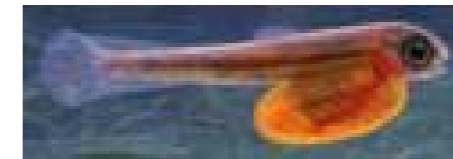


PER LEFFLER, DANIEL RAGNVALDSSON, JAN BYLUND, LARS HÄGGLUND,
HÅKAN WINGFORS, EVA BRÄNNÄS, RUNE BERGLIND



FOI är en huvudsakligen uppdragsfinansierad myndighet under Försvarsdepartementet. Kärnverksamheten är forskning, metod- och teknikutveckling till nytta för försvar och säkerhet. Organisationen har cirka 1250 anställda varav ungefär 900 är forskare. Detta gör organisationen till Sveriges största forskningsinstitut. FOI ger kunderna tillgång till ledande expertis inom ett stort antal tillämpningsområden såsom säkerhetspolitiska studier och analyser inom försvar och säkerhet, bedömning av olika typer av hot, system för ledning och hantering av kriser, skydd mot och hantering av farliga ämnen, IT-säkerhet och nya sensorers möjligheter.

Per Leffler, Daniel Ragnvaldsson, Jan Bylund, Lars Hägglund, Håkan Wingfors,
Eva Brännäs, Rune Berglind

TNT-föroreningspektrum och dess toxikologiska betydelse i ett vattensystem

Utgivare FOI - Totalförsvarets forskningsinstitut NBC-skydd 901 82 Umeå	Rapportnummer, ISRN FOI-R--1904--SE	Klassificering Användarrapport
	Forskningsområde 3. Skydd mot NBC och andra farliga ämnen	
	Månad, år December 2006	Projektnummer E46099
	Delområde 35 Miljöfrågor	
	Delområde 2	
Författare/redaktör Per Leffler Daniel Ragnvaldsson Jan Bylund Lars Hägglund Håkan Wingfors Eva Brännäs	Projektledare Åsa Scott Andersson	Godkänd av Anders Norqvist
	Uppdragsgivare/kundbeteckning Försvarsmakten	
	Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig Per Leffler	
	Rapportens titel TNT-föroreningspektrum och dess toxikologiska betydelse i ett vattensystem	
Sammanfattning <p>Trinitrotoluen (TNT) har använts som explosivämne i stor omfattning. Ett TNT-kontaminerat vattensystem i Sverige undersöktes. Provtagning genomfördes i sediment och vatten. Kemisk screening för TNT och dess nedbrytningsprodukter 2-amino,4,6-DNT och 4-amino,2,6-DNT, genomfördes med GC-ECD teknik. TNT-halter i bäcksediment låg i intervallet 0,05 till ca 230 g/kg, och 6-10 g/kg (TNT/torrsvikt) i dammsediment. Detta indikerade att TNT till stor del kristalliserat och bundit till sedimentpartiklar i bäckens nedre lopp nära inflödet till dammen. Dammvatten innehöll 3 mg TNT/L. Toxikologiska analyser visade tydlig respons i alla modellsystem. Cellkulturtillväxt påverkades vid 50 % extraktillsats från alla sedimentprovpunkter. Vattenloppa visade akut toxicitet vid 6 % extraktillsats (ca 10 mg/L), vilket speglade toxiska effekter även på organnivå. En ökad frekvens av döda laxyngel registrerades redan vid 5 gångers utspädning av dammvatten (0,4 mg TNT/L). Ett dosberoende upptag i intervallet 0,016 – 2 mg/L, och tidsberoende upptag vid vattenkoncentrationen 0,08 mg TNT/L, av TNT och metaboliter i fiskyngel kunde dokumenteras. Kondition och mognad hos yngel i övrigt studerades inte och kan därför inte uteslutas ens vid exponering för 125 gångers utspädning av dammvatten (0,016 mg TNT/L).</p>		
Nyckelord TNT, DNT, sediment, vatten, toxicitet, cellkultur, vattenloppa, laxyngel		
Övriga bibliografiska uppgifter	Språk Svenska	
ISSN 1650-1942	Antal sidor: 27 s.	
Distribution enligt missiv	Pris: Enligt prislista	

Issuing organization FOI – Swedish Defence Research Agency NBC Defence SE-901 82 Umeå	Report number, ISRN FOI-R--1904--SE	Report type User report
	Programme Areas 3. NBC Defence and other hazardous substances	
	Month year December 2006	Project no. E46099
	Subcategories 35 Environmental Studies	
	Subcategories 2	
Author/s (editor/s) Per Leffler Daniel Ragnvaldsson Jan Bylund Lars Hägglund Håkan Wingfors Eva Brännäs	Project manager Åsa Scott Andersson	Approved by Anders Norqvist
	Sponsoring agency The Swedish Armed Forces	Scientifically and technically responsible Per Leffler
	Report title (In translation) TNT pollution spectrum and its toxicological importance in a water system	
	Abstract <p>Trinitrotoluene (TNT) has been extensively used as an explosive. A water system in Sweden was investigated due to heavy TNT contamination. Sediment and water samples were taken along a creek all the way to a downstream pond.</p> <p>Screening for TNT and degradation products such as 2-amino,4,6-DNT and 4-amino,2,6-DNT, was performed using GC-ECD analysis. TNT concentrations varied between 0.05g/kg up to ~230g/kg (dry weight) in creek sediment, whereas the pond sediment contained ~ 6-10 g/kg TNT.</p> <p>This indicated a considerable precipitation of TNT in the creek and close to the inflow of the pond. The pond water contained 3 mg/L of TNT. Toxicological analyses revealed clear responses in all toxicological models used. Cell cultures were affected at a 50 % addition of extract at all sediment sampling points. Water fleas showed acute effects at a 6 % addition of water extract (approx. 10 mg/L). Increased mortality in salmon alevins already occurred at 5 times dilution (≈ 0.4 mg TNT/L) of pond water. A dose-dependent uptake in the interval 0.016-2 mg TNT/L and a time- dependent uptake at 0.08 mg TNT/L of TNT and its metabolites were documented. However, the disturbed physiological condition and delayed development in alevins were not objects of study and could not be excluded even at 125 times diluted pond water (0.016 mg TNT/L).</p>	
Keywords TNT, DNT, sediment, water, toxicity, cell culture, water flea, salmon alevin		
Further bibliographic information	Language Swedish	
ISSN 1650-1942	Pages 27 p.	
Price acc. to pricelist		

Innehåll

Ordlista.....	6
1 Introduktion.....	7
Bakgrund.....	7
TNT-fördelningsmodell i vattenrecipient	7
Syfte	8
2 Metod	8
Provtagning.....	8
Kemisk analys.....	9
Toxikologisk analys	10
Dammvatten testat på fisk.....	10
Dammvatten och extrakt av sediment/jord testat på mindre vattenloppa och cellkultur	11
Tvättat sediment testat på stor vattenloppa	12
3 Resultat	12
Kemisk analys.....	12
Toxikologisk analys	15
4 Diskussion.....	22
Slutsatser	25
Tack.....	25
Referenser	26

Ordlista

TNT	trinitrotoluen, den explosiva substansen i 'trotyl'
2aDNT	2-amino dinitrotoluen; metabolit av TNT med en nitrogrupp ändrad till amingrupp
4aDNT	4-amino dinitrotoluen; metabolit av TNT med en nitrogrupp ändrad till amingrupp
PLE	pressurised liquid extraction; trycksatt vätskeextraktion
GC ECD	gas chromatografy electron capture detection
GC-MS	gas chromatografy mass spectrometry
Ligand	kemisk substans som kan binda till andra ämnen
DOC	dissolved organic matter; vattenlösliga organiska ämnen
Daphnia magna	stor vattenloppa
Ceriodaphnia	liten vattenloppa
MEM	minimal essential medium
Förgiftningsrespons	andel förgiftade t.ex. djur

1 Introduktion

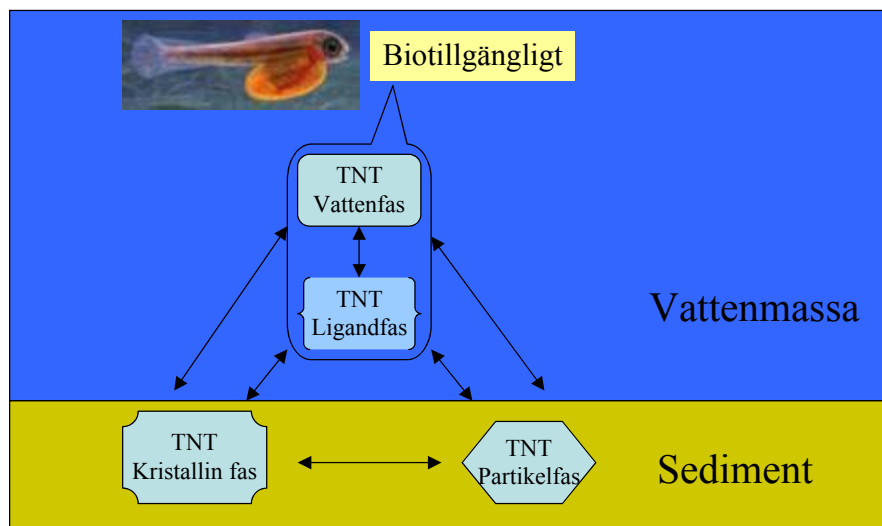
Bakgrund

Trinitrotoluen (TNT) har fått en omfattande användning som explosivämne sedan introduktionen i 1800-talets slut. TNT har visats utgöra en fara vid utsläpp i vattenmiljön och litteraturuppgifter finns som visar på föroreningsnivåer i mark/sediment i Europa och USA på upptill 600-700 g/kg torrsvikt (Hovatter et al, 1997).

Tidigare uppdrag inom ett sådant område i Sverige har redovisats i tre rapporter - en översiktlig miljöriskklassificering (Liljedahl et al 2001), en fördjupad (Qvarfort et al, 2002) samt en kompletterande studie (Qvarfort et al, 2003). Dessa rapporter följde det s.k. MIFO-konceptet, miljöklassificering av förorenade områden (SNV, 1999). Ett av de särskilt förorenade objekten enligt dessa studier var en s.k. branddamm. De försök som gjorts att sänka branddammens TNT-halter genom luftbubbling har visats otillräckliga. Den höga TNT-belastningen inom området och dess TNT-mättade sediment, har öppnat en möjlighet att studera effekter på biota. Försvarsmakten (FM) initierade därför ytterligare studier med branddammen som modellområde. Relevansen för FM ligger i att få klarlagt huruvida ett ”värsta fall” av TNT-läckage till sediment, t.ex. från dumpad ammunition, kan få toxikologisk betydelse.

TNT-fördelningsmodell i vattenrecipient

Den bild som finns av föroreningsprocessen kan beskrivas enligt följande. Fyllning och tömning av TNT i granater har lett till spill som sköljts ut med vatten ur fabriksanläggningen via ett rörsystem ut till recipienten. Ett vattendrag mynnande i en branddamm har använts som ett fång för TNT-läckage. TNT är lösligt i vatten till en viss grad, men över den nivån binds TNT till partiklar i vattnet eller kristalliserar till fällningar i sediment. Flera dynamiska jämvikter inställer sig över tiden mellan följande förekomstformer: *kristallin fas – partikelfas – ligandfas – löst i vattenfas* (se figur 1).



Figur 1. Schematisk fördelningsmodell för TNT i en föroreningsrecipient. Biotillgänglig fraktion av TNT och nedbrytningsprodukter är den andel som faktiskt tas upp av aktuell organism.

Vattenfasens TNT-halt når som högst cirka 130 mg/L vatten (Ryon, 1987), medan den kristallina fasen kan ge extremt höga koncentrationer 600-700 g/kg torrsvikt sediment (Hovatter et al, 1997). Partikelfasens aktuella bindningskapacitet är oftast okänd och beror av lokala förhållanden. En transport av TNT i vattensystem är möjlig genom TNT löst i vattenfasen, TNT adsorberad till vattenlösliga ligander s.k. DOC (dissolved organic matter; t.ex. humusämnen), samt TNT bundet till partiklar (Eriksson et al, 2001). I turbulent vatten kan därför ske en omlagring inom vattensystemet. Teoretiskt skulle all TNT kunna ackumuleras i branddammen efter lång tid utan nya tillskott från emissionsröret samt utan bräddavlopp till nedströms liggande dike och en större recipient.

Föroreningsgraden av ursprungssubstansen TNT kan karakteriseras med tillgänglig kemisk metodik men den ekologiska betydelsen av nedbrytningsprodukter och övriga komponenter i sprängämnet är svår att klargöra utan kompletterande toxikologisk analys. En provtagningskampanj genomfördes därför på FM's uppdrag i september 2004 och prov togs på vatten och sediment i tillrinningsområdet inom fastigheten. Tagga prover analyserades kemiskt och toxikologiskt enligt metodik som etablerats vid FOI NBC-Skydd och beskrivs under metodkapitlet nedan.

Syfte

En undersökningsdesign uppställdes med följande syften:

1. Toxikologisk analys av effekter på fisk för att svara på frågan om fisk blir påverkad av att vistas i miljöer med hög TNT belastning – dvs. motsvarande områden med stora läckage från ammunition.
2. Toxikologisk analys av effekter i andra testsystem för att kunna slutgiltigt besvara frågan om sediment ”renat” från TNT genom extraktion med vatten vid 150 °C och 10 MPa fortfarande innehåller giftiga komponenter, dvs. sådana som ej kunnat extraheras.
3. Kemisk analys av TNT i sediment, vatten samt i fisk för att svara på frågan hur hårt TNT, dess analoger och nedbrytningsprodukter binder till sediment, om fisk tar upp dessa ämnen och om det sker mikrobiell nedbrytning i dammens extrema miljö.

2 Metod

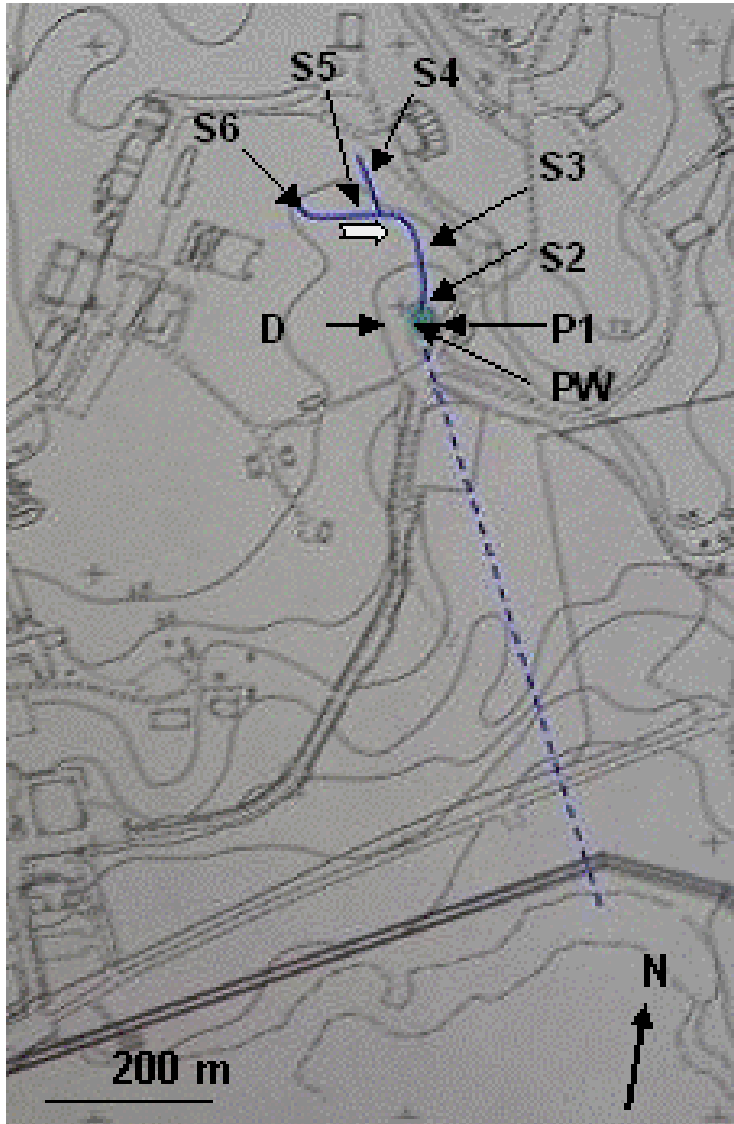
Branddamm med tillrinnings- och avrinningsområden framgår av figur 2. Från dammen togs vattenprov och sedimentprov. För att få rimliga referensvärden togs en serie sedimentprover uppströms i tillrinningsområdet samt i en markyta som bedömdes vara tidvis utsatt för översvämning av smältvatten under vårperioderna.

Provtagning

Från dammen togs vattenprover i 6 flaskor om 5 L. Vattnet pumpades med elektrisk läns pump genom ofärgad polyetenslang som genomspolades ca 10 minuter före provtagning. Vattnet kylförvarades med hjälp av kylgel under transporten till laboratorium.

Provtagning av sediment i dammen erhöles från ett större prov som hämtades från ca 1-2 meters vattendjup med Ekmanhuggare. Ett jämförelseprov togs intill dammen i en torr översvämningssyta.

Provtagning av sediment i vattendraget gjordes uppströms branddammen vid ett antal punkter upp till utsläppspunktens avloppsrör längs med den bäck som leder vattnet mot dammen i den tänkta föroreningsgradienten. Totalt sex sedimentprover (≈ 200 gram med rostfri stålsked) togs från sediment i bäcken precis i vattenlinjen. Proverna placerades i glasbägare med lock och förvarades därefter svalt ($\approx +8$ °C) under transport till kylskåp på laboratorium.



Figur 2.

Provtagningsområde. Provpunkter markerade med förkortningar vilka förklaras nedan. Branddammen indikeras med PW alt P1. Dammens tillflöde började i punkt S6. Frånflödet till större recipient beskriv av streckad linje.

Förklaringar:

PW = dammvattenprov (pond water)

P1 = sediment 1 i dammen (pond)

S2 = Sediment 2 bäcken

S3 = Sediment 3 bäcken

S4 = Sediment 4 bäcken

S5 = Sediment 5 bäcken

S6 = Sediment 6 bäcken

(huvudsaklig utsläppspunkt)

D = torrlagd översvämningssyta (Dry overflow area).

Kemisk analys

Dammvatten filtrerades ($0,45 \mu\text{m}$ (PTFE) Teflon-filter) före kemisk mätning i duplikat genom gaskromatografi (GC) med elektron fångst detektor (ECD) s.k. GC-ECD analys.

En inledande kemisk TNT-analys utfördes enligt metodik framtagen av US EPA (8330 respektive 3535), med mindre modifieringar. Sedimentprover genomgick ultraljudsbehandling med acetonitril, koncentrerades och filtrerades (0,45 µm (PTFE) Teflon-filter) före kemisk mätning i duplikat genom s.k. GC-ECD analys.

En kompletterande kemisk analys gjordes på vattenextrakt av sediment erhållna med trycksatt extraktion (pressurised liquid extraction, PLE). Ett automatiserat instrument för snabb extraktion (≈15 minuter per prov) användes där tryck och temperatur kontrollerades till 150 °C och 10 MPa tryck (Dionex ASE 100). Vattenextrakt av sediment samt dammvattenprov analyserades efter extraktion på fast fas (solid phase extraction, SPE; EN Lichrolut[®] column), följd av eluering i acetonitril. Filtrering (0,45 µm (PTFE) Teflon-filter) gjordes före GC-ECD analys i duplikat.

Vattenprover från exponeringsförsök på laxyngel upparbetades på fastfaskolonner (EN Lichrolut) utan föregående filtrering och extraherades med acetonitril och metanol varefter internstandard tillsattes. Analyserna utfördes med gaskromatograf och masselektiv detektor (GC-MS).

Dammsedimentpartiklar renade med PLE (s.k. 'tvättat sediment') analyserades av certifierat laboratorium (ALControl) parallellt med råsediment. Dessa prover screenades med avseende på andra föroreningar än TNT för att klargöra om sådana kunde uteslutas i riskbedömningen.

Fiskyngel provtogs enligt doserings- och tidschema i exponeringsförsök på laxyngel (se *Toxikologisk analys* nedan). Fiskvävnadsproverna (utan gulesäck) upparbetades genom homogenisering i acetonitril varefter mätning gjordes med GC-ECD vilket medgav identifiering av såväl modersubstans (TNT) och omvandlingsprodukter (2a, 4,6-DNT, 4a,2,6-DNT). Antalet fiskar och deras individuella vikter från dos- och tids-serien varierade stort (medelvärde: 0,10 g, min-max: 0,014-0,204 g). Detta resulterade bl.a. i en stor spridning i detektionsgränser och interferenser. Enligt upparbetningsprotokollet lades två till fyra fiskyngel i ett tarerat eppendorfrör med torkmedel (0,5 g Na₂SO₄). Fiskar i provrör förvarades på en isbädd mellan varje hanteringssteg för att undvika eventuell nedbrytning av TNT. Efter tillsats av två internstandards (3,4-DNT samt 2,4-Cl₂-anilin) samt 1 ml acetonitril som extraktionsmedel homogeniserades provet (Polytron). Efter centrifugering i 15 minuter överfördes supernatanten till glasrör anpassade för gaskromatografens injektionssystem. Proverna analyserades med gaskromatografi kopplat till elektroninfångningsdetektor (GC ECD) i serier med procedurblankar och en kalibreringskurva förberedd från certifierade standardpreparat (Supelco 8330 mix A och B). Provserierna förvarades i frys före och efter analysen som gjordes i rumstemperatur. Uppskattningsvis var proverna uppvärmda i max 15 timmar i samband med analysen.

Toxikologisk analys

För toxikologisk analys av tagna prover användes fyra toxikologiska modellsystem (se figur 3) – laxyngel (*Salmo salar*), mindre vattenloppa (*Ceriodaphnia dubia*), stor vattenloppa (*Daphnia magna*), samt odlad kultur av bindvävceller från mus (L929).

Dammvatten testat på fisk

För *toxikologisk effekt av dammvatten på fisk* användes en utvecklingstoxikologisk modell baserad på laxyngel. Fiskyngel erhöles genom kläckning av ögonpunktmogna

ägg från Norrfors fiskodlingsanstalt enligt standardiserade inkuberingsmetoder vid genomströmmande vatten och +6 °C (Brännäs, muntlig information). Tillstånd från etisk nämnd erhöles 2004-10-29 före försöken.

En spädningsserie tillreddes av autentiskt (dvs. ej syntetiskt) dammvatten med inblandning av kranvatten (Umeå kommun) till följande spädningar av dammvatten (%): 100, 20, 4, 0,8 %. Som kontroll användes kommunalt kranvatten. Vattnet byttes veckovis i exponeringsbägare och kontrollbägare varvid prover togs för kontroll av exponeringskoncentrationernas stabilitet och TNT koncentrationen mättes.

I ett experiment med olika dosering (s.k. dos-respons studie) fördelades slumpmässigt 400 nykläckta yngel på fem olika grupper fördelat på fem stycken litersbägare som replikat. Till exponeringsbägare sattes 10 djur vardera medan kontrollbägare gavs 40 djur vardera. Döda djur noterades under försökets gång och förvarades frysta intill kemisk analys. När mer än 50 % djur bedömdes döda vid en koncentration avslutades försöket.

I ett experiment med olika tid för exponering (s.k. upptagsstudie) vid 4 % inblandning av dammvatten (beräknad koncentration 0,04 mg TNT/L), användes 250 djur i fem exponeringsbägare. Enligt en planerad provtagningsplan under perioden, togs tio djur ut ur respektive bägare vid olika tider efter start (0, 7, 14, 21, 28, 35, 41 dygn) och förvarades därefter frysta intill kemisk analys.

Dammvatten och extrakt av sediment/jord testat på mindre vattenloppa och cellkultur

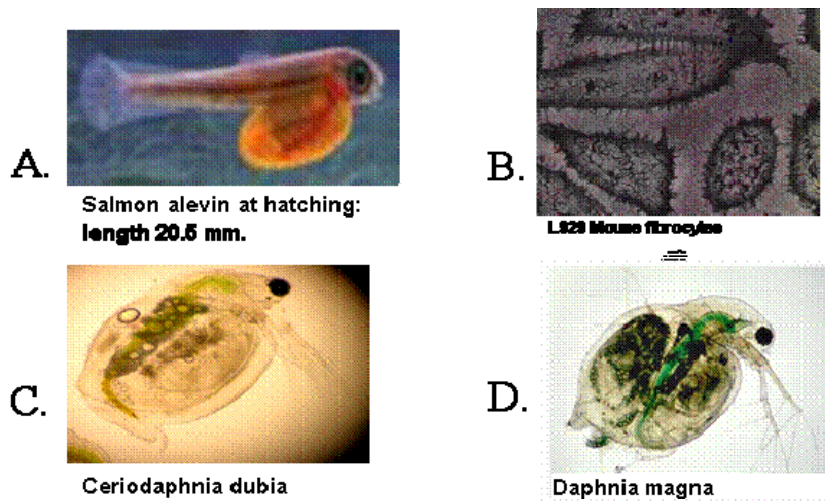
För *toxikologisk analys av dammvatten och extrakt av sediment/jord* användes filtrerat dammvatten, PLE-extrakt (150 °C, 10 MPa; Dionex ASE 100) från samtliga sediment. Extrakten filtrerades före toxikologisk analys (0,45 µm Teflon filter samt sterilfiltrering 0,22 µm). Vattenprov från dammen filtrerades på samma sätt före toxikologisk analys med cellkultur och vattenloppa. Filtrerade extrakt och vattenprov tillsattes kultiveringsmedium i standardiserade spädningsserier för toxikologisk analys *in vitro*.

För toxikologisk screening av tillväxthämning användes en cellkultur från mus (L929), vilken är etablerad bl a vid produktkontroll inom medicinsk-teknisk industri (Andrén et al, 1993) samt toxikologisk testning (Sauvant et al, 1995). Cellkulturen odlades i ett 'minimal essential medium with Earls salts' s.k. EMEM. Vissa essentiella ämnen med kort hållbarhet som glutaminsyra, icke-essentiella aminosyror samt gentamycin (antibiotika) tillsattes separat för kontrollerad tillväxt. Spädningsserier tillreddes genom tillsats av extrakt i 1:1 förhållande till dubbelkoncentrerat EMEM resulterande i ett första spädningssled med 50 % testextrakt och normalkoncentrerat EMEM. Efterföljande led späddes med varierande delar EMEM till en slutlig spädningsserie med följande extraktkoncentrationer: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 %.

För akut toxisk effekt inkluderande nervpåverkan, användes evertebratmodellen *Ceriodaphnia dubia* (se figur 3). Kolonin av denna mindre vattenloppa har hållits i kontinuerlig odling sedan 1990-talet och används för toxikologisk analys enligt utarbetat protokoll (ISO, 1982). Kulturen genererar 200-1000 individer dagligen under goda betingelser i medium enligt Klüttgen et al (1994) och tillsatt föda bestående av alger (*Selenastrum capricornutum*) från egen odling.

Tvättat sediment testat på stor vattenloppa

För *toxikologisk analys av resterande toxicitet i partiklar renade från TNT-komponenter (tvättat sediment)*, användes sedimentprover som genomgått PLE-extraktion. PLE-tvättning innebär en mycket grundlig genomspolning av sedimentpartiklarna under hög temperatur (+150 °C) och mycket högt övertryck (10 MPa \approx 100 ggr normaltrycket), vilket kan sägas motsvara en mycket kraftig tvättprocedur. Den renade sedimentresten intorkades, finfördelades och resuspenderades därefter i odlingsmedium varefter *akut toxisk effekt* mättes på stor vattenloppa (*Daphnia magna*). Daphnia är genomskinlig och tillräckligt stor för att fyllnadsgraden i tarm av mörka partiklar kan ses med ögat genom mikroskop.



Figur 3. Toxikologiska modeller som användes vid studien: A/ laxyngel (*Salmo salar*), B/ Cellkultur L929 bindvävcell från mus, C/ mindre vattenloppa (*Ceriodaphnia dubia*), D/ stor vattenloppa (*Daphnia magna*).

3 Resultat

Resultaten i denna undersökning omfattar dels kemisk analys, dels toxikologisk analys. Kemisk analys av TNT och nedbrytningsprodukter i autentiskt dammvatten och extrakt gjordes med acetonitril för kemisk analys av totalhalt respektive vatten för kemisk analys och toxikologisk analys av biotillgänglig fraktion. Toxikologisk analys av dammvatten, sedimentextrakt och 'tvättat' sediment genomfördes med hjälp av fyra biologiska modellsystem (fiskyngel, mindre och stor vattenloppa, cellkultur).

Vid intorkning av vissa sedimentprov för analyserna bedömdes finnas en ökad *explosionsrisk* i vissa sedimentprover eftersom TNT koncentreras och kristalliserar i det torkade provet. Kristallint och torrt TNT är explosivt över ca 20 % av torrvikten på sedimentet (beroende på kornstorleken). Som försiktighetsmått har FOI valt att förvara sedimentprover tagna i föreliggande studie i särskild ordning utanför laboratorier (SRV Förordning om brandfarliga och explosiva varor).

Kemisk analys

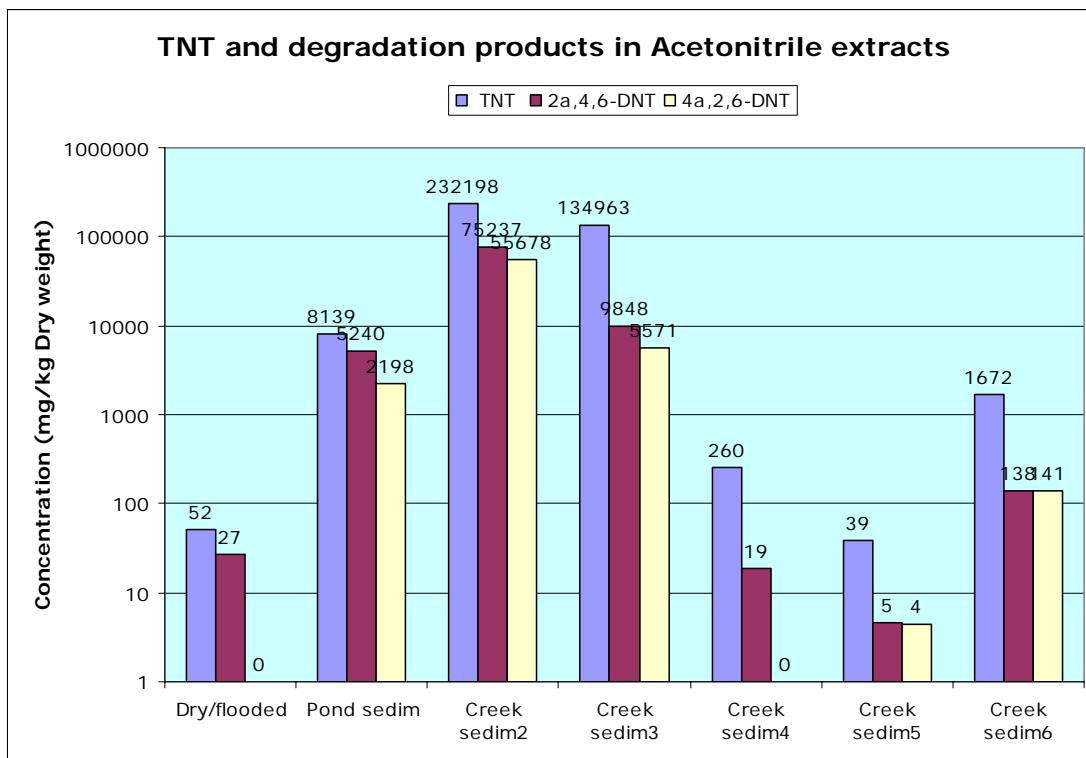
Resultaten från inledande kemisk analys med extrakt i acetonitril ses i figur 4. Koncentrationer har angetts i gram per kilogram torrs substans av sediment (g/kg TS) och är beräknade från mätningar i duplikat. Halterna i vattenextrakt från provsediment 2 och

3 var anmärkningsvärt förhöjda (ca 10-50 gånger högre) jämfört med dammsediment. Vid utsläppspunkten (sediment 6) ses en liten förhöjning av halterna.

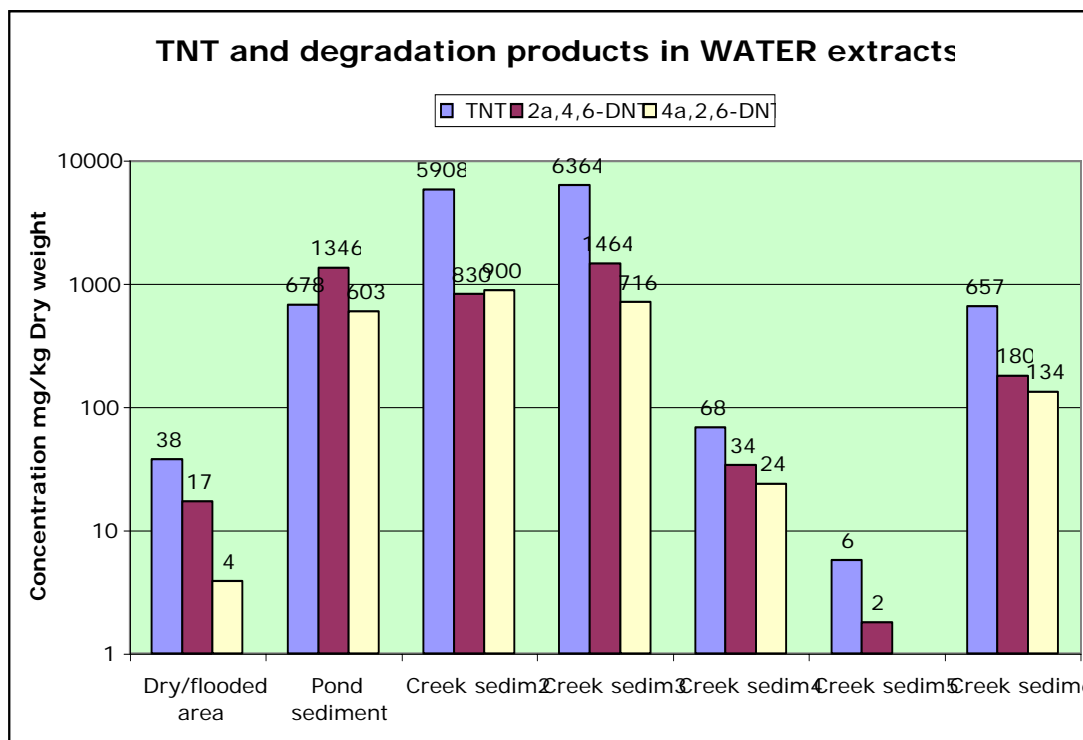
Resultaten från kemisk analys av vattenlöslig fraktion ses i figur 5. Koncentrationerna har angetts i milligram TNT per liter (mg/L) och är beräknade som medelvärde från mätningar i duplikat. TNT-halterna i vattenextrakt från provsediment 2 och 3 var anmärkningsvärt förhöjda, ca 1000 gånger högre jämfört med dammvatten. Även extrakt från dammsediment visade avsevärt förhöjda TNT-halter (ca 100 gånger högre) jämfört med dammvatten. Översvämningområdet visade ca 10 gånger förhöjda TNT-halter.

Resultaten indikerade en ansamling av TNT i sediment i vattendragets nedre lopp och i dammen. Mönstret av TNT och nedbrytningsprodukter i vattenextrakt visade lägre halter TNT i relation till nedbrytningsprodukterna 2a,4,6-DNT och 4a,2,6-DNT i dammsediment jämfört med bäcksediment. Mer recenta utsläpp kan därför misstänkas i bäcksedimenten 2 och 3 samt 6 genom förekomst av kraftig dominans av TNT över nedbrytningsprodukter.

Löslighetsdata för TNT finns dokumenterat vid rumstemperatur. Vid vattenextraktion under höga temperaturer ökar lösligheten för TNT i vatten väsentligt jämfört med rumstemperatur. De uppmätta halterna i vattenextrakt av TNT i Bäcksediment 2 och 3 (1400-1590 mg/L) överskred vida de litteraturdata som finns tillgängliga (100-552 mg/L). En förklaring kan ligga i att de aktuella sedimenten samtidigt var rika på organiskt kol. Vid extraktion av TNT extraherades även löst organiskt kol som erbjuder goda bindningsytor för TNT. Det kan innebära att en större andel TNT extraherades bundet till organiskt kol i de aktuella vattenextrakten jämfört med vad litteraturdata anger (ca 10-30 %; Eriksson and Skyllberg, 2001). Ett tecken på att vattenextrakten innehöll löst TNT över gränsen av vad som är lösligt var att fällningar uppstod vid förvaring i kylskåp.



Figur 4. TNT och nedbrytningsprodukter i dammsediment respektive bäcksediment i det kontaminerade vattensystemet. Sedimenten har extraherats med acetonitril och ultraljudsbehandling.



Figur 5. TNT och nedbrytningsprodukter (2a,4,6-DNT, 4a,2,6-DNT) i respektive sedimentextrakt i det kontaminerade vattensystemet. Sedimentprov (motsvarande 4 g torrsvikt) har extraherats med vatten (slutvolym ca. 16 ml) genom PLE.

Kemiskt innehåll i sediment, 'tvättat' sediment samt jordprov från jord (soil) från översvämningsytan framgår av tabell 1. Metallerna bly (Pb), koppar (Cu), zink (Zn) låg över de riktnivåer som angivits för sediment (SNV, 1999). Bland de organiska föreningarna låg inte någon över riktvärden där sådant åsatts, men åtskilliga föreningar saknar riktvärde. Detta gäller t.ex. för 2,6-dinitrotoluen samt bis-(2-etylhexyl)-adipat med höga värden särskilt i 'tvättat' sediment.

I flera fall uppkom en koncentrerings av föroreningskomponenterna i tvättat sediment jämfört med råsediment. Komponenterna bly (Pb), koppar (Cu), zink (Zn) kom därför att överskrida de ungefärliga effektgränser som angetts internationellt för havssediment av SNV (1999). Eftersom dessa effektgränser i sediment saknas för flertalet föroreningar kan ingen fullständig bedömning göras av farligheten i sedimentet från branddammen. Däremot kan konstateras för dessa föroreningar att tvätteffekten av PLE var liten på sedimentpartiklarna.

Tabell 1. Resultat från kemisk screening analys (ICPMS, GCFID, TOFMS) av prover från dammsediment, PLE-'tvättat' dammsediment (CleanSediment) och jordprov (Soil) från översvämningsyta. Där värden ej angetts har ämnet ej detekterats, dvs. varit under detektionsgräns.

Screening analyses	Sediment	CleanSediment	Soil	Detection limit	Guide line Sediment
Metals	mg/kg DryW	mg/kg DryW	mg/kg DryW	mg/kg	mg/kg DryW
As	25	24	2	<1	35
Pb	219	242	55	<1	35
Cd	2	2		<1	5
Co	15	14	11	<1	missing
Cu	131	127	29	<1	70
Cr	59	57	44	<1	80
Ni	20	20	16	<1	30
V	59	57	49	<1	missing
Zn	682	632	198	<1	120
Hg				<1.2	0,15
Sb	5	4	1	<1	missing
Ba	177	169	178	<2	missing
Mo	3	2	1	<1	missing
Sn	14	14		<1	missing
Organic compounds	Sediment	CleanSediment	Soil	µg/kg	Guide line Sediment
Phenantrene				<100	225
Fluoranthene		214		<100	600
Pyrene		184		<100	350
2,6-Dinitrotoluene		2215		<100	missing
Trichloroethene	22	5		<1	missing
Toluene	34	78		<1	missing
Diethylphtalate				<100	missing
Di-n-butylphtalate				<100	missing
Bis(2-ethylhexyl)adipate		8757		<100	missing
Diethylhexylphtalate DEHP				<100	missing

Toxikologisk analys

Dammvatten testat på Laxyngel. Resultaten från utvecklingstoxikologisk mätning på laxyngel ses i figur 6. En mycket tydlig sänkning av överlevnaden kunde dokumenteras i befintligt dammvatten. Efter 14 dygn var dödligheten mer än 20 % och i en av exponeringsbägarna med högst dos dog alla fiskyngel inom en vecka. Vid en utspädningsgrad av 25 gånger överlevde ynglen under de 41 dygn försöket pågick. Att fiskyngel visade större känslighet än övriga studerade modellsystem här kan tyda på att komplexa funktioner i organsystem störts (t.ex. syrgastransport, nervfunktion).

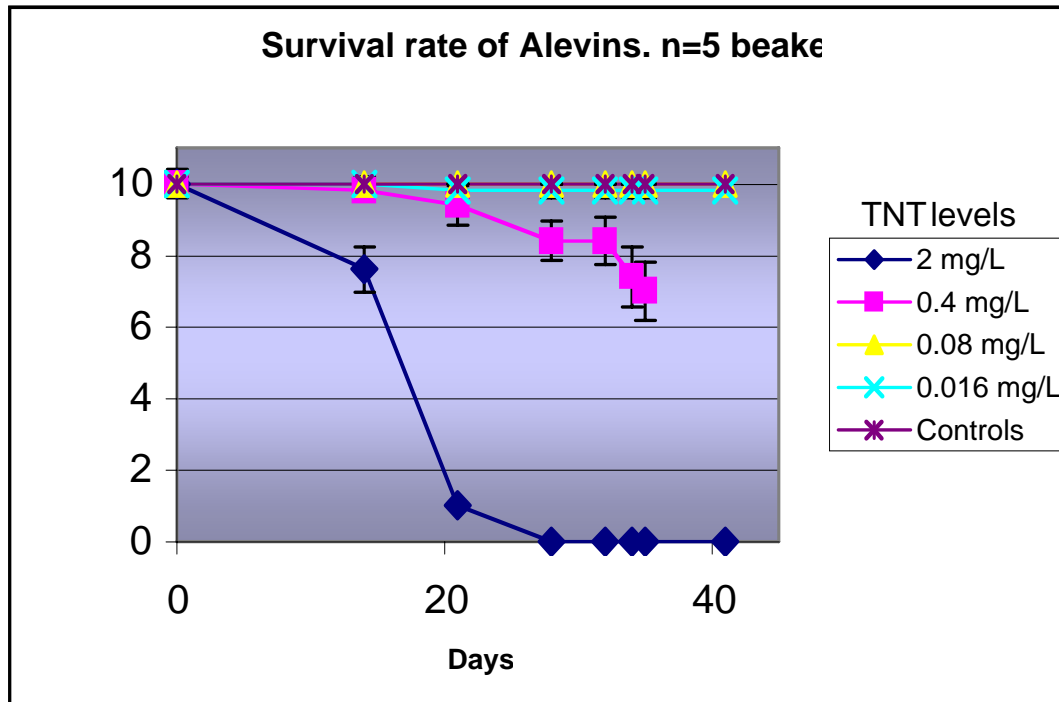
Dammvattnets exponeringshalter av TNT-föreningar kontrollerades genom kemisk analys av icke filtrerat dammvatten vid veckovisa byten (se figur 7). Halterna varierade inom acceptabla gränser med ca 3 mg TNT/L i färskt dammvatten och ca 1 mg TNT/L efter en veckas exponering. Genomsnittliga exponeringskoncentrationer antas därför ha varit: 2, 0,4, 0,08, 0,016 mg TNT/L vatten.

Upptag av TNT och TNT-metaboliter till laxyngel kunde dokumenteras. Ett tydligt dosberoende upptag framgår av figur 8, men det var särskilt omvandlingsprodukten 4a-2,6-DNT som ackumulerades starkast i fiskvävnaden. Ett tydligt tidsberoende upptag framgår av figur 9, där kraftigast ackumulation indikeras för 4a-2,6-DNT.

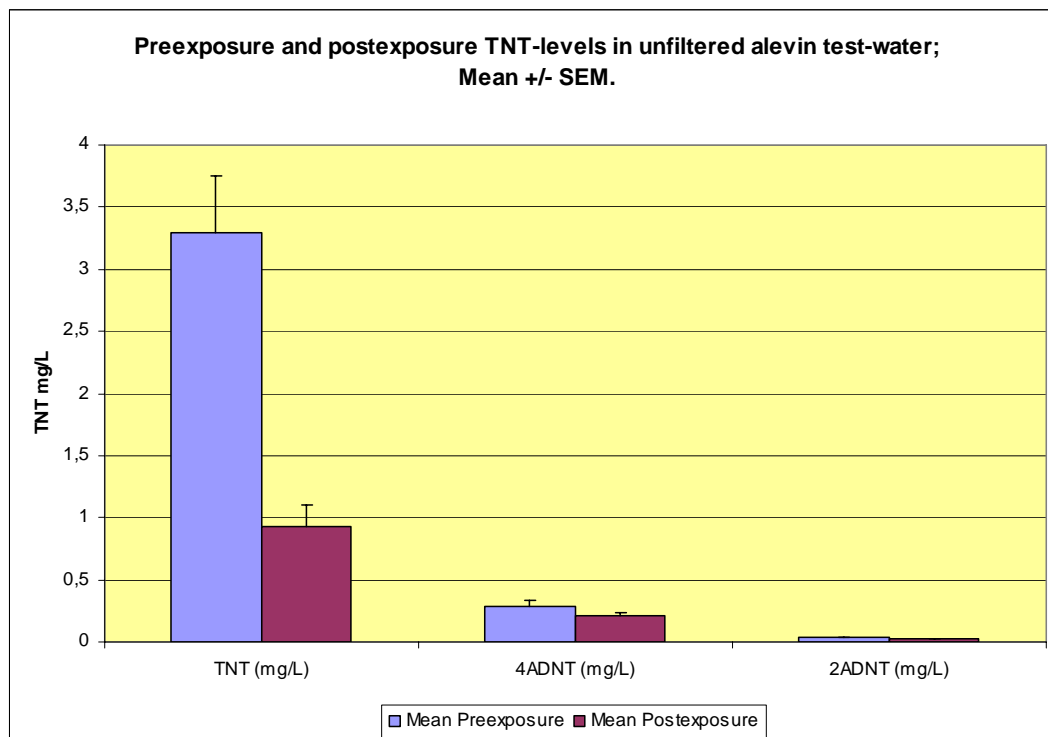
Damm och bäcksediment testat på Cellkultur. Resultaten från celltoxikologisk mätning på L929 ses i figur 10. Vid 50 % inblandning av sedimentextrakt är hämning av cellkulturens tillväxt i cellantal tydlig för dammsediment, bäcksediment 2, 3, 6, samt jord från översvämningssytan (figur 10A). Redan vid 6,25 % extrakt tillsats sågs giftighet i vattenextrakten från dammsediment och sedimenten 2, 3, 6, och översvämningssytan. Bäcksedimenten 4 och 5 hade en lägre grad av giftighet. Vatten från dammen visade ingen toxicitet.

Damm och bäcksediment testat på Vattenloppa. Resultaten från akut toxicitetsmätning på vattenloppa ses i figur 11. Vid 50 % inblandning av sedimentextrakt sågs akuta giftigheten tydligt för dammsediment, bäcksediment 2, 3, 6, samt jord från översvämningssytan (figur 11A). Giftigheten uttrycks dock något starkare jämfört med cellförsöken vid samma extrakt tillsats (6,25 %) undantaget jord från översvämningssytan. Att vattenloppan här visade större känslighet kan tyda på att komplexa funktioner i organsystem störts (t.ex. syrgastransport, nervfunktion). En annan skillnad var att vattenloppan inte uppvisade någon akut toxicitet medan celltillväxten var tydligt hämmad i extrakt från översvämningssytan, något som antyder ett annat föroreningspektrum i det provet.

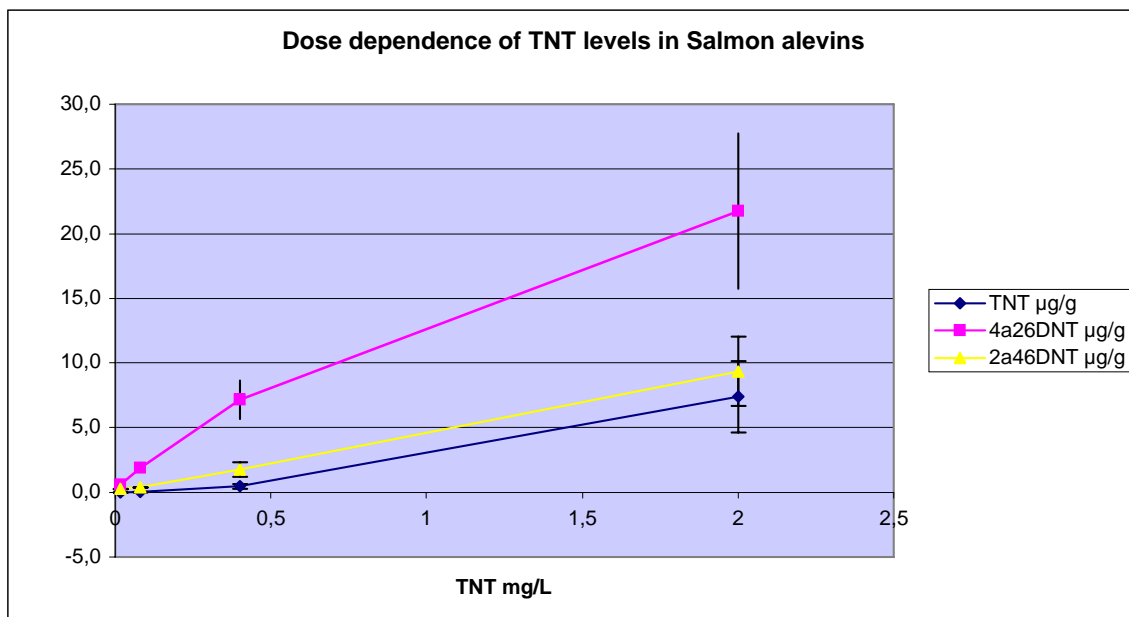
Tvättat dammsediment testat på Vattenloppa. Akuta toxiciteten hos stor vattenloppa från sedimentpartiklar ses i figur 12. Tvättat sediment uppvisade kraftigt sänkt toxicitet (48 timmar vattenloppa; $p=0,0545$) jämfört med råsediment. Tillsats av TNT (spikning) i 'tvättat' sediment återställde toxiciteten upp till den nivå som uppmätts för råsediment.



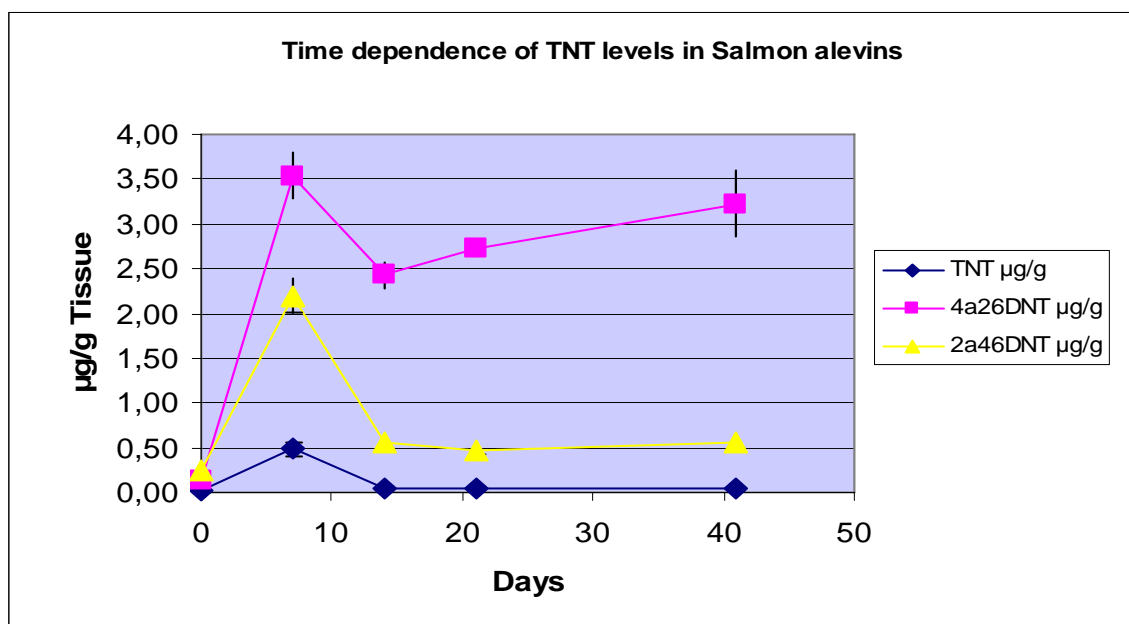
Figur 6. Akut toxicitet hos laxyngel i dammvatten från det kontaminerade vattensystemet. Autentiskt dammvatten späddes med kommunalt kranvatten (medelvärde \pm SEM).



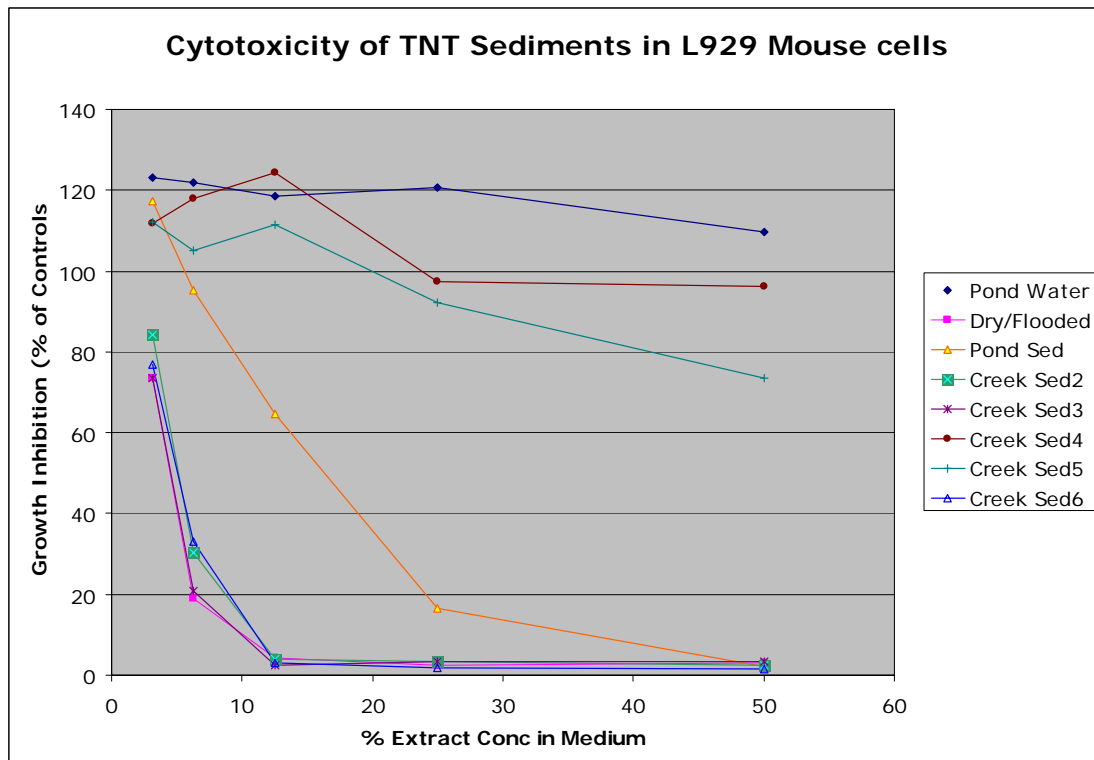
Figur 7. Genomsnittlig variation i TNT-koncentration på grund av vattenbyten veckovis under exponeringsförsök med laxyngel. Ej filtrerat vattenprov från varje exponeringsbägare (5 bägare för varje koncentration) poolades före och efter vattenbyte. Högre koncentrationen gäller för vatten efter byte och den lägre före bytet efter cirka en veckas exponering.



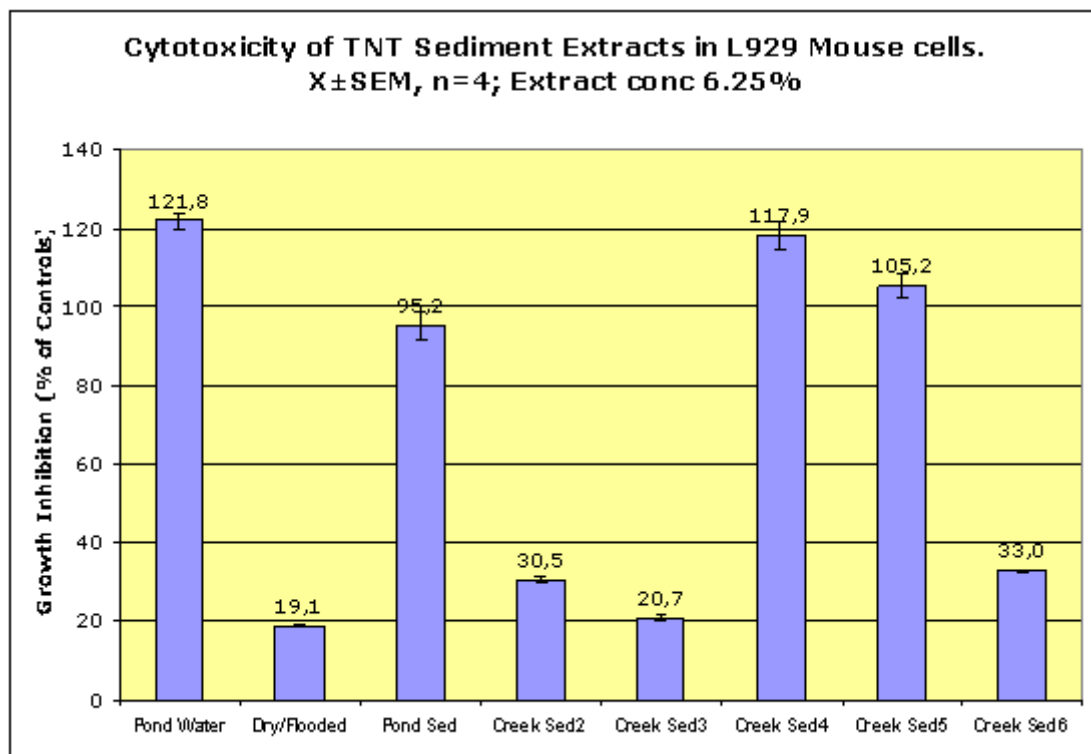
Figur 8. Dosberoende TNT-relaterade nivåer i laxyngel efter exponering för 0,04 mg/L TNT-förorenat dammvatten (filtrerat) i 40 dagar. Medelvärde ± SEM; n=3-5.



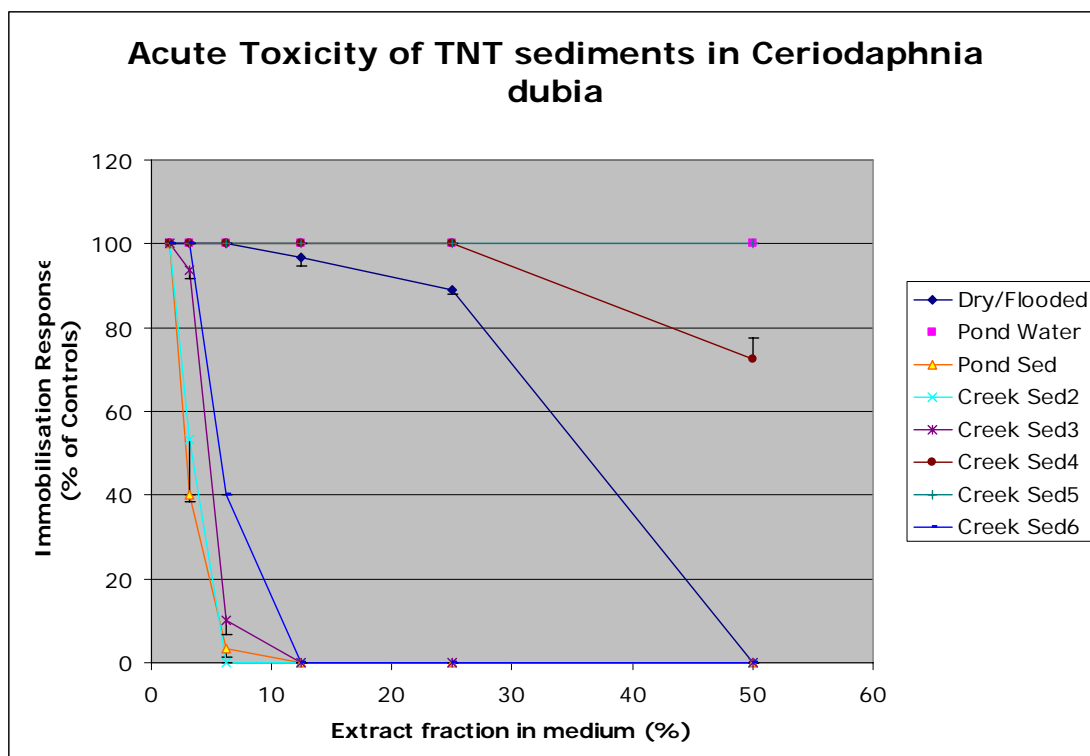
Figur 9. Tidsberoende TNT-relaterade nivåer i laxyngel efter exponering för 0,04 mg/L TNT-förorenat dammvatten (filtrerat) i 40 dagar. Medelvärde ± SEM; n=3-5.



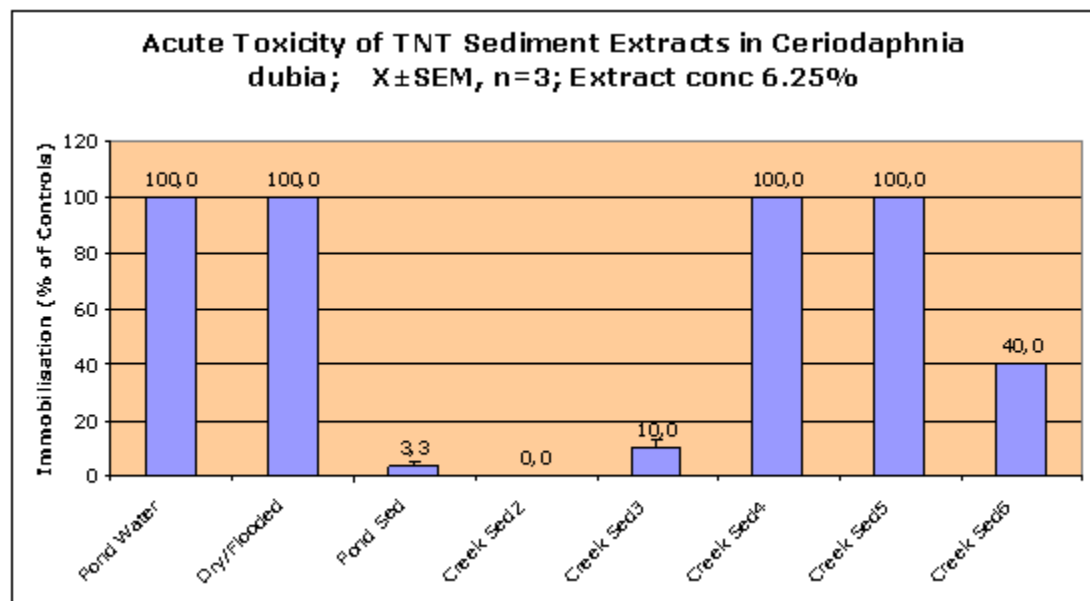
Figur 10 A. Cytotoxiciteten (cellkulturens tillväxt i procent av kontroller (100 %)) i dammvatten respektive sedimentextrakt i det kontaminerade vattensystemet. Värden över 100 % innebär en gödning av cellkulturen som odlas i s.k. minimalt medium med avseende på näringsämnen. Sedimenten har extraherats med vatten genom PLE.



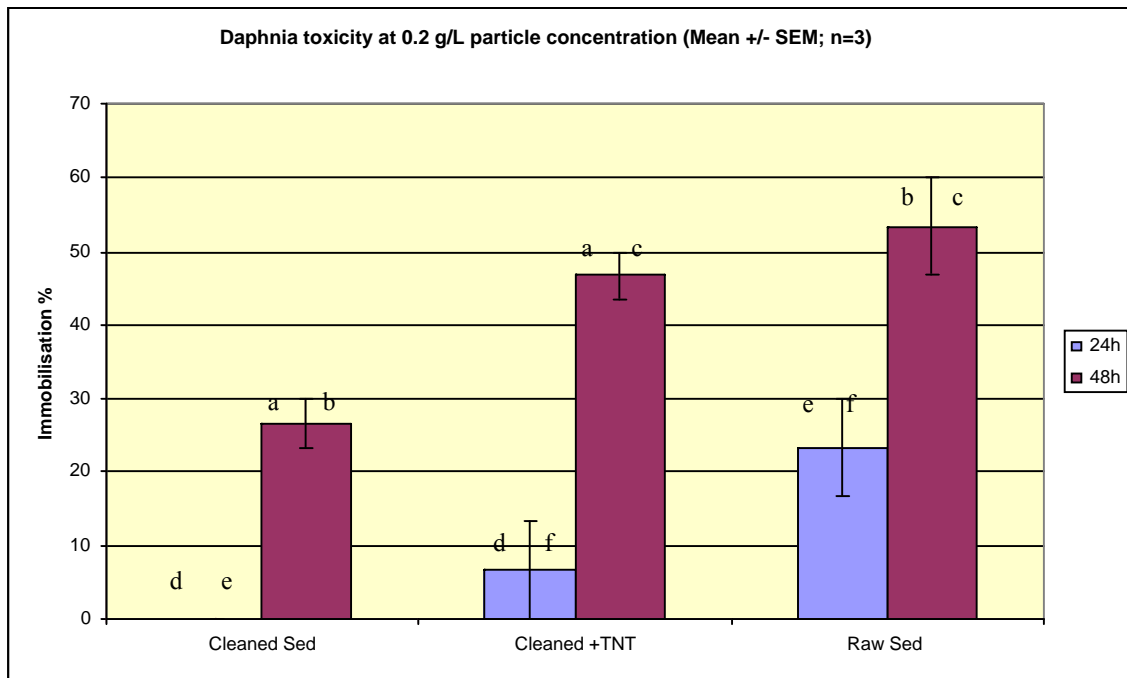
Figur 10 B. Cytotoxicitet (cellkulturens tillväxt i procent av kontroller (100 %)) vid 6,25 % tillsats i odlingsmedium av dammvatten respektive sedimentextrakt från det kontaminerade vattensystemet. Värden över 100 % innebär en gödning av cellkulturen som odlas i s.k. minimalt medium med avseende på näringsämnen. Sedimenten har extraherats med vatten genom PLE.



Figur 11 A. Akut toxicitet (rörliga djur i procent av kontroller (100 %)) hos vattenloppa i dammvatten respektive sedimentextrakt i det kontaminerade vattensystemet. Sedimenten har extraherats med vatten genom PLE.



Figur 11 B. Akut toxicitet (rörliga djur i procent av kontroller (100 %)) hos vattenloppa vid 6,25 % tillsats i odlingsmedium av dammvatten respektive sedimentextrakt från det kontaminerade vattensystemet. Sedimenten har extraherats med vatten genom PLE.



Figur 12. Skillnader i akut toxicitet på stor vattenloppa (*Daphnia magna*) mellan obehandlat sediment (raw sediment), 'tvättat' sediment (med PLE; cleaned sediment) och 'tvättat' sediment spikat med TNT. Partikelkoncentrationen var densamma (0,2 g/L) i de tre fallen. Medelvärde \pm SEM. Statistisk skillnad beräknad med Wilcoxon signed ranks test (1-tailed) för två relaterade grupper: a/ $p=0,0545$, b/ $p=0,0545$, c/ $p=0,207$, d/ $p=0,158$, e/ $p=0,051$, f/ $p=0,051$.

4 Diskussion

Detta fall har erbjudit ett unikt tillfälle att studera en mycket tydlig förorening med TNT i ett extremt vattenekosystem. Såväl den kemiska karakteriseringen av TNT och nedbrytningsprodukter i det lokala ekosystemet, som den toxikologiska tolkningen av betydelsen har underlättats av att TNT-belastningen varit så kraftig.

Kemisk karakterisering. En screening för TNT och dess omvandlingsprodukter visade på en kraftig föroreningsgrad i vattensystemet. Dammsediment höll 8,1 g TNT/kg torrs substans, vilket var avsevärt högre än tidigare mätningar i området (0,124 g/kg; Qvarfort et al, 2002), vilket kan förklaras av en effektivare provtagningsmetodik i nuvarande studie (Ekman-huggare i centrala sedimentationsstället). I extremfallet noterades TNT-halten i bäcksediment 232 g/kg torrs substans, nära de högsta föroreningsnivåer som rapporterats (600-700 g/kg) i mark och sediment vid militära anläggningar i Europa och USA (Hovatter et al, 1997; Elovitz et al, 1999; Conder et al, 2004). Förhållandena var antagligen sådana att en utfällning av kristallin TNT förelåg i sedimenten. Ett sådant scenario stöds av att de vattenextrakt som producerades med PLE (150 °C och 10 MPa övertryck) sannolikt löste ut TNT-kristaller. Detta gav avsevärt högre TNT-halter i vattenfas än vad som normalt är lösligt, och under avsvalningsfas bands TNT sannolikt till glas- och partikelytor, varvid TNT-halten i vatten sjönk till motsvarande den naturliga mättnadsgraden. Samma förhållande gällde flera av provpunkterna från utsläppspunkten längs vattendraget fram till dammen, vilket indikerade att TNT och omvandlingsprodukter till betydande del kristalliserat i bäcksedimenten före inflödet i dammen.

Vid sidan av TNT kunde omvandlingsprodukterna 2-amino,4,6-DNT och 4-amino,2,6-DNT klart identifieras och kvantifieras. Omvandling av TNT sker dels genom fotolytisk kemisk nedbrytning (Talmage et al, 1999), dels genom biologisk omvandling (Gorontzy et al 1994; Hawari et al, 1998; Lachance et al, 2004). Balansen mellan TNT och nedbrytningsprodukter i dammsedimentet antyder att en kraftigare omvandling skett från modersubstansen TNT till nedbrytningsprodukter jämfört med flertalet bäcksediment (se figur 4-5), vilket skulle kunna vara resultatet av en övervägande mikrobiell omvandling. Mot detta talar en mikrobiell analys hos certifierat laboratorium (ALControl, Umeå), som bedömdes tyda på en relativt kraftigt reducerad aerob aktivitet (2490 cfu/ml; cfu = colony forming units; metod enligt SS 028171-1), samt på en svag anaerob mikrobiell aktivitet (595 cfu/ml; metod enligt NMKL 95-3 mod). Litteraturuppgifter anger att mikrobiell aktivitet med vissa svamparter (*Phanerochaete chrysosporium*) reduceras avsevärt vid TNT-halter över 92 mg/L vatten (Chen et al, 1997) medan hämrad bakterietillväxt (*Vibrio fischeri*) har påvisats redan vid 1 – 2 mg/L (Frische, 2002). Sedimenten i föreliggande studie höll TNT-halter i spannet 2-232 mg/kg (torrvikt), och extrakt från sedimenten 9-1591 mg/L. Detta tyder på att en hämmande effekt av TNT på mikrobiell flora sannolikt förelåg. En kemisk omvandling till nedbrytningsprodukter kan därför ha dominerat över en mikrobiell omvandling till TNT-metaboliter i sediment. En mikrobiell aktivitet kan dock inte uteslutas i dammvatten vars TNT-halt var cirka 3 mg/L.

Toxikologisk betydelse. Toxikologisk analys visade tydlig förgiftningsrespons hos fiskyngel i autentiskt dammvatten. Förgiftningsresponsen kvarstod vid utspädning med rent vatten ner till 20 % dammvatten, dvs. fem gångers utspädning (ca 0,4 mg/L i

dammvatten). Responsen i övriga testorganismer stöder dessa resultat samtidigt som källan till TNT-förorening av vattensystemet indikeras.

Laxyngel visade en mycket hög känslighet för de TNT-nivåer som förelåg i dammvatten. Upptag av TNT-substanser har här dokumenterats i tydlig relation till dosering (figur 8). Ett snabbt tidsrelaterat upptag samt en omvandling och ansamling av TNT-föreningar i fiskvävnad visas av data (figur 9). Upptag och ansamling i fiskvävnad av TNT-metaboliterna 2-amino,4,6-DNT och 4-amino,2,6-DNT var avsevärt högre än TNT-moderssubstans. En möjlig förklaring kan vara en högre vattenlöslighet för TNT (130 mg/L) jämfört med metaboliterna (cirka 40 mg/L) (van Ham, 2005). Det kan ge en större fördelning av metaboliterna till fiskvävnadens högre fetthalt. Metaboliten 4-amino,2,6-DNT nådde en ackumulationsnivå kring ca 3 µg/g vävnad efter 40 dygns exponering vid vattenhalten 0,08 mg/L jämfört med ca 0,03 µg/g för TNT.

Dokumentation av TNT i fiskvävnad är sällsynt och vad författarna känner till har detta ej tidigare visats i kontrollerade exponeringsförsök med autentiskt vatten. Experiment med ren radioaktivt inmärkt TNT (Ownby et al, 2005) visar viss överensstämmelse med resultaten från föreliggande rapport i avseendet att TNT-metaboliterna klart dominerar över TNT i fiskvävnaden. I exponeringsförsök på havsbotten intill dumpningszoner för TNT-innehållande ammunition kunde TNT föreningar emellertid ej detekteras hos flundra (Ek et al, 2005).

Den låga överlevnadsfrekvensen hos nykläckta fiskyngel redan inom en vecka efter försökets start visade tydligt det potentiella ekologiska hot mot fiskpopulationer som vattensystemet innebär i befintligt skick. Först vid en utspädningsgrad av 25 gånger dammvatten (0,08 mg/L) kunde fiskynglen överleva hela försöksperioden (41 d). Detta faktum var inte heller förvånande men gav en intressant möjlighet att fastställa graden av förgiftning i denna autentiska miljö. Mekanismerna som orsakat denna dokumenterade fiskdöd är dåligt kända. En möjlig förklaring kan utgöras av en ökad metabolism hos fiskyngel vars vävnader är under snabb utveckling. Denna utveckling kräver bl.a. god syretillförsel, något som kan störas av TNT-interaktioner med blodets syrgastransport (Savolainen et al, 1985). Någon närmare undersökning av fiskyngel kunde inte göras p.g.a. projektets avgränsning, vilket innebar att påverkan på laxynglens kondition och utvecklingsstörning kvarstår som icke utredd. Det är emellertid sannolikt att dammvattnet måste spädas mer än 125 gånger för att inte utgöra en utvecklingstoxikologisk risk för laxyngel.

En tydlig samvariation mellan TNT-halt och toxicitet hos *cellkultur och vattenloppa* sågs vid en jämförelse mellan extrakt från sedimentprover. Förgiftningseffekter sågs vid högre koncentrationer än för fiskyngel: cellkultur vid cirka 6 % extraktinblandning i odlingsmedium (ca 10 mg TNT/L i bäcksediment 6), och hos vattenloppor vid cirka 6 % extraktinblandning (ca 10 mg TNT/L i dammsediment och bäcksediment 6). Bäcksedimenten 2, 3 och 6 var giftigast i cellkultur och vattenloppskultur. En tydlig skillnad var dammsedimentets lägre giftighet i cellkulturen medan vattenloppskulturen då var mycket känslig. Den skillnaden kan ha flera förklaringar varav en möjligen kan vara den större andelen TNT-metaboliter relativt TNT-moderssubstansen i dammsediment. En annan skillnad mellan dessa båda modellsystem var cellkulturens klart större känslighet för jordprovsextrakt från översvämningssytan. Här var samtidigt TNT-nivåerna så låga att andra föroreningar torde förekomma som kan förklara den höga giftigheten.

Partiklar från industriet sediment var uppenbart giftiga för *stor vattenloppa* som visade en förgiftningsrespons strax över 50 % för råsediment vid 48 timmars exponeringstid (se figur 12). Efter tvättning genom trycksatt vätskeextraktion vid 150 °C, nära nog halverades giftigheten ner till 25 % giftighet. Efter tillsats av TNT till ursprunglig nivå hos suspensionen med tvättade partiklar, återgick förgiftningsresponsen till den initiala hos vattenloppa. Detta antyder att en löslig TNT-fraktion, som var möjlig att avlägsna genom intensiv PLE-tvätt, kunde förklara nära hälften av den giftighet som fanns i obehandlade sedimentpartiklar. Resterande giftighet (25 %; se figur 12) hos tvättade sedimentpartiklar, kan eventuellt förklaras av en svårtillgänglig fraktion TNT-föreningar, vilken ej avlägsnades genom PLE-extraktion, samt andra giftiga substanser i föroreningspektrum (se tabell 1) varav följande ämnen inte kan friskrivras från de förgiftningseffekter som dokumenterats: bly (Pb), koppar (Cu), zink (Zn), bis-(2-etylhexyl)-adipat och 2,6-dinitrotoluen med höga värden särskilt i 'tvättat' sediment.

Vilken är då den miljötoxikologiska påverkan i modelldammen? Den akuta förgiftningsrisken i det *lokala ekosystemet* är uppenbart mycket stor. Fortplantning hos fisk och dess möjliga föda i lokal näringskedja torde vara omöjlig att upprätthålla vid de dokumenterade TNT-nivåerna. Vid lika kraftiga TNT-utsläpp i liknande vattensystem som i modellområdet, blir exponering och förgiftning sannolikt av samma storleksordning. Förgiftningsrisken för *näraliggande ekosystem* är av intresse men har inte omfattats av rapportens syfte.

En viss förhöjd kronisk (långsiktig) risk kan finnas med koppling till genskador (genotoxicitet), något som har associerats med TNT-metaboliter (Honeycutt et al, 1996). Detta kan teoretiskt beröra såväl fisk som andra djur, inklusive människa, som löper risk att komma i kontakt med förorenade sedimentmassor. En sådan miljöexponering kan emellertid övervakas och kontrolleras genom mätning av exempelvis TNT-metaboliter i urinprover (Ahlborg et al, 1988).

Dumpad ammunition misstänks att under extrema förhållanden (t.ex. skadat granathölje) uppvisa ett visst läckage av explosivämne till omgivande sediment. Eventuellt läckage är under utredning och dess storlek har ännu ej kvantifierats (Burman och Qvarfort, 2006). En viss kunskap har dock genererats om explosivämnens nedbrytningsprocesser i sedimentmiljön. Nedbrytningsexperiment vid FOI (Berglind et al, 2006) har utgått från resthalter i sediment på cirka 7 mg/kg torrsbstans och vattenhalter av TNT på cirka 0,01-0,640 mg/L. Detta ansågs motsvara ett värsta läckagescenario för dumpad TNT-ammunition, och är av intresse i en jämförelse med giftiga TNT-nivåer i föreliggande studie (branddammen), med sedimenthalten 15,5 mg/kg och vattenhalten cirka 3 mg/L. Detta gav tydliga toxiska effekter i samtliga biologiska modeller vid en haltnivå som emellertid var avsevärt högre (cirka 5-300 gånger) jämfört med vattenhalter i nedbrytningsförsöken.

Slutsatser

Syftet med föreliggande rapport adresserade tre frågeställningar som här ges följande komprimerade svar.

1. *Blir fisk påverkad i högt TNT-belastad miljö?* Tydliga effekter på fisk av autentiskt vatten från branddammen med hög TNT-belastning har dokumenterats. I områden som eventuellt drabbas av kraftiga TNT-läckage från ammunition riskerar fiskpopulationer att påverkas. Ett dos- och tidsberoende upptag av TNT till fiskynglens vävnad visar att fiskdöden kan vara relaterad till TNT-föroreningarna.
2. *Är TNT-tvättat sediment giftigt?* Övriga toxikologiska testsystem som använts uppvisade toxiska effekter som huvudsakligen associerades med extraherad TNT och dess omvandlingsprodukter. Dammsediment ”renat” från TNT visar nära halverad giftighet hos vattenloppa, en giftighet som kunde återskapas genom tillsats av TNT upp till ursprunglig nivå i partiklarna. Återstående giftighet i ’tvättade’ partiklar (genom trycksatt vätskeextraktion; PLE) kan eventuellt förklaras av andra giftiga ämnen eller TNT-föroreningar som ej kunnat avlägsnas utan bundit hårt till sedimentpartiklar. Således finns en potentiell giftighet i ’tvättade’ sedimentpartiklar.
3. *Hur fördelar sig TNT mellan sediment (partiklar), vatten respektive fisk?* Fördelningen av TNT mellan sediment, vatten och fisk kompliceras av olika partikelinbindning och vattenlöslighet för TNT och dess metaboliter. Dammsedimentets partiklar gav störst andel TNT vid extraktion med acetonitril, medan extraktion med vatten och efterföljande partikelfiltrering gav en lägre andel TNT jämfört med TNT-metaboliter. Det antyder att TNT var relativt starkt partikelbundet. Filtrat vatten gav följaktligen en större andel TNT-metaboliter bundna till vattenlösliga ligander (som passerar filter) i vattenfasen. TNT var tydligt tillgänglig för upptag till fiskyngel även om TNT-metaboliterna i vattenmassan togs upp effektivare till fiskvävnaden än TNT. Förekomsten av TNT-metaboliter i vattenmassan antyder att en viss mikrobiologisk aktivitet funnits där medan själva sedimentet hade så höga TNT-halter att mikrofloran antagligen var kraftigt hämmad.

Tack

Undersökningen har initierats och finansierats av Försvarmakten. Ett tack riktas till Timo Hentunen för tekniskt stöd vid provtagning.

Referenser

Ahlborg G Jr, Einisto P, Sorsa M. 1988. Mutagenic activity and metabolites in the urine of workers exposed to trinitrotoluene (TNT). *Br J Ind Med*. May;45(5):353-8.

Andrén A H G, and Wieslander A P. 1993. Survival and function of fibroblasts stored as stock cultures at a non-freezing temperature. *ATLA* 21:206-9.

Berglind Rune, Ann-Christine Andersson, Göran Dave, Helene Ek, Ronald Mella, Eva Nilsson, Emma Thelander, Håkan Wingfors. 2006. Biologisk nedbrytning av TNT i sött, bräckt och salt vatten med sediment: Kemisk och toxikologisk undersökning. FOI-rapport (manuskript)

Brännäs E. 2005. Institutionen för Vattenbruk, SLU. Muntlig information

Burman och Qvarfort, 2006. Muntlig information

Chen JC, Huebner HJ, He LY, Donnelly KC. 1997. Degradation and detoxification of 2,4,6-Trinitrotoluene by four strains of white-rot fungus. Department of Veterinary Anatomy and Public Health, Texas A&M University, Texas. Abstract at the 12th Annual Conference on Hazardous Waste Research, May 19-22, 1997, Kansas City Airport Hilton, Kansas City, Missouri, Great Plains/Rocky Mountain Hazardous Substance Research Center (HSRC), Kansas State University.

Conder JM, La Point TW, Steevens JA, Lotufo GR. 2004. Recommendations for the assessment of TNT toxicity in sediment. *Env Tox Chem* 23:141-9.

Ek Helene, Göran Dave, Eva Nilsson, Joachim Sturve, Göran Birgersson. 2006. Fate and Effects of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) from Dumped Ammunition in a Field Study with Fish and Invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 244–252.

Elovitz MS, Weber EJ. 1999. Sediment mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and fate of the resulting (poly)amines. *Environ Science Technol* 33:2617-25.

Eriksson J, and Skyllberg U, 2001. Binding of 2,4,5-Trinitrotoluene and its degradation products in a soil organic matter two-phase system. *J Environ Qual* 30:2053-2061.

Frische T. 2002. Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria – A case study of the explosive 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Ecotox Environ Safety* 51:133-33.

Gorontzy T, Drzyzga O, Kahl MW, Bruns-Nagel D, Breitung J, vonLoew E, Blotevogel K-H. 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. *Crit Rev Microbiol* 20:265-84.

van Ham, N. 2005. Leaching of chemicals to the environment. Abstract at a Trilateral workshop Canada, Sweden, Netherlands. TNO, Delft, Netherlands.

Hawari J, Halasz A, Paquet L, Zhou E, Spencer B, Ampleman G, Thiboutot S. 1998. Characterization of metabolites in the biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene. *Appl Environ Microbiol* 64:2200-06.

Honeycutt ME, Jarvis S, McFarland VA. 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,3,6-Trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35: 282-7.

Hovatter PS, Talmage SS, Opresko DM, Ross RH. 1997. Ecotoxicity of nitroaromatics to aquatic and terrestrial species at Superfund sites. In: Dwyer FJ, Doane TR, Hinman ML (Eds), *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modelling and Risk Assessment*, Vol 6. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 117-129.

ISO, 1982. Standardiseringskommissionen i Sverige. 1982. Vattenundersökningar - Bestämning av rörlighetshämning hos *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Svensk Standard SS 02 81 80, ISO 6341 – 1982.

Klüttgen B, Dülmer U, Engels M, and Ratte H T. 1994. AdaM, and artificial freshwater for the culture of zooplankton. *Wat. Res.* 28(3), 743-746.

Lachance B, Renoux AY, Sarrazin M, Hawari J, Sunahara GI. 2004. Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. *Chemosphere* 55:1339-48.

Lanno R, Wells J, J Conder J, Bradham K, and Bastae N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57:39–47.

Liljedahl B, Qvarfort U, Waleij A. 2001. Undersökning av mark och grundvatten inom Nammo LIAB, Lindesberg. MIFO-Fas 1. FOI-R—0029--SE

Ownby David R., Jason B. Belden, Guilherme R. Lotufo, Michael J. Lydy. 2005. Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 1—Bioconcentration and distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 58: 1153–1159

Qvarfort U, Waleij A. 2002. Undersökning av mark och grundvatten inom Nammo LIAB, Lindesberg. MIFO-Fas 2. FOI-R—0240--SE

Qvarfort U, Waleij A. 2003. Kompletterande undersökningar av förorenade mark- och vattenobjekt vid Nammo LIAB, Lindesberg. FOI-R—0953--SE

Ryon M G. 1987. Water quality criteria for 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). ORNL-6304. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge , TN.

Saka M. Developmental toxicity of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. *Environ Toxicol Chem.* 2004 Apr;23(4):1065-73.

Sauvant MP, Pépin D, Bohatier J, Groliere C A. 1995. Comparison of six bioassays for assessing in vitro acute toxicity and structure-activity relationships for vinyl chloride monomer, its main metabolites and derivatives. *The Science of the Total Environment* 172:79-92.

Savolainen H, Tenhunen R, Häkäen H. 1985. Reticulocyte hem synthesis in occupational exposure to trinitrotoluene. *Br J Ind Med.* May;42(5):354-5.

SNV. 1999. Metodik för inventering av förorenade områden. SNV rapport 4918.

SRV Förordning om brandfarliga och explosiva varor.

Talmage SS, Opresko DM, Maxwell CJ, Welsh CJ, Cretella FM, Reno PH, Daniel FB. 1999. Nitro-aromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Rev Environ Contam Toxicol.* 161:1-156.

US EPA 8330.

US EPA 3535.