

METODIK FÖR INVENTERING AV

# *Förorenade områden*

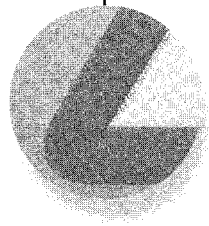
ANALYS- OCH TEST METODER



METODIK FÖR INVENTERING AV

# *Förorenade områden*

ANALYS - OCH TESTMETODER



NATURVÅRDSVERKET FÖRLAG


**BESTÄLLNINGSADRESS** Naturvårdsverket  
Kundtjänst  
106 48 Stockholm

**TELEFON** 08 – 698 12 00

**FAX** 08 – 698 15 15

**E-POST** kundtjanst@environ.se

**INTERNET** <http://www.environ.se>

**ISBN** 91-620-4947-X 

**ISSN** 0282-7298

© Naturvårdsverket 1999

**PRODUKTION** ARALIA – konsult i trycksaker  
Göran Durgé Grafisk Design

**OMSLAG OCH TITELSIDA** Idéoluck AB

**TRYCKERI** Bratts Tryckeri, Jönköping

**UPPLAGA** 2000 ex

# Innehåll

<b>Förord</b>	<b>4</b>
<b>Kemisk/fysiska analysparametrar</b>	<b>5</b>
Extraherbart gaskromotograferbart organiskt material (EGOM)	6
Extraherbar organiskt bunden halogen (EOX)	14
Flyktiga kolväten med SPME-teknik	22
PAH-screening	26
Potentiellt bioackumulerbara substanser (PBS)	35
<b>Biologiska tester</b>	<b>39</b>
Microtox solid phase	40
Musselftest	44
EROD	47
UMU-test	53

# Förord

Med syfte att göra det möjligt att på ett enhetligt sätt inventera områden i landet som förorenats genom bland annat industriverksamhet har Naturvårdsverket tagit fram en inventeringsmetodik, den s.k. MIFO-modellen, Naturvårdsverket Rapport 4918. I metodiken ingår analysprogram för olika medier. För att utarbeta dessa analysprogram har det varit nödvändigt att utveckla delvis nya metoder. Dessa analysmetoder beskrivs i denna publikation som utgör en separat del av inventeringsmetodiken. Metoder som redan finns beskrivna eller för vilka standard finns redovisas inte här.

Utvecklingsarbetet har samordnats av Ingvar Björklund vid Institutet för tillämpad miljöforskning, Stockholms Universitet. I anslutning till varje metodbeskrivning anges vilka organisationer och personer som utvecklat metoden.

Rapporterna om inventering av förorenade områden ingår i Naturvårdsverkets nya serie BEDÖMNINGSGRUNDER FÖR MILJÖKVALITET.

Stockholm i januari 1999  
Naturvårdsverket



**Kemisk/  
fysiska analys-  
parametrar**

## Extraherbart gaskromatograferbart organiskt material (EGOM) Modifierad version

### METODBESKRIVNING

Metoden är en screeningmetod som bestämmer summa organiska (både naturliga och antropogena) substanser i grundvatten, sediment och mark.

#### **1 Användningsområde**

Används med fördel tillsammans med andra kemiska analysmetoder för att karaktärisera förorenade områden. Ingår i basprogrammet.

#### **2 Princip**

Grundvatten extraheras med cyklohexan, mark och sediment extraheras med aceton. De organiska substanserna i extraktet analyseras med en gaskromatograf (GC) försedd med en flamjonisationsdetektor (FID). Den totala detektorresponsen kvantifieras mot en alkanstandard.

#### **3 Störningar**

Metoden bestämmer bara relativt opolära kolföreningar med molekylvikt upp till ca 600 och kokpunkt upp till ca 400°C och som inte har för lågt ångtryck. Halterna tenderar att underskattas om föreningarna i extraktet har många substituentter som reducerar responsen jämfört med motsvarande kolväte.

#### **4 Arbetshygieniska aspekter vid upparbetning och analys**

Många av de lösningsmedel som används är hälsovådliga och brandfarliga varför extraktionsarbetet bör utföras i dragskåp. Använd skyddshandskar och skyddsglasögon. Vid extraktion i separertratt måste trycket utjämnas med jämna mellanrum genom att kranen öppnas. Rester av lösningsmedel samlas i särskilda behållare, för att senare destrueras enligt kommunens miljö- och hälsoskyddsförvaltnings anvisningar.

## A Extraktion av grundvatten

### 5A *Kemikalier och lösningar*

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om ej annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

#### 5.1A **Cyklohexan**

$C_6H_{12}$ , kontrollera renheten genom att analysera koncentrat av lösningsmedlet (t.ex. 1:100) på GC/FID.

#### 5.2A **Svavelsyra/vatten (1:1)**

Koncentrerad svavelsyra,  $H_2SO_4$ , blandas med samma volym vatten.

#### 5.3A **Natriumhydroxid, 10 M**

40 gram natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten.

#### 5.4A **Natriumsulfat**

$Na_2SO_4$ , vattenfri (brännes vid 500°C om den ej är ren).

#### 5.5A **Surt vatten, pH 2**

Svavelsyra (1:1) tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.

#### 5.6A **Basiskt vatten, pH 12**

NaOH (10M) tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 12.

### 6A *Utrustning*

#### 6.1A **Separertrattar eller flatbottnade rundkolvar**

Koniska separertrattar med normalslipad hals och glaspropp samt oslipad kran med krankik av teflon, volym 2 L och 250 mL. Flatbottnad rundkolv, volym 2 L + magnet och magnetomrörare (magnetomrörningsmetoden)

#### 6.2A **Bägare**

Volym 3 L, 150 mL och 250 mL

#### 6.3A **Rundkolv**

Normalslipad hals och glaspropp, volym 500 mL



- 6.4A Graderat provrör**  
Volym 10 mL
- 6.5A Provrör**  
Volym 15 mL
- 6.6A Mätglas**  
Volym 1L, 50 mL och 100 mL
- 6.7A Glastrattar**  
En stor och en liten (10 resp. 5 cm Ø)
- 6.8A pH-indikatorstickor**  
Universalindikator pH 0-14
- 6.9A Rullindunstare**  
Försedd med mellanstycke med stänkskydd
- 6.10A Vattenbad**  
Tempererat till cirka 40°C
- 6.11A Kvävgas**  
N<sub>2</sub>(g), ansluten med slang till en pasteurpipett

### **7A Utförande**

Parallellt med proverna analyseras MilliQ-vatten som blankprov. För varje nyöppnad cyklohexanflaska görs en ny blank.

Vattnet (cirka 1,9 liter) mäts upp noga och surgörs med svavelsyrevatten (5.2A) till pH 2 och extraheras med 100 mL cyklohexan i separertratt i två minuter (exsickatorfett får ej användas) eller i flatbottnad rundkolv med magnetomrörare i 60 min. Cyklohexanextraktet tvättas med 50 mL surt vatten (5.5A). Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter.

Därefter görs vattenprovet basiskt till pH 12 med 10 M natriumhydroxid (5.3A) och extraheras med 100 mL cyklohexan. Extraktet tvättas med 50 mL basiskt vatten (5.6A). Det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. Om vattenprovet innehåller mycket oorganiskt klor, mer än 1 g/L, tvättas extrakten två gånger.

Om emulsion uppstår vid extraktionen kan denna spräckas genom att släppa ut det mesta vattnet och sedan röra om i emulsionen med en glastav. Vid kraftig emulsionsbildning överför man organfasen och emulsion till ett annat kärl och placerar det i frys några timmar. Då EOX skall analyseras får natriumklorid inte användas för att spräcka emulsioner. De "sura" och "basiska" extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och torkas med vattenfri natriumsulfat. Därefter koncentreras extraktet med rullindunstare och/eller i vattenbad med hjälp av kvävgasström till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL). Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.

## **B Extraktion av mark och sediment**

### **5.B Kemikalier och lösningar**

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om inget annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

**5.1B Aceton**  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

**5.2B n-Hexan**  
C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>

**5.3B Svavelsyra/vatten (1:1)**  
Koncentrerad svavelsyra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, blandas med samma volym vatten.

**5.4B Surt vatten, pH 2**  
Svavelsyra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.

**5.5B Natriumhydroxid, 10 M**  
40 gram Natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten.

## **6 Utrustning**

### **6.1B Provrör**

Med teflonbelagd skruvkork, volym 50 mL och 15 mL

### **6.2B Analysväg**

Med mätnoggrannhet  $\pm 10$  mg

### **6.3B Rotationssmixer**

För stora provrör

### **6.4B Centrifug**

Med plats för stora provrör

### **6.5B pH-indikatorstickor**

Universalindikator pH 0-14

### **6.6B Vattenbad**

Tempererat till cirka 40°C

### **6.7B Kvävgas**

N<sub>2</sub>(g), ansluten med slang till en pasteurpipett

## **7B Utförande**

Parallellt med proverna analyseras blankprov som består av använda lösningsmedel och reagens.

### **Extraktion av mark**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör. Provet extraheras med 40 mL aceton på rotationsmixer (ca ett varv per sekund) i 30 minuter. Provet centrifugeras och acetonekstraktet överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonekstraktet spädes med ca 15 mL surt vatten (5.4B) och extrahe-  
ras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs  
hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen  
görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.5B) och extra-  
heras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifuge-  
ring ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexan-extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.

#### **Extraktion av sediment**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör som centrifugeras och supernatanten överförs till ett nytt provrör. Till centrifugröret med provet tillsättes 40 mL aceton och eventuell pellet löses upp genom att skaka röret varefter det extraheras genom rotation (ca ett varv per sekund) i 30 minuter på rotationsmixer.

Provet centrifugeras och acetonextraktet överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonextraktet spädes med supernatanten som avskildes tidigare och surt vatten (5.4B), totalt ca 15 mL, och blandningen extraheras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.5B) och extraheras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifugering ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexan-extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.

#### **Bestämning av torrsubstans**

Utföres enligt Svensk standard (SS 02 81 13)

### **8 GC-analysen**

Till en aliquot av extraktet sätts intern standard (normaloktadekan, C18 eller normaldodekan, C20) och efter eventuell ytterligare koncentrerings

eller spädning injiceras det splitless (1-2 µL) i en gaskromatograf med flamjonisationsdetektor (GC/FID). Injicera också extrakt utan tillsats av intern standard för att kontrollera att denna inte interfererar med toppar från provet. Kolonnen ska vara 25-30 m lång och ha en innerdiameter på ca 0.3 mm. Stationärfasen ska vara kemiskt bunden av typen "SE 30", "DB 5" eller "SE 54" och helst 0.5 µm tjock. Temperaturprogrammet bör vara sådant att C18 eluerar efter ungefär 16 minuter och sluttemperaturen hålls vid 300°C i 20 minuter.

### 9 Beräkning av resultat

Provet kvantifieras mot C18- eller C20-toppen med hjälp av integrator. All toppyta adderas som överskrider den baslinje som bildas när man endast temperaturprogrammerar kolonnen utan att injicera något prov. Det bästa är att integrera hela ytan som en enda topp. Eventuella större toppar kan integreras för sig. Lösningssmedels- och internstandardtopparna dras ifrån liksom eventuell toppyta som motsvarar blankprovet. Innehållet av extraherbart, gaskromatograferbart organiskt material beräknas dels som C18- eller C20-ekvivalenter och dels som organiskt kol räknat mot kolinnehållet i C18 respektive C20 (dvs multiplicera med 0,850 respektive 0,851).

Följande formel gäller för beräkning av EGOM:

Grundvatten

$$X = \frac{a m v f}{b c p}$$

där

X = EGOM i mg org. kol/L

a = provets area

m = mängd standard i provet i µg

v = extraktets volym i mL

b = standardens area

c = volym alikvot av extrakt med intern standard i µL

p = provvolym i liter

f = faktor som beror av kolinnehållet i standarden

**Sediment och mark**

Bestämningen görs på basis av torrsubstanshalt (TS)

$$X = \frac{a m v f 100}{b c p s}$$

där

X = EGOM i mg org. kol/g torrsubstans (TS)

a = provets area

m = mängd standard i provet i µg

v = extraktets volym i mL

f = faktor som beror av kolinnehållet i standarden

b = standardens area

c = volym alikvot av extrakt med intern standard i µL

p = provvikt i gram

s = torrsubstans i procent

**10 Kriterier för godkänd analys**

Dubbla injektioner bör göras av både prov och blank. Spridningen i resultat mellan dessa bör inte vara mer än 15%. Topphöjden på den interna standarden skall ungefär motsvara medelhöjden av komponenterna i provet.

**11 Rapport**

Analyssvaret rapporteras i mg organiskt kol /L vatten eller µg organiskt kol /g jord eller sediment (TS) dels som C18 (C20), dels som organiskt kol. Redovisa också blankvärdet och eventuella större toppar som integrerats för sig. Kopior av alla kromatogram inklusive blank inkluderas i rapporten. Kolonntyp, temperaturprogram, etc ska redovisas liksom eventuella anmärkningar eller andra uppgifter av värde för bedömningen.

**Referenser**

Renberg L, Rosén-Olofsson A-C; Karakterisering av potentiellt bioackumulerbara substanser i industriella avloppsvatten, *NSL/IVL-rapport* 82-03, SNV 1982.

Renberg L O, Sundström S G, Rosén-Olofsson A-C; The Determination of Partition Coefficients of Organic Compounds in Technical Products and Waste Waters for the Estimation of Their Bioaccumulation Potential Using Reversed Phase Thin Layer Chromatography, *Toxicology and Environmental Chemistry*, 10(1985)333-349.

## EOX

### (Extraherbar organiskt bunden halogen)

#### METODBESKRIVNING

Metoden är en screeningmetod för bestämning av organiska halogenerade substanser i vatten, sediment och mark

##### **1**      *Användningsområde*

Används med fördel tillsammans med andra kemiska analysmetoder för att karaktärisera förorenade områden.

##### **2**      *Princip*

Grundvatten extraheras med cyklohexan, mark och sediment extraheras med aceton och innehållet av organiskt halogen bestäms efter förbränning i syrgas med mikrocoulometrisk titrering.

##### **3**      *Störning*

Lättflyktiga komponenter kan gå förlorade i indunstningssteget som är nödvändigt för att byta lösningsmedel. Oorganiska halogenföreningar kan störa analysen. För att undvika detta tvättas extraktet med vatten.

##### **4**      *Arbetshygieniska aspekter vid upparbetning och analys*

Många av de lösningsmedel som används är hälsovådliga och brandfarliga varför extraktionsarbetet bör utföras i dragskåp. Använd skyddshandskar och skyddsglasögon. Vid extraktion i separertratt måste trycket utjämnas med jämna mellanrum genom att kranen öppnas. Rester av lösningsmedel samlas i särskilda behållare, för att senare destrueras enligt kommunens miljö- och hälsoskyddsförvaltnings anvisningar.

## A Extraktion av grundvatten

### 5A Kemikalier och lösningar

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om ej annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

#### 5.1A Cyklohexan

$C_6H_{12}$ , kontrollera renheten genom att analysera koncentrat av lösningsmedlet (t.ex. 1:100) på GC.

#### 5.2A Svavelsyra/vatten (1:1)

Koncentrerad svavelsyra,  $H_2SO_4$ , blandas med samma volym vatten.

#### 5.3A Natriumhydroxid, 10 M

40 gram natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten.

#### 5.4A Natriumsulfat

$Na_2SO_4$ , vattenfri (brännes vid  $500^\circ C$  om den ej är ren).

#### 5.5A Surt vatten, pH 2

Svavelsyra (1:1) tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.

#### 5.6A Basiskt vatten, pH 12

NaOH (10M) tillsättes droppvis MilliQ-vatten till pH 12.

### 6A Utrustning

#### 6.1A Separertrattar eller flatbottnade rundkolvar

Koniska separertrattar med normalslipad hals och glaspropp samt oslipad kran med krankik av teflon, volym 2 L och 250 L. Flatbottnad rundkolv, volym 2 L + magnet och magnetomrörare (magnetomrörningsmetoden)

#### 6.2A Bägare

Volym 3 L, 150 mL och 250 mL



- 6.3A Rundkolv**  
Normalslipad hals och glaspropp, volym 500 mL
- 6.4A Graderat provrör**  
Volym 10 mL
- 6.5A Provrör**  
Volym 15 mL
- 6.6A Mätglas**  
Volym 1L, 50 mL och 100 mL
- 6.7A Glastrattar**  
En stor och en liten (10 resp. 5 cm Ø)
- 6.8A pH-indikatorstickor**  
Universalindikator pH 0-14
- 6.9A Rullindunstare**  
Försedd med mellanstycke med stänkskydd
- 6.10A Vattenbad**  
Tempererat till cirka 40°C
- 6.11A Kvävgas**  
N<sub>2</sub>(g), ansluten med slang till en pasteurpipett

### **7A Utförande**

Parallellt med proverna analyseras MilliQ-vatten som blankprov. För varje nyöppnad cyklohexanflaska görs en ny blank.

Vattnet (cirka 1,9 liter) mäts upp noga och surgörs med svavelsyrevatten (5.2A) till pH 2 och extraheras med 100 mL cyklohexan i separertratt i två minuter (exsickatorfett får ej användas) eller i flatbottnad rundkolv med magnetomrörare i 60 min. Cyklohexanextraktet tvättas med 50 mL surt vatten (5.5A). Det ”sura” extraktet innehåller sura och neutrala komponenter.

Därefter görs vattenprovet basiskt till pH 12 med 10 M natriumhydroxid (5.3A) och extraheras med 100 mL cyklohexan. Extraktet tvättas

med 50 mL basiskt vatten (5.6A). Det "basiska" extraktet innehåller basis-ka komponenter. Om vattenprovet innehåller mycket oorganiskt klor, mer än 1 g/L, tvättas extrakten två gånger.

Om emulsion uppstår vid extraktionen kan denna spräckas genom att släppa ut det mesta vattnet och sedan röra om i emulsionen med en glasstav. Vid kraftig emulsionsbildning överför man organfasen och emulsion till ett annat kärl och placerar det i frys några timmar. Då EOX skall analyseras får natriumklorid inte användas för att spräcka emulsioner. De "sura" och "basiska" extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och torkas med vattenfri natriumsulfat. Därefter koncentreras extraktet med rullindunstare och/eller i vattenbad med hjälp av kvävgasström till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL). Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets koncentration.

## B Extraktion av mark och sediment

### 5.B Kemikalier och lösningar

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om inget annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

**5.1B Aceton**  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

**5.2B n-Hexan**  
C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>

**5.3B Svavelsyra/vatten (1:1)**  
Koncentrerad svavelsyra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, blandas med samma volym vatten.

**5.4B Surt vatten, pH 2**  
Svavelsyra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.

**5.5B Natriumhydroxid, 10 M**  
40 gram Natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten.

## **6 Utrustning**

### **6.1B Provrör**

Med teflonbelagd skruvkork, volym 50 mL och 15 mL.

### **6.2B Analysvåg**

Med mätnoggrannhet  $\pm 10$  mg

### **6.3B Rotationssmixer**

För stora provrör

### **6.4B Centrifug**

Med plats för stora provrör

### **6.5B pH-indikatorstickor**

Universalindikator pH 0-14

### **6.6B Vattenbad**

Tempererat till cirka 40°C

### **6.7B Kvävgas**

N<sub>2</sub>(g), ansluten med slang till en pasteurpipett

## **7B Utförande**

Parallellt med proverna analyseras blankprov som består av använda lösningsmedel och reagens.

### **Extraktion av mark**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör. Provet extraheras med 40 mL aceton på rotationsmixer (ca ett varv per sekund) i 30 minuter. Provet centrifugeras och acetonekstraktet överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonekstraktet spädes med ca 15 mL surt vatten (5.4B) och extraheras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.5B) och extraheras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifugering ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexan-extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.

#### **Extraktion av sediment**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör som centrifugeras och supernatanten överförs till ett nytt provrör. Till centrifugröret med provet tillsättes 40 mL aceton och eventuell pellet löses upp genom att skaka röret varefter det extraheras genom rotation (ca ett varv per sekund) i 30 minuter på rotationsmixer.

Provet centrifugeras och acetonekstraktet överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonekstraktet spädes med supernatanten som avskildes tidigare och surt vatten (5.4B), totalt ca 15 mL, och blandningen extraheras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.5B) och extraheras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifugering ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexan-extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets koncentration.

#### **Bestämning av torrs substans**

Utföres enligt Svensk standard (SS 02 81 13)

### **8 EOX analysen**

Samma utrustning (något modifierad) som vid bestämning av AOX används (se SS 02 81). Extraktet drivs försiktigt in till torrhet varefter återstoden löses i en liten exakt mängd etylacetat (100-500 µL). Ca 20 µL

(exakt mängd noteras) etylacetatextrakt injiceras långsamt i ugnen på AOX-apparaten, som modifierats för EOX-användning. Det är viktigt att nålen på injektionssprutan är tillräckligt lång, så att extraktet sprutas in i den heta delen av ugnen. Det bör vara en plugg rent lösningsmedel efter pluggen med extrakt i sprutan.

### 9 Beräkning av resultat

Provet kvantifieras mot en ställd standard av någon högklorerad organisk förening löst i etylacetat t.ex. pentaklorfenol.

Följande formel gäller för beräkning av EOX:

Grundvatten:

$$X = \frac{(a/c - b/d) v}{R V}$$

där

X = EOX koncentrationen i ng klor/L

a = mängd halogen i provet i ng (avläst värde)

b = mängd halogen i blanken i ng (avläst värde)

c = volym injicerat prov (µL)

d = volym injicerad blank (µL)

v = extraktets volym (µL)

R = utbytesfaktor (avläst värde / teoretiskt värde) för standarden

V = volym prov (L)

Sediment och mark:

$$X = \frac{(a/c - b/d) v}{R p s 10}$$

där

X = EOX koncentrationen i µg klor/g torrsubstans (TS)

a = mängd halogen i provet i ng (avläst värde)

b = mängd halogen i blanken i ng (avläst värde)

c = volym injicerat prov (µL)

d = volym injicerad blank ( $\mu\text{L}$ )

v = extraktets volym ( $\mu\text{L}$ )

R = utbytesfaktor (avläst värde / teoretiskt värde) för standarden

p = provvikt i gram

s = torrs substans i procent

### **10 Kriterier för godkänd analys**

Dubbla eller tredubbla injektioner av både prov, blank och standard rekommenderas. Skillnaden i resultat mellan injektionerna bör ej vara mer än 15 %. Utbytet för standarden bör ej vara under 85-90%.

### **11 Rapport**

Rapporten skall innehålla följande uppgifter:

- a) Provets beteckning
- b) Resultat
- c) Övriga förhållanden som kan ha påverkat resultatet.

### **Referenser**

Martinsen, K., Kringstad, A., Carlberg, G. E.; Methods for Determination of Sum Parameters and Characterization of Organochlorine Compounds in Spent Bleach Liquors from Pulp Mills and Water, Sediment and Biological Samples from Receiving Waters, *Wat. Sci. Tech.* 20(1988)13-24.

Adolfsson-Erici, M., Wahlberg, C, Extraherbar organiskt bunden halogen (EOX), metodbilaga till Naturvårdsverkets *rapport 4103* (1992).

INSTITUTET FÖR TILLÄMPAD MILJÖFORSKNING (ITM)

Laboratoriet för analytisk miljökemi

Stockholms Universitet

Erik Gravenfors, Maria Petterson, Margaretha Adolfsson-Erici, Ulf Järnberg

## Flyktiga kolväten med SPME-teknik

### METODBESKRIVNING

Detta är en mycket snabb metod både för screening och specifik analys av flyktiga föreningar t.ex. BTEX.

#### **1 Användningsområde**

Används med fördel tillsammans med andra kemiska analysmetoder för att karaktärisera förorenade områden. Ingår i basprogrammet.

#### **2 Princip**

Solid phase micro extraction (SPME) är en kombinerad extraktions-, anriknings- och injektionsteknik som innebär att de organiska föreningarna i luft eller vattenprover anrikas direkt från provmatrisen på en kvartsfiber belagd med en lipofil film. Denna fiber förs direkt över i injektorn på en GC/FID där substanserna desorberas för separation och kvantifiering.

#### **3 Störningar**

Eftersom fibern även adsorberar organiska föreningar från omgivande luft är det av yttersta vikt att fibern inte exponeras för luft. Det är mycket viktigt att det råder samma omständigheter vid extraktion av standard som av prov. Viktiga parametrar att hålla konstanta är extraktionstid, temperatur och omrörning. Förluster av analyt genom adsorption till glasväggar har rapporterats. För att undvika dessa förluster bör alla glaskärl silaniseras innan användning. Förluster kan även uppstå genom adsorption av analyt till partiklar och makromolekyler i provet. För att undvika detta rekommenderas metanoltillsats ca 0.1 % till 0.5 %. Metanoltillsats mer än 1% bör undvikas om bensen skall bestämmas, då metanol ofta coeluerar med bensen.

#### 4 *Kemikalier och lösningar*

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om ej annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet och bör testas före användning genom blankextraktion enligt metoden.

##### 4.1 **Stamlösning av BTEX (Bensen, Toluen, Etylbensen och Xylen) i metanol**

Standardlösningar beredes i MilliQ-vatten och bör täcka intervallet 1 – 500 µg/L. Minst 5 nivåer på standarden rekommenderas.

##### 4.2 **Metanol** CH<sub>3</sub>OH

#### 5 *Utrustning*

##### 5.1 **SPME spruta.**

Manuell eller automatiserad

##### 5.2 **SPME fibrer**

Den fasta fasen bör vara polydimetylsiloxan (100 µm tjocklek)

##### 5.3 **Provkärl**

Silaniserade glasburkar med septumförsett lock. Volym: 4 ml

##### 5.4 **Magnet**

Passande ovanstående kärl

##### 5.5 **Magnetomrörare**

##### 5.6 **Gaskromatograf med flamjonisationsdetektor (GC-FID)**

#### 6 *Extraktion av grundvatten (manuell spruta)*

Strax innan extraktionen skall fibern desorberas i GC injektorn vid ca 225°C i minst 2 minuter.

Metanol sätts till provet för att motsvara metanolinnehållet i de olika standardnivåerna (ca 0.1 – 0.5%) men även för att frigöra analyterna från partiklar och aggregat. Provkärllet förses med passande magneter. Provkär-



let placeras ovanpå magnetorröraren med ca 2 cm distans till magnetorröraren för att undvika oönskad uppvärmning. SPME utrustningen fixeras strax ovanför provkärlet med en hållare. Provkärlets septum penetreras med SPME nålen och fibern som löper inne i nålen förs ner i lösningen. Lämplig extraktionstid är 15 minuter med kontinuerlig omrörning. Nålen skall inte doppas i lösningen under extraktionen. När extraktionstiden är slut dras fibern tillbaka in i nålen och hela SPME utrustningen placeras omedelbart ovanpå injektorporten på GC.

## **7 GC-analysen**

Analysen sker med en gaskromatograf med flamjonisationsdetektor (GC/FID). Septumet penetreras med SPME nålen och fibern förs ner i den hetaste delen av injektorn. Fibern desorberas under 2 minuter och dras därefter tillbaka in i nålen och SPME utrustningen avlägsnas från GC:n. Det är lämpligt att använda någon typ av stativ monterat på GC:n för SPME utrustningen under desorptionsfasen. Var noga med att inte beröra väggarna i injektorns glasinsats med fibern. Kolonnen ska vara 25-30 m lång och ha en innerdiameter på ca 0.3 mm. Stationär-fasen ska vara kemiskt bunden av typen "SE 30", "DB 5" eller "SE 54" och helst 0.5 µm tjock. Lämpligt temperaturprogram kan vara enligt följande: 40°C i 2 min (helst lägre temperatur om det är möjligt), därefter 6°C per minut till 80°C. Nästa temperaturramp bör vara brantare, ca 15°C per minut upp till 225°C där temperaturen hålls konstant i 5 min. Lämplig injektor- respektive detektor-temperatur är 225°C resp 300°C.

## **8 Beräkning av resultat**

### **Bestämning av BTEX**

En standardkurva görs genom att avsätta topparea som funktion av olika koncentrationer av standarder i ett diagram (minst 5 punkter) för samtliga komponenter.

Areorna för respektive komponent i provet beräknas och ur standardkurvan kan sedan koncentrationen avläsas som motsvarar den aktuella arean.

### **Screening av flyktiga kolväten**

All topparea i provet kvantifieras mot etylbensen-toppen i den standard som bäst motsvarar provet enligt följande formel:

$$X = \frac{a c}{b}$$

där

x = Provets koncentration (µg etylbensenekvivalenter /L)

a = Provets totala area

b = Etylbensenarea i den standard som bäst motsvarar provet

c = Etylbensenkoncentration i den standard som bäst motsvarar provet (µg/L)

### 9 Kriterier för godkänd analys

Dubbla extraktioner bör göras av både prov och standard. Skillnaden i resultat mellan dessa bör inte vara mer än 10%.

### 10 Rapport

Analysväret rapporteras i µg/L för respektive komponent (BTEX) eller µg etylbensen- ekvivalenter/L (Screening av flyktiga kolväten). Kopior av alla kromatogram inklusive standarder inkluderas i rapporten. Kolonn- typ, temperaturprogram, etc ska redovisas liksom eventuella anmärkningar eller andra uppgifter av värde för bedömningen.

### Referenser

Pettersson, Maria., Development of a method for determination of volatile organic compounds; BTEX, in groundwater with Solid Phase Micro Extraction (SPME) in combination with GC-FID *ITM rapport 60(1997)*

Arthur, C. L., Killam, L. M., Motlagh, S., Lim, M., Potter, D. W., Pawliszyn, J., Analysis of substituted benzene compounds in groundwater using solid phase microextraction. *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 979-983

INSTITUTET FÖR TILLÄMPAD MILJÖFORSKNING (ITM)

Laboratoriet för analytisk miljö kemi

Stockholms Universitet

Erik Gravenfors, Margaretha Adolfsson-Erici, Tomas Alsberg och Anna Winberg

## PAH-Screening version 1

### METODBESKRIVNING

Metoden är en semikvantitativ metod att bestämma polycykliska aromatiska kolväten (PAH) i grundvatten, sediment och mark.

#### **1 Användningsområde**

Används med fördel tillsammans med andra kemiska analysmetoder för att karaktärisera förorenade områden.

#### **2 Princip**

Grundvatten extraheras med cyklohexan, mark och sediment extraheras med aceton. Extraktet appliceras på en tunnskiktspatta belagd med octadecyl (C18) modifierad kiselgel. Plattan utvecklas med en polär mobilfas och föreningarna i provet fördelar sig efter polaritet över plattan. Slutbestämningen görs med en tunnskiktsscanner med fluorescensdetektion.

#### **3 Störningar**

Man bör uppnå tillräcklig separation mellan olika polyaromatiska föreningar och andra ämnen med god fluorescens för att kvantifieringen skall fungera tillfredsställande. Provet måste också spädas tillräckligt så att inte fluorescenssignalen mätas och så att en jämn och låg baslinje erhålls. Om provets sammansättning av PAH avviker mycket från standarden kan skevhet i resultaten uppstå. Detta beror på att fluorescensresponsen skiljer sig mellan olika polyaromatiska föreningar. Ströljus kan störa mätningen om emissionsvåglängderna ligger för nära excitationsvåglängden.

#### **4 Arbetshygieniska aspekter vid upparbetning och analys**

Många av de lösningsmedel som används är hälsovådliga och brandfarliga varför extraktionsarbetet bör utföras i dragskåp. Använd skyddshandskar

och skyddsglasögon. Vid extraktion i separertratt måste trycket utjämnas med jämna mellanrum genom att kranen öppnas. Rester av lösningsmedel samlas i särskilda behållare, för att senare destrueras enligt kommunens miljö- och hälsoskyddsförvaltnings anvisningar.

## A Extraktion av grundvatten

### 5A *Kemikalier och lösningar*

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om ej annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

#### 5.1A **Cyklohexan**

$C_6H_{12}$ , kontrollera renheten genom att analysera koncentrat av lösningsmedlet (t.ex. 1:100) på GC

#### 5.2A **Svavelsyra/vatten (1:1)**

Koncentrerad svavelsyra,  $H_2SO_4$ , blandas med samma volym vatten.

#### 5.3A **Natriumhydroxid, 10 M**

40 gram natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten.

#### 5.4A **Natriumsulfat**

$Na_2SO_4$ , vattenfri (brännes vid  $500^\circ C$  om den ej är ren).

#### 5.5A **Surt vatten, pH 2**

Svavelsyra (1:1) tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.

#### 5.6A **Basiskt vatten, pH 12**

NaOH (10M) tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 12.

## 6A *Utrustning*

### 6.1A **Separertrattar eller flatbottnade rundkolvar**

Koniska separertrattar med normalslipad hals och glaspropp samt oslipad kran med krankik av teflon, volym 2 L och 250 mL.

Flatbottnad rundkolv, volym 2 L + magnet och magnetomrörare  
(magnetomrörningsmetoden)

**6.2A Bägare**

Volym 3 L, 150 mL och 250 mL

**6.3A Rundkolv**

Normalslipad hals och glaspropp, volym 500 mL

**6.4A Graderat provrör**

Volym 10 mL

**6.5A Provrör**

Volym 15 mL

**6.6A Mätglas**

Volym 1L, 50 mL och 100 mL

**6.7A Glastrattar**

En stor och en liten ( 10 resp. 5 cm Ø)

**6.8A pH-indikatorstickor**

Universalindikator pH 0-14

**6.9A Rullindunstare**

Försedd med mellanstycke med stänkskydd

**6.10A Vattenbad**

Tempererat till cirka 40°C

**6.11A Kvävgas**

N<sub>2</sub>(g), ansluten med slang till en pasteurpipett

**7A Utförande**

Parallellt med proverna analyseras MilliQ-vatten som blankprov. För varje nyöppnad cyklohexanflaska görs en ny blank.

Vattnet (cirka 1,9 liter) mäts upp noga och surgörs med svavelsyrevatten (5.2A) till pH 2 och extraheras med 100 mL cyklohexan i separer-

tratt i två minuter (exsickatorfett får ej användas) eller i flatbottnad rundkolv med magnetomrörare i 60 min. Cyklohexanextraktet tvättas med 50 mL surt vatten (5.5A). Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter.

Därefter görs vattenprovet basiskt till pH 12 med 10 M natriumhydroxid (5.3A) och extraheras med 100 mL cyklohexan. Extraktet tvättas med 50 mL basiskt vatten (5.6A). Det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. Om vattnet innehåller mycket oorganiskt klor, mer än 1 g/L, tvättas extrakten två gånger

Om emulsion uppstår vid extraktionen kan denna spräckas genom att släppa ut det mesta vattnet och sedan röra om i emulsionen med en glasstav. Vid kraftig emulsionsbildning överför man organfasen och emulsion till ett annat kärl och placerar det i frys några timmar. Då EOX skall analyseras får natriumklorid inte användas för att spräcka emulsioner. De "sura" och "basiska" extrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och torkas med vattenfri natriumsulfat. Därefter koncentreras extraktet med rullindunstare och/eller i vattenbad med hjälp av kvävgasström till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL). Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets koncentration.

## B Extraktion av mark och sediment

### 5.B Kemikalier och lösningar

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om inget annat anges. Vatten för blankextraktion, lösningar och tvätt skall vara av MilliQ-kvalitet.

**5.1B Aceton**  
(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

**5.2B n-Hexan**  
C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>

**5.3B Svavelsyra/vatten (1:1)**  
Koncentrerad svavelsyra, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, blandas med samma volym vatten.

- 5.4B Surt vatten, pH 2**  
Svavelsyra,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , tillsättes droppvis till MilliQ-vatten till pH 2.
- 5.5B Natriumhydroxid, 10 M**  
40 gram Natriumhydroxid, NaOH, löses i 100 mL vatten

## **6 Utrustning**

- 6.1B Provrör**  
Med teflonbelagd skruvkork, volym 50 mL och 15 mL
- 6.2B Analysväg**  
Med mätnoggrannhet  $\pm 10$  mg
- 6.3B Rotationssmixer**  
För stora provrör
- 6.4B Centrifug**  
Med plats för stora provrör
- 6.5B pH-indikatorstickor**  
Universalindikator pH 0-14
- 6.6B Vattenbad**  
Tempererat till cirka 40°C
- 6.7B Kvävgas**  
 $\text{N}_2(\text{g})$ , ansluten med slang till en pasteurpipett

## **7B Utförande**

Parallellt med proverna analyseras blankprov som består av använda lösningsmedel och reagens.

### **Extraktion av mark**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör. Provet extraheras med 40 mL aceton på rotationsmixer (ca ett varv per sekund) i 30 minuter. Provet centrifugeras och acetonextraktet

överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonextraktet spädes med ca 15 mL surt vatten (5.4B) och extraheras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.5B) och extraheras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifugering ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexanextrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.

#### **Extraktion av sediment**

Provet görs så homogent som möjligt och cirka 20 gram vägs noggrant in i centrifugrör som centrifugeras och supernatanten överförs till ett nytt provrör. Till centrifugröret med provet tillsättes 40 mL aceton och eventuell pellet löses upp genom att skaka röret varefter det extraheras genom rotation (ca ett varv per sekund) i 30 minuter på rotationsmixer.

Provet centrifugeras och acetonextraktet överförs till ett nytt provrör och indunstas till ungefär halva volymen i vattenbad med hjälp av kvävgasström.

Acetonextraktet spädes med supernatanten som avskildes tidigare och surt vatten (5.3B), totalt ca 15 mL, och blandningen extraheras sedan med 10 mL n-hexan i två minuter. Efter centrifugering förs hexanfasen ("surt" extrakt) över till ett nytt provrör. Aceton/vattenfasen görs basisk, pH 12, med några droppar natriumhydroxid (5.4B) och extraheras sedan med ytterligare 10 mL n-hexan som avskiljs efter centrifugering ("basiskt" extrakt).

Det "sura" extraktet innehåller sura och neutrala komponenter och det "basiska" extraktet innehåller basiska komponenter. De två hexanextrakten slås ihop – ibland kan det vara av värde att behandla extrakten separat – och drivs in till liten volym som mäts exakt (förslagsvis 1-5 mL) i vattenbad med hjälp av kvävgasström. Hur mycket extraktet skall drivas in måste avgöras från fall till fall beroende på provets innehåll av organiska substanser.



**Bestämning av torrsubstans**

Utföres enligt Svensk standard (SS 02 81 13)

**HPTLC-analysen****8 Kemikalier och lösningar**

Alla kemikalier skall vara av hög renhet (pro analysi) om inget annat anges.

**8.1 Mobilfas**

Acetonitril, vatten, diklormetan (50:5:10).

**8.2 Aceton**

$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$

**8.3 Hexan**

$\text{C}_6\text{H}_{14}$

**9 Utrustning****9.1 HPTLC-plattor**

Stationärfas: Octadecylmodifierad (C18) kiselgel med applikationszon utan fluorecensindikator.

**9.2 Glasvannor**

0,5-1 L, för tvättning och utveckling av HPTLC-plattan.

**9.3 Spruta**

10 $\mu$ L, helst med trubbig spets för att ej repa HPTLC-plattan.

**9.4 HPTLC-scanner**

Försedd med kvicksilverlampa för fluorescensmätningar.

**9.5 Diamantskärare**

För att skära till HPTLC-plattor av lämplig dimension.

## 10 Utförande

Tunnskiktspattan förtvättas i en vanna med hexan/aceton 1:1 och får torka i rumstemperatur före användning. Provet appliceras på plattan (ca 2 µL, mät exakt) med en spruta som en väl koncentrerad fläck. Standardlösning av PAH eller kvantifierad kreosot appliceras parallellt med proven. Plattan utvecklas i vanna med mobilfas (8.1) tills lösningsmedelsfronten nått strax under kanten på plattan. Plattan tas upp, fronten markeras och plattan får torka i rumstemperatur innan analys.

HPTLC plattan analyseras med linjärt scan vid förslagsvis excitation svåglängden 254 nm. Emmisionsvåglängderna bör ej ligga för nära excitation svåglängden.

## 11 Resultat

### 11.1 Standardlösning

Som standard används teknisk kreosot och en PAH-standard som består av representanter för 3-, 4- och 5-ringade PAH t.ex. antracen, fluoranten och bens(a)pyren. Använda standarder skall vara kvantifierade med GC-FID eller GC-MS.

### 11.2 Resultatberäkning

Arean av de toppar som ligger inom samma intervall som PAH-standarderna skall beräknas. Totalsumman av dessa areor kvantifieras mot den tekniska kreosotstandardens totala area enligt följande:

Grundvatten

$$X = \frac{a m v}{b u p}$$

där

X = PAH-koncentrationen (µg PAH ekv/L)

a = provets area

m = mängd standard på plattan i ng

v = extraktets volym i mL

b = standardens area

u = volym prov påsatt på plattan i µL

p = provvolym i liter

**Sediment och mark**

$$X = \frac{(a m v) 100}{b u p s}$$

där

X = PAH-koncentrationen ( $\mu\text{g PAH ekv/g torrsubstans (TS)}$ )

a = provets area

m = mängd standard på plattan i ng

v = extraktets volym i mL

b = standardens area

u = volym prov på påsatt på plattan i  $\mu\text{L}$

p = provvikt i gram

s = torrsubstans i procent

**12 Kriterier för godkänd analys**

Dubbelprov bör utföras d.v.s. två appliceringar på plattan. Spridningen i resultat mellan dessa bör inte vara mer än 15%.

Separation på plattan är godkänd om PAH med 3,4 och 5 ringar har olika retention. Om kreosot används som standard bör en blandning som representerar PAH med 3,4 och 5 ringar sättas på varje platta, förslagsvis antracen, pyren och benz(a)pyren.

**13 Rapport**

Rapporten skall innehålla följande uppgifter:

- a) Provets beteckning
- b) Resultat
- c) Övriga förhållanden som kan ha påverkat resultatet.

**Referenser**

Sundström, Nylund, SNV Rapport 85-03

## POTENTIELLT BIOACKUMULERBARA SUBSTANSER (PBS)

Provextrakt som erhållits genom extraktion enligt EGOM (sid 6) uppdelas efter substansernas fördelningskonstanter på en tunnskiktspatta. De substanser som har  $\log P_{ow} > 3$  skrapas av plattan, extraheras med lösningsmedel och analyseras med GC/FID analogt med EGOM-metodiken.

”Reversed phase” tunnskiktspattor (oktadecyl-modifierad kiselgel, RP-18) med koncentrationszon och fluorescensindikator används. Dessa förväntas t ex med en blandning av n-hexan/acetone, 1:1. En kvantitativt uttagen del av provextrakt respektive blank appliceras som ett band på plattan med hjälp av en spruta eller en pasteurpipett. Vid sidan av bandet sätts en blandning av referenssubstanser med kända  $\log P_{ow}$ -värden.

Exempel på referenssubstanser för plattor med fluorescensindikator är

p,p'-DDT ( $\log P_{ow}=6.19$ )  
bifenyl ( $\log P_{ow}=4.09$ )  
benzofenon ( $\log P_{ow}=3.18$ )  
dimetylfthalat ( $\log P_{ow}=1.60$ )  
2-fenoxietanol ( $\log P_{ow}=1.16$ )

Plattan elueras med acetone-vatten, 80:20, tills fronten når ca 2 cm från plattans övre kant. Frontlinjen markeras och plattan får torka. Därefter delas den in i fyra zoner:

zon I  $\log P_{ow} < 3$   
zon II  $\log P_{ow} = 3-6$  (OBS! gränsen 106 istället för 105)  
zon III  $\log P_{ow} > 6$   
zon IV applikationszonen (=koncentrations-zonen)

Det går till på följande sätt. Referenssubstanserna visualiseras under en UV-lampa och  $R_f$ -värden och  $\log P_{TLC}$ -värden beräknas för varje fläck enligt nedanstående.

$$R_f = \frac{\text{substansens vandringssträcka}}{\text{frontens vandringssträcka}}$$

$$\log P_{TLC} = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

I ett diagram avsätts sedan  $\log P_{OW}$  mot  $\log P_{TLC}$  för vardera referenssubstans och den linjära korrelationen räknas ut med regressionsanalys. Med hjälp av den erhållna ekvationen kan man sedan räkna ut vilken vandringssträcka på plattan ovanstående zongränser motsvarar.

Skikten i alla fyra zonerna skrapas av plattan och extraheras vart och ett för sig med en blandning av aceton och n-hexan, 1:1 (3x2 mL). Blanken behandlas på samma sätt. Extrakten från tunnskikts-zonerna tillsätts intern standard, koncentreras och karakteriseras med GC/FID som beskrivet ovan i "Extraherbart gaskromatograferbart organiskt material". Om något kromatogram visar sig innehålla några få stora toppar som står för det mesta av ytan ska dessa integreras och redovisas för sig.

I rapporten anges innehållet av extraherbart gaskromatograferbart organiskt material (som mg/L) i varje zon-extrakt från plattan tillsammans med värdet för det ursprungliga extraktet (EGOM, se ovan). PBS-värdet är det sammanlagda värdet för zon II, III och IV (dvs där  $\log P_{OW} > 3$ ). Blankvärden för alla zoner redovisas också. Återvinningen vid eluering och extraktion från tunnskiktsplattan anges som det sammanlagda värdet från alla fyra zon-extrakten i procent av EGOM. Men räkna inte upp värdena med denna faktor.

Parallellt beräknas och anges också innehållet av organiskt kol i alla extrakten mot kolinnehållet i C18 respektive C20. Om några få toppar står för huvudparten av PBS bör dessa redovisas med retentionstider och uppskattade halter. Liksom för EGOM ska kopior av alla kromatogram inklusive blank ingå i rapporten. Kolonntyp, temperaturprogram, eventuella anmärkningar och andra uppgifter av värde rapporteras också.

**Referenser**

Martinsen K, Kringstad A, Carlberg G E; Methods for Determination of Sum Parameters and Characterization of Organochlorine Compounds in Spent Bleach Liquors from Pulp Mills and Water, Sediment and Biological Samples from Receiving Waters, *Wat. Sci. Tech.* 20(1988)13-24.

Renberg L, Sundström G, Sundh-Nygård K; Partition Coefficients of Organic Chemicals Derived from Reversed Phase Thin Layer Chromatography. Evaluation of Methods and Application on Phosphate Esters, Polychlorinated Paraffins and Some PCB-substitutes, *Chemosphere*, 9(1980)683-691.

Renberg L, Rosén-Olofsson A-C; Karakterisering av potentiellt bioackumulerbara substanser i industriella avloppsvatten, *NSL/IVL-rapport 82-03*, SNV 1982.

Renberg L O, Sundström S G, Rosén-Olofsson A-C; The Determination of Partition Coefficients of Organic Compounds in Technical Products and Waste Waters for the Estimation of Their Bioaccumulation Potential Using Reversed Phase Thin Layer Chromatography, *Toxicology and Environmental Chemistry*, 10(1985)333-349.





# **Biologiska tester**



## MICROTOX Solid Phase

### KORTFATTAD METODBESKRIVNING

Bestämning av akuttoxicitet i sediment och markprover med hjälp av en luminicerande marin bakteriestam.

#### **1. Användningsområde**

Utöver standardtester för i vatten lösta kemikalier, har MICROBICS Corp., Carlsbad, USA, under senare tid utvecklat ett brett spektrum av tester, med vilka man kan undersöka toxiska substanser i olika media såsom sediment, jord, oljeborrmassor, muddermassor, organiska lösningar, marina prover, porvatten etc. I vägledning för översiktlig inventering och riskklassning av förorenade områden har metoden använts för bestämning akut toxicitet i sediment, markprover parallellt med porvatten, ytvatten och grundvatten.

#### **2 Syfte**

Att med en snabb och relativt billig metod kunna mäta toxiska effekter i fasta prover.

#### **3. Begränsningar i användning**

Vid test av fasta prover är högsta möjliga koncentration begränsad till ca 20 volymsprocent. Kornstorleksfördelningen i provet påverkar testresultatet. Mycket finkornigt material t ex leror kan ge avvikande förhöjd toxicitet. Microbics rekommenderar parallella tester av standardprover av olika kornstorlek för kompensation av kornstorleksberoende avvikelser.

Övriga faktorer som kan påverka resultatet:

- Starkt färgade prover
- Torrsubstanshalt
- Organiskt innehåll
- Förändringar av provet genom åldring t.ex. oxidation, pH, salt-

halt o.s.v.

#### **4. Arbetshygieniska aspekter**

Vid arbete med förorenade prover skall hudkontakt undvikas. Prover som misstänks innehålla flyktiga ämnen upparbetas i dragskåp eller väl ventilerade arbetsytor.

#### **5. Testorganism och lösningar**

##### **5.1 Testorganism**

Som testorganism används en odlad och frystorkad luminiserande marin bakterie av arten *Vibrio fischeri* tidigare kallad *Photobacterium phosphoreum*.

##### **5.2 Testlösningar**

Odlingsmedium/stamlösning utgörs av Microtox Solid Phase Diluent- 3%, steril NaCl eller för 100% metod tester Microtox Diluent-2% NaCl-lösning och Microtox Reconstitution Solution (ultrarent vatten) för rekonstituering av frysta bakterier.

#### **6. Utrustning**

##### **6.1 Microtoxinstrument**

t ex modell M 500 med PC och skrivare

##### **6.2 Termostaterat vattenbad**

för temperatur  $15 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$

##### **6.3 Automatpipetter**

##### **6.4 Centrifug**

##### **6.5 Våg**

##### **6.6 Frys**

$-20 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$

##### **6.7 Kyl eller kylrum**

$+4^{\circ}\text{C}$

##### **6.8 Plaströr**

med specialtillverkad filteranordning (Microbics)

- 6.9 Magnetorrörare
- 6.10 Tidur
- 6.11 Värmeskåp för torrviktbestämning
- 6.12 Ugn för glödningsförlustbestämning

### **7. Provmängd**

För test av yt-, grund- eller porvatten krävs för varje test ca 10-15 ml prov. Av fasta prover som mark och sediment behövs 30-50 g beroende på val av koncentrationer och antal replikat.

### **8. Provförvaring**

Kyl eller kylrum, +4°C för sediment och markprover upp till en månad.. Lösta prover förvaras frysta 2-6 månader.

### **9 Provberedning**

Sediment och markprov silas eller sällas genom plastnät med 2 mm maskstorlek. Beroende på föroreningsgrad får jordprover i vissa fall rensas från partiklar större än 2 mm med hjälp av pincett.

Se vidare avsnitt 6.4.

### **10 Utförande**

7,0 g sediment eller jord vägs in och blandas med 35 ml 3 %-ig Solid Phase Diluent i en 50 ml bägare och homogeniseras under 10 minuter med hjälp av magnetorrörare. Rekommenderat pH-intervall är 6-8 och normalt behöver provet ej pH-justeras. Torrsvikt och glöddrest bestäms i triplikat.

Testet utförs i en serie omfattande förslagsvis sex koncentrationer i duplikat med två blankprover. 16 plaströr (beroende på antal spädningar) placeras i termostatbad i 15°C, tillsätt 1,5 ml Solid Phase Diluent till alla utom till de två första rören. 1,5 ml sedimenthomogenat enligt ovan tillsätts de första fyra rören. Efter omblandning överflyttas 1,5 ml homogenat från andra till tredje röret och vidare till nästa rörpar. De två sista rörparen innehåller endast diluent och utgör blankprover. Provet späds således med en faktor 2. Provets högsta koncentration beräknas innehålla 197,4 g vått prov per liter 3%-ig NaCl-diluent.

Prover stabiliseras under 10 minuter i vattenbad (15°C). Efter temperaturstabilisering tillsätts 20 µl "rekonstituerad" bakterielösning till alla rör inom ett tidsintervall på 15 sekunder. Efter omblandning installeras filtren i rören så att filtrets underkant ej når vätskeytan. Provet inkuberas 30 minuter och därefter trycks filtret försiktigt ner till nära rörets botten. Filtratet flyttas till Microtox-analysator, där ljusintensiteten mäts enligt programmet. Resultatet uttrycks som EC50- och EC20-värden i volymprocent eller i koncentration g vätvikt/l. Med hjälp av torrviktsbestämning kan toxiciteten omräknas till g torrvtikt/l. Vid redovisningen av resultaten presenteras förutom ECxx-värden även TU-värden (Toxic Unit) = 100 /ECxx. Om provet är starkt färgat eller grumligt kan mätresultaten korrigeras med hjälp av Colour Correction Program.

### **11 Bestämning av toxicitet hos porvatten från sediment**

För test av porvatten behövs ca 10-15 ml prov. Beroende på sedimentets täthet centrifugeras 50 – 200 ml sediment under 30 minuter vid 2000G. Porvatten pH-justeras så att det ligger mellan 5-8 med HCl eller NaOH. Porvattnet testas helst omgående eller efter frysning. Provet kan testas enligt standard- eller 100 % metoden (Microtox M 500 Manual Version 3, 1994).

### **12 Kvalitetskontroll**

Alla prover körs som duplikat med ett eller flera blankprover. Microtox dataprogram signalerar automatiskt om ett mätvärde avviker mer än 20 % i dos/respons i förhållande till övriga värden. I analysprotokollet skall finnas uppgifter om EC50, EC20 eller annan önskad effektkoncentration och 95% konfidensintervall.

### **13 Kriterier för godkänt test (gäller samtliga metoder)**

- Standardavvikelse mindre än 25% vid 95% konfidensintervall
- Spridning mellan replikat mindre än 20%
- Internkontroll med referenssubstans (fenol eller ZnSO<sub>4</sub>)
- Färgkorrigering för prover som är grumliga eller gulbrunfärgade.

### **Referenser**

Microtox M 500, Manual Version 3 (1994 12 09)

Solid Phase testmetod för jord och sedimentprover

Åke Granmo, Rolf Ekelund

Ekotoxikologiska gruppen

Kristinebergs marina forskningsstation

450 34 Fiskebäckskil

Info angående metoden Tel: 0523-18500 Fax: 0523-18502 el 18503

## Metodbeskrivning för mussellarvförsök

1. Rengör ett stort antal lekmogna blåmusslor (100 – 200 st eller fler). Vid svenska västkusten finns lekmogna musslor under april t.o.m. juli. Beroende på vattentemperaturen kan de även finnas tidigare eller senare, men då krävs ett större antal individer för att öka möjligheten att erhålla mogna ägg och spermier. Man kan bevaka mognadsgraden på äggen genom att fortlöpande ta ut prover från musslors gonadvävnad och studera äggen i mikroskop. Ta musslor från olika typer av lokaler. Senare under lekperioden tages musslor från större djup.
2. Förvara musslorna torrt vid 5-10°C under några timmar alternativt under natten. Skaka dem därefter tillsammans kraftigt. Fördela dem så en och en i burkar (200 ml) och tillsätt filtrerat (0.45 µm) havsvatten av 15 – 20°C.
3. Det kan dröja en halv till några timmar innan musslorna släpper game-terna. När detta skett kontrolleras kvaliteten i mikroskop (runda ägg, rör-liga spermier). Välj därefter ut ägg från en hona och spermier från en hane. Äggen kan som längst förvaras under 3 timmar vid 10°C innan för- söket startas. Spermierna förvaras i kyl under väntetiden.
4. Använd kapade pasteurpipetter och kapade pipettspetsar vid hantering av äggen eftersom de är rel. stora och mycket ömtåliga. Överför äggen till ett 100 ml mätglas, suspendera dem i sugfiltrerat (0.2 µm) havsvatten av 10°C och låt dem delvis sedimentera. (Tryckfiltrering av saltvatten bör undvikas då cellsprängning kan uppstå och rester passera filtren vilket kan ge näring för mikroorganismer och infektion i proverna.) De mogna äggen är tyngre och sjunker snabbast.
5. När de tyngsta äggen sedimenterat avdekanteras nästan hela vattenvo- lymen och slängs. Äggen omröres försiktigt så att de blir homogent för- delade i vattenvolymen och antalet ägg i 100 µl bestäms sedan genom räkning i räknekammare under mikroskop.

6. Mät med hjälp av turbidimeter spermiesuspensionens täthet och spädd den med filtrerat saltvatten (0.2  $\mu\text{m}$ ) så att tätheten blir 6 NTU (nephelometric turbidity units). Tillsätt därefter spermier från suspensionen motsvarande en droppe / 70 ägg till bägaren med äggsuspension. Rör om varmsamt och inkubera därefter äggen vid 10°C.

7. En timme efter spermietillsatsen delas de befruktade äggen upp i ett antal mindre bägare. Uppdelningen av äggsuspensionen i små portioner göres för att minska den mekaniska påverkan som äggen utsätts för vid den omrörning som görs före pipetteringen för att få en homogen suspension. Det har visat sig lämpligt att byta bägare efter ca. 30 larvkoppar. Förvara äggen vid +5°C.

8. Väl diskade larvkoppar av glas (8 mm höga, 24 mm ytterdiameter) fördelas i petriskålar med lock. Sätt till varje larvkopp 1.1 ml av vattenprovet som skall toxicitetstestas. Salthalten bör vara 20 – 35 ‰. Vid behov tillsättes salter enl. Brujewicz's recept för syntetiskt havsvatten (Brujewicz, 1931). PH-värdet justeras till 7.8 – 8.4. Tillsatsen av vattenproverna till kopporna görs först sedan bra ägg (runda ägg) erhållits. Obs! tänk på att syreövermättnad kan uppstå om vattnet är för kallt vid sugfiltrering. Vid övermättnad uppstår problem med bubblor vid fotografering. Använd alltid havsvattenkontroller som sättes i början och i slutet av försöksstarten och några extra koppar med streptomycin (20 mg/l) + malakitgrönt (0.03 mg/l) för att kontrollera om ev. dålig äggutveckling berott på infektion.

Det är även lämpligt att vid varje testning inkludera en referenskemikalie där effektgränsen är känd. Därigenom kan kvaliteten på gameter och larver jämföras mellan testtillfällena.

9. Tag en bägare med befruktade ägg, suspendera dem genom varsam omskakning och sätt ca. 70 ägg till varje larvkopp. Det är lämpligt att ha 6 – 8 replikat. Börja på en ny bägare med ägg efter ca. 30 larvkoppar. Sätt lock på petriskålarna.

10. Efter tillsats av de befruktade äggen kan larvkopporna ev. fotograferas eller videofilmas för senare äggräkning. Petriskålen bör ligga på is i samband med fotograferingen för att inte bli för varm. Skålarna med de befruktade äggen inkuberas vid ca. 13°C .

11. När huvuddelen av mussellarverna i kontrollproverna har nått veligerstadiet (efter 72 – 96 timmar) avbrytes samtliga prover genom tillsats av en droppe 8% formalin i saltvatten till varje kopp.

12. När ett prov skall avläsas sättes larvkoppen i en räknekammare med rutnät i botten och koppen fylles till brädden med dest.vatten och täckglas pålägges. Observationerna göres med mikroskop vid ca. 100 ggr förstoring. Bestäm andelen larver som uppskattas varit döda vid försökets avbrytande eller missbildade samt andelen larver som nått det tydligt D-formade veligerstadiet.

13. Antalet tillsatta ägg i varje larvkopp räknas från foton eller videofilmningen och andelen befruktade ägg, döda eller missbildade larver samt veligerlarver uttrycks som procent av antalet tillsatta ägg. I de fall spädningsserier testats kan beräkningar göras av LC 50, EC 50 eller NOEC-värden. Det är här viktigt att man avpassar spädningen så att övergången till veligerstadiet täckes in. Lämpliga dataprogram för att beräkna LC50, EC50 eller NOEC-värden har beskrivits av B. Eklund (1995).

14. Denna metod går även att använda för lösningsmedelsextrakt. Vid arbete med sådana tillsätts avsedd mängd till varje larvkopp varefter proverna indunstatas till torrhet samt ytterligare en timme i renluftsbänk. Tillsätt saltvatten (1.1 ml sugfiltrerat 0.2 µm) till kopporna med indunstat extrakt.

### Referenser

- Brujewicz, S. 1931. In N.N. Subov et al. (Ed). Oceanographical tables. Oceanographical Institute, Hydro-Meteorological Committee of USSR, Moscow. p. 146.
- Eklund, B. 1995. Metodmanual för reproduktionstest med rödalgen *Ceramium strictum*. Inst. för tillämpad miljöforskning rapp. 40. 27 p.

## Bestämning av EROD-induktion i celler

### METODBESKRIVNING

Denna metod är en vidareutveckling av två tidigare metoder (Hanberg et al. 1991, Kennedy et al. 1993).

#### **1 Syfte**

Syftet med EROD-testet är att på ett relativt billigt och snabbt sätt få ett mått på provets samlade dioxin-likade biologiska aktivitet.

#### **2 Användningsområde**

Testet kan användas till alla typer av prover, enskilda substanser eller komplexa blandningar som t ex miljöprover.

#### **3 Princip för test**

Dioxin-likade ämnen inducerar (ökar) cellers förmåga att metabolisera 7-etoxyresorufin till resorufin. Detta sker genom nyproduktion av enzymet CYP1A1 i cellen. Produkten resorufin fluorescerar, vilket används för kvantifiering av enzymet.

#### **4 Begränsningar i användning**

Testet begränsas främst genom den mängd av det/de dioxin-likade ämne(n) som finns i provet. Olika EROD-testsystem med olika typer av celler och olika kvantifieringsmetoder ger olika känslighet. Vid testning av t ex miljöprover begränsas testet även av begränsad vattenlöslighet och av toxicitet. I testet exponeras celler för provet löst i cellmediet, som är en vattenlösning. Det är därför viktigt att provet löser sig i mediet. Dioxin-likade substanser är inte speciellt cytotoxiska, men i komplexa miljöprover finns det oftast många andra ämnen som kan vara toxiska och därmed skada/döda cellerna så att ingen EROD-induktion kan mätas.



## **5 Kvalitetskontroll**

Det är viktigt att en standardkurva med TCDD körs i varje provomgång. Genom att studera aktiviteten av TCDD och formen på kurvan och jämföra med tidigare provomgångar kan man kontrollera att den aktuella provomgången är av tillräckligt hög kvalitet. Dessutom bör tillräckligt många spädningar av provet köras för att formen på provets dos-responskurva ska kunna studeras.

## **6 Arbetshygieniska aspekter**

De arbetshygieniska aspekterna gäller främst upparbetning av provet samt senare vid provhanteringen. Skyddshandskar bör användas. Av miljöskäl bör provspädningar samt cellmedium innehållande prov insamlas och skickas för destruktion. Var aktsam vid extraktionen då många av de lösningsmedel som används är hälsovådliga och brandfarliga. Utför extraktionsarbetet i dragskåp. Använd skyddshandskar och skyddsglasögon. Vid extraktion i separertratt måste trycket utjämnas med jämna mellanrum genom att kranen öppnas. Då syror skall blandas med vatten hålls syran i vattnet – SIV! Rester av lösningsmedel samlas i särskilda behållare, för att senare destrueras enligt kommunens miljö- och hälsoskyddsförvaltnings anvisningar.

## **7 Material**

### **7.1 Testorganism**

I denna uppsättning av EROD-testet används hepatom cellinjen MH1c1. Även ett flertal andra cellinjer samt primära celler kan användas men MH1c1 har visat sig vara lämplig pga att de både växer bra och är känsliga för EROD-induktion. Cellmediet består av DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) med tillsats av 10% bovint fetalserum, streptomycin (1000 µg/ml) och Penicillin (1000 IU/ml). Cellerna odlas i 10% CO<sub>2</sub> vid 37°C.

### **7.2 Kemikalier**

För enzyminkubationen används följande kemikalier: NADPH, NADH, MgSO<sub>4</sub> och bovint serumalbumin. Som buffert används Hepes (0.1 M, pH 7.8).

### **7.3 Utrustning**

För att odla cellerna krävs en inkubator med termostat och tillförsel av 10% CO<sub>2</sub>. För enzyminkubering krävs ett värmeskåp (37°C) med skak-

möjlighet. Om enzymanalysen inte körs direkt efter det att cellerna har exponerats bör de förvaras vid  $-70^{\circ}\text{C}$ . Fluorescensmätningen görs i en spektrofluorometer för läsning av 96-brunns cellodlingsplattor (t ex Fluoroskan II, Labsystems), utrustad med filter för excitation vid 545 nm och emission vid 590 nm.

## **8 Utförande**

### **8.1 Cellodling**

MH1c1 cellerna odlas i flaskor under ca 1-2 veckor. De sätts om när de blir nästan konfluenta (ca var tredje dag). Därefter sätts de ut i 96-hålsplattor för cellodling med  $1.5 \times 10^5$  celler och 200  $\mu\text{l}$  medium per brunn. Cellerna får växa 1-2 dygn (tills de är nästan konfluenta).

### **8.2 Provbehandling**

Provet bör vara extraherat eftersom det då kan koncentreras, vilket ökar chansen att kunna detektera enzyminduktion. Dessutom minskar risken för cytotoxicitet i ett extrakt då vissa andra typer av ämnen elimineras. Extraktionsmetoden är samma metod som använts i de organiskemiska screeningmetoderna EGOM, SPOT och EOX, vilket innebär att samma extrakt kan användas till EROD-testet utan särbehandling (se SPOT-testet, Gravenfors et al., 1995). Efter extraktion är provet löst i ett organiskt lösningsmedel. Detta kan inte användas på cellerna utan dunstas in och löses i DMSO. Samtidigt koncentreras provet så mycket som möjligt för att öka detekterbarheten. Från DMSO-lösningen görs vidare spädningar för exponering av cellerna.

### **8.3 Exponering för testsubstans(er)**

Mediet byts mot medium innehållande testsubstansen löst i DMSO (0.5% DMSO i cellmediet). Minst fem brunnar exponeras med samma koncentration (varav en används som blankprov vid enzyminkubationen). Den yttersta kolumnen på vardera sidan används inte pga stora spridningar i resultaten. Cellerna inkuberas med testsubstansen under 24 timmar. Därefter sugs mediet av och cellerna sköljs två gånger med PBS. Plattorna fryses vid  $-70^{\circ}\text{C}$  utan medium och förvaras så tills enzymanalysen ska göras. Om den ska köras direkt måste cellerna ändå frysas och tinas så att cellerna spricker. Detta bör kontrolleras i mikroskop.

### **8.4 Enzymbestämning**

Plattorna tas fram ur frysen och får tina. 75  $\mu\text{l}$  Hepesbuffert innehållande

NADPH (1.33 mg/ml), NADH (1.33 mg/ml), MgSO<sub>4</sub> (1.33 mg/ml) och albumin (1.33 mg/ml) tillsätts i varje brunn. I blankproverna tillsätts allt utom NADPH och NADH. Plattorna förinkuberas under 15 minuter vid 37°C under skakning. 25 µl av substratet (7-etoxyresorufin; 20 µM i metanol) tillsätts i varje brunn och plattorna inkuberas under skakning vid 37°C under 15 minuter. Därefter stoppas reaktionen med 150 µl metanol. Plattorna får stå i minst 15 minuter och därefter mäts fluorescensen vid excitation 545 nm och emission 590 nm.

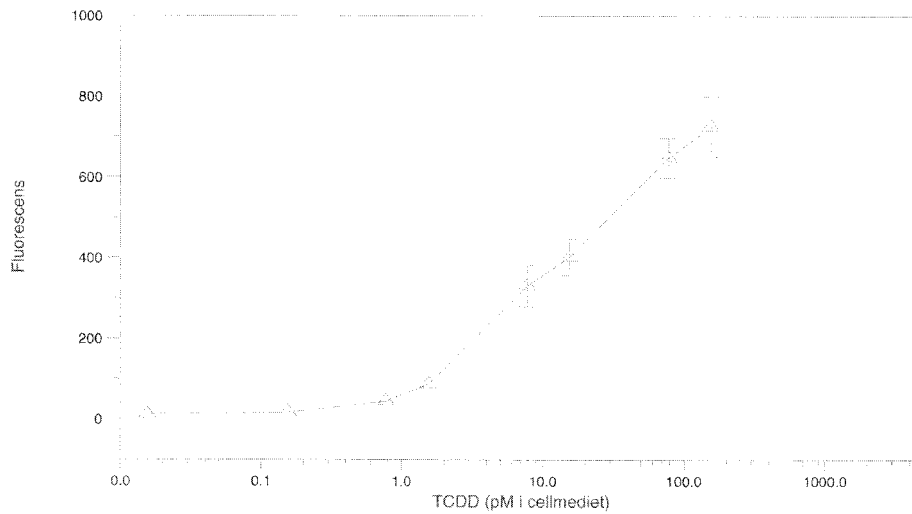
### 9 Beräkning av resultat

Provresultaten anges som TCDD-ekvivalenter (TEQ) efter att provet jämförts med TCDD-kurvan som körts i samma omgång. Fluorescensen i de olika cellbrunnarna korrigeras för respektive blankprov. Om något av de fyra värdena för samma provkoncentration avviker från de övriga exkluderas detta. TCDD-punkterna (speciellt viktigt i den linjära delen av kurvan) anpassas till en kurvfunktion (S-formad kurva med logaritmerad x-axel). Provkurvan ritas ut bredvid TCDD-standardkurvan och den provkoncentration som ligger bäst (dvs med en fluorescens i närheten av TCDDs EC<sub>50</sub> (halva maxfluorescensen)) används för att beräkna provets TEQ. Provets TEQ fås genom att i TCDD-standardkurvan beräkna vilken TCDD koncentration provets fluorescens motsvarar. Därefter korrigeras värdet för spädning och hur mycket sediment/mark det motsvarar. Om flera punkter ligger lika bra tas medelvärdet av dessa. Detektionsgränsen bestäms från TCDD-kurvan och prover med lägre fluorescens anges som < detektionsgränsen efter korrigering för eventuell spädning.

Variationen mellan prover, både inom samma körning och mellan olika körningar, är generellt större i biologiska tester än i kemiska analyser. Vid testning av samma sedimentextrakt i fyra olika testomgångar erhöles en standardavvikelse på ± 94% av medelvärdet. Detta beror till stor del på normal biologisk variation och icke-linjära samband mellan koncentration och effekt (se figur 1).

### 10 Kriterier för godkänt test

1. Att TCDD-standardkurvan ser normal ut (se figur 1). Formen är viktigast och att detektionsgränsen ligger där den brukar (varierar med celltyp). Den maximala induktionen kan variera något från gång till gång beroende på hur länge cellerna har vuxit. Maxinduktionen minskar successivt och nya celler bör sättas ut ungefär var tredje månad.
2. Att dos-respons kurvan för provet ser normal ut (S-formad). Ofta min-



FIGUR 1. Exempel på standardkurva: EROD-induktion av 2,3,7,8-tetraklorodibenso-p-dioxin (TCDD).

skar induktionen vid doser högre än de som ger maxinduktion. När man kör okända prover rekommenderas att provet körs i två omgångar. I den första testas koncentrationer 1:1, 1:10, 1:100 osv för att hitta rätt område. I den andra omgången studeras detta koncentrationsområde i mer detalj; dvs t ex 1:100, 1:300, 1:1000 osv. Det är viktigt att få med flera punkter på den linjära delen av kurvan.

Det finns några kritiska moment i testet som lätt kan ge upphov till mätfel eller stor spridning i resultaten. Framför allt är det mycket viktigt att det är lika många celler i varje brunn eftersom enzymaktiviteten inte korrigeras för mängden protein. Generellt gäller att alla brunnar i samma omgång ska behandlas så lika som möjligt.

### 11 Redovisning av resultat

Resultaten redovisas som TCDD-ekvivalenter (TEQ) per g sediment eller mark. I fall då ingen enzyminduktion har kunnat uppmätas redovisas provet som < detektionsgränsen för TCDD. Detektionsgränsen begränsas då av hur mycket prov man har kunnat exponera cellerna för, i praktiken ofta hur mycket provet har koncentrerats vid extraktionen. Detektionsgränsen får i vissa fall korrigeras om provet har behövt spädas pga låg vattenlöslighet eller hög cytotoxicitet.

**Referenser**

Hanberg A, Ståhlberg M, Georgellis A, de Wit C och Ahlborg UG (1991) Swedish Dioxin Survey: Evaluation of the H-4-II E bioassay for screening environmental samples for dioxin-like enzyme induction. *Pharmacology & Toxicology* 69: 442-449.

Kennedy SW, Lorenzen A, James CA och Collins BT (1993) Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Analytical Biochemistry* 211: 102-112.

Ulrika May  
Ekotoxikologiska gruppen  
Kristinebergs Marina Forskningsstation  
450 34 Fiskebäckskil

## UMU-test

### för bestämning av genotoxicitet hos vatten och avloppsvatten

#### 1. Introduktion med kort teori

Denna metod bygger på att under kontrollerade former exponera genetiskt modifierade bakterier av stammen *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 för varierande koncentrationer av testmaterial för att kunna detektera eventuell förekomst av mutagena ämnen i detsamma.

I alla celler finns många olika reparationsenzymers vilkas uppgift består i att reparera skador på DNA. UmuC\* producerar ett reparationsenzym som orsakar många felreparationer. Detta på grund att genen saknar en styrenhet, en instruktionsmall, vilket i sin tur medför att reparationerna sker på ett slumpartat sätt. Ämnen som aktiverar till produktion av detta enzym misstänks därför kunna orsaka speciellt allvarliga skador hos organismer.

UmuC har förmåga att svara på flera olika typer av genotoxiska skador. Ett mått på endast detta enzyms aktivitet anses därför fullt tillräckligt för att kunna detektera verkan av många olika slags genotoxiska substanser. Detta medför också att det räcker med att undersöka en enda bakteriestam till skillnad från Ames test vilken kräver olika bakteriestammar för olika mutagena ämnen.

För att kunna mäta induktionshastigheten av umuC har dess operator, dvs den sekvens som reglerar umuC, kopplats till en lacZ-gen. LacZ-genen producerar enzymet  $\beta$ -galaktosidas vilket i sin tur bryter ner laktos men även vissa andra substrat som t ex ONPG\*\*. En produkt från ONPGs nedbrytning är ortho-nitrofenol vilken är guldfärgad och kan bestämmas spektrofotometriskt. Genom att testorganismen berövas den

\* umuC är en akronym för: "uv-mutagenesis and Chemical repair gene"

\*\* o-nitrofenol- $\beta$ -D-galaktopyranosid

kromosomala lacZ-genen samt att den plasmida lacZ-genen saknar promotor och istället kopplats till umuC-operatorn kan transkription av lacZ-genen endast äga rum vid inducering av umuC-operatorn. Mängden nedbrytningsprodukt från  $\beta$ -galaktosidasets substrat, ortho-nitrofenol, blir därmed också ett direkt mått på induktionen av umuC-operatorn.

## **2 Metodens omfattning**

### **2.1 Applicerbarhet**

Metoden kan användas för bestämning av genotoxicitet hos vatten- och avloppsvattenprover.

### **2.2 Interferenser**

Olösliga substanser i provet kan medföra att testresultatet blir felaktigt samt att reproducerbarheten minskas.

Om ett prov innehåller en hög halt cytotoxiska substanser kan dessa hämma celldelning och även leda till celldöd.

## **3 Definitioner**

### **3.1 Lagringskultur**

Lagrad bakteriekultur av viss stam för att bevara ursprunglig stam i laboratoriet samt för inokulering av 12h-kultur.

### **3.2 12h – kultur**

Kultur för förökning av testbakterien att användas vid beredning av förkultur.

### **3.3 Förkultur**

Bakteriekultur att användas för att anpassa bakterierna till testförhållandena samt att användas som ympmaterial till provvatten.

### **3.4 Ympmaterial**

Bakteriesuspension att användas vid inokulering av en näringslösning samt en exponentiellt växande förkultur att inokulera provvatten med.

### **3.5 Näringslösning**

Vattenlösning av de näringsämnen bakterierna kräver för sin tillväxt.

### 3.6 Prov

Provvatten som ska testas efter att ha förbehandlats på lämpligt sätt exempelvis genom centrifugering, filtrering, homogenisering, pH-justering etc.

### 3.7 Kontroller

- Blanker (närlösning utan bakterier)
- Negativa kontroller till prov (närlösning, ympmaterial och destillerat vatten)
- Negativa kontroller till referenser (närlösning, ympmaterial samt lösningsmedel)

### 3.8 Referenser (positiva kontroller)

- Närlösning, ympmaterial och lösta genotoxiska substanser exempelvis 4-nitroquinolin-N-oxid eller 2-aminoantracen.
- Metabolisk aktivering genom tillsats av S9 (fraktion av levermikrosomer inducerade med aroklor (en kommersiell PCB-blandning). Mikrosomerna utvinns genom centrifugering vid 9000 g och förvaras vid -80°C)

### 3.9 Spädningsfaktor

Heltalsförhållandet mellan volymen utspätt prov och volymen tillsatt prov avrundat nedåt. Observera att högsta möjliga koncentration innebär en spädningsfaktor 1:1,5 pga tillsats av ympmaterial och närlösning. Genom avrundning blir däremot spädningsfaktorn i detta fall 1. Nästa spädningssteg blir dock  $1,5 * 2$  dvs 3.

Skulle däremot provet redan från början vara utspätt exempelvis 8 ggr skulle detta innebära en spädningsfaktor 1:12 genom tillsats av ymp och närlösning dvs spädningsfaktorn skulle bli 12.

### 3.10 LID-värde (LID = Lowest Ineffective Dilution)

Den lägsta spädningsfaktorn med en uppmätt induktionshastighet  $< 1,5$ . Om enzymtillsats av S9 ger ett annat värde på induktionshastigheten ska den behandling som ger högst utslag gälla.

## 4 Princip

En jämförelse mellan den effekt som provvattnet har på induktionshastigheten av umuC, i förhållande till den spontana aktiviteten hos umuC, utgör ett mått på provets genotoxicitet.



## 5 Testorganism

*Salmonella typhimurium* är en gramnegativ, fakultativt anaerob bakterie från Enterobacteriaceae-familjen. *Salmonella typhimurium* TA 1535 är originalstammen. Testorganismen har en plasmid, pSK1002, med en umuC-lacZ-gen samt en gen för ampicillinresistens. Beteckningen på denna *Salmonella*-stam är "TA1535/pSK1002". Till följd av sin ampicillinresistens är den lätt att detektera.

## 6 Lagringskultur, beredning och lagring

*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 lagras i 150 µl näringslösning med 10% dimetylsulfoxid (DMSO) i 2 ml ampuller vid en temperatur ej överstigande -80°C. Vid beredning av 12h-kultur används endast en ampull.

## 7 Reagens

Kemikalier skall då så är möjligt vara av högsta renhetsgrad och betecknade "pro analysi".

Alla lösningar skall beredas med destillerat vatten av mycket hög reningsgrad.

### 7.1 Saltsyra, c = 1 mol/l

### 7.2 Natriumhydroxid, c = 1 mol/l

### 7.3 Dimetylsulfoxid (DMSO)

### 7.4 Näringslösning (TGA-lösning: trypton, glykos, ampicillin)

10 g trypton, 5 g natriumklorid (NaCl) och 11,9 g HEPES löst i dest. vatten, pH 7,0 ± 0,2, fyll till 980 ml och autoklavera 20 min vid 121°C. Lös 2 g D(+)-glykos (vattenfri) i 20 ml dest. vatten och autoklavera separat. Efter autoklavering blandas de båda lösningarna. Då näringslösningen svalnat till < 60°C tillsättes 50 mg ampicillin under sterila förhållanden. (Ampicillinet löses i 5 ml dest. vatten och tillsättes medelst en spruta utrustad med ett sterilt filter). Om lösningen ej ska användas samma dag kan den lagras i portioner vid -20°C i upp till 4 veckor.

### 7.5 Koncentrerad näringslösning (10 \* TGA):

(kan lagras i 14 dagar vid + 4°C)

**7.5.1 För inkubering utan S9 (-TGA)**

Lös 10 g trypton, 5 g natriumklorid (NaCl) och 11,9 g HEPES i 80 ml dest. vatten. Justera pH till  $7,0 \pm 0,2$ . Lös 2 g D(+)-glykos (vattenfri) i 20 ml dest. vatten. Autoklavera båda lösningarna separat i 20 min vid  $121^\circ\text{C}$ . Blanda lösningarna. Efter avsvälning till  $<60^\circ\text{C}$  tillsättes 50 mg ampicillin under sterila förhållanden (se punkt 7.4).

**7.5.2 För inkubering med S9 (+TGA)**

Lös 10 g trypton, 5 g natriumklorid (NaCl), 2,46 g kaliumklorid (KCl), 1,63 g magnesiumklorid hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) och 11,9 g HEPES i 80 ml dest. vatten. Justera pH till  $7,0 \pm 0,2$

Lös 2 g D(+)-glykos (vattenfri) i 20 ml dest. vatten.

Autoklavera båda lösningarna separat i 20 min vid  $121^\circ\text{C}$ . Blanda lösningarna. Efter avsvälning tillsättes 50 mg ampicillin under sterila förhållanden (se punkt 7.4).

**7.6 B-buffert (cell-lysering och reaktionsbuffert):**

Lös 20,18 g dinatriumvätefosfat dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), 5,5 g natriumdivätefosfat monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 0,75 g kaliumklorid (KCl), 0,25 g magnesiumsulfat heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) i dest. vatten. Justera pH till  $7,0 \pm 0,2$ . Tillsätt därefter 1,0 g "sodiumdodecylsulphate" (SDS) och fyll upp till 1 l. Före användning tillsättes 0,27 ml 2-merkaptoetanol till 100 ml B-buffert och blandas väl.

**7.7 Fosfatbuffert:**

Lös 1,086 g dinatriumvätefosfat dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,538 g natriumdivätefosfat monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), i 100 ml dest. vatten.

Ställ om nödvändigt pH till  $7,0 \pm 0,2$ . Autoklavera lösningen vid  $121^\circ\text{C}$ .

**7.8 Stoppreagens**

Lös 105,99 g natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) i vatten och späd till 1000 ml.

**7.9 o-nitrofenol-  $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG)-lösning**

Lös 45 mg ONPG i 10 ml fosfatbuffert (se 6.7). På grund av ONPG-lösningens instabilitet måste lösningen beredas kort (ej mer än 2h) före användandet. Lösningen förvaras mörkt.

**7.10 S9-fraktion**

(inducerad med Aroklor 1254 och med ett proteinhaltsminimum på 34 mg protein / ml.)

Den nedfrysta S9-fraktionen tinas sakta förvarad i krossis på analysdagen. Före iblandningen i förkulturen skakas dess behållare något. S9-fraktionen lagras vid minst -80°C.

**7.11 Co-faktorlösning**

Bered lösningen på analysdagen och förvara den på is till dess den används.

Lös 70 mg NADP (natriumsalt) och 76 mg glykos-6-fosfat (dinatriumsalt) i 5ml 10 \* TGA (se 7.5.2)

**7.12 Referenssubstanser i dimetylsulfoxid (DMSO)****7.12.1 Utan S9**

Lös 5 mg 4-nitroquinolin-1-oxid (4-NQO) i 5 ml DMSO (kan frysas i små portioner vid -20°C) och justera till en koncentration på 500 µg 4-NQO / l från det frysta koncentratet med en 30% vattenlösning av DMSO.

**7.12.2 Med S9**

Lös 5 mg aminoantracen (2-AA) i 5 ml DMSO (fryses på samma sätt som 4-NQO) och justera till 2 mg 2-AA / l från det frysta koncentratet med en 30% vattenlösning av DMSO.

**Notera att lösningar 7.6 – 7.8 kan förvaras mörkt i rumstemperatur i upp till fyra veckor.**

## **8 Materiallista**

- 8.1 mikrotiterplattläsare**
- 8.2 inkubator**  
för +28°C och +37°C
- 8.3 autoklav**
- 8.4 centrifug**
- 8.5 pH-mätare**
- 8.6 förvaringskärl av glas**  
helst mörkfärgade annars täckta med folie för mörkläggning,  
250 och 500 ml
- 8.7 automatpipetter:**  
2-10 µl, 0,5-10 µl, 5-40 µl, 40-200 µl, 200-1000 µl
- 8.8 automatpipetter "multichannel":**  
5-50 µl, 50-300 µl
- 8.9 plastvannor**  
till "multichannel"-pipetter
- 8.10 mätglas**  
100 ml
- 8.11 mätkolvar**  
100 ml
- 8.12 mätkolvar**  
3 st 1000 ml
- 8.13 E-kolv**  
2000 ml

- 8.14 **E-kolvar**  
250 ml
- 8.15 **bägare**  
av olika storlek
- 8.16 **plastspruta**  
5 ml (för ampicillintillsats)
- 8.17 **sterilfilter**  
till plastspruta
- 8.18 **spetsar**  
till automatpipetter
- 8.19 **mikrotiterplattor**
- 8.20 **"platesealers"**  
till mikrotiterplattor
- 8.21 **kryror med skruvlock**  
2 ml (för lagring av bakterier)
- 8.22 **Eppendorffrör**  
bl.a.för lagring av referenssubstanser
- 8.23 **plaströr med lock**  
5 ml (till beredning av referenslösning från koncentrat)  
10 ml (till beredning av ONPG-lösning samt S9-lösning)  
50 ml (till lagring av frusen TGA-lösning samt beredning  
av fosfatbuffer)
- 8.24 **autoklaverbara ställ till pipettspetsar**
- 8.25 **aluminiumfolie**
- 8.26 **bomull och "tube gas"**  
för tillverkning av proppar till E-kolvar

**8.27 ev hårtork eller liknande**

för avlägsnande av luftbubblor på ytan av prover i mikrotiterplattan. OBS!! Ej för stark luftström!!

**9 Preparering och konservering av prover**

Alla vattenprover skall analyseras så snart som möjligt efter provtagning. Om omedelbar analys ej är möjlig skall provet lagras vid en temperatur understigande +4°C. För en längre tids förvaring krävs djupfrysning. Vad gäller behandling såsom ex. centrifugering och filtrering är det viktigt att förstå risken för vissa förluster av genotoxiska substanser från provet. Provernas pH ska vara  $7,0 \pm 0,2$ . Ställ pH genom tillsats av saltsyra (se 7.1) eller natriumhydroxid (se 7.2).

**10 Resultatberäkningar**

Upprätta en tabell över:

- A spädningsfaktorn avrundad nedåt till närmaste heltal (högsta koncentrationen i en spädningsserie är spädd 1,5 ggr pga tillsats av bakteriekultur och näringslösning)
- B absorbansvärdet för bakteriernas tillväxt
- C absorbansvärdet för induktionen av umuC (egentligen absorbansvärdet för mängd bildad ortho-nitrofenol, se introduktion)
- D tillväxtfaktor
- E induktionshastigheten

**10.1 Bestämning av tillväxtfaktor och induktionshastighet:**

T = tillväxtfaktor

Abs. = medelvärde av replikatens absorbans

B = blank

P = prov

N = negativ kontroll

I = induktionshastighet

$$T = \frac{\text{Abs. } 600\text{nm P} - \text{Abs. } 600\text{nm B}}{\text{Abs. } 600\text{nm N} - \text{Abs. } 600\text{nm B}}$$

$$I = \frac{1}{T} * \frac{\text{Abs. } 420\text{nm P} - \text{Abs. } 420\text{nm B}}{\text{Abs. } 420\text{nm N} - \text{Abs. } 420\text{nm B}}$$

**10.2 Beräkning av aktiviteten hos  $\beta$ -galaktosidas i relativa enheter(U):**  
(för eventuell jämförelse mellan olika laboratorier samt för att kunna upptäcka eventuellt fel på substrat (ONPG).

$$U(P) = \frac{\text{Abs. 420nm P} - \text{Abs. 420nm B}}{\text{Abs. 600nm P} - \text{Abs. 600nm B}}$$

Värdet för de negativa kontrollerna (U (N)) kan beräknas på likadant vis. Likaså kan värdet för de positiva kontrollerna beräknas vilka dock relateras till negativa kontroller innehållande lösningsmedel i stället för till blanker.

**10.3 Bestämning av LID-värde (LID = lowest ineffective dilution):**  
LID-värdet är den lägsta utspädningsfaktor som vid givna testbetingelser ger en induktionshastighet understigande 1,5.

**10.4 Kriterium för testens validitet:**

Testen anses godkänd om referenslösningarna (positiva kontroller) uppnår en induktionshastighet på minst 2 under givna testbetingelser.

Testresultat med en tillväxtfaktor vars värde understiger 0.5 kan ej utvärderas.

Minsta värde för tillväxtfaktor hos negativa kontroller på platta B är 140-280 FNU.

**10.5 Testrapportens innehåll:**

- A Identifikation av testmaterialet
- B Behandling av prover såsom:  
pH-justering, centrifugering, homogenisering o.s.v.
- C Namn på testorganism
- D Testförhållanden samt testdatum
- E Resultatframställning innehållande:

- utspädningsfaktor
- medelvärden för absorbans vid 600 resp. 420 nm,
- medelvärde för tillväxtfaktor
- medelvärde för induktionshastighet
- medelvärdets medelfel (standard error (SE))
- LID-värde

Dessutom bör det noteras om speciella testomständigheter föreligger såsom avvikelser från gängse testmetodik eller andra förhållanden vad gäller turbiditet, löslighet, utfällning etc.



## Uppodling av bakterier på agarplattor

### **I Agarlösningens innehåll:**

- a) 100 ml TGA-lösning (98 ml trypton-NaCl-HEPES-lösning + 2 ml glykoslösning)
- b) 1,4g agar
- c) 10 mg ampicillin

### **II Beredning av agarlösning**

#### **OBS! Arbeta hela tiden sterilt!**

Vid beredning av TGA-lösning sättes 98 ml av trypton-NaCl-Hepes-lösningen till ett särskilt kärl vari 1,4g agar löses. Efter autoklavering överföres 2 ml av glukoslösningen till agarlösningen och iblandas väl.

När lösningen svalnat till  $< 60^{\circ}\text{C}$  tillsättes 10 mg ampicillin sterilt. Ampicillinet löses i 5 ml dest.vatten och tillsättes med hjälp av spruta kopplad till ett sterilfilter.

Innan lösningen svalnat för mycket hålles den upp på cellodlingsplattor så att ytan täcks helt.

Plattorna förvaras svalt, gärna inneslutna i plastpåse eller igentejpade tills de ska användas.

Vid odling göres ett utstryk av ca 0,1 ml från "overnight culture" till respektive odlingsplatta.

Plattorna inkuberas därefter 1-2 dygn vid  $37^{\circ}\text{C}$ . Om inkubator med luftdrag användes måste plattorna förslutas väl med tejp eller förvaras i väl tillsluten plastpåse för att undvika uttorkning.

### **III Lagring av odlade bakterier**

De framodlade bakterierna fryses ner i en TGA-lösning med 10% dimetylsulfoxid.

Överför 1 ml DMSO till sterilt rör. Späd därefter med TGA-lösning till 10 ml och blanda väl.

Applicera därefter 150  $\mu\text{l}$  av denna lösning till ett antal 2 ml kryorör.

Bakterierna överföres därefter från odlingsplattorna med platinös till respektive kryorör. Blanda väl med platinösen. Frys därefter ner de förslutna rören till  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**IV Beredning av formazin ( $C_2H_4N_2$ )-stamlösning**

( för upprättande av standardkurva att användas vid bestämning av FNU)

**Lösning A:**

10g hexametylentetramin ( $C_6H_{12}N_4$ ) löses och spädes upp till 100 ml med destillerat vatten.

**Lösning B:**

1g hydrazinsulfat ( $N_2H_6SO_4$ ) löses och spädes till 100 ml med destillerat vatten.

**Varning!** hydrazinsulfat är giftigt och misstänks vara carcinogent.

**Suspension C:**

5 ml av lösning A blandas med 5 ml av lösning B.

Inkubera suspension C vid  $(25 \pm 3)^\circ C$  i 24 h. Späd därefter till 100 ml med destillerat vatten.

Denna suspension motsvarar 400 Formazine Attenuation Units (FAU) eller Formazine Nephelometric Units (FNU).

Suspensionen förvaras i mörker vid  $(25 \pm 3)^\circ C$  och är då hållbar i ca 4 veckor.

Vid upprättande av standardkurva göres en spädningsserie där högsta koncentration motsvarar 200 FNU eftersom standardkurvan inte är linjär vid högre koncentrationer. Suspensionerna avläses vid 605 nm (alternativt 630 nm).

## Arbetsgång vid analys

**Observera!** Allt material som kommer i kontakt med testbakterien samt alla lösningar innehållande bakterier måste autoklaveras innan de får slängas eller eventuellt användas på nytt. Dessutom måste alla arbetsytor hållas så rena som möjligt under arbetets gång samt avtorkas med > 70% sprit vid varje arbetsdags slut.

### **I Beredning av "overnight culture"**

(utföres sent på eftermiddagen dagen före analys)

- a) Fyll på **20 ml TGA-lösning** i en steril E-kolv och förslut med steril bomullspropp.
- b) Tina en ampull med frusen bakteriekultur.
- c) Överför bakteriekulturen till sterilt Eppendorffrör och centrifugera i **10 min** vid **2000 g**.
- d) Dekantera supernatanten.
- e) Resuspendera pelleten (ej synlig för ögat) i **1 ml TGA-lösning** genom att pipettera bottensatsen ut och in upprepade gånger genom pipettspetsen.
- f) Överför **0,5 ml av bakteriesuspensionen** till TGA-lösningen i E-kolven.
- g) Inkubera på skak vid **37°C** över natten (dock ej längre än 12 h, använd en timer).

## II Beredning av "förkultur"

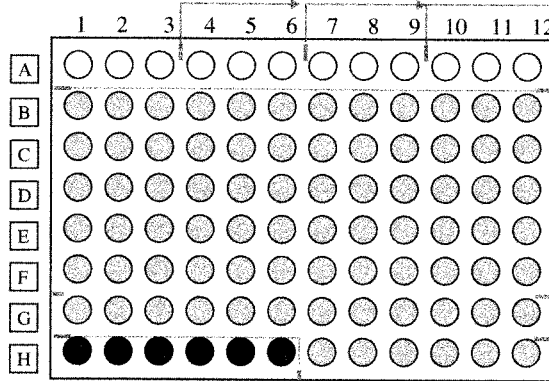
(utföres på analysdagens morgon)

- a) Kontrollera att 12h-kulturen erhåller ett FNU-värde  $\geq 400$  genom spektrofotometrisk avläsning vid **605 nm** (alternativt 630 nm) och genom att avläsa motsvarande FNU-värde på upprättad standardkurva.
- b) Späd 12h-kulturen 1:10 med färsk TGA-lösning, (Åtgång till en mikrotiterplatta: **5 ml bakteriekultur + 45 ml TGA-lösning**).
- c) Fortsätt inkuberingen på skak vid 37°C i ca **1,5 h** eller tills **FNU-värdet är 340-350** varvid bakterierna befinner sig i den exponentiella tillväxtfasen. Under tiden prepareras mikrotiterplattorna enligt anvisning i metoden.

### Litteratur:

1. Nakamura, S.I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., Sugimoto, K.: SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002: examination with 152 chemicals. *Mutation Res.* 192 (1987) 239-246
2. Oda, Y., Nakamura, S.I., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H.: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 147 (1985) 219-229
3. Whong, W-Z., Wen, Y-F., Steward, J., Ong, T.: Validation of the SOS/Umu test with mutagenic complex mixtures. *Mutation Res.* 175 (1986) 139-144
4. Reifferscheid, G., Heil, J., Zahn, R.K.: Die Erfassung von Genotoxinen in Wasserproben mit dem umu-Mikrotest. Detection of genotoxins in water samples using the umu-Microtest. *Vom Wasser* 76 (1991) 153-166.
5. Reifferscheid, G., Heil, J., Zahn, R.K.: A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Res.* 253 (1991) 215-222.

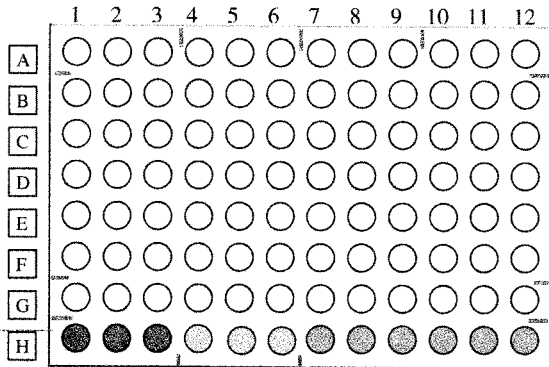
**Preparering av mikrotiterplatta A utan S9  
för 4 st prover med 6 st spädningssteg**



Markera gärna viktiga avgränsningar samt ev resp prov nr på plattan med en spritpenna.

**1. Tillsätt 180 µl Aq bidest till cellerna: B-G, 1-12 samt H, 7-12**

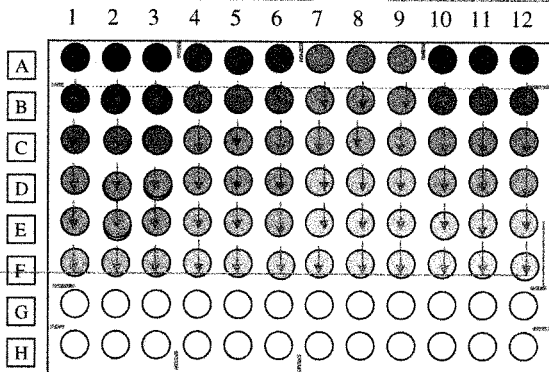
**2. Tillsätt 153 µl Aq bidest till cellerna: H, 1-6**



**5. Tillsätt 70 µl TGA-lösning till cellerna: H, 7-12**

**3. Tillsätt 27 µl 4-NQO, (500 µg/l i 30% DMSO (2,5 µl konc. => 5ml)) H, 1-3**

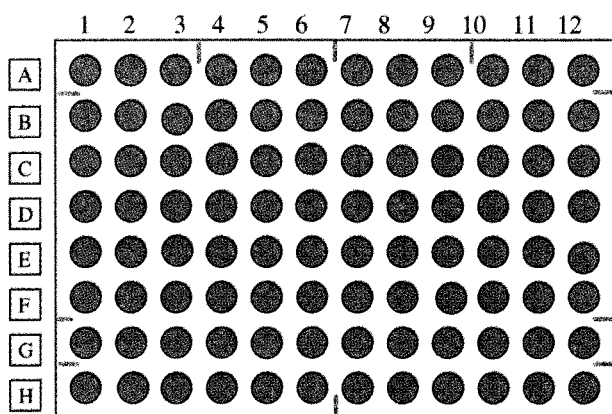
**4. Tillsätt 27 µl 30% DMSO till cellerna: H, 4-6**



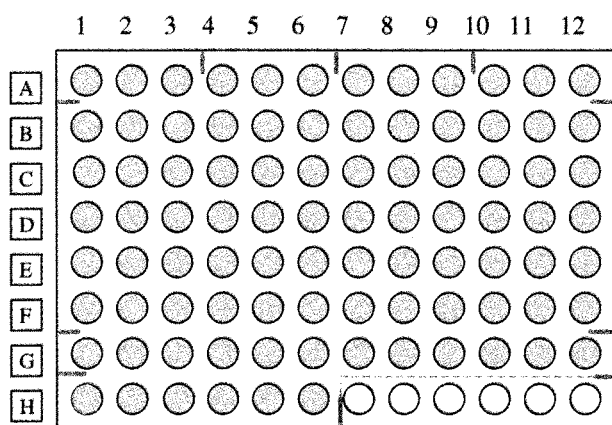
**6. Tillsätt 360 µl prov till cellerna: A, 1-12  
prov nr 1: A, 1-3  
prov nr 2: A, 4-6  
prov nr 3: A, 7-9  
prov nr 4: A, 10-12**

**7. En spädningsserie fås genom att föra 180 µl från cellerna: A, 1-12 till cellerna: B, 1-12. Efter blandning genom in- resp utpipettering ett par gånger föres så 180 µl från rad B till cellerna C, 1-12. Förfarandet upprepas nedåt till och med rad F.**

**8. Slutligen bortföres 180 µl från cellerna F, 1-12 och slänges.**



**9.** Tillsätt 20  $\mu$ l konc. -TGA-lösning till samtliga celler.

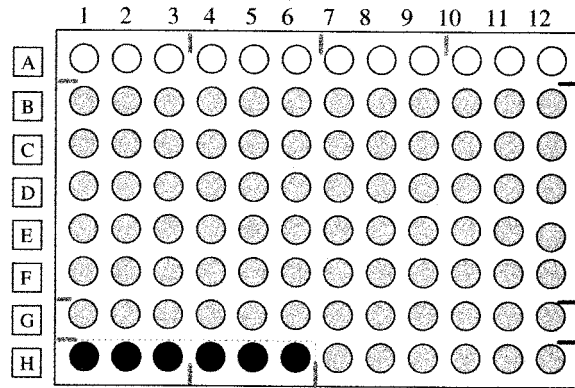


**10.** Kontrollera att bakteriekulturen befinner sig i sin exponentiella tillväxtfas och har nått turbiditeten 340-350 FNU genom avläsning vid 605 (alt. 630 nm) och avsättning mot upprättad standardkurva över FNU. Applicera därefter 70  $\mu$ l av bakteriekulturen till celler A-G, 1-12 samt H, 1-6.

**11.** Täck plattan med "plate sealer" samt inkubera i 2 h vid 37°C på skak med frekvens 125-150 rpm. Ha gärna plattan lutad ca 45° mot underlaget för att undvika att bakterierna sedimenterar på botten.

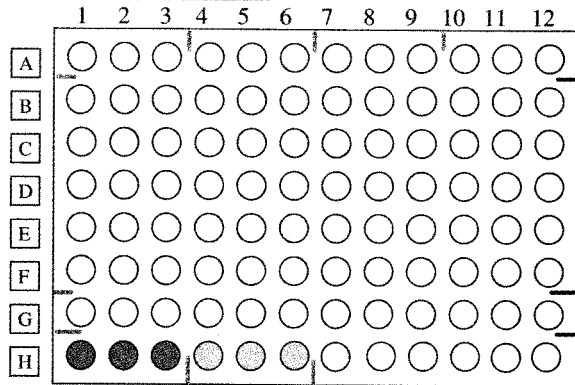
**Preparering av mikrotiterplatta A med S9  
för 4 st prover med 6 st spänningssteg**

INNAN DU Börjar, SÄTT FÖRST S9 PÅ KROSSIS FÖR TINING  
OCH BERED CO-FAKTORLÖSNING ENLIGT PUNKT 6.11 !!!



**1. Tillsätt 180 µl Aq bidest  
till cellerna : B-G, 1-12  
samt H, 7-12**

**2. Tillsätt 153 µl Aq bidest  
till cellerna H, 1-6**



**3. Tillsätt 27 µl 2-AA  
2 mg/l i 30% DMSO  
(10 µl fruset koncentrat  
2-AA => 5 ml 30% DMSO)  
till cellerna H, 1-3**

**4. Tillsätt 27 µl 30% DMSO till  
cellerna: H, 4-6**

**5. Tillsätt proverna såsom under punkt 6-8 i metodbeskrivning "utan S9" !**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

**6. Tillsätt 20µl konc.+TGA-lösn. med co-faktor till samtliga celler**

**7. Tillsätt 300µl tinad S9 till 10 ml förkultur vilken ska ha ett FNU-värde på 340-350. (Kulturen spädes först 1:2 och ska då erhålla ett FNU-värde på 170-175)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

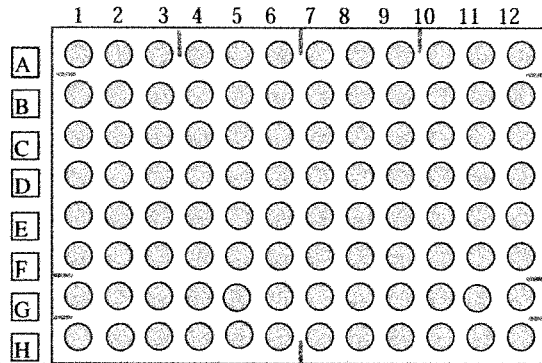
**8. Tillsätt 70µl förkultur med S9 till celler: A-G, 1-12 samt H, 1-6**

**9. Lös 45µl S9 i 1,5 ml TGA-lösning och sätt 70µl av detta till celler: H.7-12**

**10. Plattan inkuberas nu på samma sätt som plattan utan S9 i 2h vid 37° C**

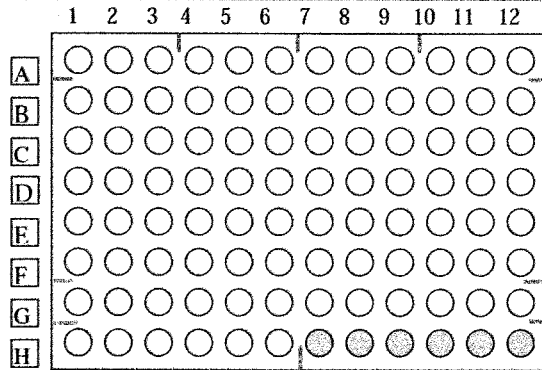


**B-platta**  
**Regenerationssteg**  
 (samma för med och utan S9)



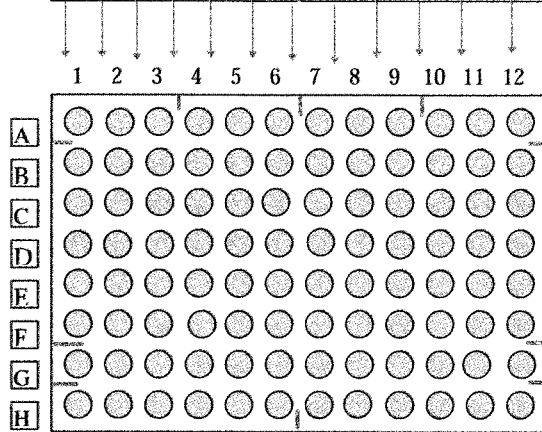
platta **B**  
 1. Tillsätt **270µl**  
**TGA-lösning** till  
 samtliga celler

2. Förvärm plattan vid **37°C** ca **10 min** innan nästa steg (använd "plate sealer" för att undvika avdunstning)



Platta **A**

3. Överför **30µl** från **alla celler i platta A till platta B** och blanda först ett par ggr in och ut genom pipettspetsen. Tänk på att arbeta från lägre till högre konc. och undvik kontamination mellan prover genom byte av spetsar. **Glöm inte byta spetsar till celler H, 7-12** som inte får kontamineras med bakterier!!



Platta **B**

4. Plattan inkuberas nu på samma sätt som tidigare i **2h** vid **37° C**.

**C-platta**  
(samma för med och utan S9)

**1. Ca 45 min före utgången inkuberingstid för B-plattan beredes ONPG-lösning samt B-buffert**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

**A. ONPG-lösning: 45 mg ONPG i 10 ml fosfatbuffert. Blanda mycket väl, täck med folie och låt stå 30 min vid 35°C.**

**B. B-bufferttillsats: 54 µl 2-merkaptoetanol till 20 ml B-buffert.**

Platta  
**C**

**2. Tillsätt 120µl B-buffert (med 2-merkaptoetanol) till samtliga celler på C-plattan. Plattan inkuberas därefter övertäckt ca 10 min vid 28° C. Under tiden avläses celldensiteten från B-plattan**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

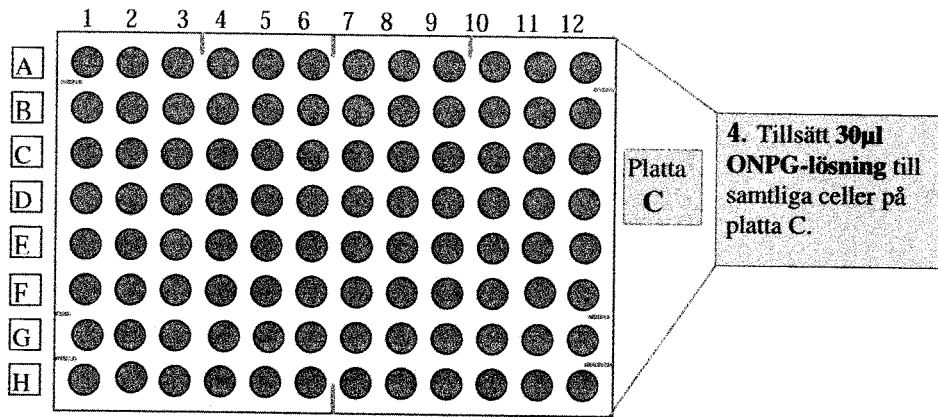
Platta  
**B**

**3. För över 30 µl från samtliga celler på B-platta till samtliga celler på C-platta. Glöm ej byta spets om det är nödvändigt pga kontaminationsrisk, speciellt viktigt vad gäller celler H, 7-12 !!!**

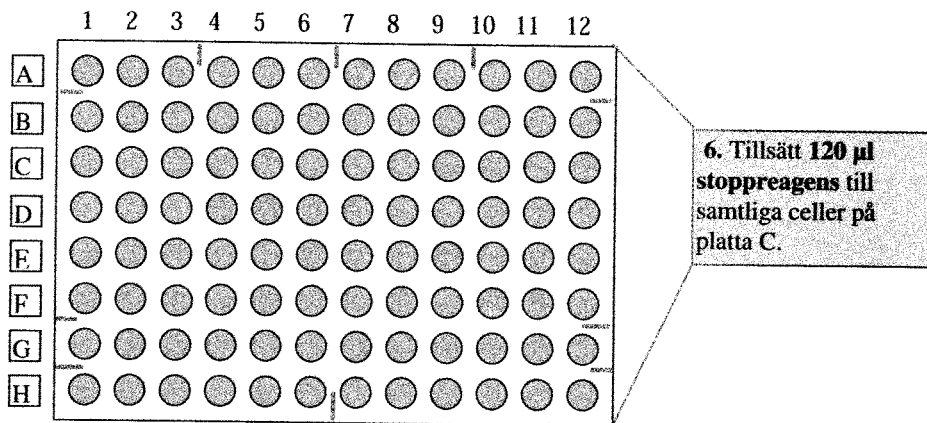
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○

Platta  
**C**

**UTFÖR NU OMEDELBART PUNKT 4! =>**



5. Täck med "plate sealer" och inkubera i 30 min, 28° C



7. Avlägsna eventuella luftbubblor med hjälp av en svag kalluftström och avläs omedelbart plattan vid 420 nm.

**Alternativ plattlayout  
(12 st prover med endast ett spädningssteg)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
B	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
C	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
D	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
E	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
F	○	○	○	●	●	●	○	○	○	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Ersätt A-plattans layout  
vad gäller brunnar för  
Aq bidest. samt prover  
med nedanstående:

Tillsätt 180 µl Aq  
bidest. till mörkt markerade  
brunnar.

Tillsätt 153 µl Aq bidest. till ljusst gråmarkerade brunnar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
B	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
C	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
D	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
E	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
F	●	●	●	○	○	○	●	●	●	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Tillsätt 360 µl prov till  
celler A-F, 1-3 samt A-F, 7-  
9 prov nr 1: A, 1-3  
prov nr 2: B, 1-3  
prov nr 3: C, 1-3  
prov nr 4: D, 1-3  
prov nr 5: E, 1-3  
prov nr 6: F, 1-3  
prov nr 7: A, 7-9  
prov nr 8: B, 7-9  
prov nr 9: C, 7-9  
prov nr 10: D, 7-9  
prov nr 11: E, 7-9  
prov nr 12: F, 7-9

Späd genom att 180 µl från celler A-F, 1-3 förs till celler A-F, 4-6  
Efter ordentlig blandning bortföres därefter 180 µl från celler A-F,  
4-6 och slänges. Byt spetsar då nödvändigt för att undvika  
kontamination mellan proverna.  
En likadan spädning göres därefter med prover A-F, 7-9 till celler  
A-F, 10-12

## RAPPORT 4947


Metodik för inventering av

# *Förorenade områden*

Analys- och testmetoder

NATURVÅRDSVERKET HAR TAGIT fram en inventerings- metodik, den s.k. MIFO-modellen, för inventering av områden som förorenats av bland annat industriell verksamhet, Naturvårdsverkets Rapport 4918. I metodiken ingår analys och testprogram för mark, grundvatten, ytvatten och sediment. För att utarbeta dessa program har det varit nödvändigt att utveckla delvis nya metoder. Dessa analys- och testmetoder beskrivs i denna publikation som utgör en separat del av inventeringsmetodiken.

Rapporten om inventering av förorenade områden ingår i Naturvårdsverkets nya serie Bedömningsgrunder för miljö kvalitet. Serien har utvecklats för användning på länsstyrelsen, i kommuner och på andra myndigheter, men vänder sig till alla med ansvar och intresse för en god miljö kvalitet.

ISBN 91-620-4947-X 

ISSN 0282-7298

NATURVÅRDSVERKET FÖRLAG