



UPPSALA  
UNIVERSITET

Projektrapport från utbildningen i

**EKOTOXIKOLOGI**

*Ekotoxikologiska avdelningen*

Nr 125

# Utvärdering av toxicitetstestet ROTAS

Helena Thulé

# INNEHÅLL

<b>FÖRORD</b> .....	<b>3</b>
<b>SAMMANFATTNING</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INLEDNING</b> .....	<b>5</b>
1.1 Bakgrund.....	5
1.2 Syfte .....	7
1.3 Avgränsningar.....	7
1.4 ROTAS .....	7
1.5 Ekotoxikologiska tester.....	10
1.6 PAH .....	12
1.7 ARSENIK .....	14
<b>2. MATERIAL OCH METODER</b> .....	<b>17</b>
2.1. Provområde - Krylbo .....	17
2.2. Provtagning .....	17
2.3. Utförande.....	18
2.4 Laktester.....	20
2.5 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester .....	20
2.6 Statistisk analys.....	21
<b>3. RESULTAT</b> .....	<b>22</b>
3.1 Grundvattenprover .....	22
3.2 Multivariat regressionsanalys .....	22
3.3 Mättidens betydelse .....	24
3.4 Samband mellan toxicitet och föroreningshalt.....	25
3.5 Extraktionsmedlets betydelse .....	27
3.6 Laktester.....	28
3.7 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester .....	28
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>30</b>
4.1 Mättidens betydelse .....	30
4.2 Samband mellan toxicitet och föroreningshalt.....	30
4.3 Extraktionsmedlets betydelse .....	31
4.4 Laktester.....	32
4.5 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester .....	32
<b>5. SLUTSATS</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERENSER</b> .....	<b>35</b>

# FÖRORD

Denna rapport är ett examensarbete som leder till en magisterexamen i biologi med inriktning mot ekotoxikologi vid Uppsala Universitet. Arbetet utfördes på uppdrag av Sweco i Karlstad.

Jag skulle vilja börja med att tacka mina handledare på Sweco, Johanna Gelang Alfredsson och Sofia Rolén, som alltid tagit sig tid för mina frågor och som kommit med många nyttiga synpunkter på rapporten. Jag vill även tacka Katrin Lundstedt-Enkel, avdelningen för ekotoxikologi, Uppsala Universitet, som hjälpte mig med statistikdelen. Ett stort tack skulle jag även vilja ge till Jan Örberg, min handledare på universitetet, som alltid ställt upp och hjälpt mig när jag behövt det.

Sist men inte minst skulle jag vilja tacka alla andra som hjälpt mig med material och som svarat på mina frågor när jag mailat eller ringt. Tack!

## SAMMANFATTNING

Mellan åren 1911 och 1986 utfördes impregneringsverksamhet på en industrifastighet i Krylbo där kreosotolja och metallsalter användes. Detta medförde att det aktuella området förorenades av bland annat PAH och arsenik. Syftet med detta examensarbete är att utvärdera analysinstrumentet ROTAS (Rapid On-Site Toxicity Audit System) användbarhet som hjälpmedel vid fördjupad riskbedömning av förorenad mark. ROTAS är ett icke-specifikt akuttoxicitetstest tillverkat för fältbruk.

I denna rapport studeras vilken analystid som är den mest lämpliga, hur bra ROTAS svarar på föroreningshalten i jorden samt vilken betydelse extraktionsmedlet har. ROTAS analyseras även på eluat från standardiserade lakteter utförda på jordarna för att se hur bra ROTAS extraktion är i jämförelse med standardiserade lakteter. Resultaten jämförs även med resultat från toxicitetstester med engelskt rajgräs, vitklöver och mask.

Resultaten visar att analys med ROTAS Leachable test, där jordproverna extraheras med vatten, bör pågå i 30 minuter. De erhållna mätvärdena stiger mellan 15 och 30 minuter vilket tyder på att de föroreningar som extraheras ut med vatten har en relativt långsam effekt på bakterierna. Organics-testet bör pågå i 15 minuter då organiska föroreningar verkar ha en snabb effekt på bakterierna. Leachable-testet svarar relativt bra på arsenikhalten i jordproverna men sämre på PAH-halterna, vilket kan bero på att PAH-er ogärna löser sig i vatten. Däremot finns ett tydligt samband mellan inhibering av luminiscens och PAH-halt när jordproverna extraheras med metanol. Vid analys med Leachable-testet har både destillerat vatten och syntetiskt framställt sötvatten använts för att extrahera jordproverna. Toxiciteten är högre i de prover där sötvatten använts, vilket kan bero på att sötvattnet innehåller salter som bidrar till jonbyte och därmed till att fler föroreningar lakas ut.

Det finns ingen signifikant skillnad i toxicitet mellan resultaten från ROTAS-extraktionerna och från de standardiserade laktesterna efter 30 minuter, vilket visar att ROTAS-extraktionen är likvärdig med standardiserade metoder. Mellan ROTAS-resultaten och resultaten från toxicitetstesterna finns ett svagt samband mellan inhibering av luminiscens och inhibering av rottillväxt hos engelskt rajgräs samt inhibering av andelen lagda äggkokonger hos mask.

# 1. INLEDNING

## 1.1 Bakgrund

Förorening av mark och vatten från industriverksamhet har pågått under hundratals år. Idag finns flera tusen förorenade områden i landet. Från många av dessa områden lakas föroreningar ut med oacceptabla miljöeffekter som följd. I många fall utgör de ett allvarligt framtida hot mot hälsa och miljö. Mot bakgrund av detta pågår ett omfattande arbete med kartläggning, inventering och sanering av förorenade områden i Sverige.

Inom arbetet med förorenade områden ingår många moment såsom fältundersökningar, riskbedömningar och åtgärder. Generella riktvärden för ett antal ämnen och grupper av ämnen har tagits fram som ett verktyg för att bättre kunna bedöma hälso- och miljöriskerna.

De generella riktvärdena som används i Sverige idag är baserade på det lägsta av ett beräknat humantoxikologiskt och ett ekotoxikologiskt värde. Generella riktvärden finns framtagna för känslig markanvändning, KM (t.ex. bostäder, odling, daghem), då ingen påverkan på markens funktioner accepteras, och för mindre känslig markanvändning, MKM (t.ex. industrier, kontor eller vägar), varav ett med grundvattenskydd och ett utan. Riktvärdena, och därmed acceptansen för markens föroreningsnivå, för MKM ligger något högre än de för KM. I tabell 1 visas riktvärdena för några vanliga metaller samt för polycykliska aromatiska kolväten (PAH) enligt Naturvårdsverkets rapport 4638 - Generella riktvärden för förorenad mark [1].

**Tabell 1.** Generella riktvärden för polycykliska aromatiska kolväten (PAH) och några vanligt förekommande metaller.

KM= Känslig markanvändning, MKM GV = Mindre känslig markanvändning med grundvattenskydd

MKM = Mindre känslig markanvändning, TS=Torrsubstans

<b>Ämne/Ämnesgrupp</b>	<b>KM (mg/kg TS)</b>	<b>MKM GV (mg/kg TS)</b>	<b>MKM (mg/kg TS)</b>
<b>Summa cancerogena PAH</b>	0,3	7	7
<b>Summa övriga PAH</b>	20	40	40
<b>Arsenik</b>	15	15	40
<b>Koppar</b>	100	200	200
<b>Krom tot (endast om Cr VI inte förekommer)</b>	120	250	250
<b>Zink</b>	350	700	700

När de ekotoxikologiska riktvärdena tagits fram har två olika typer av ekotoxikologiska värden använts där det första avser att skydda flora, fauna och mikroorganismer inom det förorenade markområdet och det andra avser att skydda det akvatiska livet i ett närbeläget ytvatten [1]. Riktvärdena för mark baseras på nederländska sammanställningar medan riktvärdena för ytvatten baseras på en kanadensisk sammanställning. Underlaget som använts är i många fall bristfälligt. För många föreningar är informationen begränsad till resultaten från studier på ett fåtal arter. Många av dessa arter ingår inte i det svenska ekosystemet. De svenska markförhållandena skiljer sig dessutom från de holländska [2].

I de fall då dataunderlaget är bristfälligt används säkerhetsfaktorer. Vid ett dåligt dataunderlag är osäkerheten stor. De toxicitetsdata som finns divideras med en säkerhetsfaktor för att inte riskera att toxiciteten underskattas. Denna metod används bland annat i de fall data för marklevande organismer saknas och man endast har tillgång till akvatiska toxicitetsdata. Detta kan dock leda till en överskattning av toxiciteten och därmed till stränga åtgärdskrav och höga kostnader vid exempelvis saneringar [3].

När de generella riktvärdena inte kan användas, till exempel om området innehåller särskilt skyddsvärda arter/ekosystem, eller om riktvärden saknas bör en fördjupad riskbedömning göras. Platsspecifika riktvärden bör då utarbetas där förorenings-spridning och exponeringsvägar som kan vara aktuella i ett långt tidsperspektiv för det aktuella området bedöms [1]. I den fördjupade riskbedömningen ingår en platsspecifik ekotoxikologisk bedömning. För den ekotoxikologiska bedömningen av ett område bör kemiska analyser kombineras med biologiska tester för att kunna kvantifiera föroreningarna samt för att få ett svar på deras biotillgänglighet och toxicitet. För ett effektivt arbete kan riskbedömningen läggas upp i olika nivåer som börjar med en gallringsprocess, bestående av exempelvis toxicitetstester och tester av viktiga markfunktioner. Exempel på toxicitetstester kan vara tester med bioluminiserande bakterier. ROTAS (Rapid On-Site Toxicity Audit System) är ett analysinstrument som använder sig av just bioluminiserande bakterier och kommer att behandlas i föreliggande rapport. Utifrån resultaten från gallringsprocessen finns möjligheten att gå vidare till mer detaljerade bedömningar och undersökningar på de områden som kräver det.

## 1.2 Syfte

Syftet med detta examensarbete är att utvärdera ROTAS användbarhet som hjälpmedel vid riskbedömningen av förorenad mark och att se hur bra ROTAS svarar på föroreningshalten i jorden, vilken analystid som är den mest lämpliga samt vilken betydelse det använda extraktionsmedlet har. Både jord- och grundvattenprover från ett förorenat område testas med ROTAS. Även laktester utförs och lakvattnet analyseras kemiskt för att se hur stor andel av föroreningarna som är lakbara. Eluatet från laktesterna analyseras även med ROTAS. För att jämföra ROTAS med andra ekotoxikologiska tester görs dessutom en jämförelse mellan resultat från ROTAS och resultat från ekotoxikologiska tester med engelskt rajgräs, vitklöver och mask som testorganismer.

## 1.3 Avgränsningar

Detta projekt fokuserar främst på ROTAS Leachable-test, där destillerat vatten eller ett artificiellt framställt sötvatten används som extraktionsmedel. Även Aqueous-testet och Organics-testet, där metanol används som extraktionsmedel för att lösa organiska föreningar från jorden, kommer att studeras. Dessutom kommer mättidens påverkan på resultaten studeras. Arbetet fokuserar främst på arsenik och PAH eftersom jordarna är starkt förorenade av dessa ämnen.

## 1.4 ROTAS

### 1.4.1 Bakgrund

ROTAS, utvecklat av Cybersense Biosystem Ltd i England, är ett icke-specifikt akuttoxicitetstest som baseras på den marina bioluminiserande bakterien *Vibrio fischeri*. Instrumentet är utvecklat för fältbruk och upp till 22 prover kan analyseras samtidigt. Analysen utförs antingen direkt på vatten eller på lakvätska från extraherade jordprover. ROTAS har två användningsområden. Meningen är att instrumentet ska användas dels som ett komplement till kemiska analyser och dels för att snabbt kartlägga platser inom förorenade områden med höga halter av föroreningar. Detta kan vara ett effektivt sätt att reducera kostnaderna vid arbete med förorenade områden genom att snabbt få en översiktlig bild av föroreningssituationen och på det viset veta vilka platser som behöver undersökas vidare [4].

Till instrumentet hör en luminometer, som mäter luminiscensen från bakterierna både före och efter att provet tillsatts, samt en dator med tillhörande ROTAS-programvara.

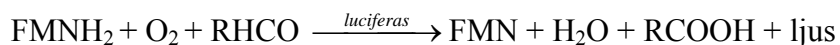
### 1.4.2 *Vibrio fischeri*

Den bioluminiserande bakterien *Vibrio fischeri* (tidigare *Photobacterium phosphoreum*) är en marin bakterie som förekommer både i fritt tillstånd samt i symbios med andra vattenlevande organismer, som exempelvis bläckfisk där den fungerar som ljusorgan [5]. Det är tack vare sin förmåga att bioluminiscera som *V. fischeri* används i så stor utsträckning och det finns ett antal standardiserade tester som bygger på inhibering av bioluminiscensen från bakterierna.

#### *Biokemi*

*V. fischeri*'s DNA innehåller sju luxgener som kodar för de proteiner som är inblandade i luminiscensreaktionen. Luxgenerna kan delas in i två enheter varav den första kodar för ett protein som tillsammans med en autoinducerare leder till transkription av den andra enheten samt av enzymet luciferas som katalyserar luminiscensreaktionen. En autoinducerare är en liten molekyl som bakterierna syntetiserar och som lätt kan passera bakteriernas cellmembran. Genom autoinduceraren kan bakterierna kommunicera med varandra. Vid höga bakteriekoncentrationer kommer autoinduceraren att diffundera ut från cellerna medan den vid låga bakteriekoncentrationer ackumuleras inuti cellerna tills de når en viss koncentration. Det är vid denna koncentration som transkriptionen av luciferas aktiveras och luminiscensen startar [6].

Det som sker när bakterierna bioluminiserar är en oxidation av en flavinmononukleotid (FMNH<sub>2</sub>) och en långkedjad aldehyd i närvaro av syre, se nedanstående formel. Det är denna reaktion som katalyseras av enzymet luciferas [7].





### 1.4.3 Typer av test

Det finns fyra typer av test som kan genomföras med ROTAS.

1. *Leachable*: Här används vatten som extraktionsmedel och det är främst vattenlösliga ämnen som löses ut ur jordproverna. Enligt standardmetoden används destillerat vatten som extraktionsmedel, men även artificiellt framställt sötvatten kan användas.
2. *Organics*: Många organiska ämnen är inte vattenlösliga och för att extrahera ut dem från jordproverna används ett organiskt extraktionsmedel – metanol.
3. *Metals*: Metallkationers adsorbtion till jordpartiklar ökar med stigande pH och för att effektivt extrahera dessa metalljoner används utspädd saltsyra som extraktionsmedel.
4. *Aqueous*: Detta test mäter toxicitet i vattenprover. Det enda som görs innan mätningen är att filtrera vattnet.

Resultatet räknas i procent luminiscens. Ju mer toxiskt provet är desto mindre bioluminiscerar bakterierna. Proverna jämförs med en blank och resultatet beräknas enligt nedanstående formel där *Lum* står för luminiscens, *t* är tid, *x* är antalet minuter som analysen pågått och *0* är starttiden för analysen.

$$\text{Luminiscens (\%)} = \frac{\frac{Lum_{prov}(t = x)}{Lum_{prov}(t = 0)}}{\frac{Lum_{blank}(t = x)}{Lum_{blank}(t = 0)}} \cdot 100$$

Gränser har satts för att avgöra om provet har hög, måttlig eller ingen/låg toxicitet.

För jord är gränserna:

100%-71% - Ingen eller låg toxicitet

70%-51% - Måttlig toxicitet

50%-0% - Hög toxicitet

För Aqueoustestet ligger gränsen för måttlig toxicitet vid 80 % och gränsen för hög toxicitet vid 50 %.

Vid varje provomgång används även en positiv kontroll för att se att testet fungerar. Den positiva kontrollen ska visa 40 % luminiscens eller mindre.

#### 1.4.4 Faktorer som kan påverka resultatet

- *pH*. Efter att man tillsatt provet bör pH inte vara  $<5$  eller  $>7,5$  då detta kan påverka bakterierna. Även om resultatet indikerar på att provet är toxiskt kan det i själva verket vara pH som orsakat toxiciteten.
- *Färg*. Om extraktet är färgat kan det komma att påverka den ljusmängd som detekteras av luminometern. Prover med höga halter av humusämnen kan t.ex. ge färgade extrakt. Färgade prover absorberar en del av ljuset och luminometern kommer att underskatta luminiscensen.
- *Stimulerande ämnen*. En del prover kan verka stimulerande på luminiscensen. Detta kan bero på närvaro av vissa ämnen som bakterierna använder sig av i luminiscensreaktionen. Även hög osmolaritet kan åstadkomma stimulering av luminiscens. Detta kan maskera eventuell förekomst av toxiska ämnen i proverna. [4]

#### 1.5 Ekotoxikologiska tester

När en fördjupad riskbedömning görs är det viktigt att inte enbart förlita sig på kemiska analyser för att få ett mått på jordens toxicitet. Kemiska analyser är ofta riktade mot föreningar eller grupper av föroreningar som kopplas till en känd användning inom området. Det finns därför en risk att vissa föroreningar förblir oupptäckta. Jorden kan dessutom innehålla metaboliter som bildas genom nedbrytning av de ursprungliga föroreningarna. Dessa kan i vissa fall vara mer toxiska och persistenta, det vill säga motståndskraftiga mot nedbrytning, än modersubstansen. Kemiska analyser tar inte heller hänsyn till samverkans-effekter. Olika ämnen kan förstärka eller motverka varandras effekter vilket kan leda till en över- eller underskattning av riskerna. Ytterligare en nackdel med att använda endast kemiska analyser är att bara förekomsten och halterna av föroreningarna uppmäts och inte deras biotillgänglighet. Många ämnen åldras och binds ofta hårt till organiskt material och är därför varken tillgängliga eller toxiska för organismer. Det finns även en risk att föroreningar tas upp i biota (levande organismer), anrikas och sprids vidare i näringskedjan [3].

Det är viktigt att de ekotoxikologiska testerna har hög känslighet med avseende på föroreningar eftersom olika arter kan vara känsliga för olika föroreningar. Olika organismer bör därför användas i de olika testerna för att få en större säkerhet i bedömningen. Om en förorenad jords toxicitet ska bedömas är det en fördel om tester med marklevande relevanta organismer används. Sättet som organismer i vattenmiljö exponeras för föroreningar kan

skilja sig mycket från hur marklevande organismer exponeras. Finns det däremot en risk att föroreningarna sprids till sjöar och vattendrag bör även vatten- och sedimentlevande organismer användas. Det är viktigt att testa organismer från olika trofiska nivåer. Om en art påverkas kan hela ekosystemet påverkas. Testorganismen bör vara lättodlad, tillgänglig året runt, ha kort livscykel och känd biologi [3]. Det finns ett flertal välstuderade ekotoxikologiska tester med olika organismer från olika trofiska nivåer men något standardiserat testpaket finns ännu inte framtaget i Sverige.

### **1.5.1 Grobarhetstest**

Växter förekommer i de flesta miljöer och spelar en central roll i det ekologiska systemet. När grobarheten undersöks på växter placeras frön i plastskålar med den jord som ska testas. Fröna får växa i mörker i tre till fem dygn beroende på vilken växt som testas. Därefter mäts rot- och skottlängden som jämförs med en kontroll där fröna fått gro i ej förorenad sand. Växter som vanligen används vid grobarhetstester är vitklöver, engelskt rajgräs och rädisa [8].

### **1.5.2 Överlevnad och reproduktionstest: mask**

Daggmaskar är viktiga organismer som har stor betydelse för olika markprocesser som exempelvis nedbrytning, luftning och mineralisering av jorden. Maskar kan ackumulera föroreningar som på det sättet sprids uppåt i näringskedjan. Vid reproduktionstoxikologiska studier på mask räknas antalet lagda äggkokonger varefter tömda kokonger räknas efter att äggen kläckts och maskarna krupit ut. Testerna görs i mörker vid 20° C på agarplattor med de jordar som ska testas. Under försökets gång noteras eventuell dödlighet och annan påverkan. Resultaten från testerna jämförs därefter med en kontroll [8].

### **1.5.3 Upptag i biota**

Tester finns för att mäta föroreningars biotillgänglighet för växter och maskar. När upptaget av föroreningar i växter mäts läggs frön i den förorenade jorden som tillåts växa under bestämda ljus- och temperaturförhållanden. Efter lämplig tid tas växterna upp ur jorden, tvättas och analyseras för att se hur stor mängd av föroreningarna som växterna tagit upp [8].

När upptaget av föroreningar i maskar mäts gjuts testjord och havregryn in i agarplattor som maskarna sedan placeras på. Efter 20 dygn flyttas maskarna över till en platta utan någon testsubstans där de får vistas i ett dygn för att tömma tarmarna. Därefter plockas maskarna bort för att sedan analyseras på sitt innehåll av föroreningar.

Det finns ytterligare en metod att mäta föroreningars biotillgänglighet för mask. Metoden är fortfarande under utveckling. Den går ut på att jordar som ska testas extraheras med magsaft från mask varefter proverna centrifugeras och föroreningsinnehållet i supernatanten mäts. Denna metod är betydligt snabbare än det upptagstest i mask som används idag.

## 1.6 PAH

Polycykliska aromatiska kolväten, PAH, bildas bland annat vid ofullständig förbränning av organiskt material och förekommer i bland annat bilavgaser och rök från vedeldning och skogsbränder. Kreosot, som framställs ur stenkolkstjära och har utnyttjats som träskyddsmedel vid äldre impregneringsanläggningar och sågverk, består till stor del av PAHer [9]. PAHer förekommer även i högaromatiska oljor som finns i bildäck vilka bidrar till spridningen av PAHer i miljön när däcken slits. Återvunna bildäck används sedan för att tillverka gummigranulat som används som utfyllnad i konstgräsplaner [10].

Det finns över 100 olika PAHer med olika effekter på miljö och hälsa. De förekommer sällan var för sig utan ofta i en blandning av flera olika föreningar. I Naturvårdsverkets rapport ”Generella riktvärden för förorenad mark” har endast 16 PAHer tagits med. De är indelade i två grupper, cancerogena och övriga PAHer, se tabell 2. Dessa 16 PAHer har valts för att det finns mest information att tillgå om dessa. Riktvärdet är baserat på det mest toxiska ämnet inom ämnesgruppen [1].

**Tabell 2.** De 16 PAHer som riktvärdena för förorenad mark baseras på [1]

<b>Cancerogena PAH</b>	<b>Övriga PAH</b>
Benso[a]antracen	Naftalen
Chrysen	Acenaftalen
Benso[b]fluoranten	Acenaften
Benso[k]fluoranten	Fluoren
Indeno[1,2,3-cd]pyren	Fenantren
Diben[a,h]antracen	Antracen
Benso[a]pyren	Fluoranten
	Pyren
	Benso[ghi]perylen

### 1.6.1 Fysikaliska/kemiska egenskaper

PAHer består av två eller flera kondenserade bensenringar. De kan delas in i olika grupper beroende på molekylvikten; låg-, mellan- och högvikts-PAH [11]. Som rena föreningar i rumstemperatur förekommer de i fast form och är färglösa, vita, gula eller ljus gulgröna till färgen [12]. PAH med den lägsta molekylvikten, naftalen, har en smältpunkt på 81°C och kokpunkt på 218°C. Både smält- och kokpunkten stiger med ökande molekylvikt. I motsats till smält- och kokpunkten sjunker vattenlösligheten och ångtrycket med ökande molekylvikt. Både vattenlösligheten och ångtrycket är jämförelsevis låga, även för PAHer med låg molekylvikt [13]. Naftalen som är den lättaste av PAHerna har en vattenlöslighet på 30 mg/l och ett ångtryck på 0,0072 kPa [14].

$K_{ow}$  är ett mått på hur ett ämne fördelar sig mellan n-oktanol och vatten. Ju större andel av substansen som fördelar sig i oktanolfasen jämfört med vattenfasen desto mer fettlösligt är ämnet. Ett ämne anses vara fettlösligt om det har ett log  $K_{ow}$ -värde över 2. Samtliga PAHer har ett log  $K_{ow}$ -värde över 2 och är därmed fettlösliga. På grund av denna egenskap kan PAHer vara bioackumulerande.

### 1.6.2 Uppträdande i miljön

PAHers uppträdande i miljön beror till stor del på deras kemiska och fysikaliska egenskaper. De vanligaste nedbrytningssätten för PAHer är kemisk, fotolytisk och metabolisk nedbrytning. Den metaboliska nedbrytningen sker med hjälp av mikroorganismer. Nedbrytningsprocesserna är beroende av ett antal miljöfaktorer såsom temperatur, syretillgång och tillgång till mikroorganismer [13]. PAHer är relativt svårnedbrytbara genom hydrolys. På grund av att de löser sig dåligt i vatten binds de i vattenmiljö till partikelytor och sedimenterar på botten där de kan bli långlivade [9]. Persistensen ökar med molekylvikten och benso[a]pyren, som är den PAH som anses vara en av de mest toxiska för människa, kan ha en halveringstid på >1 år i sediment [13].

I jord är PAHer oftast bundna till partiklar, till exempel humussyror. Humussyror har lipofila egenskaper och kan därför binda fettlösliga ämnen [13]. PAHer kan avdunsta till luft från såväl vatten som jord. I luft kan föreningarna brytas ner genom fotolys eller genom att reagera med olika kemikalier i luften. Nedbrytningen sker ofta inom en period av dagar till veckor. Halveringstiden i jord och vatten rör sig vanligen om veckor till månader och nedbrytningen sker främst av mikroorganismer [12].

### 1.6.3 Toxikokinetik och toxicitet

För människa är inandning den främsta upptagsvägen av PAH, antingen aktivt genom cigaretttrök eller passivt genom PAH-kontaminerad luft. PAH kan även tas upp via huden genom kontakt med kontaminerad jord eller exempelvis tjära samt oralt via dricksvatten eller genom rökt eller stekt mat [12].

Många organismer bryter ned PAH relativt snabbt. Däggdjur har exempelvis utvecklat enzymer, bland annat cytokrom P450-enzym (CYP450), som omvandlar fettlösliga ämnen till mindre fettlösliga ämnen som lättare kan lämna kroppen. CYP450 finns i riklig mängd i levern men förekommer i nästan alla vävnader. Det har dock visat sig att många av metaboliterna är mer toxiska än den ursprungliga substansen. En del PAH-er är mutagena och cancerogena vilket har visat sig vara orsakat av just metaboliter [15]. Benso[a]pyren och benso[a]antracen är två av de mest cancerogena PAH-erna. En epidemiologisk studie har visat en ökad frekvens av lungcancer hos bland annat koksverksarbetare och rökare. Cigaretttrök har visat sig innehålla bland annat benso[a]pyren och benso[a]antracen. Många av de biologiska effekterna orsakade av PAH-er beror på den plana strukturen hos molekylerna som tillåter dem att binda till DNA i cellkärnan och till hemoglobin [10, 13]. Benso[a]pyren och 7,12-dimetylbenso[a]antracen har även visat sig ge vaskulära effekter, ateroskleros, hos fågel utan att dessa haft förhöjda halter av kolesterol [15]. I regel ökar toxiciteten med ökande molekylvikt och  $K_{ow}$ -värde [13].

PAH-er har visat sig vara mer toxiska mot akvatiska organismer i närvaro av UV-ljus och synligt ljus än utan. Fisk kan dessutom metabolisera PAH-er till metaboliter som kan ha teratogena, mutagena och cancerogena egenskaper. Naftalen som är den mest vattenlösliga av PAH-erna har visat sig vara mycket toxisk mot vattenlevande organismer. Vid studier av naftalens akuta toxicitet mot fisk, *Onchorynchus mykiss*, var  $LC_{50}$ -värdet 0,11 mg/l efter 96 timmar. Studier på alg (inhibering av tillväxt) efter 72 timmar gav ett  $IC_{50}$ -värde på 0,0001 mg/l [14].

## 1.7 ARSENIK

Arsenik är det tjugonde vanligast förekommande elementet i jordskorpan [15]. Andra källor till arsenikförekomsten i miljön är bland annat via spridning från smältverk, gruvdrift, träimpregnering med CCA-salter (koppar, krom och arsenik) samt från förr då det användes i vissa pesticider [16]. Arsenik används även för konservering av uppstoppade djur.

Människor exponeras för oorganisk arsenik främst från dricksvatten, mark och luft och organisk arsenik från fisk och skaldjur [17].

### **1.7.1. Fysikaliska/kemiska egenskaper**

Arsenik (As) som rent ämne är svårt att karaktärisera på grund av dess komplexa kemiska egenskaper och för att det förekommer i så många olika föreningar. I naturen förekommer arsenik i både trevärd och femvärd form. Bland de vanligaste oorganiska trevärdade och femvärdade föreningarna finns bland annat arseniktrioxid ( $\text{As}^{3+}$ ) och arsenater ( $\text{As}^{5+}$ ). Även organiska arsenikföreningar, som exempelvis metylerade former av arsenik, förekommer och dessa former bildas av mikroorganismer i jord och vatten [12]. Molekylvikten för arsenik är 74,9 g/mol och den är luktlös och nästan smaklös [18]. Vattenlösligheten är 50 mg/l och arsenik sublimerar vid 616°C [19]

### **1.7.2. Uppträdande i miljön**

Det finns olika faktorer som påverkar metallers mobilitet i marken och det är dels jordens pH, dels redoxförhållanden och halt av löst organiskt kol. Arsenik i form av arsenat adsorberas starkt till järn- och aluminiumoxider vid  $\text{pH} < 8$ . Om järnet reduceras leder det till att arsenik frigörs och därmed blir lätttrörligt. Förändringen i redoxstatus i en jord kan ha mycket stor betydelse för metallers frigörelse och transport. Humusämnen kan binda metallkationer, till exempel arsenat, och är därför en viktig metallfälla i jorden. Vid högt pH ökar lösligheten av humusämnen som därmed kan ta med sig de bundna metalljonerna i lösningen [16].

I luft förekommer arsenik främst i form av arseniktrioxid. Genom torr- eller våtdeposition kan det sedan hamna i marken eller i vattnet. I vattenmiljö förekommer arsenik främst i form av oorganisk femvärd arsenik i oxiderade förhållanden som ytvatten, och som trevärd arsenik i reducerade förhållanden som grundvatten. Vattenlösliga former kan transporteras långa vägar med vattnet och spridas på det sättet. Metylering av arsenik är viktig för transporten från sediment vidare till vatten och slutligen till luft. Metylerad arsenik är mer flyktig än icke-metylerade arsenikföreningar [18].

### 1.7.3 Toxikokinetik och toxicitet

För människa kan arsenik tas upp oralt via mat och dricksvatten. Andra exponeringsvägar är via inandning och via huden. Ungefär 80-90 % av en engångsdos arsenik, i form av arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) eller arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ), har visat sig absorberas från mag- tarmkanalen hos människa och försöksdjur.

I kroppen sker metylering av arsenik, vilket antas vara ett sätt att omvandla toxisk oorganisk arsenik till mindre toxisk organisk arsenik. Jämfört med oorganisk arsenik är de metylerade formerna mindre benägna att reagera med kroppsvävnad, har lägre akuttoxicitet och har lättare att lämna kroppen via urin. Metylering av arsenik sker främst i levern [15].

Symptom på akut toxicitet av arsenik hos människa är bland annat illamående och kräkningar, arytmi och stickningar i händer och fötter. Intag av låga halter oorganisk arsenik under lång tid kan ge leverskador, missfärgningar i huden samt vårtliknande strukturer på handflator och fotsulor. Kronisk exponering för arsenik kan även ge skador på både det perifera och det centrala nervsystemet. Om huden kommer i kontakt med arsenik kan det orsaka rodnader och svullnad på huden. Intag av metyl- och dimetylarsenik kan orsaka diarré och skador på njurarna. Amerikanska naturvårdverket, USEPA, har klassificerat oorganisk arsenik som cancerogent. Arsenik har visat sig leda till bland annat hud-, lever- och lungcancer.

Engångsdos i storleksordningen 70-180 mg arsenik kan vara dödligt för människa [20, 15].

Arsenik är även toxiskt för akvatiska organismer.  $\text{LC}_{50}$ -värdet för fisk, *Pimephales promelas*, efter 96 timmar är 9,9 mg As/liter. Även studier på hoppkräfta, *Daphnia magna* (48 timmar), och alger (72 timmar) har gjorts då immobilitet respektive inhibering av tillväxt studerats.  $\text{EC}_{50}$ - och  $\text{IC}_{50}$ -värdena från dessa studier är 1,4 respektive 0,006 mg As/liter [19].



## 2. MATERIAL OCH METODER

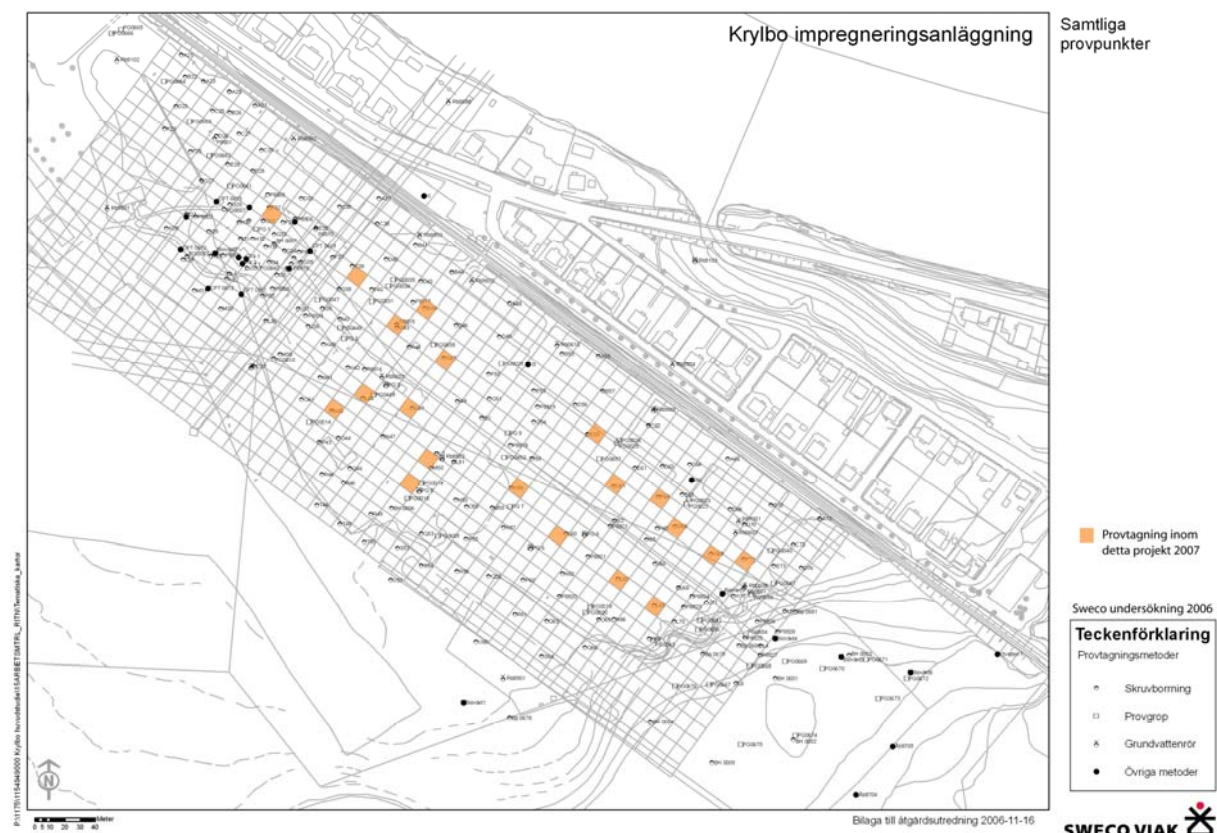
### 2.1. Provområde - Krylbo

Området i Krylbo har under åren 1911 till 1986 använts för impregneringsverksamhet av Statens järnvägar, numera Banverket. Impregneringen har gjorts med kreosotolja och metallsalter vilket innebär att ett område på ungefär 5 ha blivit förorenat av PAH och metaller, främst arsenik.

Området är i stort sett plant och har fyllts ut med ett lager fyllnadsmassor som i allmänhet utgörs av sand, grus och sten. Massorna är tydligt påverkade av impregneringsverksamheten och asfaltliknande kreosotmassa finns på vissa ställen i fyllnadsmassorna. Under fyllnadsmaterialet finns den ursprungliga jordarten som består av siltiga och sandiga sediment [21].

### 2.2. Provtagning

Området delades in i ett rutnät och jordprover togs systematiskt slumpmässigt. Systematisk slumpmässig provtagning innebär att ett område delas in i ett rutnät och att en provpunkt placeras i varje enhetsyta, men med slumpmässig placering [22].



**Figur 1.** Översiktskarta över området i Krylbo där impregneringsverksamhet pågått mellan åren 1911 och 1986. De fyllda rutorna representerar provpunkterna som använts i detta projekt.

Tjugo jordprover med olika innehåll av PAH och arsenik valdes sedan ut för att testas med bland annat ROTAS, se figur 1. Mellan provtagningen och ROTAS-analysen förvarades jordproverna i plastpåsar mörkt och i ca 5°C.

Grundvattenproverna togs inom samma förorenade område. Dessa prover förvarades i syradiskade plastflaskor i mörker och ca 5°C i väntan på analys.

## **2.3. Utförande**

### **2.3.1. Förberedelser**

ROTAS-testet startade med att en luminometer kopplades till en dator och ROTAS-mjukvaran startades. För att förbereda de frystorkade bakterierna, *Vibrio fischeri*, tillsattes 27 ml saltlösning (NaCl 2 %) för Leachable- och Aqueoustestet och 54 ml (NaCl 2,5 %) för Organicstestet, se mer om de olika testerna i stycke 1.4.3. Burken med bakterierna och saltlösningen (reagenset) skakades om och lämnades att stå i rumstemperatur i 50 minuter.

### **2.3.2. Provberedning**

Påsarna, innehållande osiktade jordprover, skakades innan de öppnades för att jorden skulle blandas om och därefter togs 5 cm<sup>3</sup> jord ur varje påse och placerades i märkta plasticsprutor. Stora korn undveks. 10 ml av extraktionsmedlet, som i Leachable-testet var antingen destillerat vatten eller syntetiskt medelhårt sötvatten (NaHCO<sub>3</sub> 96 mg/l, CaSO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 60 mg/l, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 123 mg/l och KCl 4 mg/l) framtaget enligt riktlinjer från USAs naturvårdsverk, tillsattes därefter till varje prov. I Organicstestet användes 100 % metanol som extraktionsmedel.

Proverna skakades sedan kraftigt i 2 minuter så att jorden och extraktionsmedlet blandades ordentligt med varandra. Sprutorna ställdes med pipen uppåt några minuter varvid jordpartiklarna sedimenterade. 1 ml av extraktet sögs upp i en mindre spruta med ett 0,45 mikron PES-filter så att eventuella partiklar filtrerades bort, se figur 2.



**Figur 2.** Sprutor innehållande jord som skakats tillsammans med extraktionsmedel. Ett 0,45 mikron-filter med en 2 ml-spruta sattes på varje spruta.

### 2.3.3. Mätning

Efter att 50 minuter gått från att reagentet förbereddes överfördes 1 ml av reagentet (2 ml i Organicstestet) med hjälp av en pipett till en provplatta. Därefter kalibrerades plattan i luminometern i 3 minuter. Resultaten ansågs tillförlitliga om luminiscensvärdet låg mellan 500 och 3500 efter kalibreringen.

När kalibreringen var utförd tillsattes blanken, den positiva kontrollen och de filtrerade proverna till respektive brunnar. Den positiva kontrollen bestod av koppar(II)sulfat (10 mg/l) för samtliga tester utom för Organics-testet där den bestod av kolväten i metanol (dieselbränsle 80 mg/l, naftalen 160 mg/l, fenantren 160 mg/l). Därefter analyserades provplattan i luminometern under 30 minuter med en avläsning per minut. Resultatet kunde följas direkt på datorskärmen, se figur 3. Om något av proverna visade på måttlig eller hög toxicitet efter 30 minuter så mättes pH i dessa brunnar med hjälp av pH-remsor. Resultaten efter 15 och 30 minuter användes vid senare beräkningar.



**Figur 3.** Pågående ROTAS-test. En dator med ROTAS-programvara samt en provplatta ansluten till en luminometer.

## 2.4 Laktester

Enstegslaktester, där förhållandet mellan vattenfas och fast fas var 10:1, gjordes på tio av jordproverna med destillerat vatten som vattenfas, för att undersöka hur stor andel arsenik och PAH som lakades ut. Laktesterna utfördes av AnalyCen i Linköping. De erhållna vatteneluat analyserades med ROTAS och resultaten jämfördes med resultaten från ROTAS Leachable-test där destillerat vatten använts som extraktionsmedel. Syftet var att jämföra ROTAS-extraktionen med standardiserade laktester.

## 2.5 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester

Resultaten från ROTAS jämfördes med resultaten från de ekotoxikologiska testerna som gjorts på engelskt rajgräs, vitklöver och mask. På engelskt rajgräs och vitklöver gjordes grobarhetstester där rot- och skottlängden mättes på frön som fått gro på de förorenade jordarna [8].

På masken *Enchytraeus crypticus*, som fått vistas i de förorenade jordarna, räknades antal lagda kokonger, antal kläckta kokonger samt antal överlevande maskar vid försöksslut [8]. Samtliga ekotoxikologiska tester med växter och mask utfördes av svenska miljöinstitutet, IVL.

## 2.6 Statistisk analys

För att få en överblick av resultaten för alla variabler gjordes en multivariat regressionsanalys som innebär att alla observationer och variabler jämförs samtidigt. En principal-komponentanalys, PCA, användes för att se om det fanns några trender i materialet och om det fanns några avvikande observationer. Därefter gjordes en PLS (Partial Least Squares Projection to Latent Structures) som användes för att kalkylera förändringar i x-variabler (föroreningar) och korrelera dessa förändringar till förändringar i y-variabeln, som i detta fall var toxicitet [23]. Med hjälp av en PLS kunde man få en överblick över vilka föroreningar som var mest toxiska för bakterierna.

Medelvärden baserat på resultaten efter 15 minuter respektive 30 minuters mättid för de 20 jordproverna jämfördes med ett parat tvåsidigt t-test. Samma test användes för att undersöka om det fanns någon skillnad i resultaten från ROTAS-analyserna då jordproverna extraherats med destillerat vatten respektive syntetiskt sötvatten, samt för att se om det fanns någon skillnad i resultaten då jordproverna extraherats under 2 minuter och eluaten från lakttesterna. I de fall då data inte var normalfördelade användes Wilcoxon's parade t-test. Ett 95 % konfidensintervall användes och skillnaden ansågs signifikant då  $p < 0,05$ .

För att se om det fanns något samband mellan föroreningshalt och toxicitet användes linjär regression. Sambandet ansågs signifikant då  $p < 0,05$ .

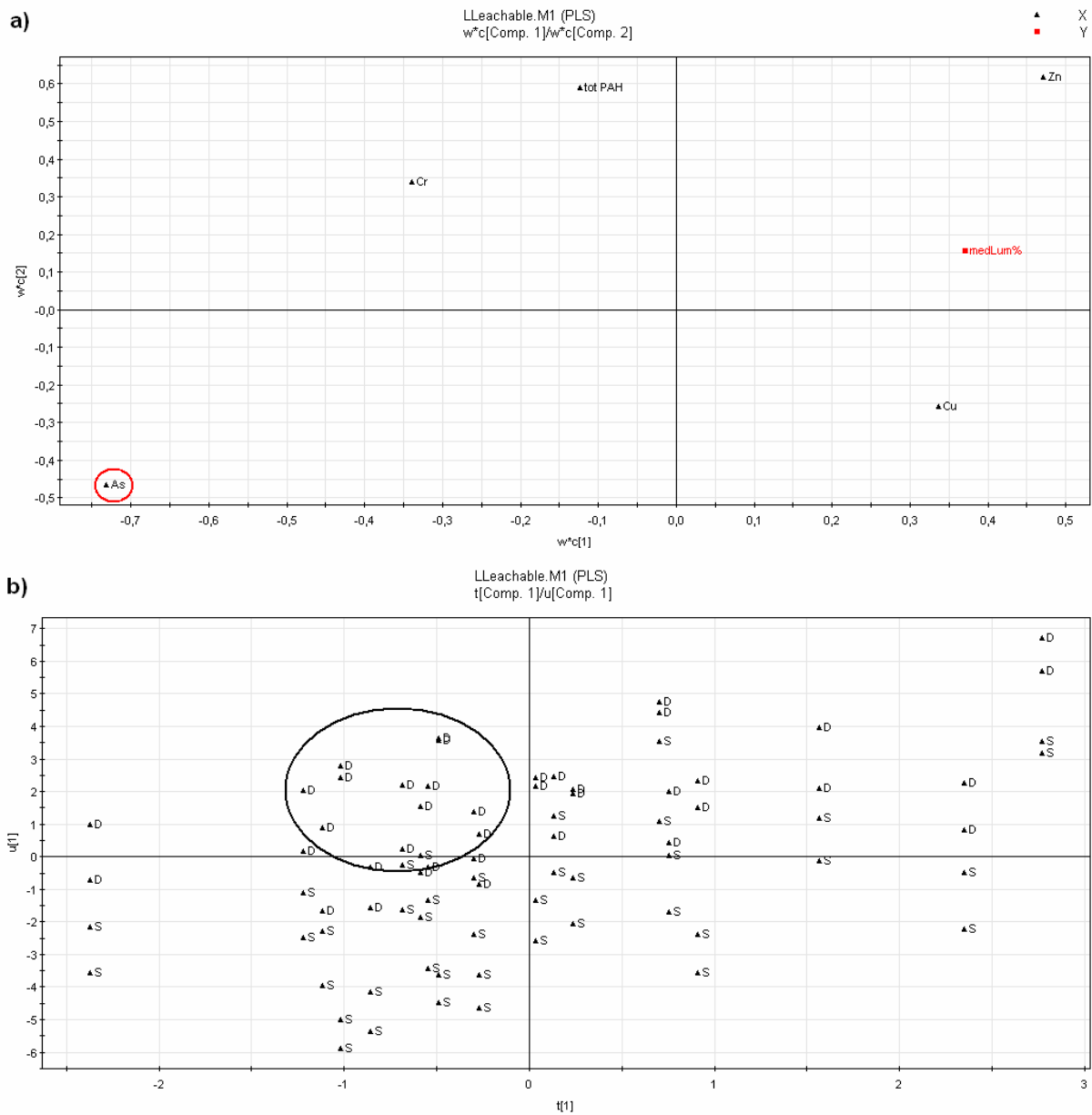
## **3. RESULTAT**

### **3.1 Grundvattenprover**

På grund av att grundvattenprovtagningen var bristfällig och föroreningshalterna mycket låga i grundvattenproverna, i flera fall under detektionsgränsen för den kemiska analysen, kommer resultaten från Aqueous-testet inte att behandlas vidare.

### **3.2 Multivariat regressionsanalys**

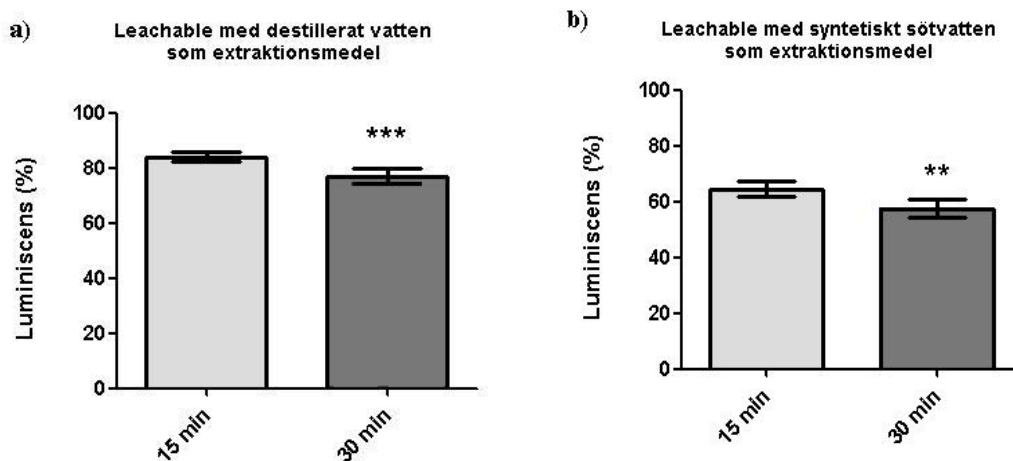
I principalkomponentanalysen som gjordes över resultaten från Leachable-testen kunde inga tydliga grupperingar ses. Däremot avvek ett av proverna från de övriga. Detta prov hade en hög halt organiskt material samt ett pH-värde som var betydligt högre än i de övriga jordproverna. I PLS-analysen som gjordes över jordarna sattes luminiscensen som y-variabel och de olika föroreningarna i jorden som x-variabler. Figur 4 a) visar att arsenik är negativt korrelerad mot luminiscensen och att det är denna variabel som har störst påverkan på toxiciteten. Även krom hade en viss påverkan på toxiciteten. Detta gällde främst proverna som extraherats med destillerat vatten, se figur 4b.



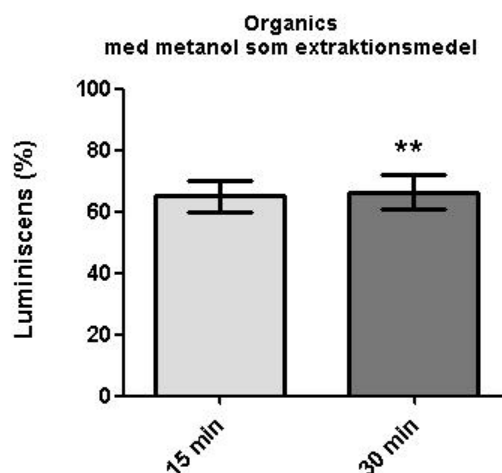
**Figur 4.** PLS-analys baserad på toxiciteten och olika föroreningskoncentrationer i jorden ( $R^2X=0,288$ ,  $R^2Y=0,03$ ,  $Q^2=-0,111$ , två komponenter). (a) Arsenik är negativt korrelerad mot luminiscensen. Det är denna variabel som påverkar toxiciteten mest. (b) Krom verkade ha större betydelse för toxiciteten när jordproverna extraherades med destillerat vatten (D) än när de extraherades med sötvatten (S) vilket går att se av att det främst är jordproverna som extraherats med destillerat vatten som befinner sig i den övre vänstra kvadranten.

### 3.3 Mättidens betydelse

Det fanns en signifikant skillnad i resultatet mellan 15 och 30 minuter för samtliga tester, se figur 5. I Leachable-testen minskade luminiscensen med tiden både då jordarna extraherats med destillerat vatten och med syntetiskt framställt sötvatten. Till skillnad från Leachable-testen var den toxiska effekten lägre efter 30 minuter jämfört med efter 15 minuter för Organics-testet, se figur 6.



**Figur 5.** Luminiscensen (medelvärde  $\pm$ SD) efter att 20 jordprover ( $5 \text{ cm}^3$ ) extraherades med 10 ml destillerat vatten (a) eller syntetiskt framställt sötvatten (b) varefter extraktet tillsattes till reagenset. Proverna mättes därefter i luminometern. Mätningen pågick under 30 minuter med en mätning av luminiscensen varje minut. För att se om det fanns någon skillnad i luminiscens mellan 15 och 30 minuter jämfördes resultaten från dessa två tider med hjälp av ett parat tvåsidigt t-test med där skillnaden ansågs signifikant då  $p < 0,05$ . (\*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ )

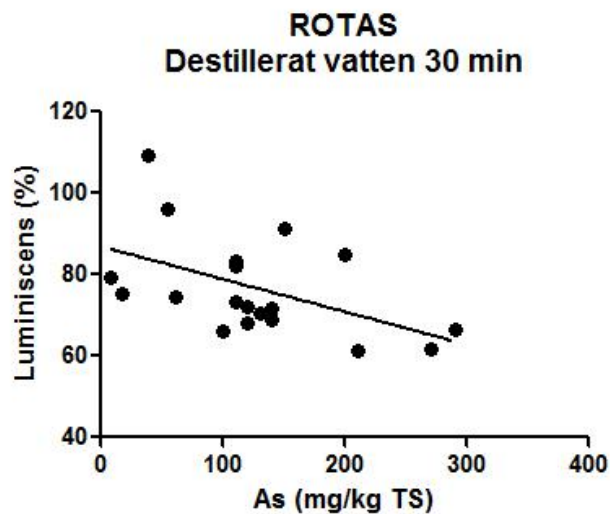


**Figur 6.** Luminiscensen (medelvärde  $\pm$ SD) efter att 20 jordprover ( $5 \text{ cm}^3$ ) extraherats med 10 ml metanol (100 %) varefter extraktet tillsattes till reagenset som sedan mättes i luminometern. Mätningen pågick under 30 minuter med en mätning av luminiscensen varje minut. För att se om det fanns någon skillnad i luminiscens mellan 15 och 30 minuter jämfördes resultaten från dessa två tider med hjälp av ett parat tvåsidigt t-test där skillnaden ansågs signifikant då  $p < 0,05$ . (\*\*\*= $p < 0,01$ )

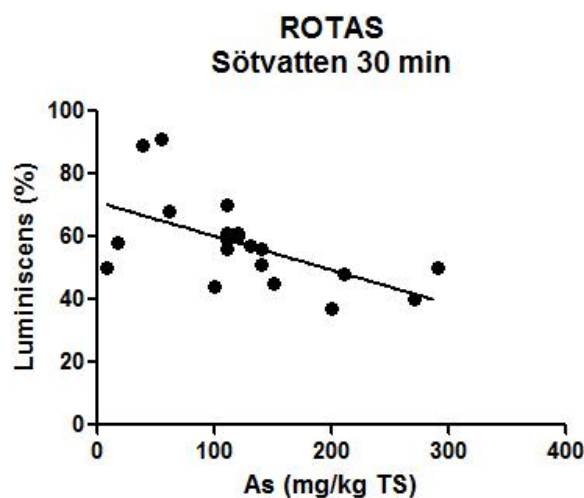


### 3.4 Samband mellan toxicitet och föroreningshalt

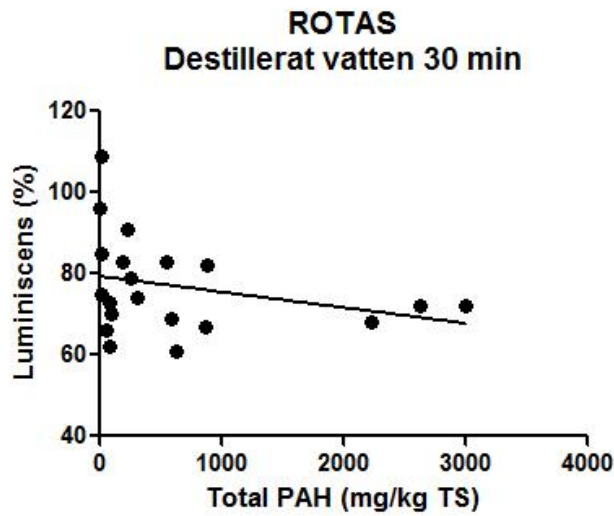
Jordprovernas arsenik- och PAH-halt varierade mellan 7,6 och 290 mg/kg TS respektive mellan 5,1 och 3000 mg/kg TS. Med hjälp av linjär regression studerades eventuella samband mellan toxicitet och föroreningshalt. Oberoende av om destillerat vatten eller syntetiskt framställt sötvatten använts som extraktionsmedel ökade toxiciteten med ökande arsenikhalt, se figur 7 och 8. Däremot fanns det ingen korrelation mellan PAH-halt och toxicitet när jordarna extraherats med destillerat vatten respektive syntetiskt framställt sötvatten, se figur 9 och 10.



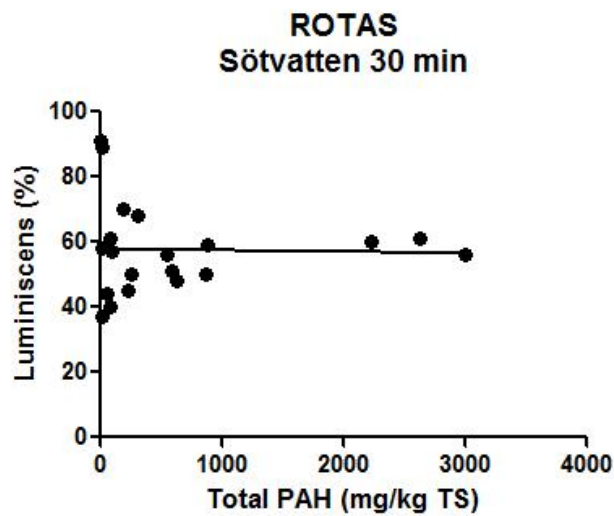
**Figur 7.** Samband mellan luminiscens och jordprovernas arsenikhalt. Varje punkt representerar ett medelvärde av tre replikat. Destillerat vatten användes som extraktionsmedel. Sambandet mellan inhibering av luminiscens och arsenikhalt var statistiskt signifikant.  $y = -0,0792x + 86,736$ ,  $R^2=0,2476$ ,  $p=0,0256$ .



**Figur 8.** Samband mellan luminiscens och jordprovernas arsenikhalt. Varje punkt representerar ett medelvärde av tre replikat. Som extraktionsmedel användes syntetiskt framställt sötvatten. Sambandet mellan inhibering av luminiscens och arsenikhalt var statistiskt signifikant.  $y = -0,1079x + 71,057$ ,  $R^2=0,3307$ ,  $p=0,0080$ .

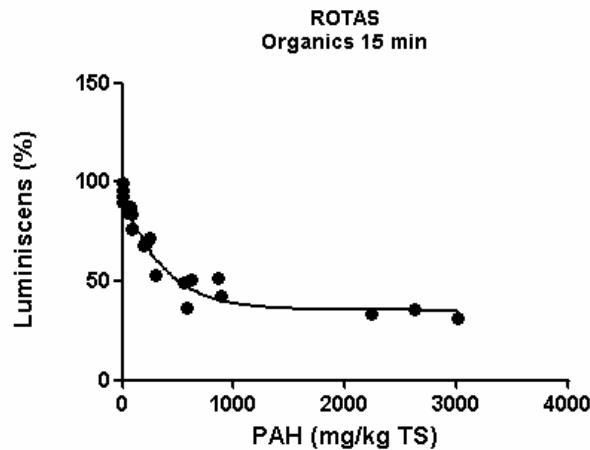


**Figur 9.** Samband mellan luminiscens och jordprovernas PAH-halt. Varje punkt representerar ett medelvärde av tre replikat. Destillerat vatten användes som extraktionsmedel.  
 $y = -0,0039x + 79,335$ ,  $R^2 = 0,08509$ ,  $p = 0,2121$



**Figur 10.** Samband mellan luminiscens och jordprovernas PAH-halt. Varje punkt representerar ett medelvärde av tre replikat där syntetiskt framställt sötvatten användes som extraktionsmedel.  
 $y = -0,0003x + 57,819$ ,  $R^2 = 0,00076$ ,  $p = 0,9084$

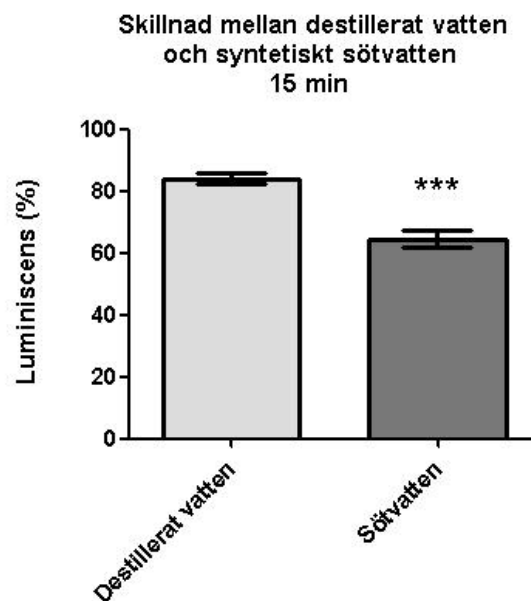
I Organics-testet där metanol användes för att extrahera jordarna fanns ett tydligt samband mellan PAH-halt och minskande luminiscens, se figur 11. De prover som innehöll högst halter PAH var brun- eller gulfärgade, antagligen på grund av de höga PAH-halterna.



**Figur 11.** Samband mellan luminiscens och jordprovernas PAH-halt. Varje punkt representerar ett medelvärde av två replikat. Metanol (100 %) användes som extraktionsmedel.

### 3.5 Extraktionsmedlets betydelse

Luminiscensmedelvärdet från analysen där syntetiskt sötvatten använts som extraktionsmedel var signifikant lägre än resultatet från analysen med destillerat vatten ( $p < 0,001$ ), se figur 12.



**Figur 12.** Luminiscensen (medelvärde  $\pm$ SD) för 20 jordprover som extraherats med destillerat vatten och syntetiskt framställt sötvatten. De två olika metoderna jämfördes med varandra med hjälp av ett tvåsidigt parat t-test där skillnaden ansågs signifikant då  $p < 0,05$ . (\*\*= $p < 0,01$ )

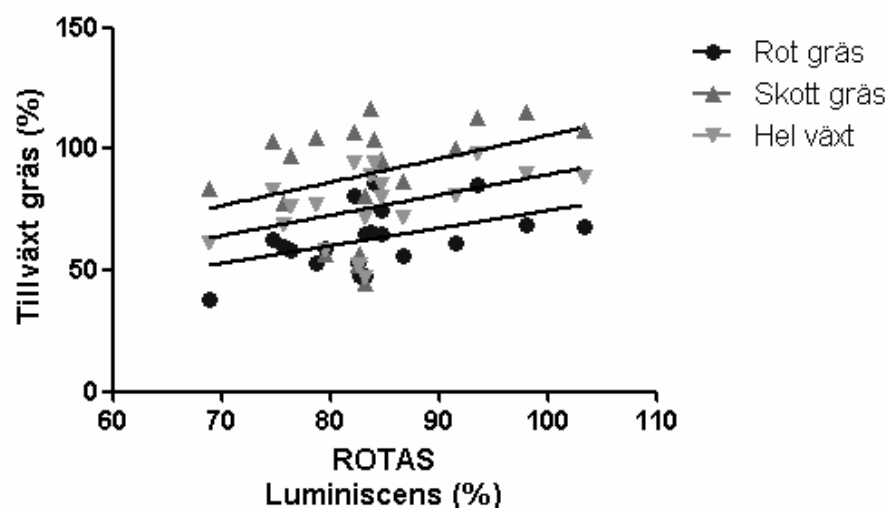
### 3.6 Laktester

Andelen arsenik och PAH som lakades ut genom enstegslakttesterna var mycket låg. I eluaten från lakttesterna med destillerat vatten var andelen utlakad arsenik upp till 1,47 % av jordens totala arsenikinnehåll. Andelen utlakad PAH var ännu mindre. Analysresultaten visar att det främst var de lättare, och därmed de mer vattenlösliga, PAHerna som lakades ut. I lakttesterna med metanol lakades så lite arsenik ut att halterna i de flesta fall låg under detektionsgränsen för den kemiska analysen. Medelvärdet för andelen PAH som lakades ut med metanol var ungefär 2 %.

Eluaten från lakttesterna analyserades med ROTAS för att jämföra ROTAS extraktion av jordproverna med standardiserade lakttester. Efter 15 minuter var luminiscensen signifikant lägre för eluaten från lakttesterna ( $p=0,0071$ ) medan det efter 30 minuter inte fanns någon signifikant skillnad i luminiscensmedelvärdena från ROTAS-extraktionen och lakttesterna.

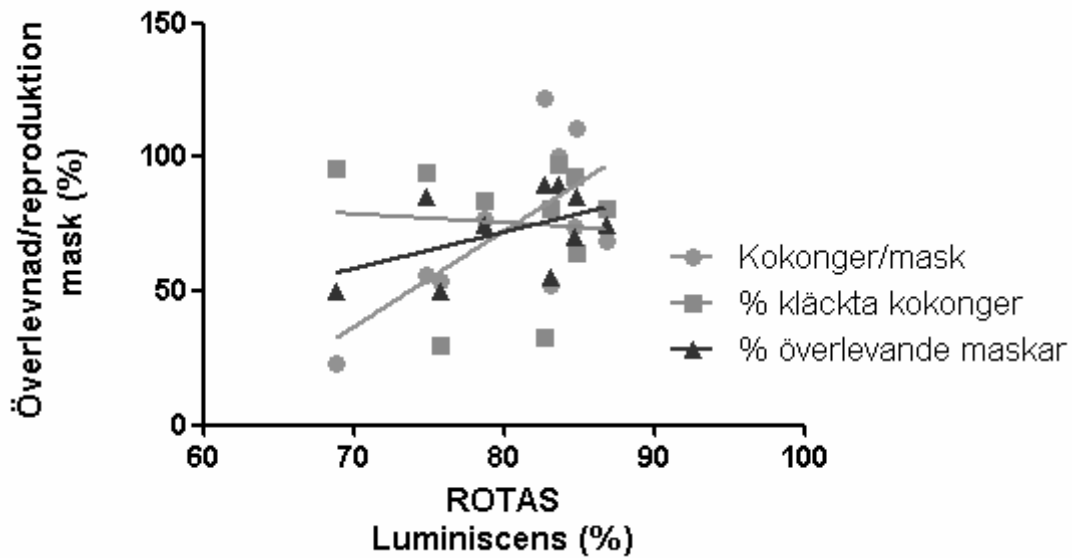
### 3.7 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester

Det fanns en signifikant korrelation mellan inhibering av luminiscens och inhibering av rottillväxt hos engelskt rajgräs, se figur 13. Däremot fanns det ingen korrelation mellan inhibering av luminiscens och inhibering av skottillväxt eller tillväxt av hel växt. Det fanns heller ingen korrelation mellan ROTAS och tillväxtinhibering hos vitklöver.



**Figur 13.** Samband mellan grobarhetstesterna med engelskt rajgräs och inhibering av luminiscens i ROTAS Leachable-test där destillerat vatten användes som extraktionsmedel. Det fanns en signifikant korrelation mellan inhibering av luminiscens och inhiberingen av rottillväxt ( $p=0,0362$ ). Korrelationen mellan inhibering av luminiscens och inhiberingen av skottillväxt samt helväxt var inte signifikant.

Mellan ROTAS och toxicitetstesterna på mask fanns en signifikant korrelation mellan inhibering av luminiscens och andelen lagda kokonger, se figur 14. Det fanns däremot ingen signifikant korrelation mellan inhibering av luminiscens och andelen kläckta kokonger eller andelen överlevande maskar.



**Figur 14.** Samband mellan överlevnads- och reproduktionstesterna på masken *Enchytraeus crypticus* och inhibering av luminiscens i ROTAS leachable-test där destillerat vatten använts som extraktionsmedel. Korrelationen mellan inhibering av luminiscens och inhiberingen av antalet lagda kokonger/mask var statistiskt signifikant ( $p=0,0326$ ).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Mättidens betydelse

I Leachable-testet, där destillerat vatten och syntetiskt framställt sötvatten användes som extraktionsmedel, var inhiberingen av luminiscensen större efter 30 minuter än efter 15 minuter. Anledningen till detta kan vara att vissa ämnen tar längre tid på sig att påverka bakterierna. Backhaus *et al.* har visat att inhiberingen av luminiscensen påverkas på olika sätt beroende på hur substanserna verkar på bakterien. Om cellmembranet skadas innebär det att även energiförsörjningen skadas, vilket leder till att luminiscensen minskar relativt snabbt. Om substanserna däremot påverkar proteinsyntesen kan det dröja längre än de 15-30 minuter som ett ROTAS-test normalt pågår innan man ser någon påverkan på luminiscensen [24]. Detta innebär en viss risk för att en toxisk påverkan inte upptäcks när mättiden begränsats till 30 minuter.

I Organics-testet var förhållandena de motsatta, det vill säga att inhiberingen av luminiscensen var mindre efter 30 minuter än efter 15 minuter. Om luminiscensförloppet studeras för blankprovet, som består av enbart metanol och reagens, kan en ökning i luminiscens även noteras där. Detta kan tyda på att bakterierna börjat nyttja metanol som kolkälla. En annan tänkbar förklaring är att det även lakas ut organiska föreningar från jorden som bakterierna kan nyttja som kolkälla. Detta kan innebära att en toxisk påverkan i viss mån kan döljas.

### 4.2 Samband mellan toxicitet och föroreningshalt

Sambandet mellan arsenikhalt och inhibering av luminiscens var signifikant både då jordarna extraherats med destillerat vatten och då de extraherats med syntetiskt framställt sötvatten. Det fanns dessutom en positiv korrelation mellan arsenik- och kromhalterna i jordarna vilket innebär att den uppmätta effekten av arsenik även kan vara en effekt av jordens kromhalt. För testet med destillerat vatten var sambandet tydligare mellan föroreningshalt och toxicitet efter 15 minuter än efter 30 minuter. Detta kan bero på att provet innehöll andra föroreningar som påverkade bakterierna och att dessa tog längre tid på sig att verka på bakterierna. Variationen i toxicitet mellan jordproverna kan då ha ökat, vilket syns som ett svagare samband mellan arsenikhalt och luminiscens.

Ingen påverkan på jordprovernas toxicitet av PAH kunde uppmätas, vilket kan förklaras med att PAHerna inte är vattenlösliga och därför bundna till jordpartiklar och organiskt material i

jordarna. Detta kan bekräftas med lakttesterna som utfördes på tio av jordarna som visade att PAH-halterna i eluaten var mycket låga, se stycke 4.4. MicroTox, som använder samma bakterie som ROTAS, har tidigare använts flitigt som ett screening-instrument för att undersöka förorenade områden ibland annat Storbritannien. MicroTox har dock visat låg sensitivitet mot några vanligt förekommande ämnen som PAHer, vissa metaller samt vissa pesticider [25].

Den låga känsligheten för PAHer kan även tyda på att föreningarna inte är akuttoxiska i sig utan att de behöver metaboliseras först. El-Alawi *et al.* gjorde kort- och långtidsstudier på *Vibrio fischeri* där fotoinducerad toxicitet av PAH undersöktes. Testet gjordes med 12 olika PAHer. Korttidstestet, som pågick under 15 min, visade inte på någon fotoinducerad toxicitet för någon av PAHerna medan det i långtidstestet, som pågick under 18 timmar, förekom fotoinducerad toxicitet. Detta kan tyda på att höga PAH-halter kan medföra toxiska effekter men att det tar längre tid eftersom de måste metaboliseras först [26].

Koncentrationen av föroreningar kan i vissa fall vara för låg för att visa något resultat i akuttoxiska tester. Detta innebär att man riskerar att underskatta provets toxicitet om man endast använder sig utav akuttoxiska tester. Kroniska låghaltiga exponeringar kan ibland orsaka kraftigare effekter än höga akuttoxiska exponeringar [25].

I Organics-testet fanns ett tydligt samband mellan PAH-halt och inhibering av luminiscensen. Däremot var de prover som visade högst inhibering av luminiscensen färgade vilket inte kan utesluta att färgen på proverna kan ha påverkat resultatet. Det står dock inte klart hur mycket provets färg påverkade resultatet eftersom någon korrigering för färgade prover för närvarande inte finns för ROTAS.

### **4.3 Extraktionsmedlets betydelse**

Inhiberingen av luminiscensen var signifikant högre i testet där syntetiskt framställt sötvatten använts som extraktionsmedel. Det kan bero på att det syntetiska sötvattnet innehåller salter som kan ha bidragit till jonbyten med metalljoner i jorden. Detta kan ha lett till att fler metaller lakats ut, och därmed kunnat bidra till en ökad inhibering av luminiscensen.

#### **4.4 Laktester**

Andelen arsenik och PAH som lakades ut var mycket liten och anledningen till detta kan vara att dessa ämnen är hårt bundna till jordpartiklar och organiskt material i jordarna. Båda dessa föroreningar binder hårt till exempelvis humusämnen. Arsenik i form av arsenat adsorberas dessutom starkt till järn- och aluminiumoxider vid  $\text{pH} < 8$ . pH-värdet i de analyserade jordproverna ligger runt 4, vilket innebär att arsenik kan antas vara ganska hårt bundet till jorden. Den låga andelen PAH som lakades ut kan förklaras med, förutom att det är bundet till partiklar i jorden, att dessa föreningar inte är vattenlösliga. De PAH'er som lakades ut var till största delen de mest vattenlösliga.

Jämförelsen av luminiscensmätningarna från ROTAS-extraktionerna och eluaten från de standardiserade laktesterna visade att det inte fanns någon signifikant skillnad i toxicitet mellan dessa efter 30 minuter vilket visar att ROTAS-extraktionen är en likvärdig metod med de standardiserade laktesterna.

På samma jordar som analyserades med ROTAS har en jämförelse gjorts mellan laktester och biotillgänglighetstester för att se hur väl de korrelerar med varandra. Både upptagstest med mask och magsaftextraktioner på jordarna har gjorts, se stycke 1.5.3. Det fanns ingen tydlig korrelation mellan laktesterna och biotillgänglighetstesterna varför man kan dra slutsatsen att laktester, och även ROTAS, inte bör användas som ett biotillgänglighetstest.

#### **4.5 Jämförelse mellan ROTAS och ekotoxikologiska tester**

Även om ROTAS och toxicitetstesterna på mask och växt skiljer sig mycket åt kan det vara intressant att se om det finns något samband mellan dessa tester. ROTAS analyseras på extraktioner medan mask- och grobarhetstesterna utförs direkt i de förorenade jordarna. Tanken är inte att något av testerna ska ersätta varandra. De samband som fanns mellan ROTAS och mask- och grästesterna kan bero på att dessa organismer var känsliga mot arsenik. Vitklöver visade dålig korrelation mellan arsenikhalt och rot- och skotttillväxt vilket kan förklara även den dåliga korrelationen mellan ROTAS och grobarhetstest med vitklöver.



## 5. SLUTSATS

Mättiden för ROTAS Leachable-test bör vara 30 minuter på grund av att det kan finnas ämnen som extraheras ut med vattnet som tar längre tid på sig än andra ämnen att verka på bakterierna. En kortare tid kan medföra en underskattning av toxiciteten. Mättiden för Organics-testet bör vara 15 minuter eftersom bakterierna kan börja nyttja den metanol som finns närvarande samt organiskt material som kan ha extraherats ut från jorden, som kolkälla vid en längre mättid. Detta kan medföra att luminiscensen ökar och att eventuell toxicitet maskeras.

Jämförelsen av luminiscensmedelvärdena från extraktionerna med de olika extraktionsmedlen i Leachable-testet visade att toxiciteten var högre när jordproverna extraherats med sötvattnet. Sötvatten är dessutom mer likt naturligt förekommande vatten än vad destillerat vatten är och ger därför en bättre bild av verkligheten. Destillerat vatten är däremot lättillgängligt och resultaten visar att det finns ett samband mellan inhibering av luminiscens och arsenikhalten i jorden, liksom resultaten från extraktionen med sötvatten. Sötvatten är att föredra, men destillerat vatten fungerar också som extraktionsmedel.

Organics-testet bör inte användas som ett ekotoxikologiskt test eftersom metanol används för att extrahera organiska föroreningar och detta är inte något tänkbart scenario i naturen. Organiska föroreningar som i vanliga fall vore bundna till partiklar i jorden lakas med stor sannolikhet ut, vilket kan leda till en överskattning av jordens toxicitet. Testet kan däremot användas som en indikator på om jorden innehåller organiska föroreningar.

Sambanden mellan ROTAS-analyserna och föroreningshalten, framför allt arsenik och PAH, visar att Leachable-testet är lämpligt när det gäller arsenik, men att det däremot visar låg känslighet för PAH, antagligen på grund av att PAH:er inte är vattenlösliga. Det är däremot svårt att få några exakta svar eftersom jordarna som testats innehåller en blandning av flera olika ämnen som även de kan tänkas påverka luminiscensen.

Som hjälpmedel vid riskbedömningen av förorenad mark kan ROTAS vara en bra indikator på hur toxiska de lakbara föroreningarna är. Däremot kan det vara lätt att missa de föroreningar som inte är vattenlösliga. Därför bör instrumentet inte användas ensamt utan gärna kombineras med andra toxicitetstester.

I detta projekt har ROTAS jämförts med toxicitetstester med engelskt rajgräs, vitklöver och mask som testorganismer. För att göra en utförligare utvärdering av ROTAS vore en jämförelse med MicroTox lämplig då MicroTox är en standardiserad metod som använder samma bakterie som ROTAS. MicroTox används i stor utsträckning idag. Fler ämnen och grupper av ämnen än arsenik och PAH bör även studeras för att ta reda på bakteriernas känslighet för dessa.

## 6. REFERENSER

- [1] Naturvårdsverket. 1996. Generella riktvärden för förorenad mark. Rapport 4638.
- [2] Naturvårdsverket. 1996. Development of generic guideline values. Rapport 4639.
- [3] Jones C., Allard A-S., Bengtsson B-E., Gilek M. och Gunnarsson J. 2006. Förbättrade miljöriskbedömningar. Naturvårdsverket publ. 5538.
- [4] Cybersense Biosystems Ltd:s hemsida, ([www.cysense.com](http://www.cysense.com))
- [5] Boettcher K.J. och Ruby E.G. 1995. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. Journal of bacteriology 177: 1053-1058
- [6] Kolibachuk D. och Greenberg E.P. 1993. The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. Journal of bacteriology 175:7307-7312.
- [7] Nealson K.H. och Hastings J.W. 1979. Bacterial luminescence: its control and ecological significance. Microbiological reviews 43:496-518.
- [8] Allard A-S., Malmberg M. och Remberger M. 2002. Platsspecifik bedömning av förorenad mark – biologiska tester i kombination med kemiska analyser. IVL-publ B 1492.
- [9] Bernes C. 1998. Organiska miljögifter – Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem. Monitor 16. Naturvårdsverkets förlag.
- [10] KemI (Kemikalieinspektionen) Prioriteringsguiden – PRIO, Polycykliska aromatiska kolväten. Senast uppdaterad: 2007-02-12  
<http://www.kemi.se/templates/PRIOframes.aspx?id=4045&gotopage=4101>  
Hämtad 2007-11-20
- [11] Hazardous Substances Data Bank (HSDB)  
(<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) Sökord: PAH, Hämtad 2007-11-12
- [12] Agency for toxic substances & disease registry, USA (ATSDR a). 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. U.S. Department of health and human services.  
(<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>) Hämtad 2007-11-15
- [13] Connell D.W. 1997. Basic concepts of environmental chemistry. CRC Press LLC
- [14] Kemiska ämnen.  
([http://kemi.prevent.se/search\\_swe.asp?chemsearch\\_text=PAH&chemsearch\\_type=name](http://kemi.prevent.se/search_swe.asp?chemsearch_text=PAH&chemsearch_type=name)) Hämtad 2008-01-11

- [15] Klaassen C.D. 2001. Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 6:e upplagan. McGraw-Hill.
- [16] Kleja D.B., Elert M., Gustavsson J.P., Jarvis N. och Norrström A-C. 2006. Metaller's mobilitet i mark. Naturvårdsverkets publ. 5536.
- [17] Karolinska Institutets hemsida, Institutet för miljömedicin (<http://ki.se/ki/jsp/polopoly.jsp?a=5728&d=2506&l=sv>) Hämtad 2008-01-11
- [18] Hazardous Substances Data Bank (HSDB) (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) Sökord: Arsenic, Hämtad 2007-11-12
- [19] Kemiska ämnen ([http://kemi.prevent.se/search\\_swe.asp?chemsearch\\_text=arsenik&chemsearch\\_type=name](http://kemi.prevent.se/search_swe.asp?chemsearch_text=arsenik&chemsearch_type=name)) Hämtad 2008-01-11
- [20] Agency for toxic substances & disease registry, USA (ATSDR b). 2007. Toxicological profile for arsenic. U.S. Department of health and human services. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>) Hämtad 2008-02-13
- [21] Kronberg H., Liljemark A., Jones C. och Engström A. 2006. Krylbo impregneringsanläggning – sammanfattande huvudstudierapport. SWECO VIAK.
- [22] Naturvårdsverket. 1994. Vägledning för miljötekniska markundersökningar. Del 1: Strategi. Rapport 4310.
- [23] SIMCA-P, version 11.5, Umetrics:Umeå (<http://www.umetrics.com/>) Hämtad 2008-01-28
- [24] Backhaus T., Froehner K., Altenburger R. och Grimme L.H. 1997. Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 H) and the short term (30 min) bioassay. Chemosphere 35:2925-2938
- [25] Weeks J.M., Sorokin N., Johnson I.J., Whitehouse P., Ashton D., Spurgeon D., Hankard P., Svendsen C. och Hart A. 2004. Biological test methods for assessing contaminated land. Environment agency report P5-069/TR1. ([http://publications.environment-agency.gov.uk/pdf/SCHO0804BICW-e-e.pdf?lang=\\_e](http://publications.environment-agency.gov.uk/pdf/SCHO0804BICW-e-e.pdf?lang=_e)) Hämtad 2007-10-31
- [26] El-Alawi Y.S., McConkey B.J., Dixon G.D. och Greenberg B.M. 2002. Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. Ecotoxicology and environmental safety 51:12-21.