

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS

Galina Garnaga

**INTERGRUOTAS APLINKOS TARŠOS BEI BIOŽYMENŲ ATSAKO
VERTINIMAS BALTIJOS JŪROJE**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2005–2010 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Mokslinė vadovė:

habil. dr. Janina Baršienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B).

Konsultantas:

doc. dr. Algirdas Stankevičius (Klaipėdos universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Vincas Būda (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B).

Nariai:

prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

habil. dr. Janina Šyvokienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

dr. Galina Lujanienė (Fizinių ir technologijos mokslų centro Fizikos institutas, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Oponentai:

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B);

dr. Nijolė Kazlauskienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B).

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje, 2011 metų balandžio 27 d. 11 val. Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto salėje.

Adresas: Akademijos g. 2, LT-08412 Vilnius-21, Lietuva

Tel. (+370 ~ 5) 272 9257, faks. (+ 370 ~ 5) 272 9352

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2011 m. kovo 25 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto bibliotekose.

**VILNIUS UNIVERSITY
INSTITUTE OF ECOLOGY OF NATURE RESEARCH CENTRE**

Galina Garnaga

**INTEGRATED ASSESSMENT OF POLLUTION AND BIOMARKER RESPONSES IN
THE BALTIC SEA**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences (03B)

Vilnius, 2011

The dissertation research was carried out at the Institute of Ecology of Nature Research Centre in 2005–2010.

Scientific supervisor:

Dr. Habil. Janina Baršienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B).

Research advisor:

Doc. Dr. Algirdas Stankevičius (Klaipėda University, Biomedical Sciences, Biology – 01B).

The defence of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University Ecology and Environmental Research Council:

Chairman:

Prof. Habil. Dr. Vincas Būda (Vilnius University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B).

Members:

Prof. Dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B);

Prof. Habil. Dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilnius Pedagogical University, Biomedical Sciences, Biology – 01B);

Habil. Dr. Janina Šyvokienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B);

Dr. Galina Lujanienė (Institute of Physics of Center for Physical Sciences and Technology, Physical Sciences, Chemistry – 03P).

Opponents:

Prof. Habil. Dr. Aniolas Sruoga (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B);

Dr. Nijolė Kazlauskienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Sciences – 03B).

The official defence of the dissertation will be held at the open session of the Research Council on the 27 April 2011, at 11:00 at the Institute of Ecology of Nature Research Centre,

Address: Akademijos 2, LT-08412 Vilnius-21, Lithuania

Tel. +370 5 2729257, fax. +370 5 2729352

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 25 March 2011.

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

IVADAS

Darbo aktualumas. Vandens sistemų sudėtingumas ir įvairovė, įvairių aplinkos veiksnių arba stresorių įtaka rodo, kad nepakanka taikyti vieną metodą daugybės stresorių įtakai gyviesiems organizmams įvertinti. Nėra abejonių, kad cheminės analizės rezultatai yra svarbus aukštų teršalų koncentracijų poveikio gyviesiems organizmams rodiklis (Den Besten, 1998). Tačiau vien tik remtis cheminiu rodikliu vandens kokybės įtakai ekologinėms sistemoms įvertinti gali nepakakti, nes šis rodiklis neatskleidžia platesnės ekologinės prasmės (Adams, 2005).

Biožymenys gali būti naudingas įrankis atliekant tyrimus, nes rodo tiek teršalų bioprieinamumą, tiek ir jų poveikį gyviesiems organizmams (Den Besten, 1998). Biologinių efektų tyrimų metodai gali būti svarbus elementas vykdant aplinkos stebėsenos programas, nes jie rodo sąryšį tarp užterštumo ir ekologinio atsako (Thain et al., 2008). Dabartiniu metu jau susiformavo tvirta nuostata, kad siekiant pagerinti cheminių teršalų ir jų mišinių poveikio jūrinėms ekosistemoms įvertinimą, reikia atlikti kompleksinį vertinimą, t. y. tirti pavojingų medžiagų koncentracijas organizmuose ir aplinkoje kartu su biologiniais efektais (Lehtonen, Schiedek, 2006b).

Pasirašydamos Baltijos jūros veiksmų planą, HELCOM šalys nusprendė bendradarbiauti renkant informaciją apie pavojingų medžiagų šaltinius, šių medžiagų buvimą jūrinėje aplinkoje, taip pat ir apie jų biologinius efektus. HELCOM šalys taip pat sutiko vykdyti biologinių efektų stebėseną, kad būtų lengviau atlikti patikimą šios ekosistemos būklės įvertinimą (HELCOM, 2007a).

Europos Sąjungos Jūrų strategijos pagrindų direktyva (2008/56/EB) (toliau – JSPD) taip pat kelia pavojingų medžiagų klausimą ir nustato geros aplinkos būklės kokybinį deskriptorių: „Teršalų koncentracijos lygis yra toks, kad nesukelia taršos poveikio.“ Pagal JSPD, progresas siekiant geros aplinkos būklės priklausys nuo to, ar bus sumažinta tarša, t. y. ar teršalai aplinkoje ir jų biologinis poveikis neviršys priimtinių slenkstinių ribų. Tuo siekiama užtikrinti, kad teršalų biologinis poveikis nedarys reikšmingos įtakos ir nesukels rizikos jūrinei aplinkai. Siekiant įgyvendinti šį uždavinį, taip pat reikia atlikti kompleksinį vertinimą.

Taigi kompleksinė pavojingų medžiagų ir jų efektų stebėseną – tai svarbus žingsnis mūsų ateities tikslo link, siekiant, kad Baltijos jūros aplinka nebūtų paveikta pavojingų medžiagų.

Darbo tikslas ir uždaviniai. Šio darbo tikslas – integruotas teršalų pasklidimo aplinkoje ir jų biologinio poveikio Baltijos jūros Lietuvos zonoje vertinimas.

Darbo uždaviniai:

- Apibendrinti ilgalaikių aplinkos taršos tyrimų Baltijos jūros Lietuvos zonoje duomenis.
- Aprašyti teršalų pasklidimo ypatumus Klaipėdos uosto, grunto gramzdinimo jūroje, Būtingės naftos terminalo, D-6 naftos platformos ir cheminio ginklo nuskandinimo rajonuose.
- Ištirti aplinkos taršos biožymenų jūrų organizmuose iš skirtingų pietrytinės Baltijos jūros rajonų ypatumus.
- Nustatyti sąryšio tarp teršalų ir biožymenų atsako moliuskų audiniuose ypatumus.

Darbo naujumas. Šiame darbe pirmą kartą atliktas kompleksinis Lietuvos Baltijos jūros aplinkos būklės įvertinimas remiantis teršiančiųjų cheminių medžiagų valstybinės stebėsenos ir kitų tyrimų duomenimis kartu su biologinių efektų duomenimis.

Atliktas ilgamečių teršiančiųjų medžiagų stebėsenos duomenų statistinis vertinimas taikant naują statistinių metodų rinkinį.

Atliktas laboratorinis eksperimentas, kurio tikslas – įvertinti policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) fluoranteno, pireno ir benzo(a)pireno ir jų mišinių poveikį biožymenų atsakams moliusko valgomosios midijos (*Mytilus edulis*) organizme. Eksperimente buvo tiriami bendrojo streso, oksidacinio streso, neurotoksinio, genotoksinio ir citotoksinio poveikio biožymenys. Tai buvo pirmas tokio pobūdžio eksperimentas su PAA mišiniais, kuris buvo atliktas naudojant Baltijos jūroje žemo druskingumo sąlygomis gyvenantį moliuską *M. edulis*.

Studijų metu buvo atlikti biožymenų tyrimai Kuršių marių moliusko dreisenos (*Dreissena polymorpha*) organizme ir Klaipėdos sąsiaurio daugiašerės kirmelės (*Nereis diversicolor*) organizme, kurie iki šiol nebuvo naudoti tokio pobūdžio tyrimams. *D. polymorpha* plačiai paplitusi centrinėje Kuršių marių dalyje ir gali būti tinkamas objektas biologinių efektų stebėsenai. *N. diversicolor* taip pat galėtų būti geras biologinių efektų tyrimų objektas dėl didelio paplitimo priekrantės vandenyse ir tolerancijos druskingumo pokyčiams. Buvo įsisavinti biocheminių biožymenų analizės metodai, kurie ateityje galėtų būti taikomi Lietuvoje.

Pirmas kompleksinio taršos poveikio vertinimas buvo atliktas apskaičiuojant taršos indeksus skirtinguose Lietuvos Baltijos jūros rajonuose. Vėliau buvo atliktas Lietuvos vandenų taršos pavojingomis medžiagomis aplinkos būklės vertinimas, naudojant HELCOM Cheminės būklės vertinimo įrankį (angl. *Chemical Status Assessment Tool*, toliau – CHASE). Tai yra rodikliais paremtas multimetris įrankis, specialiai sukurtas kompleksiniam Baltijos jūros aplinkos taršos vertinimui atlikti.

Mokslinė ir praktinė tyrimų reikšmė. Šis darbas atitinka HELCOM Baltijos jūros veiksmų plano ir ES Jūrų strategijos pagrindų direktyvos iškeltus tikslus – „Baltijos jūros aplinka nepaveikta pavojingų medžiagų“ ir „teršalų koncentracijos lygis yra toks, kad nesukelia taršos poveikio“. Norint pasiekti šiuos tikslus, būtina atlikti kompleksinį Baltijos jūros aplinkos būklės vertinimą. Šiems tikslams sukurtas HELCOM Cheminės būklės vertinimo įrankis CHASE buvo panaudotas kompleksiškai vertinant Lietuvos Baltijos jūros rajonų aplinkos taršą.

Atsiranda vis daugiau moksliniais tyrimais pagrįstų įrodymų, kad biologinių efektų tyrimai yra svarbūs. Šis darbas yra dar vienas biologinių efektų tyrimų svarbos įrodymas ir tokio pobūdžio tyrimų įtraukimo į valstybinės stebėsenos programą aktualumo patvirtinimas.

Ginamieji teiginiai

1. Baltijos jūros Lietuvos zonoje aptinkamos kai kurių teršalų koncentracijų ilgametės tiek didėjimo, tiek mažėjimo tendencijos.
2. Klaipėdos uostas, Būtingės naftos terminalas, iškasto grunto Baltijos jūroje gramzdinimo rajonas, Rusijos naftos platforma D-6 ir nuskandintas cheminis ginklas – potencialūs taršos šaltiniai Baltijos jūros Lietuvos zonoje.
3. Arsenas yra cheminio ginklo medžiagų patekimo į aplinką indikatorius.

4. *Mytilus edulis*, *Macoma balthica*, taip pat *Dreissena polymorpha* ir *Nereis diversicolor* yra informatyvūs biologinių efektų tyrimų objektai Baltijos jūros Lietuvos zonoje.
5. *M. edulis* ir *M. balthica* yra jautrūs genotoksinių ir citotoksinių efektų bioindikatoriai Baltijos jūroje.
6. Policikliniai aromatiniai angliavandeniliai ir jų mišiniai sukelia įvairių biožymenų atsakus moliusko *M. edulis* organizme.
7. Integruotas cheminių ir biologinių parametrų vertinimas – naudingas įrankis vertinant jūrinių ekosistemų cheminę būklę.

Rezultatų aprobavimas ir publikacijos. Šio darbo rezultatai paskelbti keturiuose straipsniuose Lietuvos ir užsienio moksliniuose recenzuojamuose žurnaluose. Disertacijos tema skaityti 7 pranešimai regioninėse ir tarptautinėse konferencijose bei simpoziumuose: Europos ir JAV tarptautiniame simpoziume „Kompleksinės vandenynų stebėjimo sistemos globalioms ir regioninėms ekosistemoms valdyti, naudojant jūrinius tyrimus, stebėseną ir technologijas“ (Klaipėda, 2006), tarptautinėje Baltic Sea Breeze konferencijoje „Baltijos jūra ateities kartoms“ (Palanga, 2007), mokslinėje konferencijoje „Naftos ir kitų aplinką teršiančių medžiagų biodegradacija“ (Vilnius, 2007), JAV ir Europos Baltijos tarptautiniame simpoziume „Vandenynų stebėjimai, ekosisteminis valdymas ir prognozė“ (Talinas, 2008), tarptautiniame seminare dėl nuskandinto jūroje cheminio ginklo „Tarptautinio bendradarbiavimo perspektyvos“ (Vilnius, 2008), 3-iojoje mokslinėje-praktinėje konferencijoje „Jūros ir krantų tyrimai“ (Nida, 2009), 15-ajame tarptautiniame simpoziume dėl teršalų atsako jūriniuose organizmuose PRIMO 15, (Bordo, 2009).

Disertacijos struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Tyrimų rezultatai, Rezultatų aptarimas, Išvados, Literatūros sąrašas, paskelbtų darbų sąrašas, Priedas. Disertacijos apimtis – 202 puslapiai. Tekste pateikti 63 paveikslai ir 17 lentelių. Literatūros sąrašą sudaro 244 šaltiniai, autorės publikacijų sąrašas – 4 publikacijos.

Padėkos. Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei habil. dr. Janinai Baršienei už jos energiją, tikėjimą manimi, didelę pagalbą, rūpinimąsi, už šiltus ir taip reikalingus žodžius. Ypač dėkoju moksliniam konsultantui doc. dr. Algirdui Stankevičiui už nuolatinį palaikymą, skatinimą, rūpestį ir vertingus mokslinius bei gyvenimo patarimus. Taip pat dėkoju habil. dr. Janinai Šyvokienei ir dr. Nijolei Kazlauskienei už disertacijos recenzavimą, už vertingus komentarus ir pasiūlymus, kurie ženkliai pagerino mano darbą. Dėkoju ir labai vertinu dr. Lauros Andreikėnaitės ir dr. Aleksandro Rybakovo pagalbą ir patarimus. Esu labai dėkinga savo kolegoms iš buvusio Jūrinių tyrimų centro, ypač Giedriui Ežerskiui, Giedriui Mačerniui, Justinui Baltrėnui, Adomui Vildžiūnui, taip pat mokslinių tyrimų laivų „Vėjas“ ir „Gintaras“ įguloms už mėginių paėmimą, Hidrochemijos skyriaus specialistams už cheminę analizę, taip pat Neringai Stončaitienei už žemėlapius, Aistei Kubiliūtei už naudingus patarimus, Nijolei Remeikaitei-Nikienei už lingvistines konsultacijas ir draugišką raginimą. Dėkoju dr. Jelenai Kusakinai už palaikymą ir lingvistinę pagalbą. Labai vertinu naudingus dr. Anastasijos Zaiko patarimus ir jos pagalbą taikant statistinius metodus. Dėkoju dr. Nerijui Nika už pastabas

santraukai. Dėkoju Jūrinės aplinkos laboratorijos (TATENA) darbuotojams, o ypač Stephen'ui de Mora, Eric'ui Wise ir Sabine'ai Azemard. Nuoširdžiai dėkoju dr. Kari'ui Lehtonen'ui už galimybę dirbti laboratorijoje, taip pat Raisa'i Turja, Anna'i Packalen ir kitiems Jūrinių tyrimų laboratorijos darbuotojams (Suomijos aplinkos institutas, SYKE). Dėkoju prof. Anders'ui Bignert'ui už jo susidomėjimą ir pagalbą analizuojant ilgamečius duomenis. Esu dėkinga HELCOM Sekretariatui už galimybę dalyvauti projektuose ir kitose veiklose. Dėkoju daugybei kitų žmonių, kurie dirbo su manimi, padėjo ir palaikė mane. Dėkoju savo draugams: Raimondai ir Sauliui, Anzhelikai ir Vitalijui, Anastasijai ir Arturui, Marinai, Viktorui, Monikai. Ypač dėkoju savo šeimai – tėvams ir seneliams – už kantrybę, supratimą ir paskaitinimą ne tik moksluose bet ir kitose mano gyvenimo srityse. Didžiausią padėką skiriu savo vyrui Olegui – Tu visada tikėjai manimi, palaikydavai visus mano sumanymus, apsaugodavai mane nuo rūpesčių. Su Tavimi buvo lengva gyventi. Ačiū Tau už meilę. Skiriu šį savo darbą Tavo atminimui.

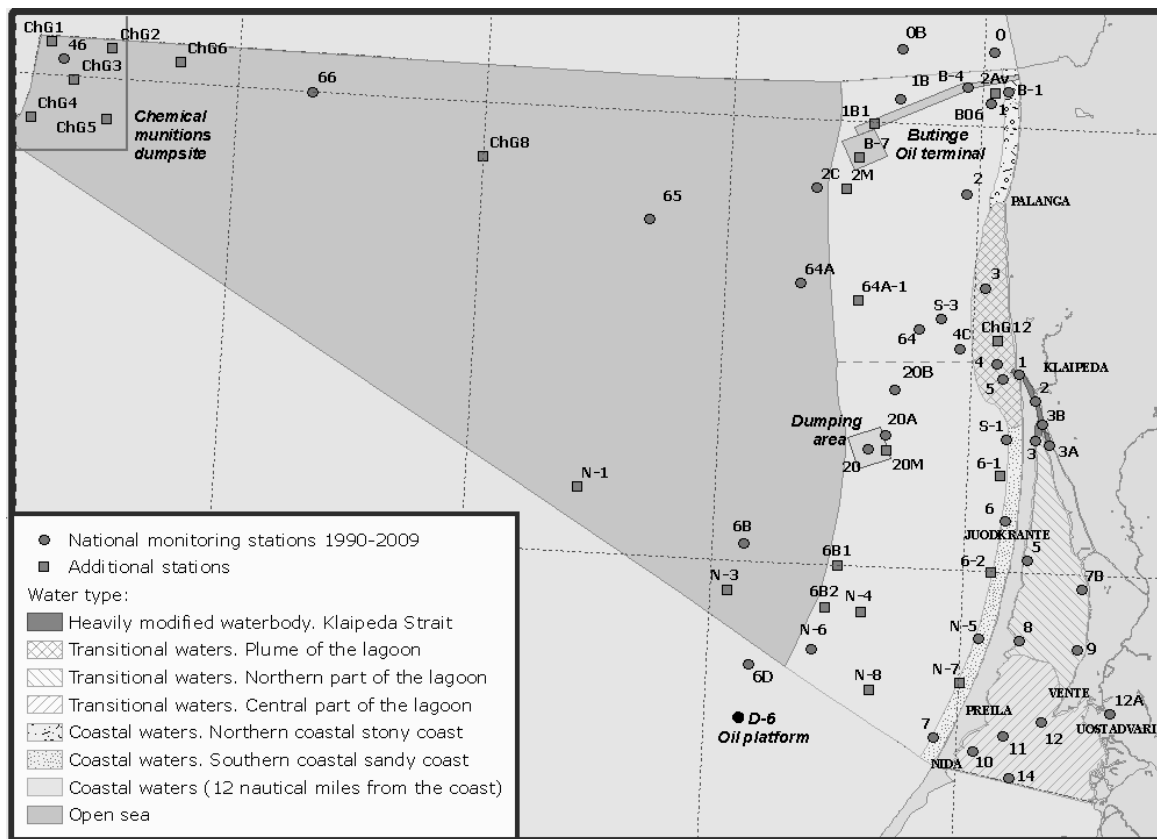
Už galimybę studijuoti doktorantūroje dėkoju Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto vadovybei. Už finansinę paramą dėkoju Lietuvos valstybiniam studijų fondui. Stažuotes parėmė Tarptautinė atominės energijos agentūra (TC projektas RER/0/016) ir Suomijos akademija.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje aprašoma Baltijos jūros ekosistema ir jos pažeidžiamumas. Aprašomi aktualiausi teršalai, tokie kaip sunkieji metalai, naftos angliavandeniliai, policikliniai aromatiniai angliavandeniliai (PAA), chlororganiniai junginiai, organiniai alavo junginiai ir kitos teršiančiosios medžiagos. Aptariama cheminio ginklo, nuskandinto Baltijos jūroje, problema. Aprašomas teršalų poveikis gyviesiems organizmams ir tokie biožymenys kaip lizosomų membranų stabilumas (LMS), acetylcholinesterazės inhibicija (AChE), etoksiresorufino O-deetilazės (EROD) aktyvumas, metalotionino indukcija (MT), PAA metabolitai tulžyje, neutralių lipidų akumuliacija, katalazės (KAT) ir glutation-S-transferazės (GST) aktyvumas, mikrobranduolių dažnis (MB) ir kiti. Taip pat šiame skyriuje aprašomas kompleksinis aplinkos būklės vertinimas.

MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimo rajonas. Lietuvos vandenys skirstomi į 4 skirtingus tipus: tarpiniai vandenys (centrinė ir šiaurinė Kuršių marių dalys ir Kuršių marių vandenų poveikio rajonas Baltijos jūroje), stipriai pakeistas vandens telkinys (Klaipėdos sąsiauris), priekrantės vandenys (šiaurinė akmenuota priekrantė bei pietinė smėlėta priekrantė) ir atvira jūra (1 pav.).



1 pav. Vandenų tipai, stebėsenos ir kitos tyrimų stotys Baltijos jūros Lietuvos zonoje ir Kuršių mariose

Fig. 1. Water types, monitoring and study stations in the Lithuanian part of the Baltic Sea and Curonian Lagoon

Mėginių ėmimo ekspedicijos. Šiame darbe naudojami stebėsenos ir kitų studijų bei projektų duomenys: valstybinės stebėsenos (1990–2009) duomenys (Baltijos jūros – 46, 66, 65, 64A, 2C, 6B, 0B, 0, 6D, 1B, B-4, B-1, 1, 2, 3, S-3, 64, 4C, 4, 5, 20B, 20A, 20, S-1, 6, N-5, 7, N-6 stotys; Kuršių marių – 10, 14, 12, 12A, 8, 9, 7B, 5, 3A, 3, 3B, 2, 1 stotys), nuskandinto cheminio ginklo rajono (2003–2004) tyrimų rezultatai (ChG1, ChG2, ChG3, ChG4, ChG5, ChG6, ChG8, ChG11, ChG12, 66 (ChG7), 65 (ChG9), 6B, B-1, S-3, 64 (ChG10), 4 (ChG13), 5 (ChG14), 20A, 20, S-1, 6, N-5, 7, N-6 stotys), Lietuvos ir Suomijos projekto „Lietuvos teritorinių vandenų ir ekonominės zonos, esančios šalia Rusijos naftos platformos D-6, aplinkos būklės vertinimas“ (2005–2006) (65, N-1, 6B (N-2), N-3, N-4, N-5, N-6, N-7, N-8, 7 (N-9), 4, 6 stotys) bei „LIFE Nature“ projekto „Jūrinės saugomos teritorijos rytinėje Baltijos jūros dalyje“ (2006) (1B, B-4, 1B-1, B-7, 2M, 2, 3, 64A-1, 20A, 20, 20M, S-1, 6-1, 6, 6-2, N-5, 7, N-6, N-8, N-4, 6B2, 6B1 stotys) rezultatai, genotoksinių ir citotoksinių efektų dvigeldžiuose moliuskuose (2006) (65, 1B, B06, 20M, N-4, N-8), naftos išsiliejimo Būtingėje (2008) (1B, B-7, 2AV, 1, 2, Palanga), biožymenų kai kuriuose bestuburiuose Lietuvos priekrantės vandenyse (2008) (Baltijos jūroje – 65, 1B, 7; Kuršių mariose – 12, 2 stotys) ir dioksinų bei alavo junginių Lietuvos priekrantės dugno nuosėdose (2008) (Baltijos jūroje – 65, 4, 20, 7; Kuršių mariose – 3B, 2 stotys) tyrimų rezultatai, taip pat HELCOM

projekto „Pavojingų medžiagų tyrimai rytinėje Baltijos jūros dalyje“ (2008–2009) (65, 4 stotys) duomenys.

Analizės metodai

Cheminė analizė. Sunkiųjų metalų (Cd, Pb, Cu, Cr, Ni, As) vandenyje, dugno nuosėdose ir biotoje tyrimai buvo atlikti elektroterminės atominės absorbcijos spektrometrijos metodu. Zn ir Fe tyrimai atlikti liepsninės atominės absorbcijos spektrometrijos metodu. Mėginių mineralizacija atlikta su azoto rūgštimi Cd, Pb, Cu, Cr, Ni ir Zn analizei; As ir Fe analizei su fluoro ir azoto rūgštimis. Hg koncentracijos vandenyje, dugno nuosėdose ir biotoje tyrimai atlikti atominės absorbcijos spektrometrijos šaltų garų metodu.

Chlororganinių pesticidų (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, DDT, DDD, DDE, α -endosulfano, β -endosulfano, aldrino, diendrino, endrino, HCB) vandenyje, dugno nuosėdose ir biotoje tyrimai atlikti dujų chromatografijos metodu, naudojant elektronų gaudymo detektorius.

Naftos angliavandenilių tyrimai vandenyje atlikti infraraudonųjų spindulių metodu. Nuo 2008 metų šis metodas buvo pakeistas dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi.

As ir Fe tyrimai atlikti Jūrinės aplinkos laboratorijoje, TATENA, Monake, kitų junginių tyrimai – Jūrinių tyrimų centro laboratorijoje.

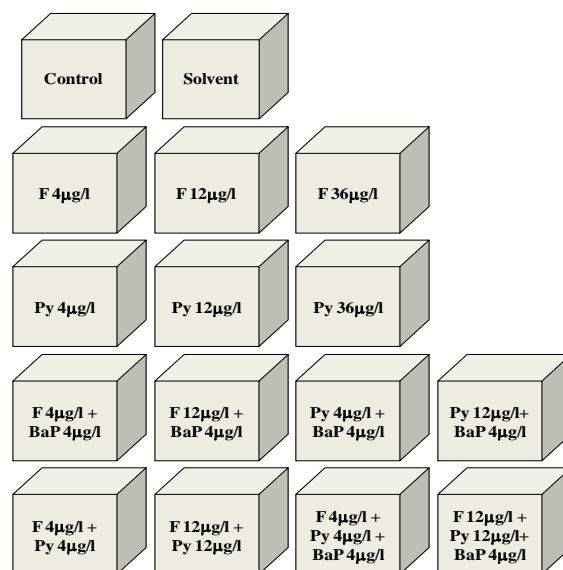
Biocheminių biožymenų tyrimai. Oksidacinio streso biožymenys – katalazė (KAT), glutation-S-transferazė (GST), glutation reduktazė (GR), superoksido dismutazė (SOD) ir lipidų peroksidazė (LPO) buvo tirti moliuskų virškinimo liaukoje, o neurotoksinių efektų biožymuo acetilcholinesterazė buvo tirta moliuskų žiaunose arba kojoje. Tyrimai buvo atlikti pagal procedūras, patvirtintas Suomijos aplinkos instituto Jūrinių tyrimų laboratorijoje.

Genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai. Dvigeldžių moliuskų ląstelių preparatai buvo ruošiami ir jų mikroskopinė analizė atliekama pagal anksčiau aprašytas metodikas (Baršienė et al., 2004). Genocitotoksiniai efektai buvo nagrinėjami Olympus BX 51 mikroskopu, naudojant 1000 \times padidinimą. Mikrobranduolių (MB), branduolio pumpurų (BP), fragmentuotų-apoptozinių (FA) ir dvibranduolių (DB) ląstelių identifikavimas atliktas pagal Fenech ir bendraautorių (2003) aprašytus kriterijus. Tyrimai atlikti Ekologijos instituto Genotoksikologijos laboratorijoje.

Laboratorinis eksperimentas. Eksperimentas buvo atliekamas Suomijos jūrinių tyrimų institute. Po aklimatizacijos po 30 *Mytilus edulis* moliuskų buvo įdėta į 16 akvariumų su 5 litrais filtruoto vandens. Eksperimentui naudojami: kontrolė (vanduo be chemikalų), kontrolė su tirpikliu, trys akvariumai – vanduo su įterptu fluorantenu (F) (4, 12, 36 $\mu\text{g l}^{-1}$), trys su pirenu (Py) (4, 12, 36 $\mu\text{g l}^{-1}$), du su mišiniais F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) ir benzo(a)pirenu (BaP) (4 $\mu\text{g l}^{-1}$ – pastovi koncentracija visuose akvariumuose su BaP), du akvariumai su mišiniais Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) ir BaP (4 $\mu\text{g l}^{-1}$), du akvariumai su mišiniais F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) ir Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$), du akvariumai su mišiniais F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$), Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) ir BaP (4 $\mu\text{g l}^{-1}$) (2 pav.). Eksperimento trukmė – 48 val. Po 48 val. buvo atlikti

biožymenų KAT, GST, GR, SOD, LPO, AChE, MB, BP, FA ir DB tyrimai moliuskų organizmuose.

Matematinė ir statistinė duomenų analizė. Duomenys buvo analizuojami naudojant paprastąją regresiją, neparametrinius Mann-Kendall, Kruskal-Walis, Mann-Whitney testus, faktorinę dispersinę analizę (ANOVA). Policiklinių aromatinių angliavandenilių įtakos biožymenų atsakams vertinimui panaudota multifaktorinė statistinė analizė (RDA). Integruotas biožymenų atsako indeksas apskaičiuotas pagal Broeg, Lehtonen (2006). HELCOM Cheminės būklės vertinimo įrankis (CHASE) naudotas kompleksiniam aplinkos būklės vertinimui atlikti.



2 pav. Eksperimento schema. Parodytos suminės PAA koncentracijos

Fig. 2. Scheme of the experiment. Summed concentrations of PAHs are shown

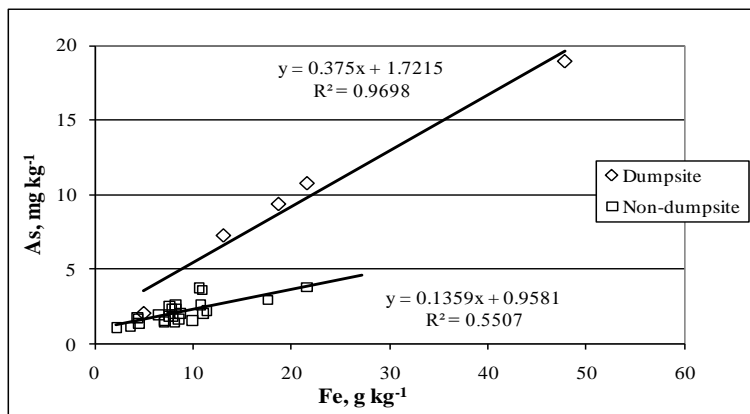
REZULTATAI

Teršalai Baltijos jūroje. Ilgamečių tyrimų duomenys rodo nuo 1995–1996 metų tolygų **gyvsidabrio** koncentracijų mažėjimą vandenyje; nuo 1999–2000 metų stebimas gyvsidabrio koncentracijų mažėjimas žuvų ir moliuskų organizmuose.

Kadmio koncentracija vandenyje 2005–2009 metais dažnai viršijo aplinkos kokybės standartą (AKS) ($0,2 \mu\text{g l}^{-1}$). 2009 metais šiaurinės priekrantės vandenyse Cd koncentracija 13 % vandens mėginiuose viršijo AKS, 8 % – atviroje jūroje, 13 % – Kuršių marių vandens įtakos zonoje ir 13 % – pietinės priekrantės vandenyse. Nuo 2005–2006 metų mažėjo **vario, chromo, nikelio** ir **švino** koncentracijos iškasto grunto gramzdinimo jūroje rajono bei Kuršių marių dugno nuosėdose.

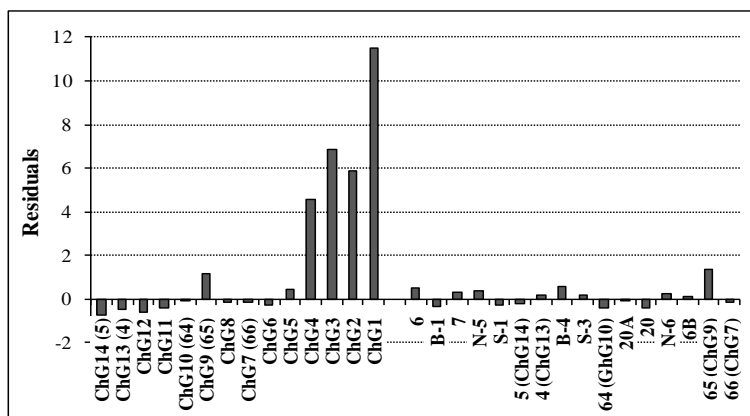
Arseno koncentracija dugno nuosėdose svyravo nuo 1,1 iki $19,0 \text{ mg kg}^{-1}$. **Geležies** koncentracija svyravo nuo 2,2 iki $47,8 \text{ g kg}^{-1}$ (vidurkis – $10,7 \text{ g kg}^{-1}$). Vertinant metalų koncentracijų pasiskirstymą dugno nuosėdose, dažnai taikomi normalizavimo metodai. Geležis dažnai naudojama sunkiųjų metalų pasiskirstymui jūrinėse dugno nuosėdose normalizuoti (Whalley et al., 1999). Arseno koncentracijų priklausomybė nuo geležies

parodyta 3 paveiksle. Aiškiai matomos dvi atskiros tendencijos: mėginiai iš cheminio ginklo nuskandinimo vietos ir kitų rajonų mėginiai; abi duomenų grupės turi gerus koreliacijos koeficientus. 4 paveiksle parodyta kiekvienos stoties arseno liekamoji paklaida. Didesnių arseno koncentracijų randama keturiuose mėginiuose iš cheminio ginklo nuskandinimo vietos, ypač ChG1 stotyje.



3 pav. Koreliacija tarp Fe ir As koncentracijų Baltijos jūros dugno nuosėdose

Fig. 3. Correlation between Fe and As in the Baltic Sea sediments



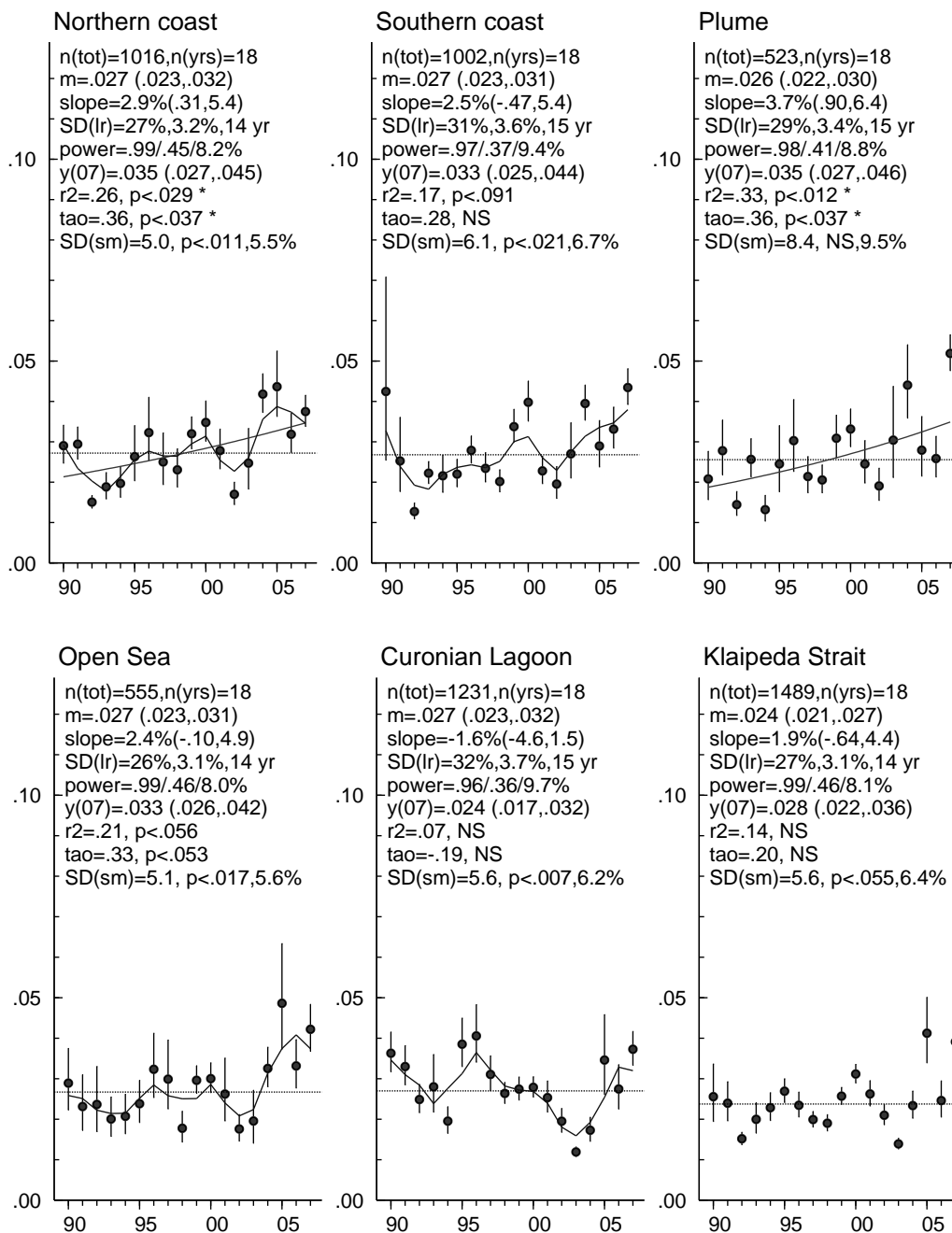
4 pav. Arseno, normalizuoto pagal geležį, liekamoji paklaida

Fig. 4. Residual arsenic normalized to iron

Naftos angliavandenilių koncentracijų (1990–2007) vandenyje analizės rezultatai parodė statistiškai patikimas didėjimo tendencijas šiaurinės priekrantės vandenyse ir Kuršių marių vandenių išplitimo zonoje (5 pav.). Kituose Lietuvos Baltijos jūros rajonuose statistiškai patikimų tendencijų nebuvo aptikta.

Siekiant nustatyti taršos **PAA** šaltinį, pasirinkus atskirus PAA junginius, buvo skaičiuojami įvairūs indeksai. Dugno nuosėdų atžvilgiu apskaičiuoti indeksai rodo, kad PAA Lietuvos Baltijos jūroje yra ir pirolitinės, ir petrogeninės kilmės. Net trys apskaičiuoti indeksai atskleidė, kad PAA šaltinis 6, 7, N-5, B-7, N-6 ir 6B2 stotyse yra petrogeninis (atsiranda aplinkoje dėl laivų arba naftos platformų taršos). 1B, N-4, 3, 20M, 64A-1 stotyse buvo aptikta didesnė palyginti su kitomis stotimis suminė PAA

koncentracija. Apskaičiuotas indeksas rodo, kad dominuojantis PAA šaltinis šių stočių dugno nuosėdose – dyzeliniai varikliai.



5 pav. Naftos angliavandenilių koncentracija skirtinguose pietrytinės Baltijos jūros rajonuose

Fig. 5. Concentration of total hydrocarbons in different types of waters of the south-eastern Baltic Sea

Tyrimų duomenys (1997–2009) rodo **chlororganinių pesticidų DDT** ir heksachlorcikloheksano (HCH) bei jų metabolitų koncentracijų vandenyje ir dugno nuosėdose mažėjimą. Ilgamečiai tyrimai rodo, kad DDT koncentracijos moliuskų *M. balthica* ir *M. edulis* organizmuose nekinta – apie $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ drėgnojo svorio (dr. sv.). Kuršių mariose DDT koncentracija *D. polymorpha* moliuskų audiniuose yra apie

1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dr. sv. Aukštesnių DDT ir jo metabolitų koncentracijų buvo aptikta žuvies *Clupea harengus* raumenyse: 4,4'-DDT – 1,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dr. sv., 4,4'-DDD – 4,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dr. sv., 4,4'-DDE – 12,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dr. sv. Tai paaiškinama tuo, kad strimelių riebalų kiekis, kuriame akumuliuojasi DDT ir jo metabolitai, yra didesnis nei kitų žuvų.

Polichlorintų bifenių (PCB) (28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) koncentracijos vandenyje ir dugno nuosėdose 2008 metais neviršijo metodo nustatymo ribų. Pagal tyrimų rezultatus, didžiausia suminė **dioksinų tipo PCB** koncentracija buvo nustatyta Klaipėdos uoste, šioje stotyje aptikta ir didžiausia koncentracija pagal toksinio ekvivalentiškumo veiksnį – TEF 0,076 ng kg^{-1} sausojo svorio (s. sv.). Remiantis tyrimų rezultatais didžiausia suminė **dioksinų ir furanų** koncentracija buvo nustatyta iškasto grunto gramzdinimo vietoje, tačiau šioje stotyje aptikti mažiausiai toksiškų junginių – PCDD/F TEF 0,199 ng kg^{-1} s. sv. Didžiausias toksinio ekvivalentiškumo veiksnys buvo nustatytas 65 stotyje – 0,438 ng kg^{-1} s. sv.

Organinių alavo junginių 2008 metais buvo aptikta trijose stotyse: 3B stotyje prie Malkų įlankos – čia buvo aptikta didžiausia tributilalavo koncentracija (57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv.) ir rasta dibutilalavo (3,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv.), 2 stotyje Klaipėdos sąsiauryje (tributilalavo koncentracija – 8,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv.) ir 20 stotyje iškasto uoste grunto gramzdinimo rajone jūroje (tributilalavo koncentracija – 2,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv.). Kitose stotyse organinių alavo junginių koncentracijos dugno nuosėdose neviršijo metodo nustatymo ribos (1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv.).

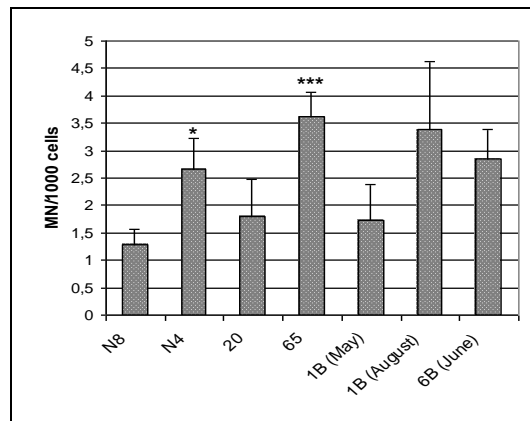
Biocheminių biožymenų tyrimai Lietuvos priekrantėje. Mažiausias AChE aktyvumas buvo moliusko *Dreissena polymorpha* organizme – 0,58 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino. AChE aktyvumas *Nereis diversicolor* organizme buvo $32,7 \pm 11,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino. Tačiau buvo stebimas didelis AChE reikšmių vidurūšinis ir vidupopuliacinis kintamumas, ypač 7 stoties moliusko *Macoma balthica* organizme.

GST aktyvumas svyravo nuo $132,2 \pm 37,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino kirmėlės *N. Diversicolor* organizme iki $339,6 \pm 52,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino moliuske *M. edulis* ir $717,5 \pm 192,6$ ir $1034 \pm 82 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino moliuske *M. balthica* atitinkamai 65 ir 7 stotyse. KAT svyravo nuo $74,2 \pm 41,0 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino kirmėlėje iki $104 \pm 20 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino moliuske *M. edulis*, bei $89,4 \pm 15,1$ ir $114 \pm 15 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino *M. balthica* moliusko organizme atitinkamai 65 ir 7 stotyse. SOD aktyvumas keitėsi nuo $4,2 \pm 2,0$ ir $11,1 \pm 1,8 \text{ vnt. min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino *M. balthica* moliuske 65 ir 7 stotyse, iki $11,0 \pm 8,7 \text{ vnt. min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino moliusko *M. edulis* organizme, bei $10,7 \pm 3,8 \text{ vnt. min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteino kirmėlės *N. diversicolor* audiniuose. LPO svyravo nuo $67,5 \pm 7,3 \text{ nmol g}^{-1}$ dr. sv. kirmėlės *N. diversicolor* audiniuose, iki $158 \pm 71 \text{ nmol g}^{-1}$ dr. sv. moliusko *M. edulis* audiniuose ir 179 ± 38 bei $190 \pm 54 \text{ nmol g}^{-1}$ dr. sv. moliusko *M. balthica* organizme iš 7 ir 65 stočių atitinkamai.

Aplinkos genotoksinis ir citotoksinis poveikis moliuskų *Macoma balthica* ir *Mytilus edulis* organizmams. Mikrobranduolių dažnis (MB/1000 ląst.) *M. balthica* žiaunų ląstelėse 2006 m. gegužės mėn. svyravo nuo 1,28 iki 3,63 ‰, *M. edulis* – nuo 1,74 iki 3,38 ‰ (6 pav.). Mikrobranduolių foninis dažnis nustatytas moliusko *M. balthica* organizme iš priekrantės N-8 stoties. Reikšmingai padidėjęs genotoksiškumas aptiktas moliusko *M. balthica* organizme N-4 (P = 0,0155) ir 65

($P = 0,0003$) stotyse. Panašus aplinkos genotoksiškumo lygis taip pat buvo nustatytas Būtingės naftos terminalo rajone.

Mikrobranduolių dažnis 1B stoties moliuskų organizmuose buvo tirtas 2006 m. gegužės ir rugpjūčio mėnesiais. Rugpjūčio mėnesį vidutinis MB dažnis (3,38 ‰) buvo du kartus aukštesnis negu gegužės mėn. (1,74 ‰). Mikrobranduolių dažnis individuose iš 6B stoties birželio mėn. buvo lygus 2,86 ‰ (6 pav.).



6 pav. Mikrobranduolių dažnis žiaunų ląstelėse moliuskų *M. balthica* ir *M. edulis* iš Lietuvos zonos Baltijos jūroje. Parodyti statistiškai reikšmingi skirtumai nuo foninės N-8 stoties: viena žvaigždutė – $P < 0,05$, trys žvaigždutės – $P < 0,0001$

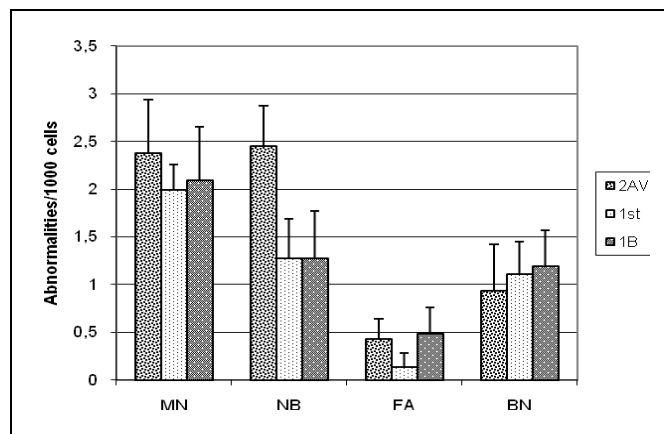
Fig. 6. Frequency of micronuclei in gill cells of *M. balthica* and *M. edulis* mussels from different study locations in the Lithuanian zone of the Baltic Sea. Differences between the reference station N-8 and other locations: one asterisk at level $P < 0.05$, three asterisks – $P < 0.0001$

Lietuvos Baltijos jūros rajono moliuskuose taip pat buvo analizuotos ir kitos branduolio pažaidos. *M. balthica* ląstelėse branduolio pumpurų dažnis (BP/1000 ląst.) svyravo nuo 0,50 iki 1,49 ‰, fragmentuotų-apoptozinių ląstelių (FA/1000 ląst.) – nuo 0,53 iki 1,72 ‰, dvibranduolių ląstelių (DB/1000 ląst.) – nuo 1,51 to 2,23 ‰. Aukščiausi BP dažniai buvo stebimi *M. edulis* ląstelėse gegužės mėn. 1B stotyje, FA ląstelių – B1 stotyje rugpjūčio mėn., DB ląstelių – moliuskų organizmuose iš 65 stoties.

Būtingės naftos išsiliejimas. Moliuskuose, surinktuose 2008 m. vasario 11-12 dienomis – praėjus 12 dienų po naftos išsiliejimo Būtingės naftos terminale – MB dažnis svyravo nuo 1,99 iki 2,38 ‰, BP dažnis – nuo 1,28 iki 2,45 ‰, FA ląstelių – nuo 0,14 iki 0,49 ‰, DB ląstelių – nuo 0,94 iki 1,20 ‰. Žemiausi MB, BP ir FA ląstelių dažniai buvo nustatyti moliuskuose, surinktuose 1 stotyje (7 pav.). Didžiausias genotoksiškumo atsakas (4,83 ‰ MB ir BP) buvo stebimas moliuskuose, surinktuose 2AV stotyje, kurioje taip pat buvo nustatyta padidinta naftos angliavandenilių koncentracija vandenyje (iki $0,11 \text{ mg l}^{-1}$).

Branduolio pažaidų analizė moliuskų žiaunose buvo atlikta ir gegužės mėn., t. y. praėjus trimis mėnesiams po naftos išsiliejimo, siekiant nustatyti aplinkos genotoksinio ir citotoksinio poveikio pokyčius laike. Gauti rezultatai atskleidė panašų genotoksiškumo ir padidėjusį citotoksiškumo lygį 1 ir 2 stotyse, kaip ir 2008 m. vasario mėn. Ilgamečių

tyrimų metu stotis prie Palangos buvo naudojama kaip foninė. Genotoksiškumo ir citotoksiškumo rezultatų palyginimas su foninės Palangos stoties rezultatais parodė statistiškai patikimą MB ($P = 0,0036$) ir FA ($P = 0,0286$) ląstelių padidėjimą moliuskų, surinktų 2 stotyje, bei BP ($P = 0,0264$) ląstelių padidėjimą moliuskų iš 1 stoties organizmuose.

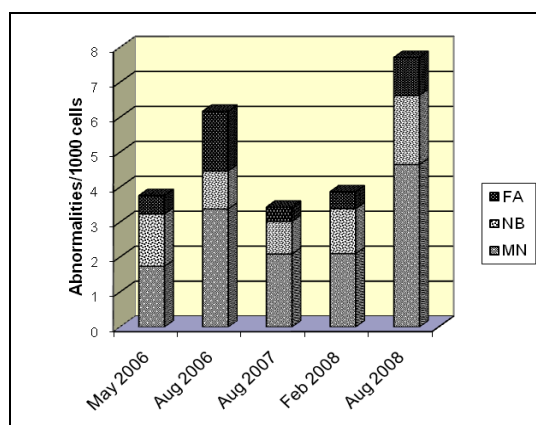


7 pav. Mikrobranduolių (MB), branduolio pumpurų (BP), fragmentuotų-apoptozinių (FA) ir dvibranduolių (DB) ląstelių dažniai moliusko *M. edulis* žiaunų ląstelėse 2008 m. vasario mėn. po naftos išsiliejimo

Fig. 7. Frequency of micronuclei (MN), nuclear buds (NB), fragmented-apoptotic (FA) and binucleated (BN) cells in gills of *M. edulis* mussels collected in February after the oil spill

Praėjus 6 mėnesiams po naftos išsiliejimo, taip pat buvo nustatytas didelis aplinkos genotoksinis ir citotoksinis poveikis moliuskų, surinktų 2008 m. rugpjūčio mėn., organizmams. Moliuskų iš 1, 1B ir Palangos stoties žiaunų ląstelių branduolio pažaidų dažniai svyravo: MB nuo 3,74 iki 6,06 ‰, BP nuo 1,69 iki 2,65 ‰, FA nuo 0,97 iki 1,96 ‰, DB nuo 1,38 iki 2,36 ‰. Palyginus su fonine Palangos stotimi (2007 m. birželio mėn.) buvo nustatytas statistiškai reikšmingas padidėjimas MB visų trijų stočių moliuskų organizmuose.

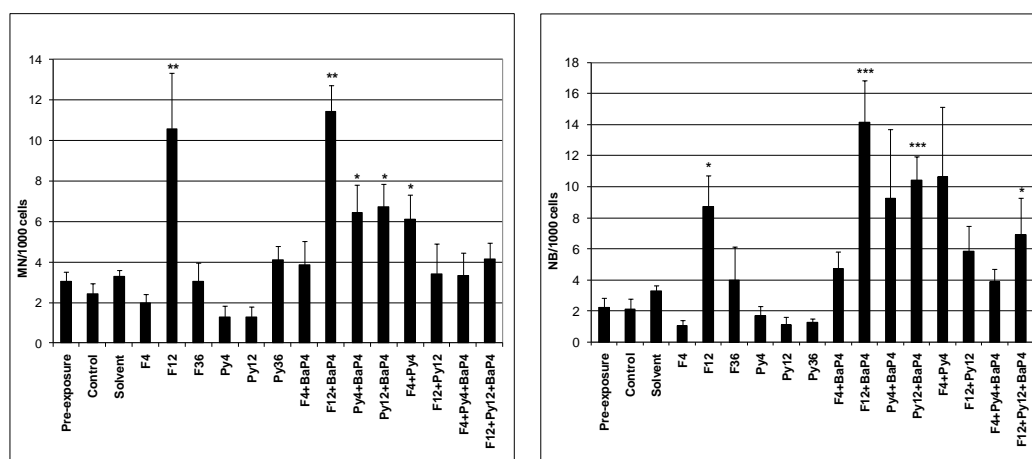
Moliuskų organizmų genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai 1B stotyje buvo atliekami ir anksčiau – 2006 m. gegužės ir rugpjūčio mėn., 2007 m. rugpjūtį, po naftos išsiliejimo 2008 m. vasario mėn. ir tų pačių metų rugpjūtį. Žemiausias atsakas buvo nustatytas 2007 m. rugpjūtį, aukščiausias – po naftos išsiliejimo 2008 m. rugpjūčio mėn. (8 pav.). Šis padidėjimas 2008 m. buvo statistiškai patikimas ($P < 0,0001$) palyginti su 2007 m. Atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA) buvo nustatyti statistiškai patikimi MB dažnio skirtumai laike ($P = 0,0036$, $F = 4,647$).



8 pav. Branduolio pažaidų dažniai moliuskų, surinktų 2006–2008 metais 1B stotyje, žiaunų ląstelėse

Fig. 8. Incidences of micronuclei (MN), nuclear buds (NB), and fragmented-apoptotic (FA) cells in gills of mussel collected in 2006-2008 from the location 1B

Eksperimento rezultatai. Genotoksinio ir citotoksinio poveikio rezultatai eksperimentinių moliuskų žiaunose parodyti 9 ir 10 paveiksluose.

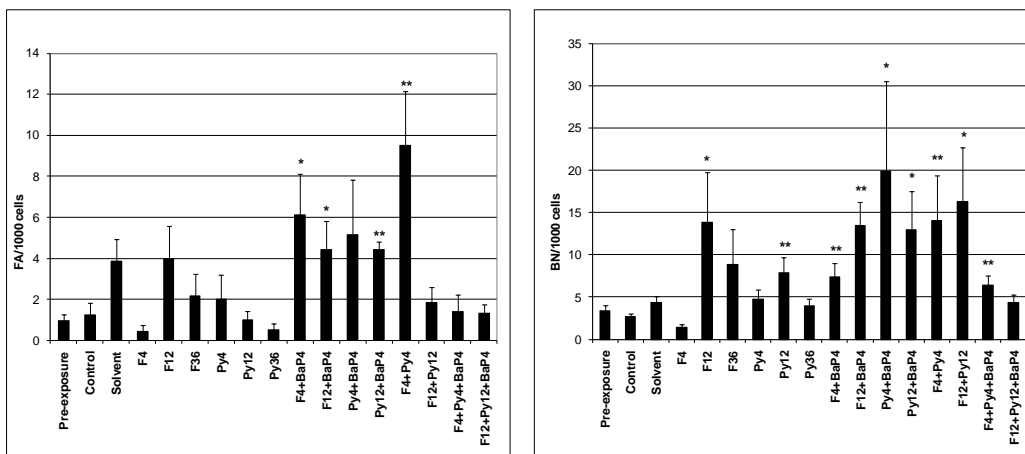


9 pav. Mikrobranduolių ir branduolio pumpurų dažniai moliuskų žiaunose po 48 val. ekspozicijos su skirtingais PAA ir jų mišiniais

Fig. 9. Frequency of micronuclei (MN) and nuclear buds (NB) in mussel gills after 48 h exposure to different PAHs and their mixtures

Benzo(a)pireno (BaP) genotoksinis ir citotoksinis poveikis buvo vertinamas lyginant moliuskų, paveiktų fluorantenu arba pirenu su atsakais paveikus šių PAA mišiniais su BaP, branduolio pažaidų dažnius. Statistiškai patikimas genotoksiškumo padidėjimas buvo nustatytas po poveikio $4 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno mišiniu su BaP. Paveikus pireno mišiniu su BaP, genotoksiškumas reikšmingai padidėjo esant $4 \mu\text{g l}^{-1}$ ir $12 \mu\text{g l}^{-1}$ pireno koncentracijoms. Statistiškai reikšmingas citotoksiškumo padidėjimas buvo nustatytas tik paveikus $4 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno mišiniu su BaP. Taigi taikant Mann-Whitney

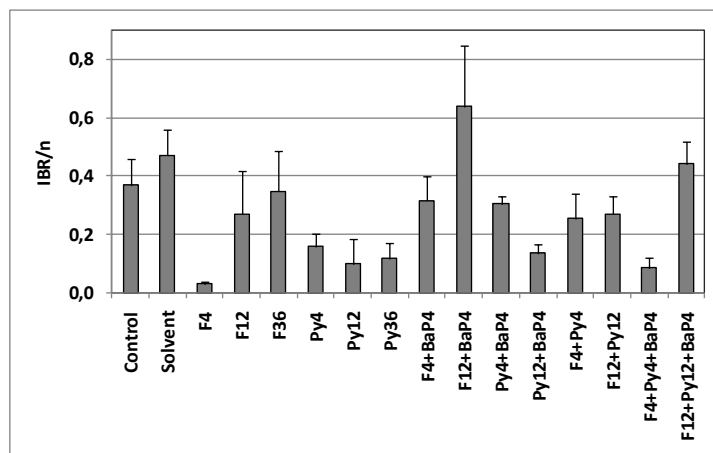
U-testą buvo nustatyta, kad mišiniuose benzo(a)pirenas gali būti provokuojantis veiksnys genotoksiniam ir citotoksiniam poveikiui moliusko *M. edulis* žiaunų ląstelėse atsirasti.



10 pav. Fragmentuotų-apoptozinių ir dvibranduolių ląstelių dažniai moliuskų žiaunose po 48 val. ekspozicijos su skirtingais PAA ir jų mišiniais

Fig. 10. Frequency of fragmented-apoptotic (FA) and bi-nucleated (BN) cells in mussel gills after 48 h exposure to different PAHs and their mixtures

Iš eksperimentinių AChE, GST, KAT, GR, SOD, LPO ir MB duomenų buvo apskaičiuoti integruoti biožymenų indeksai (IBI) (11 pav.).



11 pav. Integruoti biožymenų indeksai apskaičiuoti naudojant AChE, GST, KAT, SOD, GR, LPO ir MB biožymenų atsakų duomenis. Indeksas čia pateiktas kaip IBI/n, kur n yra biožymenų parametru, naudotų skaičiavimams, skaičius

Fig. 11. Integrated Biomarker Index (IBI), calculated using biomarker AChE, GST, CAT, SOD, GR, LPO and MN responses. IBI is given here as IBI/n, n being the number of biomarker parameters used in the calculation of the index

IBI parodė, kad paveikus fluorantenu daugumos biožymenų atsakas didėjo nuo $4 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno iki $36 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno, tačiau paveikus skirtingomis pireno

koncentracijomis didelių indekso skirtumų pastebėta nebuvo. Mišiniuose su fluorantenu stebimas BaP poveikis.

Ekspimentinių duomenų statistinė analizė (RDA) parodė statistiškai patikimą ($P < 0,05$) visų trijų kintamųjų fluoranteno, pireno ir benzo(a)pireno įtaką biožymenų atsakams (AChE, GST, KAT, GR, SOD, LPO, MB) *M. edulis* moliuskuose.

CHASE rezultatai. Įvedus į CHASE sistemą pavojingų cheminių medžiagų ir biožymenų duomenis, buvo gautos tokios Baltijos jūros Lietuvos priekrantės cheminės vandenų būklės charakteristikos: šiaurinės priekrantės vandenys – vidutinė būklė; pietinės priekrantės vandenys (be iškasto grunto gramzdinimo rajono) – vidutinė būklė; iškasto grunto gramzdinimo rajonas – vidutinė būklė; Kuršių marių vandenų išplitimo zona – vidutinė būklė; Klaipėdos sąsiauris – bloga būklė; Kuršių marios – gera būklė.

REZULTATŲ APTARIMAS

Baltijos jūros Lietuvos zonos taršos tyrimai. Valstybinės stebėsenos duomenys rodo, kad kai kurie teršalai Lietuvos Baltijos jūros rajone turi didėjimo arba mažėjimo tendencijas. Pavyzdžiui, gyvsidabris – mažėjimo tendencija stebima visuose tyrimų objektuose – vandenyje, dugno nuosėdose ir biotoje. Taip pat stebima ir pesticido DDT bei jo metabolitų DDD ir DDE mažėjimo tendencija. Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad DDT koncentracijos vandenyje ir dugno nuosėdose dažnai būna žemesnės už metodo nustatytą ribą. Tačiau šių junginių yra aptinkama biotoje. Nepaisant to, kad DDT naudoti yra uždrausta, jo vis dar aptinkama Baltijos jūros mitybos grandinėse.

Kitokia situacija nustatyta naftos angliavandenilių atveju. Naftos angliavandenilių koncentracija vandenyje didėja šiaurinės priekrantės rajone ir Kuršių marių vandenų išplitimo zonoje.

Policikliniai aromatiniai angliavandeniliai – naudingas parametras, vertinant aplinkos užterštumą naftos produktais. Stebėsenos programoje PAA pradėti tirti 2006 metais, tačiau stočių skaičius galėtų būti didesnis. Apskaičiuoti indeksai rodo, kad PAA šaltiniai Lietuvos vandenyse yra tiek pirolizinės, tiek ir petrogeninės kilmės.

Iškasto grunto gramzdinimo Baltijos jūroje rajono, Klaipėdos uosto ir Kuršių marių (šalia Nidos) dugno nuosėdos užterštos sunkiaisiais metalais. Tačiau žinoma, kad metalų koncentracija dugno nuosėdose priklauso nuo dugno nuosėdų granulometrinės sudėties. Ypač naudingos galėtų būti normalizavimo procedūros, kurios pakoreguotų foninių ir užterštų vietų koncentracijas (Kersten, Smedes, 2002). Minėtuose rajonuose dominuoja

Aukštos organinių alavo junginių koncentracijos buvo nustatomos Klaipėdos uosto dugno nuosėdose ankstesnių tyrimų metu (Dudutytė ir kt., 2007). Tačiau 2008 metais aukštų šių junginių koncentracijų aptikta nebuvo. Reikia detalesnių šių junginių tyrimų, siekiant įvertinti uosto dugno nuosėdų taršos šiais junginiais mastą, ir nustatyti, ar stebima šių junginių koncentracijų mažėjimo tendencija.

Dioksinų ir furanų dugno nuosėdose tyrimai parodė, kad šių junginių koncentracijos Lietuvos priekrantėje nėra didelės palyginti su kitais Baltijos jūros rajonais. Tačiau laikomasi nuostatos, kad šių junginių aplinkoje iš viso neturi būti.

Taršos šaltiniai Baltijos jūros Lietuvos zonoje. Klaipėdos uostas – stambus Lietuvos priekrantės taršos šaltinis. Stebėsenos duomenys rodo, kad aukštos įvairių teršalų koncentracijos aptinkamos Klaipėdos sąsiaurio vandenyje ir dugno nuosėdose.

Kartu su uoste iškastu gruntu teršalų gali patekti į Baltijos jūrą. Pavyzdžiui, tyrimų rezultatai rodo, kad organiniai alavo junginiai į jūrą pateko kartu su uoste iškastomis dugno nuosėdomis.

Naftos angliavandenilių, policiklinių aromatinių angliavandenilių ir genotoksinio bei citotoksinio poveikio tyrimai rodo, kad Būtingės naftos terminalas – aplinkos taršos naftos angliavandeniliais šaltinis. Jūrinės aplinkos tarša ir jos žalingų padarinių atsiradimas ypač padidėja avarių ir naftos išsiliejimų metu.

Kaip ir Būtingės naftos terminalas, Rusijos D-6 naftos platforma yra potencialus aplinkos teršimo naftos angliavandeniliais šaltinis. Modeliavimo rezultatai rodo, kad yra didelė tikimybė, jog įvykus avarijai nafta pasieks Lietuvos krantus (FIMR, 2007). Atliktų tyrimų rezultatai neparodė naftos platformos poveikio aplinkai, tačiau aplinkos genotoksiškumas buvo padidėjęs Lietuvos zonoje arčiausiai D-6 platformos (Baršienė ir kt., neskelbti duomenys).

Nustatytos didesnės arseno koncentracijos cheminio ginklo nuskandinimo rajone Lietuvos ekonominėje zonoje palyginti su kitais rajonais. Panaudojus geležį rezultatų normalizavimui atlikti, gautos didesnės liekamosios arseno koncentracijos cheminio ginklo rajone. Tačiau tyrimo metu nustatytos arseno koncentracijos, netgi cheminio ginklo rajono dugno nuosėdose, yra žemos palyginti su kitais tyrimais, atliktais Baltijos ir Šiaurės jūrose.

Biocheminių biožymenų tyrimai Lietuvos priekrantėje. Atlikti biožymenų tyrimai Baltijos jūros (*Mytilus edulis* ir *Macoma balthica*), Kuršių marių (*Dreissena polymorpha*) ir Klaipėdos sąsiaurio (*Nereis diversicolor*) organizmų audiniuose. Kuršių marių ir Klaipėdos sąsiaurio organizmai iki šiol nebuvo naudoti tokio pobūdžio tyrimams. Lietuvos priekrantės žuvų ir moliuskų biocheminių biožymenų tyrimų buvo atliekama labai nedaug (Baršienė et al., 2006b). Siekiant nuodugniau ištirti Lietuvos vandenų taršos biologinius efektus, reikėtų atlikti tyrimus, naudojant skirtingų rūšių organizmus, ištirti aplinkos veiksnių ir sezoniškumo įtaką biožymenų atsakui. Be to, turint daugiau pradinių duomenų, aplinkos būklės vertinimas, įvykus taršos incidentams, tampa tikslesnis ir efektyvus.

Aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo tyrimai Baltijos jūros Lietuvos zonoje. Tyrimų metų didžiausias mikrobranduolių dažnis buvo nustatytas *M. balthica* moliuskuose, surinktuose atviros jūros 65 stotyje. Mikrobranduolių santykinai aukštų dažnių aptikta midijose gyvenusiose 1B stotyje 2006 m. rugpjūčio mėn. ir makomose iš N-4 stoties. Foninis mikrobranduolių dažnis nustatytas *M. balthica* moliuskuose iš priekrantės N-8 stoties.

Naftos angliavandenilių tyrimai atskleidė, kad 2003 metais buvo nustatomos padidėjusios jų koncentracijos 65 stoties vandenyje. Ypač aukštų koncentracijų buvo aptikta 2005 metų rudenį, o 2006 metais šios stoties dugno nuosėdose buvo nustatytos didesnės sunkiųjų metalų (Cu, Pb ir Zn) koncentracijos. Organinių alavo junginių koncentracija siekė 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv., o suminė PAA koncentracija buvo 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ s. sv. (FIMR, 2007). Tyrimų stotis 1B yra šalia Būtingės naftos terminalo, kuriame epizodiškai

buvo aptinkama padidėjusių naftos angliavandenilių koncentracijų. Šios stoties moliuskų organizmuose buvo nustatyta aukštesnė Cd koncentracija, tačiau pesticido DDT koncentracijos buvo žemos. N-4 stotis yra šalia Rusijos naftos platformos D-6. Ir ankstesnių tyrimų Baltijos jūroje metu moliuskų, rinktų šalia naftos terminalų ir jūrinių uostų, organizmuose būdavo aptinkama mikrobranduolių aukštesnių dažnių (Baršienė, Baršytė Lovejoy, 2000; Baršienė, 2002).

Cheminės medžiagos, pasižyminčios genotoksiniu poveikiu, yra labai pavojingos vandens ekosistemose gyvenantiems organizmams, nes jos gali paveikti DNR molekules ir sukelti seką neigiamų biologinių pakitimų, tokių kaip fermentinis aktyvumas, sutrikęs metabolizmas, citotoksinis ir imunotoksinis poveikis, reprodukcijos sutrikimai, augimo slopinimas arba karcinogenezė (Ohe et al., 2004). Tačiau salyginai žemas biožymenų atsakas organizmuose gali būti adaptacijos prie nuolat teršiamos aplinkos, pvz., iškasto grunto gramzdinimo jūroje Lietuvos zonoje (stotis 20M), rezultatas. Taigi adaptacija prie nuolat teršiamos aplinkos turėtų būti tiriama ateityje, nes tai suteiktų naudingos informacijos siekiant įvertinti iškasto grunto gramzdinimo vietų, jūrų uostų, naftos gavybos ir perdirbimo objektų bei kitų jūrinės aplinkos antropogeniškai paveiktų zonų būklę.

Aplinkos būklės vertinimas po Būtingės naftos išsiliejimo. Lietuvos priekrantėje mikrobranduolių dažnis moliuskuose svyravo nuo 1,08 ‰ (MN/1000 ląst.) Palangos stotyje 2007 m. birželio mėn. iki 6,06 ‰ toje pačioje stotyje 2008 m. rugpjūčio mėn. Foninių lygių (1,2 ‰) Palangos stotyje buvo aptinkama ir anksčiau – 2001 m. birželio mėn., tačiau po naftos išsiliejimo Būtingės terminale 2001 m. lapkričio mėn., Palangos stotis buvo užteršta, ir genotoksiškumas 2002–2003 metais buvo padidėjęs net iki 3,0 MB/1000 ląstelių (Baršienė et al., 2004) ir buvo salyginai aukštas iki 2005 metų. Visiškai atsistatė tik 2007 m. birželio mėn. Tačiau 2008 m. sausio mėn. išsiliejus naftai, pasikartoję naftos sklaidos scenarijus, ir genotoksiškumas vėl padidėjo. Kaip to rezultatas, mikrobranduolių dažnis Palangos stotyje padidėjo net iki 6,06 ‰ ir pasiekė aukščiausią lygį 2001–2008 m. Lietuvos Baltijos jūros zonoje.

Reikia pabrėžti, kad išsiliejus naftai 2008 m., nuo 2 iki 4 kartų padidėjo kitas genotoksiškumo parametras – branduolio pumpurų dažnis palyginti su dažniu iki išsiliejimo. Dvibranduolių ląstelių atsirado du kartus daugiau, fragmentuotų-apoptozinių dažnis padidėjo iki 9 kartų.

Taigi vertinant naftos išsiliejimo poveikį jūriniam organizmams, kartu su mikrobranduoliais, buvo įrodyta kitų branduolio pažaidų vertinimo svarba. Kitų branduolio pažaidų tyrimai buvo akcentuoti aprašant ankstesnių tyrimų rezultatus (Izquierdo et al., 2003; Venier, Zampieron, 2005; Baršienė et al., 2006a, 2006c, Baršienė, Rybakovas, 2006; Baršienė, Andreikėnaitė, 2007; Koukouzika, Dimitriadis, 2008). Be to, mūsų tyrimų rezultatai parodė palyginti greitą branduolio pažaidų formavimąsi žemoje temperatūroje, kas ypač pabrėžia žalingą naftos poveikį gyviesiems organizmams, gyvenantiems vidutinio ir arktinio klimato sąlygomis.

Biožymenų tyrimai paveikus midijas PAA – laboratorinis eksperimentas. Tyrimų metų nustatyta, kad 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ benzo(a)pireno koncentracija reikšmingai padidina mažų koncentracijų pireno ir fluoranteno mišinių genotoksiškumą ir citotoksiškumą, tačiau nepadidina genotoksiškumo moliuskuose, paveiktuose 12 $\mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno mišinio.

Reikia pabrėžti, kad $12 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno koncentracija sukėlė aukštus genotoksinio ir citotoksinio poveikio atsakus. Mišinių su BaP tyrimų rezultatai parodė genotoksiškumo ir citotoksiškumo slopinimą esant aukštoms ($36 \mu\text{g l}^{-1}$) fluoranteno arba pireno koncentracijoms ir veikiant midijas visų trijų PAA mišiniu. Šie rezultatai rodo, kad eksperimente naudota $12 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranteno koncentracija midijoms buvo ribinė. Tačiau midijas paveikus $12 \mu\text{g l}^{-1}$ pireno koncentracija, jų žiaunų ląstelėse nepadidėjo MB, BP ir FA pažaidų formavimasis, ir ši ekspozicija sukėlė tik du kartus didesnę DB ląstelių susidarymą. Taigi $12 \mu\text{g l}^{-1}$ pireno koncentracija veikia ląstelių dalijimosi procesą, tačiau genotoksinio poveikio ir apoptozės procesų nesukelia.

Integruotų biožymenų indeksų analizė rodo fluoranteno poveikį neurotoksinio, oksidacinio streso ir genotoksiškumo biožymenims, be to, stebimas šio poveikio stiprėjimas. Tačiau paveikus skirtingomis pireno koncentracijomis, didelių indekso skirtumų pastebėta nebuvo. Skirtingi biožymenys parodė skirtingą atsaką. Mažos pireno koncentracijos sukelia didesnę oksidacinį stresą moliuskų organizmuose: KAT, SOD, GR ir LPO parodė didesnę atsaką esant $4 \mu\text{g l}^{-1}$ koncentracijai. O genotoksiškumo biožymuo – mikrobranduolių dažnis aptiktas didesnis paveikus $36 \mu\text{g l}^{-1}$ pireno. Taip pat buvo nustatyta BaP įtaka biožymenų atsako didėjimui PAA mišiniuose.

Kompleksinis Baltijos jūros taršos vertinimas. Šiame darbe pirmą kartą bandyta atlikti kompleksinį Baltijos jūros Lietuvos zonos aplinkos būklės įvertinimą naudojant aplinką teršiančių cheminių medžiagų valstybinės stebėsenos ir kitų tyrimų duomenis kartu su biologinių efektų duomenimis.

HELCOM Baltijos jūros veiksmų planas ir ES Jūrų strategijos pagrindų direktyva iškelia tikslus – „Baltijos jūros aplinka nepaveikta pavojingų medžiagų“ ir „Teršalų koncentracijos lygis yra toks, kad nesukelia taršos poveikio“. Norint pasiekti šiuos tikslus, visų pirma reikia atlikti kompleksinį Baltijos jūros aplinkos būklės vertinimą. Tam buvo sukurtas HELCOM Cheminės būklės vertinimo įrankis (CHASE).

Lietuvoje pirmą kartą buvo atliktas aplinkos būklės vertinimas naudojant CHASE, kuris leido plačiai ir visapusiškai įvertinti cheminę taršą. Rezultatai rodo, kad daugelyje Lietuvos vandenų rajonų aplinkos būklė vidutinė, o Klaipėdos sąsiauryje – bloga. Taigi reikia imtis priemonių pagerinti Baltijos jūros aplinkos būklę ir pasiekti nustatytus tikslus.

IŠVADOS

1. Ilgamečių tyrimų duomenys rodo tolygų gyvsidabrio koncentracijų mažėjimą vandenyje nuo 1995–1996 metų, o nuo 1999–2000 metų – gyvsidabrio koncentracijų mažėjimą žuvų ir moliuskų audiniuose. Nuo 2005–2006 metų mažėjo vario, chromo, nikelio ir švino koncentracijos iškasto grunto gramzdinimo jūroje rajono bei Kuršių marių dugno nuosėdose. Naftos angliavandenių vandenyje tyrimai (1990–2007) išryškino koncentracijų didėjimo tendenciją šiaurinės priekrantės vandenyse ir Kuršių marių vandenų išplitimo zonoje; kituose rajonuose didėjimo ar mažėjimo tendencijų nebuvo aptikta. 1997–2009 metais nustatyta pesticidų DDT ir heksachlorcikloheksano (HCH) bei jų metabolitų koncentracijų vandenyje ir dugno nuosėdose mažėjimo tendencija, tačiau DDT koncentracijos moliuskų *Macoma balthica*, *Mytilus edulis* ir *Dreissena polymorpha* audiniuose išlieka to paties lygio.

2. Klaipėdos uoste ir uoste iškasto grunto gramzdinimo rajone nustatytos padidėjusios teršalų koncentracijos. 2005–2007 metais Klaipėdos sąsiaurio vandenyje 25 % nustatytų naftos angliavandenilių koncentracijų viršijo didžiausią leistiną koncentraciją (DLK). Vario, nikelio ir švino koncentracijos Klaipėdos uosto dugno nuosėdose dažnai viršijo I užterštumo klasės ribas, taip pat čia nustatytos didžiausios dioksinų tipo PCB koncentracijos. Malkų įlankos dugno nuosėdose nustatyta didžiausia tributilalavo koncentracija. Didžiausia suminė dioksinų ir furanų koncentracija buvo nustatyta iškasto grunto gramzdinimo rajono dugno nuosėdose, kur buvo aptiktas ir tributilalavas.
3. Būtingės naftos terminalas ir Rusijos D-6 naftos platforma yra potencialūs taršos nafta šaltiniai. Po 2008 metais sausio 31 d. įvykusio naftos išsiliejimo Būtingės terminalo akvatorijoje, naftos angliavandenilių koncentracijos vandenyje tanklaivių inkaravimo vietoje net iki 13 kartų viršijo DLK. Apskaičiuoti policiklinių aromatinių angliavandenilių (PAA) indeksai tanklaivių inkaravimo vietos ir netoli Rusijos D-6 naftos platformos dugno nuosėdose parodė petrogeninę PAA kilmę, kuri atsiranda dėl laivybos arba naftos platformų taršos. Indeksas, apskaičiuotas pagal rastas 1B stoties dugno nuosėdose PAA koncentracijas, atskleidė taršos policikliniais aromatiniais angliavandeniliais iš laivų dyzelinių variklių kilmę.
4. Nustatytos padidėjusios arseno koncentracijos (vidutinė koncentracija – 9,7 mg kg⁻¹) cheminio ginklo nuskandinimo rajone. Panaudojus geležį rezultatų normalizavimui atlikti gautos didesnės liekamosios arseno koncentracijos. Tačiau šio tyrimo metu nustatytos arseno koncentracijos – netgi ir cheminio ginklo rajono dugno nuosėdose – yra santykinai žemos palyginti su kitomis cheminio ginklo nuskandinimo zonomis Baltijos ir Šiaurės jūrose.
5. Integruotas aplinkos taršos ir biožymenų vertinimas parodė, kad *M. edulis*, *M. balthica*, taip pat *D. polymorpha* ir *Nereis diversicolor* yra informatyvios rūšys biologinių efektų tyrimams ir stebėsenai Baltijos jūros Lietuvos zonoje.
6. Didžiausias aplinkos genotoksinis ir citotoksinis poveikis *M. balthica* moliuskuose nustatytas Lietuvos zonos atviros jūros dalyje. Santykinai aukštas mikrobranduolių dažnis rastas *M. edulis* iš 1B stoties ir *M. balthica* iš N-4 stoties, o foninis dažnis nustatytas *M. balthica* žiaunų ląstelėse iš priekrantės N-8 stoties. Statistiškai patikimas mikrobranduolių ir kitų branduolio pažaidų padidėjimas rastas moliuskuose po avarinio naftos išsiliejimo Būtingės naftos terminale. Padidėję aplinkos genotoksiškumo ir citotoksiškumo lygiai buvo stebimi moliuskų organizmuose netoli Palangos praėjus 6 mėnesiams po naftos išsiliejimo.
7. Eksperimento sąlygomis nagrinėjant policiklinių aromatinių angliavandenilių poveikį biožymenų atsakams *M. edulis* audiniuose, buvo nustatyta statistiškai patikima fluoranteno, pireno ir benzo(a)pireno įtaka AChE, GST, KAT, GR, SOD, LPO, MB biožymenims. Eksperimento rezultatai parodė, kad mišiniuose su fluorantenu arba pirenu benzo(a)pirenas gali būti provokuojantis veiksnys genotoksiniam ir citotoksiniam poveikiui atsirasti *M. edulis* žiaunų ląstelėse.
8. CHASE metodu vertinant Baltijos jūros Lietuvos priekrantės cheminę vandenų būklę nustatyta, kad Kuršių marių būklė yra gera; šiaurinės ir pietinės priekrančių vandenų, iškasto grunto gramzdinimo rajono bei Kuršių marių vandenų išplitimo zonos būklė yra vidutinė; Klaipėdos sąsiaurio būklė yra bloga.

INTRODUCTION

Relevance of the study. The complexity and variability of aquatic systems, the influence of multiple environmental factors suggest that any of single measures is adequate for assessing the effects of multiple stressors on biota. There is no doubt that the result of chemical analyses is an important indication whether or not organisms are exposed to pollutants at unacceptable high levels (Den Besten, 1998). But the use of chemical criteria alone to assess the effects of water quality on ecosystems can be incomplete, because it does not include broader ecological view (Adams, 2005).

Biomarkers are useful tools, indicating bioavailability of contaminants and their effects at the same time (Den Besten, 1998). Biological-effect methods could be important elements in environmental monitoring programmes, because they can indicate links between contaminants and ecological responses (Thain et al., 2008).

In order to assess the effects of chemical contaminants and their mixtures in the Baltic Sea ecosystem more accurately, an integrated approach, i.e., monitoring the levels of hazardous substances in organisms or in the environment along with biological effects, is needed (Lehtonen, Schiedek, 2006b).

By adoption of the Baltic Sea Action Plan (BSAP) the HELCOM countries decided to cooperate in order to build up more information on the sources of the selected hazardous substances, the extent of their occurrence in the Baltic marine environment, as well as on their biological effects. HELCOM countries also agreed to develop a monitoring programme of biological effects which would facilitate a reliable ecosystem health assessment (HELCOM, 2007a).

The EU Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC) (MSFD) addresses hazardous substances, setting one of the qualitative descriptors for determining good environmental status as „Concentrations of contaminants are at levels not giving rise to pollution effects“. According to MSFD, the progress towards good environmental status will depend on whether pollution is progressively being phased out, i.e. whether the presence of contaminants in the marine environment and their biological effects are kept within acceptable limits, so as to ensure that there are no significant impacts on or risk to the marine environment. And that is also the case where integrated view of the situation is needed.

Thus, integrated monitoring of hazardous substances and their effects is an important step forward to reach one of our future goals – Baltic Sea life undisturbed by hazardous substances.

Aim and objectives of the study. The aim of the study is an integrated assessment of the spread of contaminants and their biological effects in the Lithuanian zone of the Baltic Sea.

The main objectives are:

- to summarize the long-term monitoring data on contaminants in water, sediments and biota from the Lithuanian part of the Baltic Sea;
- to describe the peculiarities of distribution of contaminants in the Klaipėda harbour, Būtingė oil terminal, dredged sediments dumping site, adjacent area to the Russian D-6 oil platform and chemical munitions dumpsite;

- to evaluate the peculiarities of biomarker responses in marine organisms from the different areas of the southeastern Baltic Sea and the Curonian Lagoon;
- to assess the impact of contaminants on the biomarker response in mussels.

Novelty of the study. This study is the first attempt of an integrated assessment of environmental state of the marine environment in Lithuania using the data from national monitoring and other studies on specific contaminants and biomarker response data.

The long-term monitoring data on contaminants have been reviewed. A new set of statistical methods has been applied for this evaluation.

A laboratory experiment was performed in order to assess the combined effects of different PAH compounds (fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene) and their mixtures on biomarker responses (acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), lipid peroxidation (LPO), micronuclei (MN), nuclear buds (NB), fragmented-apoptotic (FA) and bi-nucleated (BN) cells) in *Mytilus edulis*.

The Curonian Lagoon and Klaipėda Strait species were not used for the biological effects studies before. Thus the zebra mussel *Dreissena polymorpha* from the Curonian Lagoon and polychaete *Nereis diversicolor* from the Klaipėda Strait were used in the biological effects studies. Due to the wide distribution of *D. polymorpha* in the central part of the Curonian Lagoon and *N. diversicolor* in the Lithuanian coastal area these species could be useful for monitoring of biological effects. The biochemical biomarker analysis can be applied in Lithuania in future.

As the first attempt of the integrated contamination assessment, the Pollution Index was applied for different areas within the Lithuanian Baltic Sea. Subsequently, the hazardous substances status of the Lithuanian Baltic Sea was assessed using HELCOM Chemical Status Assessment Tool (CHASE), which is a multimetric indicator-based tool developed for the integrated assessment of hazardous substances in the Baltic Sea.

Scientific and practical significance. The thesis reflects the overall goals of the hazardous substances segment of the HELCOM Baltic Sea Action Plan – to achieve a Baltic Sea with life undisturbed by hazardous substances and of the EU Marine Strategy Framework Directive – concentrations of contaminants are at levels not giving rise to pollution effects. The ongoing activities of HELCOM and EU are aimed at the integrated holistic assessments of the environmental state of the Baltic Sea. The step forward has been made by HELCOM since the combination of contaminant concentrations with the biological effects were used in the HELCOM Chemical Status Assessment Tool CHASE, which also has been applied for Lithuanian waters. Whereas more scientific evidences appear the biological effects become an important issue of the environmental research. In order to achieve the objectives set by EU and HELCOM Lithuania should also look for the possibility to integrate biological effects to the Baltic Sea environmental monitoring programme.

Defensive statements

1. Long-term increasing and decreasing trends can be detected for certain contaminants in the Lithuanian part of the Baltic Sea.

2. Klaipėda harbour, Būtingė oil terminal, dredged sediments dumping site, Russian D-6 oil platform and chemical munitions dumping site are potential pollution sources in the Lithuanian part of the Baltic Sea.
3. Arsenic is an indicator of the leakage of chemical weapon substances at the chemical munitions dumpsite.
4. *Mytilus edulis* and *Macoma balthica*, as well as other species like *Dreissena polymorpha* and *Nereis diversicolor* can be used as sentinel species for the biological effects studies in the Lithuanian zone of the Baltic Sea.
5. Bivalve mussels are sensitive bioindicator organisms for the assessment of environmental genotoxicity and cytotoxicity in the Baltic Sea.
6. There are combined effects of exposure to different PAH compounds and their mixtures on the biomarker responses in *M. edulis*.
7. Integrated approach is an advantageous tool for the assessment of marine environment pollution.

Scientific approval and publications. The results of the present study were published in 4 scientific papers in the international and Lithuanian peer-reviewed scientific journals and discussed during 7 presentations on international conferences and symposiums: EU-USA International Symposium „Integrated Ocean Observation Systems for Managing Global and Regional Ecosystems Using Marine research, Monitoring and Technologies“ (Klaipėda, 2006), Baltic SeaBreeze International Conference “Baltic Sea for future generations” (Palanga, 2007), Scientific conference “Biodegradation of oil and other environmental contaminants” (Vilnius, 2007), US/EU-Baltic International Symposium “Oceans observations, Ecosystem-based Management & Forecasting” (Tallinn, 2008), International seminar on sea-dumped chemical weapons. Perspectives of international cooperation (Vilnius, 2008), Regional conference “Marine and coastal research” (Nida, 2009), 15th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, PRIMO 15 (Bordeaux, 2009).

Structure of the dissertation. The dissertation manuscript is composed of the following chapters: Introduction, Literature Review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, List of author’s publications, Annex. The material and results of the dissertation are presented in 202 pages. The text contains 63 figures and 17 tables. The list of references contains 244 sources. The list of author’s publications comprises 4 publications. The dissertation is written in English with Lithuanian summary.

Acknowledgements. Firstly I would like to express my gratitude to my supervisor Habil. Dr. Janina Baršienė for her energy, belief, generous assistance, huge support, kind and needed words. I am especially grateful to my scientific advisor Dr. Algirdas Stankevičius who taught and encouraged me on my way and gave me a lot of valuable scientific and living advices. The manuscript was expertly reviewed by Habil. Dr. Janina Šyvokienė and Dr. Nijolė Kazlauskienė, their comments and suggestions led to considerable improvements. I largely appreciate help of Dr. Laura Andreikėnaitė and Dr. Aleksandras Rybakovas. I am much obliged to all my colleagues from the former Center of Marine Research, particularly Giedrius Ežerskis, Giedrius Mačernis, Justinas

Baltrėnas, Adomas Vildžiūnas and the crew of research vessels „Vėjas“ and „Gintaras“ for sampling assistance, Hydrochemistry group for the chemical analyses, also to Neringa Stončaitienė for maps, Aistė Kubiliūtė for her advices and Nijolė Remeikaitė-Nikienė for encouragement and linguistic help. I am grateful to Dr. Jelena Kusakina for her support and linguistic remarks. I largely appreciate valuable advices of Dr. Anastasija Zaiko and her help with statistics. I am grateful to Dr. Nerijus Nika for his comments on this summary. I would also like to thank the staff of the Marine Environment Laboratory, IAEA (Monaco), especially Stephen de Mora, Eric Wise and Sabine Azemard. My warm thanks to Dr. Kari Lehtonen for the opportunity to make biomarker analyses and also to Raisa Turja, Anna Packalen and other staff of the Marine Research Laboratory (Finnish Environment Institute). I give thanks to Prof. Anders Bignert for his interest and help with long-term data analysis. I thank the staff of HELCOM for providing the opportunity to participate in projects and other HELCOM activities. My thanks are also owing to other numerous people who worked with me during the study. Many thanks go to my dear friends Raimonda and Saulius, Anzhelika and Vitalijus, Anastasija and Artur, Marina, Viktor, Monika. My particular thanks to my family – my parents and grandparents – for patience, understanding and encouraging me not only in my studies but in all other steps of my life. I feel the deepest gratitude to my husband Oleg – You have always believed in me, supported me in all my beginnings, thank You for making my life easier and for Your love. I dedicate this work to Your memory.

I am grateful to the direction of the Institute of Ecology of Nature Research Centre for the opportunity of PhD studies; to Lithuanian State Science and Studies Foundation, International Atomic Energy Agency (TC project RER/0/016) and Finnish Academy for the financial support.

LITERATURE REVIEW

The vulnerability of the Baltic Sea ecosystem and contaminants like heavy metals, oil hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), chlorinated hydrocarbon compounds organotin compounds and other contaminants are discussed in this section. The problem of chemical munitions dumped in the Baltic Sea is presented. The effects of pollutants on aquatic organisms and biomarkers like lysosomal membrane stability (LMS), acetylcholinesterase inhibition (AChE), EROD activity, metallothionein induction (MT), PAH metabolites in bile, micronuclei frequency (MN), neutral lipid accumulation, catalase (CAT) and GST activity are reviewed. The integrated assessment of the state of the aquatic environment is described.

MATERIAL AND METHODS

Study area. Lithuanian waters are divided into 4 different types: transitional waters (central part, northern part and the plume of the Curonian Lagoon waters), heavily modified waterbody (Klaipėda Strait), coastal waters (northern stony coast and southern sandy coast) and open sea waters (Fig. 1).

Sampling campaigns. Several different sampling surveys and studies were organized during the period of the research: national monitoring cruises (1990–2009) (Baltic Sea stations – 46, 66, 65, 64A, 2C, 6B, 0B, 0, 6D, 1B, B-4, B-1, 1, 2, 3, S-3, 64, 4C, 4, 5, 20B, 20A, 20, S-1, 6, N-5, 7, N-6; Curonian Lagoon stations – 10, 14, 11, 12, 12A, 8, 9, 7B, 5, 3A, 3, 3B, 2, 1), a cruise to chemical munitions dumpsite (2003–2004) (stations ChG1, ChG2, ChG3, ChG4, ChG5, ChG6, ChG8, ChG11, ChG12, 66 (ChG7), 65 (ChG9), 6B, B-1, S-3, 64 (ChG10), 4 (ChG13), 5 (ChG14), 20A, 20, S-1, 6, N-5, 7, N-6), Lithuanian-Finnish project “Evaluation of the environmental state of the sea area in the Lithuanian territorial waters and economic zone adjacent to the Russian oil platform D-6” (2005) (stations 65, N-1, 6B (N-2), N-3, N-4, N-5, N-6, N-7, N-8, 7 (N-9), 4, 6), LIFE Nature project “Marine Protected Areas in the Eastern Baltic Sea” (2006) (stations 1B, B-4, 1B-1, B-7, 2M, 2, 3, 64A-1, 20A, 20, 20M, S-1, 6-1, 6, 6-2, N-5, 7, N-6, N-8, N-4, 6B2, 6B1), environmental genotoxicity and cytotoxicity effects study in bivalve mussels (2006) (65, 1B, B06, 20M, N-4, N-8), Būtingė oil spill (2008) (1B, B-7, 2AV, 1, 2, Palanga), biomarkers in some invertebrates of the Lithuanian coastal area (2008) (Baltic Sea stations – 65, 1B, 7; Curonian Lagoon stations – 12, 2), dioxins and TBT study in sediments from the Lithuanian coastal area (2008) (Baltic Sea stations – 65, 4, 20, 7; Curonian Lagoon stations – 3B, 2), HELCOM project “Screening of selected hazardous substances in the Eastern Baltic marine environment” (2008–2009) (stations 65 and 4).

Analysis methods

Chemical analysis. Heavy metals (Cd, Pb, Cu, Cr, Ni, As) in water, sediments and biota were determined by atomic absorption spectrometry, graphite furnace. The concentration of Zn and Fe was determined by flame atomic absorption spectrometry. The digestion of samples with nitric acid was used for Cd, Pb, Cu, Cr, Ni and Zn, with nitric and concentrated hydrofluoric acids for As and Fe. Mercury content in water, sediments and biota was measured by cold vapor technique.

Chlorinated pesticides (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, DDT, DDD, DDE, α -endosulfan, β -endosulfan, aldrin, diendrin, endrin, HCB) in water, sediments and biota were determined by gas chromatography with ECD detector.

Oil hydrocarbons in water and sediments were analyzed by infrared spectrometry method. Starting from 2008 the method has been changed to gas chromatography with FID detector.

As and Fe were measured in the Marine Environment Laboratory, IAEA (Monaco), other contaminants in the laboratory of the Center of Marine Research (Lithuania).

Biochemical biomarkers. Antioxidant biomarkers including catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidase (LPO) were measured from the digestive gland and acetylcholinesterase (AChE) for neurotoxic effects was measured from gills or foot of the mollusks. Measurements were done according to the procedures, validated in the Marine Research Laboratory of Finnish Environment Institute.

Environmental genotoxicity and cytotoxicity. Mussels were dissected, gills removed and two gill arches placed in a drop of 3:1 ethanol acetic acid solution on clean

microscopic slide and gently nipped with tweezers for 2-3 minutes. Then the produced cell suspension was softly smeared on a surface of the slide and air-dried. Dried smears were subsequently fixed in methanol for 10 min, dried and stained with 4 % Giemsa solution in phosphate buffer pH 6.8. The stained slides were analyzed under a light microscope Olympus BX51 at final magnification of 1.000×. Micronuclei and other nuclear abnormalities were identified using criteria described by Fenech and co-authors (2003). The analysis was made in the Genotoxicology laboratory of the Institute of Ecology.

Laboratory exposure of mussels to PAHs. An experiment has been carried out in the laboratory of the Finnish Institute of Marine Research. After the acclimation 30 *Mytilus edulis* mussel specimens were placed to each of 16 5-liters aquariums filled with filtered water. The exposure aquariums were: control (water without chemicals), solvent control, three aquariums with fluoranthene (F) (4, 12, 36 $\mu\text{g l}^{-1}$), three with pyrene (Py) (4, 12, 36 $\mu\text{g l}^{-1}$), two aquariums with the mixture of F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) and benzo(a)pyrene (BaP) (4 $\mu\text{g l}^{-1}$ – constant concentration in all aquariums with BaP), two aquariums with the mixture of Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) and BaP (4 $\mu\text{g l}^{-1}$), two aquariums with the mixture of F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) and Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$), two aquariums with the mixture of F (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$), Py (4, 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) and BaP (4 $\mu\text{g l}^{-1}$) (Fig. 2). The duration of the experiment was 48 h. After 48 hours of exposure biomarkers CAT, GST, GR, SOD, LPO, AChE, MN NB, FA and BN were measured.

Mathematical and statistical data analysis. The data were analysed using simple regression, non-parametric Mann-Kendall test, non-parametric Kruskal-Wallis, Mann-Whitney tests and factorial analysis of variance (ANOVA). Responses of biomarkers were related to concentrations of PAHs using redundancy analysis (RDA). An Integrated Biomarker Response Index (IBR) index was calculated according to Broeg, Lehtonen (2006). HELCOM Chemical Status Assessment Tool CHASE was used for the integrated assessment.

RESULTS

Contaminants in the Baltic Sea. Long-term data analysis showed the decrease of mercury concentrations in water starting from 1995–1996. Mercury concentrations in fish and mussels were decreasing starting from 1999–2000.

The concentration of Cd in water during the period of 2005–2009 often exceeded the environmental quality standard (EQS) (0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$); in 2009 the 13 % of measured concentrations were above the EQS in northern coastal waters, 8 % in the open sea, 13 % in the plume of the lagoon and 13 % in the southern coastal waters. From 2005–2006 concentrations of copper, chromium, nickel and lead were decreasing in sediments of dumping site and the Curonian Lagoon.

The concentration of **arsenic** in sediments ranged from 1.1 to 19.0 mg kg^{-1} . The concentration of **iron** ranged from 2.2 to 47.8 g kg^{-1} , with an average of 10.7 g kg^{-1} . The interpretation of metal distributions in sediments has often relied upon some method of normalization. Iron has commonly been used for the normalization of heavy metal distributions in the marine sediments (Whalley et al., 1999). Arsenic as a function of iron

in the sediments from Lithuania is shown in Fig. 3. Two distinct trends were evident for samples from inside and outside the chemical munitions dumpsite; both sets of data had high correlation coefficients. Clearly, one site (ChG5) located in the southeast corner of the dumpsite area comprised a background sample. Arsenic residuals were plotted for the various stations (Fig. 4). There were higher concentrations in four samples from the chemical munitions dumpsite, notably at station ChG1.

The analysis of long-term (1990–2007) **total oil** concentrations in water showed that there were statistically significant increasing trends in northern coastal waters and plume of the lagoon (Fig.5). Statistically significant trends were not detected in other areas of the Lithuanian Baltic Sea.

Calculated molecular indexes of **PAHs** showed that PAHs in samples from the Lithuanian part of the Baltic Sea are both of pyrolytic and petrogenic origins. The source of PAHs at the 6, 7, N-5, B-7, N-6 and 6B2 stations was petrogenic. A diesel engine source was indicated at the 1B, N-4, 3, 20M, 64A-1 stations which showed comparatively high concentrations of summed PAHs compared to other stations.

During the period of 1997–2009 there was a decrease in concentrations of **organochlorine pesticides** DDT and hexachlorocyclohexane (HCH) and their metabolites in water and sediments. Monitoring of DDT in bivalves from the Lithuanian part of the Baltic Sea (*M. balthica* and *M. edulis*) and the Curonian Lagoon (*D. polymorpha*) has been started from 1999. Long-term studies have shown that DDT concentrations in *M. balthica* and *M. edulis* were at the same level – about 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wet weight (w. w.). In the Curonian Lagoon the concentration of DDT in *D. polymorpha* was about 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ w. w. High concentrations of DDT and its metabolites were found in *Clupea harengus* muscles: 4,4'-DDT – 1.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ w. w., 4,4'-DDD – 4.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ w. w., 4,4'-DDE – 12.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ w. w. That could be explained by the higher amount of fat found in Baltic herring comparing to other biota species.

The concentrations of **PCBs** in water and sediments of the Lithuanian Baltic Sea in 2008 didn't exceed limits of quantification of the methods. The highest concentration of **dioxin-like PCBs** (WHO-PCB-TEF 0.076 ng kg^{-1} dry weight (d. w.)) was found in the Klaipėda harbour. The highest summed concentration of **dioxins and furans** (29 ng kg^{-1} d. w.) was found in the dredged sediments dumping site, however at this station dioxins and furans compounds were less toxic (PCDD/F TEF 0.199 ng kg^{-1} d. w.) than at the open sea station 65 (PCDD/F TEF 0.438 ng kg^{-1} d. w.).

Organotin compounds were detected at three stations: 3B station near the Malkū bay in the Klaipėda harbour – the highest concentrations of tributyltin (57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ d. w.) and dibutyltin (3.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ d. w.) were detected at that station; station 2 in the Klaipėda Strait (the concentration of tributyltin – 8.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ d. w.); station 20 at the dredged sediments dumping site (the concentration of tributyltin – 2.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ d. w.). The concentrations of organotin compounds at other stations were under the limit of quantification (1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ d. w.).

Biochemical biomarkers in Lithuanian coastal area. There was a high variability in acetylcholinesterase activity among studied organisms: the lowest activity was obtained in *D. polymorpha* mussels – 0.58 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. In *N. diversicolor* an acetylcholinesterase activity was $32.7 \pm 11.0 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. There was a large

variability among replicates in all samples, especially in *M. balthica* collected from the station 7.

GST varied from 132.2 ± 37.8 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *N. diversicolor*, to 339.6 ± 52.0 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *M. edulis*, and 717.5 ± 192.6 and 1034 ± 82 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *M. balthica* at the stations 65 and 7 respectively. CAT varied from 74.2 ± 41.0 μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *N. diversicolor*, to 104 ± 20 μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *M. edulis*, and 89.4 ± 15.1 and 114 ± 15 μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein in *M. balthica* at the stations 65 and 7 respectively. The activity of SOD in *M. balthica* varied from 4.2 ± 2.0 to 11.1 ± 1.8 units min⁻¹ mg⁻¹ protein at the stations 65 and 7. In *M. edulis* 11.0 ± 8.7 units min⁻¹ mg⁻¹ protein of SOD were found, in *N. diversicolor* – 10.7 ± 3.8 units min⁻¹ mg⁻¹ protein. LPO varied from 67.5 ± 7.3 nmol g⁻¹ w.w. in *N. diversicolor*, to 158 ± 71 nmol g⁻¹ w.w. in *M. edulis*, and 179 ± 38 and 190 ± 54 nmol g⁻¹ w.w. in *M. balthica* at the stations 7 and 65.

Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in *Macoma balthica* and *Mytilus edulis*. The frequency of micronuclei (MN/1000 cells) in *M. balthica*, sampled in May 2006 varied from 1.28 to 3.63 ‰, in mussels *M. edulis* – from 1.74 to 3.38 ‰ (Fig. 6). The lowest level of micronuclei was observed in *M. balthica* inhabiting station N-8, which was considered as a reference site. Significant increase in genotoxicity was found in *M. balthica* from the locations N-4 (P = 0.0155) and 65 (P = 0.0003) compared to the reference site. Similar levels of nuclear abnormalities were observed in *M. edulis* collected near the Būtingė oil terminal area (station 1B). MN frequencies in mussels from the station 1B were analyzed in May and August 2006. In August, the average MN (3.38 ‰) was nearly two-fold higher than in May (1.74 ‰). The value of the parameter in mussels from 6B station in June was equal to 2.86 ‰ (Fig. 6).

The occurrence of other nuclear abnormalities was also analyzed in *M. balthica* and *M. edulis*. In *M. balthica*, the frequency of nuclear buds (‰ - NB/1000 cells) varied in a range from 0.50 to 1.49 ‰, fragmented-apoptotic cells (FA/1000 cells) – from 0.53 to 1.72 ‰, bi-nucleated cells (BN/1000 cells) – from 1.51 to 2.23 ‰. The highest level of nuclear buds was observed in *M. edulis* collected in May from the station 1B, fragmented-apoptotic cells – in mussels collected from the same station in August and bi-nucleated cells – in *M. balthica* sampled from station 65.

Būtingė oil spill. In *M. edulis* specimens collected on 11-12 February 2008 (12 days after the oil spill in the Būtingė oil terminal) the frequency of micronuclei (‰ - MN/1000 cells) ranged from 1.99 to 2.38 ‰, nuclear buds (NB/1000 cells) – from 1.28 to 2.45 ‰, fragmented-apoptotic cells (FA/1000 cells) – from 0.14 to 0.49 ‰, bi-nucleated cells (BN/1000 cells) – from 0.94 to 1.20 ‰. The lowest values of micronuclei, nuclear buds and fragmented-apoptotic cells were found in mussels from the 1st station (Fig. 7). The total oil hydrocarbons concentration in the water at the station was not elevated and did not exceed maximum allowable concentration (MAC) (0.05 mg l⁻¹). The highest level of genotoxicity (4.83 ‰ MN and NB incidences) was registered in mussels from the station 2AV, where elevated total oil hydrocarbons concentration (up to 0.11 mg l⁻¹) in the water was determined.

The analysis of nuclear abnormalities in gills of mussels was performed in May 2008 (three months after the oil spill) in order to determine the persistency of the

damage. Similar genotoxicity and increased cytotoxicity levels at the 1st and 2nd stations compared to the responses in February 2008 were detected. In the long-term studies, location close to Palanga has served as a reference site. Comparison of genotoxicity and cytotoxicity levels in the Palanga location in June 2007 and after the accidental spill in May 2008 showed statistically significant increase of micronuclei ($P = 0.0036$) and fragmented-apoptotic cells ($P = 0.0286$) in mussels inhabited 2nd (Palanga) station, and nuclear buds ($P = 0.0264$) in mussels from the 1st station.

The environmental genotoxicity and cytotoxicity levels were significantly elevated in mussels collected 6 months after the oil spill, in August 2008, compared to the background levels detected in mussels before the accident. In *M. edulis* from the stations contaminated with oil products (1st, 1B and Palanga 2008), the frequency of micronuclei ranged from 3.74 to 6.06 ‰, nuclear buds – from 1.69 to 2.65 ‰, fragmented-apoptotic cells – from 0.97 to 1.96 ‰, bi-nucleated cells – from 1.38 to 2.36 ‰. Compared to the reference data from Palanga (June 2007), statistically significant elevation of MN, NB and FA was found in mussels from all three contaminated stations.

Investigation of environmental genotoxicity and cytotoxicity in mussels at station 1B was performed earlier in May and August 2006, in August 2007, and after the oil spill in February and August 2008. The lowest responses were in August 2007, the highest – after the oil spill in August 2008 (Fig. 8). Increase in MN in August 2008 was significant ($P < 0.0001$) compared to the parameter value in August 2007. One way ANOVA revealed significant time-related differences only in frequencies of micronuclei ($P = 0.0036$, $F = 4.647$).

Exposure of mussels to PAHs. The results of genotoxicity and cytotoxicity levels in gill cells of experimental mussels are shown in Fig. 9 and 10.

BaP influence on genotoxicity and cytotoxicity was evaluated by comparison of the responses in mussels exposed solely to fluoranthene or pyrene with the responses after exposure to their mixtures with BaP. Statistically significant increase of genotoxicity in mixtures of BaP with fluoranthene at $4 \mu\text{g l}^{-1}$ was revealed. However for the BaP and pyrene mixture treatment, significantly increased levels of genotoxicity were detected at $4 \mu\text{g l}^{-1}$ and $12 \mu\text{g l}^{-1}$ concentrations. Increase in cytotoxicity caused by BaP was detected only for the mixture of fluoranthene $4 \mu\text{g l}^{-1}$ and benzo(a)pyrene $4 \mu\text{g l}^{-1}$. Therefore, BaP could be suspected as a provocative factor for the formation of genotoxicity and cytotoxicity in *M. edulis* under the influence of fluoranthene or pyrene.

Integrated Biomarker Indices (IBR) were calculated for the experimental mussels using biomarkers AChE, GST, CAT, SOD, GR, LPO and MN (Fig. 11). The integrated biomarker results showed that at single compound exposures most biomarker responses were increasing from $4 \mu\text{g l}^{-1}$ of fluoranthene to $36 \mu\text{g l}^{-1}$ of fluoranthene, but have not shown any difference for different pyrene concentrations. The influence of BaP can be noticed, especially in the mixtures with fluoranthene.

The redundancy analysis (RDA) showed that all three explanatory variables (fluoranthene, pyrene and BaP) had a statistically significant ($P < 0.05$) effect on biomarker responses (AChE, GST, CAT, SOD, GR, LPO and MN).

Results of CHASE. Chemical status of the Lithuanian coastal waters was evaluated using CHASE. As a result the status of the Curonian Lagoon was assessed as

good; northern coastal waters, southern coastal waters, dredged sediments dumping site and plume of the lagoon – moderate, Klaipėda Strait – poor.

DISCUSSION

Contaminants in the Lithuanian part of the Baltic Sea. National environmental monitoring data have shown that there were apparent trends in concentrations of some contaminants within the Lithuanian part of the Baltic Sea. For example, the decreasing trend of mercury was detected in all compartments of the aquatic environment: in the water, sediments and biota. The decreasing trend was observed for DDT pesticide and its metabolites DDD and DDE. During the last few years the values of DDT in water and sediments were mostly under the limit of quantification. But these compounds can be still detected in biota. Although the use of DDT has been banned it still persists in the food web of the Baltic Sea.

Different results were obtained from the analysis of the long-term data on oil hydrocarbons. The concentrations of oil in water have shown increasing trends in some areas of the Lithuanian part of the Baltic Sea.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration is a suitable monitoring parameter for the determination of oil pollution in aquatic environment. PAHs have been added to the monitoring program already in 2006, but the amount of stations is not sufficient. Indices have shown that PAHs in Lithuanian part of the Baltic Sea are of both pyrolytic and petrogenic origin.

Areas that contaminated by metals were the dredged sediments dumping site, Klaipėda harbour and Curonian Lagoon area close to Nida. It is known that concentrations of metals in sediments depend on the grain size composition. Normalization procedure can be used to correct both background and contaminant concentrations (Kersten, Smedes, 2002). The granulometric composition of sediments in the mentioned areas was dominated by the clay fraction. That partly explains higher contaminants concentrations observed there.

High concentrations of organotin compounds were detected in Klaipėda harbour during previous studies (Dudutyte et al., 2007), but samples taken in 2008 from the several stations in the Baltic Sea did not reveal high concentrations of organotins. The monitoring of these compounds in Klaipėda harbour should be performed to evaluate the pollution of the harbour area by these contaminants.

Investigations of dioxins and furans showed that sediments at the sampled stations were rather unpolluted by dioxins and furans compared to other sites in the Baltic Sea. But the current aim is to reach concentrations close to zero, as these anthropogenically generated contaminants do not occur naturally in the environment.

Sources of pollutants in Lithuanian waters of the Baltic Sea. Klaipėda harbour is the most important source of pollution. According to the monitoring data, high concentrations of different contaminants can be detected in both sediments and water. Together with dredged sediments pollutants can enter the environment of the Baltic Sea. An evidence of transferring contaminants from the harbour to the sea is distribution of TBT compounds in sediments of the harbour and dumping site. TBT compounds were

detected only at harbour and dumping site stations, but not at the other stations of the coastal area.

The analysis of data on oil hydrocarbons and PAHs has indicated that area near Būtingė oil terminal polluted by oil products. Accidental oil spill events have particularly strong influence on the contamination of environment. D-6 oil platform in Russia is also a potential hazard of oil pollution. Modelling results showed, that if an accident has occurred at the platform, the oil under certain meteorological and hydrological conditions would reach Lithuanian coast (FIMR, 2007). The evaluation of the environment state of the area adjacent to the oil platform didn't reveal any higher contaminants concentrations, although environmental genotoxicity was higher in the Lithuanian area adjacent to the D-6 oil platform (Baršienė et al., unpublished data).

Analysis of sediment samples taken from the Lithuanian exclusive economic zone of the Baltic Sea showed that there were higher arsenic concentrations near the chemical munitions dumpsite (average 9.7 mg kg^{-1}) compared to other coastal locations (2.1 mg kg^{-1}). Normalization of results to iron showed slightly elevated residual arsenic concentrations near the dumpsite. However arsenic concentrations data, even from the dumpsite region, were low compared to the other dumping sites in the Baltic and North Seas. This preliminary study focused only on arsenic. For a definitive assessment of the possible leakage of poisonous contaminants, more comprehensive research is needed, such as long-term monitoring of the area and determination of various individual toxic substances, including arsenic-containing munitions.

Biochemical biomarker responses in Lithuanian coastal area. During the study, biochemical biomarkers were analysed in the Baltic Sea (*M. edulis* and *M. balthica*), Curonian Lagoon (*D. polymorpha*) and Klaipėda Strait (*N. diversicolor*) organisms. This study presents the first attempt in Lithuania to analyze AChE, CAT, GST and SOD in organisms inhabiting the Curonian Lagoon and Klaipėda Strait. There is definitely only a few data on biochemical biomarkers in fish and mussels from the Lithuanian coastal area of the Baltic Sea (Baršienė et al., 2006b). To investigate the effect of pollution the screening study on biomarkers has to be done, using different species, taking samples at different environmental conditions (e.g. in different seasons). Having reliable background data, the interpretation of accidental spills of contaminants would be more efficient and reasonable.

Environmental genotoxicity and cytotoxicity in Lithuanian zone of the Baltic Sea. The study revealed the highest level of micronuclei in *M. balthica* inhabiting the offshore station 65. A comparatively high frequency of micronuclei was found in *M. edulis* from station 1B in August 2006 and in *M. balthica* from station N-4. The reference level of micronuclei incidences was observed in *M. balthica* inhabiting the comparatively uncontaminated coastal station N-8. Long-term data on total oil hydrocarbons and heavy metal contamination disclosed elevated oil hydrocarbon concentrations in water at the open sea station (65) in 2003. Especially high total oil hydrocarbon concentrations were observed in autumn 2005. In sediments from station 65, elevated concentrations of Cu, Pb and Zn were detected in 2006. The concentration of TBT reached $6.0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d. w.}$, the concentration of total PAHs being $120 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d. w.}$ (FIMR, 2007). The study station 1B is situated near the Būtingė oil terminal area, where

increased levels of total oil hydrocarbons have been observed episodically. Elevated concentrations of Cd were detected in mussels, which were used in the present environmental genotoxicity study, but DDT concentrations were lower than the average level. The station N-4 is located close to the Russian D-6 oil platform. A higher frequency of micronuclei has been detected earlier in mussels taken close from the oil terminal and marine port zones in the Baltic Sea (Baršienė, Baršytė Lovejoy, 2000; Baršienė, 2002).

Chemicals with a genotoxic potential for the aquatic environment are of serious concern since they can bind to DNA molecules and provoke a damaging chain of biological changes such as impaired enzyme function or general metabolism, cytotoxicity, immunotoxicity, disturbances in reproduction, inhibition of growth, or carcinogenesis (Ohe et al., 2004). Nevertheless, a comparatively low response in indigenous organisms could arise as a result of adaptation to chronically contaminated habitats such as dumping sites (station 20M) in the Lithuanian waters of the Baltic Sea. Therefore, adaptation to chronically contaminated habitats should be one of the priorities for the future studies of environmental genotoxicity in dumping areas, in marine harbour zones, in the oil refinery or drilling sites, dredging and other areas with a long history of anthropogenic influence.

Būtingė oil spill – assessment of the state of the environment. In the Lithuanian coast, MN frequency in mussels ranged from 1.08 ‰ (MN/1000 cells) in Palanga location in June 2007 to 6.06 ‰ in the same location in August 2008. The reference level (1.2 ‰) in Palanga site was found also in June 2001, but after the accidental oil spill in Būtingė oil terminal (in November 2001), Palanga location was contaminated by oil and the genotoxicity level in 2002–2003 have increased up to 3.0 MN/1000 cells (Baršienė et al., 2004) and remained significantly elevated until 2005. Full recovery of mussels was found only in June 2007. However, in January 2008, the oil spill accident has recurred and very similar scenarios of spilled oil distribution and genotoxicity elevation appeared again. As a result, the frequency of micronuclei in mussels from the Palanga site increased up to 6.06 ‰, and reached the highest level registered in 2001–2008 at different study locations on the Lithuanian coastal and offshore zones.

It is noteworthy to stress that 2–4-fold elevation of nuclear buds, the other endpoint of the environmental genotoxicity, was found after the oil spill in 2008 compared to the level before the spill. The induction of bi-nucleated cells in gills of mussels was elevated up to two times; induction of fragmented-apoptotic cells was increased up to 9 times. The phenomenon in mussels appears evidently as a result of action of genotoxic and cytotoxic agents constituting the spilled oil. Therefore, in assessment of oil spill damage, a usefulness of other than micronuclei nuclear abnormalities has been confirmed (Izquierdo et al., 2003; Venier, Zampieron, 2005; Baršienė et al., 2006a, 2006c, Baršienė, Rybakovas, 2006; Baršienė, Andreikėnaitė, 2007; Koukouzika, Dimitriadis, 2008).

The results of the present study pointed to comparatively quick formation of genotoxicity and cytotoxicity caused by oil spill in winter at low temperature and revealed the need to highlight harmful effects after the oil spillage in marine environment.

Biomarker responses to different PAHs – laboratory experiment. An important fact was identified in our experimental work showing that adding $4 \mu\text{g l}^{-1}$ of BaP significantly increased genotoxicity and cytotoxicity of model mixtures at low fluoranthene or pyrene concentrations, and did not show significant increase of genotoxicity in mussels treated with model mixtures consisting of $12 \mu\text{g l}^{-1}$ of fluoranthene. Exposure of mussels solely to fluoranthene at $12 \mu\text{g l}^{-1}$ caused high genotoxicity and cytotoxicity responses. The finding on significant role of BaP and also the suppression of genotoxicity and cytotoxicity responses in mussels treated with highest concentrations ($36 \mu\text{g l}^{-1}$) of fluoranthene, pyrene, as well as with model mixtures of all three PAHs, indicated that in our experiment used $12 \mu\text{g l}^{-1}$ fluoranthene concentrations were at threshold levels for the mussels. However, the same concentration of pyrene did not induce micronuclei, nuclear buds, fragmented-apoptotic cells at all and caused only 2-fold increase of bi-nucleated cells. Thus, pyrene at $12 \mu\text{g l}^{-1}$ has shown only risk for the cell division alterations, whilst genotoxicity, nor apoptosis was not appeared.

The results of IBR revealed the effect of fluoranthene on the neurotoxicity, oxidative stress and genotoxicity biomarkers, and some additive responses were observed. Low concentrations of pyrene ($4 \mu\text{g l}^{-1}$) elicited stronger oxidative stress response (CAT, SOD, GR and LPO) in mussels. However, the response of micronuclei, the biomarker of genotoxicity, was higher at $36 \mu\text{g l}^{-1}$ concentration of pyrene. The results of IBR also showed that the biomarker responses were induced (particularly in mixtures with fluoranthene) showing the effect of BaP.

Integrated assessment of the contamination of the Baltic Sea. This study was the first attempt of an integrated assessment of environmental state of the marine environment in Lithuania using national monitoring data of specific contaminants together with biological effects data.

The thesis reflects the overall goals of the hazardous substances segment of the HELCOM Baltic Sea Action Plan – to achieve a Baltic Sea with life undisturbed by hazardous substances and of the EU Marine Strategy Framework Directive – concentrations of contaminants are at levels not giving rise to pollution effects. To achieve these goals an integrated holistic assessment of the state of the environment of the Baltic Sea is needed. For that purpose HELCOM developed a multi-metric Chemical Status Assessment Tool CHASE.

For the first time the assessment of the chemical status of Lithuanian marine waters has been made using CHASE. This provided us with the opportunity of the comprehensive and integrated evaluation of pollution. The results have shown that the chemical status of the most analyzed areas is moderate, whilst in the Klaipėda Strait it is poor. Thus, relevant measures have to be taken to improve the status of the Baltic marine environment and to achieve established goals.

CONCLUSIONS

1. Long-term data analysis showed the decrease of mercury concentrations in water starting from 1995–1996; mercury concentrations in fish and mussels were decreasing starting from 1999–2000. From 2005–2006 concentrations of copper, chromium, nickel and lead were decreasing in sediments at the dumping site and in the Curonian Lagoon. The analysis of the long-term (1990–2007) data on the total oil concentrations in water showed that there were statistically significant increasing trends in the northern coastal waters and plume of the lagoon. Statistically significant trends were not detected in other areas of the Lithuanian Baltic Sea. During the period of 1997–2009 there was a decrease in DDT and hexachlorocyclohexane (HCH) pesticides and their metabolites concentrations in water and sediments. DDT concentrations in *Macoma balthica*, *Mytilus edulis* and *Dreissena polymorpha* stayed at the same level during the analysed period of time.
2. Higher contaminants concentrations were detected in the Klaipėda harbour area and at the dredged sediments dumping site. During the period of 2005–2007 25 % of the measured total oil hydrocarbon concentrations in the Klaipėda Strait were above the maximum allowable concentration (MAC). The concentrations of copper, nickel, and lead in sediments of the Klaipėda harbour often exceeded the I pollution category, the highest concentration of dioxin-like PCBs was also found in the Klaipėda harbour. The highest concentration of tributyltin was detected in sediments of Malkū bay. The highest summed concentration of dioxins and furans was found at dredged sediments dumping site. Tributyltin was also found in sediments of dumping site area.
3. Būtingė oil terminal and Russian D-6 oil platform are potential oil pollution sources. After the oil spill in Būtingė oil terminal in the 31 of January 2008, concentration of oil hydrocarbons in water at tankers anchoring area was about 13 times above the MAC. Calculated molecular indices of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at tankers anchoring area and adjacent to the D-6 oil platform showed that the source of PAHs in the sediments was petrogenic, related to shipping or oil platforms. A diesel engine source of PAA was indicated at the 1B station.
4. Analysis of sediment samples showed that there were higher arsenic concentrations near the chemical munitions dumpsite (average 9.7 mg kg^{-1}) compared to other coastal locations. Normalization of results to iron showed slightly elevated residual arsenic concentrations near the dumpsite. However arsenic concentrations, even from the dumpsite region, were low compared to other dumping sites in the Baltic and North Seas.
5. Integrated assessment of pollution and biomarker responses showed that *M. edulis* and *M. balthica*, as well as *D. polymorpha* and *Nereis diversicolor* can be used as sentinel species for the biological effects studies and monitoring in the Lithuanian zone of the Baltic Sea.
6. The highest level of environmental genotoxicity and cytotoxicity in *M. balthica* mussels was found in the open sea area of the Lithuanian zone. A comparatively high frequency of micronuclei was found in *M. edulis* from station 1B and in *M. balthica* from station N-4, the reference level of micronuclei incidences was observed in *M. balthica* gill cells from the coastal station N-8. Statistically

significant increase of micronuclei and other nuclear abnormalities was observed in mussels after the oil spill in the Būtingė oil terminal. Elevated environmental genotoxicity and cytotoxicity responses were observed in mussels from the Palanga location 6 months after the oil spill event.

7. The results of the laboratory PAHs exposure showed statistically significant effects of fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene on biomarker responses (AChE, GST, CAT, GR, SOD, LPO, MN) in *M. edulis*. BaP could be suspected as a provocative factor for the formation of genotoxicity and cytotoxicity in *M. edulis* under the influence of fluoranthene or pyrene.
8. According to CHASE evaluation, a chemical status of the Curonian Lagoon is good; northern coastal waters, southern coastal waters, dredged sediments dumping site and plume of the lagoon – moderate, Klaipėda Strait – poor.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Garnaga G., Stankevičius A., 2005. Arsenic and other environmental parameters at the chemical munitions dumpsite in the Lithuanian economic zone of the Baltic Sea. *Environmental research, engineering and management*, 3 (33): 24-31.
2. Garnaga G., Wyse E., Azemard S., Stankevičius A. and de Mora S., 2006. Arsenic in sediments from the southeastern Baltic Sea. *Environmental Pollution*, 144 (3): 855-861.
3. Baršienė J., Andreikėnaitė L., Garnaga G., Rybakovas A., 2008. Cytogenetic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija*, 54 (1): 44-50.
4. Garnaga G., Štukova Z., 2008. Contamination of the South-eastern Baltic Sea and the Curonian Lagoon with oil products. *US/EU-Baltic International Symposium, 2008 IEEE/OES*, pp.1-8, ISBN: 978-1-4244-2267-8

GALINA GARNAGA: CURRICULUM VITAE

Date and place of birth:

18 March 1979, Klaipėda, Lithuania

Education:

2005- 2009 PhD studies at the Institute of Ecology of Vilnius University;

2001- 2003 Master Degree in Ecology and Study of Local Environment, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Klaipėda University;

1997 -2001 Bachelor Degree in Ecology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Klaipėda University;

Professional experience:

2010-till present Environmental Protection Agency, Marine Research Department, Head of Hydrochemistry division;

2010-till present Klaipėda University, Ecology Department, lecturer;

2006-2009 Center of Marine Research, Head of Ecotoxicology division;

2006-2009 Klaipėda University, Ecology Department, assistant;

2005-2006 Center of Marine Research, Ecotoxicology division, senior specialist;

2004-2005 Center of Marine Research, Ecotoxicology division, chemist;

2003-2004 Center of Marine Research, Hydrochemistry division, senior chemist;

2003 Klaipėda University, junior researcher.