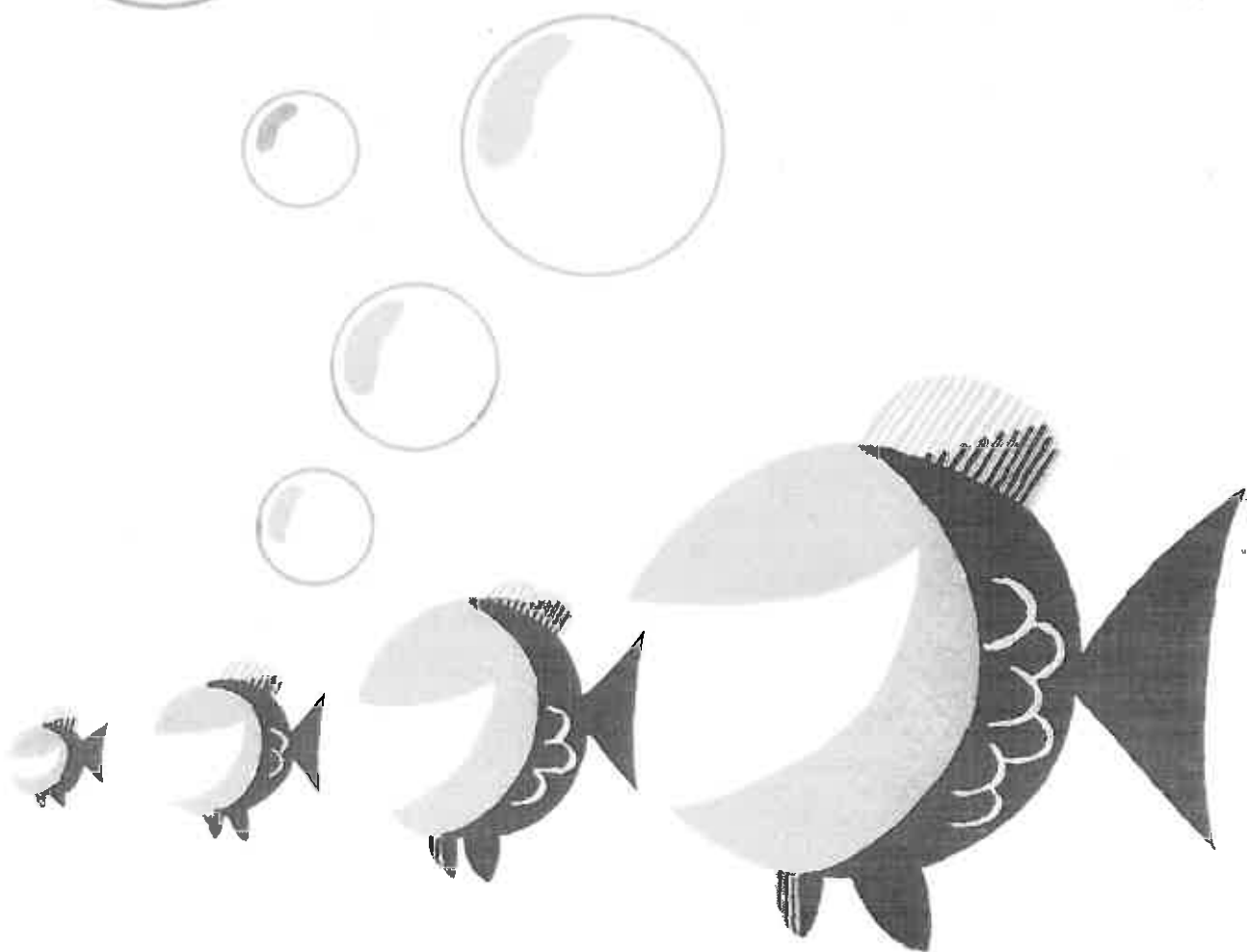


RIISTA- JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS
KALANTUTKIMUSOSASTO



MONISTETTUJA JULKAISUJA

54
1986





RIISTA- JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS
KALANTUTKIMUSOSASTO

MONISTETTUA JULKAISUA

Toimittaja: Viljo Nylund. Toimitussihteerit: Marja-Liisa Koljonen, Petri Suuronen.

Julkaisun jakelusta päätetään kunkin numeron osalta erikseen.

Julkaisua koskevat tiedustelut osoitetaan Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston kirjastolle, PL 193, 00131 Helsinki 13.

Monistettuja julkaisuja on jatkoa sarjalle: "Maataloushallituksen kalataloudellinen tutkimustoimisto. Monistettuja julkaisuja". Kalantutkimusosaston muut julkaisusarjat ovat "Finnish Fisheries Research", "Suomen kalatalous", "Tiedonantoja" ja "Meddelanden".

Redaktör: Viljo Nylund. Redaktionssekreterare: Marja-Liisa Koljonen, Petri Suuronen .

Publikationens distribuering fastställs skilt för varje nummer.

Förfrågningar angående tidskriften riktas till bibliotekarien, Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet, fiskeriforskningsavdelningen, PB 193, 00131 Helsingfors 13.

Tidskriften är fortsättning på "Maataloushallituksen kalataloudellinen tutkimustoimisto. Monistettuja julkaisuja". Övriga publikationsserier från fiskeriforskningsavdelningen är "Finnish Fisheries Research", "Suomen kalatalous", "Tiedonantoja" och "Meddelanden".

RIISTA- JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS, KALANTUTKIMUSOSASTO

MONISTETTUJA JULKAISUJA

No 54

1986

VEDEN VÄHÄHAPPISUUDEN JA HAPPAMUUDEN
VAIKUTUKSET RAVUN HEMOLYMFaan

Teuvo Järvenpää

HELSINKI 1986

ISBN 951-9092-83-8
ISSN 0358-4623
Helsinki 1986

SISÄLLYS:

	Sivu
1. JOHDANTO	1
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	4
2.1 Koe-eläimet	4
2.2 Altistukset	6
2.3 Koeryhmät	7
2.3.1 Vertailuryhmä eli hapekkaan veden ryhmä	7
2.3.2 Vähähappisen eli hypoksisen veden ryhmä	8
2.3.3 Happaman veden ryhmä	8
2.3.4 Vähähappisen happaman veden ryhmä ..	10
2.4 Hemolymfanäytteen otto	10
2.5 Näytteiden käsittely ja analysointi	12
2.5.1 Hemolymfan pH, happikapasiteetti ja happiaffiniteetti	12
2.5.2 Kokonaisvalkuaisainepitoisuus	13
2.5.3 Cu^{2+} -pitoisuus	13
2.5.4 Glukoosi-, laktaatti-, Cl^- -, Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuudet	14
2.5.5 Vahvaionipitoisuuserotus	15
2.5.6 Käytetyt vakio- ja vertailuliuokset..	15
2.5.7 Akvaarioveden pH:n ja happikyllästeisyyden määrittäminen	15
2.6 Aineiston tilastollinen käsittely	15
3. AINEISTON JA MENETELMIEN TARKASTELU	16
3.1 Koe-eläinten koko	16
3.2 Koelämpötila	17
3.3 Akvaarioveden happikyllästeisyys ja happamuus altistusten aikana	18
3.4 Näytteenotto ja -käsittely	18
3.5 Vertailuryhmän puolittaminen	19
3.6 Näytteenoton jakaminen kahdelle päivälle ...	19

	Sivu
4. TULOKSET	20
4.1 Hemolymfan happikapasiteetti sekä kokonais- valkuaisaine- ja Cu^{2+} -pitoisuus	20
4.2 Hemolymfan happiaffiniteetti l. hapensi- tomiskyky	22
4.3 Hemolymfan kalsium-, magnesium- ja laktaat- tipitoisuus	26
4.4 Hemolymfan yksiarvoiset ionit K^+ , Na^+ ja Cl^-	29
4.5 Hemolymfan pH	30
4.6 Hemolymfan vahvaionipitoisuuserot	32
4.7 Hemolymfan glukoosipitoisuus	36
5. TULOSTEN TARKASTELU	36
5.1 Sukupuolten väliset erot	36
5.2 Sopeutuminen veden vähähappisuuteen	38
5.3 Veden happamoitumisen vähähappisuussopeutu- mia ehkäisevä vaikutus	48
5.4 Hemolymfan pH-säätely ja ionitasapaino	50
6. JOHTOPÄÄTÖKSET	54
KIITOKSET	55
LÄHDELUETTELO	56
LIITE	

1. JOHDANTO

Monien vesistöjen vedenlaatu on muuttunut suuresti viime vuosikymmenten aikana. Jokia on perattu, ruopattu, padottu ja allastettu voimatalouden ja tulvasuojelun tarpeisiin. Viljelysmaiden, soiden ja metsien ojitusta on tehostettu. Teollisuuden, maatalouden ja asutuksen jätevedet ovat lisääntyneet ja sateet muuttuneet happamiksi laajoilla alueilla. Vesistöissä, joissa muutokset ovat olleet suurimpia, rapukannat ovat joko hävinneet kokonaan tai taantuneet suuresti myös varsinaisten toimenpidealueiden alapuolisissa vesistön osissa (esim. WESTMAN 1973, NIEMI 1976, WESTMAN 1979, PURSIAINEN ja WESTMAN 1984).

Samalla tavoin perkauksista ja ruoppauksista aiheutuneiden veden laadun muutosten on todettu olleen syynä rapujen häviämiseen tai kantojen taantumiseen Yhdysvalloissa (HOBBS ja HALL, 1974), Ruotsissa (VALLIN, 1964) ja Puolassa (KOSSAKOWSKI, 1973). Vesien likaantumista pidetään merkittävänä syynä monien Euroopan maiden rapukantojen taantumiseen (KOSSAKOWSKI 1973, LAURENT 1973, ERENCIN ja KÖKSAL 1973, WESTMAN 1985).

Erilaiset vesistö-rakennustyöt, ojitukset, ruoppaukset, per-
kaukset ja tekoaltaiden rakentamiset johtavat usein pitkä-
aikaiseen veden samentumiseen, kiintoaine- ja metalli-ioni-
pitoisuuksien suurenemiseen, happipitoisuuden pienenemiseen
sekä erityisesti sulfidimailla happamoitumiseen. Niitä
vaikutustapoja, joilla nämä veden laadun muutokset erilli-
sinä tai summautuneina aiheuttavat rapujen kuolemia, karkot-
tumista, kasvu- ja lisääntymishäiriöitä, ei tunneta.

Tästä syystä Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksessa
käynnistettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston eläintie-
teen laitoksen kanssa v. 1979 tutkimusohjelma selvittämään
ympäristön muutosten vaikutuksia rapuihin. Tutkimus veden
vähähappisuuden (hypoksia) ja happamuuden erillisistä ja
summautuvista vaikutuksista ravun hemolymfaan on osa tätä
tutkimusohjelmaa. Tutkimuksessa, joka tehtiin akvaarioal-
tistuksina, pyrittiin erityisesti selvittämään ravun hemo-
lymfan hapenkuljetusominaisuuksien muutoksia, koska vähä-
happisessa ympäristössä kudosten riittävän hapensaannin
turvaaminen muodostuu keskeiseksi ongelmaksi. Muita eri-
tyisiä selvityksen kohteita olivat lymfan pH- ja ionitasa-
paino, joissa sekä hypoksia- että varsinkin happamuusaltis-
tusten vaikutusten voitiin odottaa ilmenevän.

Kymmenjalkaisten äyriäisten (Decapoda) fysiologisia vastei-
ta veden happipitoisuuden pienenemiselle on kokeellisesti
tutkittu jo pitkään. Vanhimmasta kirjallisuudesta WOLVE-
KAMP ja WATERMAN (1960) ovat laatineet laajan katsauksen.
Kuten aikaisemminkin, suurin osa viime vuosien tutkimuksis-
ta on kohdistunut mereisiin lajeihin (esim. JOHANSEN ym.
1970, SPOEK 1974, McMAHON ja WILKENS 1975, TAYLOR 1976,

BRIDGES ja BRAND 1980). Hypoksia-altistukset ovat olleet vaihtelevan pituisia, enimmäkseen hyvin lyhyitä. Tästä syystä tehdyt havainnot ovat usein keskenään ristiriitaisia.

Myös makean veden rapujen hypoksiavasteita on selvitetty (mm. MOSHIRI ym. 1970, McMAHON ym. 1974, DEJOURS ja BEE-KENKAMP 1977; WILKES ja McMAHON 1982a, b). Vaikka useimmissa tutkimuksissa päähuomio on kiinnitetty hengitystoimintojen ja verenkierron muutoksiin, on myös lymfan hapenkuljetusominaisuuksia selvitetty (mm. LARIMER ja RIGGS, 1964, TRUCHOT 1975c, WHEATLY ja TAYLOR 1981). Äskettäin, tämän työn tekemisen jälkeen, WILKES ja McMAHON (1982b) ovat julkaisseet tutkimuksensa pitkäaikaisen hypoksia-altistuksen vaikutuksesta amerikkalaisen Orconectes rusticus -ravun hemolymfan happiaffiniteettiin.

Veden pH-muutosten vaikutuksia kalojen fysiologiaan on selvitetty viime vuosina paljonkin (esim. LEIVESTAD ja MUNIZ 1976, PACKER 1979, McDONALD ja WOOD 1981). Rapujen osalta tietoja on vähän. CUKERZIS (1968) on selvittänyt ravun Astacus astacus ja kapeasaksiravun A. leptodactylus pH-optimia ja määrittänyt samalla näiden lajien happamuudensietorajat. ABRAHAMSSON (1972) ja FÜRST (1977) ovat selvittäneet rapukantojen (A. astacus) tiheyden riippuvuutta veden pH:sta ja APPELBERG (1979) tutkinut veden alhaisen pH:n vaikutusta ravun (A. astacus) kuorenvaihdon jälkeiseen kalsiumaineenvaihduntaan. MALLEY (1980) on selvittänyt happamoitumisen vaikutusta Orconectes virilisin kalsiumaineenvaihduntaan.

Aivan äskettäin MORGAN ja McMAHON (1982) ovat selvittäneet veden happamoitumisen vaikutuksia kahden amerikkalaisen makean veden ravun, Procambarus clarki ja Orconectes rusticus, ioni- ja happo-emästasapainoon.

Samanaikaisen hypoksia- ja happamuusstressin mahdollisista summautuvista vaikutuksista ei ole aikaisempia tutkimuksia. Tosin CUKERZIS (1968) on todennut rapujen hapenkulutuksen suurenevan alhaisessa pH:ssa.

Vaikka veden laadun muutosten aikaansaamat fysiologiset vasteet eri ravuissa ovat pääpiirteittäin samanlaiset, voi sopeutumisvalmius ja fysiologisten vasteiden voimakkuus vaihdella suurestikin jopa samassa vesistössä elävien eri ekologiisiin lokeroihin sopeutuneiden lähisukuistenkin lajien kesken (BURBANCK ym. 1948, MORGAN ja McMAHON 1982). Tästä syystä eri lajeilla tehdyt tutkimukset eivät ole keskenään suoraan vertailukelpoisia, eivätkä vieraista lajeista saadut tutkimustulokset päde sellaisenaan vesistöissämme elävään A. astacus-lajiin.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Koe-eläimet

Tutkimuksessa käytetyt, heinä-elokuussa pyydetyt ravut, Astacus astacus, siirrettiin Evon kalanviljelylaitoksesta Helsingin yliopiston eläintieteen laitoksen fysiologian

osaston akvaarioihin syyskuussa 1980 kolme viikkoa ennen koesarjan aloittamista. Tutkimukseen valittiin keskenään mahdollisimman samankokoisia yksilöitä 32 kappaletta kumpaa-kin sukupuolta. Koiraat painoivat keskimäärin $19 \pm 0,4$ g ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Niiden selkäkilven pituus, joka on jokseenkin puolet eläimen koko pituudesta, oli $43,5 \pm 0,3$ mm. Naaraiden keskimääräinen paino oli $22,5 \pm 0,8$ g ja selkäkilven pituus $45,7 \pm 0,6$ mm.

Ravut olivat sukukypsiä ja kuorenvaihto kiertonsa lepovaiheessa (intermoult) (DRACH 1939, STEVENSON 1975). Altistuksia varten ne jaettiin neljään ryhmään siten, että jokaiseen ryhmään tuli kahdeksan naarasta ja kahdeksan koirasta. Kukin ryhmä sijoitettiin omaan 60 l:n vetoiseen lasiakvaarioonsa 1 m:n syvyisen teräsaltaan pohjalle. Altaan seinät toimivat näkösuojana estäen huoneessa tapahtuvien toimien näkymisen akvaarioihin. Akvaariot oli peitetty valoaläpäisemättömillä muovikansilla ja niiden pohjalle oli ladottu keraamisia salaojaputkia ravuille suojapaikoiksi. Akklimointiaikana akvaarioissa oli jatkuva veden läpivirtaus ($\sim 0,5$ l/min.). Vesi otettiin vesijohtoverkosta. Kloorin poistamiseksi se johdettiin akvaarioihin aktiivihiilisuodattimen läpi. Akvaarioihin johdettiin myös paineilmaa, jonka ansiosta veden happikyllästeisyys pysyi yli 90-prosenttisena.

Veden pH vaihteli 7,2:n ja 7,5:n välillä ja lämpötila oli $+12$ °C. Akvaariohuoneen valaistus noudatti vuodenajan normaalirytmää: akklimointiaikana päivä lyheni n. 12 tunnis-

ta 10 tuntiin ja altistusjakson aikana 10 tunnista 8 tuntiin. Huoneessa käytettiin keinovaloa vain vuorokauden valoisana aikana.

Rapuja ruokittiin lahoavilla lepänlehdillä, joita oli akvaarioissa saatavana myös altistuksen kestäessä.

2.2 Altistukset

Altistuksiin käytetyt veden happikyllästeisyys ja pH valittiin kirjallisuuden perusteella läheltä kriittisiksi ilmoitettuja arvoja. KALMUSin (1930) mukaan 25 % ($2,4 \text{ mg l}^{-1} \text{O}_2$, $T+17 \text{ }^\circ\text{C}$) on ravulle, Potamobius astacus (= Astacus astacus), kriittinen veden happikyllästeisyys. Tätä pienemmässä kylästeisyydessä ravun hapenkulutus pienenee ja hengitys muuttuu epäsäännölliseksi. LINDROTHin (1950) mukaan ravun hapenotto säilyy optimaalisena $+15 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa niin kauan kuin veden happipitoisuus on yli 5 mg l^{-1} , eli kyllästeisyys on yli 50 %. Saman tutkimuksen mukaan rapu säilyy hengissä, vaikka veden happipitoisuus pienenee 2 mg l^{-1} :aan (O_2 -kyll. n.20 %). Tässä tutkimuksessa testattavaksi veden happikyllästeisyydeksi valittiin 30 % ($3,2 \text{ mg l}^{-1}$), jotta mahdolliset sopeutumisolmiöt ja subletaalit häiriöt tulisivat selvästi esille.

Happamuusaltistusten veden pH-arvoksi valittiin pH 4. Se on ravun happamuuden sietokyvyn alarajalla (CUKERZIS 1968), ja sen on todettu aiheuttavan häiriöitä ravun kalsiumaineenvaihdunnassa kuorenvaihdon aikana (APPELBERG 1979, MALLEY 1980).

Sekä happikyllästeisyyden että happamuuden suhteen vastaavan suuruisia veden laadun muutoksia esiintyy häiriintyneissä vesistöissä myös luonnossa (esim. ALASAARELA ja SALMELA, 1980, STORBERG 1983).

Altistukset tapahtuivat seisovassa vedessä. Vähähappisuusaltistuksissa veden happikyllästeisyyttä vähennettiin kuplittamalla siihen tyypeä. Happamuusaltistuksissa tarvittava happamuusaste saatiin aikaan lisäämällä veteen rikkihappoa, joka on luonnossakin usein veden happamoitumisen aiheuttaja (happamat sateet, sulfidimaiden ojitukset). Happamuusaltistuksissa veden pH:n annettiin tasapainottua yli yön ennen rapujen siirtoa siihen.

Altistukset kestivät 7-8 vuorokautta. Tänä aikana vesi vaihdettiin kerran kussakin akvaariossa. Vaihtovesi valmistettiin edellisenä päivänä ja sen annettiin tasapainottua yli yön ennen vaihtoa. Näytteenoton ruuhkautumisen ehkäisemiseksi eri ryhmien altistukset jouduttiin porrastamaan 14. lokakuuta ja 7. marraskuuta väliselle ajalle.

2.3 Koeryhmät

2.3.1 Vertailuryhmä eli hapekkaan veden ryhmä

Puolesta vertailuryhmän rapuja hemolymfanäyte otettiin kokeen alkaessa, 3 viikkoa kestäneen akklimointiajan päätyttyä. Sen jälkeen veden virtaus akvaarioon keskeytettiin. Veden ilmastusta jatkettiin koko kokeen ajan, joten akvaarioveden happikyllästeisyys säilyi yli 90-prosenttisenä. Veden lämpötila laski kokeen aikana +12°C:sta +11,2 °C:een.

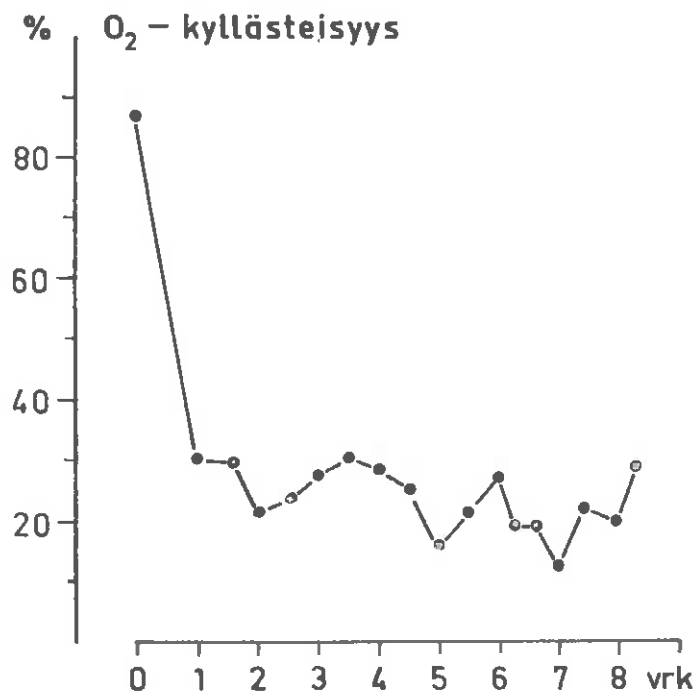
ja pH vaihteli 7,2:n ja 7,4:n välillä. Akvaariovesi vaihdettiin kokonaisuudessaan kokeen neljäntenä päivänä. Ryhmän toisesta puoliskosta hemolymfanäyte otettiin 7 vuorokautta kestäneen kokeen päättyessä.

2.3.2 Vähähappisen eli hypoksisen veden ryhmä

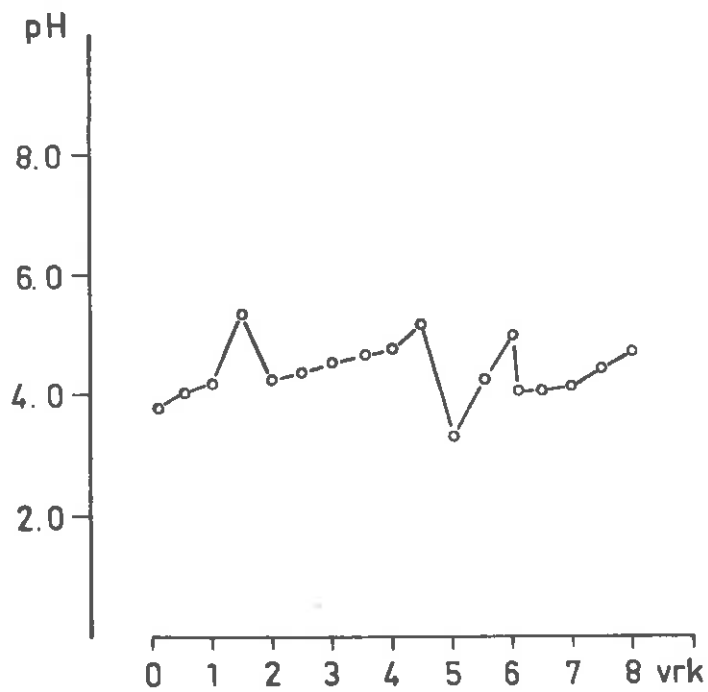
Hypoksia-altistuksessa akvaarioveden happikyllästeisyys alennettiin 30 %:iin ($3,2 \text{ mg l}^{-1}$) kuplittamalla siihen tyypeä. Hypoksiatasoa pidettiin yllä säätelämällä veteen kuplitettavan tyypin ja paineilman keskinäistä suhdetta. Usein toistuvista happipitoisuuden tarkistuksista ja kuplituksen säädöistä huolimatta happikyllästeisyys ei pysynyt tasaisena, vaan vaihteli 20-30 %:n välillä käväisten alimillaan 16 %:ssa (kuva 1). Akvaariovesi vaihdettiin kokonaisuudessaan altistuksen neljäntenä päivänä. Altistuksen aikana veden lämpötila laski $+12,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$:sta $+11,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$:een. pH vaihteli 7,2:n ja 7,4:n välillä. Hemolymfanäytteet ravuista otettiin 7 ja 8 vrk:n kuluttua altistuksen aloittamisesta.

2.3.3 Happaman veden ryhmä

Happamuusaltistuksen alkaessa ravut siirrettiin akvaarioon, jonka veden pH oli edellisenä päivänä laskettu rikkihappoa lisäämällä pH 4:ään. Aikaansaatua happamuustasoa pidettiin yllä päivittäisin happolisäyksin. Altistuksen aikana veden pH vaihteli 3,7:stä 5,1:een (kuva 2). Koko altistuksen ajan



Kuva 1. Akvaarioveden happikyllästeisyys (%) vähähappi-
suusaltistuksen aikana.



Kuva 2. Akvaarioveden pH happamuusaltistuksen aikana.

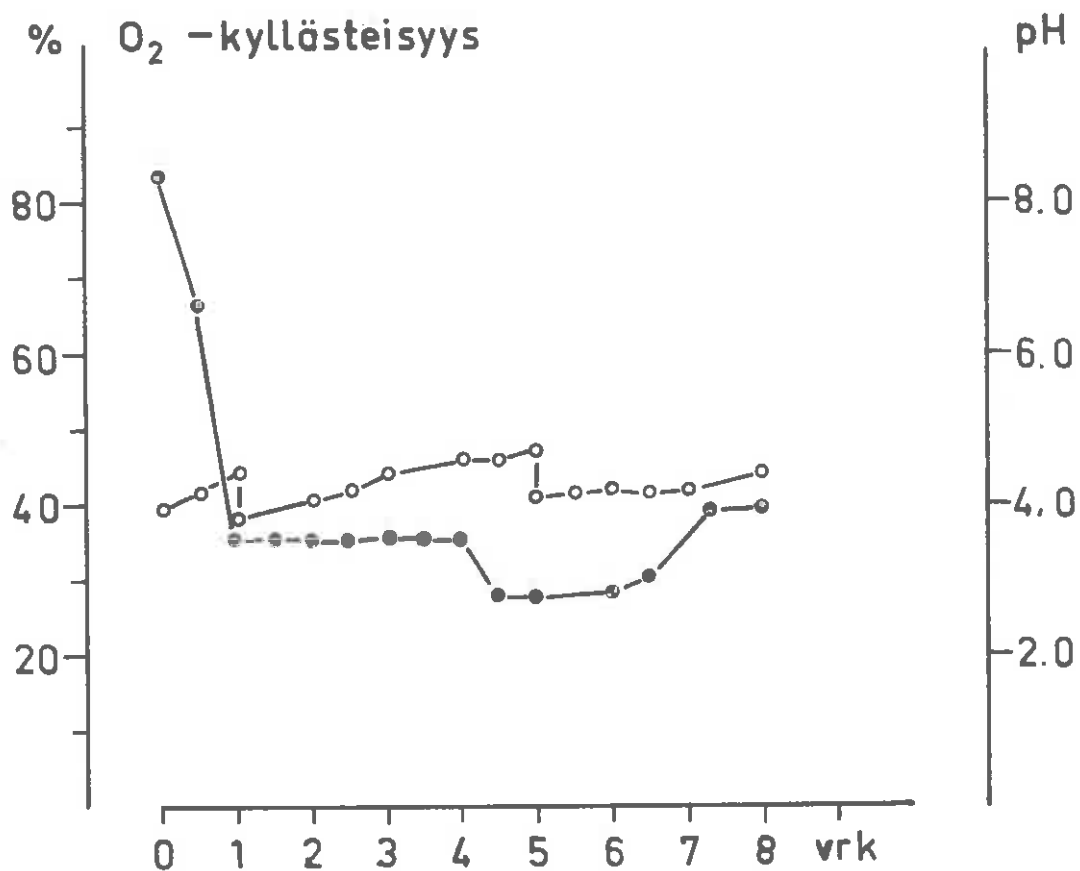
veteen kuplitettiin runsaasti paineilmaa, mistä syystä happikyllästeisyys pysyi yli 90-prosenttisena. Akvaarion vesi vaihdettiin kokonaisuudessaan altistuksen neljäntenä päivänä. Veden lämpötila laski kokeen kestäessä +11,2:sta +10,8 °C:een. Hemolymfanäytteet otettiin 7 ja 8 vrk:n kuluttua altistuksen aloittamisesta.

2.3.4 Vähähappisen happaman veden ryhmä

Altistuksen alussa ravut siirrettiin akvaarioon, jonka veden pH oli laskettu 4:ään rikkihappoa lisäämällä. Samalla veden happikyllästeisyys alennettiin 30 %:iin kuplittamalla siihen tyypeä. Aikaansaatuja veden laadun muutoksia pidettiin yllä kuten erillisissä hypoksisen ja happaman veden ryhmissä. Veden happikyllästeisyys vaihteli altistuksen kestäessä 28-40 %:n välillä ja pH 3,8:sta 4,7:ään (kuva 3). Akvaariovesi vaihdettiin kokonaisuudessaan altistuksen neljäntenä päivänä. Kokeen kestäessä veden lämpötila laski +10,8 °C:sta +10,0 °C:een. Hemolymfanäytteet otettiin 7 ja 8 vrk:n kuluttua altistuksen aloittamisesta.

2.4 Hemolymfanäytteen otto

Näytteenottoa varten rapu nostettiin akvaariosta ilmaan ja käärittiin kosteaan paperipyyhkeeseen. Hemolymfanäyte (n. 0,9 ml) otettiin 0,6 mm:n läpimittaisella neulalla injektio-ruiskuun prebranchiaalisinuksesta viimeisen kävelyraajaparin takaa. Kokonaisuudessaan näytteenottoon käytettiin aikaa n. 45-60 sekuntia.



Kuva 3. Akvaarioveden happikyllästeisyys (%) ja pH samanaikaisen vähähappisuus- ja happamuusaltistuksen aikana.
●-●-● O₂ -kyllästeisyys, o-o-o pH.

2.5 Näytteiden käsittely ja analysointi

2.5.1 Hemolymfan pH, happikapasiteetti ja happiaffiniteetti

Välittömästi näytteenoton jälkeen osa näytteestä (0,5 ml) sentrifugoitiin minuutin ajan suljetussa putkessa Eppendorff -mikrofuugissa nopeudella 12 000 kierrosta minuutissa. Näin ehkäistiin näytteen hyytyminen.

Soluttoman hemolymfan pH mitattiin välittömästi sentrifugoinnin jälkeen Radiometer BMS 3 Mk 2, PHM 71,72 -järjestelmällä, joka oli termостоitu koelämpötilaan. pH:n annettiin tasapainottua 30 sekunnin ajan. Muu osa näytteestä (n. 450 μ l) jaettiin kahteen osaan, joista toiseen johdettiin ilmaa ja toiseen typpeä (NIKINMAA ja SOIVIO 1979) kunnes hemosyaniini oli kokonaan ilman tai typen kyllästämä. Tämän jälkeen hemolymfan happikapasiteetti määritettiin ilmakyllästeisestä lymfasta mukaellulla TUCKERin (1967) menetelmällä, jossa hapen vapauttamiseen hemosyaniinista käytettiin kaliumsyaniidia kaliumferrisyaniidin asemesta (BRIDGES ym. 1978). Liuoksen kaliumsyaniidipitoisuus oli 0,08 M (5,2 gl⁻¹). Saadusta happikapasiteetista vähennettiin lymfaan liunneen hapen osuus (PO_2 158 mmHg, +12 °C, liunneen hapen osuus 0,36 til.-%). Happiaffiniteettia ilmentävä P_{50} -arvo (= se hapen osapaine, jossa hemosyaniini on 50-prosenttisesti happikyllästeinen) määritettiin sekoitusmenetelmällä (EDWARDS ja MARTIN 1966). Liuunneen hapen osuus vähennettiin ilmalla kyllästetystä lymfasta, jolloin saa-

tiin ainoastaan hemosyaniinin sitoutunutta happea kuvaava P_{50} -arvo.

2.5.2 Kokonaisvalkuaisainepitoisuus

Hemolympfan kokonaisvalkuaisainepitoisuuden määrittämiseksi 50 μ l sentrifugoimatonta lymfaa pipetoitiin 2 000 μ l:aan biuretreaganssia (HYVÄRINEN ym. 1972). Fotometrinen määrittäminen suoritettiin seuraavana päivänä Hitachi 100-10 -spektrofotometrillä 555 nm:n aallonpituudella.

2.5.3 Cu^{2+} -pitoisuus

Kuparipitoisuuden määrittämiseksi 100 μ l sentrifugoimatonta lymfaa lisättiin 100 μ l:aan 1 N HCl:a, sekoitettiin, annettiin seistä 25 minuuttia huoneenlämmössä, lisättiin 100 μ l 10 % TCA:a ja sentrifugoitiin 3 minuutin ajan 12 000 kierrosta minuutissa. Cu^{2+} -pitoisuus määritettiin myöhemmin supernatantista fotometrisesti Boehringer Mannheim GmbH:n Cu^{2+} -testillä (No 124 834). Määrittämistä varten näyte laimennettiin tislattulla vedellä suhteessa 1:5 ja laimennokseen lisättiin 1 N HCl:a ja 10 % TCA:a suhteessa 2:1:1. Näytteen lopullinen laimennussuhde oli täten 15-kertainen valmistajan ohjeeseen verrattuna.

2.5.4 Glukoosi-, laktaatti-, Cl^- -, Na^+ -, K^+ -,
 Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuudet

Määrityksiä varten 200 μl sentrifugoimatonta lymfaa laimennettiin 600 μl :aan 10 % TCA:a, annettiin seistä yli yön jääkaapissa, sentrifugoitiin 12 000 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan, minkä jälkeen supernatantti pakastettiin myöhemmin tehtäviä määrityksiä varten.

Lymfan glukoosipitoisuus määritettiin supernatantista Boehringer Manneheim GmbH:n GOD-Perid -menetelmään perustuvalla glukoositestillä (No 124 028) ja laktaattipitoisuus saman valmistajan laktaattitestillä (No 124 842).

Kloridi-pitoisuus määritettiin Radiometer CMT 10 coulometrisellä automaattititraajalla.

Kalium- ja natriumpitoisuus määritettiin EEL 100 liekkifotometrillä. Määrityksiä varten supernatanttia laimennettiin tislatusella vedellä siten, että K^+ -määrityksen osalta näytteen lopullinen laimennussuhde oli 1:100 ja Na^+ -määrityksen osalta 1:2000.

Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuudet määritettiin Perkin-Elmer 303-atomiabsorbtiiospektrofotometrillä. Määritystä varten supernatanttia laimennettiin 0,1 % lantaaniliuoksella 1:200, joten näytteen lopullinen laimennussuhde oli 1:800.

2.5.5 Vahvaionipitoisuuserotus

Vahvojen emäskationien ja happoanionien pitoisuuksien välinen erotus (Strong Ion Concentration Difference = SID) laskettiin määritetyistä pitoisuuksista seuraavasti: $SID = [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}] + [Na^+] + [K^+] - [Cl^-]$ *

2.5.6 Käytetyt vakio- ja vertailuliuokset

Kokonaisvalkuuaisainemäärityksissä käytettiin vertailuliuokseksi Merz + Dade AG:n Lab-Trol. -vertailuseerumia, jonka kokonaisvalkuuaisainepitoisuus on $73,3 \text{ g l}^{-1}$. Ionipitoisuusmäärityksissä varsinaisena vertailuliuoksena käytettiin Merck'in Titrisole -vakioliuosta. Sen lisäksi kaikissa määrittelyssarjoissa oli mukana muutamia näytteen kanssa identtisesti käsiteltyjä Lab-Trol. -vertailuseeruminäytteitä.

2.5.7 Akvaarioveden pH:n ja happikyllästeisyyden määrittely

Akvaarioveden pH määritettiin Beckman H 2 pH -mittarilla ja happipitoisuus Schott Geräte 867 -happimittarilla mg l^{-1} :na.

2.6 Aineiston tilastollinen käsittely

Analyysitulokset on ilmoitettu ryhmien keskiarvoina ja keskiarvon keskivirheinä. Ryhmien välisten erojen tilastolli-

nen merkitsevyys testattiin Studentin t-testillä. Vertailuryhmän ja hypoksiaryhmän laktaattipitoisuuksien välisen erotuksen tilastollisen merkitsevyyden testaamiseen käytettiin Mann-Whitney U-testiä, koska hypoksiaryhmän laktaattipitoisuudet näyttivät selvästi poikkeavan normaalijakautumasta. Eri parametrien muutosten välillä havaitut riippuvuudet varmennettiin korrelaatioanalyysillä.

3. AINEISTON JA MENETELMIEN TARKASTELU

3.1 Koe-eläinten koko

Koe-eläinten koko altistusryhmittäin ilmenee taulukosta 1. Vaikka eläimet jaettiin ryhmiin sattumanvaraisesti, voidaan ryhmien välillä havaita vähäisiä eroja: ryhmässä 2 (hypoksia-altistus) naaraat olivat jokseenkin merkitsevästi ($P < 0,05$) vertailuryhmän yksilöitä suurempia. Ryhmässä 4 (samaaikainen hypoksia- ja happamuusaltistus) naaraat olivat jokseenkin merkitsevästi koiraita suurempia. Yhtä merkitsevästi ne olivat myös vertailuryhmän yksilöitä suurempia. Koska kaikki yksilöt olivat sukukypsiä, on luultavaa, ettei kokoeroilla ole suurta vaikutusta testituloksiin. Tosin KALMUS (1930) on havainnut hapenkulutuksen painoyksikköä kohti vähenevän eläimen koon suuretessa.

Taulukko 1. Rapujen koko koeryhmissä.

Koeryhmä	Selkäkilven pituus				Paino			
	mm $\bar{x} \pm \text{SEM}$				g $\bar{x} \pm \text{SEM}$			
	♂	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀
1. Vertailuryhmä hapekas vesi	43,4 ± 0,4		43,6 ± 1,0		19,3 ± 0,4		20,3 ± 1,2	
2. Vähähappinen vesi ¹⁾	44,1 ± 0,6		46,5 ± 0,9		21,1 ± 0,7		24,5 ± 1,4	
3. Hapan vesi	43,4 ± 0,5		45,0 ± 0,9		20,0 ± 0,8		21,7 ± 1,2	
4. Vähähappinen hapan vesi ²⁾	42,7 ± 1,3		48,2 ± 1,4		18,2 ± 1,3		24,5 ± 2,0	

1) Ryhmän naaraat suurempia kuin vertailuryhmän yksilöt, ero jokseenkin merkitsevä (P<0,05).

2) Ryhmässä sukupuolten välinen ero jokseenkin merkitsevä (P<0,05). Ryhmän naaraat vertailuryhmän yksilöitä suurempia, ero jokseenkin merkitsevä (P<0,05).

3.2 Koelämpötila

Koska yksittäisen näytteen käsittely välittömästi näytteenoton jälkeen kesti n. 40 minuuttia, kaikkia ryhmiä ei voitu altistaa samanaikaisesti. Koko koesarjan suorittaminen kesti 25 vuorokautta. Tänä aikana veden lämpötila laski +12,0 °C:sta +10,0 °C:een. Vain hypoksia-altistus tapahtui tarkalleen vertailuryhmän lämpötilassa. Tällä lämpötila-alueella rapujen hapenkulutuksen muutos lämpöastetta kohti on kuitenkin vähäinen (KALMUS 1930, RUTLEDGE ja PRITCHARD 1981).

3.3 Akvaarioveden happikyllästeisyys ja happamuus altistusten aikana

Veden happikyllästeisyyden säätelyyn käytetty kuplitusmenetelmä ei ole aivan luotettava. Vaikka tarkistuksia suoritettiin useita kertoja päivässä, veden happipitoisuus vaihteli. Hypoksia-altistuksessa happikyllästeisyys jäi keskimäärin tavoiteltua, 30 %:a, pienemmäksi ja happaman veden hypoksia-altistuksessa se oli keskimääräistä tavoitetta suurempi. pH-vaihteluissa ei näiden kahden ryhmän välillä ollut merkitsevää eroa.

Hieman lievemmästä hypoksia-asteesta huolimatta happaman veden hypoksia-altistuksen aiheuttamat muutokset hemolymfan koostumuksessa olivat paljon suurempia kuin pelkän hypoksia- tai happamuusaltistuksen aiheuttamat muutokset. Tästä syystä tulosten tarkastelussa tehtyjä johtopäätöksiä voitaneen pitää perusteltuina.

3.4 Näytteenotto ja -käsittely

Hemolymfanäytteet otettiin ilmassa, kosteaan paperipyyhkeeseen kääritystä ravusta. Ilmasta kiduksen kautta diffundoituvan hapen vaikutuksen minimoimiseksi näyte otettiin minuutin kuluessa siitä, kun rapu oli nostettu vedestä. Näyte otettiin prebranchiaalisinuksesta, jonne "tympeä" lymfa kerääntyy kiertonsa viime vaiheessa ennen hapettumistaan uudelleen kiduksessa. TRUCHOT (1973) on testannut ilmassa tapahtuvan näytteenoton vaikutusta Carcinus maenas -tasukuravun prebranchiaalilymfan pH-arvoon ja todennut, että jos eläintä ei pidetä ilmassa 2 minuuttia pitempään, ei pH muutu.

Osa näytteestä jouduttiin sentrifugoimaan näytteen hyytymisen ehkäisemiseksi. Sentrifugoinnin aikana näytteen pintakerroksen hapettumista ei voitu kokonaan välttää. Se ilmeni lymfan pintakerroksen värimuutoksena. pH-näyte otettiin tämän kerroksen alapuolelta. Vertailun vuoksi pH määritettiin muutamista näytteistä suoraan injektioruiskusta. Näiden näytteiden ja sentrifugoitujen näytteiden välillä ei havaittu pH-eroa. Koska suoraan injektioruiskusta otettu näyte ehti toisinaan hyytyä pH-määritysten aikana, oli tästä määrittäytavasta luovuttava.

3.5 Vertailuryhmän puolittaminen

Vertailuryhmästä otetut näytteet otettiin kahdessa erässä. Puolesta ryhmän rapuja näyte otettiin koesarjan alkaessa, kun veden tulo akvaarioon keskeytettiin. Ryhmän toisesta puoliskosta näyte otettiin 7 vrk:n kuluttua. Tällä menetelmällä haluttiin selvittää, vaikuttaako koesarjan suorittaminen seisovassa vedessä analyysituloksiin. Tilastollisessa vertailussa ryhmän puolikkaiden välillä ei havaittu yhtään merkitsevää eroa, joten tuloksia käsiteltiin yhtenä ryhmänä.

3.6 Näytteenoton jakaminen kahdelle päivälle

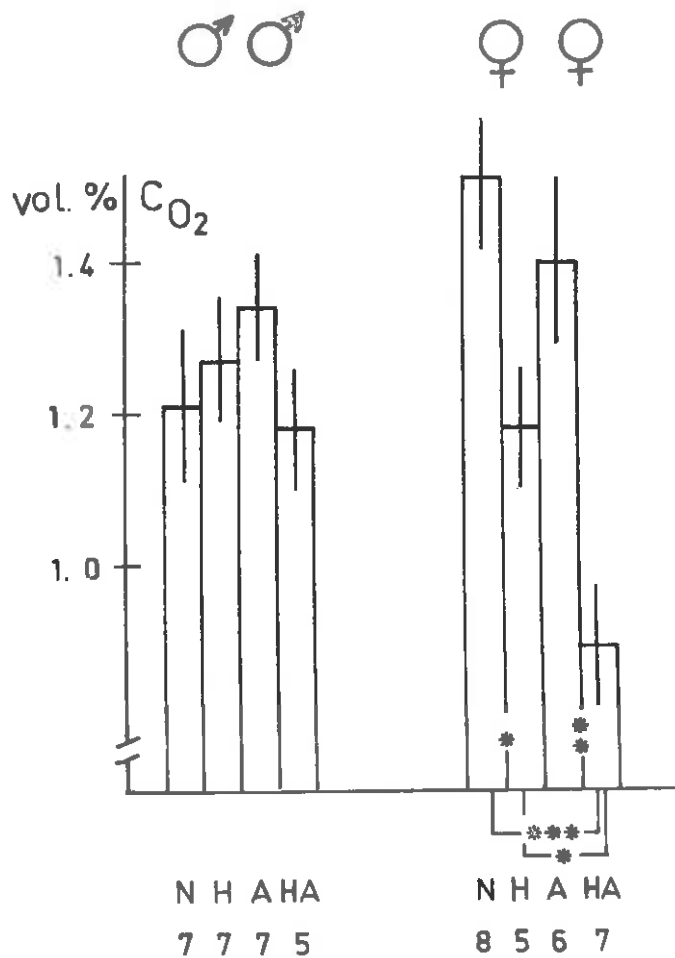
Muiden ryhmien osalta näytteenotto jakautui altistuksen lopussa kahdelle peräkkäiselle päivälle, koska näytteiden käsittely ja välittömästi tehdyt analyysit veivät niin paljon aikaa, ettei koko ryhmän näytteitä ehditty ottaa yhden päivän kuluessa.

4. TULOKSET

Neljässä koeryhmässä seurattujen fysiologisten parametrien analyysitulokset on esitetty kuvissa 4-14 ja liitteessä 1. Testatut vedenlaadun muutostilat, vähähappisuus (hypoksia) ja happamuus, aiheuttivat sekä erillisinä että yhdessä monia muutoksia rapujen hemolymfan ominaisuuksiin ja koostumukseen. Tulokset esitellään määritetyissä parametreissa havaittuina muutoksina, parametrien välillä havaittujen keskinäisten riippuvuussuhteiden mukaisesti ryhmiteltyinä.

4.1 Hemolymfan happikapasiteetti sekä kokonaisvalkuaisaine- ja Cu^{2+} -pitoisuus

Vertailuryhmän eli hapekkaan veden ryhmän naaraiden hemolymfan happikapasiteetti oli jokseenkin merkitsevästi ($P < 0,05$) koiraiden kapasiteettia suurempi (kuva 4, taulukko 2). Myös veden laadun muutosten aikaansaamat kapasiteetin muutokset ilmenivät naaraissa suurempina. Hypoksisessa vedessä naaraiden lymfan happikapasiteetti pieneni jokseenkin merkitsevästi ja erittäin merkitsevästi ($P < 0,001$), kun veden pH:ta samanaikaisesti alennettiin. Happamuusaltistus yksinään ei muuttanut merkitsevästi lymfan happikapasiteettia. Koiraisissa hypoksia, samoin kuin happamuuskin, lisäsivät lievästi lymfan happikapasiteettia. Vain yhtäaikainen hypoksia- ja happamuusaltistus pienensi kapasiteettia hienman. Mikään näistä muutoksista ei ollut kuitenkaan tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 4. Ravun hemolympfan happikapasiteetti (CO_2 ; vol.% = til.-%) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. N (normoxia) = vertailuryhmä eli hapekkaan veden ryhmä; H (hypoxia) = vähähappisen eli hypoksisen veden ryhmä. A (acid water) = happaman veden ryhmä; HA (hypoxic acid water) = vähähappisen happaman veden ryhmä. Pylvään korkeus ilmaisee ryhmän keskiarvon ja jana pylvään päässä keskiarvon keskivirheen. Ryhmien välisten erojen tilastollinen merkitsevyys on määritetty t-testillä (***) $P < 0,001$, erittäin merkitsevä; **) $P < 0,01$, merkitsevä; *) $P < 0,05$, jokseenkin merkitsevä). Ryhmäsymbolin alapuolella oleva luku ilmaisee näytteiden lukumäärän ryhmässä.

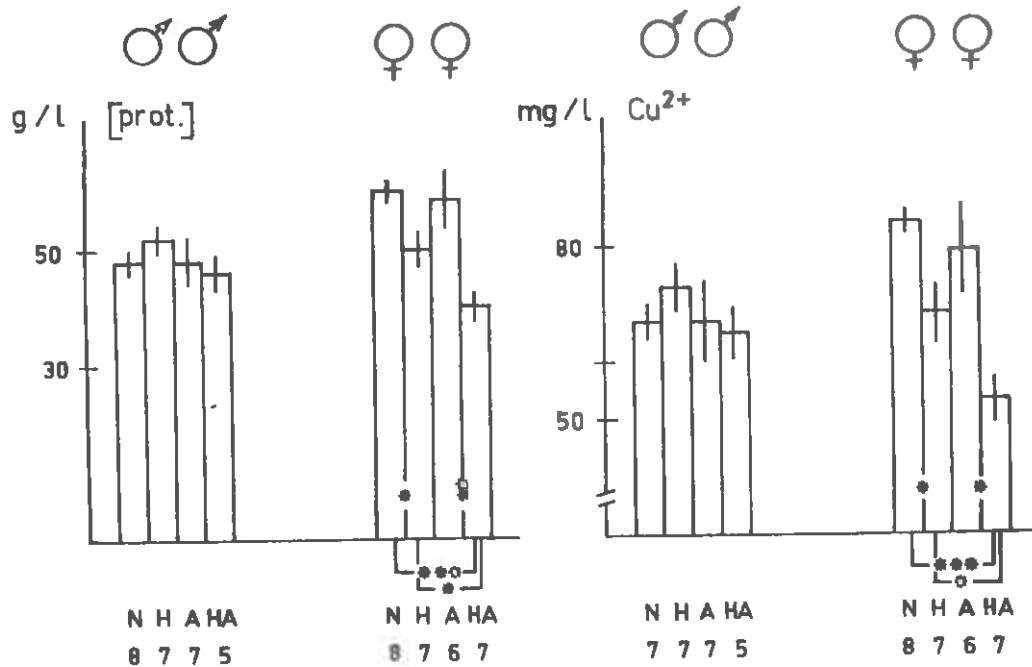
Hemolymfan kokonaisproteiini- ja kuparipitoisuuden muutokset olivat kummankin sukupuolen osalta hyvin samanlaiset kuin edellä esitetyt happikapasiteetin muutokset (kuva 5). Näiden kolmen parametrin välillä todettiin erittäin merkitsevä positiivinen korrelaatio (kuvat 6 ja 7). Niinpä minkä tahansa niistä voidaan katsoa ilmentävän lymfan hengityspigmentin määrää ja sen muutoksia, vaikka hemosyaniinipitoisuutta sinänsä ei määritettykään tässä tutkimuksessa.

Valkuaisainegrammaa kohden laskettuna kuparipitoisuus oli naaraiden lymfassa $1,37 \pm 0,06$ mg ja koiraiden lymfassa $1,39 \pm 0,06$ mg. Eri ryhmien välillä ei ollut merkitseviä eroja.

4.2 Hemolymfan happiaffiniteetti eli hapensitomiskyky

Hemolymfan happiaffiniteetti määritettiin P_{50} -arvona. Arvo ilmaisee sen hapen osapaineen, jossa lymfa on 50-prosenttisesti hapen kyllästämä. Toisin sanoen, mitä pienempi P_{50} -arvo on, sitä tehokkaammin lymfa sitoo happea.

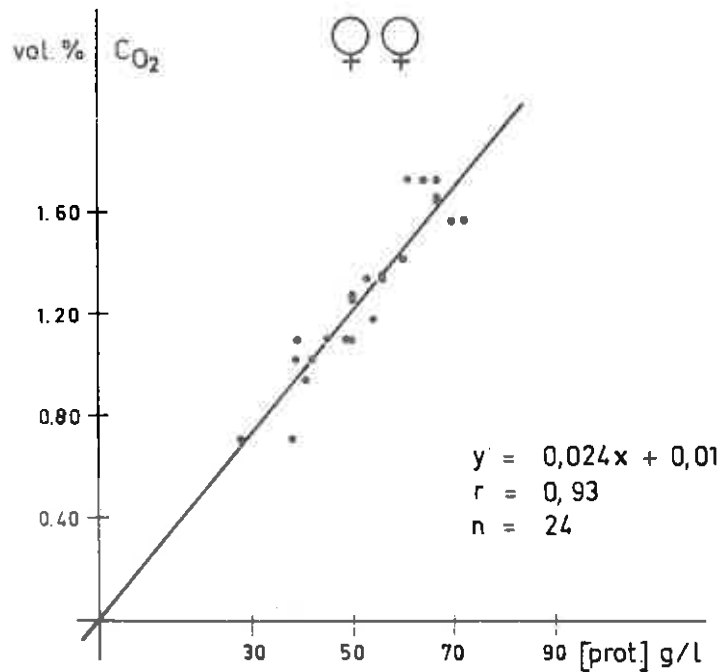
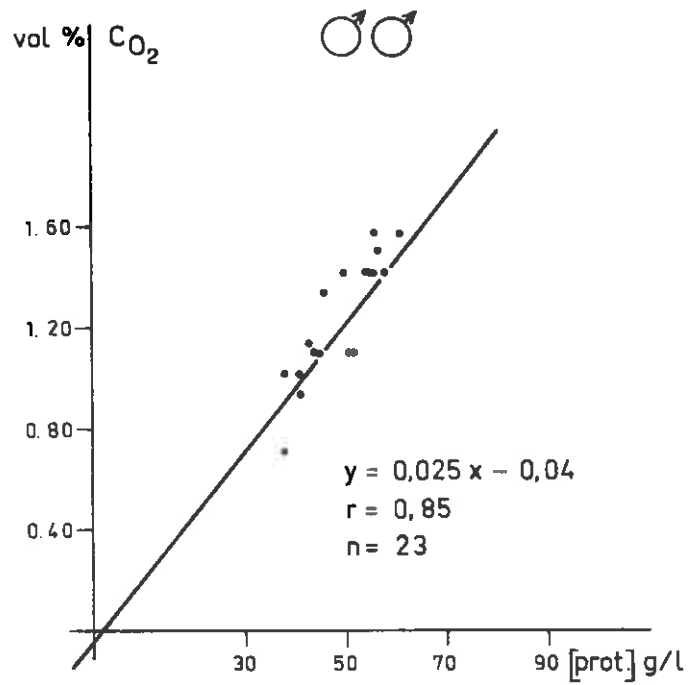
Hypoksia-altistuksessa sekä naaraiden että koiraiden hemolymfan happiaffiniteetti suureni merkitsevästi (kuva 8). Koiraiden osalta muutos oli erittäin merkitsevä ($P < 0,001$). Happamuusaltistus yksinään ei muuttanut naaraiden lymfan happiaffiniteettia, koiraisissa affiniteetti hieman suureni. Kun vesi oli samanaikaisesti sekä hypoksista että hapanta, ei pelkän hypoksia-altistuksen aikaansaamaa lymfan happiaffiniteetti-



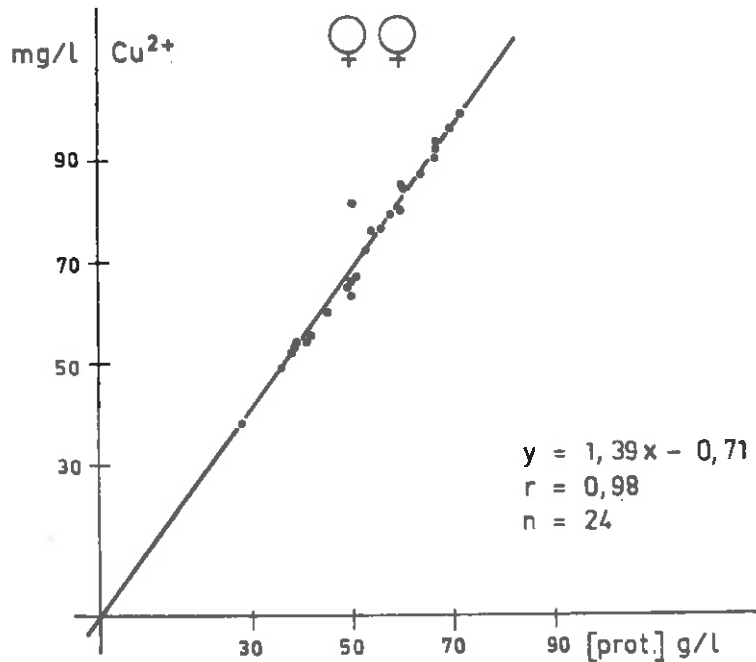
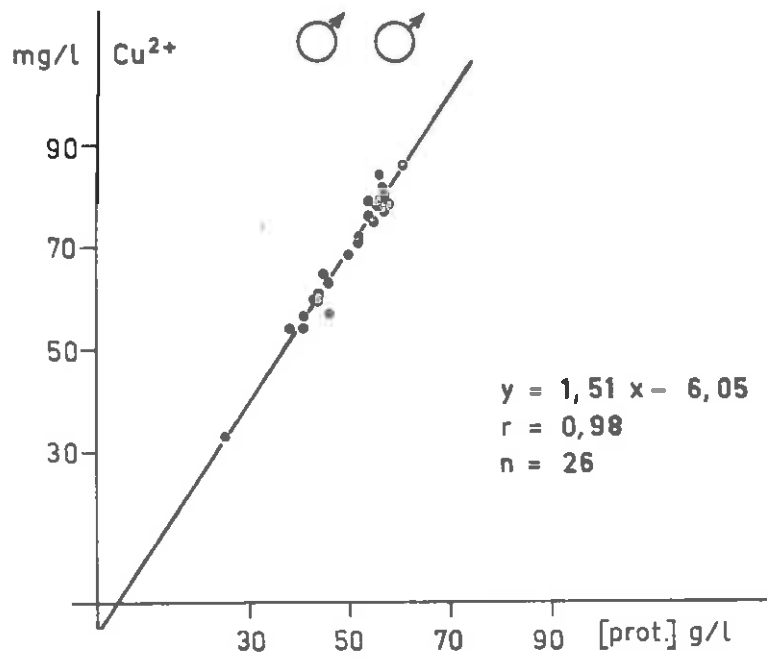
Kuva 5. Ravun hemolympfan kokonaisvalkuaisaine (prot. g/l) ja Cu²⁺ -pitoisuus (mg/l) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.

Taulukko 2. Sukupuolten välisten erojen tilastollinen merkitsevyys hemolympfasta määritettyjen fysiologisten suureiden keskiarvojen välillä eri koeryhmissä. (***)P<0,001, (**P<0,01, *)P<0,05, (o P<0,1, - ei merkitsevää eroa). Erojen tilastollinen merkitsevyys on testattu t-testillä.

Koeryhmä	CO ₂	prot.	Cu ²⁺	P ₅₀	Ca ²⁺	Mg ²⁺	lact.	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	SID	pH	gluc.
Vertailuryhmä hapekas vesi	*	***	***	-	**	**	-	-	-	*	***	*	-
Vähähappinen vesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hapan vesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vähähappinen hapan vesi	*	-	*	*	o	-	-	-	-	o	-	-	-



Kuva 6. Ravun hemolympfan happikapasiteetin ja kokonaisvalkuaisainepitoisuuden välinen korrelaatio kummankin sukupuolen osalta erikseen. Regressiosuoran lisäksi kuvassa esitetään suoran yhtälö, korrelaatiokerroin (r) ja pisteparien lukumäärä (n). Parametrien välillä todettiin erittäin merkitsevä positiivinen korrelaatio ($P < 0,001$).



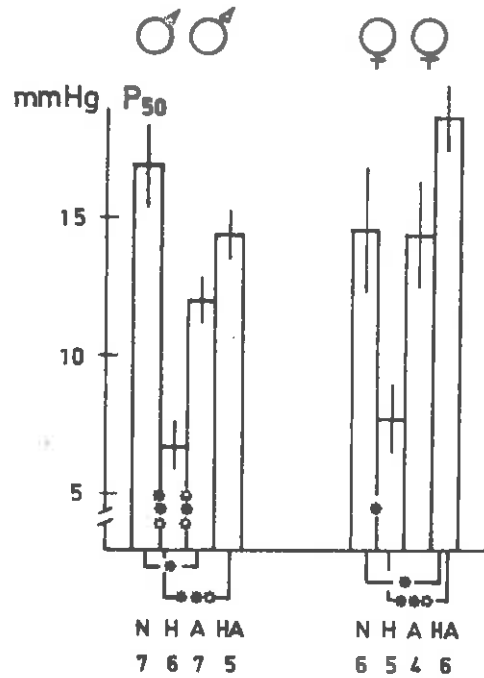
Kuva 7. Ravun hemolympfan kuparipitoisuuden ja kokonaisvalkuaisainepitoisuuden välinen korrelaatio kummankin sukupuolen osalta erikseen. Parametrien välillä todettiin erittäin merkitsevä positiivinen korrelaatio ($P < 0,001$).

tin suurenemista voitu todeta. Päinvastoin, naaraiden hemolymfan happiaffiniteetti pieneni merkitsevästi ($P < 0,05$). Koiraiden lymfassa ei tapahtunut merkittävää muutosta.

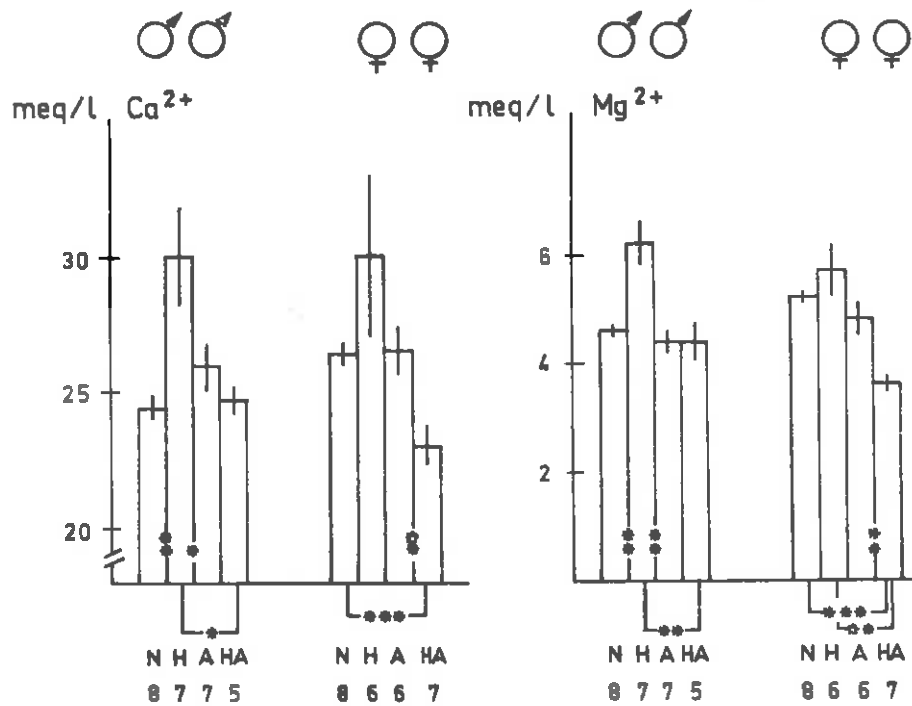
4.3 Hemolymfan kalsium-, magnesium- ja laktaattipitoisuus

Normoksisessa vertailuryhmässä naaraiden hemolymfan kaksiarvoisten ionien, Ca^{2+} :n ja Mg^{2+} :n, pitoisuudet olivat merkitsevästi ($P < 0,01$) koiraiden pitoisuuksia suuremmat. Hypoksia- ja happamuusaltistusten aiheuttamat muutokset olivat kummassakin sukupuolella jokseenkin samanlaiset (kuva 9): hypoksisessa ympäristössä pitoisuudet suurenivat; happamassa ympäristössä ne säilyivät lähes ennallaan. Samanaikaisesti vähähappinen ja hapan ympäristö aiheutti naaraiden lymfassa Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuuksien erittäin merkitsevän pienenemisen, eli pelkän hypoksian vaikutukselle päinvastaisen muutoksen. Koiraisissa, joiden lähtöarvot olivat alhaisemmat, ei tapahtunut havaittavaa pitoisuuksien muutosta.

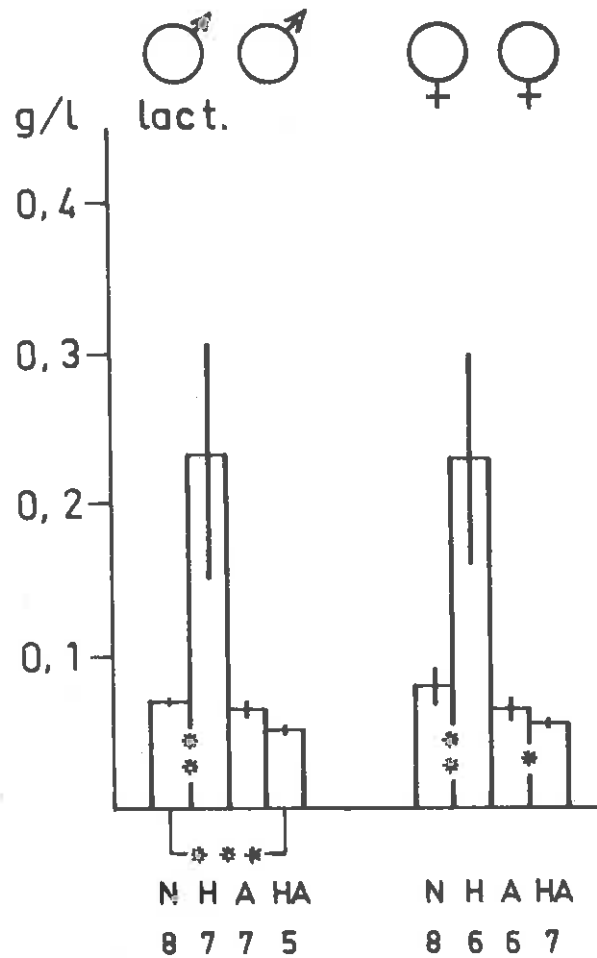
Hemolymfan laktaattipitoisuuden muutokset olivat samansuuntaiset kuin Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuuksien muutokset. Muutokset olivat kummankin sukupuolen osalta samanlaiset (kuva 10): hypoksiaryhmässä pitoisuus suureni merkitsevästi; happamuusaltistus aiheutti pitoisuuden vähäisen pienenemisen ja samanaikaista hypoksia- ja happamuusaltistusta seurasi pitoisuuden pieneneminen edelleen. Vertailuryhmään nähden muutos oli koiraisissa erittäin merkitsevä.



Kuva 8. Ravun hemolymfän P₅₀ -arvo (mmHg) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.



Kuva 9. Ravun hemolymfän Ca²⁺- ja Mg²⁺ -pitoisuudet (meq/l) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.



Kuva 10. Ravun hemolympfan laktaattipitoisuus (g/l) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.

Koska hypoksiaryhmästä määritetyt lymfan laktaattipitoisuudet eivät noudattaneet normaalijakautumaa, käytettiin niiden ja vertailuryhmästä määritettyjen laktaattipitoisuuksien välisen eroavuuden tilastolliseen testaamiseen Mann-Whitney U -testiä.

Ca^{2+} -, Mg^{2+} - ja laktaattipitoisuuksien havaittiin olevan verrannollisia hemolymfan hapensitomiskykyyn. Riippuvuutta kuvaa seuraava yhtälö:

$$1/P_{50} = 0.042 (\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{laktaatti}) - 0,637$$

$$r = 0,774, \quad P < 0,001, \quad n = 45$$

4.4 Hemolymfan yksiarvoiset ionit: K^+ , Na^+ ja Cl^-

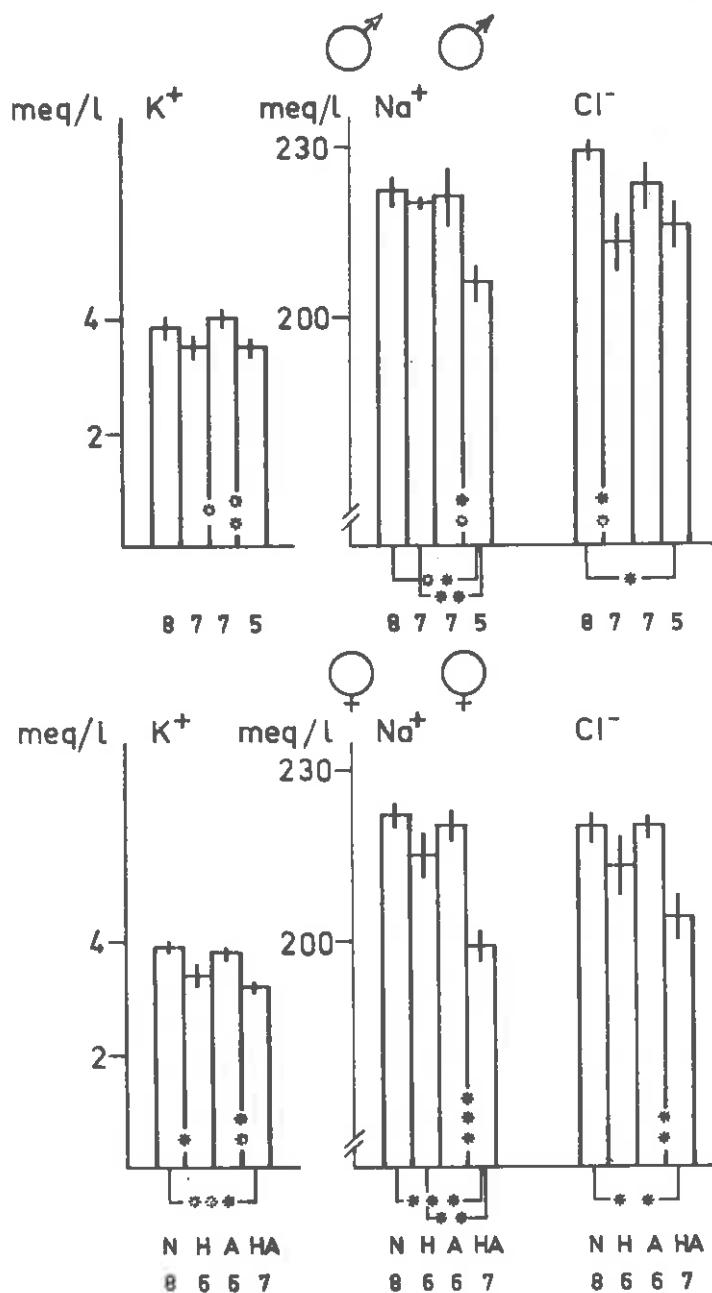
Päinvastoin kuin kaksiarvoisten kationien pitoisuudet, yksiarvoisten kationien pitoisuudet pienenevät hypoksia-altistuksen seurauksena. Kaliumpitoisuuden muutokset olivat kummankin sukupuolen hemolymfassa samanlaiset, joskin naaraiden lymfassa suuremmat (kuva 11). Hypoksia-altistuksen vaikutuksesta pitoisuus pieneni, mutta vain naaraissa merkitsevästi ($P < 0.05$). Happamuusaltistus ei aiheuttanut muutoksia, mutta yhtäaikaisena hypoksia-altistuksen kanssa se vahvisti hypoksia-altistuksen aikaansaamia muutoksia: lymfan kaliumpitoisuus pieneni enemmän kuin pelkän hypoksian seurauksena. Naaraissa muutos oli erittäin merkitsevä ($P < 0,001$).

Hemolympfan natriumpitoisuuden muutokset olivat kaliumpitoisuuden muutosten kaltaisia, joskin suurempia (kuva 11). Hypoksia-altistuksen seurauksena lymfan natriumpitoisuus pieneni jonkin verran. Samanaikainen happamuusaltistus vahvisti muutosta merkitsevästi ($P < 0.01$) niin, että vertailuryhmään nähden pitoisuus pieneni koiraiden lymfassa merkitsevästi ($P < 0.01$) ja naaraiden lymfassa erittäin merkitsevästi ($P < 0.001$). Pelkkä happamuusaltistus ei aiheuttanut muutoksia lymfan natriumpitoisuudessa.

Hemolympfan kloridipitoisuuden muutokset noudattivat pääpiirteiltään natriumpitoisuuden muutoksia (kuva 11). Koiraiden osalta pelkkä hypoksia-altistus riitti pienentämään lymfan Cl^- -pitoisuutta merkitsevästi ($P < 0.01$), eikä samanaikainen veden happamoituminen enää suurentanut muutosta. Naaraissa hypoksian aiheuttama vähäinen lymfan Cl^- -pitoisuuden pieneneminen tuli merkitseväksi vasta kun vesi oli samanaikaisesti hapanta. Pelkkä happamuusaltistus ei aiheuttanut muutoksia kummankaan sukupuolen hemolympfan kloridipitoisuuksissa.

4.5 Hemolympfan pH

Vertailuryhmän naaraiden hemolympfan pH oli jokseenkin merkitsevästi ($P < 0.05$) koiraiden lymfan pH-arvoa suurempi (kuva 12). Hypoksia-altistuksessa koiraiden lymfan pH nousi merkitsevästi ($P < 0.01$) ylittäen naaraiden lähtötason. Naaraissa ei tapahtunut muutosta. Happamuusaltistus johti pH:n laskuun kummankin sukupuolen lymfassa, mutta vain naa-



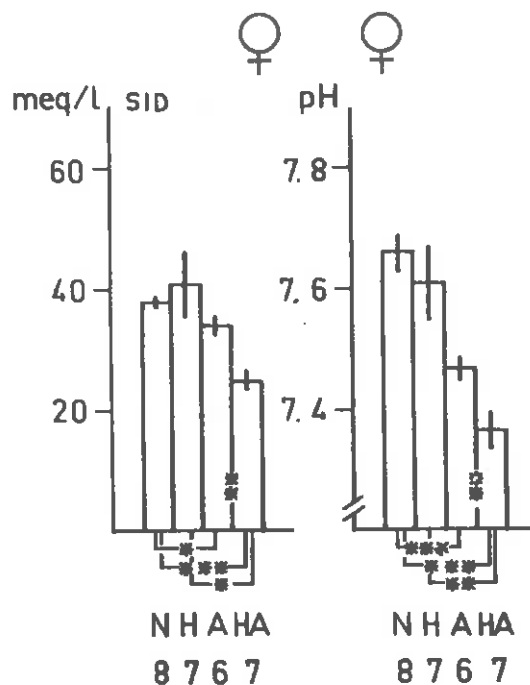
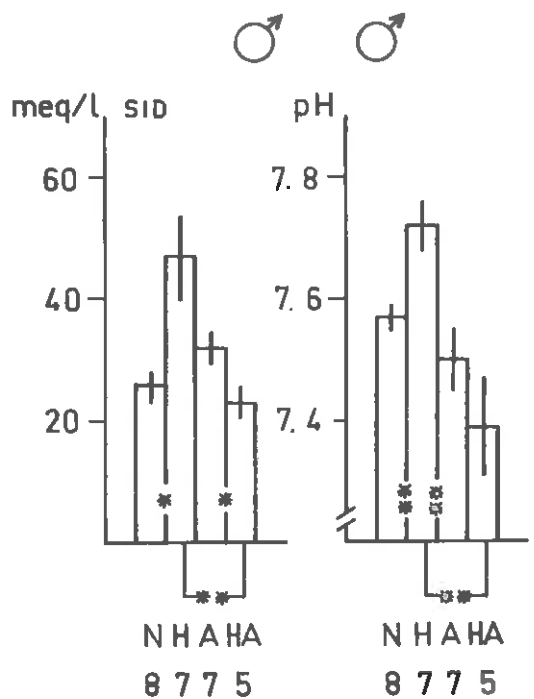
Kuva 11. Ravun hemolympfan K⁺-, Na⁺- ja Cl⁻-pitoisuudet (meq/l) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.

raissa, joiden lähtötaso oli ollut korkeampi, muutos oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,001$). Yhtäaikaisen hypoksia- ja happamuusaltistuksen seurauksena lymfan pH aleni edelleen, naaraiden osalta muutos vertailuryhmään nähden oli erittäin merkitsevä ($P < 0,001$).

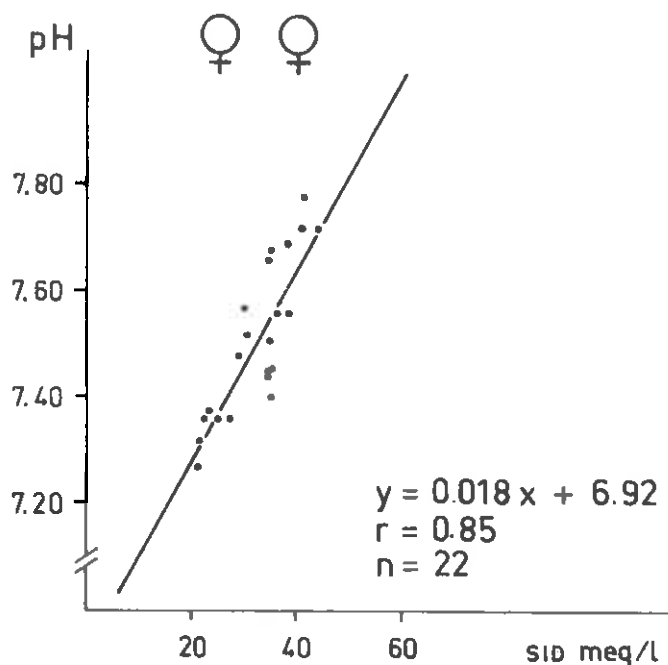
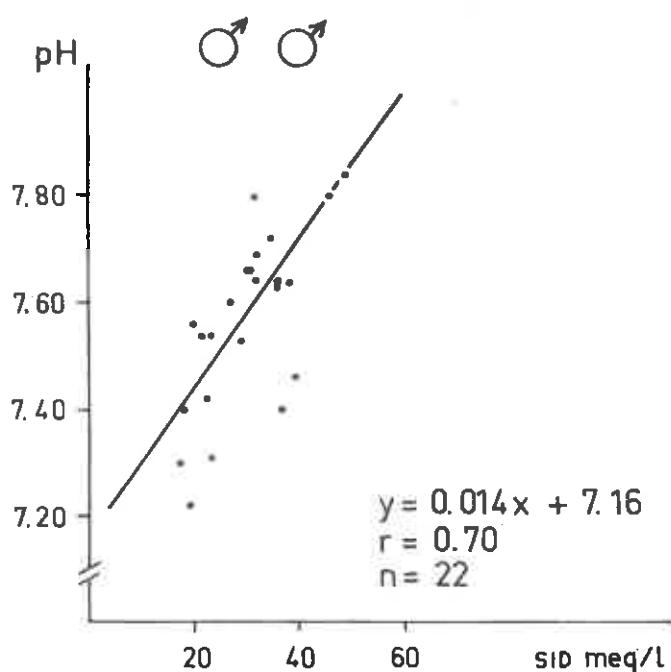
4.6 Hemolymfan vahvaionipitoisuuserotus

Hemolymfasta määritettyjen vahvojen emäskationien: Ca^{2+} :n, Mg^{2+} :n ja K^+ :n ja Na^+ :n ja vahvan happoanionin, Cl^- :n pitoisuuksien erotus SID (Strong Ion Concentration Difference) oli vertailuryhmän naaraisissa erittäin merkitsevästi ($P < 0,001$) suurempi kuin koiraisissa (kuva 12). Hypoksiassa erotus suureni. Alhaisemmasta lähtötasosta johtuen muutos oli koiraisissa tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,05$). Erotuksen suureneminen aiheutui lymfan Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuuksien suurenemisesta ja Cl^- -pitoisuuden pienenemisestä hypoksisessa vedessä. Happamuusaltistuksen seurauksena erotus pieneni naaraisissa ja se oli pienimmillään yhtäaikaisen happamuus- ja hypoksia-altistuksen jälkeen otetuissa näytteissä. Normoksiseen vertailuryhmään nähden erotus oli tällöin erittäin merkitsevästi pienempi. Erotuksen pieneneminen aiheutui kaikkien kationien, mutta erityisesti erittäin merkitsevästä Na^+ :n pitoisuuden pienenemisestä.

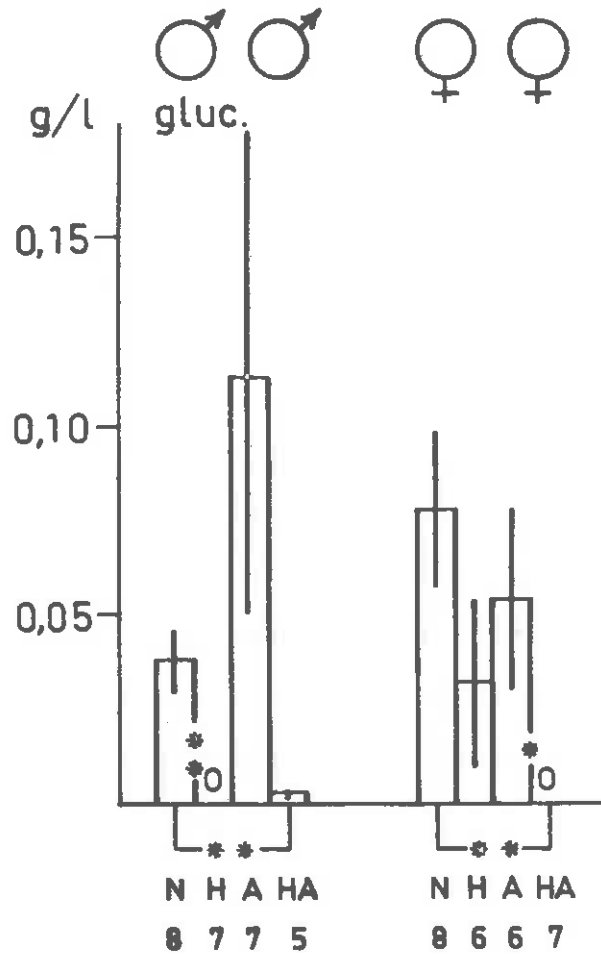
Vahvojen ionien pitoisuuksien erotuksen ja lymfan pH:n muutosten välillä havaittiin erittäin merkitsevä positiivinen korrelaatio (kuva 13).



Kuva 12. Ravun hemolympfan vahvaionipitoisuuserotus (SID, kationit-anionit) ja pH eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.



Kuva 13. Ravun hemolympfan pH:n ja vahvaionipitoisuusero-
tuksen välinen korrelaatio kummankin sukupuolen osalta
erikseen. Vertailuaineistosta puuttuvat ne hypoksiaryh-
män ravut (2 koirasta ja 1 naaras), joiden lymfan lak-
taattipitoisuus oli poikkeuksellisen suuri. Parametri-
en välillä todettiin erittäin merkitsevä positiivinen korre-
laatio ($P < 0,001$).



Kuva 14. Ravun hemolyμφan glukosipitoisuus (g/l) eri koeryhmissä kummankin sukupuolen osalta erikseen. Selitykset kuten kuvassa 4.

4.7 Hemolymfan glukoosipitoisuus

Hemolymfan glukoosipitoisuus vaihteli ryhmien yksilöiden välillä suuresti (kuva 14). Hypoksia-altistuksella todettiin olevan pitoisuuksia pienentävä vaikutus sekä neutraalissa että happamassa vedessä. Suuresta osasta näiden ryhmien rapuja ei määrittäminen menetelmä paljastanut glukoosia ollenkaan.

5. TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Sukupuolten väliset erot

Tässä tutkimuksessa jokainen koeryhmä muodostui yhtä suuresta koiras- ja naarasryhmästä. Kummankin sukupuolen osalta myös tulokset on esitetty erikseen, koska aikaisempien näytteenottojen yhteydessä oli havaittu Astacus astacus -ravun hemolymfan koostumuksessa huomattavia sukupuolten välisiä eroja (JÄRVENPÄÄ ym. 1979). Myös GONDKO ym. (1981) ovat todenneet lymfan koostumuksessa sukupuolten välisiä eroja Astacus astacus-, A. leptodactylus- ja Orconectes limosus -lajeista heinäkuun lopulla ottamissaan näytteissä.

ANDREWSin (1967) laajassa, eri vuodenaikoina kerätyssä aineistossa ei sen sijaan ole havaittu merkittäviä eroja sukupuolten välillä Orconectes limosus -lajin lymfassa.

Todettujen sukupuolten välisten erojen tilastollinen merkitsevyys on esitetty taulukossa 2 sivulla 23. Erot olivat suurimmil-

laan normoksisessa vertailuryhmässä: hengityspigmentin määrä (proteiini- ja Cu^{2+} -pitoisuus) sekä lymfan happikapasi-
teetti olivat naaraiden lymfassa huomattavasti suuremmat kuin koiraiden lymfassa. SPOEK (1974) on osoittanut, että hummerin, Homarus gammarus, aerobinen toiminta-alue (Scope for Activity) on suoraan verrannollinen hemolymfan hemosyaniinin määrään. Toisin sanoen, mitä suurempi hemolymfan hemosyaniinipitoisuus on, sitä suurempaan toimintojen lisäämiseen eläimellä on mahdollisuus hapenkulutustaan lisäämällä. Vastaavanlainen riippuvuus on osoitettu täpläravun, Pacifastacus leniusculus, lymfan hemosyaniinipitoisuuden ja aerobisen suorituskyvyn välillä (RUTLEDGE 1981b).

Rapunaaraiden suurempi hengityspigmentin määrä näyttää takaavan niille koiraita paremmat edellytykset suurempaan aktiivisuuteen. Siitä, mihin naaraat tätä valmiuttaan tarvitsevat, ei ole tietoja. Tällaisia toimintoja saattaisivat olla munien kehittyminen ovarioissa ja muninta, joka tapahtuu syksyllä. Naaraat myös kuljettavat pyrstön alle kiinnittyneitä munia mukanaan usean kuukauden ajan ja "tuulettavat" niitä liikuttamalla pleopodejaan viuhkan tavoin.

Naaraiden lymfan Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuudet ovat koiraiden pitoisuuksia merkitsevästi suurempia. Suuremmasta Ca^{2+} ja Mg^{2+} -pitoisuudesta ja pienemmästä Cl^- -pitoisuudesta johtuen vahvaionipitoisuuserotus oli naaraiden lymfassa erittäin merkitsevästi suurempi kuin koiraiden lymfassa. Samoin naaraiden lymfan pH oli merkitsevästi koiraiden lymfan pH:ta korkeampi.

Taulukosta 2. ilmenee, että testatut vedenlaadun muutokset pienentävät sukupuolten välisiä eroja. Tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaita hypoksisen eikä happaman veden ryhmissä. Näyttää siltä, että näillä ympäristön muutoksilla on rapujen elintoimintoja yhdenmukaistava vaikutus; ulkoisten olosuhteiden muutokset puristavat ravut fysiologisesti ahtaampiin puitteisiin.

Kun olosuhteet vaikeutuivat edelleen, eli kun vesi oli samanaikaisesti sekä hypoksista että hapanta, ilmeni sukupuolten välillä jälleen eroavuuksia. Lymfan happikapasiteetti ja -affiniteetti pienenevät sekä hengityspigmentin määrä väheni naaraissa merkitsevästi enemmän kuin koiraisissa. Normaalioloissa naarailla näyttäisi siis olevan enemmän aerobista liikkuma-alaa kuin koiraille, mutta ne ovat näitä herkempiä ympäristön muutoksille.

5.2 Sopeutuminen veden vähähappisuuteen

Täysin happikyllästeisenäkin vesi sisältää vain murto-osan ilman sisältämän hapen määrästä. Erilaisten biologisten ja kemiallisten toimintojen seurauksena veden happipitoisuus voi pienetä huomattavasti ja veteen liuennutta happea hengittävien eläinten hapenotto ja -kuljetus kudoksiin vaikeutuvat. Kudosten riittävän hapensaannin turvaaminen hypoksiatilanteessa on johtanut erilaisiin sopeutumisilmiöihin, jotka vaihtelevat lajeittain ja samankin lajin kohdalla hy-

poksia-asteen ja sen keston mukaan. Yksinkertaisin Decapodeista kuvattu sopeutumismalli on eläimen inaktivoituminen ja siitä aiheutuva hapenkulutuksen väheneminen veden happipitoisuuden pienetessä.

BRIDGES ja BRAND (1980) ovat todenneet kahta merirapua, Galathea strigosa ja Corystes cassivelanus, tutkiessaan niiden hapenkulutuksen vähenevän ja aineenvaihdunnan hidastuvan hypoksisessa ympäristössä normaalia lepotasoa alhaisemmaksi. McMAHON ja WILKENS (1975) ovat todenneet hummerin, Homarus americanus, hapenkulutuksen vähenevän lyhytaikaisen hypoksia-altistuksen aikana. TAYLOR (1976) on osoittanut Carcinus maenas -taskuravun hapenkulutuksen vähenevän 10-25 % hypoksisessa ympäristössä. MOSHIRI ym. (1970) havaitsivat normaalisti hyvin happipitoisessa vedessä elävän täpläravun, Pacifastacus leniusculus, hengitysliikkeiden hidastuvan ja hapenkulutuksen pienevän vähähappisessa vedessä (O_2 -kyll. 35 %, T 20 °C).

Hapenkulutus voi pienetä vain tilapäisesti ja auttaa eläintä selviytymään lyhytaikaisesta hypoksiatilanteesta. Aineenvaihdunta tapahtuu tällöin huomattavalta osin anaerobisesti. Kun ympäristön happipitoisuus palautuu normaaliksi, anaerobiset aineenvaihduntatuotteet hapetetaan loppuun. Hypoksiatilannetta seuraakin usein hapenkulutuksen voimakas, normaalitason ylittävä suureneminen (McMAHON ja WILKENS 1975, TAYLOR 1976, BRIDGES ja BRAND 1980).

Toinen tapa turvata hapen saanti vähähappisessa ympäristössä on tehostaa hengitystä ja verenkiertoa. McMAHON ym.

(1974) totesivat, että amerikkalaisen makean veden ravun, Orconectes virilis, kiduskammioiden läpi virtaavan veden määrä moninkertaistui ja sydämen lyöntinopeus kasvoi hypoksia-altistuksen (P_{O_2} 40-60 mmHg, T 18-21 °C) aikana. Vaikka hapen diffuusio hengitysvedestä kiduksessa samanaikaisesti väheni, lisääntyi hapenkulutus kokonaisuudessaan huomattavasti. Muutokset olivat suurimmillaan hypoksia-altistuksen toisena ja kolmantena päivänä. Altistuksen jatkuessa sekä hengitystoiminnot että verenkierto hidastuivat, mutta pysyivät vertailuryhmän tasoa vilkkaampina. Samalla ravun hapenkulutus säilyi hypoksiaa edeltäneellä tasolla. Samanlaisia havaintoja on tehty hummerista, Homarus vulgaris, (McMAHON ym. 1978), eurooppalaisesta makean veden ravusta, Austropotamobius pallipes (WHEATTY ja TAYLOR 1981) sekä amerikkalaisesta Orconectes rusticus -ravusta (WILKES ja McMAHON 1981a).

Hengitysveden tai hemolympfan pumppaamisen tehostuminen lisää kuitenkin energian kulutusta logaritmisesti pumppaus-tilavuuden lisäykseen verrattuna (WALLACE 1972). Näin ollen joudutaan helposti sellaiseen tilanteeseen, jossa kidushuuhtelun ja verenkierron tehostamisella saatava lisähappi kulutetaan kokonaisuudessaan tehostuneiden hengitys- ja verenkiertotoimintojen ylläpitämiseen (BRADFORD ja TAYLOR 1982). Hengitystoimintojen ja verenkierron huomattava vilkastuminen voivat siis olla vain tilapäisratkaisuja.

WOLVEKAMPin ja WATERMANin (1960) mukaan myös ravun, Astacus astacus, hengitysvilkkujen on todettu nopeutuvan moninkertaiseksi lyhytaikaisen hypoksia-altistuksen aikana.

McMAHONin ym. (1974, 1978) havainnot verenkierron ja hengitystoimintojen hidastumisesta lähelle normaalitasoa hypoksia-altistuksen jatkuessa pitkään osoittavat, että jokin uusi, korvaava sopeutumiskeino tulee niiden tilalle.

Tässä tutkimuksessa ei seurattu rapujen hengitysvilkkujen tai verenkierron muutoksia. Sen sijaan havaittiin, että viikon kestänyt hypoksia-altistus johti ravun hemolymfan P_{50} -arvon pienenemiseen n. 17 mmHg:stä n. 7 mmHg:iin. Toisin sanoen lymfan happiaffiniteetti kaksinkertaistui. On ilmeistä, että lymfan happiaffiniteetin suureneminen on myös taloudellisin sopeutuma pitkäaikaiseen hypoksiaan. Myös WHEATY ja TAYLOR (1981) ovat havainneet happiaffiniteetin suurenevan hypoksia-altistuksen seurauksena Austropotamobius pallipesin ja WILKES ja McMAHON (1982b) Orconectes rusticusin lymfassa.

Happiaffiniteetin suurenemisen merkitys sopeutumana hypoksiaan ilmenee hyvin McMAHONin ja WILKENSin (1975) tekemästä havainnosta, jonka mukaan Homarus americanus -hummerin hemolymfan kudoksiin kuljettamasta hapesta yli 80 % on sitoutunut hemosyaniiniin veden happikyllästeisyyden ollessa 20-30%. Normoksisessa ympäristössä vain n. 25 % hapesta kulkee hemosyaniiniin sitoutuneena. Vastaavasti Carcinus maenas -tasuravun hemolymfassa sitoutuneena kulkevan hapen osuus li-

sääntyy normoksisen tilanteen 43 %:sta 90 %:iin, kun veden happikyllästeisyys alenee 20 %:iin (TAYLOR 1976).

In vitro kokeissa on osoitettu, että äyriäisten hemosyaniinin happiaffiniteetti riippuu pääasiassa pH:sta, lämpötilasta ja joidenkin epäorgaanisten ionien läsnäolosta liuoksessa. HOGBEN (1926, sit. LARIMER ja RIGGS 1964) osoitti CaCl_2 :n, MgCl_2 :n tai SrCl_2 :n läsnäolon lisäävän hummerin hemosyaniinin happiaffiniteettia.

LARIMER ja RIGGS (1964) tutkivat amerikkalaisen makean veden ravun, Procambarus simulans, hemolymfan happiaffiniteettia. He osoittivat, että Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -ionien lisääminen lymfaan sai aikaan hemosyaniinin dissosioitumisen pienemmiksi molekyyleiksi. Samalla hemosyaniinin happiaffiniteetti suureni. Ca^{2+} -ioni osoittautui Mg^{2+} -ionia huomattavasti tehokkaammaksi.

MILLER ja van HOLDE (1974) tekivät vastaavan havainnon näiden ionien happiaffiniteettia lisäävästä vaikutuksesta Callinassa californiensis katkaravun hemolymfassa. Myös heidän tutkimuksessaan tietynsuuruisen affiniteetin lisäyksen aikaansaamiseksi riitti pienempi Ca^{2+} - kuin Mg^{2+} -lisäys.

TRUCHOTn (1975c) mukaan näiden ionien vaikutustavat poikkeavat toisistaan: Mg^{2+} -lisäys pienentää lymfan puolikyllästeisyysarvoa (P_{50}), ts. lisää happiaffiniteettia suurentamalla samalla Bohrin efektiä. Ca^{2+} -lisäys lisää happiaffiniteettia, mutta ei vaikuta Bohrin efektiin.

BROUWER ym. (1978) väittävät, että Ca^{2+} :n ohella myös Cl^- -ionilla olisi happiaffiniteettia lisäävä vaikutus. Tutkimus on tehty Panaeus setiferus -katkaravun lymfalla in vitro.

TRUCHOT (1980) ja BOOTH ym. (1982) ovat osoittaneet laktaattipitoisuuden suurenemisen lisäävän hemolymfan happiaffiniteettia Bohrin efektiä muuttamatta.

pH:n nousun happiaffiniteettia lisäävä vaikutus on osoitettu monessa tutkimuksessa (mm. LARIMER ja RIGGS 1964, ANGERSBACH ja DECKER 1978, BROUWER ym. 1978, BURNET 1979, MANGUM 1980, RUTLEDGE 1981a).

Tässä tutkimuksessa havaittiin rapujen lymfan pH:n nousevan hypoksia-altistuksen aikana. Sama havainto on tehty monissa muissa in vivo tutkimuksissa (mm. TRUCHOT 1975a, McMAHON ym. 1978, WILKES ja McMAHON 1982a). pH:n nousun välittömänä syynä pidetään hypoksian aiheuttamaa hengityksen vilkastumista ja siitä johtuvaa respiratorista alkaloosia (TRUCHOT 1975a, McMAHON ym. 1978, MASSABUAU ym. 1979, SINHA ja DEJOURS 1980, WHEATLY ja TAYLOR 1981, WILKES ja McMAHON 1982a). DEJOURS ja BEEKENKAMP (1977) ovat osoittaneet kapeasaksiravun, Astacus leptodactylus, hengitysvilkkauden olevan kääntäen verrannollisen veden happipitoisuuteen: hapen suhteen ylikyllästeisessä vedessä hengitysvilkkaukset hidastuvat ja seurauksena on hyperkapninen asidoosi ja lymfan pH:n lasku. Hypoksisessa ympäristössä hengitys vilkastuu. Seurauksena on respiratorinen alkaloosi ja lymfan pH:n nousu.

Hypoksian jatkuessa pitkään hengitystoiminnot hidastuvat. Lymfan suurentuneesta bikarbonaattipitoisuudesta johtuen pH säilyy kuitenkin normaalia korkeamana (McMAHON ym. 1978). DeFURin ym. (1980) mukaan bikarbonaatti on todennäköisimmin peräisin eläimen ulkoisesta tukirangasta, jonka tärkein mineraalinen rakenneosana on kalsiumkarbonaatti (DENNELL 1960, HUNER ym. 1978). Hypoksian aiheuttama Ca^{2+} -pitoisuuden suureneminen voisi näin ollen olla peräisin samasta lähteestä. Olettamusta, että bikarbonaatti on peräisin kuoresta, tukee myös DEJOURSin ja BEEKENKAMPin (1978) havainto, jonka mukaan lymfan bikarbonaattipitoisuus suurenee huomattavasti ennen kuorenvaihtoa ja johtaa metaboliseen alkaloosiin. Kuorenvaihdon jälkeen uuden kuoren kovettuessa bikarbonaattipitoisuus jälleen pienenee. Seurauksena on metabolinen asidoosi ja lymfan pH:n lasku.

pH:n nousun ohella tässä tutkimuksessa havaittiin Ca^{2+} - Mg^{2+} - ja laktaattipitoisuuksien suurenevan hypoksia-altistuksen aikana in vivo. Näiden pitoisuuksien ja happiaffiniteetin muutosten välillä havaittiin erittäin merkitsevä positiivinen korrelaatio. WILKES ja McMAHON (1982a, b) eivät todenneet hypoksia-altistuksesta aiheutuneen happiaffiniteetin lisäyksen ja lymfan ionipitoisuuksien välillä merkitsevää riippuvuutta, vaikka Ca^{2+} -pitoisuus hieman suurenikin altistuksen aikana. Hemo-lymfan laktaattipitoisuutta he eivät määrittäneet.

Tässä tutkimuksessa todettu Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuuksien suureneminen lymfassa voi olla peräisin paitsi ulkoisesta tukirangasta, myös hepatopankreaksesta, joka varsinkin intermoult -vaiheen aikana sisältää suuret määrät kalsium- ja magnesiumfosfaattia (PASSANO 1960). Gastrolilitit eli ravunkivet, jotka koostuvat pääasiassa kalsiumkarbonaatista, ja jotka toimivat kuorenvaihdon aikaisena kalsiumvarastona, ovat intermoult-vaiheen aikana hävinneet lähes jäljettömiin (PASSANO 1960, McWHINNIE 1962, RYHÄNEN 1962).

Kalsium voi olla peräisin myös ympäröivästä vedestä, josta ravun kiduksen on todettu absorvoivan sitä tehokkaasti (CHAISEMARTIN 1968). GREENAWAY (1976) on todennut Carcinus maenas -taskuravun ottavan kalsiumia tehokkaasti laimennetusta merivedestä. Hänen rekisteröimänsä kalsiumin "imeytymisnopeus" on lähes kaksinkertainen natriumin imeytymiseen nähden (SHAW 1961). McWHINNIE (1962) on osoittanut ravun, Orconectes virilis, ja ympäröivän veden välillä tapahtuvan vilkasta kalsiumin vaihtoa kuorenvaihtokierron kaikissa vaiheissa.

Laktaatin lisääntymisen merkitys ravun lymfassa hypoksia-altistuksen seurauksena ei ole aivan yksiselitteinen. Äkillisessä hypoksia-altistuksessa lymfan maitohappopitoisuus suurenee nopeasti elimistön happivajauksen seurauksena. Kun ympäristön happipitoisuus palautuu normaaliksi, maitohappo hapatetaan ja happivelka maksetaan suurentuneena hapenkulutuksena (BRIDGES ja BRAND 1980). Toisaalta TRUCHOT (1980) on osoittanut, että laktaatin lisääminen in vitro Carcinus

maenas- ja Cancer pagurus-taskurapujen lymfaan lisää hemosyaniinin happiaffiniteettia välittömästi. Suuren laktaattipitoisuuden säilyttäminen lymfassa olisi näin ollen tarkoituksenmukainen sopeutuma hypoksiaan. On myös mahdollista, että maitohappo liuottaa tukirankana toimivaa kuorta ja vapauttaa Ca^{2+} -, Mg^{2+} - ja HCO_3^- -ioneja hemolymfaan. Tällaisen ilmiön on todettu tapahtuvan Mercenaria mercenaria-sim-pukassa hypoksia-altistuksen aikana. Liuottavana happona toimii lähinnä meripihkahappo (CRENSHAW ja NEFF 1969).

Monissa äyriäisissä todettu suuri valmius anaerobiseen metaboliaan ja nopeaan maitohapon muodostamiseen mahdollistaa ko. eläinten selviytymisen voimakkaista fyysisistä rasituksista esim. pakoreaktion aikana. Tämä voikin olla todennäköisempi selitys kehittyneelle anaerobiselle metabolialle kuin sen tarjoama valmius selvitä satunnaisista hypoksiatilanteista (BOOTH ym. 1982).

On myös havaintoja siitä, että hengityspigmentin määrä lisääntyisi hypoksian aikana. SENKBEIL ja WRISTON (1981) saivat 2-3 päivän hypoksiakäsittelyllä (PO_2 30-50 mmHg) aikaan hemosyaniinipitoisuuden suurenemisen hummerin, Homarus americanus, lymfassa. Biosynteesin tapahtumapaikaksi he osoittivat hepatopankreaksen.

Tässä tutkimuksessa hengityspigmentin määrä väheni naaraisissa jokseenkin merkitsevästi hypoksia-altistuksen aikana. Koiraisissa havaittu vähäinen pigmentin lisääntyminen ei ollut tilastollisesti merkitsevä. WILKES ja McMAHON

(1982b) eivät havainneet hengityspigmentin määrän muutoksia 3,5 viikkoa kestäneen hypoksia-altistuksen (PO_2 55 mmHg) Orconectes rusticus -ravun lymfassa.

Hypoksian vaikutusta ravun kudosten hapen osapaineeseen ei ole suoranaisesti määritetty. TRUCHOT (1975c) korostaa hemolymfan happiaffiniteetin suurenemisen kahdenlaista vaikutusta: samalla kun hapen sitoutuminen hemosyaniiniin tehostuu kiduksessa, sen vapautuminen kudoksessa vaikeutuu. Optimaalinen affiniteetti olisi näin ollen hyvin kapea-alainen.

Monissa pitkäaikaisissa hypoksia-altistuksissa rapujen hapenkulutuksen on kuitenkin havaittu säilyneen hypoksiaa edeltäneellä tasolla (esim. McMAHON ym. 1974, WHEATLY ja TAYLOR 1981, WILKES ja McMAHON 1982a, b) juuri lymfan happiaffiniteetin suurenemisen ansiosta (esim. WHEATLY ja TAYLOR 1981, WILKES ja McMAHON, 1982). Affiniteettimuutosten vaikutuksia hemolymfan hapenkuljetusominaisuuksiin voidaan havainnollistaa tarkastelemalla näiden muutosten ilmenemistä hemosyaniinin happidissosiaatiokäyrässä. Hemosyaniinin happidissosiaatiokäyrä jyrkkenee ja siirtyy vasemmalle affiniteetin suuretessa (esim. ANGERSBACH ja DECKER, 1978). Hypoksiatilanteessa sekä post- että prebranchiaalilymfan hapen osapaineet pienenevät. Samoin osapaineiden välinen erotus pienenee (McMAHON ja WILKENS 1975, TAYLOR 1976, WHEATLY ja TAYLOR 1981, BRADFORD ja TAYLOR 1982). Näin ollen sekä hapen sitoutuminen kiduksessa että vapautuminen kudoksessa tapahtuvat dissosiaatiokäyrän jyrkällä osalla. Tällöin pienikin hapen osapaineen lisäys post-

branchiaalilymfassa lisää hapen sitoutumista hemosyaniiniin merkittävästi ja vastaavasti vähäinen hapen osapaineen pieneneminen kudoksessa vapauttaa huomattavan määrän hemosyaniiniin sitoutunutta happea.

Hypoksia-altistuksen aikana lymfan pH nousee, mikä sinänsä suurentaa happiaffiniteettia. Samalla CO₂ -pitoisuus pienenee sekä post- että prebranchiaalilymfassa, samoin pienenee näiden pitoisuuksien välinen erotus. WHEATLYn ja TAYLORin (1981) määritysten mukaan post- ja prebranchiaalilymfan välinen pH:n ero ei kuitenkaan muutu hypoksia-altistuksessa. Siitä, mitkä aineenvaihduntatuotteet CO₂:n ohella aiheuttavat pH:n laskun kudoksessa ja ylläpitävät post- ja prebranchiaalilymfan välistä pH-eroa, ei ole tietoa. Koska lymfan pH:n lasku pienentää hemosyaniinin happiaffiniteettia (esim. RUTLEDGE, 1981a) helpottuu hapen vapautuminen hemosyaniinista kudoksessa prebranchiaalilymfan pH:n laskiessa.

5.3 Veden happamoitumisen vähähappisuussopeutumia ehkäisevä vaikutus

CUKERZIS (1968, 1973) on havainnut ravun, Astacus astacus, ja kapeasaksiravun, A. leptodactylus, hapenkulutuksen liisääntyvän veden pH:n laskiessa alle ~pH 6 tai noustessa yli ~pH 9. Samalla hän totesi ravulle optimaalisen veden pH-alueen olevan kapeasaksiravun optimialuetta kapea-alaisemman.

Edellä on todettu, että lymfan pH:n säätelyllä on keskeinen merkitys äyriäisten sopeutumisessa vähähappiseen ympäristöön. Kun ympäristö lisäksi happamoituu, vaikeudet lisääntyvät. Tässä tutkimuksessa havaittiin lymfan pH:n laskevan happamuusaltistuksen seurauksena. Saman havainnon ovat tehneet DEJOURS ja ARMAND (1981) kapeasaksiravusta ja MORGAN ja McMAHON (1982) kahdesta amerikkalaisesta makean veden rapulajista.

Lymfan pH:n lasku sinänsä pienentää hemosyaniinin happiaffiniteettia (esim. TRUCHOT 1975c, RUTLEDGE 1981a, CAMERON ja MANGUM 1983). Veden pH:n laskun on lisäksi todettu vaikeuttavan ravun kalsiumin ottoa. pH 4:ssä sen on todettu keskeytyvän kokonaan Orconectes virilis -ravussa, jossa pitkäaikainen altistus johti kuoren haurastumiseen (MALLEY 1980). APPELBERG (1979) totesi ravun, Astacus astacus, kuorenvaihdon jälkeisen kuoren kovettumisen häiriintyvän alhaisessa pH:ssa. Toisaalta MORGAN ja McMAHON (1982) havaitsivat Ca^{2+} -pitoisuuden suurenevan Procambarus clarkiin lymfassa lyhytaikaisen happamuusaltistuksen seurauksena (4 vrk, pH 3.8). He tulkitsivat sen johtuvan kalsiumkarbonaatin liukenemisestä ulkoisesta tukirangasta sopeutumana vastustaa lymfan pH:n laskua. Siitä huolimatta lymfan pH laski merkittävästi.

Tässä tutkimuksessa ei havaittu happamuusaltistuksen vaikuttavan merkittävästi lymfan kalsiumpitoisuuteen. Sen sijaan todettiin, että kun vesi oli samanaikaisesti sekä hapanta että hypoksista, lymfan kalsiumpitoisuus pieneni. Muutos oli siis päinvastainen hypoksia-altistuksen aiheuttamalle muutokselle.

Pelkkä happamuusaltistus ei muuttanut merkittävästi lymfan hapenkuljetusominaisuuksia. Sen sijaan yhtäaikaisessa happamuus- ja hypoksia-altistuksessa ei rapujen lymfasta voitu todeta mitään niistä hypoksiasopeutumista, joihin hypoksia-altistus yksinään oli johtanut. Päinvastoin, lymfan happi-affiniteetti pieneni pH:n alenemisen ja Mg^{2+} - ja Ca^{2+} -pitoisuuksien pienenemisen seurauksena. Myös hengityspigmentin määrä ja hapenkuljetuskapasiteetti pienenivät. Naaraissa muutokset olivat erittäin merkittäviä.

5.4 Hemolymfan pH-säätely ja ionitasapaino

Edeltävistä luvuista on käynyt ilmi, miten hypoksia-altistus saa aikaan lymfan pH-muutoksia, jotka puolestaan vaikuttavat lymfan hapenkuljetusominaisuuksiin. Veden happamoitumisen on osoitettu johtavan monien kalojen veren happo-emäs- ja ionitasapainojen huomattaviin häiriöihin (esim. PACKER 1979, McDONALD ja WOOD 1981).

Sisäisen pH:n säätely on eläimelle ensiarvoisen tärkeää, koska pH puolestaan säätelee proteiinien, kuten entsyymien, ionisoitumisastetta ja sitä kautta niiden toimintaa (REEVES ja RAHN 1979). Tästä syystä sisäinen pH pyrkii hakeutumaan uuteen, muuttuneen tilanteen edellyttämään tasapainotilaan mahdollisimman nopeasti. Niinpä vedestä ilmaa hengittämään nostetun taskuravun, Carcinus maenas, lymfan pH asettuu uudelle tasolle n. 100 tunnin kuluessa (TRUCHOT 1975b). Orconectes rusticus -ravun lymfassa tapahtuu vähäisiä muutoksia vielä kuudennen hypoksia-altistusvuorokauden jäl-

keen, vaikkakin suurimmat muutokset tapahtuvat 2-3 ensimmäisen vuorokauden aikana (WILKES ja McMAHON 1982a).

Tässä tutkimuksessa lymfan pH määritettiin 7-8 vuorokauden mittaisen altistuksen lopussa, joten voidaan olettaa, että pH oli ehtinyt asettua uuteen tasapainotilaan.

CAMERONin (1978a, b) mukaan veteen liuennutta happea hengittävien eläinten pH:n säätely tapahtuu aktiivisen $\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NH}_4^+)$ ja $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-/(\text{OH}^-)$ -vaihdon välityksellä.

Tässä tutkimuksessa ei määritetty lymfan bikarbonaattipitoisuutta. Sen sijaan vahvojen emäskationien ja happoanionien välisen erotuksen muutosten havaittiin olevan suoraan verrannollisia eri altistuksissa havaittuihin pH-muutoksiin. REEVESin ja RAHNin (1979) mukaan vahvojen ionien pitoisuuksien erotuksella, jota aktiivinen ioninvaihto säätelee, on keskeinen osuus veteen liuennutta happea hengittävien selkärankaisten pH-säätelyssä.

Äyriäisten osalta vahvaionipitoisuuserotuksen merkitystä pH-säätelyssä ei ole selvitetty. HENRY ja CAMERON (1982) totesivat siirrettyään Callinectes sapidus -taskurapuja vähäsuolaiseen veteen niiden lymfan pH:n nousevan. Samalla lymfan Na^+ - ja Cl^- -ionien välinen pitoisuuserotus suureni. Vaikka he eivät määrittäneet muiden vahvojen ionien pitoisuuksia, he pitivät muutosta merkinä vahvaionipitoisuuserotuksen osallistumisesta happo-emästasapainon säätelyyn.

Tässä tutkimuksessa hypoksia-altistus johti pH:n nousuun. Samalla vahvaionipitoisuuserotus suureni Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -pitoisuuden suuretessa ja Cl^- -pitoisuuden pienetessä. Happamuusaltistuksessa muutokset olivat vähäisiä, mutta kun vesi oli samanaikaisesti hypoksista, pH laski ja vahvaionipitoisuuserotus pieneni huomattavasti. Kationeista natriumin pitoisuus pieneni eniten. MORGAN ja McMAHON (1982) havaitsivat samanlaisen " Na^+ -vuodon" Procambarus clarki-ravusta happamuusaltistuksen seurauksena. Na^+ -ioni vaihtui todennäköisesti H^+ -ioniin. Kalan kiduksessa tällainen vaihto tapahtuu helposti kumpaankin suuntaan (EVANS 1975).

MCDONALD ja WOOD (1981) havaitsivat happamuusaltistuksessa (pH 4,2) H^+ -ionien kulkeutuvan ympäröivästä vedestä kiduksen kautta kirjolohen vereen samalla kun Na^+ -, K^+ - ja Cl^- -ioneja kulkeutui kiduksen kautta ulos. Vaikka H^+ -ionien erityys munuaisen kautta samanaikaisesti lisääntyi, seurauksena oli veren vakava happo-emäs- ja ionitasapainon häiriö. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin kationipitoisuuksien pienemisen ohella Cl^- -pitoisuuden pienenevän merkitsevästi rapujen lymfassa samanaikaisen hypoksia- ja happamuusaltistuksen seurauksena.

Samanaikaisen hypoksia- ja happamuusaltistuksen aiheuttamille suurille ionipitoisuusmuutoksille ja pH:n laskulle ei löydy fysiologisesti tarkoituksenmukaista selitystä. Todennäköisimmin ne ilmentävät hemolympfan ionitasapaino- ja pH-säätelyn sekä samalla osmoottisen säätelyn vakavaa häiriintymistä.

Euryhaliinisissa ravuissa, Carcinus maenas ja Eriocheir sinensis, lymfan valkuaisaineiden on todettu osallistuvan osmoottiseen säätelyyn: lymfan osmolaarisuuden pieneneminen johtaa proteiinipitoisuuden suurenemiseen (PEQUEUX ym. 1979).

Täpläravun, Pacifastacus leniusculus, hemolymfassa vapaiden aminohappojen on todettu osallistuvan osmoottiseen säätelyyn ravun sopeutuessa murtoveteen. Aminohappojen lisääntyessä hemosyaniini-pitoisuus pienenee (WHEATLY ja McMAHON 1983).

Tässä tutkimuksessa ravun lymfan kokonaisvalkuaisainepitoisuus pieneni samanaikaisen hypoksia- ja happamuusaltistuksen seurauksena. Vapaiden aminohappojen pitoisuutta ei määritetty, mutta ionitasapainohäiriö oli niin suuri, että mahdollisella vapaiden aminohappojen lisääntymisellä ei voinut olla suurtakaan merkitystä osmoottisen säätelyn häiriöiden tasapainottajana.

6. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen mukaan rapunaarailia oli hapekkaassa, neutraalissa vedessä suurempi valmius aerobisiin toimintoihin kuin koirailia, mutta ne näyttivät olevan myös koiraita herkempiä veden laadun muutoksille.

Kuorenvaihtokierron lepovaiheessa olevat ravut kykenivät sopeutumaan veden vähähappisuuteen (O_2 -kyllästeisyys 20-30 %) syksyllä +10 - +12 °C:n lämpötilassa. Sopeutuminen ilmeni hemolympfan hapensitomiskyvyn tehostumisena.

Ravut kestivät hyvin viikon mittaisen happamuusaltistuksen (pH 4-4,5). Tilanne vaikeutui rapujen kannalta huomattavasti, kun vesi oli samanaikaisesti sekä vähähappista että hapanta. Vähähappisuussopeutumia ei tällöin voitu havaita, sen sijaan rapujen hemolympfan pH:n ja ionitasapainon säätely häiriytyivät selvästi. Testattujen veden laadun muutostilojen summautuvat vaikutukset poikkesivat siis huomattavasti niiden erillisvaikutuksista.

Hemolympfan vahvaionipitoisuuserotuksella näytti olevan huomattava osuus lymfan happo-emästasapainon säätelyssä.

Jotta veden vähähappisuuden ja happamuuden vaikutuksia rapukantojen kehitykselle luonnossa voitaisiin arvioida nykyistä suuremmalla varmuudella, tulisi näiden ympäristöolosuhteiden fysiologiset vasteet selvittää eri vuodenaikoina ja ravun elämänkierron eri vaiheissa. Lisätutkimuksia tar-

vitaan erityisesti ravun poikasvaiheiden sekä lisääntymis- ja kuorenvaihtokiertonsa aktiivisissa vaiheissa olevien rapujen vähähappisuuden ja happamuuden siedosta.

KIITOKSET

Esitän kiitokseni dos. Antti Soivolle ja FL Kai Westmanille monista työn kannalta tärkeistä neuvoista ja ohjeista sekä FT Mikko Nikinmaalle, paitsi oleellisesta avusta tutkimuksen pohjana olevan työn toteuttamisessa, myös monista myöhemmistä aiheen käsittelyn kannalta tärkeistä keskusteluista. Kiitän myös Suomen Akatemian luonnontieteellistä toimikuntaa osallistumisesta tutkimusprojektin rahoittamiseen. Rakennusmestari Osmo Ranta-ahoa kiitän kuvien puhtaaksi piirtämisestä. Työn tuloksia on aiemmin esitelty kahdessa julkaisussa (JÄRVENPÄÄ ym. 1983 ja NIKINMAA ym. 1983).

LÄHDELUETTELO

- ABRAHAMSSON, S. 1970: Fecundity and growth of some populations of *Astacus astacus* Linné in Sweden. - Rep. Inst. Freshw. Res. Drottningholm 52: 23-37.
- ALASAARELA, E. & SALMELA, K. 1980: Siikajoen yhteistarkkailu. Siikajoen vesistötarkkailun tulokset v. 1979 ja Uljuan altaan vaikutus Siikajoen veden laatuun ja aine-taseisiin v. 1969-1979. - Pohjois-Suomen vesitutkimus-toimisto. Moniste. 33 s.
- ANDREWS, P. 1967: Über den Blutchemismus des Flusskrebsses *Orconectes limosus* und seine Veränderungen im Laufe des Jahres. - Z. vergl. Physiol. 57: 7-43.
- ANGERSBACH, D. & DECKER, H. 1978: Oxygen transport in crayfish blood: effect of thermal acclimation, and short-term fluctuations related to ventilation and cardiac performance. - J. Comp. Physiol. 123: 105-112.
- APPELBERG, M.: The effect of low pH on *Astacus astacus* L. during moult. - The Second Scand. Symp. Freshwater Crayfish, Lammi, Finland 1979, manuscript.
- BRADFORD, S.M. & TAYLOR, A.C. 1982: The respiration of *Cancer pagurus* under normoxic and hypoxic conditions. - J. Exp. Biol. 97: 273-288.
- BRIDGES, C. R. & BRAND, A. R. 1980: The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine crustacea. - Comp. Biochem. Physiol. 65A: 399-409.
- BRIDGES, C. R., BICUDO, J.E.P.W. & LYKKEBOE, G. 1979: Oxygen content measurement in blood containing haemocyanin. - Comp. Biochem. Physiol. 62A: 457-462.
- BOOTH, C. E., McMAHON, B. R. & PINDER, A. W. 1982: Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. - J. Comp. Physiol. 148: 111-121.
- BROUWER, M., BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. 1978: Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. - Biochemistry 17: 2148-2154.
- BURBANCK, W.D., EDWARDS, J. P. & BURBANCK, M. P. 1948: Tolerantion of lowered oxygen tension by cave and stream crayfish. - Ecology 29(3): 360-367.

- BURNETT, L. E. 1979: The effects of environmental oxygen levels on the respiratory function of hemocyanin in the crabs, *Libinia emarginata* and *Ocypode quadrata*. - J. Exp. Zool. 210: 289-300.
- CAMERON, J. N. 1978a: Regulation of blood pH in teleost fish. - Respir. Physiol. 33: 129-144.
- 1978b: Effects of hypercapnia on blood acid-base status, NaCl fluxes, and trans-gill potential in freshwater blue crab, *Callinectes sapidus*. - J. Comp. Physiol. 123: 137-141.
- CAMERON, J. N. & MANGUM, C. P. 1983: Environmental adaptations of the respiratory system: ventilation, circulation and oxygen transport. - Teoksessa: BLISS, D. E. (toim.), The biology of Crustacea vol. 8: VERNBERG, F. J. & VERNBERG, W.B. (toim.), Environmental adaptations 43-63. Academic Press. New York.
- CHAISEMARTIN, C. 1968: Nature, active ou passive, des transferts calciques chez les Astacidae. - Vie Milieu, Série C, 19: 159-172.
- CRENSHAW, M. A. & NEFF, J. M. 1969: Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. - Am. Zool. 9: 881-885.
- CUKERZIS, J. 1968: Interspecific relations between *Astacus astacus* L. and *Astacus leptodactylus* ESCH. - Ekologia Polska. Seria A 16(31): 629-636.
- 1973: Biologische Grundlagen der Methode der künstlichen Aufzucht der Brut des *Astacus astacus* L. - Teoksessa: ABRAHAMSSON, S. (toim.), Freshwater Crayfish 1: 187-201. Lund.
- DeFUR, P. L., WILKES, P.R.H. & McMAHON, B. R. 1980: Non-equilibrium acid-base status in *Carcinus productus*: role of exoskeletal carbonate buffers. - Respir. Physiol. 42: 247-261.
- DEJOURS, P. & ARMAND, J. 1980: Haemolymph acid-base balance of the crayfish *Astacus leptodactylus* as a function of the oxygenation and the acid-base balance of the ambient water. - Respir. Physiol. 41: 1-11.
- DEJOURS, P. & BEEKENKAMP, H. 1977: Crayfish respiration as a function of water oxygenation. - Respir. Physiol. 30: 241-251.
- DEJOURS, P. & BEEKENKAMP, H. 1978: L'équilibre acide-base de l'hémolymphe au cours de la mue chez l'écrevisse. - C. R. Acad. Sc. Paris, Série D. t. 286: 1895-1898.
- DENNELL, R. 1960: Integument and exoskeleton. - Teoksessa: WATERMAN, T. H. (toim.), The physiology of Crustacea I: 449-472. Academic Press, New York.

- DRACH, P. 1939: Mue et cycle d'internue chez les Crustacés Décapodes. - Ann. Inst. Océanogr. 19: 103-391.
- EDWARDS, M. J. & MARTIN, R. J. 1966: Mixing technique for the oxygen-hemoglobin equilibrium and Bohr effect. - J. App. Physiol. 21: 1898-1902.
- ERENCIN, Z. & KÖKSAL, G. 1977: On the crayfish, *Astacus leptodactylus*, in Anatolia. - Teoksessa: LINDQVIST, O.V. (toim.), Freshwater Crayfish 3: 187-192. Kuopio.
- EVANS, D. H. 1975: Ion exchange mechanisms in fish gills. - Comp. Biochem. Physiol. 51 A: 491-495.
- FÜRST, M. 1977: Förurningens inverkan på flodkräftan, *Astacus astacus* L. - Information från Sötvattenslaboratoriet, Drottningholm 14: 89-93.
- GONDKO, R., MICHALAK, W. & SWIERCZYNSKI, B. 1981: Comparison of the hemolymph content of protein and cations (Ca, Mg, Na, K), clotting time and pH in three crayfish species. - Comp. Biochem. Physiol. 69 A: 637-640.
- GREENAWAY, P. 1976: The regulation of haemolymph calcium concentration of the crab *Carcinus maenas* (L.). - J. Exp. Biol. 64: 149-157.
- HENRY, R. P. & CAMERON, J. N. 1982: Acid-base balance in *Callinectes sapidus* during acclimation from high to low salinity. - J. Exp. Biol. 101: 255-264.
- HOBBS, H. H. & HALL, E. T. 1974: Crayfishes (Decapoda; Astacidae). - Teoksessa: HART, C. W. & FULLER, S.L.H. (toim.), Pollution ecology of freshwater invertebrates: 195-214. New York.
- HOGBEN, L. T. 1926: Some observations on the dissociation of haemocyanin by the colorimetric method. - Brit. J. Exp. Biol. 3: 225-238.
- HUNER, J. V., KOWALCZUK, J. G. & AVAULT, J. W. 1978: Post-molt calcification in subadult red swamp crayfish, *Procambarus clarki* (Girard) (Decapoda, Cambaridae). - Crustaceana 34: 275-280.
- HYVÄRINEN, A., JÄNNES, J., NIKKILÄ, E., SARIS, N-E. & VUOPIO, P. (toim.) 1972: Kliiniset laboratoriotutkimukset. WSOY, Porvoo. 581 s.
- JOHANSEN, K., LENFANT, C. & MECKLENBURG, T. A. 1970: Respiration in the crab, *Cancer magister*. - Z. vergl. Physiol. 70: 1-19.
- JÄRVENPÄÄ, T., NIKINMAA, M., WESTMAN, K. & SOIVIO, A. 1983: Effects of hypoxia on the haemolymph of freshwater crayfish *Astacus astacus* L. in neutral and acid water during the intermolt period. - Teoksessa: GOLDMAN, C.R. (toim.) Freshwater Crayfish 5: 86-97. Davis.

- JÄRVENPÄÄ, T., WESTMAN, K. & SOIVIO, A.: Sampling and analysing of the haemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus* (L.). - The Second Scand. Symp. Freshwater Crayfish, Lammi, Finland 1979, manuscript.
- KALMUS, H. 1930: Untersuchungen über die Atmung des Flusskrebsses *Potamobius astacus* Leach. - Z. Vergl. Physiol. 12: 725-759.
- KOSSAKOWSKI, J. 1973: The freshwater crayfish in Poland. - Teoksessa: ABRAHAMSSON, S. (toim.), Freshwater Crayfish 1: 17-26. Lund.
- LARIMER, J. L. & RIGGS, A. F. 1964: Properties of hemocyanins I. The effect of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin. - Comp. Biochem. Physiol. 13: 35-46.
- LAURENT, P. 1973: *Astacus* and *Cambarus* in France. - Teoksessa: ABRAHAMSSON, S. (toim.), Freshwater crayfish 1: 69-78. Lund.
- LEIVESTAD, H. & MUNIZ, J. P. 1976: Fish kill at low pH in a Norwegian river. - Nature 259: 391-392.
- LINDROTH, A. 1950: Reactions of Crayfish on low oxygen pressure. - Inst. Freshw. Res. Drottningholm Rep. 31: 110-112.
- MALLEY, D. F. 1980: Decreased survival and calcium uptake by the crayfish *Orconectes virilis* in low pH. - Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 364-372.
- MANGUM, C. P. 1980: Respiratory function of the hemocyanins. - Amer. Zool. 20: 19-38.
- MASSABUAU, J. C., ECLANCHER, B. & DEJOURS, P. 1979: Ventilatory reflex response to oxygen changes in crayfish. - IRCS Med. Sci. 7: 14.
- MCDONALD, D. G. & WOOD, C. M. 1981: Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. - J. Exp. Biol. 93: 101-118.
- MCMAHON, B. R. & WILKENS, J. L. 1975: Respiratory and circulatory responses to hypoxia in the lobster *Homarus americanus*. - J. Exp. Biol. 62: 637-655.
- MCMAHON, B. R., BURGREN, W. W. & WILKENS, J. L. 1974: Respiratory responses to long-term hypoxic stress in the crayfish *Orconectes virilis*. - J. Exp. Biol. 60: 195-206.
- MCMAHON, B. R., BULTER, P. J. & TAYLOR, E. W. 1978: Acid base changes during recovery from disturbance and during long-term hypoxic exposure in the lobster *Homarus vulgaris*. - J. Exp. Zool. 205, 361-370.

- McWHINNIE, M. A. 1962: Gastrolith growth and calcium shifts in the freshwater crayfish, *Orconectes virilis*. - *Comp. Biochem. Physiol.* 7: 1-14.
- MILLER, K. & van HOLDE, K. E. 1974: Oxygen binding by *Callinassa californiensis* hemocyanin. - *Biochemistry* 13(8): 1668-1674.
- MORGAN, D. O. & McMAHON, B. R. 1982: Acid tolerance and effects of sublethal acid exposure on iono-regulation and acid-base status in two crayfish *Procambarus clarki* and *Orconectes rusticus*. - *J. Exp. Biol.* 97: 241-252.
- MOSHIRI, G. A., GOLDMAN, C. R., GODSHALK, G. L. & MULL, D. R. 1970: The effects of variations in oxygen tension on certain aspects of respiratory metabolism in *Pacifastacus leniusculus* (Dana) (Crustacea: Decapoda). - *Physiol. Zoöl.* 43(1): 23-29.
- NIEMI, A. 1976: Pyhäjoen limnologian ja kalatalouden nykytilan selvitys. - Vesihallitus, Kokkolan vesipiirin vesitoimisto. Moniste. 65 s.
- NIKINMAA, M., JÄRVENPÄÄ, T., WESTMAN, K. & SOIVIO, A. 1983: Effects of hypoxia and acidification on the haemolymph pH values and ion concentrations in the freshwater crayfish, (*Astacus astacus* L.). - *Finn. Fish. Res.* 5: 17-22.
- NIKINMAA, M. & SOIVIO, A. 1979: Oxygen dissociation curves and oxygen capacities of blood of a freshwater fish, *Salmo gairdneri*. - *Ann. Zool. Fennici* 16: 217-221.
- PACKER, R. K. 1979: Acid-base balance and gas exchange in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to acid environments. - *J. Exp. Biol.* 79: 127-134.
- PASSANO, L. M. 1960: Molting and its control. - Teoksessa: WATERMAN, T. H. (toim.), *The physiology of Crustacea I*: 473-536. Academic Press, New York.
- PÉQUEUX, A., VALLOTA, A. C. & GILLES, R. 1979: Blood proteins as related to osmoregulation in Crustacea. - *Comp. Biochem. Physiol.* 64A: 433-435.
- PURSIAINEN, M. & WESTMAN, K. 1984: The restoration of the crayfish (*Astacus astacus*) in River Siikajoki, Finland. - EIFAC Technical paper 42.2: 412-421. Rome. FAO.
- REEVES, R. B. & RAHN, H. 1979: Patterns in vertebrate acid-base regulation. - Teoksessa: WOOD, S. C. & LENFANT, C. (toim.), *Evolution of respiratory processes, a comparative approach.* 225-252. Marcel Deccer Inc., New York.
- RUTLEDGE, P. S. 1981a: Effects of temperature acclimation on crayfish hemocyanin oxygen binding. - *Am. J. Physiol.* 240(1): R93-R98.

- RUTLEDGE, P. S. 1981b: Circulation, oxygen transport, and activity in the crayfish. - Am. J. Physiol. 241(1): R99-R105.
- RUTLEDGE, P. S. & PRITCHARD, A. W. 1981: Scope for activity in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. - Am. J. Physiol. 240(1): R87-R92.
- RYHÄNEN, R. 1962: Beobachtungen über Häutungsvorgang und Ca-Haushalt beim Edelkrebs *Astacus astacus* (L.). - Arch. Soc. Vanamo 17 (1): 25-38.
- SENKBEIL, E. G. & WRISTON Jr., J. C. 1981: Hemocyanin synthesis in the american lobster, *Homarus americanus*. - Comp. Biochem. Physiol. 68B: 163-171.
- SHAW, J. 1961: Studies on ionic regulation in *Carcinus maenas* (L.) I. Sodium Balance. - J. Exp. Biol. 38: 135-152.
- SINHA, N. P. & DEJOURS, P. 1980: Ventilation and blood acid-base balance of the crayfish as functions of water oxygenation (40-1500 Torr). - Comp. Biochem. Physiol. 65A: 427-432.
- SPOEK, G. L. 1974: The relationship between blood haemocyanin level, oxygen uptake, and the heart-beat and schaphognathite-beat frequencies in the lobster *Homarus gammarus*. - Neth. J. Sea Res. 8: 1-26.
- STEVENSON, J. R. 1975: The molting cycle in the crayfish: Recognizing the molting stages, effects of ecdysone and changes during the cycle. - Teoksessa: AVAULT, J.W. (toim.), Freshwater crayfish 2: 255-269. Baton Rouge.
- STORBERG, K-E. 1983: Kyrönjoen alaosan vedenlaadusta. - Vesihallitus, Vaasan vesipiirin vesitoimisto. Moniste. 17 s.
- TAYLOR, A. C. 1976: The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. - J. Exp. Biol. 65: 309-322.
- TRUCHOT, J.-P. 1973: Temperature and acid-base regulation in the shore crab *Carcinus maenas* L. - Respir. Physiol. 17: 11-20.
- 1975a: Changements de l'etat acide-base du sang en fonction de l'oxygenation de l'eau chez le crabe, *Carcinus maenas* (L.). - J. Physiol. 70: 583-592.
- 1975b: Blood acid-base changes during experimental emersion and reimmersion of the intertidal crab *Carcinus maenas* (L.). - Respir. Physiol. 23: 351-360.
- 1975c: Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affinity of the haemocyanin in the crab *Carcinus maenas* (L.). - Respir. Physiol. 24: 173-189.

- TRUCHOT, J.-P. 1980: Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. - J. Exp. Zool. 214: 205-208.
- TUCKER, V. A. 1967: Method for oxygen content and dissociation curves on microliter blood samples. - J. Appl. Physiol. 23: 410-414.
- VALLIN, S. 1964: Kräftan, *Potamobius astacus* (Linné). - Teoksessa: ANDERSSON, K. A. (toim.), Fiskar och fiske i Norden: 505-512. Stockholm.
- WALLACE, J. C. 1972: Activity and metabolic rate in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). - Comp. Biochem. Physiol. A 41: 523-533.
- WESTMAN, K. 1973: The population of the crayfish *Astacus astacus* L. in Finland and the introduction of the american crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. - Teoksessa: ABRAHAMSSON, S. (toim.), Freshwater Crayfish 1: 41-55. Lund.
- WESTMAN, K. 1979: Raputaloudellisen vahingon kompensointi. - Teoksessa: AUVINEN, H. & MUHONEN, J. (toim.), Kalatalousvahinkojen arviointi, kompensointi ja korvaaminen: 97-105. Vesi- ja kalatalousmiehet r.y. Helsinki.
- WESTMAN, K. 1985: Effects of habitat modification on freshwater crayfish. - Teoksessa: ALABASTER, J. (toim.), Habitat modification and freshwater fisheries: 245-255. Butterworths.
- WHEATLY, M. G. & McMAHON, B. R. 1983: Respiration and ionoregulation in the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus* on exposure to high salinity: an overview. - Teoksessa: GOLDMAN, C. R. (toim.), Freshwater crayfish 5: 43-55. Davis.
- WHEATLY, M. G. & TAYLOR, E. W. 1981: The effect of progressive hypoxia on heart rate, ventilation, respiratory gas exchange and acid-base status in the crayfish *Austropotamobius pallipes*. - J. Exp. Biol. 92: 125-142.
- WILKES, P.R.H. & McMAHON, B.R. 1982a: Effect of maintained hypoxic exposure on the crayfish *Orconectes rusticus*: I. Ventilatory, acid-base and cardiovascular adjustments. - J. Exp. Biol. 98: 119-137.
- WILKES, P.R.H. & McMAHON, B.R. 1982b: Effect of maintained hypoxic exposure on the crayfish *Orconectes rusticus*: II. Modulation of haemocyanin oxygen affinity. - J. Exp. Biol. 98: 139-149.
- WOLWEKAMP, H.P. & WATERMAN, T.H. 1960: Respiration. - Teoksessa: WATERMAN, T.H. (toim.), The physiology of Crustacea I: 35-100. Academic Press. New York.

Ravun hemolymfasta määritetyt fysiologiset suureet $\bar{x} \pm \text{SEM}$, (n).

KOIRAAT

Koeryhmä	CO ₂ til.-%	prot. g/l	Cu ²⁺ mg/l	Cu ²⁺ / prot. mg/g	P ₅₀ mmHg	Ca ²⁺ meq/l	Mg ²⁺ meq/l	lact. g/l	K ⁺ meq/l	Na ⁺ meq/l	Cl ⁻ meq/l	SID meq/l	pH	gluc. g/l
Vertailuryhmä	1,21	47,8	66,6	1,37	16,9	24,4	4,64	0,070	3,93	222,0	228,6	26,1	7,57	0,027
hapekas vesi	$\pm 0,10$ (7)	$\pm 1,9$ (8)	$\pm 3,1$ (7)	$\pm 0,03$ (7)	$\pm 1,6$ (7)	$\pm 0,5$ (8)	$\pm 0,13$ (8)	$\pm 0,002$ (8)	$\pm 0,19$ (8)	$\pm 2,5$ (8)	$\pm 1,6$ (8)	$\pm 2,1$ (8)	$\pm 0,02$ (8)	$\pm 0,008$ (8)
Vähähappinen	1,27	52,0	72,8	1,39	6,7	30,7	6,22	0,232	3,50	219,9	212,9	47,4	7,72	0
vesi	$\pm 0,08$ (7)	$\pm 2,6$ (7)	$\pm 4,3$ (7)	$\pm 0,02$ (7)	$\pm 0,7$ (6)	$\pm 1,9$ (7)	$\pm 0,41$ (7)	$\pm 0,081$ (7)	$\pm 0,16$ (7)	$\pm 0,7$ (7)	$\pm 4,6$ (7)	$\pm 7,1$ (7)	$\pm 0,04$ (7)	± 0 (7)
Hapan vesi	1,34	48,3	67,3	1,38	12,0	26,0	4,42	0,064	3,97	221,0	223,6	32,4	7,50	0,113
	$\pm 0,07$ (7)	$\pm 4,5$ (7)	$\pm 6,9$ (7)	$\pm 0,02$ (7)	$\pm 0,9$ (7)	$\pm 0,8$ (7)	$\pm 0,23$ (7)	$\pm 0,004$ (7)	$\pm 0,12$ (7)	$\pm 4,9$ (7)	$\pm 4,4$ (7)	$\pm 2,6$ (7)	$\pm 0,50$ (7)	$\pm 0,64$ (7)
Vähähappinen	1,18	46,3	64,8	1,40	14,4	24,7	4,37	0,058	3,48	206,0	215,6	23,0	7,39	0,003
hapan vesi	$\pm 0,08$ (5)	$\pm 3,3$ (5)	$\pm 4,5$ (5)	$\pm 0,01$ (5)	$\pm 0,9$ (5)	$\pm 0,5$ (5)	$\pm 0,35$ (5)	$\pm 0,001$ (5)	$\pm 0,15$ (5)	$\pm 3,4$ (5)	$\pm 4,1$ (5)	$\pm 2,5$ (5)	$\pm 0,08$ (5)	$\pm 0,002$ (5)

Ravun hemolymfasta määritetyt fysiologiset suureet $\bar{x} \pm \text{SEM}$, (n)

NAARAAT

Koeryhmä	CO ₂ til.-%	prot. g/l	Cu ²⁺ mg/l	Cu ²⁺ / prot. mg/l	P ₅₀ mmHg	Ca ²⁺ meq/l	Mg ²⁺ meq/l	lact. g/l	K ⁺ meq/l	Na ⁺ meq/l	Cl ⁻ meq/l	SID meq/l	pH	gluc. g/l
Vertailuryhmä hapekas vesi	1,51	60,1	84,0	1,40	14,6	26,4	5,24	0,078	3,88	222,3	219,9	37,8	7,66	0,078
	$\pm 0,08$ (8)	$\pm 2,1$ (8)	$\pm 2,3$ (8)	$\pm 0,03$ (8)	$\pm 2,1$ (6)	$\pm 0,4$ (8)	$\pm 0,13$ (8)	$\pm 0,011$ (8)	$\pm 0,08$ (8)	$\pm 2,1$ (8)	$\pm 2,6$ (8)	$\pm 0,8$ (8)	$\pm 0,03$ (8)	$\pm 0,020$ (8)
Vähähappinen vesi	1,18	49,7	68,0	1,37	7,8	29,6	5,75	0,227	3,42	215,3	213,2	40,9	7,61	0,032
	$\pm 0,08$ (5)	$\pm 3,3$ (6)	$\pm 4,8$ (6)	$\pm 0,01$ (6)	$\pm 1,2$ (5)	$\pm 3,1$ (6)	$\pm 0,48$ (6)	$\pm 0,077$ (6)	$\pm 0,17$ (6)	$\pm 3,6$ (6)	$\pm 5,1$ (6)	$\pm 5,5$ (6)	$\pm 0,06$ (6)	$\pm 0,022$ (6)
Hapan vesi	1,40	58,5	78,8	1,34	14,4	26,5	4,80	0,067	3,78	219,3	220,7	33,8	7,47	0,054
	$\pm 0,11$ (6)	$\pm 5,2$ (6)	$\pm 7,9$ (6)	$\pm 0,02$ (6)	$\pm 1,9$ (6)	$\pm 0,9$ (6)	$\pm 0,31$ (6)	$\pm 0,005$ (6)	$\pm 0,12$ (6)	$\pm 2,5$ (6)	$\pm 2,5$ (6)	$\pm 1,4$ (6)	$\pm 0,02$ (6)	$\pm 0,024$ (6)
Vähähappinen hapan vesi	0,89	39,9	52,9	1,37	18,6	22,9	3,60	0,055	3,27	199,1	203,6	25,4	7,37	0
	$\pm 0,08$ (7)	$\pm 2,5$ (7)	$\pm 3,6$ (6)	$\pm 0,01$ (6)	$\pm 1,3$ (6)	$\pm 0,7$ (7)	$\pm 0,14$ (7)	$\pm 0,001$ (7)	$\pm 0,11$ (7)	$\pm 2,8$ (7)	$\pm 4,3$ (7)	$\pm 1,7$ (7)	$\pm 0,03$ (7)	± 0 (7)

**RIISTA- JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS,
KALANTUTKIMUSOSASTO**

MONISTETTUJA JULKAISUJA

- No 35. VIHERVUORI, A.: Jänisjoen vesistön kala- ja rapukannoille aiheutuneet vahingot ja niiden kompensointi. Helsinki 1985. 114 s.
- No 36. SEPPONEN, M. ja HILDÉN, M.: Virkistys- ja kotitarvekalastus merenkurkun pohjoisosassa vuonna 1981. 1—32.
KOIVISTO, V. ja PARMANNE, R.: Vedenalaisten räjähdysten aiheuttamista kalakuolemista Lounais-Suomessa Reilan ammunta-alueella. 33—64. Helsinki 1985.
- No 37. KOLJONEN, M-L.: Suomen lohikantojen entsyymigeneettinen muuntelu. Helsinki 1985. 94 s.
- No 38. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston tutkimus-, palvelu-, tiedotus- ja julkaisutoiminta vuonna 1983. Helsinki 1985. 133 s.
- No 39. Suunnitelma Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston toiminnaksi vuodelle 1985. Helsinki 1985. 155 s.
- No 40. SALOJÄRVI, K., PARTANEN, H., AUVINEN, H., JURVELIUS, J., JÄNTTI-HUHTANEN, N. ja RAJAKALLIO, R.: Oulujärven kalatalouden kehittämissuunnitelma. Osa I: Nykytila. Helsinki 1985. 278 s.
- No 41. SALOJÄRVI, K. ja PARTANEN, H.: Oulujärven kalatalouden kehittämissuunnitelma. Osa II: Suunnitelma. Helsinki 1985. 116 s.
- No 42. PURSIAINEN, M., ASLA, I., KANNEL, R. ja WESTMAN, K.: Lohenpoikasten vapautusallas-kokeet Selkämeren rannikolla vuosina 1983—1984. 1—28.
NAARMINEN, M.: Lohi- ja taimenmerkintöjen yhteydessä tapahtuvasta kalojen käsittelystä, kuljetuksesta ja istutuksesta. 29—62. Helsinki 1985.
- No 43. SALMI, P.: Ammattikalastuksen investointien, vuosiansioiden ja saaliiden aikasarja-analyysi vuosilta 1978—1982. Helsinki 1986. 46 s.
- No 44. KALLIO, I.: Vaelluskalakantojen nykyinen tila ja hoito. 1—51.
KALLIO, I.: Istutettujen ja luonnonkudusta peräisin olevien emolohien (Salmo salar L.) fekunditeetti ja mätimunien koko. 53—74. Helsinki 1986.
- No 45. LOUHIMO, J. ja HONKASALO, L.: Taimenkanta ja taimenen ympäristövaatimukset Evon Luutajoessa. 1—74.
JUTILA, E.: Vaikkojoen kunnostussuunnitelmaa koskeva tarkastus- ja selvitystyö. 75—96.
JUTILA, E.: Selvitys Vieksinjoen vesistön uittolaitteiden ja -rakenteiden kalataloudelle aiheuttamista haitoista sekä niiden poistamiseksi tarvittavista toimenpiteistä. 97—112.
JUTILA, E.: Hossanjoen uittoperkauksien aiheuttamat kalataloudelliset vahingot sekä niiden poistamiseksi tarvittavat toimenpiteet. Hossanjoen uittosäännön kumoamiseen liittyvä kalataloudellinen selvitys. 113—126. Helsinki 1986.
- No 46. Nahkiainen-nejonögon -symposiumin, 17.—18.10.1979 Kalajoki. Toim. T. Järvenpää ja K. Westman. Helsinki 1986. 107 s.
- No 47. LEHTONEN, H., BÖHLING, P. och HUDD, R.: Siken och sikkfisket i Kvarkenområdet. Helsinki 1986. 76 s.
- No 48. Suunnitelma Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston toiminnaksi vuodelle 1986. Helsinki 1986. 178 s.
- No 49. ERONEN, T., HANSKI, A., HYYTINEN, L. ja KAIJOMAA, V-M.: Vuoksen vesistöalueen lohi- ja taimenkantojen hoidon puiteohjelma. Helsinki 1986. 117 s.
- No 50. TUUNAINEN, P., VUORINEN, P., RASK, M., JÄRVENPÄÄ, T. ja VUORINEN, M.: Happaman laskeuman vaikutukset kaloihin. Raportti vuodelta 1985. English summary: Effects of acidic deposition on fish, Report 1985. 1—39.
TIKKA, J. ja PAASIVIRTA, L.: Ahvenen populaatiorakenne, kasvu ja tuotanto kahdessa eteläsuomalaisessa metsäjärvenä. 40—63. Helsinki 1986.
- No 51. Valtion kalanviljelyn VII neuvottelupäivät 12.—14.4. 1983 Punkaharjulla. Toim. A. Vihervuori. Helsinki 1986. 119 s.
- No 52. NIKINMAA, B.: Inverkan av ljus och insekttillskott till födan på tillväxten hos laxyngel Salmo salar. Helsinki 1986. 79 s.
- No 53. Papers presented at ICES Statutory Meetings in 1984—86 by Finnish participants. Helsinki 1986. 260 pp.

SISÄLTÖ

JÄRVENPÄÄ, T.: Veden vähähappisuuden ja happamuuden vaikutukset ravun hemolymfaan. 64 s.

**ISBN 951-9092-83-8
ISSN 0358-4623
Yliopistopaino**