossa määritettyä pitoisuutta erinomaisesti selityskertoimen (r^2) ollessa 0,9995 ja mallin toimivuutta kuvaavan F-testin p-arvon ollessa 0,00000000148 (ks. kuvio 22).



Kuvio 22. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen a-klorofylliarvojen vastaavuus

A-klorofyllianturin paikalliskalibroinnissa käytettiin kahden selittävän muuttujan regressioyhtälöä, jossa selittävinä muuttujina (x) olivat anturin mittaamat a-klorofyllin ja fykosyaniinin pitoisuudet ja selitettävänä (y) muuttujana laboratoriossa vesinäytteistä määritetty a-klorofyllin pitoisuus. Kahden selittävän muuttujan malli valittiin, koska yhden selittävän muuttujan (a-klorofyllin anturitulos) regressioyhtälön selitysaste jäi kalibrointia varten liian heikoksi ($r^2 = 0,41$). Kalibrointiyhtälöä ei tavallisesti pakoteta kulkemaan origon kautta automaattimittauksiin liittyvän satunnaisen tai systemaattisen vaihtelun takia (Ketola ym. 2014, 44), mutta kyseisessä yhtälössä vakiotermin olisi ollut negatiivinen ja sen käyttö aiheutti kalibroituun aineistoon pienillä pitoisuuksilla negatiivisia a-klorofylliarvoja, joten vakio pakotettiin arvoon 0. Kalibrointiyhtälö oli näin ollen muotoa $y = ax + bz$, jossa y on a-klorofyllin laboratoriotulos, x on klorofyllianturin mittaustulos ja z on fykosyaniinianturin mittaustulos. Kalibrointiyhtälön selityskerroin (r^2) oli 0,9991 ($p = 0,0000005$). Vakion pakottaminen nolnaan heikensi mallin korjattua selityskerrointa, joka oli 0,799.

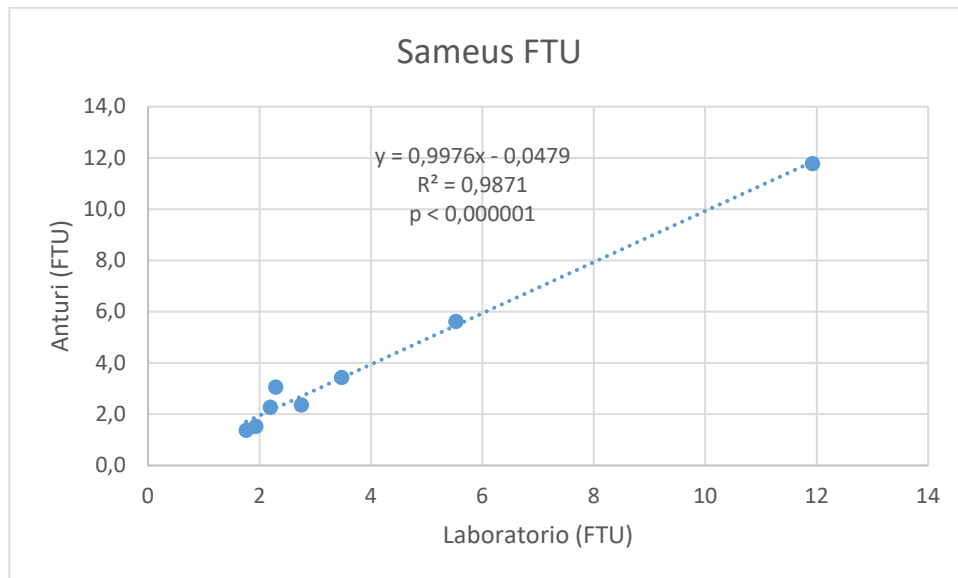
Muun muassa Kuha (2016) on havainnut humuspitoisissa vesistöissä orgaanisen aineen aiheuttavan virheitä jatkuvatoimiseen a-klorofyllin mittaukseen. Sekä Kuhan, että useiden muiden tutkimusten mukaan orgaanisen aineen pitoisuuden (esim.

fDOM) ja/tai humuksen määrää kuvaavan veden väriluvun lisääminen yhtälöön selittäviksi tekijöiksi parantaa kalibroinnin laatua ja vähentää humuksen a-klorofyllimitaukseen aiheuttamaa virhettä. (Mts. 20, 30.) Tässä tutkimuksessa veden värilukua ei määritetty. Liunneen orgaanisen aineen määrää kuvaavan fDOM-arvon lisääminen selittäväksi tekijäksi yhtälöön ei vaikuttanut mallin selityssasteeseen, mutta huononsi mallin p-arvoa sekä lisäsi vakion negatiivisuutta. Tulos vastaa Kringin, Figaryn, Boyerin, Watsonin & Twissin (2014, 1090) saamia tuloksia, joissa myöskään orgaanisen aineksen määrällä ei ollut vaikutusta a-klorofyllin mittaukseen.

Veden lämpötilan lisääminen selittäväksi tekijäksi kalibrointimalliin ei niin ikään vaikuttanut mallin selityssasteeseen, mutta heikensi mallin p-arvoa ja aiheutti vakion huomattavan negatiivisuuden (-28,5). Kun vakio pakotettiin nolaksi, sai lämpötila selittävänä tekijänä negatiivisen kertoimen, minkä vaikutuksesta koko kalibroitu data olisi ollut miinusmerkistä. Sekä lämpötilan että fDOM:n t-testin p-arvot olivat heikot (lämpötila $p = 0,09$; fDOM $p = 0,6$), mikä myös kertoo niiden vaatimattomasta vaikutuksesta a-klorofyllipitoisuuden selittämiseen.

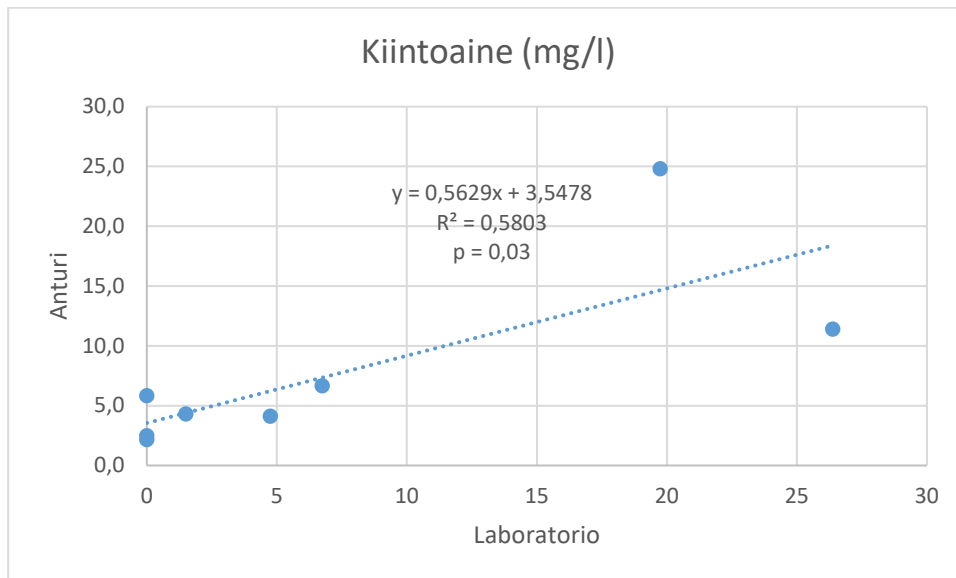
4.1.2 S::can UV-VIS

S::can anturin optisesti mitaamat sameusarvot (FTU) vastasivat erinomaisesti laboratoriossa määritettyjä arvoja ($r^2 = 0,99$, $p < 0,000001$). Anturin mitaamien ja laboratoriossa määritettyjen sameusarvojen validointiyhtälö on esitetty kuviossa 23.

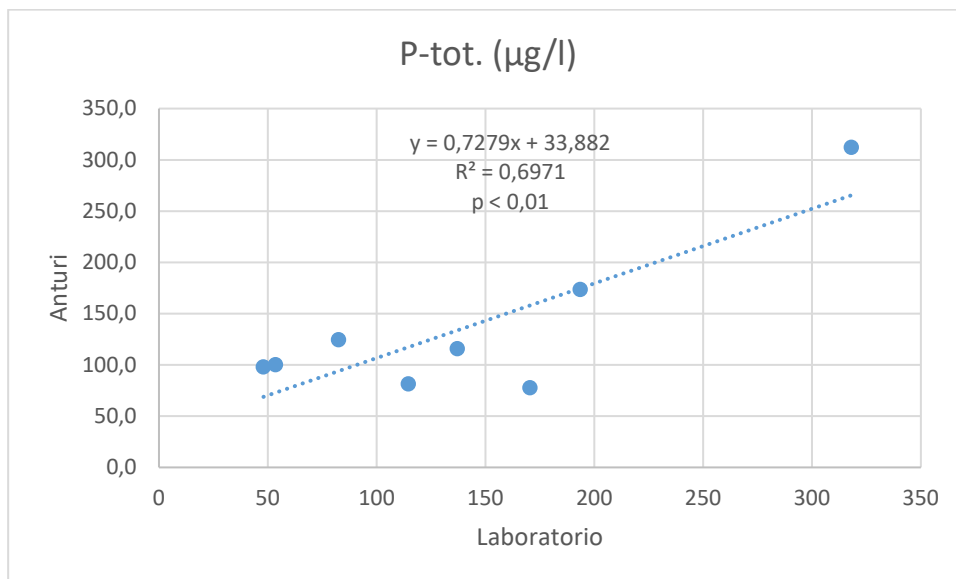


Kuvio 23. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen sameusarvojen vastaavuus

Sameuden ja kiintoainepitoisuuden (mg/l) sekä sameuden ja kokonaisfosforipitoisuuden ($\mu\text{g/l}$) välinen riippuvuus jäi heikohkoksi (sameus/kiintoaine $r^2 = 0,55$, $p = 0,05$ ja sameus/P-tot $r^2 = 0,71$, $p = 0,01$). Vastaavia tuloksia on saatu aiemminkin samantyyppisiltä hiesu- ja moreenimailta (mm. Siimekselä, Ylimartimo, Stenman & Lahtela 2013, 26; Rätty, Järvenranta, Virkajärvi, Saarijärvi & Kröger 2014, 3), joissa karkearakeinen kiintoaine ei kulkeudu veden mukana saviaineksen tapaan ja fosfori on pääosin liukoisessa muodossa. Heikoista selityksistä huolimatta kiintoaine- ja kokonaisfosforipitoisuudet kuitenkin kalibroitiin käyttäen sijaismuuttujana anturin mittaamaa sameusarvoa, sillä tässä tutkimuksessa tarkkoja ravinne- tai kiintoainemääriä tärkeämpää oli selvittää vedenlaatumuuttujien pitoisuuksien vaihtelun vaikutusta leväpitoisuuteen. Sameuden perusteella laskettujen veden kiintoaine- ja kokonaisfosforipitoisuuksien vastaavuus laboratoriossa määritettyihin arvoihin on esitetty kuvioissa 24 ja 25. Selityksistä (kiintoaine $r^2 = 0,58$, P-tot $r^2 = 0,7$) perusteella tuloksia voi pitää suunta-antavina, mutta riittävinä tämän tutkimuksen tarkoituksiin, koska tässä tutkimuksessa ei tutkittu ainemääriä, vaan ravinnepitoisuuksien vaihtelua ja sen vaikutusta levän määrään kosteikolla.



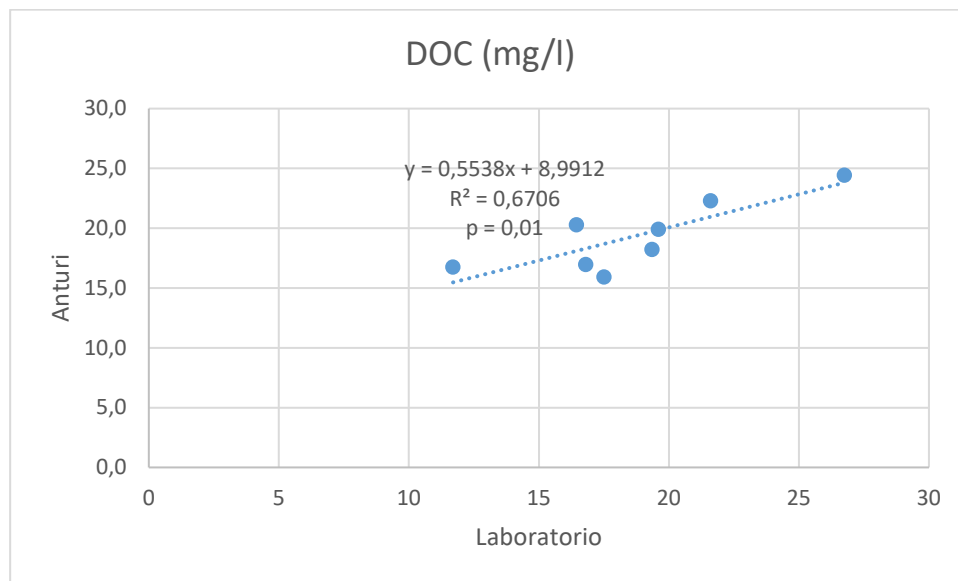
Kuvio 24. Automaattianturin sameusarvojen perusteella laskettujen ja laboratoriossa määritettyjen kiintoainepitoisuuksien vastaavuus



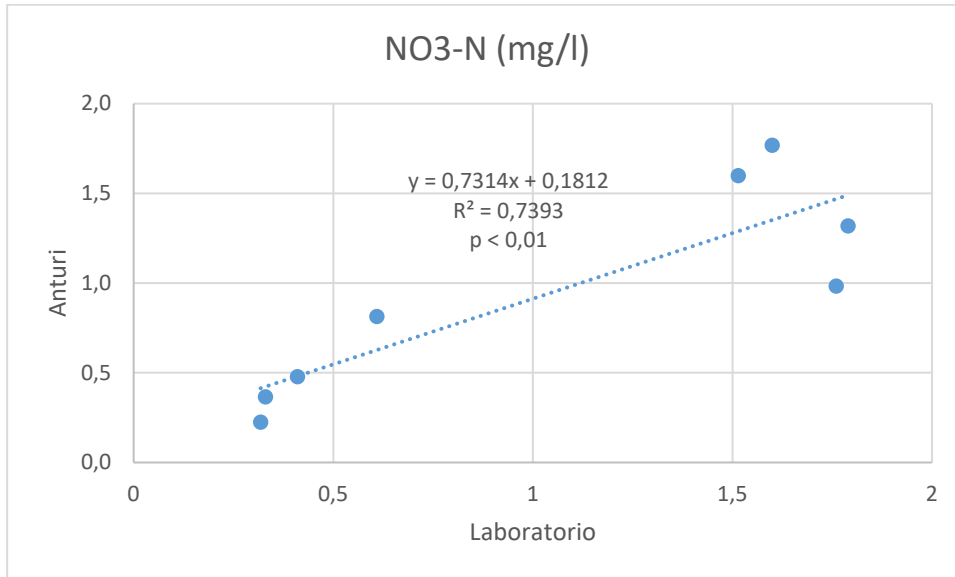
Kuvio 25. Automaattianturin sameusarvojen perusteella laskettujen ja laboratoriossa määritettyjen kokonaisfosforipitoisuuksien (P-tot) vastaavuus

Myös muiden S::can -anturilla mitattujen suureiden vastaavuus laboratoriossa määritettyihin arvoihin jäi tutkimusjaksolla heikoksi. Aiempiin tutkimuksiin verrattuna (mm. Siimekselä ym. 2013, 26) varsinkin liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) automaatti- ja laboratoriotulosten välinen selitysaste jäi epätavallisen heikoksi ($r^2 = 0,67$, $p = 0,01$). Myös nitraattitypen ($\text{NO}_3\text{-N}$) ja kokonaistypen selitysasteet olivat vain 70 %

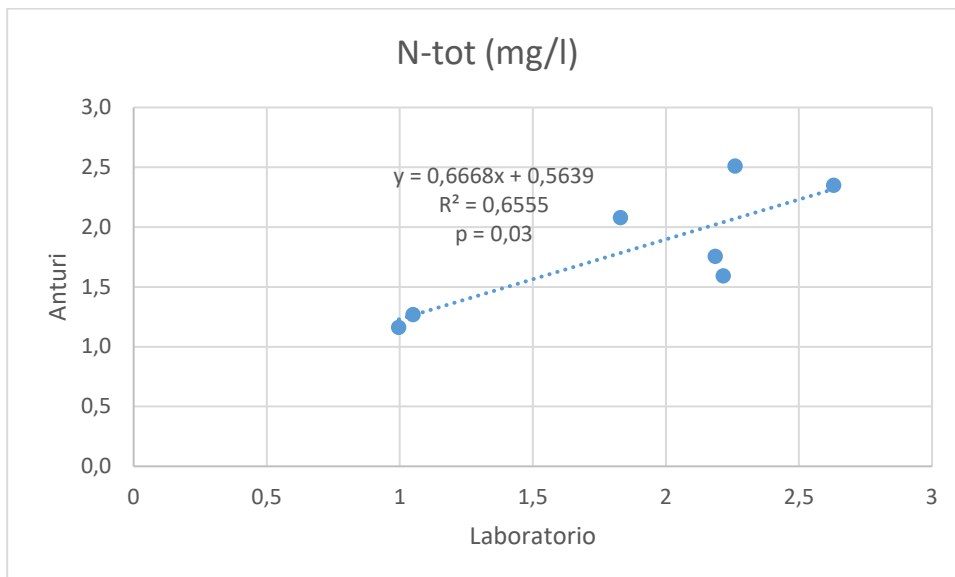
tietämissä (ts. $r^2 \approx 0,7$) eikä niiden välillä ollut riippuvuutta, minkä vuoksi kokonaistyyppipitoisuus kalibroitiin käyttäen selittävänä tekijänä suoraan automaattianturin mittaamaa raakadataa, kun yleisemmin selittävänä tekijänä kokonaistypen kalibrointiyhtälössä käytetään $\text{NO}_3\text{-N}$:n kalibroitua mittausdataa. Liukoisen orgaanisen hiilen sekä nitraatti- ja kokonaistypen automaattianturin mittaamien tulosten vastaavuus laboratoriossa määritettyihin arvoihin on esitetty kuvioissa 26, 27 ja 28.



Kuvio 26. Automaattianturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen liukoisen orgaanisen hiilen arvojen (DOC) vastaavuus



Kuvio 27. Automaattianturin mitaamien ja laboratoriossa määritettyjen nitraattityppiarvojen (NO₃-N) vastaavuus

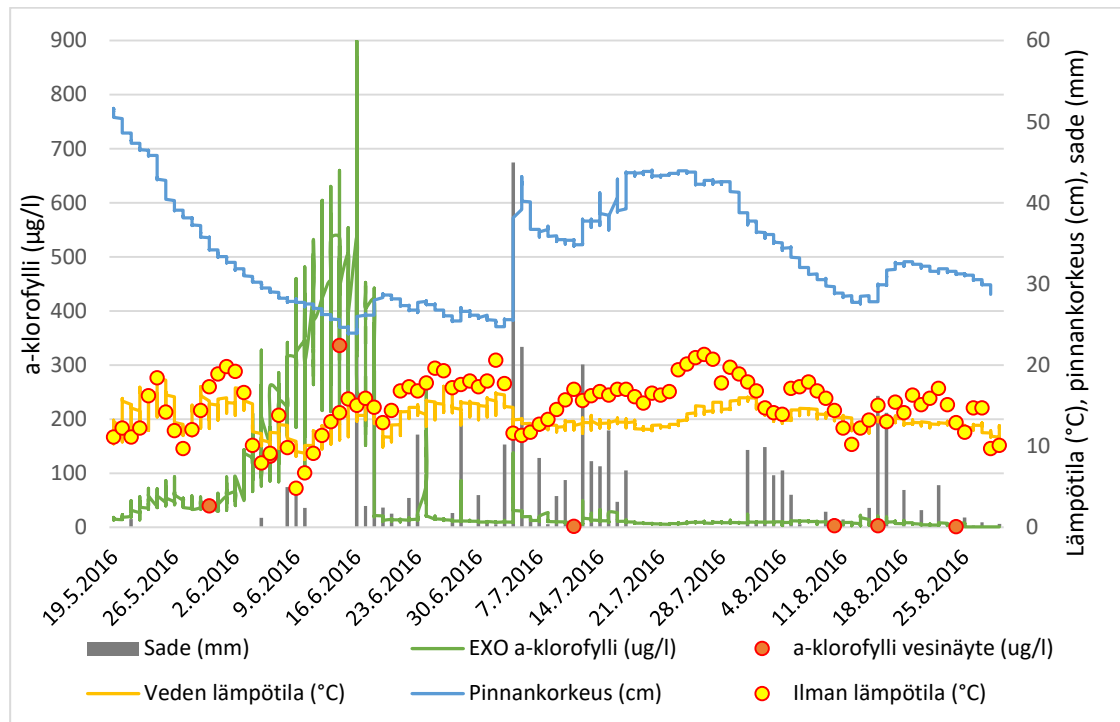


Kuvio 28. Automaattianturin mitaamien ja laboratoriossa määritettyjen kokonaistyyppiarvojen (N-tot) vastaavuus

4.2 Vedenlaatumuuttujien vaihtelu tutkimusjaksolla

Tutkimuskohteen veden a-klorofyllipitoisuus vaihteli suuresti tutkimusjakson aikana vaihteluvälin ollessa $< 1 \mu\text{g/l} - 899 \mu\text{g/l}$, keskipitoisuus tutkimusjaksolla $59 \mu\text{g/l}$. Suurimmat pitoisuudet mitattiin kesäkuun puolen välin molemmin puolin, jolloin a-klorofyllipitoisuudessa havaittiin 13 vuorokautta kestänyt piikki (ks. kuvio 29). Tuolloin myös veden pinnalla oli runsaasti silmin havaittavaa leväkasvustoa. Tämän jälkeen pitoisuus laski nopeasti ja pysytteli kahta pienempää pitoisuuspiikkiä (24.6. ja 4.7.) lukuun ottamatta pääosin alle $20 \mu\text{g/l}$ tutkimusjakson loppuun saakka.

Kaikki a-klorofyllin pitoisuuspiikit esiintyivät, kun ilman keskilämpötila ($^{\circ}\text{C}$) alkoi laskea lämpimämmän jakson jälkeen. Ilman lämpötilan ja a-klorofyllipitoisuuden välillä ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta. Myöskään veden lämpötilan ($^{\circ}\text{C}$), veden pinnankorkeuden (cm) tai vuorokautisen sadesumman (mm) ei havaittu vaikuttavan merkitsevästi a-klorofyllin määrään tutkimuskohteessa. Edellä mainittujen ympäristömuuttujien ja automaattianturin mittaaman veden a-klorofyllipitoisuuden vaihtelu tutkimusjaksolla sekä laboratoriossa määritetyt a-klorofyllipitoisuudet on kuvattu kuviossa 29.



Kuvio 29. Tutkimuskohteen ilman keskilämpötila (°C), veden lämpötila (°C), veden pinnankorkeus (cm), päivittäinen sadesumma (mm) ja automaattianturin mittaama sekä laboratoriossa määritetty a-klorofyllipitoisuus (µg/l) tutkimusjaksolla

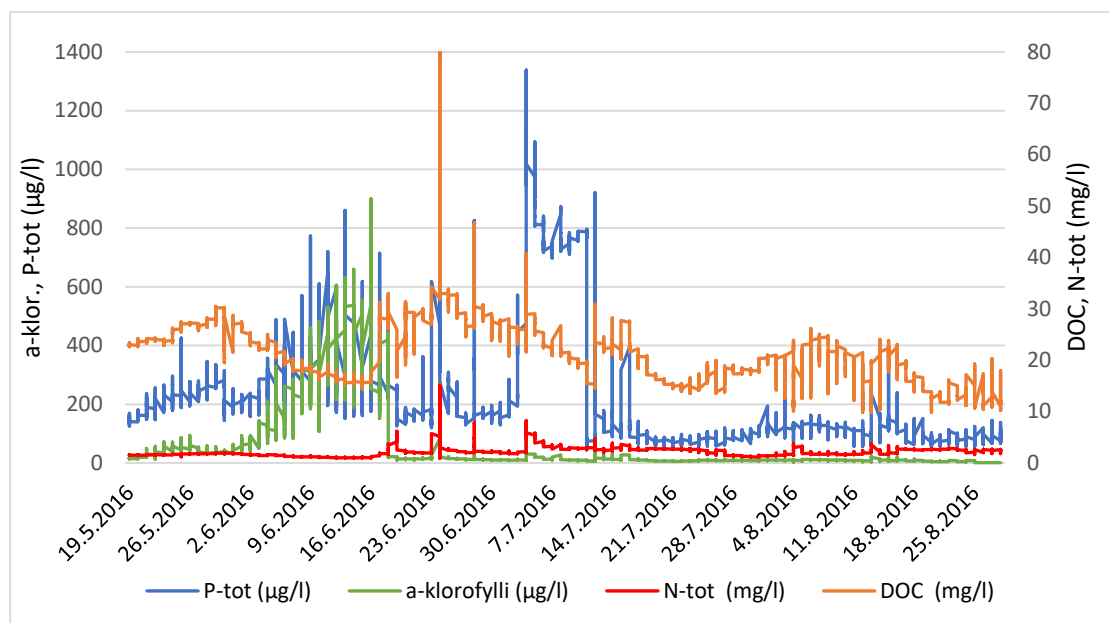
Tutkimuskohteen vesi ei ole suoraan verrattavissa järviveteen, sillä kosteikko, jonka tarkoituksena on puhdistaa valumavedet ennen kuin ne menevät järveen, ottaa vastaan koko yläpuolisen valuma-alueen ravinnekuormituksen ja kosteikon vesimassan ollessa yleensä verrattain pieni on kosteikkovesi järviveteen verrattuna hyvin konzentroitunutta. Järvien vedenlaadulle laaditut kriteerit antavat kuitenkin jonkunlaista vertailupintaa tutkimuskohteen olosuhteille. Tutkimuskohteessa automaattiantureilla mitatut kiintoaine-, DOC- ja ravinnepitoisuudet sekä veden sameus olivat aikaisempien tutkimusten (mm. Siimekselä ym. 2013, 25) mukaisia, maatalousalueen valumavesille tyypillisiä arvoja (taulukko 3). Typpi- ja fosforipitoisuudet ylittivät tyypillään runsasravinteisille järville annetun ekologisen välttävän ja huonon tilan raja-arvot. Runsa-ravinteinen järvi luokitellaan vedenlaadultaan huonoksi, kun sen keskimääräinen kokonaisfosforipitoisuus ylittää 120 µg/l ja kokonaistyyppipitoisuus 1,8 mg/l. Ravinteisuudeltaan karumpiin järvityyppeihin kuuluvilla järvillä rajat ovat pienemmät. (Niinimäki ym. 2014, 64.)

Järvien käyttökelpoisuusluokitus kertoo esimerkiksi, voiko järven vettä käyttää talousvetenä. Käyttökelpoisuuden luokitteluun käytettävät muuttujat poikkeavat em. ekologisen tilan luokitteluun käytettävistä vedenlaatutekijöistä eikä siinä huomioida järven tyyppiä. Tutkimuskohteessa mitatuista suureista a-klorofylli- ja kokonaisfosforipitoisuus sekä sameus kuuluvat viidentoista käyttökelpoisuusluokittelussa käytetyn muuttujan joukkoon ja niiden kaikkien tutkimuskohteessa mitatut keskiarvot ylittivät käyttökelpoisuusluokituksen välttävän ja huonon raja-arvot. (Niinimäki ym. 2014, 58.)

Taulukko 3. Automaattiantureilla mitatut keskiarvot sekä minimi ja maksimiarvot veden sameudelle (FTU), kiintoaine-, N-tot-, NO₃-N- ja DOC-pitoisuudelle (mg/l) sekä P-tot- ja a-klorofyllipitoisuudelle (µg/l) tutkimusjaksolla.

	Sameus	Kiinto- aine	P-tot	N-tot	NO ₃ -N	DOC	a-klorof.
	FTU	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l
keski- pit.	7,7	15,9	221	2,2	1,4	21,2	59
min	< 1	< 1	< 1	1	< 1	10	< 1
max	57	124	1338	15	15	91	899

Tässä tutkimuksessa tutkimusjaksolla mitatut a-klorofyllipitoisuudet olivat huomattavan korkeita verrattuna esimerkiksi Kujan (2016, 16, 23) kuudelta suomalaiselta järveltä tekemiin havaintoihin, joissa a-klorofyllipitoisuus vaihteli välillä 1,4 - 20 µg/l. Kuten edellä todettiin, typpi- ja fosforipitoisuudet olivat tutkimuskohteessa myös huomattavasti korkeampia kuin järvivesissä pääsääntöisesti tavataan. A-klorofyllipitoisuuden ja veden typpi-, fosfori- tai DOC-pitoisuuden välillä ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää yhteyttä. Edellä mainittujen muuttujien vaihtelu tutkimusjaksolla on kuvattu kuviossa 30.



Kuvio 30. Kokonaisfosfori- ja a-klorofyllipitoisuudet ($\mu\text{g/l}$) sekä kokonaistypen ja liukoisena orgaanisen hiilen pitoisuudet (mg/l) tutkimusjaksolla.

Erilaisten vesikasvien (mm. pikkulimaska, vesitähti ja karvalehti, ei määritetty lajilleen) määrä lisääntyi tutkimuskohteessa voimakkaasti tutkimusjaksolla kesäkuun lopulta alkaen. Vesikasvien runsastuminen ja levämäärän väheneminen havaittiin samoihin aikoihin, mutta tilastollisesti merkitsevää yhteyttä näiden tapahtumien välillä ei voitu tutkia, sillä vesikasvien määrää tai tiheyttä ei tässä tutkimuksessa mitattu. Kuitenkin esimerkiksi pikkulimaska (*Lemna minor*) tunnetaan hyvin nopeana lisääntyjänä, joka kaksinkertaistaa biomassansa 36 - 72 tunnissa ja käyttää vedessä olevia ravinteita, varsinkin typpeä, hyvin tehokkaasti. Vapaasti veden pinnalla kelluva pikkulimaska muodostaa nopeasti tiheän kasvuston, joka estää valon pääsyä alempiin vesikerroksiin. (Chhabra, Chaudhary, Sainger & Jaiwal 2011, 129; Yu, Liu, Venkateshan, Yan, Cheng, Sun & Wang 2011, 555.) Tästä syystä sitä käytetäänkin esimerkiksi akvaarioissa ja piha-altaissa estämässä ei-toivotun levän kasvua.

5 Johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli automaattianturien ja laboratoriossa määritettyjen vesinäytteiden tuloksia vertaamalla selvittää, voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua seurata jatkuvatoimisesti. Lisäksi tavoitteena oli edistää leväkasvatusmenetelmän kehittämistä luonnollisten leväkantojen hallittuun kasvattamiseen luonnon olosuhteissa maatalouden vesiensuojelukosteikolla tuottamalla tietoa veden ravinteiden ja lämpötilan vaihtelun sekä sääoloissa tapahtuvien muutosten vaikutuksista levien määrään tutkimuskohteella.

Jatkuvatoimiset *in situ*-mittauslaitteet (EXO2 ja S::can) toimivat teknisesti koko tutkimusjakson ajan moitteettomasti ja niiden mittaamat tulokset vastasivat vesinäytteiden perusteella määritettyjä laboratorioarvoja parhaimmillaan erinomaisesti. S::can-anturin optisesti mittaamista muuttujista sameusarvot (FTU) vastasivat erinomaisesti laboratoriossa määritettyjä arvoja, kun taas kokonais- (N-tot) ja nitraattitypen ($\text{NO}_3\text{-N}$) sekä liukoisen orgaanisen hiilen (DOC) osalta anturin mittaamien ja laboratoriossa määritettyjen pitoisuuksien selitysasteet olivat tyydyttäviä. Saman tyyppisellä valuma-alueella aiemmin tehtyjen tutkimusten (Siimekselä ym. 2013, 26) tuloksiin verrattuna automaatti- ja laboratoriotulosten välinen selitysaste oli epätavallisen heikoksiin DOC:n kuin nitraatti- ja kokonaistypenkin osalta. Tutkimusjakson aikana otettiin mittareiden kalibrointia sekä tulosten tarkastelua varten kahdeksan yksittäistä vesinäytettä, mikä arvioitiin kokemuksen perusteella riittäväksi määräksi S::can-anturin tulosten kalibrointiin. On mahdollista, että runsaampi kalibrointinäytteiden määrä olisi parantanut selitysastetta. Lisäksi myös vesinäytteiden laboratorioarvoissa voi olla virheellisyksiä. Automaatti- ja laboratoriotulokset olivat kuitenkin numeerisesti hyvin lähellä toisiaan kautta linjan.

Veden sameus korreloi kiintoainepitoisuuden kanssa heikosti ja kokonaisfosforipitoisuuden (P-tot) kanssa tyydyttävästi, minkä seurauksena molempien sijaismuuttujan (sameus) avulla kalibroituja muuttujien selitysasteet myös laboratoriossa määritettyihin arvoihinsa jäivät vastaavalle tasolle. Aikaisempien tutkimuskohteen tyyppisillä hiesu- ja moreenimailla tehtyjen tutkimusten (mm. Siimekselä ym. 2013, 26; Rätty ym. 2014, 3) tuloksiin peilaten olisi ollut mahdollista, että sameuden ja kokonaisfosforipi-

toisuuden välille ei olisi löytynyt lainkaan riippuvuutta, jolloin kokonaisfosforin mittaaminen olisi ollut mahdotonta. Tutkimustulokset aiheesta ovat osittain ristiriitaisia, sillä Siimekselä ja muut (2011, 27) ovat havainneet myös erittäin voimakkaan korrelaation sameuden ja kokonaisfosforin sekä sameuden ja kiintoaineen välillä samalla tutkimusalueella, jossa joinakin vuosina korrelaatiota ei ole ollut lainkaan. Sameuden ja kokonaisfosforin välinen riippuvuus on vaihdellut voimakkaasti myös turvevaltaisella valuma-alueella (Siimekselä ym. 2013, 26). Savimailla kokonaisfosforipitoisuuden mittaaminen sameusarvojen avulla ei ole ongelmallista (mm. Valkama, Lahti & Särkelä 2008, 27; Valkama ym. 2007), sillä fosfori on pääosin partikulaarista ja sitoutuneena maahiukkasten savesfraktioihin.

Tässä tutkimuksessa mielenkiinto mittaustekniikan toimivuuden sekä tulosten luotettavuuden osalta kohdistui pääasiassa EXO2-mittaussondin Total Algae-yhdistelmäanturin toimintaan, koska tutkimuksen tavoitteena oli selvittää tutkimuskohteen vedessä olevan levän määrää ja sen vaihtelua tutkimusjakson aikana. Tämän tutkimusten tulosten perusteella EXO2 Total Algae-mittausanturilla voitiin mitata luotettavasti veden leväpitoisuutta tutkimuskohteessa. Automaattianturilla mitatut a-klorofyllipitoisuudet vastasivat laboratoriossa määritettyjä pitoisuuksia erinomaisesti selityksastteen ollessa lähes 100 %. Yksittäisiä vesinäytteitä a-klorofyllin mittaustulosten kalibrointia ja validointia varten otettiin tutkimusjakson aikana seitsemän kappaletta. Näytteiden määrä arvioitiin tutkimuksen luotettavuuden kannalta riittäväksi, sillä näytteitä onnistuttiin saamaan kattavasti koko mittausjakson aikaisen a-klorofyllipitoisuuden vaihteluväliltä. (Ketola ym. 2014, 43.)

A-klorofyllitulosten kalibroinnissa käytettiin selittävinä muuttujina anturin mittaaman a-klorofyllipitoisuuden lisäksi anturin mittaamaa fykosyaniinipitoisuutta. Veden lämpötilan tai liuennutta orgaanista ainesta (humusta) kuvaavan fDOM:n lisääminen yhtälöön ei parantanut kalibroinnin laatua, vaan päinvastoin molemmat huononsivat validointiyhtälön selityksastetta. Vedessä olevien humusaineiden on aiemmissa tutkimuksissa (Kuha 2016, 10–12, 20, 30) havaittu aiheuttavan a-klorofyllin mittaustuloksiin virhettä, jota on pystytty pienentämään sisällyttämällä kalibrointiyhtälöön joko humuksen määrää kuvaava väriluku tai liukoisen orgaanisen aineen määrää kuvaava

arvo. Tässä tutkimuksessa vedessä olevilla humusaineilla ei havaittu olevan vaikutusta a-klorofyllin mittaustuloksiin. Tulos on yhteneväinen Kringin ja muiden (2014, 1090) havaintojen kanssa.

Eri tutkimusten toisistaan poikkeavat tulokset humusaineiden vaikutuksesta a-klorofyllin mittaustuloksiin voivat johtua monista eri syistä. Tässä tutkimuksessa, Kringin ja muiden (2014, 1087) sekä Kuhan (2016, 15) tutkimuksissa on kaikissa käytetty eri laitevalmistajan mittausturua, mikä voi olla yksi selitys toisistaan poikkeaviin tuloksiin. Eri mittausturujen mittausturua ei ole täysin samanlainen (Ketola ym. 2014, 41). Esimerkiksi fluorometrin valon voimakkuus voi olla eri laitteilla erilainen ja riippua sekä laitteen iästä, että valmistajasta, samoin laitteen käyttämä aallonpituus. Myös fluorometrin linssien puhdistusmenetelmä ja -väli vaikuttavat suoraan mittaustulokseen. (Seppälä ym. 2014, 24.) On todennäköistä, että toiset fluorometrit ovat herkempiä vedessä oleville humusaineille, kuin toiset. Myös tutkimuskohde ja sen olosuhteet ovat todennäköisesti laite-erojen lisäksi toinen, mahdollisesti vielä tärkeämpi, selitys erilaisille havainnoille. Kringin ja muiden (2014, 1088–1089) tutkimus tehtiin laboratorio-olosuhteissa, Kuha (2016, 20) tutki kuutta suomalaista järveä luonnonolosuhteissa, ja tämä opinnäytetyötutkimus tehtiin luonnonolosuhteissa maatalouden vesiensuojelukosteikolla, joten tutkimusten tulokset eivät ole suoraan verrattavissa toisiinsa. Lisäksi Kuha (2016, 20) on havainnut, että vedessä olevan orgaanisen aineen merkitys a-klorofyllin mittaustuloksiin vaihtelee järvien välillä. Orgaanisen aineksen häiritsevistä vaikutuksista a-klorofyllimittaukseen on raportoitu useassa tutkimuksessa (Kuhan 2016, 20 mukaan Proctor & Roesler 2010; Goldman, Smith & Richardson 2013; Leppä, Karjalainen & Holopainen 1995). Johtopäätöksenä voidaan esittää, että vedessä olevat humusaineet aiheuttavat virhettä a-klorofyllin mittaustuloksiin useissa tapauksissa ja niiden määrää on tarpeen mitata a-klorofyllimittausten yhteydessä esimerkiksi veden värin tai liukoisen orgaanisen aineen seurannan avulla sekä käyttää kyseisiä arvoja tarvittaessa parantamaan a-klorofyllin mittaustulosten kalibroinnin luotettavuutta.

Tutkimuskohteen veden typpi- ja fosforipitoisuudet vastasivat tutkimusjaksolla aikaisempien tutkimusten (mm. Siimekselä ym. 2013, 25) mukaisia, maatalousalueen valumavesille tyypillisiä arvoja. Tavallisiin järvivesiin verrattuna ravinnepitoisuudet oli-

vat niin ollen huomattavan korkeat. Myös tutkimuskohteen veden a-klorofyllipitoisuus oli keskimäärin huomattavasti suurempi kuin järvivesissä yleensä tavataan esimerkiksi Kuhan (2016,23) tutkimuksen mukaan. Todennäköisesti tutkimuskohteen veden suuri a-klorofyllipitoisuus oli seurausta ravinteiden runsaudesta, sillä kasviplanktonin määrän tiedetään lisääntyvän voimakkaasti esimerkiksi vesistöön tulevan ulkoisen ravinnekuormituksen seurauksena (Niinistö ym. 2014, 29). Tutkimuskohteen veden ravinne- ja a-klorofyllipitoisuuksien välille ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan löydetty tilastollisesti merkitsevää yhteyttä. A-klorofyllipitoisuus vaikutti tutkimusjakson alkupuolella kesäkuun alusta kesäkuun puoleen väliin vaihtelevan veden fosforipitoisuuden vaihtelun mukaan, mutta myöhemmin tutkimusjaksolla ei enää havaittu samaa ilmiötä. Tämä voi selittyä esimerkiksi Aution (2011) kuvaamalla leväbiomassan luonnollisella vuotuisella vaihtelulla, jossa keväällä levämäärä on huipussaan valo- ja lämpötilaolojen ollessa otolliset ja laiduntajien määrän ollessa vielä pieni. Laidunnuspaineen kasvaessa ja ravinteiden vähentyessä kesää kohti levämäärä romahtaa. (Autio 2011.)

Tutkimusjakson edetessä kesäkuun lopulle tutkimuskohteessa havaittiin erilaisten vesikasvien voimakas runsastuminen sekä samanaikaisesti veden a-klorofyllipitoisuuden ts. levämäärän väheneminen. Koska vesikasvien määrää ei tässä tutkimuksessa laskettu tai arvioitu, tilastollista merkitsevyyttä kasvien runsastumisen ja levien katoamisen välille ei voitu löytää. On kuitenkin todennäköistä, että nopeasti kasvava tiheä kasvillisuus edesauttoi levien määrän vähenemistä sekä kilpailemalla samoista ravinteista, että - täyttäessään vedenpinnan täysin - varjostamalla runsaasti valoa kasvuunsa tarvitsevia leviä. Vesikasvillisuuden runsastuminen saattoi olla seurausta BioA-hankkeessa kokeillusta levänkasvatusmenetelmästä, jossa levien kasvatusta varten kasvihuonemuovista rakennettu katos loi ihanteelliset olosuhteet levien lisäksi myös muulle kasvillisuudelle.

Tämän tutkimuksen tavoitteenmukaisina johtopäätöksiä voidaan yhteenvetona esittää, että veden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua voitiin mitata tutkimuskohteena olleella maatalouden vesiensuojelukosteikolla luotettavasti jatkuvatoimisella a-klorofyllin ja fykosyaniinin fluoresenssin mittauslaitteistolla. Lisäksi jatkuvatoimisella mittauksella saatiin levämäärän vaihtelusta tutkimuskohteessa tarkkaa, reaaliaikaista

tietoa, jonka avulla voidaan edistää levänkasvatusmenetelmän kehittämistä luonnollisten leväkantojen hallittuun kasvattamiseen luonnon olosuhteissa. A-klorofyllin fluoresenssin mittaamiseen voivat vaikuttaa lukuisat ympäristötekijät, jotka tulee tiedostaa ja huomioida mittausten aikana sekä mittaustulosten käsittelyssä ja analysoinnissa.

6 Pohdinta

Levät ovat hyvin monimuotoinen ja varsin kiinnostava eliöjoukko. Ne ovat paitsi elintärkeitä hapentuottajia maapallolla ja korvaamaton osa ravintoketjua (100 kysymystä levistä 1999, 16), myös rajattomilta vaikuttavien kaupallisten soveltamis- ja hyödyntämismahdollisuuksien aarreaattia (mm. Verhein 2016, 3; Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 6, 8; Tyystjärvi 2016). Levien avulla voidaan puhdistaa vesiä (Tyystjärvi 2016) ja ne myös pilaavat vesiä haitaten vesistön virkistys- ja talouskäyttöä, edistävät vesistön happikatoa (100 kysymystä levistä 1999, 24, 27) ja voivat aiheuttaa vakavia, jopa kuolemaan johtavia oireita esimerkiksi juomavedessä (Setälä ym. 2011). Levät ovat yksi vesistöjen ekologisen tilan arvioinnin keskeisistä laatutekijöistä ja ne antavat nopean vasteen ympäristömuutoksille (Järvinen 2013). Veden a-klorofyllipitoisuus kuvaa kasviplanktonin biomassaa (mm. Mitikka 2013), joten a-klorofyllipitoisuutta seuraamalla voidaan havaita veden laadussa tapahtuvia muutoksia melko luotettavasti (Järvinen 2013). Jatkuvatoimisella (*in situ*) seurannalla tietoa muutoksista saadaan lähes reaaliaikaisesti ja muutoksiin pystytään reagoimaan nopeammin kuin perinteisellä vesinäytteiden ottoon perustuvalla seurannalla.

Tässä opinnäytetyössä ja siihen liittyneessä tutkimuksessa pääpaino oli nimenomaan levämäärän, ts. a-klorofyllipitoisuuden, jatkuvatoimisessa mittaamisessa fluoresenssin avulla sekä siihen liittyvässä teknologiassa ja haasteissa, joita esimerkiksi erilaiset ympäristötekijät voivat mittaustuloksille aiheuttaa. Luotettavien mittaustulosten saamiseksi sekä niiden analysoinnin ja niistä tehtyjen johtopäätösten tueksi työssä oli kuitenkin tarpeen tutkia paitsi fluoresenssia ilmiönä ja sen mittaamista yleisesti myös

levien ja leväyhteisöjen elintapoja, esiintymistä vesistöissä sekä käyttö- ja hyödyntämismahdollisuuksia. Tässä luvussa tarkastellaan leviä ja niiden määrän mittaamista fluoresenssin avulla ekologisesta, teknologisesta, taloudellisesta ja yhteiskunnallisesta näkökulmasta sekä arvioidaan tutkimuksen luotettavuutta. Lisäksi tuodaan esiin uusia kysymyksiä ja tutkimustarpeita sekä kehittämisideoita, joita tämän tutkimuksen aikana ilmeni.

Ekologinen näkökulma

Levien (ml. syanobakteerit) ekologinen merkitys on laaja, kauaskantoinen ja helppo ymmärtää, sillä levät ja bakteerit muodostavat perustan koko ravintoverkolle, johon myös ihmiskunta kuuluu, ja ovat korvaamaton osa vesiekosysteemiä. Ne myös tuottavat suuren osan maapallolla tarvittavasta ja kulutettavasta hapesta ja sitovat samalla yhteyttäessään hiilidioksidia vaikuttaen näin maapallon ilmastoon. (100 kysymystä levistä 1999, 16.)

Ekologisen kestävyuden ilmaisemiseen on olemassa useita indikaattoreita, joista yleisimmin käytettyjä ovat muun muassa biodiversiteetti, eroosio, energian ja veden käyttö sekä ilmastonmuutos (Joensuu & Reinikainen 2014, 17–20). Biodiversiteetin näkökulmasta levät ovat tärkeä osatekijä, sillä ravintoverkon tuottajina ne muodostavat yhdessä bakteerien kanssa ravintoketjun perustan (100 kysymystä levistä 1999, 16), jota ilman maapallolla ei olisi nykyisen kaltaista elämää. Esimerkiksi koralliriuttojen, merien monimuotoisimpien elinympäristöjen, säilymiselle levät ovat elintärkeitä. Korallit saavat värinsä korallipolyyppien kudoksissa eläviltä symbioottisilta mikroleviltä, jotka yhteyttäessään myös tuottavat ravintoa koralleille. Ilmastonmuutoksen vaikutuksesta merivedet lämpenevät, minkä johdosta symbioottisten levien yhteyttäminen häiriintyy ja niiden kunto heikkenee, jolloin koralli karkottaa levät soluistaan menettäen samalla leviltä saamansa värin ja ravinnontuotannon. Haalistunut koralli on altis sairauksille ja ympäristörasitteille. Koralliriuttojen on havaittu maailmanlaajuisesti menettävän värejään ja haalistuvan 1980-luvulta lähtien ja esimerkiksi vuosina 1997–1998 tuhoja havaittiin 75 %:lla maailman koralliriutoista. (Buddemeier, Lane & Martinich 2011, 376.)

Jatkuvatoimisella fluoresenssimittauksella voidaan saada arvokasta tietoa esimerkiksi levien ekofysiologiasta, tuotantobiologiasta, solumäärästä ja esiintymisestä niin tutkimuksen kuin monitoroinninkin tarpeisiin (Arvola, Huotari & Tulonen 2014, 10). Mitattaessa a-klorofyllin lisäksi myös muiden levien pigmenttien fluoresenssia niille ominaisilla aallonpituuksilla, saadaan tietoa levien diversiteetistä (Seppälä 2014, 12) ja leväyhteisön koostumuksesta (Huotari ym. 2014, 25), joiden muutoksilla taas voi olla laajaa vaikutusta ekosysteemin diversiteettiin.

Erosio on neljästä aiemmin mainitusta ekologisen kestävyuden indikaattorista ehkä vaikeimmin yhdistettävissä leviin ja niiden tutkimiseen. Tässä tapauksessa eroosiolla ei tarkoiteta ekosysteemin toimintaan kuuluvaa luonnollista maanpinnan kulumista ja rapautumista, vaan lähinnä ihmisen toiminnan aiheuttamaa voimakasta maan kulumista, joka pahimmillaan johtaa maan köyhtymiseen ja jopa aavikoitumiseen. Kirjallisuudesta ei löytynyt suoraa yhteyttä eroosion ja levien välille. Välillisesti eroosio kuitenkin ruokkii levien kasvua, sillä eroosion vaikutuksesta maa-ainesta ja sen mukana ravinteita kulkeutuu vesistöihin, joissa levät käyttävät näitä ravinteita kasvuunsa. Rungas ulkoinen ravinnekuormitus voi johtaa levien massaesiintymiin, jotka haittaavat vesistön virkistys- ja hyötykäyttöä (100 kysymystä levistä 1999, 24, 27) ja horjuttavat ravintoketjun tasapainoa (Niinistö ym. 2014, 25-29). Toisaalta eroosio voi myös hävittää leviä ja vähentää niiden diversiteettiä varsinkin rannikoilla, joissa voimakas eroosio on globaalisti varsin suuri ongelma. Eroosion vaikutuksesta rannikkovesiin joutuu suuria määriä maa-ainesta, joka samentaa veden, jolloin levät eivät saa riittävästi yhteyttämiseensä tarvitsemaansa valoa ja osa lajeista tai pahimmassa tapauksessa koko leväyhteisö kuolee.

Levien suhde energian ja veden käyttöön on kaksijakoinen, sillä toisaalta levien avulla voidaan tuottaa uusiutuvaa energiaa - millä on vaikutusta myös ilmastonmuutoksen kannalta - ja puhdistaa vesiä (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 12; Tyystjärvi 2016; Verhein 2016), mutta toisaalta niiden kasvatusta vaatii sekä energian että veden käyttöä. Leväkasvattamoiden sijoittaminen ilmasto-olosuhteiltaan optimaalisille alueille, joissa ilman lämpötila ei laske alle 15 °C:n, esimerkiksi Pohjois-Amerikan Texas ja Kalifornia, EU:n alueen Italia ja Espanja sekä Pohjois-Afrikan Marokko, Tunisia, Algeria ja Egypti, vähentää energiantarvetta, sillä levät saavat tarvitsemansa lämmön ja valon auringosta. Pohjois-Afrikan valtioilla

on myös hyödyntämättömiä aavikkoalueita levänkasvatuksen tarpeisiin. Toisaalta veden, ravinteiden ja hiilidioksidin saanti näillä alueilla voi olla ongelmallista. (Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013, 16.)

Pohjoisissa maissa lämpimiin olosuhteisiin sopivien levälajien hyödyntäminen on ongelmallista (Suhonen 2016), sillä levien tarvitsema lämpö ja valo joudutaan suurelta osin tuottamaan keinotekoisesti, mikä kuluttaa runsaasti energiaa. Esimerkiksi teollisuuslaitosten lauhdevesien lämpöä hyödyntämällä tai käyttämällä hyväksi LED-tekniikan tuomia mahdollisuuksia voidaan energiankulutusta vähentää, mutta ekologisesti kestäväntä olisi kasvattaa leviä alueilla, joissa on luonnostaan kasvatettavalle lajille sopivat olosuhteet. Onkin tärkeää tutkia myös pohjoisia levälajeja, jotka ovat sopeutuneet elämään olosuhteissa, joissa valoa on ylen määrin kesällä, mutta muina vuodenaikoina niin valoa kuin lämpöäkin on niukasti (Suhonen 2016).

Ruoantuotanto, pääasiassa maatalous, aiheuttaa viidenneksen maailman ilmastonmuutosta kiihdyttävistä päästöistä ja sen osuus kaikesta ihmisen kuluttamasta vedestä on 70 %, joka sisältää viljelysten kasteluun käytettävän veden. Valtaosaa maatalousmaasta käytetään lihantuotannon tarpeisiin joko eläinten laitumina tai rehun kasvatukseen ja lihantuotanto onkin maatalouden suurin ilmastopäästöjen aiheuttaja ja vedenkuluttaja. (Ruoantuotannon ja -kulutuksen vaikutukset ympäristöön ja ilmastoon n.d.; Vähemmän lihaa lautaselle 2016.) Laidunnus myös aiheuttaa ja pahentaa eroosiota sille herkkillä alueilla. Runsaasti hyvälaatuista proteiinia sisältävien levien käyttöä valkuaisrehuna esimerkiksi soijan korvaajana on tutkittu muun muassa kanojen, kalojen, broilerin ja nautakarjan ruokinnassa (Tarsia 2016, 12). Myös ihmisravinnossa levillä voitaisiin korvata esimerkiksi osa ihmisten kuluttamasta lihasta ja vihanneksista. Mikrolevien vaatima pinta-ala niiden tuottoon nähden on perinteisiin viljelykasveihin verrattuna huomattavasti pienempi (Tarsia 2016, 7), niiden kasvatuksessa ei tarvita kasvinsuojeluaineita ja levänkasvatuksen vedenkulutus on pieni verrattuna perinteisten viljelykasvien viljelyyn alueilla, joissa viljelyksiä joudutaan keinokastelemaan.

Ilmastonmuutoksen kannalta levillä on merkitystä paitsi jo aiemmin mainittuina uusiutuvan energian ja ekologisesti kestävä proteiinin lähteenä, myös tehokkaina hiilen sitojina. Hiilidioksidi on merkittävin ilmaston lämpenemistä edistävä kasvihuone-

kaasu. Jäämerellä tehdyssä tutkimuksessa on havaittu, että hiilidioksidin lisääntymisen ilmassa kasvattaa kasviplanktonin biomassaa kylmissä olosuhteissa, mutta lämpötilan noustessa ilmiö katoaa. Pohjoisen jäämeren lämpötila kohoaa lähes kolme kertaa nopeammin kuin ilmaston lämpötila. (Stacey 2015.) Edinburghin yliopiston tekemässä tutkimuksessa on kuitenkin saatu viitteitä, että jotkut leväpopulaatiot pystyvät sopeutumaan muuttuviin olosuhteisiin ennakoitua paremmin (Ocean algae will cope well in varying climates, study shows 2015). Valtamerten levämassat ovat valtava luonnon hiilinielu, mutta levien hiilensidontakykyä voidaan hyödyntää myös esimerkiksi voimalaitosten ja teollisuuden savukaasujen puhdistuksessa (Tyystjärvi 2016), mikä vähentää kasvihuonekaasupäästöjä ja näin ollen vaikuttaa ilmastomuutoksen etenemiseen.

Teknologinen näkökulma

Tässä opinnäytetyössä teknologinen näkökulma näyttäytyy vahvasti läpi koko työn, sillä tutkimuksessa testattiin nimenomaan mittaustekniikan toimivuutta käytännön olosuhteissa. Fluoresenssimittauksen tekniikkaa on käytetty a-klorofyllipitoisuuden jatkuvatoimiseen seurantaan jo 1960-luvun alkupuolelta asti ja usealla aallonpituudella toimiva monikanavainen fluorometria on tunnettu jo pitkään tekniikkana, jolla voidaan tutkia eri leväryhmien esiintymistä (Richardson ym. 2010, 2462). Jatkuvatoimisten fluorometrien käyttö leväpitoisuuden arviointiin on kuitenkin kasvattanut suosiotaan vasta viime vuosina (Arvola ym. 2014, 9), mikä on seurausta pitkän harppauksin kehittyneestä teknologiasta. Jatkuvatoimisen veden laatutekijöiden, muun muassa a-klorofyllin, seurannan tekniikka toimii nykyisin luotettavasti lähes kaikissa olosuhteissa, kuluttaa vain vähän (sähkö)energiaa, laitteiden käyttö ja huoltaminen on helppoa ja mittauksilla saadaan yleensä luotettavaa tietoa. Markkinoilla on usean eri valmistajan fluorometrejä, joiden toiminta (esim. käytettävä aallonpituus) ja tarkkuus vaihtelevat, samoin niiden käytöstä saadut kokemukset. Luotettavien tuloksien varmistamiseksi fluorometrin valinnassa onkin tärkeää huomioida niin tutkimuksen tarkoitus, suunnitellun mittauspaikan olosuhteet kuin tutkimuksen toteuttajien kokemus ja asiantuntemuskin. (Tarvainen, Kotilainen & Suomela 2015, 15–17.)

Fluorometria ja spektrometria eroavat toimintaperiaatteiltaan toisistaan, mikä voi vaikeuttaa eri menetelmillä saatujen tulosten vertailua toisiinsa. Tässä tutkimuksessa veden sameuden ja ravinnepitoisuuksien mittaamiseen käytetty UV-VIS-spektrometri mittaa valon absorbanssia, toisin sanoen valon vaimenemista, UV- ja näkyvän valon aallonpituusalueella tietyllä matkalla. Tekniikka perustuu Lambert–Beerin lakiin, jonka mukaan liuenneen aineen konsentraation ja absorbanssin välillä on lineaarinen suhde, kun valon aineessa kulkema matka on vakio (Heiskanen 2016, 12). Fluorometri taas mittaa mitattavan aineen, tässä tutkimuksessa a-klorofyllin ja fykosyanin, absorptioa aallonpituusmaksimia vastaavalla aallonpituudella viritetyn aineen palauttamaa valoenergiaa, eli fluoresenssia (Seppälä ym. 2014, 17, 18).

Tässä tutkimuksessa niin a-klorofyllin mittaukseen käytetty fluorometri kuin sameuden ja ravinteiden mittaamiseen käytetty spektrometrikin toimivat teknisesti hyvin ja luotettavasti koko tutkimusjakson ajan. Tutkimuksen tekninen toteutus on kuvattu tässä työssä luvuissa 3.3. ja 3.4.

Mikrolevän kasvatusta on toistaiseksi suurimmaksi osaksi keskittynyt lämpimän ilmastoin maitiin, joissa levää kasvatetaan pääasiassa maa-alueilla suljetuissa fotobioreaktoreissa tai avoimissa altaissa. Suurimmat haasteet levänkasvatuksessa liittyvät tällä hetkellä lähinnä kasvatusta- ja korjuuteknologiaan, joka ei nykyisellään ole kustannustehokasta. Siirtyminen pilottimittakaavasta kaupallisen mittakaavan levänkasvatukseen on myös usein osoittautunut ennakoitua ongelmallisemmaksi eivätkä pilottimittakaavassa testatut menetelmät ja tekniikat ole toimineet enää laajemmassa mittakaavassa (Lunkka-Hytönen, Lohtander-Buckbee & Ruohonen-Lehto 2016, 42). Varsinkin levän erottaminen (ts. korjuu) vedestä on nykyisin käytössä olevilla menetelmillä kallista ja vaatii usein paljon ihmistyötä, joten nykyisiä tekniikoita olisi parannettava tai kehitettävä kokonaan uusia menetelmiä, jotta uusia yrityksiä levän kasvatukseen ja jatkojalostukseen syntyisi. (Seppälä ym. 2015, 9; European Algae Biomass-conference 2016.)

Talouden näkökulma

Jatkuvatoimiset vesistöjen seurantaan tarkoitetut laitteet ovat kehittyneet huomasti viimeisen kymmenen vuoden aikana ja niiden käyttö on yleistynyt niin vesistötarkkailussa kuin esimerkiksi maa- ja metsätalouden vesiensuojelutoimien vaikuttavuuden tai maankäytön vaikutusten arvioinnissa. Suomea pidetään jatkuvatoimisen vedenlaadun mittauksen edelläkävijänä ja täällä onkin jatkuvatoimisten vedenlaatumittareiden käyttökelpoisuudesta jo melko paljon kokemusta. (Tarvainen ym. 2015, 12.)

Jatkuvatoimisella seurannalla saadaan yksittäisiä vesinäytteitä tarkempaa tietoa esimerkiksi virtaamanvaihtelun aiheuttamista nopeista muutoksista veden laadussa ja pystytään tekemään tarkempia arvioita alueen kuormituksesta. Tästä huolimatta jatkuvatoiminen mittaus ei ole syrjäyttänyt perinteistä vesinäytteenottoon perustuvaa vesistöseurantaa, mikä johtuu suurelta osin kustannustekijöistä. Jatkuvatoimisten mittauslaitteiden hankintahinnat vaihtelevat noin 1 400–75 000 euron välillä (Tarvainen ym. 2015, 17) ja vuokrattuna noin 1 000 eurosta ylöspäin kuukaudessa. Kustannuksia syntyy lisäksi vesinäytteistä, joita tarvitaan usein entistä enemmän tulosten varmistamiseksi, sekä mittauslaitteiden huoltoon ja mittareiden keräämän datan käsittelyyn tarvittavasta työstä. Mittauspaikan perustaminen voi vaatia esimerkiksi kaivuri- tai muuta konetyötä ja erilaisia tarvikkeita, esimerkiksi siltarakenteita. Kustannusten ja suuren työllistävyyden takia jatkuvatoimisia mittauksia ovatkin tehneet pääasiassa valtion organisaatiot, yhdistykset ja säätiöt sekä tutkimus- ja oppilaitokset pääasiassa erilaisten hankerahoitusten tai avustusten turvin.

Leväkasvatus on vielä maailmanlaajuisesti pienen mittakaavan toimintaa. Seppälän ja muiden (2015, 9) mukaan mikroleviä kasvatetaan lähinnä taloudellisesti arvokkaiden yhdisteiden tuottamiseen tuotantomäärien ollessa noin 5000 tn (kuivapaino) vuodessa. Suurimmat tuotantolaitokset ovat hehtaarin kokoluokkaa ja tuotteiden vuotuinen markkina-arvo on noin 1000–2000 M€. (Mts. 9).

Laajin mielenkiinto mikrolevien hyödyntämisessä kohdistuu niiden sisältämään suureen määrään rasvaa – joillakin levälajeilla jopa 70 % painosta –, joka on helposti muunnettavissa dieselpolttoaineeksi (Seppälä ym. 2015, 9). Myös tutkimus on pitkälti keskittynyt nimenomaan levien polttoainekäytön kehittämiseen. Kaupallista läpimurtoa kuitenkin tuskin on odotettavissa leväpolttoaineiden osalta ainakaan seuraavan

kymmenen vuoden sisällä, sillä leväkilon tuotantokustannukset ovat nykyisin vähintään kymmenkertaiset taloudellisesti kannattavaan polttoainetuotantoon nähden (Seppälä ym. 2015, 9). Leväbiomassan keruuseen, vedenpoistoon ja öljyn erotukseen olisi kehitettävä nykyistä edullisempia ja yksinkertaisempia menetelmiä, löydettävä runsaammin öljyä sisältäviä levälajeja ja kehitettävä sivuvirtojen hyödyntämistä, minkä lisäksi tarvitaan vielä poliittisia tukitoimia, muun muassa verohelpotuksia, teknologian merkittävää kehitystä sekä fossiilisten polttoaineiden hinnannousua, jotta levien polttoainekäyttöä voisi pitää kannattavana (Lunkka-Hytönen ym. 2016, 42).

Pohjoisissa olosuhteissa, missä valoa ja lämpöä ei ole ympäri vuoden luonnostaan saatavilla ja tuotantokustannukset ovat sen vuoksi väistämättä korkeammat kuin ilmasto-oloiltaan levänkasvatuksen kannalta suotuisemmilla alueilla, taloudellisesti kannattava levänkasvatus vaatii keskittymistä kalliiden arvoaineiden ja korkean jalostusasteen tuotteiden tuotantoon. Edessä on kuitenkin pitkä tie, sillä mikroleväkemikaalien tuntemus on vasta alkutekijöissään ja ennen kaupallisia sovelluksia tarvitaan paljon perus- ja soveltavaa tutkimusta (Tyystjärvi 2016).

Yhteiskunnallinen (human factor) näkökulma

Yhteiskunnallinen näkökulma läpi leikkaa kaikkia kolmea edellä esitettyä näkökulmaa. Poliittinen ja taloudellinen ohjaus, EU:n ja valtiolliset linjaukset esimerkiksi eri ohjelma- ja hallituskausilla, megatrendit ja yleinen ilmapiiri muun muassa ekologisten tai taloudellisten arvojen suhteen, alueelliset kehittämistavoitteet ja niin edelleen vaikuttavat tutkimus- ja kehittämistyön rahoitukseen sekä yritysten investointihalukkuuteen ja -mahdollisuuksiin ja sitä kautta leväalan teknologiseen ja kaupalliseen kehitykseen.

Ekosysteemipalvelut ovat luonnon ekosysteemien tuottamia aineellisia ja aineettomia tuotteita ja palveluja sekä prosesseja, joista muodostuu inhimillistä hyvinvointia edistäviä hyödykkeitä, hyötyjä ja arvoja vuorovaikutuksessa ihmisen kanssa. Ekosysteemipalveluja voidaan tarkastella myös tutkimusotteena, jonka avulla pyritään tunnistamaan ja luokittelemaan ekosysteemipalvelut sekä ymmärtämään niiden vuorovaikutus, tai politiikkakehikkona, joka tuo yhteistä kieltä ja ajattelua eri sektoreille. Käytännön lähestymistavan näkökulmasta ekosysteemipalveluiden avulla voidaan

kasvattaa maa- ja vesialueista saatavaa kokonaishyvää edistämällä niiden hoitoa, käyttöä ja suojelua. (Saastamoinen, Kniivilä, Alahuhta, Arovuori, Kosenius, Horne, Otsamo & Vaara 2014, 3.)

Vesistöt tuottavat monia tärkeitä ekosysteemipalveluita, kuten puhdasta vettä juotavaksi sekä kotitalouksien, maatalouden ja teollisuuden käyttöön, kalaa ravinnoksi sekä monenlaisia mahdollisuuksia virkistykselle ja matkailulle (Aylward ym. 2005, 216). Vesiekosysteemipalveluilla on niin taloudellista, kulttuurista kuin sosiaalistakin merkitystä sekä paikallisesti että globaalisti. Puhdas vesi on vesiekosysteemipalveluista tärkein, vaikka se onkin ehkä enemmän valuma-alueen kuin vesistön itsensä tuottama palvelu (Saastamoinen ym. 2014, 69), sillä valuma-alueella tapahtuva toiminta, esimerkiksi maankäytön muutokset, peltojen lannoitus tai metsien raivaus ja ojitus, vaikuttaa vesiekosysteemin toimintaan.

Suomen sisävesien fysikaalisista ja kemiallisista muuttujista ja kuormitustekijöistä on runsaasti seurantatietoa, mutta biologista aineistoa on huomattavasti vähemmän (Saastamoinen ym. 2014, 69, 70). Kuitenkin sekä vesistöjen ekologisen tilan arvioinnissa, että käyttökelpoisuusluokittelussa kasviplankton on yksi keskeisistä laatutekijöistä (Järvinen 2013; Niinimäki ym. 2014, 58, 60). Jatkuvatöimisellä levämäärän mitauksella ja leväyhteisön seurannalla voidaan saada lähes reaaliaikaista tietoa kasviplanktonin määrän ja lajien vaihtelusta sekä ympäristötekijöiden vaikutuksesta tähän vaihteluun. Näin saadaan vesistöjen tilaan vaikuttavista muuttujista uutta, tärkeää tietoa esimerkiksi vesistökuormituksen hallinnan tueksi. Reaaliaikaisella leväyhteisön seurannalla voidaan havaita ja joskus myös ennakoida esimerkiksi vesistön virkistys- ja hyötykäyttöä haittaavien leväkukintojen esiintyminen. (Richardson ym. 2010, 2471; Järvinen 2013.) Vesistöjen tilalla on suuri merkitys sekä ihmisten fyysiseen, että henkiseen hyvinvointiin. Puhdas luonto on kansallinen taloudellinen ja henkinen voimavara (Saastamoinen ym. 2014, 11).

Luotettavuuden tarkastelu

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua seurata jatkuvatoimisesti, sekä tuottaa tietoa veden ravinteiden ja läm-

pötilan vaihtelun sekä sääoloissa tapahtuvien muutosten vaikutuksista levien määrään tutkimuskohteella. Tutkimuksen tavoitteet voi esittää myös tutkimuskysymyksenä: Voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua mitata jatkuvatoimisesti? Vaikuttavatko veden ravinnepitoisuuden, lämpötilan tai sääolojen vaihtelut levän määrään tutkimuskohteessa?

Tutkimuksen reliabiliteetin, eli stabiliteetin ja konsistenssin kannalta olennaista tässä tutkimuksessa olivat tutkimusjakson pituus (103 vrk) ja ajoittuminen sekä tutkimusjakson aikana otettujen vertailuvesinäytteiden lukumäärä ja niiden vertaaminen automaattimittauksilla saatuihin tuloksiin. Tutkimuksen luotettavuus pyrittiin varmistamaan jo tutkimusta suunniteltaessa sekä koko ajan tutkimuksen aikana tutkimusainestoa kerättyä. Virheellisten automaattimittaus tulosten välttämiseksi mittausanturit puhdistettiin säännöllisesti kerran viikossa, sillä antureiden likaisuus aiheuttaa mittausdataan vaikeasti havaittavaa systemaattista virhettä. Vertailuvesinäytteet otettiin aina mahdollisimman läheltä mittausanturia samalta syvyydeltä heti automaattianturin mittauksen jälkeen, sillä mittaushetkellä tapahtuvan vesinäytteenoton on havaittu aiheuttavan häiriötä mittausdataan. Vesinäytteet analysoitiin a-klorofyllin ja kiintoaineen osalta käytössä olevia standardeja noudattaen, ja ravinteiden sekä liukoisen orgaanisen hiilen osalta kyvettitestien valmistajan ohjeita noudattaen suositusten mukaisesti huolletuilla laboratoriolaitteilla. A-klorofyllinäytteistä analysoitiin kolme ja kyvettitesteillä analysoiduista muuttujista kaksi rinnakkaista näytettä, millä pyrittiin välttämään satunnaisvirheen mahdollisuus.

Laboratorio- ja automaattianturitulosten vastaavuus toisiinsa kuvaa tämän tutkimuksen konsistenssia. Tutkimusjakson aikana otettiin S::can-mittareiden kalibrointia ja validointia varten kahdeksan ja EXO2-anturin a-klorofyllin mittaustulosten kalibrointia ja validointia varten seitsemän kappaletta vesinäytteitä. A-klorofyllipitoisuudet vastasivat laboratoriossa määritettyjä pitoisuuksia erinomaisesti lähes 100 %:n selitysteella, kun taas DOC- ja ravinnepitoisuuksien selitysteet laboratoriotuloksiin olivat 70 prosentin luokkaa. Runsaampi vertailuvesinäytteiden määrä olisi mahdollisesti vaikuttanut selitysteisiin ja parantanut tutkimuksen konsistenssia, mutta tutkimusjakson ajoittuessa loma-aikaan ei useampien näytteiden analysointi käytän-

nössä onnistunut. Näytteiden määrää voi kuitenkin pitää tutkimuksen luotettavuuden kannalta riittävänä, sillä näytteiden pitoisuudet kattoivat melko hyvin mittausjakson aikaiset pitoisuuksien vaihteluvälit.

Tämän tutkimuksen stabiiliutta mittaava tutkimusjakson pituus optimoitiin kustannussyistä vain ajalle, jolloin tutkimuskohteessa tiedettiin aiempina vuosina olleen levää, mutta kuitenkin riittävän pitkäksi, jotta olosuhteiden ja muiden satunnaismuuttujien mittaustuloksiin mahdollisesti aiheuttamat virheet olisivat tulleet ilmi. Tutkimusjakson alussa ja lopussa veden leväpitoisuus tutkimuskohteella oli hyvin pieni, mutta tutkimusjakson aikana havaittiin myös hyvin korkeita leväpitoisuuksia, joten tutkimusjakson ajoitus onnistui hyvin. Mittausdatassa ei havaittu tutkimusjaksolla erityisiä poikkeamia tai häiriöitä. On huomattava, että luonnossa ja luonnon ilmiöissä on aina satunnaista vaihtelua ulkoisten olosuhteiden, luonnon prosessien ja satunnaisten tapahtumien vuoksi, eikä luonnon olosuhteissa toteutettu tutkimus voi olla koskaan täysin stabiili. Tutkimusjakson pituutta voidaan pitää riittävänä tutkimuksen luotettavuuden kannalta, mutta tämän tutkimuksen tuloksia ei voida yleistää koskemaan muita tutkimuspaikkoja tai -ajanjaksoja.

Validiteetilla eli pätevyydellä tarkoitetaan perinteisesti valitun tutkimusmenetelmän kykyä selvittää sitä, mitä sillä on tarkoitus selvittää. Tässä tutkimuksessa selvitettiin, voiko kosteikkoveden leväpitoisuutta ja sen vaihtelua mitata jatkuvatoimisesti. Tutkimus toteutettiin luonnon olosuhteissa kosteikolla mittaamalla veden a-klorofyllin ja fykosyaniinin, eli levien yhteyttämisspigmenttien, fluoresenssia kaksikanavaisella, jatkuvatoimisella fluorometrillä. A-klorofyllin mittaaminen on yleisesti käytetyin menetelmä vedessä olevien levien määrän arviointiin, koska sitä esiintyy runsaana kaikissa leväryhmissä. Tutkimuskohteen leväyhteisössä tiedettiin aiempien tutkimusten perusteella olevan myös syanobakteereja, joiden runsas esiintyminen voi johtaa levämäärän aliarvioimiseen mitattaessa ainoastaan a-klorofylliä, minkä vuoksi tutkimuksessa mitattiin myös syanobakteerien yhteyttämisspigmenttiä, fykosyaniinia. Fluoresenssiin perustuvassa mittauksessa tuloksena saatu fluoresenssin määrä ei vastaa suoraan vedessä olevaa leväpitoisuutta, vaan tähän tarvitaan mittaustulosten paikalliskalibrointi, joka tehdään jälkikäteen varsinaiselta mittauspaikalta otettujen, laboratoriossa analysoitujen vertailuvesinäytteiden perusteella yhden tai useamman selittävän muuttujan regressioanalyysillä. Tässä tutkimuksessa paikalliskalibrointi tehtiin

seitsemän laboratoriossa analysoidun vesinäytteen avulla käyttäen selittävinä muuttujina jatkuvatoimisen anturin mittaamaa a-klorofylli- ja fykosyaniinipitoisuutta, joiden havaittiin antavan kalibrointiyhtälölle parhaan selitysasteen.

Tässä tutkimuksessa oli lisäksi tarkoitus selvittää, vaikuttavatko veden ravinnepitoisuuden, lämpötilan tai sääolojen vaihtelut levän määrään tutkimuskohteessa. Veden ravinnepitoisuuksia ja lämpötilaa mitattiin jatkuvatoimisesti tutkimuskohteessa ja sääoloja tutkittiin sekä oman sääaseman että Ilmatieteen laitoksen keräämien tietojen perusteella. Jatkuvatoiminen ravinnemittaus toteutettiin UV-VIS-spektrometrillä, jonka käytöstä on runsaasti kokemusta saman tyyppisissä olosuhteissa ja joka on todettu aiemmissa tutkimuksissa toiminnaltaan luotettavaksi. UV-VIS-spektrometrillä mitatut tulokset paikalliskalibroitiin laboratoriossa analysoitujen vesinäytteiden perusteella käyttäen yhden selittävän muuttujan regressioanalyysia, joka on tavallisimmin käytetty menetelmä ravinnemittausaineistojen kalibroinnissa.

Tämän tutkimuksen tulokset vastasivat hyvin tutkimuskohdetta ja tutkimukselle asetettuja tavoitteita. Tutkimusprosessi kuvattiin tässä työssä tarkasti, tehdyt valinnat perusteltiin ja tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia verrattiin ja tulkittiin suhteessa teoreettiseen viitekehykseen sekä muihin tutkimuksiin, joten tätä tutkimusta voidaan pitää validina.

Ehdotuksia jatkotutkimuksia varten

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että kosteikkoveden a-klorofyllipitoisuus vaikutti tutkimusjakson alkupuolella kesäkuun alusta kesäkuun puoleen väliin vaihtelevan veden fosforipitoisuuden vaihtelun mukaan, mutta myöhemmin tutkimusjaksolla ei enää havaittu samaa ilmiötä. Tämä voi selittyä leväbiomassan luonnollisella vuotuisella vaihtelulla, mutta on myös mahdollista, että tutkimuskohteessa havaittu erilaisten vesikasvien voimakas runsastuminen, joka havaittiin samanaikaisesti veden a-klorofyllipitoisuuden vähenemisen kanssa, edesauttoi levien määrän vähenemistä kilpailamalla samoista ravinteista ja varjostamalla runsaasti valoa kasvuunsa tarvitsevia leviä. Olisi tärkeää saada pidempiaikaista seurantatietoa veden fosfori- ja leväpitoisuuden vaihtelun välisestä yhteydestä, sillä mikäli yhteys löytyisi, se voisi olla yksi ratkai-

sumahdollisuus fosforin jatkuvatoimiseen mittaamiseen liittyvään ongelmaan. Fosforia ei tällä hetkellä pystytä mittaamaan jatkuvatoimisesti, mikäli sen ja veden sameuden välillä ei ole korrelaatiota, mikä on yleistä savea karkeammilla maalajeilla. Mikäli a-klorofyllipitoisuudesta pystyttäisiin johtamaan veden fosforipitoisuus, mahdollistuisi jatkuvatoiminen fosforipitoisuuden mittaaminen monissa tapauksissa.

Vesikasvillisuuden runsastuminen saattoi olla seurausta BioA-hankkeessa kokeillusta levänkasvatusmenetelmästä, jossa levien kasvatusta varten kasvihuonemuovista rakennettu katos loi ihanteelliset olosuhteet levien lisäksi myös muulle kasvillisuudelle. Vesikasvien runsastumisen ja leväpitoisuuden romahduksen välistä yhteyttä ei tässä tutkimuksessa selvitetty, mutta kosteikolla olevalla kasvillisuudella ja kasvilajistolla on nykytiedon mukaan suuri merkitys kosteikon ravinteiden pidätyskykyyn. Esimerkiksi pikkulimaska tunnetaan tehokkaana ravinteidenkäyttäjänä ja sille tunnetaan myös useita käyttötarkoituksia, esimerkiksi eläinten rehuna. Kasvillisuus on levään verrattuna helpommin kerättävissä, joten olisi aiheellista tutkia, kuinka paljon esimerkiksi tutkimuskohteena olleelle kosteikolle tyypilliset lajit ottavat ravinteita ja voisiko niitä hyödyntää toisaalta tehostamaan kosteikon toimintaa maatalouden valumavesien puhdistuksessa ja toisaalta ravinnekierrossa palauttamalla kasvien keräämät ravinteet esimerkiksi kompostoinnin jälkeen peltoon. Lisäksi BioA-hankkeen levänkasvatusmenetelmän vaikutusta vesikasvillisuuden määrään ja sitä kautta kosteikon ravinteidenpidätyskykyyn olisi syytä tutkia tarkemmin.

Tutkimuskohteena olleen kosteikon toimintaa ja sen kykyä pidättää valuma-alueelta tulevaa ravinne- ja kiintoainekuormaa ei varsinaisesti tutkittu BioA-hankkeessa. Kosteikoita on perustettu viimeisen noin kymmenen vuoden aikana innokkaasti ma- ja metsätalouden kuormituksen hallintaan, mutta niiden tutkimus on vielä melko vähäistä eikä täyttä varmuutta kosteikkojen toimivuudesta ole. Pitkäaikaiset kosteikkojen jatkuvatoimiset seurannat olisivat ehdottoman tärkeitä, jotta saataisiin tietoa kosteikkojen tehokkuudesta, niillä tapahtuvista biologisista prosesseista sekä ulkoisten olosuhteiden vaikutuksesta kosteikkojen toimintaan. Tiedon avulla kosteikkojen toimintaa olisi kenties mahdollista tehostaa ja käyttää uutta tietoa hyväksi jo perustettavien kosteikkojen suunnitteluvaiheessa.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että luonnon leväkantojen kasvattaminen luonnon olosuhteissa on vaativaa ja epävarmaa, sillä olosuhteita ei pystytä hallitsemaan juuri

lainkaan. Myös levän kerääminen ja erottaminen vedestä on vaikeaa ja kallista, eikä esimerkiksi tutkimuskohteen kaltaisella kosteikolla ole riittävää levämassaa kustannustehokkaaseen levänkorjuuseen. Lisäksi luonnon leväkannat voivat aina sisältää myös myrkyllisiä levälajeja, mikä rajoittaa niiden käyttöä esimerkiksi kasteluveden mukana ravinteena pelloilla. Edellä mainituista ongelmista ja haasteista huolimatta levät kuitenkin tarjoavat mahdollisuuksia puhdistaa esimerkiksi maatalouden valumavesiä luonnonmukaisesti ilman kemikaaleja siten, että ravinteet voidaan palauttaa takaisin peltoon kasvien käytettäväksi. Kasvatusmenetelmiä olisi edelleen kehitettävä niin, että olosuhteiden säätelyminen ainakin jossain määrin mahdollistuisi. Esimerkiksi yksinkertainen bioreaktori, jossa valumavesi ohjattaisiin kulkemaan altaaseen tai putkeen suljetun leväkasvuston läpi, voisi olla yksi vaihtoehto. Tämä myös helpottaisi levän korjuuta. Toimivien ja kustannustehokkaiden menetelmien kehittäminen vaatii vielä paljon soveltavaa tutkimusta käytännön olosuhteissa, mutta on varsin varteenotettava vaihtoehto muun muassa maatalouden ravinnekuormituksen hallinnan tueksi.

Leviä pidetään lupaavina tulevaisuuden energian-, polttoaineen-, ravinnon- ja arvoainentuottajina, joten on ehdottoman tärkeää pysyä mukana leväalan kehityksessä, joka tutkimusten valossa näyttää kallistuvan vahvasti suljetuissa järjestelmissä tapahtuvaan, valittujen levä- ja syanobakteerilajien kasvatukseen ja hyödyntämiseen. Tutkimusta tarvitaan niin Suomen olosuhteissa menestyvistä levälajeista ja niiden hyödyntämismahdollisuuksista kuin oloihimme parhaiten sopivista kasvatusteknologioistakin.

Lähteet

- Arvola, L., Huotari, J. & Tulonen, T. 2014. Tausta ja tavoitteet levämäärien jatkuvatoimiseksi mittaukselle. Julkaisussa *Jatkuvatoiminen levämäärien mittaaminen*. Hyvät mittauskäytännöt ja aineiston käsittely. Ympäristöhallinnon ohjeita 5/2014. Toim. J. Huotari & M. Ketola. Helsinki: Suomen ympäristökeskus, 9–10. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/45421/OH_5_2014.pdf?sequence=1.
- Autio, S. 2011. Kasviplanktonlajiston tunnistus. Esitys Pyhäjärvi-instituutti 24.8.2011. Viitattu 3.3.2017. http://www.pyhajarvi-instituutti.fi/image/pdf-tiedostot/kasviplankton_24_8_11.pdf.
- Aylward B., Bandyopadhyay J. & Belausteguigotia J.-C. 2005. Freshwater ecosystem services. Julkaisussa *Ecosystems and Human Well-Being: Policy Responses*. Millennium Ecosystem Assessment vol 3. Toim. K. Chopra, R. Leemans, P. Kumar & H. Simons. Washington: Island Press, 213–255.
- Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä 2013. BTNK:n julkaisu 5/2013. Helsinki: Biotekniikan neuvottelukunta. http://www.btnk.fi/files/pdf/Julkaisu/BTNK_levaselvitys.pdf.
- Buddemeier, R. W., Lane, D. R. & Martinich, J. A. 2011. Modeling regional coral reef responses to global warming and changes in ocean chemistry: Caribbean case study. *Climatic Change* 109, 3, 375–397. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10584-011-0022-z>.
- Chhabra, G., Chaudhary, D., Sainger, M., & Jaiwal, P. K. 2011. Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17, 2, 129–136.
- Elokuun 2016 sää ja tilastot n.d. Ilmatieteen laitoksen verkkosivut. Viitattu 31.1.2017. <http://ilmatieteenlaitos.fi/elokuu>.
- European Algae Biomass-konferenssi 2016. Omat muistiinpanot konferenssista 20.–21.4.2016.
- EXO User Manual n.d. Advanced water quality monitoring platform. Viitattu 26.2.2017. http://biogeodb.stri.si.edu/physical_monitoring/downloads/YSI%20Exo%20%20Sonde.pdf.
- Heinäkuun 2016 sää ja tilastot n.d. Ilmatieteen laitoksen verkkosivut. Viitattu 31.1.2017. <http://ilmatieteenlaitos.fi/heinakuu>.
- Heiskanen, N. 2016. Spektrofotometrin historiaa, toiminta ja sovelluksia – esimerkkinä klorofyllin määrittäminen. Kandidaatin tutkielma. Kemian opettajankoulutusyksikkö. Kemian laitos. Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta. Helsingin yliopisto. http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/ont/Heiskanen_N_2016_kandidaatin-tutkielma.pdf.
- Huotari, J., Kuha, J. & Seppälä, J. 2014. Mittauslaitteet ja tiedonsiirto. Julkaisussa *Jatkuvatoiminen levämäärien mittaaminen*. Hyvät mittauskäytännöt ja aineiston käsittely. Ympäristöhallinnon ohjeita 5/2014. Toim. J. Huotari & M. Ketola. Helsinki: Suomen

ympäristökeskus, 25–29. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/45421/OH_5_2014.pdf?sequence=1.

Hypoteesien testaus 2003. KvantiMOTV. Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto. Menetelmäopetuksen tietovaranto. Päivitetty 9.2.2003. Viitattu 20.12.2016. <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hypoteesi/testaus.html>.

Itämeressä luultua enemmän myrkyllisiä leviä 2007. Yle Uutisten verkkosivusto. Julkaistu 21.9.2007. Päivitetty 31.10.2008. Viitattu 6.3.2017. <http://yle.fi/uutiset/3-5802729>.

Joensuu, K. & Reinikainen, A. 2014. Ekologinen kestävyys. Julkaisussa Biotalousketjujen ekologinen, sosiaalinen ja taloudellinen kestävyys. MTT raportti 184. Jokioinen: MTT, 17-20. Viitattu 15.3.2017. <http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti184.pdf>.

Järvinen, M. 2013. Kasviplankton sisävesien ekologisen tilan arvioinnissa ja seurannassa. Luento KasPer-koulutuksessa 15.5.2013. Viitattu 6.3.2017. http://www.kasviplanktonseura.fi/material/Kasper_kasvipl_luento1_MarkoJarvinen.pdf.

Kasviplanktonopas n.d. Päivitetty 8.5.2014. Viitattu 1.3.2017. <http://www.kasviplanktonopas.net/uusin/index.php>.

Kesäkuun 2016 sää ja tilastot n.d. Ilmatieteen laitoksen verkkosivut. Viitattu 31.1.2017. <http://ilmatieteenlaitos.fi/kesakuu>.

Ketola, M., Kuoppamäki, K., Huotari, J., Seppälä, J., Kotamäki, N. & Kallio, K. 2014. Aineiston kalibrointi ja laadunvarmistus. Julkaisussa Jatkovatoiminen levämäärien mittaustaus. Hyvät mittauskäytännöt ja aineiston käsittely. Ympäristöhallinnon ohjeita 5/2014. Toim. J. Huotari & M. Ketola. Helsinki: Suomen ympäristökeskus, 41–49. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/45421/OH_5_2014.pdf?sequence=1.

Kring, S., Figary, S., Boyer, G., Watson, S. & Twiss, M. 2014. Rapid *in situ* measures of phytoplankton communities using the bbe FluoroProbe: evaluation of spectral calibration, instrument intercompatibility, and performance range. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 71, 7, 1087–1095. https://www.researchgate.net/publication/264118318_Rapid_in_situ_measures_of_phytoplankton_communities_using_the_bbe_FluoroProbe_Evaluation_of_spectral_calibration_instrument_intercompatibility_and_performance_range.

Kuha, J. 2016. Automated Water Quality Monitoring of Humic Lakes by Using the Optical Properties of Water. Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Science 319. Väitöskirja. Jyväskylän yliopisto. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/50909/978-951-39-6713-0_vaitos12082016.pdf?sequence=1.

Lunkka-Hytönen, M., Lohtander-Buckbee, K. & Ruohonen-Lehto, M. 2016. Levät ja biotalous biotekniikan näkökulmasta. Suomen ympäristökeskuksen raportteja 4/2016. Helsinki: Suomen ympäristökeskus. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/160093/SYKEra_4_2016.pdf?sequence=1.

- Mitikka, S. 2013. Järvien vedenlaadun vertailu. Julkaistu 9.7.2013. Viitattu 6.3.2017. <http://www.ymparisto.fi/download/noname/%7B642BB7A7-42F9-4A67-85BA.../57406>.
- Mitikka, S. 2015. Yleinen käyttökelpoisuusluokitus. Julkaistu 7.12.2015. Viitattu 25.3.2017. http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Vesien_tila.
- Möttönen, S., Konttinen, E. & Salo, M. 2016. Ei vettä, rantaa rakkaampaa. Asukkaiden arvioita Saarijärven reitin tilasta ja muutoksista. Keski-Suomen liitto. http://www.keskisuomi.fi/filebank/24767-Asukkaiden_arvioita_Saarijarven_reitin_tilasta.pdf.
- Niinimäki, J. & Penttinen, K. 2014. Vesienhoidon ekologiaa. Ravintoverkkokunnostus. Helsinki: Books on Demand GmbH.
- Ocean algae will cope well in varying climates, study shows 2015. Julkaistu 30.6.2015. Viitattu 17.3.2017. <https://phys.org/news/2015-06-ocean-algae-cope-varying-climates.html>.
- Pinkka. Lajintuntemuksen oppimisympäristö n.d. Viitattu 2.3.2017. <http://h108.it.helsinki.fi/virtuaalikasvio/index.php?bundle=443&pcat=1>.
- Pintavesien ekologinen ja kemiallinen tila 2016. Suomen ympäristökeskus. Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. Julkaistu 22.9.2016. Päivitetty 22.9.2016. Viitattu 25.3.2017. <http://www.ymparisto.fi/pintavesientila>.
- Pohjoisen luontomme talvi n.d. Pohjoinen luontomme. Verkkosivusto. Viitattu 3.3.2017. <http://www oulu.fi/northnature/finnish/Suomi/talvikansio/talvivedessa.html>.
- Ranta, E., Rita, H. & Kouki, J. 1992. Biometria. Tilastotiedettä ekologeille. 4. p. Helsinki: Yliopistopaino.
- Regressioanalyysi 2008. KvantiMOTV. Yhteiskuntatieteellinen tietoaarkisto. Menetelmäopetuksen tietovaranto. Päivitetty 16.12.2008. Viitattu 20.12.2016. <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/regressio/analyysi.html>.
- Richardson, T., Lawrenz, E., Pinckney, J., Guajardo, R., Walker, E., Paerl, H. & MacIntyre, H. 2010. Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser®. Water Research 44, 2461–2472.
- Rikkinen, J. 1999. Leviä, sieniä ja leväsieniä. Johdatus levien ja sienten monimuotoisuuteen. Helsinki: Yliopistopaino.
- Rosenqvist, A-K. 2012. Levän poisto ja hallinta voimalaitoksen jäähdytysjärjestelmässä. Insinööriyö. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Bio- ja elintarviketekniikka. Viitattu 3.3.2017. <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/53376/Insinööriyö.pdf?sequence=>.
- Ruoantuotannon ja -kulutuksen vaikutukset ympäristöön ja ilmastoon n.d. Luonnonvarakeskuksen verkkosivut. Viitattu 17.3.2017. <https://www.luke.fi/tietoa-luonnonvaroista/ruoka-ja-ravitsemus/ruoan-ilmastovaikutukset/>.

Räty, M., Järvenranta, K., Virkajärvi, P., Saarijärvi, E. & Kröger, H. 2014. Jatkuvatoinen ravinnekuormituksen seurantaverkosto Kirmanjärven valuma-alueella. Julkaisussa Maataloustieteen Päivät 2014. Toim. M. Hakojärvi & N. Schulman. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisuja no 30. Julkaistu 9.1.2014. Viitattu 23.2.2017. http://www.smts.fi/MTP_julkaisu_2014/Esitykset/Raty_ym_Jatkuvatoinen_ravinn_ekuormituksen_seurantaverkosto_Kirmanjarven_valuma-alueella.pdf.

Saarijärven reitti 2013. Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. Julkaistu 3.7.2013. Päivitetty 3.7.2013. Viitattu 19.1.2017. [http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Luonto/Suojelualueet/Natura_2000_alueet/Saarijarven_reitti\(6630\)](http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Luonto/Suojelualueet/Natura_2000_alueet/Saarijarven_reitti(6630)).

Saastamoinen, O., Kniivilä, M., Alahuhta, J., Arovuori, K., Kosenius, A-K., Horne, P., Otsamo, A. & Vaara, M. 2014. Yhdistävä luonto: ekosysteemipalvelut Suomessa. Publications of the University of Eastern Finland. Reports and Studies in Forestry and Natural Sciences Number 15. University of Eastern Finland. Faculty of Science and Forestry. School of Forest Sciences. http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_978-952-61-1426-2/urn_isbn_978-952-61-1426-2.pdf.

100 kysymystä leivistä 1999. Ympäristöopas 63. Toim. J. Rissanen. Suomen ympäristökeskus. Helsinki: Erweko Painotuote. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/40287/YO_63.pdf?sequence=1.

Seppälä, J. 2009. Fluorescence properties of Baltic Sea phytoplankton. Monographs of the Boreal Environment Research 34. Department of Biological and Environmental Sciences. Faculty of Biosciences. University of Helsinki. Väitöskirja. Helsingin yliopisto. Helsinki: Edita Prima. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22270/fluoresc.pdf?sequence=2>.

Seppälä, J. 2014. Levien pigmentaatio. Julkaisussa Jatkuvatoinen levämäärien mittaaminen. Hyvät mittauskäytännöt ja aineiston käsittely. Toim. J. Huotari & M. Ketola. Ympäristöhallinnon ohjeita 5/2014. Helsinki: Suomen ympäristökeskus, 11–16. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/45421/OH_5_2014.pdf?sequence=1.

Seppälä, J., Kuoppamäki, K. & Kuha, J. 2014. Mittausperiaate ja fluoresenssiin vaikuttavat tekijät. Julkaisussa Jatkuvatoinen levämäärien mittaaminen. Hyvät mittauskäytännöt ja aineiston käsittely. Toim. J. Huotari & M. Ketola. Ympäristöhallinnon ohjeita 5/2014. Helsinki: Suomen ympäristökeskus, 17–24. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/45421/OH_5_2014.pdf?sequence=1.

Seppälä, J., Spilling, K., Natunen, K., Kostamo, K., Suutari, M. & Leskinen, E. 2015. Kestävän sinisen biotalouden uudet resurssit Itämerellä: mikrolevät, makrolevät ja simpukat. Vesitalous 56, 6, 8–11. http://www.vesitalous.fi/wp-content/uploads/2016/01/Vesitalous_06_2015_netti.pdf.

Setälä, O. & Kremp, A. 2011. Saaliiksi myrkkyyä. Tiede-lehden verkkosivusto. Julkaistu Tiede-lehdessä 07/2011. Julkaistu 17.8.2011. Päivitetty 17.8.2011. Viitattu 6.3.2017. http://www.tiede.fi/artikkeli/jutut/artikkelit/saaliiksi_myrkkya.

Siimekselä, T., Stenman, T. & Ylimartimo, A. 2011. Tuloksia pilottikokeesta pienellä valuma-alueella Saarijärven vesireitin varrella. Vesitalous 52, 6, 24–28. http://vesitalous.mobie.fi/wp-content/uploads/2013/04/Vesitalous_1106_lowres.pdf.

- Siimekselä, T., Ylimartimo, A., Stenman, T. & Lahtela, S. 2013. Tuloksia vesistökuormituksesta peltovaltaisilla alueilla Keski-Suomessa. *Vesitalous* 54, 4, 23–28. http://www.vesitalous.fi/wp-content/uploads/2013/09/Vesitalous_04_2013.pdf.
- Stacey, D. 2015. Arctic study finds CO2 helps plants grow but only at low temperatures. Julkaistu 2.9.2015. Viitattu 17.3.2017. <https://phys.org/news/2015-09-arctic-co2-temperatures.html>.
- Suhonen, T. 2016. NordForskin rahoittama pohjoismainen huippuyksikkö Turun yliopistoon. Turun yliopiston verkkosivut. Julkaistu 13.12.2016. Päivitetty 19.12.2016. Viitattu 17.3.2017. <https://www.utu.fi/fi/Ajankohtaista/Uutiset/Sivut/nordforskin-rahoittama-pohjoismainen-huippuyksikko-turun-yliopistoon.aspx>.
- Taanila, A. 2010. Lineaariset regressiomallit. Viitattu 20.12.2016. <http://myy.haaga-helia.fi/~taaak/m/regressio.pdf>.
- Tarsia, E. 2016. Rypsin, härkäpavun ja *Spirulina platensis*-mikrolevän vaikutukset lypsylehmien valkuaisen hyväksikäyttöön. Maisterintutkielma. Helsingin yliopisto. Maataloustieteiden laitos. Kotieläinten ravitsemustiede. https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/163686/Maisterintutkielma_TarsiaEssi_2016.pdf?sequence=2.
- Tarvainen, M., Kotilainen, H. & Suomela, J. 2015. Uudet menetelmät vesistöjen seurannassa – mahdollisuudet ja haasteet. Raportteja 86. Varsinais-Suomen elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskus. https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/120174/RA%2086_2015_Uudet%20menetelm%C3%A4t%20vesist%C3%B6jen%20seurannassa.pdf?sequence=2.
- Toukokuun 2016 sää ja tilastot n.d. Ilmatieteen laitoksen verkkosivut. Viitattu 31.1.2017. <http://ilmatieteenlaitos.fi/toukokuu>.
- Turkki, T. 2013. Vesi vanhin resursseista. Artikkelit Sitran verkkosivuilla. Julkaistu 7.6.2013. Viitattu 25.3.2017. <https://www.sitra.fi/artikkelit/vesi-vanhin-resursseista/>.
- Tyystjärvi, E. 2016. Mikrolevät – haaste ja mahdollisuus. Esitys 16.3.2016. Levien hyödyntäminen Keski-Suomessa-työpaja.
- Valkama, P., Lahti, K. & Särkelä, A. 2007. Automaattinen veden laadun seuranta Lepsämänjoella. *Terra* 119, 3–4, 195–206. Suomen maantieteellinen seura: Helsinki.
- Valkama, P., Lahti, K. & Särkelä, A. 2008. Fosfori- ja typpikuormituksen muodostuminen Lepsämänjoessa kevät- ja syystulvatilanteissa. *Vesitalous* 49, 5, 26–30. http://www.vesitalous.fi/wp-content/uploads/2010/02/5_2008.pdf.
- Verhein, M. 2016. Algasol's Patented PBR Technology. Esitys European Algae Biomass-konferenssissa 21.4.2016.
- Vesistöjen ravinnekuormitus ja luonnon huuhtouma 2013. Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. Julkaistu 30.8.2013. Päivitetty 6.2.2017. Viitattu 6.3.2017. http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Vesistojen_ravinnekuormitus_ja_luonnon_huuhtouma.
- Vähemmän lihaa lautaselle 2016. WWF-lehti 1/2016. WWF:n verkkosivut. Viitattu 17.3.2017. <https://wwf.fi/vahemman-lihaa-lautaselle/>.

Yang, Y., Colom, W., Pierson, D. & Pettersson, K. 2016. Water column stability and summer phytoplankton dynamics in a temperate lake (Lake Erken, Sweden). *Inland Waters* 2016, 6, 499–508. International Society of Limnology 2016.
<https://www.fba.org.uk/journals/index.php/IW/article/viewFile/874/664>.

Yu, G., Liu, H., Venkateshan, K., Yan, S., Cheng, J., Sun, X. S. & Wang, D. 2011. Functional, physiochemical, and rheological properties of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) protein. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 54, 2, 555–561.