

Bioanalys av organiska föroreningars biotillgänglighet

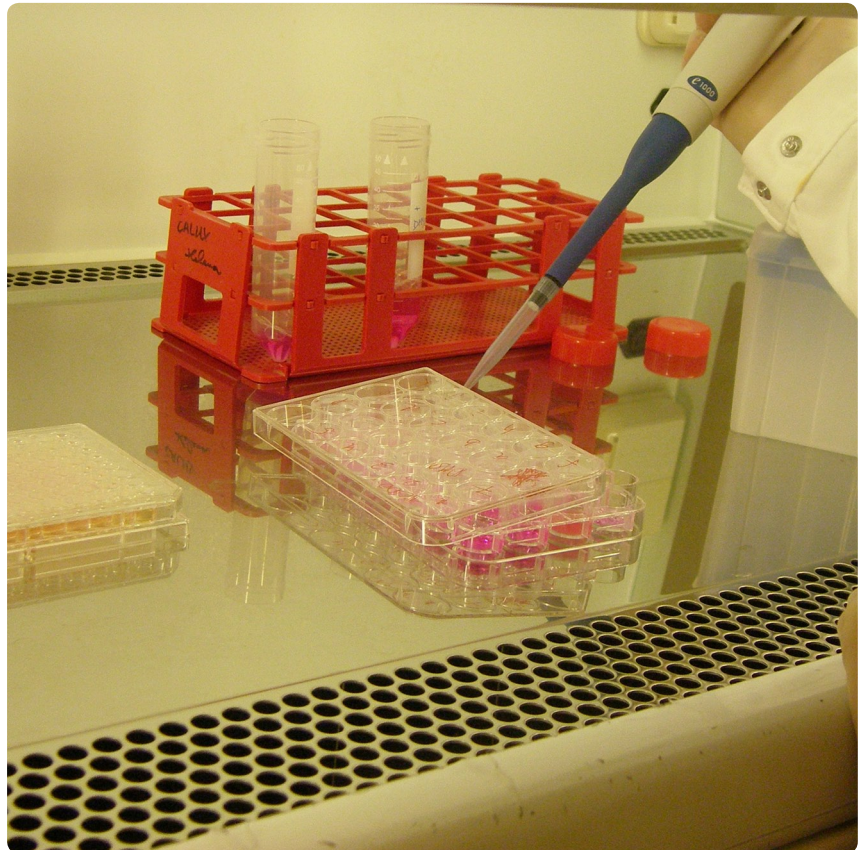
- tillämpning i sanerade massor

RAPPORT 5931 • FEBRUARI 2009



Kunskapsprogrammet

**HÅLLBAR
SANERING**



Bioanalys av organiska föroreningars biotillgänglighet - tillämpning i sanerade massor

Författare:

Magnus Engwall, Forskningscentrum Människa-Teknik-Miljö (MTM), Örebro universitet
Maria Larsson, Forskningscentrum Människa-Teknik-Miljö (MTM), Örebro universitet

NATURVÅRDSVERKET

Beställningar

Ordertel: 08-505 933 40

Orderfax: 08-505 933 99

E-post: natur@cm.se

Postadress: CM Gruppen AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: www.naturvardsverket.se/bokhandeln

Naturvårdsverket

Tel 08-698 10 00, fax 08-20 29 25

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-5931-6.pdf

ISSN 0282-7298

Elektronisk publikation

© Naturvårdsverket 2009

Tryck: CM Gruppen AB

Omslag: Stora bilden: Sterilarbete i LAF-bänk, Anna Rotander

Lilla bilden: Jonas Nygren, Golder Associates

Förord

Ett av riksdagens miljömål är Giftfri miljö, och i detta mål ingår att efterbehandla och sanera förorenade områden. Brist på kunskap om risker med förorenade områden och hur de bör hanteras har identifierats som hinder för ett effektivt saneringsarbete. Naturvårdsverket har därför initierat kunskapsprogrammet Hållbar Sanering.

Föreliggande rapport redovisar projektet ”Bioanalys av organiska föroreningars biotillgänglighet - tillämpning i sanerade massor” som har genomförts inom Hållbar Sanering. Rapporten beskriver hur bioanalys av toxicitet kan användas för att karakterisera jord förorenad med polycykliska aromatiska kolväten.

Projektet har bedrivits vid forskningscentrum Människa Teknik Miljö (MTM), Örebro universitet. Författare till rapporten är Magnus Engwall och Maria Larsson vid MTM. Andra personer som har deltagit i projektet är Bert van Bavel, Anna Rotander och Anders Düker samtliga vid MTM samt Thomas von Kronhelm vid SAKAB. Ett stort tack riktas till SAKAB, Göran Wennerström vid SITA och Martin Tengsved vid Ragn-Sells som medverkat med jordprover till projektet.

Kontaktperson för Hållbar Sanering har varit Bo Svensson vid Linköpings Universitet. Naturvårdsverket har inte tagit ställning till innehållet i rapporten. Författarna svarar ensamma för innehåll, slutsatser och eventuella rekommendationer.

Naturvårdsverket februari 2009

Innehåll

SAMMANFATTNING	6
SUMMARY	7
1 BAKGRUND OCH SYFTE	8
2 POLYCYKLISKA AROMATISKA KOLVÄTEN	10
2.1 Egenskaper och förekomst	11
2.2 Tillgänglighet/biotillgänglighet	12
3 BIOANALYS	14
3.1 Relativa potensfaktorer	14
3.1.1 Relativa PAH-potensfaktorer för H4IIE-luc	15
4 UPPARBETNINGS- OCH ANALYSMETODER	17
4.1 Jordprover	17
4.2 Totalextraktion	18
4.3 Biotillgänglighetsextraktion	18
4.3.1 Metodutveckling	18
4.3.2 Metodbeskrivning	19
4.4 Lakningsförsök	19
4.4.1 Metodbeskrivning	19
4.5 Analyser	20
4.5.1 Kemisk analys (GC-MS)	20
4.5.2 Biologisk analys (H4IIE-luc)	20
5 RESULTAT OCH DISKUSSION	22
5.1 Utveckling av biotillgänglighetsextraktion	22
5.2 Totalhalter	23
5.3 Biotillgänglighet/lakbarhet	25
6 SLUTSATSER	27
7 REFERENSER	28

Sammanfattning

Polycykliska aromatiska kolväten (PAHer) är relativt vanliga i förorenade områden, särskilt på gamla gasverktomter, bensinstationer och tidigare impregneringsanläggningar. På grund av deras toxicitet så är sanering av PAH-förorenade områden av hög prioritet. För att minska riskerna med PAH-förorenade jordar, både före och efter sanering, är det viktigt att åstadkomma en heltäckande riskbedömning och säker klassning av dessa jordmassor. De generella riktvärden för PAH-förorenad mark som används idag är i regel baserade på kemisk analys av 16 standard PAHer (PAH₁₆), trots att det ofta förekommer 100-tals PAHer och PAH-metaboliter i jordarna.

I detta projekt har vi genom att jämföra kemisk och biologisk analys (H4IIE-luc) av ett flertal sanerade PAH-förorenade jordprover studerat om toxiciteten verkligen minskar i proportion till minskningen av PAHer i jordarna. H4IIE-luc är en mekanismspecifik bioanalys som detekterar alla ämnen som aktiverar Ah-receptorn, en av de två viktigaste mekanismerna bakom PAHers toxicitet. Jämförelsen av resultaten visade att den totala toxiciteten i de sanerade jordproverna inte gick att förklara med kemisk analys av PAH₁₆ och att man därmed med dagens analysmetodik riskerar att missa toxikologiskt relevanta PAHer och andra liknande ämnen. Vidare kemiska identifieringsstudier samt bioanalytiska studier krävs för att ta reda på om dessa okända ämnen utgör en risk för människa eller miljö.

Våra resultat visar på svagheten med kemisk analys av ett mindre antal ämnen som grundval för klassning av renade massor. Det är därför rimligt att inkludera mekanismspecifika tester i riskbedömning och vid klassning av renade PAH-förorenade jordar. Dels för att minimera riskerna som dessa jordar kan utgöra för människor och miljö, dels för att man med en större säkerhet och i större utsträckning skall kunna återanvända sanerade jordmassor.

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are fairly common in contaminated areas, especially at old gasworks sites, gas stations and former wood impregnation facilities. Because of their toxicity, PAH-contaminated areas are highly prioritized for remediation. In order to reduce the risks of PAH contaminated soils, both before and after remediation, it is vital to achieve an exhaustive risk assessment and a reliable classification of these soils. Today, the generic guideline values of PAHs in contaminated soils are commonly based on chemical analysis of 16 standard PAHs (PAH₁₆), even though it often exist hundreds of PAHs and PAH metabolites in the soils.

In this project we have by comparing chemical and bioanalysis (H4IIE-luc) of a number of remediated PAH-contaminated soil samples studied if the toxicity actually is reduced in proportion to the reduction of the PAHs in the soils. H4IIE-luc is a mechanism-specific bioassay, which detects all the compounds that activate the Ah-receptor, one of the two most important mechanisms for PAHs toxicity. Comparison of the results showed that the overall toxicity in the soil samples could not be explained by chemical analysis of the total concentrations of PAH₁₆. It is therefore a considerable risk that the analysis methodology of today is missing toxicologically relevant PAHs and other similar substances. Further chemical identification studies and bioanalytical studies are needed to determine whether these unknown substances pose a risk to humans or the environment.

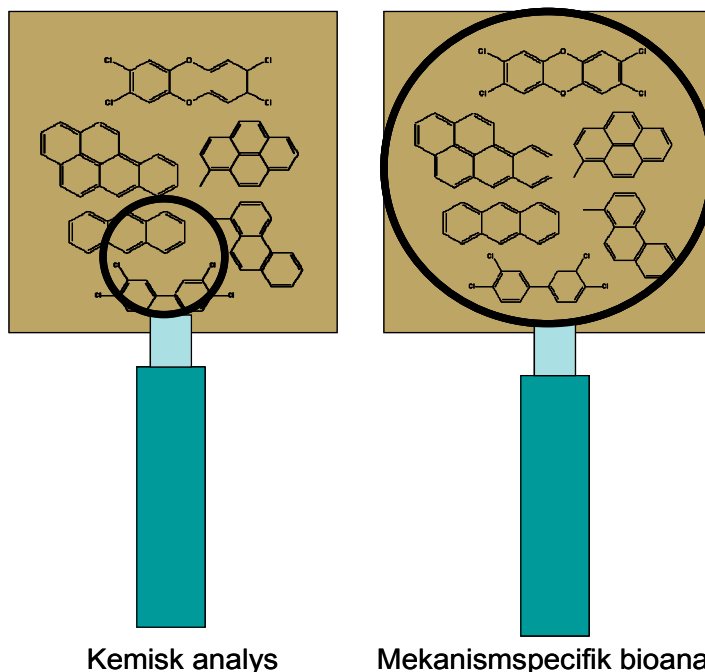
Our results show the weakness of chemical analysis of a small number of compounds as the basis for classification of remediated masses. It is therefore reasonable to include mechanism-specific tests in risk assessment and in the classification of remediated PAH-contaminated soils. This could minimize the risk these soils can pose to humans and the environment and enable greater safety in reuse of remediated soils.

1 Bakgrund och syfte

I dag finns det ungefär 80 000 potentiellt förorenade områden identifierade i Sverige. Av dem är flera områden förorenade med polycykliska aromatiska kolväten (PAHer) (Naturvårdsverket, 2008). På gamla gasverkstomter, bensinstationer och där det tidigare förekommit träimpregnering kan marken vara så förorenad att det medför stor risk för miljö och människors hälsa. Sanering av dessa områden är därför av stor betydelse.

De kemiska riktvärden för förorenad mark som används idag är användbara och mycket viktiga för att garantera en säker marksaneringsverksamhet, men de ger sällan hela bilden. Ofta är jordmassorna förorenade med en komplex blandning av ämnen. När det gäller PAH-förorenade jordar så analyseras idag bara 16 standard PAHer (PAH₁₆), trots att det ofta förekommer 100-tals PAHer och PAH-metaboliter i jorden. Dessa föroreningar tar man inte hänsyn till i riskbedömningen och vid klassningen. Detta betyder vanligen att a) halterna av alla ingående ämnen inte är kända, b) det fattas riktvärden för alla ämnen som går analysera, och c) eventuella samverkans effekter av de ingående föreningarna försummas.

De generella riktvärdena är dessutom beräknade utifrån ett antagande att alla 16 PAHer tids nog är tillgängliga för spridning och upptag. Detta antagande leder ofta till en kemisk analys av den totala halten PAH₁₆ som inte tar hänsyn till vilken mängd som egentligen är tillgänglig i jorden.

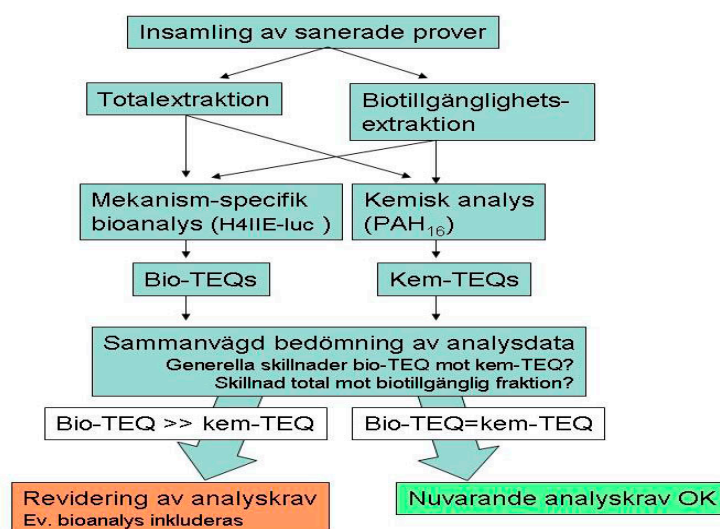


Figur 1. Illustration av skillnaden mellan kemisk analys och mekanismspecifik bioanalys av jordprover. Med kemisk analys kan man analysera och kvantifiera specifika ämnen men risken är stor att man missar andra toxiska ämnen som finns i provet. Med mekanismspecifik bioanalys mäts den totala mekanismspecifika effekten av alla toxiska ämnen i provet som verkar via den studerade mekanismen.

Toxiciteten i mark kan studeras med mekanismspecifika cellbaserade bioanalyser (Andersson m.fl., 2009; Behnisch m.fl., 2001; Machala m.fl., 2001). Fördelen med dessa analyser är att de ger ett integrerat svar som baseras på den totala mekanismspecifika effekten av alla ämnen som finns i ett prov. Detta är en principiell skillnad mot traditionell kemisk analys där specifika ämnen kan analyseras men urvalet av ämnen måste bestämmas i förväg och standarder måste finnas tillgängliga för kvantifiering. Med bioanalytisk metodik har man alltså möjlighet att detektera giftiga ämnen i miljöprover som man riskerar att missa med traditionell kemisk analys. Skillnaden illustreras i figur 1.

Lakning med polära lösningsmedel kombinerat med mekanismspecifika bioanalyser kan ge information huruvida en jord innehåller en biologisk tillgänglig fraktion av PAHer eller liknande ämnen med toxisk effekt. Denna metodik har potential att kunna leda till en mer heltäckande och rättvis riskbedömning av den ofta mycket komplexa toxiciteten i jordarna. Bioanalyser av denna typ tar dessutom hänsyn till eventuella samverkans effekter.

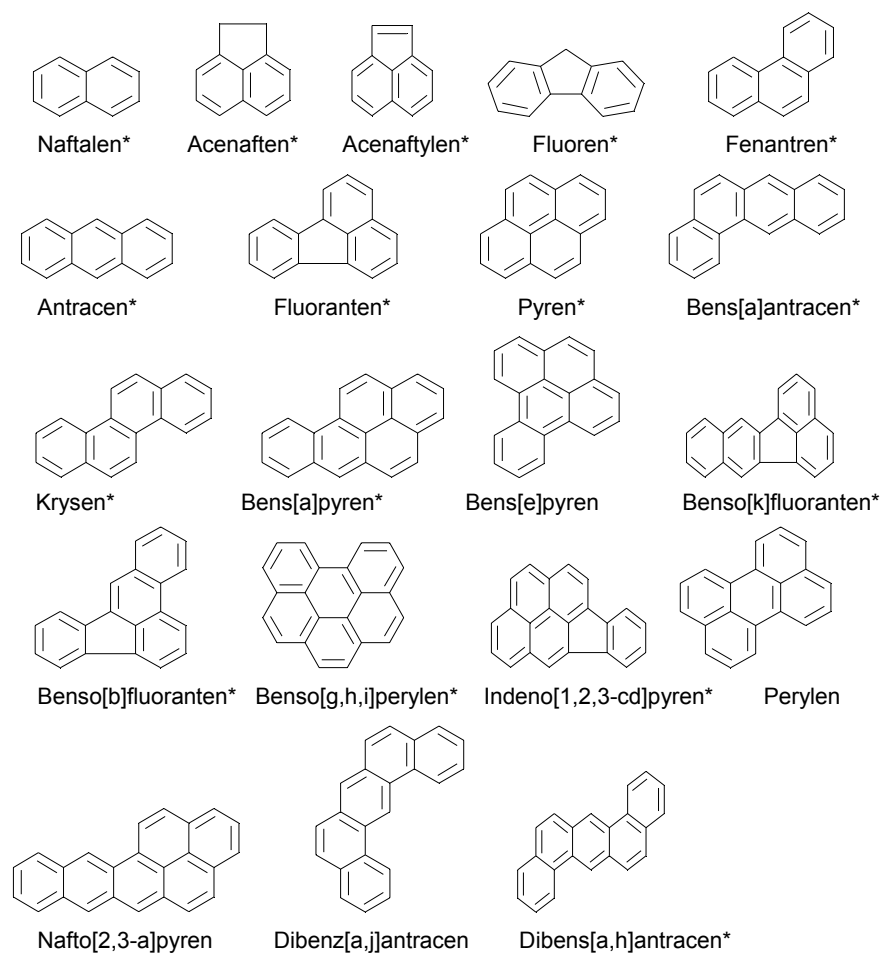
Syftet med detta projekt har varit studera om PAH-förorenade färdigsanerade jordar verkligen har minskat i toxicitet i proportion till minskningen av PAHer. Denna frågeställning har vi studerat genom att jämföra kemisk och mekanismspecifik bioanalys (H4IIE-luc) av sanerade PAH-förorenade jordprover (figur 2). På så sätt ville vi kartlägga ifall dagens riktvärden för PAHer i sanerade PAH-förorenade jordmassor är rimliga som grund för respektive markanvändningstyp eller om man med dagens analysmetodik riskerar att missa andra PAHer och liknande ämnen med toxisk effekt.



Figur 2. Flödesschema över arbetsgången i projektet.

2 Polycykliska aromatiska kolväten

Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) är en stor grupp av ämnen som består av två eller flera sammanfogade bensenringar (se strukturformler, figur 3). Dessa föroreningar har alltid förekommit i vår miljö genom naturliga källor som till exempel skogsbränder men till följd av industrialiseringen är PAHer idag ett stort miljöproblem. De bildas som oönskade biprodukter vid ofullständig förbränning av organiskt material. Antropogena källor är bland annat bilavgaser, slitage av bildäck och vägmateriäl, vedeldning, kreosotimpregnerat virke, gummitillverkning och bensinstationer.



Figur 3. Strukturerna av de 20 PAHer som studerats i projektet. De 16 PAHer som ingår i riskklassningen och bedömts vara prioriterade föroreningar av US Environmental Protection Agency (EPA) är märkta i figuren (*).

En stor anledning till att PAHer har blivit så uppmärksammade är att flera av dem har visats vara mutagena och carcinogena vid djurförsök. Bens[a]antracen och ben[a]pyren har visat sig vara cancerframkallande hos människor. US Environmental Protection Agency (EPA) har klassat 7 av de 16 standard-PAHerna som troligen carcinogena för människor (se tabell 1). Långtidsexponering av blandningar innehållande PAHer och andra ämnen via inandning och hudkontakt har visat sig kunna orsaka cancer hos vissa individer (ATSDR). PAHer är akuttoxiska för akvatiska organismer. Generellt ökar toxiciteten med ökad molekylvikt och log K_{ow} (Connel, 1997).

2.1 Egenskaper och förekomst

PAHer är en komplex grupp av föroreningar med stora skillnader i fysikaliska och kemiska egenskaper såsom vattenlöslighet, K_{ow} , och Henry lags konstant (presenteras i tabell 1). Generellt ökar fettlösligheten (log K_{ow}) och stabiliteten med ökat antal ringar i molekylerna.

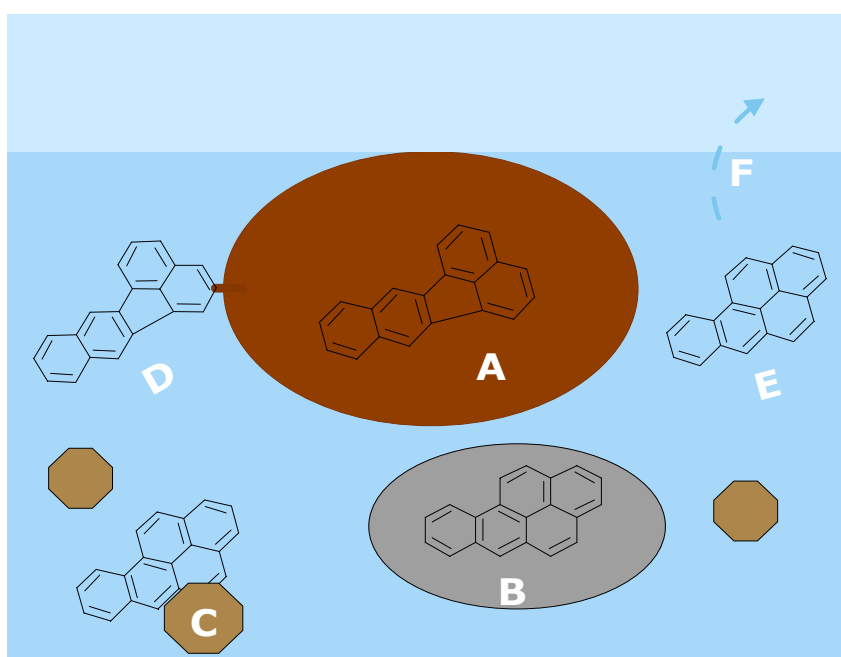
Tabell 1: Fysikaliska egenskaper för de 20 PAHer som studeras i projektet

	Molekylvikt	Log K_{ow}	Henry lags konst. (Atm×m ³ /mol)	Vattenlöslighet (mg/l)
Naftalen	128	3,36	4,83×10 ⁻⁴	31
Acenaftylen	152	4,07	1,45×10 ⁻³	3,93
Acenaften	154	3,98	7,91×10 ⁻⁵	1,93
Fluoren	166	4,18	1,0×10 ⁻⁴	1,98
Fenantren	178	4,45	2,56×10 ⁻⁵	1,20
Antracen	178	4,45	1,77×10 ⁻⁵	0,076
Fluoranten	202	4,9	6,5×10 ⁻⁶	0,26
Pyren	202	4,88	1,14×10 ⁻⁵	0,077
Bens[a]antracen ¹	228	5,61	1×10 ⁻⁶	0,010
Krysen ¹	228	5,16	1,05×10 ⁻⁶	2,8×10 ⁻³
Bens[k]fluoranten ¹	252	6,06	3,87×10 ⁻⁵	7,6×10 ⁻⁴
Bens[b]fluoranten ¹	252	6,04	1,22×10 ⁻⁵	0,0012
Perylen	252			
Bens[a]pyren ¹	252	6,06	4,9×10 ⁻⁷	2,3×10 ⁻³
Bens[e]pyren	252			6,3×10 ⁻³
Dibens[a,h]antracen ¹	278	6,84	7,3×10 ⁻⁸	5×10 ⁻⁴
Dibens[a,j]antracen	278			
Indeno[1,2,3-cd]pyren ¹	276	6,58	6,95×10 ⁻⁸	0,062
Benso[g,h,i]perylene ¹	278	6,50	1,44×10 ⁻⁷	2,6×10 ⁻⁴
Nafto[2,3-a]pyren	302			

Data hämtat från ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) 1995

¹carcinogena enligt EPA

Transporten och fördelningen av PAHer i miljön styrs till stor del av deras kemiska och fysikaliska egenskaper. Lågmolekylära PAHer (2- och 3-ringade) är mer vattenlösliga och flyktiga (har högre värden för Henry lags konstant) än tyngre PAHer och är tämligen rörliga i mark- och grundvatten. I luft förekommer de främst i gasfas och är därmed tillgängliga för nedbrytningsprocesser i atmosfären. Högmolekylära PAHer har låg vattenlöslighet, är starkt lipofila och förekommer i luften framförallt adsorberade till partiklar. De är svårnedbrytbara och kan transporteras lång väg i atmosfären. Fördelningen mellan gas- och partikelfas är mycket viktig för PAHers spridning och effekt i miljön. I vattenmiljön sker transporterna av högmolekylära PAHer främst via partiklar och de binder vanligen till sediment där de kan bli mycket långlivade.



Figur 4. Fördelning av PAHer i jorden. A= absorberad in i organiskt material, B= i fri organisk fas t.ex. oljedroppe, C= bunden till löst organiskt material (kolloider, löst organiskt kol), D= adsorberad till partikelyta, E= löst i porvatten, F= avdunstning från porvatten till atmosfär

I jorden förekommer PAHer framför allt hårt bundna till organiskt material, de är därmed svårnedbrytbara och kan finnas kvar i marken under mycket lång tid (figur 4). Ju högre $\log K_{ow}$ -värde desto högre fördelning av föroreningen till det organiska materialet. Extraherbarheten och nedbrytbarheten avtar med tiden på grund av att PAHerna långsamt diffunderar in djupare i det organiska materialet. Fenomenet kallas ”aging” (Allard m.fl., 2000; Hatzinger & Alexander, 1995).

2.2 Tillgänglighet/biotillgänglighet

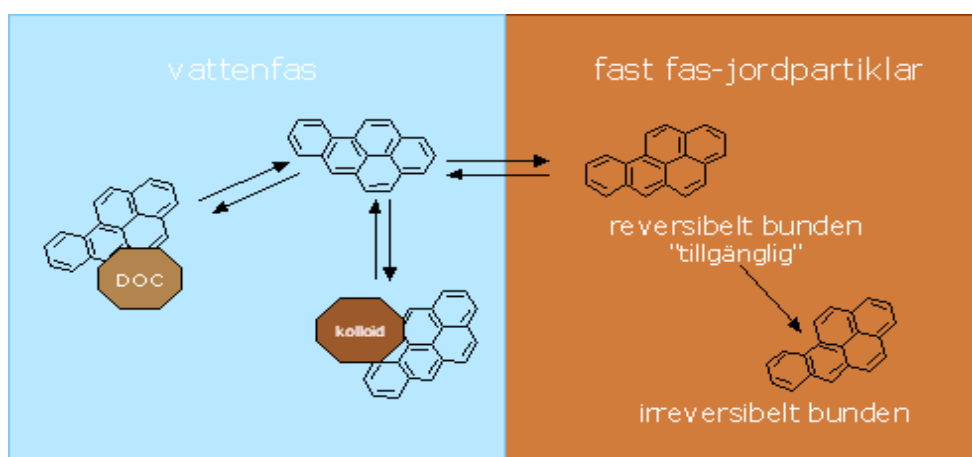
Jorden är en mycket komplex matris och egenskaper som till exempel kornstorlek, halt organiskt material, pH-värde och vattenhalt varierar geografiskt. Dessa jord-egenskaper påverkar tillgängligheten och därmed spridningen av organiska föroreningar i jorden.

Biotillgängligheten av föroreningar i jorden avser den fraktion som kan tas upp av levande organismer. Hur mycket av en förorening i jorden som är tillgänglig för upptag av organismer beror på ämnets fördelning mellan olika medier, till exempel mellan porvatten och jord. Halten av ett organiskt ämne i porvattnet kontrolleras främst av tre processer; lösning, sorption samt förekomsten av kolloider och löst organiskt kol (DOC), se figur 5. Fördelningen beror på ämnets och jordens egenskaper.

Biotillgängligheten av PAHer i jorden minskar med tiden, på grund av aging. Totalhalten av PAHer i mark som förorenats för länge sedan kan därför fortfarande vara hög men risken den utgör för människor och djur kan vara liten eftersom ämnenas mobilitet och biotillgänglighet är låg.

Fraktionen av en förorening som är tillgänglig för upptag av organismer beror på organismens art och vilka upptagsvägar som finns. PAHer kan tas upp av människor och djur från jorden via oralt intag (vatten, föda, jord), hudkontakt och från luften genom inandning (damm, ånga).

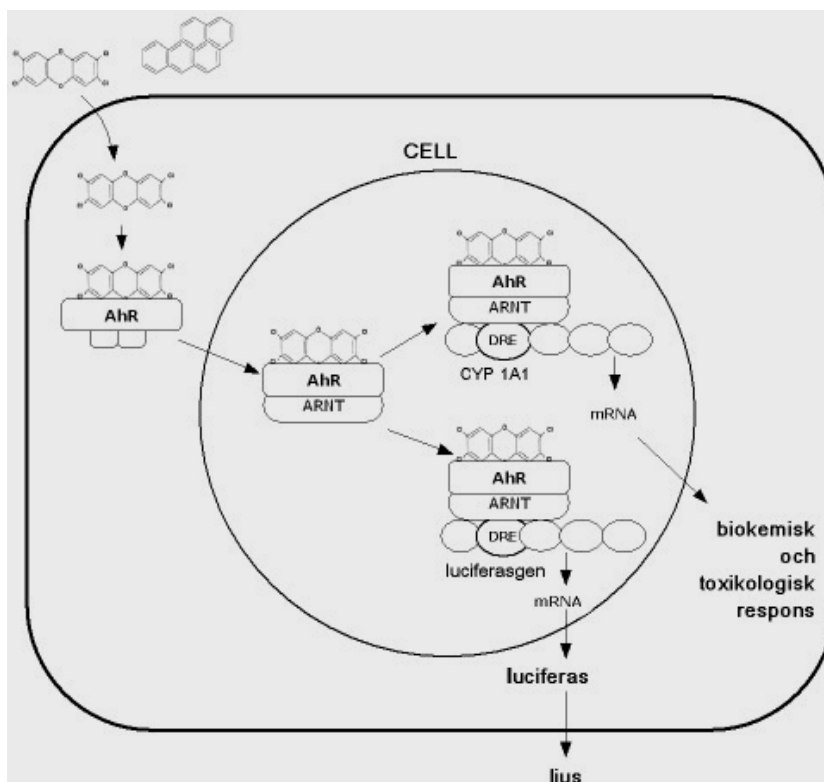
De flesta levande organismer kan omvandla PAHer och nedbrytningsprodukterna som bildas kan många gånger vara skadligare än ursprungssämnena.



Figur 5. Förenklad bild över fördelningsprocesserna som styr lakningen av PAHer från jorden. Halten av en förorening i vattenfasen är den halt i jorden som är tillgänglig för utlakning. För organiska föroreningar kontrolleras denna halt huvudsakligen av tre processer; lösning, sorption samt förekomsten av kolloider och löst organiskt kol (DOC) (modifierad från Comans m.fl. 2001).

3 Bioanalys

Bioanalyser, eller bioassays är mycket användbara vid riskbedömningen av miljöprov, de mäter den totala toxiciteten i provet och de tar automatiskt hänsyn till eventuella samverkans effekter. H4IIE-luc är en dioxinkänslig cellinje av rått hepatocyter med en luciferas reportergen för enkel detektion av ämnen som binder till och aktiverar Ah-receptorn, också kallad dioxinreceptorn (Murk m.fl., 1996). Dioxinreceptorn är nyckelmekanismen bakom dioxiners och PCBers toxicitet (Behnisch m.fl., 2001) (figur 6). Även PAHers toxicitet kan kopplas till denna receptor. H4IIE-luc är en snabb, känslig och reproducerbar metod vid bestämning av den totala effekten av AhR-aktiva ämnen i olika matriser som, jord, sediment och vatten (Behnisch m.fl., 2001; Machala m.fl., 2001).

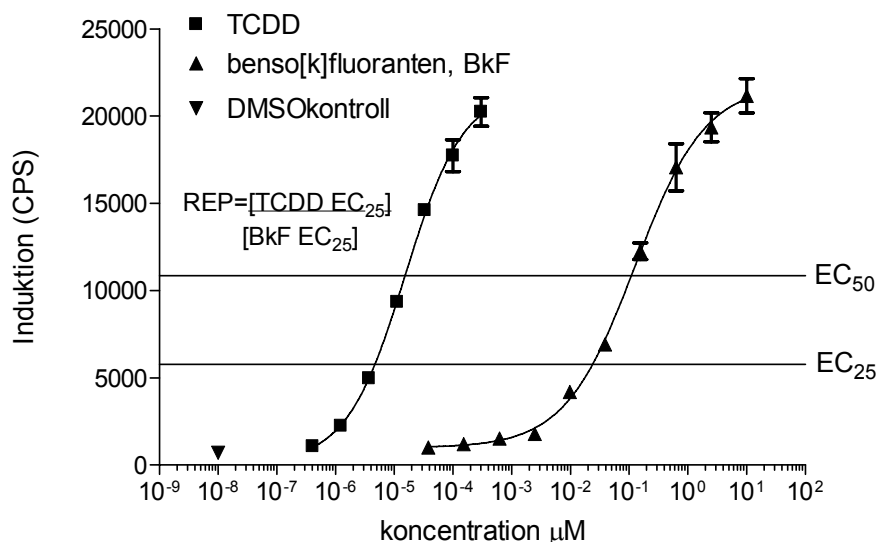


Figur 6. AhR-ligander som t.ex. dioxiner och PAHer passerar genom cellmembranet och binder till Ah-receptorn, som aktiveras och bildar ett komplex tillsammans med ett protein, ARNT. Komplexet binder till specifika geners reglerande delar, DRE och styr på så sätt genernas uttryck. I den rekombinanta cellinjen H4IIE-luc har en reportergen som kodar för enzymet luciferas klonats in i genomet. Mängden producerat luciferas, som är ett integrerat resultat av AhR ligandernas affinitet till receptorn och deras koncentration, kan mätas med en ljusreaktion (modifierad från Behnisch m.fl., 2001).

3.1 Relativa potensfaktorer

Bioanalyser som H4IIE-luc är användbara när man vill studera enskilda ämnens förmåga att aktivera Ah-receptorn (AhR) och därmed kunna uppskatta miljöriskerna kopplade till detta ämne. Man kan även studera ämnets nedbrytbarhet

genom att variera tiden som cellerna exponeras för detta ämne. Genom att testa enskilda ämnens förmåga att binda till och aktivera Ah-receptorn och jämföra dem med den mest toxiska dioxinen TCDD (2,3,7,8-tetraklordibenso-*p*-dioxin) så får man en relativ potensfaktor (REP) jämfört med TCDD för varje ämne. REP-värdena är specifika för varje cellinje och exponeringsförhållande. Som ett exempel visas i figur 7 dos-responskurvor från bestämningen av REP-värdet för benso[k]fluoranten vid 24 timmars exponering.



Figur 7. Dos-responskurvor för benso[k]fluoranten och TCDD vid exponering av H4IIE-luc celler i 24 timmar. REP-värdet (förhållandet mellan TCDD och PAH) beräknas vid 25 % eller 50 % av den maximala responsen i cellinjen för TCDD.

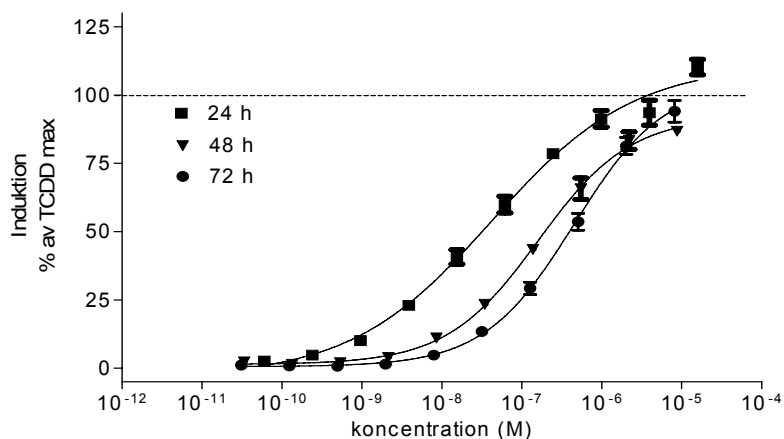
Varje ämnes REP kan man sedan multiplicera med dess koncentration i ett miljöprov. Genom att lägga ihop produkterna för samtliga ämnen erhålls en teoretisk total toxisk potens (kem-TEQ) baserad på antagandet att ämnenas effekter adderas till varandra i systemet. På detta sätt kan ett prov som analyserats med både kemisk och biologisk analys jämföras. Om det inte finns några andra ämnen med toxisk effekt i proverna och om det inte förekommer några samverkans effekter så ska kem-TEQ vara lika med bio-TEQ (effekten i bioanalysen).

$$\text{kem-TEQ} = \text{pg PAH/g jord} \times \text{REP}$$

3.1.1 Relativa PAH-potensfaktorer för H4IIE-luc

I detta projekt testades 14 enskilda PAHers förmåga att binda till och aktivera Ah-receptorn jämfört med TCDD. De PAHer som ingick i försöket var de högmolekylära standard-PAHerna (>3 ringar) samt bens[e]pyren, nafto[2,3-a]pyren, perylen och dibens[a,j]antracen. Cellerna exponerades för varje enskild PAH i 24, 48 och 72 timmar. Av de 14 testade PAHerna var det 12 PAHer (se tabell 2) som gav effekt efter 24 timmars exponering och deras REP-värden användes sedan för att

räkna fram den totala toxiciteten, kem-TEQ i jordproverna utifrån data från den kemiska analysen.



Figur 8. Dos-respons kurvor för dibens[ah]antracen vid exponering av H4IIE-luc celler i 24, 48 och 72 timmar. Dibens[ah]antracen ger fortfarande effekt i bioanalysen efter 24, 48 och 72 timmar. Förmågan att aktivera AhR minskar dock med tiden, vilket man kan se på att kurvorna förskjuts åt höger med ökad exponeringstid.

Våra tidigare undersökningar har visat på en kvarvarande effekt i biotestet även vid 72 timmars exponering för extrakt från PAH-förorenade jordar (opublicerat data). Eftersom andras forskning visat att PAHer tenderar att brytas ned av H4IIE-luc-celler vid lång exponering var detta förvånande (Machala m.fl., 2001; Masunaga m.fl.2004; Suzuki m.fl., 2006). Detta gjorde det intressant för oss att testa rena PAHer för att se om de gav effekt efter 72 timmar. I figur 8 visas som ett exempel dos-responskurvor från exponeringen av dibens[ah]antracen i 24, 48 och 72 timmar. Det var tio av de 14 testade PAHerna som fortfarande visade effekt i bioanalysen efter 72 timmars exponering, se REP-värden i tabell 2.

Tabell 2. Relativa potensfaktorer (REP) baserade på effektnivåerna EC₂₅ respektive EC₅₀ för PAHer framtagna vid 24h, 48h och 72h exponering av H4IIE-luc celler.

PAHer	24h exponering		48h exponering		72h exponering	
	EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₂₅	EC ₅₀
Pyren	4,97E-06	2,95E-06	1,83E-06	-	2,44E-06	-
Benso[a]antracen	1,24E-05	1,25E-05	2,68E-06	2,32E-06	6,24E-07	-
Krysen	3,95E-05	2,02E-05	5,73E-06	4,75E-06	2,93E-06	2,30E-06
Benso[b]fluoranten	5,37E-04	1,44E-04	6,59E-05	4,05E-05	1,48E-05	1,25E-05
Benso[k]floranten	2,32E-03	7,11E-04	1,56E-04	1,12E-04	4,68E-05	2,78E-05
Benso[e]pyren	7,05E-07	1,00E-06	-	-	-	-
Benso[a]pyren	5,39E-05	3,08E-05	8,93E-06	8,85E-06	2,64E-06	2,41E-06
Indeno[1,2,3-cd]pyren	4,06E-04	1,45E-04	6,85E-05	3,87E-05	1,14E-05	9,91E-06
Dibens[aj]antracen	5,82E-04	2,54E-04	1,28E-04	7,81E-05	2,28E-05	1,36E-05
Dibens[ah]antracen	1,45E-03	4,72E-04	2,37E-04	1,07E-04	6,90E-05	4,71E-05
Benso[ghi]perylen	2,62E-06	-	1,06E-06	-	4,10E-07	-
Nafto[2,3-a]pyren	1,82E-04	1,01E-04	7,71E-05	4,43E-05	2,09E-05	1,60E-05

- = ingen detekterbar effekt

4 Upparbetnings- och analysmetoder

Vid upparbetningen av proverna användes endast material av glas, metall eller teflon för att undvika förlust av analyter genom adsorption till ytor. I samtliga metoder användes brunfärgade glasvaror eller aluminiumfolie som skydd för att hindra fotolytisk nedbrytning av analyterna. Alla glasvaror och glasull tvättades med etanol och n-hexan före användning för att undvika kontaminering av proven.

4.1 Jordprover

Under åren 2006 och 2007 samlades nio jordprover in från olika saneringsföretag i Sverige (tabell 3). Kriterierna för de insamlade proverna var att jordarna skulle ha varit förorenade med PAH och sanerade ned till MKM (mindre känslig markanvändning) med avseende på PAH. Av de insamlade jordproverna hade sex stycken genomgått biologisk behandling och de andra tre jordtvätt. I tabell 4 redovisas kort de olika behandlingsmetoderna. De insamlade jordproverna siktades (<4mm), homogeniserades och förvarades i frys vid -18°C på laboratoriet. Torrhalt och glödförlust bestämdes för samtliga jordar. En artificiell OECD jord upparbetades på samma sätt som de övriga jordarna och fick representera en oförorenad jord.

Tabell 3. Schema över jordprov, bakgrund, typ av behandling, torrhalt och glödförlust

	Bakgrundsfakta	Genomförd behandling	Torrhalt (%)	Glödförlust (%)
Jord 1	PAH-förorenad jord (ca 160 ton) från ett stålindustriområde innehållande spår av kreosot. PAH-halterna överskred ej 4×MKM	BioSan-behandling	73,8	2,2
Jord 2	Kreosot-förorenad jord från impregneringsplats, sandfraktionen	Jordtvätt	85,2	6,3
Jord 3	PAH-förorenad jord	Dessa 3 jordar är behandlade med Daramend enligt BioSan teknik d.v.s. med s.k. piles istället för ett utbredd skikt.	85,0	6,2
Jord 4	PAH-förorenad jord		89,3	4,5
Jord 5	PAH-förorenad jord		87,2	2,7
Jord 6	PAH-förorenad jord	Biologisk kompostering	88,5	4,0
Jord 7	PAH-förorenad jord, sandfraktion	Jordtvätt	93,2	1,5
Jord 8	PAH-förorenad jord	BioSan-behandling	83,6	6,7
Jord 9	PAH-förorenad makadam, sandfraktionen	Jordtvätt	95,6	1,4
OECD	Artificiell jord		99,6	10,2

Bakgrundsfakta som härkomst och typ av bedriven verksamhet på föroreningsplatsen fanns endast för ett fåtal av jordarna. De flesta av de insamlade jordproven kom från jordmassor innehållande jord från ett flertal föroreningsplatser som blandats under behandlingen. Tillgången på sanerade PAH-jordar var låg då de

flesta PAH-förorenade jordar deponeras idag utan att ha genomgått någon form av behandling.

Tabell 4. Kort beskrivning av de behandlingsmetoder som jordarna genomgått

Biosan-behandling	Jorden saneras med hjälp av bakterier i ett slutet och kontrollerat system där bakterierna får arbeta under optimala förhållanden.
Daramend-behandling	Bygger på att speciella organiska tillsatser, som ska öka den mikrobiella aktiviteten samt föroreningarnas biotillgänglighet, fräses ned i den förorenade jorden.
Biologisk kompostering	Näringsämnen tillsätts och blandas med jorden. En naturlig process startar där bakterier som finns i jorden bryter ned föroreningarna.
Jordtvätt	Koncentrationsmetod. Jordmassorna fraktioneras och tvättas med vatten i ett slutet system. De minsta jordpartiklarna, koncentratet som ofta är kraftigt förorenat avskiljs och deponeras.

4.2 Totalextraktion

PLE (Pressurized liquid extraction) med incellrening användes vid extraktionen av jordprov för analys av den totala halten PAHer (Ong m.fl., 2003; Richer m.fl., 1996). Det är en effektiv metod där provet extraheras under högt tryck och hög temperatur så att både tid och lösningsmedelsåtgång kraftigt reduceras jämfört med traditionella extraktions- och uppreningsmetoder. Ingen upprensning av extrakten behövs efter extraktion då extrakten renades genom eluering genom fyra gram 10 % deaktiverad kiselgel som satts till extraktionscellerna tillsammans med jorden innan extraktionens start.

Två parallella extraktioner utfördes på varje jord, en till kemisk analys och en till biologisk analys. Vid varje extraktion extraherades tre gram jord med hexan/diklormetan 9:1 (v/v) i 2 cykler. Varje cykel var 10 minuter lång (temperatur 120°C, tryck 1700 psi) och sköljvolymen var 28 ml. De prov som skulle analyseras med kemisk analys spikades före extraktion med 50 µl internstandard (IS) 10 ng/µl. Efter extraktionen indunstades extrakten avsedda för kemisk analys ned till 1 ml i toluen och 50 µl recovery standard (RS), 10 ng/ul tillsattes. Extrakten avsedda för bioanalys indunstades till 200 µl i dimetylsulfoxid (DMSO). Samtliga extrakt förvarades i frys fram till analys.

4.3 Biotillgänglighetsextraktion

En metod för att uppskatta biotillgänglighet är att mäta upptag av en förorening i daggmask. Mask är en lämplig referensorganism på grund av att den lever i jorden, bearbetar jorden, har ett tunt permeabelt skinn och spelar en stor roll för transporten av föroreningar från jorden till organismer högre upp i näringskedjan. Användning av mask i detta syfte är dock ganska arbetsamt och tidskrävande och de tål inte exponering av vissa ämnen eller vissa koncentrationer (Jager m.fl., 2005).

4.3.1 Metodutveckling

För att kunna utveckla en enkel kemisk metod för biotillgänglighet av PAHer genomfördes en studie på en biologiskt renad jord där upptaget av PAHer i mask,

Eisenia fetida, studerades. Ett antal extraktioner med olika lösningsmedel (n-hexan, butanol och metanol) genomfördes på samma jord. Extrakten analyserades med kemisk analys av PAH₁₆ samt perylen och bens[e]pyren. PAH-mönstret i extrakten jämfördes med PAH-mönstret i masken. En mild skakmetod med metanol överensstämde bäst med PAH-mönstret i masken både när det gällde toxicitet (TEQ-värden) (se figur 10) och PAH-halter (se figur 11). Denna metod användes sedan som ett mått på biotillgängligheten i jordproverna som insamlats under detta projekt.

4.3.2 Metodbeskrivning

Tio gram av varje jordprov blandades med 20 ml metanol i fem sekunder med hjälp av en vortex-mixer. Därefter överfördes extrakten till centrifugrör i teflon och centrifugerades i 60 minuter vid 7000 g. Efter centrifugeringen spikades extrakten avsedda för kemisk analys med 50 µl internstandard (IS) (10 ng/µl). En tiondel av varje extrakt indunstades till 0,5 ml med hjälp av kvävgas och upprenades sedan på fem gram 10 % deaktiverad kiselgel i en kolonn och eluerades först med 15 ml hexan och sedan med 15 ml hexan/diklormetan 3:1 (v/v). Extrakten avsedda för kemisk analys indunstades till 1 ml i toluen och 50 µl recovery standard (RS) (1 ng/µl) tillsattes. Extrakten som skulle analyseras med biologisk analys indunstades till 25 µl i DMSO. Samtliga extrakt förvarades i frys fram till analys.

4.4 Lakningsförsök

Ett viktigt steg i riskbedömningen av en förorenad jord är att undersöka hur mycket av föroreningarna som kan lakas ut från jorden. Den fraktion som är lakbar avgör spridningen i miljön och är dessutom tillgänglig för upptag i växter och organismer. Under de senaste åren har man försökt utveckla bra och enkla metoder för lakning av organiska ämnen i jord (Bjuggren m.fl., 1999; Comans 2001; Fortkamp m.fl., 2002; Nordtest 2004). I dag finns kriterier för lakning av oorganiska ämnen i jord men de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos dessa ämnen skiljer sig väsentligt från organiska ämnen. Vid lakning av organiska ämnen kan det vara andra parametrar som man måste ta hänsyn till som till exempel halten löst organiskt kol samt risken för adsorption till utrustning och nedbrytning av ämnen under lakningsförsöket.

4.4.1 Metodbeskrivning

Ett lakningsförsök utfördes på två jordprov (prov 2 och 7) baserat på en skakmetod, ISO/DIS 21268-2, med mindre modifieringar. Från varje prov togs 20 gram jord ut och lakades med 200 ml 0,001 M CaCl₂-lösning i 250 ml bruna glasburkar på vändskak (8-10 varv/minut) i 24 timmar. För att motverka nedbrytning av mikroorganismer tillsattes NaN₃ (0,5 g/L) till lakvätskan. Efter 24 timmars lakning fick extrakten sedimentera i 15 minuter varefter lakvätskan separerades från jorden genom centrifugering i 45 minuter vid 10 000 g. Cirka 10 ml av varje lakextrakt togs ut till pH-mätning och TOC-analys. Därefter delades extrakten till kem- och biologisk analys och de avsedda för kemisk analys spikades med 50 µl IS

(10 ng/μl). Föroreningarna extraherades med vätske-vätske extraktion, tre gånger 30 ml med diklormetan i fem minuter per gång. Efter indunstning uppenades extrakten på fem gram 10 % deaktiverad kiselgel och eluerades med 15 ml hexan och därefter med 15 ml hexan/diklormetan 3:1 (v/v). Efter uppeningen indunstades extrakten avsedda för biologisk analys till 25 μl i DMSO. Extrakten avsedda för kemisk analys indunstades till 500 ml i toluen och 50 μl RS (10 ng/μl) tillsattes. Samtliga extrakt förvarades i fryn fram till analys.

4.5 Analyser

I detta projekt analyserades samtliga jordprov både med en kemisk analys, GC-MS och en biologisk analys, H4IIE-luc (Murk m.fl., 1996). Med GC-MS kan man identifiera ämnen i ett prov och specifika ämnen kan kvantifieras med hjälp av standarder för dessa ämnen. Till skillnad mot GC-MS mäter den biologiska analysen (H4IIE-luc) den totala effekten av samtliga ämnen som verkar via samma mekanism; vilket för H4IIE-luc är bindning och aktivering av Ah-receptorn.

4.5.1 Kemisk analys (GC-MS)

Analyserna utfördes med hjälp av en HP 6890 gaskromatograf kopplad till en HP 5973 lågupplösande masspektrometer. Kolonnen var en DB-5, 30 m med 0,25 mm innerdiameter och belagd med en 0,25 μm tjock fas. Provet (1 μl) injicerades splitless och injektortemperaturen var 300°C. Temperaturprogrammet för GC-ugnen startade vid 80°C (bibehölls i 2 min), ökade 15°C min⁻¹ till 180°C (bibehölls i 1 min), ökade 8°C min⁻¹ till 250°C (bibehölls i 1 min) och ökade slutligen 3°C min⁻¹ till 300°C (bibehölls i 6 min).

PAHerna identifierades och kvantifierades med hjälp av en kvantifieringsmix som innehöll 20 nativa PAHer (PAH₁₆, Perylen, Bens[e]pyren, Nafto[2,3-a]pyren och Dibens[a,j]antracen). Till kvantifieringsmixen tillsattes samma mängd internstandard, IS (d8-Naftalen, d10-Acenaften, d10-Fenantren, d12-Krysen och d12-Perylen) och recoverystandard, RS (d10-Fluoranten) som till proverna. PAH-halterna räknades fram med hjälp av internstandardmetoden.

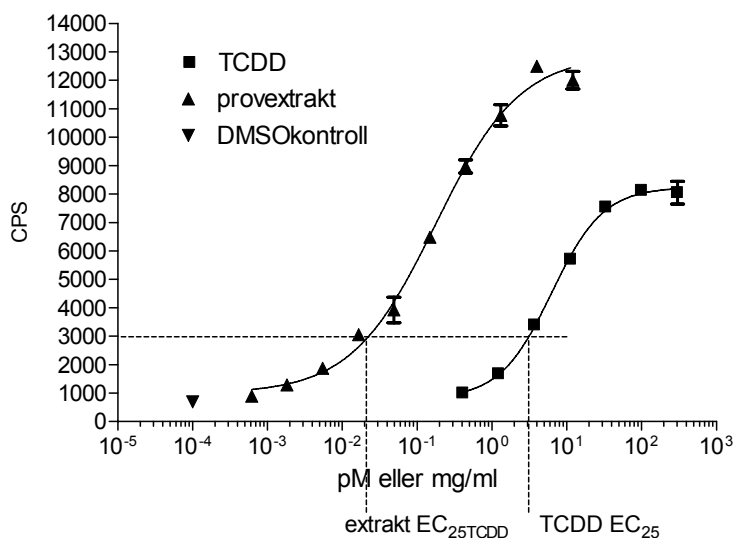
Den totala toxiciteten, kem-TEQ i jordproverna räknades fram med hjälp av de för H4IIE-luc framtagna REP-värdena i tabell 2. Vid beräkningen av kem-TEQ gjordes ingen kompensation för recovery, det vill säga ingen hänsyn togs till eventuella förluster vid upparbetning och analys av proverna. Detta för att det inte går att kompensera för eventuella förluster under upparbetningen av proverna vid den biologiska analysen.

4.5.2 Biologisk analys (H4IIE-luc)

H4IIE-luc är en cellinje av rätt hepatocyter med en luciferas reporter gen för enkel detektion av AhR-agonister.

Cellerna odlades i medium (α-MEM) med 10 % kalvserum (FCS). Cellerna såddes i sterila transparenta 96-brunnsplattor 24 timmar före exponering för att uppnå 100 % konfluens. En spädningsserie (10 doser) bereddes i odlingsmedium för varje extrakt, som cellerna därefter exponerades för i triplikat. Cellerna

exponerades också för en TCDD-standardserie (0-300 pM) i triplikat. Efter 24 timmars exponering avlägsnades mediet, cellerna tvättades med PBS och luserades vid -18°C över natten. Luciferasaktiviteten mättes genom tillsats av substratet luciferin (Steady Lite) till cellerna och förvaring i mörker vid 20°C i en timme. Därefter överfördes celllysaten till vita 96-brunnsplattor och luminescensen (i CPS) avlästes med en Wallac 1420 Victor plattavläsare (Perkin Elmer, Upplands Väsby, Sverige).



Figur 9. Dos-respons kurvor för TCDD och jordextrakt från total-extraktion av prov 1.

Dos-respons kurvor skapades för varje prov. I figur 9 visas som ett exempel dos-responskurvor från exponeringen av ett prov. Bio-TEQ (bioanalys bestämda TCDD-ekvivalenter) räknades fram genom att responsen för provet relaterades till responsen för TCDD-kurvan i samma analys enligt formeln:

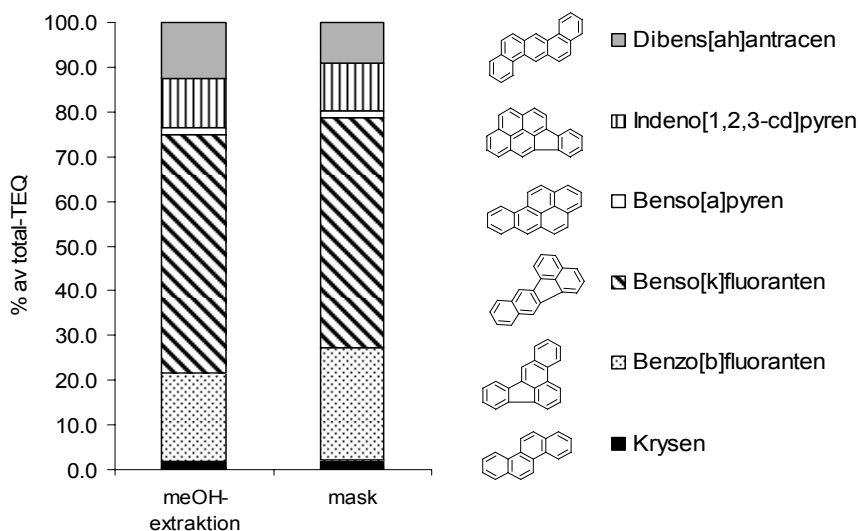
$$\text{bio - TEQ (pg/g)} = \frac{\text{TCDD EC}_{25} \text{ (pg/ml)}}{\text{extrakt EC}_{25\text{TCDD}} \text{ (g/ml)}}$$

TCDD EC₂₅ är koncentrationen för TCDD vid 25 % av den maximala effekten för TCDD och extrakt EC_{25TCDD} är koncentrationen för extraktet vid 25 % av den maximala effekten för TCDD (se figur 9).

5 Resultat och diskussion

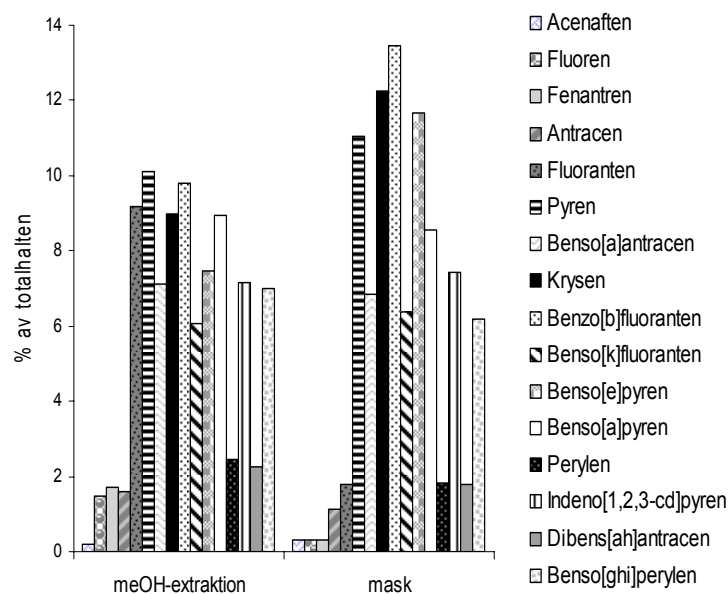
5.1 Utveckling av biotillgänglighetsextraktion

I detta projekt testades ett antal olika kemiska extraktionsmetoder på en bio-behandlad jord för att hitta en metod som bäst uppskattade den biotillgängliga fraktionen PAHer. Som referens användes mask som exponerats för samma jord. PAH-mönstret i masken jämfördes sedan med PAH-mönstret i extrakten. En enkel och snabb skakmetod med metanol överensstämde bäst med PAH-mönstret i masken både när det gällde toxicitet (TEQ-värden) och PAH-halter. Resultaten redovisas i figur 10 och figur 11. Denna skakmetod med metanol användes sedan för att uppskatta den biotillgängliga fraktionen i alla jordar i detta projekt.



Figur 10. Jämförelse av PAH-mönstret i mask och metanolextrakt. Figuren visar varje enskild PAHs toxicitet (pg/g TEQ) i procent av den förväntade totaltoxiciteten i extrakten, beräknat med hjälp av PAH-analysen och REP-värdena. De PAHer som namnges i figuren är de PAHer som står för 98 % av toxiciteten hos de kemiskt analyserade PAHerna. Observera att PAHerna bara kunde förklara en liten del av den observerade, faktiska effekten i H4IIE-luc testet.

Denna metod ger inget kvantifierbart mått på den biotillgängliga fraktionen då man inte direkt kan jämföra halten som en mask tar upp med den som metanolskaken extraherar ut. Den ger dock en uppskattning om andelen PAHer som är tillgängliga och som kan lakas ut relativt lätt med ett polärt lösningsmedel.



Figur 11. Jämförelse av PAH-mönstret i mask och metanolextrakt. Figuren visar halten av varje PAH i procent av totalhalten av respektive PAH i extrakten.

I figur 11 kan man se att både metanolextraktionen och masken tog upp en större andel av de högmolekylära och mer toxiska PAHerna i jorden än de lågmolekylära och mindre toxiska PAHerna. Andelen av de lågmolekylära PAHerna, naftalen och acenaftylen redovisas ej i figur 11 då recoveryn för dessa var låg vilket medför en osäkerhet i halterna.

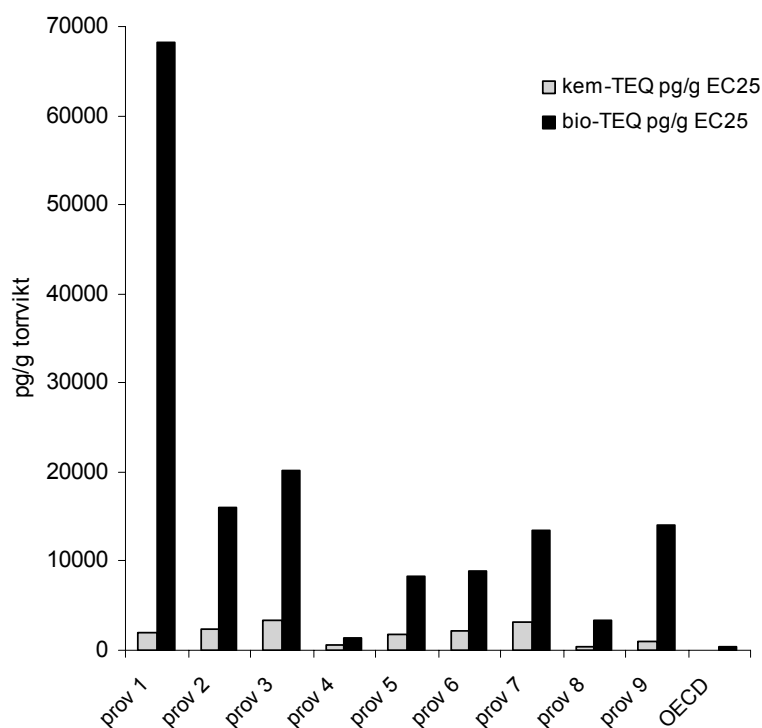
5.2 Totalhalter

Samtliga av de jordprover som upparbetades och analyserades i projektet var samlingsprover av cirka 5-10 stickprover från jordmassor som sanerats ned till MKM-nivån (mindre känslig markanvändning) med avseende på PAH-innehåll. Trots den stora variationen som ofta förekommer i stora jordmassor så låg totalhalterna i samtliga jordprover under de generella riktvärdena för MKM, 7 mg/kg för carcinogena PAHer och 40 mg/kg för övriga PAHer (tabell 5).

Tabell 5. Resultat från kemisk analys av totalhalter i jordproverna (mg/kg torrsvikt)

	Carcinogena PAHer	Övriga PAHer	PAH ₁₆	PAH ₂₀
Jord 1	4,79	9,50	14,3	15,9
Jord 2	4,06	3,19	7,26	8,12
Jord 3	5,98	4,94	10,9	12,2
Jord 4	1,15	1,19	2,34	2,56
Jord 5	3,29	3,23	6,52	7,14
Jord 6	4,17	3,72	7,89	8,82
Jord 7	5,43	4,71	10,2	11,2
Jord 8	0,68	1,62	1,50	1,67
Jord 9	1,68	1,62	3,30	3,62
OECD Jord	0,06	0,19	0,25	0,26

Resultaten i tabell 5 visar att jordarna även innehöll en viss mängd av de analyserade PAHerna (bens[e]pyren, perylen och dibens[a,j]antracen) som inte ingår i standardanalysen av PAH₁₆. Ingen av jordarna innehöll några detekterbara halter av nafto(2,3-a)pyren.



Figur 11. Jämförelse mellan kem-TEQ (PAH₁₆) och bio-TEQ i extrakt från totalextraktion.

Figur 11 visar att alla jordar hade högre bio-TEQ än kem-TEQ. Detta innebär att jordarna efter avslutad sanering uppvisade en stor andel biologiskt aktiva AhR-agonister som inte var PAH₁₆. Andelen skilde sig åt mycket mellan de olika jordarna, men i samtliga prov syntes detta mönster tydligt. I kontrolljorden (OECD-jorden) var halten av PAHer naturligt nog låg och andelen oförklarade AhR-agonister 93 procent. En stor del av de AhR-agonisterna som förekom i kontrolljorden existerar troligtvis naturligt i många jordar. Dessa gav dock ett minimalt bidrag till de sanerade jordarna vars halter oförklarade AhR-agonister var flera gånger högre. Vidare kemiska identifieringsstudier samt bioanalytiska studier krävs för att utröna om dessa okända AhR-agonister utgör en risk för människa eller miljö. Handlar det om samma kemikalier eller är det helt olika för olika sanerade jordar, är de persistenta, hur lipofila är de?

I tidigare studier i vår grupp har vi kunnat visa att jordar förorenade med PAHer utgör en ytterst komplex matris med hundratals toppar som kan observeras vid tvådimensionell GC-MS. Det är sannolikt att det är likadant i dessa jordar, vilket också våra resultat antyder. Vidare kan sägas att våra resultat visar på svagheten med stickprovsanalyser av ett mindre antal kemiska ämnen som

grundval för klassning av renade massor. Man kan vara ganska säker på att det efter de flesta remedieringar kommer att återstå en stor mängd icke-analyserade, biologiskt aktiva molekyler i jorden. Den risk som dessa utgör är idag okänd men kan i princip vara allt från försumbar till betydande.

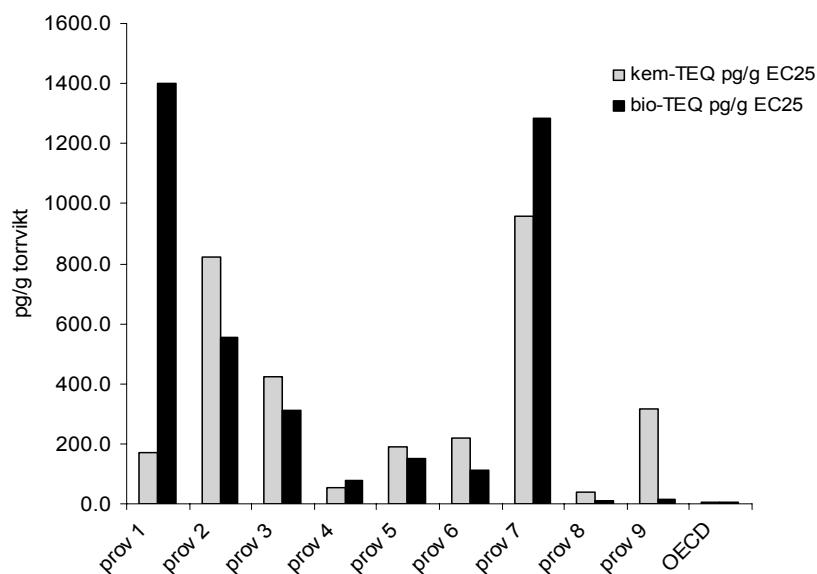
5.3 Biotillgänglighet/lakbarhet

Resultaten från metanolextraktionen redovisas i tabell 6. Andelen extraherbara PAHer jämfört med totalhalterna i jordarna varierade mellan 11-78 procent beroende på prov. Det fanns inget samband mellan högst totalhalter och högst andel biotillgängliga PAHer. Detta tyder på att det är jordens egenskaper som styr vad som kan lakas ut mer än koncentrationen av PAHer i jorden.

Tabell 6. Resultat från metanolextraktionen (mg/kg torrsvikt).

	Carcinogena PAHer	Övriga PAHer	PAH ₁₆	PAH ₂₀
Jord 1	0,42	1,06	1,52	1,69
Jord 2	1,46	4,21	5,69	6,03
Jord 3	0,80	0,87	1,65	1,85
Jord 4	0,16	0,36	0,49	0,53
Jord 5	0,38	0,59	0,99	1,06
Jord 6	0,39	0,84	1,24	1,40
Jord 7	1,92	1,97	3,93	4,30
Jord 8	0,077	0,91	0,99	1,01
Jord 9	0,54	0,65	1,19	1,30
OECD Jord	0,0024	0,70	0,70	0,71

När det gäller sanerade jordar kan mängden tillgängliga PAH₁₆ i vissa jordar vara hög på grund av behandlingen. Vid till exempel biologisk behandling av förorenade jordar är det en del i processen att göra föroreningarna mer tillgängliga för nedbrytning. Tidigare studier i vår grupp har visat att biologisk behandling av PAH-förorenad jord leder till en minskning av totalhalten PAH₁₆ i jorden men att den biologisk tillgängliga fraktionen av PAHer ökar och att den därmed kan vara högre i slutet än vid behandlingens början (Andersson m.fl., 2009).



Figur 12. Jämförelse kem-TEQ (PAH₁₆) och bio-TEQ i extrakt från biotillgänglighetsextraktion med metanol.

Vid jämförelse av kem-TEQ och bio-TEQ i metanolextrakten, figur 12, så var det stor variation mellan jordarna. Prov 1 uppvisade den största andelen okända biotillgängliga AhR-ligander. Det är inte möjligt att uttala sig om risken med dessa ämnen, eftersom deras identitet inte är känd, men det faktum att de tycks kunna lakas ut förhållandevis lätt ur prov 1 utgör en anledning att vidare studera vilka ämnen det kan tänkas vara.

Resultat från lakningen visas i tabell 7. Lakningsförsök skattar den andel av föroreningarna i jorden som är tillgängliga för spridning till omgivande miljö och grundvatten. Tämmligen små mängder PAHer lakades ut ur jordarna med vatten, 0,4-0,5 procent av totalhalterna. Prov 2 innehöll en mycket stor andel lakbara okända biologiskt aktiva AhR-agonister som inte kan förklaras med PAH₁₆, medan lakvätskan från prov 7 uppvisade en väsentligt lägre effekt än förväntat i H4IIE-luc testet.

Tabell 7. Resultat från lakningsförsöken

	pH	TOC i mg/l	Halt PAH ₁₆ i µg/kg torrsvikt lakad jord	Halt PAH ₁₆ i lakvätskan µg/l	Kem-TEQ pg/g torrsvikt jord	Bio-TEQ pg/g torrsvikt jord
Jord 2	7,26	13,1	32,2	2,6	0,020	9,94
Jord 7	7,19	5,8	49,0	4,5	5,67	0,38

6 Slutsatser

Komplexiteten i en jord, ämnenas egenskaper samt valet av lösningsmedel och metod gör att det är flera faktorer som styr resultatet för vad som är lakbart och därmed analyserbart i ett prov. Valet av analysmetod avgör vad som kan ses.

Våra resultat visar att man med dagens kemiska analysmetodik av PAH₁₆ i sanerade jordar riskerar att missa toxikologiskt relevanta PAHer eller andra liknande ämnen med toxisk effekt via Ah receptorn (AhR-agonister). I samtliga jordar var bio-TEQ större än kem-TEQ. Detta betyder att alla jordar uppvisade en stor andel biologiskt aktiva AhR-agonister som inte kan förklaras med PAH₁₆. Endast ett litet bidrag kom från naturligt i jord förekommande AhR-agonister.

Våra resultat visar på svagheten med kemisk analys av ett mindre antal ämnen som grundval för klassning av renade massor. Vi bedömer därför att det är skäligen att inkludera mekanism-specifika tester för AhR-aktivering i riskbedömning samt vid klassning av renade PAH-jordar. Introducerandet att denna metodik skulle kunna minska riskerna som dessa jordar kan utgöra för människor och miljö, samt medföra en säkrare återanvändning av renade massor.

Man kan vara ganska säker på att det efter de flesta saneringar kommer att återstå icke-analyserade, biologiskt aktiva molekyler i jorden. Den risk som dessa utgör är idag okänd men kan i princip vara allt från försumbar till betydande. Vidare kemiska identifieringsstudier samt bioanalytiska studier krävs för att utröna om dessa okända ämnen utgör en risk för människa eller miljö.

7 Referenser

Allard AS, Remberger M, Neilson AH (2000) The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 43-49

Andersson E, Rotander A, von Kronhelm T, Berggren A, Ivarsson A, Hollert H, Engwall M (2009) AhR Agonist and Genotoxicant Bioavailability in a PAH Contaminated Soil Undergoing Biological Treatment. Accepted 2009 *Environmental Science and Pollution Research*

ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) August 1995

Behnisch PA, Hosoe K, Sakai S (2001): Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology. *Environ Int* 27, 413-439

Bjuggren C, Fortkamp U, Remberger M. (1999) Laktest för organiska ämnen i jord - utveckling av testmetod. Rapport 1339. IVL Svenska miljöinstitutet, Stockholm, Sverige

Comans RNJ, Roskam G, Oosterhoff A, Shor L, Wahlström M, Laine-Ylijoki J, Pihlajaniemi M, Ojala M, Broholm K, Villholth K, Hjelmar O, Daly P, Woodhead R, Higgins J, Heimovaara T, Keijzer J, Keijzer H (2001) Development of standard leaching tests for organic pollutants in soil, sediments and granular waste materials. Report ECN-C-01-121.

Connel d.W (1997) *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. CRC Press LLC

Fortkamp U, Tjus K, Bergman G (2002) Platsspecifik bedömning av förorenad mark - Utveckling av laktest som del av ett bedömningskoncept. Rapport B1485. IVL Svenska miljöinstitutet, Stockholm, Sverige

Hatzinger PB, Alexander M (1995) Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537-545

ISO/DIS 21268-2, Soil quality – Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials - Part 2: Batch test using a liquid to solid ratio of 10 l/kg dry matter

Jager T, van der Wal L, Fleuren RHLJ, Barendregt A, Hermens JLM (2005) Bioaccumulation of Organic Chemicals in Contaminated Soils: Evaluation of Bioassays with Earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 293-298

Machala M, Vondracek J, Blaha L, Ciganek M, Neca J (2001) Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res* 497, 49-62

- Masunaga S, Sakashita R, Furuishi T, Shirai J, Kannan K, Giesy J (2004) Effect of exposure duration on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of polycyclic aromatic hydrocarbons measured by in vitro reporter gene assay. *Organohalogen Compd.* 66, 623-629
- Murk AJ, Legler J, Denison MS, Giesy JP, Van De Guchte C, Brouwer A (1996) Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fund Appl Toxicol* 33, 149-160
- Naturvårdsverket (2008) Lägesbeskrivning av efterbehandlingsarbetet i landet 2007. <http://www.naturvardsverket.se>.
- Nordtest (2004) Leaching tests for non-volatile organic compounds -Development and testing. Hansen JB, Grøn C, Hjelmar O, Asmussen O, Klemi S, Mizutani S, Gamst J, Wahlström M, Håkkanson K, Breedweld. NT techn. report 576.
- Ong R, Lundstedt S, Haglund P, Marriott P (2003) Pressurised liquid extraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography for fast-screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Journal of Chromatography A* 1019, 221-232
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C (1996) Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 68, 1033-1039
- Suzuki G, Takigami Y, Sakai S (2006) Time-course changes of mixture effects on AhR binding-dependent luciferase activity in a crude extract from a compost sample. *Toxicology Letters* 161, 174-187

Bioanalys av organiska föroreningars biotillgänglighet

RAPPORT 5931

NATURVÅRDSVERKET
ISBN 978-91-620-5931-6
ISSN 0282-7298

- tillämpning i sanerade massor

Rapporten beskriver hur bioanalys av toxicitet kan användas för att karakterisera jord förorenad med polycykliska aromatiska kolväten. Resultaten visade att den totala toxiciteten i de sanerade jordproverna inte kan förklaras med halterna uppmätta med kemisk analys och att man därmed med dagens analysmetodik riskerar att missa toxikologiskt relevanta ämnen. Efter behandling av förorenad jord kan det återstå icke-analyserade, biologiskt aktiva molekyler i jorden. Den framtagna metodiken kan användas för bedömning av toxiciteten i förorenade jordar och därmed en säkrare återanvändning av renade massor.

Naturvårdsverket har inte tagit ställning till innehållet i rapporterna. Författarna svarar ensamma för innehåll, slutsatser och eventuella rekommendationer.

Kunskapsprogrammet Hållbar Sanering samlar in, bygger upp och sprider kunskap om förorenade mark- och vattenområden. Genom Hållbar Sanering kan myndigheter, forskare och företag söka bidrag för utredningar, seminarier och utvecklingsprojekt som täcker kunskapsluckor på kort och lång sikt. Hållbar Sanering styrs av en programkommitté som består av representanter från Banverket, Göteborgs stad, KTH, Linköpings Universitet, Länsstyrelsen i Kalmar, Naturvårdsverket, Norges Teknisk- Naturvetenskaplige Universitet; SGI, SLU, Sydkraft SAKAB och Umeå Universitet.

