



FFI-RAPPORT

16/02335

Metoder for å måle og modellere biotilgjengelighet av ammunisjonsrelaterede metaller i jord og vann i skyte- og øvingsfelt

—
Espen Mariussen
Ida Vaa Johnsen

Metoder for å måle og modellere biotilgjengelighet av ammunisjonsrelaterte metaller i jord og vann i skyte- og øvingsfelt

Espen Mariussen
Ida Vaa Johnsen

Emneord

Tungmetaller
Antimonforbindelser
Skytefelt
Måleteknikk
Analyse
Vann
Jord

FFI-rapport

FFI-RAPPORT 16/02335

Prosjektnummer

518901

ISBN

P: 978-82-464-2904-5

E: 978-82-464-2905-2

Godkjent av

Øyvind Voie, *forskningsleder*

Janet Blatny, *avdelingssjef*

Sammendrag

Miljøkvalitetsstandardene i vannforskriften for miljøgifter i vannforekomster ble revidert høsten 2015. Det ble blant annet innført en grenseverdi for årsgjennomsnittet i ferskvann på 1,2 µg Pb/l som gjaldt den biotilgjengelige fraksjonen av bly (Pb). Biotilgjengelig konsentrasjon kan defineres som den andelen av et stoff som kan gjøres tilgjengelig for opptak i en organisme. Denne andelen kan være mye lavere enn den totale konsentrasjonen. Forurenset avrenningsvann fra et skytefelt består av forskjellige tilstandsformer av uorganiske metallforbindelser, og metallforbindelser assosiert med uorganiske og organiske kolloider og partikler. For Pb og kobber (Cu) i avrenningsvann eller porevann er det foreslått at det er fraksjonen med frie metallioner som utgjør den mest biotilgjengelige og toksiske fraksjonen. Andelen fritt metallion i vann er imidlertid ikke en konstant størrelse, og man har flere varianter av kompleksbundet metall som kan være biotilgjengelig. Derfor brukes begrepet labilt metallion, som også kan omfatte andre tilstandsformer enn fritt ion.

Det finnes mange forskjellige metoder for å måle eller beregne den biotilgjengelige andelen av metallforurensing i vann. Metodene kan deles inn i fire hovedgrupper: (1) De teoretiske likevektsbaserte modellene, som benytter kjente kjemiske og biologiske parametere fra løsningen, for eksempel pH, løst organisk innhold og toksisitet, for å finne ut hvilke spesier metallet befinner seg på. Et eksempel på dette er biotic ligand-modellen (BLM). (2) Kjemiske analysemetoder, som måler frie metallioner direkte, for eksempel ioneselektive detektorer. (3) Forskjellige varianter av passive prøvetakere, for eksempel DGT. (4) Forskjellige metoder for ultrafiltrering og dialyse. Mange av metodene kan kombineres, og flere av metodene for å måle tilstandsformen til metaller i vann kan også benyttes på jord og jordvæske. For å vurdere biotilgjengelighet av metallforurensinger i jord blir det i tillegg benyttet forskjellige ekstraksjonsprosedyrer og ristetester som kan si noe om hvordan metallene er bundet til jorda.

Det er få metoder som er tilpasset rutinemessig overvåkning av vann og vassdrag. Mange metoder er lite uttestet, de har for høye deteksjonsgrenser, eller de krever sofistikert utstyr og er tidkrevende. Metoder som vil være egnet for overvåkning av biotilgjengelig andel av metaller i vann, er passive prøvetakere som DGT og teoretiske modeller som BLM. Utdfordringen med modeller som BLM er at de ikke er validert for vannkvaliteten man ofte finner i Norge eller i Skandinavia. I tillegg er det utviklet få validerte BLM-modeller for Pb. Man står derfor i fare for å både over- og underestimere risikoen knyttet til en metallforurensing. Elektrokjemiske analysemetoder som voltametri vil sannsynligvis bli mer aktuelt, men per i dag gjenstår en del utvikling på utstyr tilpasset feltbruk. Separasjon av metallspesier med ioneselektive kolonner og ultrafiltrering er enkel metodikk for å undersøke metallenes tilstandsform i vann, men må sammenlignes med andre metoder for å vurdere om de kan benyttes i risikovurdering av forurensinger i vann. For å vurdere biotilgjengelighet av metaller i jord kan man benytte enkle ristetester, men det er viktig at testen er tilpasset det miljøet organisme eksponeres i.

Summary

Environmental quality standards (EQS) in the water were revised in 2015. An EQS for the bioavailable fraction of Pb was implemented. The bioavailable fraction can be defined as the fraction of a compound that is accessible to an organism for absorption. This fraction may be less than the total concentration of the compound. Contaminated run-off water from a shooting range contains different metal species, such as free ions, and metal species associated with organic and inorganic colloids and particles. The fraction of free metal ions is considered the most bioavailable and toxic fraction, but also metal ions associated in complexes with colloids may be available for uptake in an organism. The term labile metal species is therefore used, which includes several more metal species than free ions only.

There are a lot of different methods to estimate or analyze the bioavailable fraction of metals in water. The existing methods can be divided in four main groups: (1) Theoretical equilibrium based methods, which build on known chemical and biological processes of the metals in the water, such as pH, concentrations of dissolved organic matter, and toxicity. An example is the biotic ligand model (BLM). (2) Chemical analyses, such as analysis with ion selective electrodes. (3) Different techniques of passive samplers, such as DGT. (4) Different techniques of size and charge fractionation, such as ultra-filtration and dialysis. Many of these methods can be combined and used to estimate the metal species in soil and soil water. To assess bioavailable fraction of metals in soil, sequential extractions or batch tests can be used.

There are few methods available to estimate the bioavailable fraction of metals on a routinely based surveillance of a contaminated area. Many methods are not properly validated, or the detection limits are too high or demanding to operate. Suitable methods for routinely monitoring for risk assessment of waters are passive samplers such as DGT and theoretical models such as BLM. The most frequently used BLM models are, however, not validated for the most typical water qualities in Norway or in Scandinavia. In addition, there are few validated BLM models for Pb. Therefore, there are chances of both underestimating and overestimating the ecotoxicological risk of a metal contamination. Use of electrochemical detection such as voltammetry may be applicable in the future, but there are still few voltammetry instruments available that are adapted to be used in the field. Size and charge fractionation techniques are simple methods to evaluate metal species in water, but must be validated through comparative studies with other methods. To assess bioavailable fractions of metals in soil, simple batch tests, adapted to the environment of the organisms, may be used.

Innhold

Sammendrag	3
1 Innledning	7
1.1 Formål	8
2 Biotilgjengelighet og toksisitet	9
2.1 Miljørelevante kjemiske former av bly, kobber og antimon	9
2.1.1 Bly	9
2.1.2 Kobber	10
2.1.3 Sink	10
2.1.4 Antimon	11
2.2 Biotilgjengelige tilstandsformer av metaller i avrenningsvann og jord	11
3 Metoder for å måle biotilgjengelig andel av metaller i vann	12
3.1 Teoretiske beregningsmodeller av frie metallioner	13
3.2 Biotic ligand model (BLM)	14
3.3 Forenklet modell for å estimere biotilgjengelig bly	17
3.4 Kjemiske og fysiske spesieringsteknikker	18
3.4.1 Voltammetri	19
3.4.2 Ioneselektiv elektrode (ISE)	20
3.4.3 Passive prøvetakingsteknikker	20
3.4.4 Filtrering	23
3.4.5 Ionebytte	23
3.5 Biologiske metoder	24
4 Metoder for å måle biotilgjengelig andel av metaller i jord	25
4.1 Sekvensiell ekstraksjon	26
4.2 Ristetester	29
4.2.1 Planter	30
4.2.2 Meitemark og andre jordlevende organismer	31
4.2.3 Mennesker og andre høyere organismer	32
4.3 Spesiering i fast stoff	32
4.4 Andre metoder	33
5 Oppsummering og diskusjon	33
Referanser	35

Forkortelser

AGNES-Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping
ASV- Anodic stripping Voltammetry
BCR-Community Bureau of Reference
BLM-Biotic Ligand Model
DGT- Diffusive Gradient in Thin-films
DMT-Donnan Membrane Technique (Donnan membranteknikk)
DOC-Dissolved Organic Carbon (løst organisk karbon)
DTPA-Diethylenetriaminepentaacetic acid
EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid
EQS-Environmental Quality Standard (miljøkvalitetsstandard)
FIAM-Free Ion Activity Model (fritt ion aktivitetsmodell)
GIME-Gel Integrated Voltametric Microsensors
GIME-VIP Gel Integrated Voltametric Microsensors-Voltametric In Situ Profiling System
GSIM- Gill Surface Interaction Model (gjelleoverflateinteraksjonsmodell)
HA-Humic Acid (humussyre)
HFPLM-Hollow Fiber Permeation Liquid Membrane (hulfiber-PLM)
HOAc-Eddikksyre
HMDE- Hanging Mercury Drop Electrode
ISE- Ion Selective Electrode (ioneselektiv elektrode)
LM-Liquid mMembrane
LS-Liquid Solid (væske-fastfase)
NH₄OAc-Ammoniumacetat
NMR-Nuclear Magnetic Resonance (kjernemagnetisk resonans)
PBET-Physiologically Based Extraction Test
PLM-Permeation Liquid Membrane
PNEC-Predicted No Effect Concentration (forventet ingen effektkonsentrasjon)
PTFE-Polytetrafluoretylen
RBALP-Relative Bioavailability Leaching Procedure
SBET-Simple Bioaccessibility Extraction Test.
SLM-Support Liquid Membrane
SLMD- Stabilized/support Liquid Membrane Device
SPE-Solid Phase Extraction (Fast fase ekstraksjon)
TFME- Thin-film Mercury Electrode
VIA-field- Voltammetric In-Line Analyzer for on-Field monitoring
VIP-Voltametric In Situ Profiling System
WHAM-Windermere Humic Aqueous Model (Windermere humussyre modell)

1 Innledning

På forswarets skyte- og øvingsfelt er det avsatt ammunisjonsrester som utgjør kilder for spredning av potensielt giftige metaller. Vannovervåkning av fra skytefeltene har vist at avrenningen av metaller fra feltene kan overskride grenseverdiene for hva som kan utgjøre en risiko for skadeeffekter på akvatiske organismer. En studie som ble gjort i et metallforurenset vann i det nedlagte skytefeltet på Gimlemoen i Kristiansand viste at ørret hadde akkumulert høye konsentrasjoner av bly (Pb) i beinvev, lever og nyre (Mariussen m. fl., 2017). Det er også blitt rapportert at dyr som beiter på grunn som har vært forurenset av ammunisjonsrester har blitt forgiftet (Braun m. fl., 1997). Nedlagte skytefelt som på Gimlemoen har vært gjenstand for omfattende oppryddingstiltak som for eksempel fjerning av forurenset jord fulgt av gjenfylling med rene jordmasser. Slike oppryddingstiltak kan være kostnadskrevede og omfanget av tiltakene baserer seg på etterbruken av området og i hvilken grad forurensingene utgjør en trussel mot dyr og mennesker. Ved eksisterende skytefelt vil ammunisjonsrelatert forurensing kunne spres via avrenning og det må gjennomføres spredningsreducerende tiltak. Ved noen av skytefeltene er det etablert tiltak for å redusere avrenningspotensialet ved for eksempel å lede forurenset vann gjennom reaktivt adsorpsjonsmaterialer, tilsette adsorpsjonsmidler til skytevoller for å redusere mobiliteten til metallene, og ved å avlede avrenningsvann slik at det ikke kommer i kontakt med forurensingene. Slike spredningsreducerende tiltak er enklest å gjøre på nyetablerte skytebaner og på avgrensede definerte områder. På feltskytebaner som dekker større areal og som har en veldig heterogen fordeling av forurensingene, og på eldre skytebaner med høy avrenning av metaller vil spredningsreducerende tiltak være mer komplisert og ressurskrevede.

De viktigste metallene i ammunisjon for håndvåpen som anses som potensielt giftige for dyr og mennesker er Pb, Cu, antimon (Sb) og sink (Zn). Av disse er det bare Pb som står på listen over prioriterte stoffer i den reviderte Vannforskriften, men det er også satt miljøkvalitetsstandarder for Cu og Zn (Miljødirektoratet, 2016). Konsentrasjonene av Pb og Cu i avrenningsvannet fra militære skytefelt i Norge kan overskride myndighetenes miljøkvalitetsstandarder for hva som kan utgjøre en risiko for skadeeffekter på vannlevende organismer og det kan fremmes krav om at det gjennomføres tiltak for å redusere spredningen av forurensingene.

Miljøkvalitetsstandardene i vannforskriften for miljøgifter i vannforekomster ble høsten 2015 revidert. I Vannforskriften benyttes fire forskjellige grenseverdier for metallkonsentrasjon i vann: En grenseverdi for årsgjennomsnittet i vannet (1,3 µg Pb/l for kystvann og 1,2 µg Pb/l for ferskvann) og en grenseverdi for maksimalkonsentrasjon i vannet (14 µg/l for både kystvann og ferskvann). Grenseverdien for årsgjennomsnittet for Pb i ferskvann gjelder for den såkalt biotilgjengelige konsentrasjonen. Vannforskriften sier ikke noe om konsentrasjonen av Cu og Zn i vannet, men det er også satt miljøkvalitetsstandarder for disse. I veilederen for grenseverdier for klassifisering av vann, sediment og biota (Miljødirektoratet, 2016) er grenseverdiene for årsgjennomsnittet av totalkonsentrasjonen av Cu og Zn satt til hhv 7,8 og 11 µg/L. I Sverige er det fastsatt en EQS (environmental quality standard) for Cu på 0,5 µg/l

(årgjennomsnittlig biotilgjengelig konsentrasjon) (HVMFS, 2015), mens denne grensen er satt til 1 µg/l i Storbritannia (DEFRA, 2014).

I tillegg til ammunisjonsforurensning vil akkumulert ammunisjon i jorda på en skytebane utgjøre en potensiell risiko for at dyr og mennesker som ferdes i området blir eksponert (Johnsen m. fl., 2016). Ved opprydning av nedlagte skytefelt blir ofte Forsvaret pålagt å fjerne forurensingen ned til et nivå som minimerer risikoen for eksponering. Graden av tiltaket bestemmes gjerne ut fra hva området skal benyttes til etter tiltak. Det er rapportert tilfeller der dyr har blitt forgiftet av Pb etter å ha ferdes, eller beitet på skytefelt. Det kan være fugl som har fått i seg haglammunisjon eller storfe som har beitet ved et målområde på en skytebane. Dyr kan få i seg ammunisjonsrelatert forurensing via jord og planter. Det er imidlertid ikke alltid en direkte sammenheng mellom forurensingskonsentrasjonen i jord og planter, og graden av eksponering (Johnsen m. fl., 2016). Dette tyder på at det kan være egenskaper i jord og planter som påvirker opptaket av ammunisjonsrelatert forurensing i eksponerte dyr. Den biotilgjengelige andelen av metaller i jord vil altså variere avhengig av forskjellige kjemiske parametere på samme måte som i vann.

1.1 Formål

Avrenningsvann fra forsvarrets skyte- og øvingsfelt kan utgjøre en risiko for skadeeffekter på vannlevende organismer. Miljøkvalitetskriteriene for den årgjennomsnittlige konsentrasjonen av Pb i vann baserer seg på såkalt biotilgjengelig andel. Denne andelen kan være mye lavere enn den totale konsentrasjonen. Det finnes forskjellige metoder for hvordan den biotilgjengelige andelen av metaller fra ammunisjonsrelatert forurensing i vann måles, både teoretisk og praktisk. Ved å beregne den biotilgjengelige andelen av metallene kan man gjøre en bedre vurdering av den faktiske risikoen for skade på eksponerte organismer. Del en av rapporten vil gi en oversikt hvilke metoder, både praktiske og teoretiske, som benyttes for å beregne biotilgjengelig andel av metaller i vann. Rapporten vil også søke å gi eksempler på bruk av disse metodene og om det finnes studier hvor forskjellige metoder har blitt sammenlignet.

Forsvarets skyte- og øvingsfelt er ofte svært forurenset av ammunisjon. Deponert ammunisjon kan utgjøre en risiko for dyr og mennesker som ferdes i området. På samme måte som i vann vil den biotilgjengelige andelen av metaller i jord variere avhengig av forskjellige kjemiske parametere. Opptak i planter vil også sannsynligvis avhenge av faktorer som jordtype og art. Del to av rapporten vil gi en oversikt over litteratur om hvordan biotilgjengelighet av metaller i jord kan undersøkes.

Rapporten vil ha fokus på metaller i håndvåpenammunisjon som Pb, Cu, Zn og Sb ettersom disse stoffene sannsynligvis utgjør den største risikoen for eventuelle skadeeffekter ved en eksponering. Sb kan være et utlekkingsproblem fra skyte- og øvingsfelt, men sammenlignet med Pb og Cu er det gjort relativt få studier på dette halvmetallet.

2 Biotilgjengelighet og toksisitet

Biotilgjengelighet kan defineres på mange måter (NRC, 2003), men vil i denne rapporten bli definert som den andelen av et stoff som kan gjøres tilgjengelig for opptak i en organisme. Dette er i henhold til definisjonen benyttet av ASTM (American society for testing and materials) (ASTM, 1998). I hvilken grad et stoff blir gjort tilgjengelig for opptak i en organisme vil avhenge av faktorer som type organisme (fisk, storfe), hva stoffene er løst i eller bundet til (jord, vann), stedsspesifikke egenskaper til miljøet (pH, ledningsevne) og i hvilken kjemisk form stoffene er i (uorganisk, organisk). For å vurdere biotilgjengeligheten av et stoff må man derfor ta hensyn til mange forskjellige parametere og det er ofte ikke noen entydig måte å beregne dette på. Man må derfor benytte seg av forskjellige modeller og metoder som kan tilnærme seg virkeligheten. Biotic Ligand Modellen (BLM) er et godt eksempel på dette der man i tillegg til toksisiteten til spormetallet også tar hensyn til andre kjemiske parametere som for eksempel pH, innhold av kalsium (Ca) og organisk materiale. Ut fra en totalkonsentrasjon av spormetallet i vannet kan man derfor beregne hvor stor andel av metallet som utgjør en reell risiko for skade. En slik modell forutsetter et solid bakgrunnsmateriale og vil gjerne være utviklet for spesifikke biologiske arter men er kostnadseffektivt å benytte seg av og kan gi en god tilnærming til risiko for skadeeffekter. For å vurdere biotilgjengelig andel av et metall må man imidlertid først ha kunnskap om hvilke kjemiske former av metallet som regnes som mest tilgjengelig for opptak i en organisme.

2.1 Miljørelevante kjemiske former av bly, kobber og antimon

Ammunisjon for håndvåpen består i hovedsak av metallisk Pb, Cu, Sb, Zn og jern (Fe). I tillegg kan noen ammunisjonstyper inneholde wolfram og barium. Rapporten vil fokusere på miljørelevante uorganiske kjemiske former av Pb, Cu, Zn og Sb fra håndvåpenammunisjon. Eventuelle Pb-organiske forbindelser fra krutt vil ikke bli omtalt.

2.1.1 Bly

Den dominerende formen av uorganisk Pb løst i vann er som toverdige kation, Pb^{2+} (Powell m. fl., 2009). Pb^{2+} kan danne komplekser med en rekke vanlige anioniske forbindelser i vandig miljø som Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , og PO_4^{3-} . I tillegg har Pb^{2+} sterk affinitet til organiske forbindelser som humusstoffer. I vann med $pH < 6$ uten organisk materiale vil fritt Pb^{2+} være den dominerende formen. Ved økende pH ($pH < 9$) vil andelen kompleksbundet vannløselig Pb i form av $PbSO_4$, $PbOH^+/PbOH_2$ og $PbCO_3/Pb(CO_3)_2$ gradvis øke. Pb^{2+} har høy affinitet til organisk materiale som for eksempel humusstoffer (Powell m.fl. 2009). Humusstoffer består i all hovedsak av fenoler og karboksylsyrer med varierende molekylstørrelse og har en negativ ladningsstruktur (Mariussen m. fl., 2008). Affiniteten til Pb^{2+} til humusstoffer øker med økende pH sannsynligvis på grunn av at den negative ladningen til humusstoffene øker. Andelen fritt Pb^{2+} vil dermed være høyest i vann med lav pH og lavt innhold av organisk materiale.

På overflaten av blyammunisjon som deponeres vil det raskt starte en oksidasjonsprosess og man får dannet blymineraler som cerussitt (PbCO_3), hydrocerussitt [$\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$], og anglesitt (PbSO_4) (Lin m. fl., 1995, 1996; Cao m. fl., 2003; Hettiarachchi and Pierzynski, 2004). Hydrocerussitt er den dominerende. I tillegg vil Pb og blymineraler som løser seg fra ammunisjonen ha høy affinitet og lett adsorberes til organisk materiale og leirmateriale i jorda (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004). Leirpartikler har et stort overflateareal, har en negativ ladningsstruktur, og har utbyttable kationer som for eksempel Ca og Mg (Appelo og Postma, 2007).

2.1.2 Kobber

På mineralform foreligger Cu for det meste som silikat- og oksidsesier eller som miksede kobber-/jernsulfid mineraler (van Loon and Duffy, 2000). Den dominerende formen av uorganisk Cu løst i vann er som toverdige kation, Cu^{2+} (Powell m. fl., 2007). I sjøvann kan også monovalent Cu være vanlig (Cu^+). Cu^{2+} kan som Pb^{2+} danne komplekser med en rekke vanlige anioniske forbindelser i vandig miljø som Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , og PO_4^{3-} . I tillegg har Cu^{2+} sterk affinitet til organiske forbindelser som humusstoffer. I vann med $\text{pH} < 7$ uten organisk materiale vil fritt Cu^{2+} være den dominerende formen med et lite innslag av CuSO_4 (Powell m. fl. 2007). Ved økende pH ($\text{pH} > 7$) vil andelen kompleksbundet vannløselig Cu i form av CuCO_3 gradvis øke. I naturlige vannforekomster vil imidlertid fritt Cu raskt kunne adsorberes til organisk materiale eller uorganiske kolloider og partikler på tilsvarende måte som Pb. Andelen fritt Cu^{2+} vil være høyest i vann med lav pH , men andelen vil sannsynligvis være lavere enn for Pb. Ladningsfraksjonering av forurenset vann ($\text{pH} \sim 5$) fra Gimlemoen viste at det var en mye større andel av Pb som var i kationisk form enn Cu, hvilket tyder på at Cu i større grad var kompleksbundet til organiske- eller uorganiske kolloider (Mariussen m. fl. 2016). Kilden til Cu-forurensing på skytefelt er prosjektiler som er dekket med en Cu- og Zn-legering samt patronhylsteret som oftest er av messing. Det kan danne seg et kobberoksidlag (CuO , Cu_2O) eller kobberkarbonat (CuCO_3) på overflaten (Qiu m. fl., 2011). Det grønne belegget som noen ganger kan observeres på overflaten av et kobberbelagt prosjektil kan være et kobberkarbonat som malachite [$\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$]. Man antar at messing i kontakt med vann vil reagere med hydroksylionet i vann til vandige Zn-(OH) eller Cu-(OH) forbindelser som kan gå i avrenning eller dehydreres til et belegg av kobberoksid (Cu_2O) eller sinkoksid (ZnO) på overflaten (Qiu og Leygraf, 2011).

2.1.3 Sink

Kilden til Zn-forurensing på skytefelt er, som beskrevet ovenfor, prosjektiler som er dekket med en Cu- og Zn-legering samt patronhylsteret som oftest er av messing. Den dominerende formen av uorganisk Zn løst i vann er som toverdige kation, Zn^{2+} (Powell m. fl., 2013). Zn^{2+} danner i liten grad komplekser med vanlige anioniske forbindelser i vandig miljø som Cl^- , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , og PO_4^{3-} ved $\text{pH} < 8,4$. Ved høyere pH vil andelen av ZnCO_3 øke. Som for Cu og Pb danner Zn komplekser med organisk materiale som fulvinsyrer (Duker m. fl., 1995). Affiniteten øker med økende pH ($\text{pH} 3-8,5$) før den synker igjen ved $\text{pH} > 8,5$ (Duker m. fl., 1995). Zn virker imidlertid å ha lavere affinitet til organisk materiale enn Pb og Cu (for eksempel Antoniadou og Golia, 2015; Hernandez m. fl., 2007). Ladningsfraksjonering av forurenset vann

fra Gimlemoen og Avgrunnsdalen viste at Zn har en mye større andel på kationisk form (>90%) enn Cu og Pb (Heier m. fl., 2009; Mariussen m. fl. 2017). Andelen fritt Zn^{2+} vil derfor sannsynligvis være høyere enn både Pb og Cu.

2.1.4 Antimon

Sb som benyttes som en legering i blyammunisjon for å øke hardheten til prosjektilet, vil i kontakt med oksygen og vann, oksidere til femverdig Sb(V) (Ilgen m. fl., 2014). Målinger av Sb i forskjellige typer vann og avrenningsvann har vist at Sb primært eksisterer i formen $Sb(OH)_6^-$. Ladningsfraksjonering av vann fra forurenset skytefelt viser også at over 90% av løst Sb er i anionisk form (Heier m. fl., 2009; Mariussen m. fl. 2017). I oksygenfattig miljø, som for eksempel i jordvæske kan man finne spor av treverdig Sb(III). Treverdig Sb vil løst i vann sannsynligvis eksistere som $Sb(OH)_3$. Det er vist at både treverdig og femverdig Sb har noe affinitet til organisk materiale (Tighe m. fl. 2005) og sekvensiell ekstraksjon av torv viste at en stor andel av Sb var knyttet til den organiske fraksjonen (Mariussen m. fl., 2017). Skjebnen til Sb i blyammunisjon er ganske uklar, men lekkasjestudier har vist at Sb løses ut mye letter fra både forurenset jord og ammunisjon, enn Cu og Pb (Mariussen, 2012). Utlekking av Sb fra jord er pH-avhengig og i motsetning til Pb, Cu og Zn vil utlekking av Sb øke med økende pH (Santillan-Medrano and Jurinak 1975; Johnson m. fl. 2005; Gundersen and Steinnes 2003; Sanderson m. fl. 2012).

2.2 Biotilgjengelige tilstandsformer av metaller i avrenningsvann og jord

Forurenset avrenningsvann fra et skytefelt består av forskjellige tilstandsformer av uorganiske metallforbindelse, og metallforbindelser assosiert med uorganiske og organiske kolloider og partikler. De biotilgjengelige tilstandsformene av metaller er forenklet sagt de tilstandsformene av metallene som tas opp i en organisme og er mest toksiske. Det finnes imidlertid eksempler der stoffer er biotilgjengelige uten å være spesielt toksiske. For eksempel er det enkelte organiske former for arsen (As) som lett tas opp i en organisme, men er lite toksiske, mens det er uorganiske og mindre biotilgjengelige arsenforbindelser som er mye mer toksiske (Neff, 1997). Dette betyr at høy biotilgjengelighet ikke nødvendigvis betyr det samme som høy toksisitet. Man må derfor ha et relativt godt bilde av hvilke tilstandsformer av et stoff man kan forvente å finne i forurenset vann eller jord. For Pb og Cu i avrenningsvann eller porevann er det foreslått at det er fraksjonen med frie metallioner som utgjør den mest biotilgjengelige og toksiske fraksjonen (Peijnenburg og Jager, 2003). Pb, som forekommer i kompleks med anioner (for eksempel $PbCO_3$) eller med humussyrer, er i forskjellige studier vist seg å være både mindre toksiske og biotilgjengelige. Dette skyldes delvis at de er i en tilstandsform som i mindre grad tas opp i kroppen. For eksempel så vil fritt Pb^{2+} -ion kunne tas opp i en organisme via Ca^{2+} -transportører (Rogers and Wood, 2004). Pb som er kompleksbundet vil i mindre grad tas opp i organismen via Ca^{2+} -transportører og dermed være i en mindre biotilgjengelig tilstandsform. Andelen fritt metallion i vann er imidlertid ikke en konstant størrelse, og man har flere varianter av kompleksbundet metall som er løst bundet og som kan være biotilgjengelig.

Derfor brukes også begrepet labilt metallion, som også kan omfatte andre metallspesier enn fritt ion.

Sb eksisterer som Sb(OH)_6^- under normale avrenningsforhold. Noen studier tyder på at det er en liten andel av Sb i avrenningsvann som kan være assosiert med organisk materiale (Pilarski m. fl. 1995; Buschmann and Sigg 2004; Johnson m. fl. 2005), men det er ikke vist noen mekanismer for dette. Selv om Sb(OH)_6^- regnes som lite biotilgjengelig i seg selv så vil det være Sb i denne tilstandsformen som i denne rapporten vil defineres som den biotilgjengelige fraksjonen ved en karakterisering av forurenset avrenningsvann. Kunnskapen om toksisitet og opptak av forskjellige Sb forbindelser er imidlertid veldig liten slik at det i framtiden kanskje vil være andre tilstandsformer av Sb som vil være mer interessante i et økotoksikologisk perspektiv.

Kjemien i jord vil være mye mer komplisert enn i avrenningsvann, og man vil i teorien finne mange flere forskjellige tilstandsformer av metaller fra ammunisjon enn de man finner i avrenningsvann og porevann. For Pb og Cu er det andelen frie eller labile metallioner som kan mobiliseres fra jorda som regnes som den mest biotilgjengelige og toksiske fraksjonen. Sb fra ammunisjon i jord vil sannsynligvis bestå av en blanding metallisk Sb^0 sammen med tre- og femverdige tilstandsformer. Andelen frie metallioner i jord som kan mobiliseres avhenger av det miljøet det er i. I praksis vil det si hvor stor andel labile metallioner som løser seg ut i den væska jorda er blandet i. På forurenset grunn vil det si andelen metallioner som løser seg ut i et vandig miljø, for eksempel etter et regnskyll eller i en vannmettet myr. Dette vil være relevant for akvatiske organismer og planter som eksponeres for dette vannet. Forurenset jord kan imidlertid bli spist av beitende dyr og bli blandet sammen med sur magesaft, hvilket sannsynligvis vil mobilisere en mye større andel biotilgjengelige metallioner fra jorda enn fra vann. For å vurdere biotilgjengelig andel av et stoff må man derfor også ta hensyn hva slags organisme som blir eksponert og hvordan organismen eksponeres.

3 Metoder for å måle biotilgjengelig andel av metaller i vann

Den biotilgjengelige andelen av spormetaller i avrenningsvann har tradisjonelt blitt definert som den såkalte løste fraksjonen av spormetallene. Man har lenge visst totalkonsentrasjonen av Pb og Cu i vann ikke gjenspeilte den reelle toksisiteten til metallene på akvatiske organismer (Rand og Petrocelli 1985). Av praktiske årsaker har man ofte definert spormetaller analysert i vann filtrert gjennom et $0,45 \mu\text{m}$ filter som den løste fraksjonen av spormetallene. Andelen som sitter fast på filteret defineres som den partikulære fraksjonen av spormetallene. I noen tilfeller har denne metoden gitt en brukbar tilnærming for å estimere den faktiske giftigheten til det kontaminerte vannet (Rand og Petrocelli, 1985). Imidlertid vil spormetallene som filtreres

gjennom et filter på 0,45 µm bestå av en blanding av forskjellige metallspesier assosiert med løste organiske og uorganiske kolloider, frie- og kompleksbundne ioner. Kolloider kan defineres som løste molekyler i varierende størrelse på mellom 1 nm og 1 µm (Gustafsson og Gschwend, 1997). Den biotilgjengelige andelen av spormetallene inkluderer de frie ionene samt den andelen metall som er løst bundet til komplekser og lett kan frigjøres som fritt ion og eventuelle andre metallspesier som også kan tilgjengeligjøres for opptak. Denne fraksjonen blir også kalt den labile, eller reaktive fraksjonen av metallioner. Ettersom det er spormetallene i form av labile ioner som regnes for de mest toksiske vil derfor en enkel filtrering mange tilfeller ikke være tilstrekkelig for å vurdere giftigheten til vannet. Man må derfor gjøre en spesiering av analytten for å beregne den biotilgjengelige andelen i vannet. En spesiering vil si å identifisere som den atomiske eller molekylære formen av en analytt. Det finnes i hovedsak to metoder for spesiering av metaller i en løsning. Den ene tilnærmingen baserer seg på beregningsmodeller som benytter kjente kjemiske parametere fra løsningen, som for eksempel pH og løst organisk innhold, for å finne ut hvilke spesier metallet befinner seg på. Et eksempel på dette er den såkalt WHAM-metoden. Den andre tilnærmingen baserer seg på direkte måling eller andre mer eller mindre indirekte kjemiske metoder for spesiering av metaller i løsning. Eksempler på dette er å måle andelen frie metallioner direkte som for eksempel med ioneselektive elektroder. Andre metoder gjør en tilnærming ved å analysere andelen metaller som er løst i spesifikke fraksjoner etter en opparbeidelses- eller filtreringsprosedyre. Et eksempel på dette er ultrafiltrering av vannet. Andelen biotilgjengelig metall løst i vann blir også beregnet ved hjelp av passive prøvetakere. Dette forutsetter en antagelse av at bare de labile ionene adsorberes av prøvetageren og at man kan relatere opptaket i prøvetakeren til totalkonsentrasjonen i bekken.

3.1 Teoretiske beregningsmodeller av frie metallioner

Likevektsbaserte modeller benyttes for å kalkulere konsentrasjon av frie og labile metallioner i naturlig vann. NICA-Donnan-modellen og Stockholm Humic-modellen er overflatemodeller for ioneadsorpsjon til humus (Han m. fl., 2013). NICA-Donnan-modellen antar kontinuerlig distribusjon av bindingssteder (Peijnenburg and Jager, 2003). Windermere Humic Aqueous Model (WHAM) inkluderer ioneadsorpsjon til humus, adsorpsjon til kolloider og oksider, binding til leirpartikler, sorpsjon-/desorpsjonsreaksjoner med fulvinsyrer, utfelling og konkurrerende ioner (Han m. fl., 2013, Peijnenburg and Jager, 2003). WHAM er designet for å kalkulere den kjemiske formen av stoffet ved likevekt i vann, sedimenter og jord. Modellen er spesielt utviklet for tilfeller der den kjemiske spesiering en domineres av organisk materiale. Metoden er en kombinasjon av "Humic ion-Binding Model V" og en enkel uorganisk spesieringsberegning for vandige løsninger (Tipping, 1994; Evisa). GEOCHEM og MINEQL+ er også eksempler på spesieringsmodeller. (Peijnenburg and Jager, 2003). GEOCHEM er et termodynamisk spesieringsprogram som kan estimere interaksjon mellom metaller og ligander og kalkulerer den frie aktiviteten til det gitte ionet (Shaff m. fl., 2010). Innputtparametere til GEOCHEM er de vanligste hovedionene, totalt løst metall av interesse og pH. Programmet kalkulerer ionestyrken i løsningen og korrigerer stabilitetskonstanten i forhold til dette. Outputen er likevektskonsentrasjonen av alle spesiene (Holm m. fl., 1995). MINEQL+ er en kjemisk likevektsmodell som kan opereres både ved lave temperaturer og lav til moderat

ionestyrke. Kalkulasjoner kan utføres enkelt ved at kjemiske komponenter velges fra en meny, deretter skannes den termodynamiske databasen og beregninger utføres (MINEQL+, 2015). FIAM (free ion activity model) er en modell der samspillet mellom de kjemiske spesiene av metallet i løsning og organismen benyttes for å forutse opptak og toksisitet, denne modellen benyttes mye i akvatisk toksikologi. BLM tar også hensyn til metallens interaksjon med organiske og uorganiske ligander og konkurrerende ioner som også kan binde seg til den biotiske liganden og er kanskje det verktøyet som er hyppigst benyttet for å si noe om biotilgjengeligheten og toksisiteten til metaller i vann (Peijnenburg and Jager, 2003). BLM er beskrevet i eget kapittel 3.2. Ved å benytte en blanding av en modell som beregner den teoretiske andelen frie ioner (Slik som WHAM), og analytiske metoder (slik som DGT) kan man få en god indikasjon på hvor stor del av metallene i løsning som potensielt er biotilgjengelige (Han m. fl., 2013; Pesavento m. fl., 2009).

Sammenlignende studier viser at en av de største utfordringene med de teoretiske modellene er binding til organisk materiale som enten defineres som humussyrer eller fulvinsyrer. I en sammenlignende studie av Unsworth m. fl. (2006) beregnet de teoretiske modellene (WHAM og MINTEQ) en mye lavere andel fritt metallion (Pb og Cu) enn det som ble målt med to passive prøvetakingsmetoder (HF-PLM og DMT) som man antok gav det mest korrekte estimatet. To av forklaringene var at det i naturlige vann er en stor kompleksitet og variasjon i humussyrer, og hvordan Fe påvirker metallens binding til humussyrene. Ved å sammenligne andelen labilt metall mellom de to teoretiske modellene, og en passiv prøvetakingsteknikk (DGT) og en voltammetrisk metode (GIME) fikk man bedre samsvar.

Manglende samsvar mellom WHAM-beregnet andel av labilt Cu, og DGT og en voltammetrisk metode (Differential pulse ASV) ble også rapportert av Bourgeault m. fl. (2013). I WHAM-modellen ble det antatt at 50 % av løst organisk materiale forekommer som fulvinsyre og under disse forutsetningene stemte WHAM-beregningene dårlig overens med andelen frie kobberioner målt med ISE. Ved å optimalisere fulvinsyreinnholdet ved hver enkelt vannkvalitet kunne man forbedre den WHAM-predikerte Cu^{2+} konsentrasjonen. Andelen predikert med WHAM var likevel 1-3 størrelsesordener lavere enn konsentrasjonen målt med ISE. Tilsvarende er også rapportert av andre (Nolan m. fl., 2003), og det kan derfor virke som om WHAM-modellen antar at Cu et er sterkere bundet til organisk materiale enn det som faktisk er tilfelle. Valg av teoretisk modell kan derfor være avgjørende for hvor bra tilnærminger de gjør. Nolan m. fl. (2013) fant at WHAM antok en mye sterkere binding av Pb^{2+} og Cu^{2+} til løst organisk materiale enn det som ble antatt av GEOCHEM.

3.2 Biotic ligand model (BLM)

Toksisiteten og biotilgjengeligheten til metaller i vann, avhenger av vannets kjemi og metallens fysiologiske tilstandsform (USEPA 2003). BLM er utviklet for å kunne predikere opptaket og/eller giftigheten av metaller i akvatiske organismer (van Loon and Duffy, 2000; Paquin m. fl., 2002). BLM er en geokjemisk likevektsmodell koblet med en toksikologisk dose-responsmodell, som predikerer hvor mye av metallene som vil binde seg til den biotiske liganden (van Loon and Duffy 2000; Di Toro 2001 m. fl., 2001; Paquin m. fl., 2002). En biotisk

ligand er en biologisk reseptor, for eksempel gjellene på en fisk. Ved hjelp av en slik modell kan den biotilgjengelige andelen av et metall regnes ut, og det kan si noe om denne er over eller under for eksempel LC₅₀. Et stoff er giftig om en stor nok mengde av stoffet fester seg på den biotiske liganden. Det er flere faktorer som vil påvirke om et potensielt giftig metall vil feste seg til denne liganden. For eksempel kan metaller forme komplekser med både organiske og uorganiske ligander, dette vil føre til at det er færre tilgjengelige metaller som kan feste seg til den biologiske liganden. Høy andel av organisk materiale som i teorien kan forme ligander med metallet i løsning vil derfor minke biotilgjengeligheten og derfor giftigheten til metallet. Høyt innhold av andre kationer i løsning kan også minke sannsynligheten for at et metall fester seg til den biotiske liganden, fordi disse vil konkurrere om plassen. BLM baserer seg på å finne andelen frie metaller i løsning, da det er disse som anses som biotilgjengelig. Ved hjelp av en matematisk modell finner BLM hvor mye av et stoff som i teorien vil feste seg på den biotiske liganden. I modellen tas det hensyn til en rekke faktorer, blant annet pH, temperatur, ionestyrke og humusinnhold. Metalltoksisitet defineres i denne modellen som den konsentrasjonen metall som antas å gi 50 % dødelighet hos en populasjon under en viss tidsperiode (LC₅₀). I BLM antas det at mengden metall som må være akkumulert på en biotisk ligand for å oppnå 50 % dødelighet alltid er konstant, uavhengig av kjemien i vannet. Denne verdien kalles LA₅₀ (lethal accumulation). Denne assosieres så med LC₅₀ for stoffet, som vil varierer med vannets kjemi. Det er vist at ved riktig kalibrering kan BLM benyttes for å finne LC₅₀ verdier i et bredt spekter av vannkvaliteter. Ut fra dette kan man videre beregne miljøkvalitetsstandarder som skal beskytte organismene som lever i det aktuelle området. Opptak av metall på gjellene kan variere med fiskens livsstadier og eksponering for metallet (Paquin m. fl., 2002). BLM er basert på to forskjellige modeller. Den biologiske biten baserer seg på Gill site interaction model (GSIM) og den kjemiske delen baserer seg på Free ion activity model (FIAM) (Cousins m. fl., 2009, Paquin m. fl., 2002, Di Toro m. fl., 2001). For å estimere andelen frie ioner er geokjemiske modeller som WHAM og MINEQL+ benyttet. Generelt er det frie metallioner (mn⁺) som antas som den mest giftige spesien, men noen BLM-modeller tar også hensyn til giftighet forårsaket av andre spesier (f.eks. MOHⁿ⁻¹, MCIⁿ⁻¹).

Det finnes flere programvarer for å regne ut BLM. Hydroqual inc utviklet en slik modell som finner LC₅₀-konsentrasjoner for Cu, Pb, kadmium (Cd) og Zn for to fiskearter og tre vannlopperarter (*Pimephales promelas* (storhodet ørekyt), *Oncorhynchus mykiss* (regnbueørret), *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dupia*). Modellen kan også predikere organisk og uorganisk spesiering av metallet (HydroQual, 2005). Denne modellen driftes nå av Windward (www.windwardenv.com) og skal predikere både kronisk og akutt forgiftning av akvatiske organismer. Et verktøy som predikerer kronisk forgiftning av Cu ble benyttet når EU risikovurderte Cu. Den internasjonale blyforeningen (ILA) har utviklet en kronisk BLM for Pb (ILA, 2016). Disse verktøyene for å predikere kronisk forgiftning krever ganske mye data. I Hydroqual sin modell kreves for eksempel temperatur, pH, løst organisk karbon (DOC), andelen humussyrer (HA), Ca, Mg, Na, K, SO₄, Cl, alkalinitet (CaCO₃) og S. Det er derfor utviklet en enklere modell som baserer seg på BLM, men som kun trenger Ca, pH og DOC (Bio-met, Garmo m. fl., 2015). Det tyder for øvrig på at denne modellen kan underestimerer giftigheten av Cu i typiske norske, kalsiumfattige vann (Garmo m. fl., 2015). US-EPA innehar et

risikovurderingsverktøy som beregner både akutt og kronisk eksponering, men denne gjelder foreløpig kun for Cu.

En svakhet ved BLM-metoden er at den antar at det er kjemisk likevekt. Det kan ta opp til et døgn før Cu og fiskegjeller er i kjemisk likevekt (Hatano and Shoji, 2010). Når fisken eksponeres for Cu, skjer det en relativt rask økning av Cu bundet til gjellene. Denne økningen skjer over et par timer til et døgn (Di Toro m. fl., 2001). Eksponeringstid er noe som er viktig for å kunne si noe om toksisiteten av metaller på vannlevende organismer (Garmo m. fl., 2015, Hatano and Shoji, 2010).

De fleste retningslinjer for vannkvalitet baserer seg på akutt eller kronisk bioassay-tester med individuell kontaminering. I noen tilfeller kan en tenke seg at effekten av to metaller vil gi en additiv effekt, mens i andre tilfeller vil de kunne gi en mindre enn additiv effekt (antagonistisk) eller en større enn additiv effekt (synergistisk) (Cooper m. fl., 2009). Det er usikkert om man ved hjelp av en likevektsmodell for ett enkelt element på en enkel biotisk ligand, også kan forutse toksisiteten til en blanding av metaller. Hvis forskjellige metaller bindes til samme opptakssete (eller biotiske ligand), vil bioakkumulering minke (eller forbli uendret) for hvert enkelt metall når to metaller er til stede. I en studie av Di Toro m. fl., (2001) ble det funnet at BLM kan forutse LC_{50} for Cu og sølv for både fisk og daphnier og at den kunne benyttes for å beregne LC_{50} når det er flere metaller i blanding om disse har den samme type giftighet på den samme biotiske liganden. BLM har derfor kapasitet til å modellere additiv effekt av metaller ved hjelp av en to-sete modell, mens synergisme vanskelig kan beskrives ved hjelp av en likevektsmodell. For å kunne modellere slike tilfeller bedre, er kunnskap om organismens bindingsseter og bindingsmekanismer essensielt (Chen m. fl., 2010).

BLM metoden er ikke tilpasset alle former for vannkvaliteter og kan gi feil estimater på den biotilgjengelige andelen av metall i vannet. Statens veivesen benyttet BLM for å finne ut om metallkonsentrasjonen i tunnelvaskevannet kunne være giftig for dyrene i resipienten. Det viste seg at LC_{50} predikert ved hjelp av BLM var svært høy, mest sannsynlig på grunn av høyt innhold av DOC. De fleste av dyrene som levde i fangdammen nedstrøms tunnelen døde som følge av hendelsen. I dette tilfellet fungerte BLM dårlig, da DOC ikke kom fra humus eller andre naturlige kilder, men sannsynligvis fra såpe. DOC konsentrasjonen var også høyere enn det modellen var tilpasset til (Johansen and Thygesen, 2013).

BLM-metodene er kalibrert for en vannkjemi som er mest vanlig i Europa. Vannkjemien i Skandinaviske vann avviker i stor grad fra denne både i innhold av Ca, pH, humus og alkalinitet (Cousins m. fl., 2009; Hoppe m. fl., 2005; Garmo m. fl., 2015). Skandinaviske vann betegnes derfor ofte som myke. I Norge kan så mange som 90% av innsjøene ha et innhold av Ca som er utenfor valideringsområdet (Garmo m. fl., 2015). I mange tilfeller, særlig i sure vann, medfører dette at modellen beregner at 100% av metallet er biotilgjengelig. Dette tilsier at man kan bruke modellen utenfor valideringsområdet. I følge Garmo m. fl. (2015) vil imidlertid BLM-modellen kunne underestimere toksisiteten til metaller. Det finnes blant annet forskjellig tilgjengelige BLM-modeller som kan gi forskjellige beregninger av grenseverdier. I en studie av Garmo m. fl., (2015) indikerte en modell (Biomet ver 2.3) at den underestimerte giftigheten av Cu i vann

med pH og Ca-konsentrasjoner innenfor valideringsområdet, men med et lavt innhold av organisk materiale. Tilsvarende er vist av Hoppe m. fl., (2015) i Ca-fattige vann.

FFI har sammen med Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) gjort en undersøkelse av et fiskebærende vann, Kyrstjønn, på det nedlagte skytefeltet på Gimlemoen i Kristiansand. Vannkvalitetsdata fra Kyrstjønn ble satt inn i to forenklete BML-modeller for Cu og Zn, hhv Biomet (www.bio-met.net) og PNEC.pro (www.pnec-pro.com). pH og Ca-konsentrasjonen i vannet fra Kyrstjønn (pH < 5,6 og Ca < 2 mg/L) lå utenfor valideringsområdet til Biomet (pH 6-8 og Ca 3,1-93 mg/L). PNEC.pro beregner en PNEC-verdi (predicted no effect concentration). Ved konsentrasjoner av stoffet lavere enn PNEC forventes ingen effekter på noen organismer i et habitat. Biomet beregner EQS-verdier (environmental quality standards) og den biotilgjengelige andelen av metallene. Ved konsentrasjoner lavere enn EQS forventes ingen effekter å oppstå på dyresamfunn i et habitat. PNEC beregnes ut fra økotoksikologiske studier på enkeltorganismer i et habitat og benyttes for å beregne EQS-verdier som skal beskytte hele samfunn i et habitat. I en overordnet BML-modell skal disse to verdiene i prinsippet gi tilnærmet samme estimat. Biomet beregnet en EQS (environmental quality standard) på 17,7 µg/L og 80,7 µg/L for henholdsvis Cu og Zn, mens PNEC.pro beregnet en PNEC på 56,7 µg/L og 7,0 µg/L for henholdsvis Cu og Zn. Det store avviket i estimatene mellom de to modellene indikerer at man må benytte de med stor grad av varsomhet.

3.3 Forenklet modell for å estimere biotilgjengelig bly

I forbindelse med EUs vanddirektiv har det blitt utarbeidet miljøkvalitetskriterier for Pb i vann. Ettersom grenseverdien for årgjennomsnittet for Pb i ferskvann gjelder for den såkalt biotilgjengelige konsentrasjonen er det foreslått en forenklet modell for å beregne dette for Pb (European Commission 2011, 2014). Modellen tar kun utgangspunkt i innholdet av løst organisk materiale (DOC) og den estimert miljøkvalitetsstandard (EQS) som er satt til 1,2 µg/L. Modellen skal være validert for konsentrasjoner av DOC lavere enn 17, Ca-konsentrasjon høyere enn 2 mg/L, og pH på mellom 6.0 og 8.5. Modellen er blant annet benyttet av NIVA i et av overvåkingsprogrammene for avrenningen av metaller fra nedlagte skytefelt i Norge (Garmo, 2016). Konsentrasjonen av biotilgjengelig Pb beregnes ut fra formel (1):

$$[\text{Pb}]_{(\text{biotilgjengelig})} = [\text{Pb}]_{(\text{løst, } 0,45\mu\text{m})} \times (\text{EQS}_{(\text{referanse})} / \text{PNEC}_{(\text{stedsspesifikk})}) \quad (1)$$

$[\text{Pb}]_{(\text{løst, } 0,45\mu\text{m})}$ er konsentrasjonen av den løste fraksjonen i vannet, EQS er Miljøkvalitetsstandarden for Pb i ferskvann som er satt til 1,2 µg/L. $\text{PNEC}_{(\text{stedsspesifikk})}$ er predicted no effect concentration for det aktuelle vannet.

$\text{PNEC}_{(\text{stedsspesifikk})}$ kan beregnes ut fra formel (2):

$$\text{PNEC}_{(\text{stedsspesifikk})} = \text{EQS}_{(\text{referanse})} + (1,2 \times ([\text{DOC}_{(\text{stedsspesifikk})}] - [\text{DOC}_{(\text{referanse})}]))) \quad (2)$$

DOC er konsentrasjonen av organisk materiale i den løste fraksjonen (0,45 µm) i vannet. $\text{DOC}_{(\text{referanse})}$ er normalisert ut fra en DOC-konsentrasjon på 1 mg/L. Klammene med

konsentrasjonen av DOC er ganget opp med en faktor på 1,2. Det er en faktor som er beregnet ut fra en toksisitetstudie av Pb på en organisme (Hjuldryret *Philodina rapida*) med økende mengde løst organisk materiale i vannet. Denne organismen er den som har respondert minst på økende mengde DOC i vannet. Toksisiteten av Pb avtok som en funksjon av DOC-konsentrasjonen med et stigningstall på 1,2. Et lavt tall vil gi et mer konservativt estimat på PNEC (stedsspesifikk).

Formel (1) og (2) kan settes sammen for enkelt å beregne $[Pb]_{\text{(biotilgjengelig)}}$ i ligning (3):

$$[Pb]_{\text{(biotilgjengelig)}} = [Pb]_{\text{(løst, 0,45}\mu\text{m)}} \times 1,2 / (1,2 + 1,2([\text{DOC}_{\text{(stedsspesifikk)}}] - 1)) \quad (3)$$

Dette verktøyet tar bare hensyn til innholdet av løst organisk materiale i vannet og er basert på økotoksikologiske studier der man har observert at innholdet av DOC er den viktigste parameteren for å beskrive giftigheten av Pb. En dobling av DOC gir en halvering av biotilgjengelig Pb, og en dobling av PNEC. Ligningen for å estimere biotilgjengelig konsentrasjon av Pb er sammenlignet med teoretiske beregningsmodeller av frie metallioner som VisualMINTEQ og WHAM og man har funnet gode korrelasjoner mellom dem.

Den forenklete metoden for å beregne biotilgjengelig konsentrasjon av Pb er ikke validert for pH lavere enn 6,0. Norske vann er ofte sure og det kan være fare for at metoden vil underestimere toksisiteten av Pb ettersom pH er en viktig faktor for biotilgjengeligheten av Pb. Ørret fra Kyrstjønn på Gimlemoen har akkumulert svært høye konsentrasjoner av Pb og har sterkt nedsatt ALA-D funksjon som følge av Pb-eksponeringen (Mariussen m. fl., 2017). Vannet på Kyrstjønn har en pH lavere enn hadde modellene er validert for (pH < 5,5) og en Ca-konsentrasjon på litt under 2 mg/L. Konsentrasjonen av løst Pb i Kyrstjønn lå på ca 12 µg/L i 2012. Setter man inn data for DOC (11 mg/L) i ligning (2) og (3) får man en stedsspesifikk PNEC på 13,2 µg/L Pb, med en biotilgjengelig konsentrasjon av Pb på ca 1,1 µg/L. Ettersom der ble funnet klare indikasjoner på at ørret fra Kyrstjønn var påvirket av Pb eksponering vil ikke denne forenklete tilnærmingen gi et riktig stedsspesifikt estimat på biotilgjengelig andel og toksisitet av Pb på akvatiske organismer. Rapporten til Garmo (2016) dekket avrenning fra 15 skytefelt og ca 90 prøvepunkter. Det var ca 30 prøvepunkter som hadde registrert en pH mindre enn 6,0. Størrelses- og ladningsfraksjonering av vannet fra Kyrstjønn viste videre at konsentrasjonen av Pb på kationisk form var 6,0 µg/L og andelen Pb < 10 kDa var på 2,4 µg/L. Dette tyder på en mye høyere biotilgjengelig andel av Pb enn 1,1 µg/L som beregnet ut fra ligning (3).

3.4 Kjemiske og fysiske spesieringsteknikker

Prøvetagere i vann kan samle opp prøver som gjenspeiler den biotilgjengelige andelen metaller i vannet. Slike prøvetagere kan deles i to grupper: aktive og passive prøvetagere. Aktive prøvetagere tiltrekker seg gjerne analytten ved hjelp av en pumpe eller andre mekaniske anretninger. Ulempen med dette er at det kreves strøm eller batterier for å kunne ta prøver. I passive prøvetagere må analytten gjerne diffundere eller på annen måte fraktes over en barriere før det binder seg til et oppsamlingsmedium. Oppsamlingsmediet er enten en væske (f.eks.

heksan) eller et fast stoff (f.eks. EDTA eller Chelex). Passive prøvetakere kan utformes slik at det kun er ønsket stoff og spesie som tas opp. Tre faktorer som avgjør hva som tas opp i en passiv prøvetaker er opptaksmediet, diffusjonslengde og porestørrelse i barrieren. Det finnes også spesieringsteknikker som krever at prøven bearbeides på lab, eller på stedet, etter at den er tatt. Ulempen med disse metodene er at spesieringen av metaller (og andre stoffer) i prøven kan forandre seg før analysen utføres. De eneste metodene som kan måle frie metallioner direkte er ved hjelp av elektrokjemiske målingsmetoder. Ulempen med elektrokjemiske målingsmetoder har tradisjonelt vært lave deteksjonsgrenser, interferenser med andre ioner og få instrumenter som er tilpasset feltbruk.

3.4.1 Voltammetri

Voltammetri er en teknikk der strøm måles som en funksjon av spenningspotensialet (Desmond m. fl., 1998; Pesavento m. fl., 2009; Tercier-Waeber m. fl., 2008). Konsentrasjonen av labile spesier analyseres ved å måle strømmen i en løsning når metaller tas opp i, eller frigjøres fra en elektrode. Instrumentet består av en voltammetrisk analysator, en tre-elektrode-celle (arbeidende-, referanse- og motelektrode) og en datamaskin. Denne metoden har lav deteksjonsgrense ($< 1 \mu\text{g/L}$), og den kan analysere flere metaller. Tradisjonelt har arbeidselektroden vært belagt med en tynn film av kvikksølv der metallionet man ønsker å måle reduseres til elementært metall og danner et kvikksølv-metall kompleks (amalgam). Avsatt metall stripres deretter av amalgamet gjennom en oksidasjonsprosess, derav navnet stripping voltammetri. Strømmen som oppstår ved oksideringen måles og er proporsjonal med konsentrasjonen av den kjemiske spesien (Princeton-Applied-Research). Elektroden som benyttes i voltammetri har tidligere bestått av kvikksølv, i hovedsak såkalt HMDE- (Hanging Mercury Drop Electrode) og TFME- (Thin-film Mercury Electrode) elektroder. Kvikksølv er giftig og andre alternative materialer blir testet ut som for eksempel vismut, gull og sølv (Wu m. fl., 2008; Wang 2005). Det finnes en rekke forskjellige varianter av voltammetri. Anode og katode stripping voltammetry (ASV og CSV), adsorptiv stripping voltammetry, stripping chronopotentiometri og AGNES (Absence of gradient Nernstian Equilibrium Stripping) (Pesavento m. fl., 2009; Domingos m. fl., 2008; Buffle and Tercier-Waeber, 2005). Voltammetri er en metode som man tidligere bare kunne utføre på lab og som fungerte best i sjøvann da det kreves en viss mengde elektrolytter i løsning (INAP, 2002). Analysemetodene har imidlertid vært gjenstand for sterk utvikling og det finnes voltammetrisk analyseutstyr som man kan benytte i felt i både ferskvann og saltvann. (Achterberg and Braungardt, 1999; Pesavento m. fl., 2009; Sigg m. fl., 2006).

Feltinstrumentene er i stor grad basert på konvensjonelle metoder der instrumenteringen er endret noe på grunn av fare for interferenser. Blant annet må elektroden utformes slik at sensorene er beskyttet fra fysiske, kjemiske og biologiske interferenser. En tykk agarosegel har vist seg som en effektiv beskyttelse (Buffle and Tercier-Waeber, 2005). Det er få kommersielt tilgjengelige voltammetrisk måleutstyr som er tilpasset feltbruk. VIP (voltametric *in situ* profiling system) er et *in situ* system for måling av frie metallioner og kan benyttes for metallovervåking helt ned til 150 m dyp. VIP-systemet består av en nedsenkbar voltammetrisk probe basert på en mikrosensor, en nedsenkbar online oksygenfjernende modul, en nedsenkbar

Ocean Seven 316 multiparameterprobe, en kalibreringsenhet, overflateenhet og en PC med software til å styre systemet (Idronaut m. fl., 2002). Den nedsenkbare sensoren er en såkalt GIME (gel-integrated voltametric microsensors). Gelen fungerer som en dialysemembran som lar små ioner og molekyler diffundere inn, mens kolloider, partikler og større komplekser holdes borte fra sensoren (Idronaut m. fl., 2002, Tercier m. fl., 1998, Pesavento m. fl., 2009). Prinsippet for denne gel-membranen er den samme som for DGT. Dette systemet kan måle dynamisk fraksjon av Cu, Pb, Cd og Zn på ppt nivå samtidig. Dette systemet kan også måle trykk, temperatur, pH, oksygen, konduktivitet, saltinnhold, redoks, turbiditet og klorofyll. Responstiden er under en time og systemet kan benyttes på både ferskvann og saltvann (Pesavento m. fl., 2009). Systemet leveres av et italiensk firma, Idronaut (Idronaut.it).

3.4.2 Ioneselektiv elektrode (ISE)

Potensiometri med ioneselektive elektroder (ISE) er i en god metode for å måle frie ioner i løsninger (Pesavento m. fl., 2009; Peijnenburg and Jager, 2003; Pretsch 2002). Prinsippet for metoden er at man setter en elektrode ned i en løsning som inneholder ionene man ønsker å måle. Elektroden er fylt med en løsning av ionet i en konsentrasjon som er forskjellig fra den løsningen man måler i. Spenningen som oppstår mellom elektroden og løsningen kan måles mot en ytre referanseelektrode. Dette potensialet kan sammenlignes med det som oppstår i en standardløsning og dermed benyttes til å beregne konsentrasjonen i den ukjente løsningen. Elektroden er utstyrt med en membran som er selektiv for det ionet som skal bestemmes. Denne metoden er relativt enkel, og fungerer nesten som en pH måling. Kommersielt finnes denne metoden foreløpig for noen ioner av alkalimetallene (Ca, Na, K), halogener (Cl, F, CN), metaller (Pb, Cu) og noen anioner (nitrat, sulfide). Ulempen med denne metoden er en relativt høy deteksjonsgrense, interferens med andre ioner som for eksempel Fe, og det er litt uklart hvor gode de er til feltbruk med stor variasjon i vannkjemi. Ideelt sett så skal standardløsningen ha tilsvarende ionestyrken og pH som i prøveløsningen. Denne metoden er under stadig utvikling og gode elektroder vil sannsynligvis etter hvert komme på markedet (McGraw m. fl., 2008). En ioneselektive elektrode som kan være relevant for forsvaret er en for Cu fra Global Water Instrumentation. Den skal ha få ioniske interferenser og skal ha et deteksjonsområde for Cu på mellom 0,4 µg/L -6350 mg/L.

3.4.3 Passive prøvetakingsteknikker

Diffusive gradients in thin films (DGT)

DGT er en praktisk metode for å evaluere biotilgjengeligheten av metaller i vann. Dette er en metode som passivt tar opp labile metaller fra løsning ved hjelp av diffusjon (INAP, 2002, De la Torre m. fl., 2000; Degryse m. fl., 2009; Pesavento m. fl., 2009). Fraksjonen som måles med DGT er den løste fraksjonen pluss metaller i komplekser som lett dissosierer slik som uorganiske metall-ligandkomplekser og noen metall-organiske komplekser (Balistrieri and Blank, 2008; Bourgeault m. fl., 2013). DGT har mange fordeler over andre liknende teknikker, den er blant annet enkel å bruke, kan gi informasjon om forskjellige spesier av et metall ved å variere tykkelse og porestørrelse på membranen, den kan oppkonsentrere metaller i felt og flere metaller kan måles samtidig (Denney m. fl., 1999; De la Torre m. fl., 2000). DGT kan benyttes

for å finne andelen labile spesier av Fe, mangan (Mn), Cd, kobolt (Co), Cu, nikkel (Ni), Pb og Zn (INAP, 2002). DGT består av tre lag, et resin-impregnert hydrogellag (Chelex 100), et hydrogel diffusjonslag og en filtermembran. Filtermembranens porestørrelse er 0,45 µm, og vil således hindre partikulært materiale å trenge gjennom membranen. Hydrogelen har en funksjonell porestørrelse på 2-5 nm og tykkelse på mellom 400 og 2000 µm og kontrollerer diffusjonstransporten av metallene inn til kation-binderen (INAP, 2002; Pesavento m. fl., 2009). Ved å variere konsentrasjonen av tverrbindere i gelfasen er det mulig å få DGT som hindrer diffusjon av metal-humus-komplekser men som har tilnærmet fri diffusjon av frie metallioner og små komplekser. Ved å benytte flere DGT med forskjellige porestørrelser er det mulig å finne andel frie metallioner, samt andel metall bundet i organiske og uorganiske komplekser. Konsentrasjonen av labilt metall tatt opp i prøvetakeren er direkte proporsjonalt med metallkonsentrasjonen i løsningen og diffusjonshastigheten av metallionet gjennom gelen (Pesavento m. fl., 2009; Scally m. fl., 2006). Konsentrasjoner av labile metallspesier kan derfor beregnes om man vet hvor mye metall som er akkumulert på resinen, diffusjonskoeffisienten til metallet, og prøvetakingstid. Diffusjonshastigheten gjennom gelen kan variere med vannets kjemi, slik som ionestyrke og pH (INAP, 2002; Scally m. fl., 2006). Om vannet har svært lav kationkonsentrasjon ($<2 \times 10^{-4}$ M) kan dette føre til en overestimering av labile metallioner, fordi det er høy konsentrasjon av natrium inne i DGT (De la Torre m. fl., 2000). For å opprettholde spenningsbalansen må det diffundere et annet kation inn hvis natrium diffunderer ut av DGT. Dette kan føre til et høyere opptak av metaller i DGT enn det som ville vært tilfellet i hardere vann. I en studie av Sigg m. fl., 2006 ble tre forskjellige passive prøvetakerteknikker (DGT, liquid mebrane (FTPLM, HFPLM), Donnan membran teknikk (DMT) sammenlignet for å måle biotilgjengelig andel av Pb, Cu, Zn og Cd i ferskvann. DGT målte mye høyere biotilgjengelig andel av Cu, Pb og Cd enn de andre metodene. Dette skyldes i stor grad av at de andre metodene er forsøkt tilpasset for å beregne andelen frie metallioner, mens DGT også inkluderer labile metallspesier. Andelen labile metallspesier ble sammenlignet med totalinnholdet av metaller i vannet filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Opptaket av Cu og Pb i DGT i forhold til totalinnholdet varierte med henholdsvis 18-65% for Cu og 7-60% for Pb. Høyest andel tatt opp av DGT var i vannet med lavest innhold av organisk materiale.

Chemcatcher®

Chemcatcher består av en cellulose-acetat-membran som fungerer som et tynt diffusjonslag. Innenfor membranen befinner det seg en immobilisert chelaterende akseptor resin på en polytetrafluoretylen (PTFE) base (Pesavento m. fl., 2009; Vrana m. fl., 2005; Charriau m. fl., 2016; Lissalde m. fl., 2016). Chemcatcher opererer under dynamiske forhold, derfor er, som for DGT, kinetikken viktig. Fluksen vil være proporsjonal med konsentrasjonen av labile metallspesier (Pesavento m. fl., 2009). Prøvetakerens typiske eksponeringstid er 14 dager til 1 måned. Etter eksponering ekstraheres metallene fra resinen ved hjelp av syre, og prøven kan analyseres for metaller. Denne metoden kan benyttes for både organiske miljøgifter, og Cd, Cu, Ni, Pb og Zn, ved å benytte forskjellige membraner og resiner (Vrana m. fl., 2005). Chemcatcher er kommersielt tilgjengelig (<http://www.port.ac.uk/research/chemcatcher/>) og har blitt sammenlignet med DGT (Charriau m. fl., 2016). Resultatene fra disse forsøkene har vært at de samsvarer ganske godt. Chemcatcher skiller seg imidlertid ut fra DGT ved at den trenger å

kalibreres på forhånd på lab for de metallene man ønsker å måle. Hvordan den påvirkes av pH, ionestyrke og temperatur er lite studert.

Gellyfish

DGT er en dynamisk prøvetaker og vil i prinsippet ikke bli mett, og konsentrasjonen av metall beregnes ut fra diffusjonshastigheten. Gellyfish er en prøvetaker som er basert på likeveltsprinsippet og skal være suspendert i vann til likevekt nås. Prøvetakeren består av en tøyelig ytre polyakrylamidgelskive innebygd med en kjent mengde iminodiacetat-komplekserende-resin i form av partikler. Mengden metaller akkumulert i prøvetakeren vil være proporsjonal med konsentrasjonen av frie ioner i prøven (Pesavento m. fl., 2009). Metoden blir sett på som lovende for å beregne konsentrasjonen av frie metallioner i en løsning, men ulempen med metoden er at det kan ta lang tid før likevekt nås og foreløpig bare validert for det marine miljø og er ikke kommersielt tilgjengelig som et ferdig produkt (Pesavento m. fl., 2009; Dong m. fl., 2015).

Liquid membrane (LM)

Support Liquid Membrane (SLM) og Permeation Liquid Membrane (PLM) er metoder der man har forsøk å etterlikne opptak av metaller i biota. Prinsippet for metodene er å benytte et organisk løsemiddel som ikke er løselig i vann og som inneholder et stoff som kan danne komplekser med metallioner, et såkalt bæreremolekyl. Løsemidlet med det kompleksende stoffet er immobilisert av kapillærkrefter på en tynn hydrofob og porøs membran. Membranene leveres i forskjellige former, som flate ark/strimler eller som hule fibre. Den ene siden av membranen er eksponert mot vannet man ønsker å analysere, mens den andre siden av membranen er eksponert mot en såkalt stripløsning som inneholder et stoff som har høyere affinitet til metallet enn bæreremolekylet i membranen. Bæreremolekylet i membranen danner komplekser med metallionet og fraktes over membranen ved hjelp av diffusjon. Metallionet kompleksdanner med liganden i stripløsningen, og oppkonsentreres i løsningen på den andre siden av membranen (Parthasarathy m. fl., 2004; Vrana m. fl., 2005; Kocherginsky m. fl., 2007; Pesavento m. fl., 2009). Ved å forandre bæreremolekylet i den organiske fasen i membranen kan man oppkonsentrere et bredt spekter av metaller, som feks Cu, Pb, Zn og Cd. Denne metoden har blitt benyttet i felt (Vrana m. fl., 2005; Sigg m. fl., 2006) og, avhengig av hvilke permeabilitetskriterier som blir satt, funnet egnet til å beregne både andelen frie og labile metallioner i vandige løsninger. I studien av Sigg m. fl., (2006) ble det benyttet en såkalt hulfiber-PLM (HFPLM) for å identifisere andelen fritt Cu, Pb, og Cd. En annen metode er såkalt Stabilized liquid membrane device (SLMD) som er en flat membran som inneholder en sterk syreløsning med høy affinitet for det aktuelle metallet. Denne metoden kan kun måle divalente metallioner (Vrana m. fl., 2005). Væske-membran-metodene er foreløpig lite utviklet og brukes foreløpig mest til forskningsformål.

Dialyseteknikker

Likevektsdialyse er en enkel måte å separere spesier i henhold til størrelse. Denne metoden baserer seg på diffusjonsfluks av spesier som er små nok til å passere gjennom en membran til

likevekt er nådd. Slik kan metaller som er assosiert med kolloider, humussyre eller andre komplekser ekskluderes på bakgrunn av størrelse. Denne metoden kan også videre konfigureres ved å tilsette en mottakende fase med høy affinitet for det ønskede spesiet. Under slike forhold vil diffusjonsraten være direkte proporsjonal med metallkonsentrasjonen i vannet (Vrana m. fl., 2005). Donnan dialyse teknikk (DMT) er basert på distribusjonen av frie metallioner mellom to vandige faser, en donorløsning som inneholder frie metallioner og deres komplekser (prøven), og en mottakerløsning med bestemt ionekomposisjon. Disse to løsningene skilles av en kationbytte membran (Pesavento m. fl., 2009). Membranen består av polystyren og divinylbensen med sulfonsyregrupper som er deprotonert ved $\text{pH} > 2$. Det negative potensialet i membranen tillater kationer å passere gjennom membranen med mye høyere fluks enn anioner og nøytrale spesier (Sigg m. fl., 2006). Transporten over membranen er drevet av aktivitetsgradienten mellom de to fasene til en såkalt Donnan likevekt nås. Denne teknikken ble benyttet av Sigg m. fl., (2006) for å identifisere andelen fritt Cu, Pb, og Cd i felt. Den er også benyttet for å estimere andelen frie metallioner i jordvæske (Nolan m. fl., 2003). DMT er en likevektsmetode og det kan ta flere døgn å oppnå likevekt. Andelen frie ioner beregnes etter at likevekt er oppnådd ved hjelp av en ligning (Temminghoff m. fl., 2000; Pesavento m. fl., 2009). Dette er en metode som er under utvikling. Universitetet i Wageningen har etablert et system for bruk av metoden, den såkalte Wageningen Donnan Membrane Technique (WDMT), for både kationer og anioner (Vega m. fl., 2009; Temminghoff m. fl., 2000). I en studie av Parat og Pinheiro (2015) har de utviklet et system for bruk i felt der de kobler elektrokjemisk deteksjon med DMT.

3.4.4 Filtrering

Filtrering i forskjellige størrelsesfraksjoner er en metode som kan benyttes for å få en oversikt over om metallene er løst eller ikke, og i hvilke størrelsesfraksjoner metallforurensingene er i. Denne teknikken benyttes ofte sammen med andre teknikker som for eksempel ionebytte. Ved å filtrere vannet gjennom filter med forskjellige porestørrelse vil man kunne gjøre en størrelsesfraksjonering av metallene som er løst i vannet. Det finnes forskjellige teknikker for å filtrere vannet. En måte er å sentrifugere vannet gjennom filter som er satt inn i små rør (15-50 ml), som beskrevet av Pedrot m. fl., (2008). Metoden er rask og utføre, rørene er kommersielt tilgjengelig og finnes med filter med flere porestørrelser (1000 KD-100000KD). Ulempen med denne metoden er at den er lite utprøvd for metaller i vann og bør derfor testes sammen med andre metoder. En annen måte er å filtrere vannet med pumpe gjennom såkalt hulfiberkolonner som beskrevet i (Heier m. fl., 2004). Denne metoden er en anerkjent metode for å identifisere labile metaller i forurenset vann, men skiller ikke mellom metaller bundet til kolloider og frie metallioner og metallmolekyler. Koblet med en ionebytterkolonne kan man kan man imidlertid få en god karakterisering av metallformene i vannet.

3.4.5 Ionebytte

Ionebytte er en teknikk der vann kommer i kontakt med en sterk kompleksbinder (resin) som binder enten kationer eller anioner. Ofte innebærer dette å pumpe vannet gjennom en kolonne. Fast fase ekstraksjon (SPE) er en type aktiv prøvetaker der vannet pumpes gjennom en

plastpatron som inneholder en sterk kationbytter. Med denne metoden samles kationer (f.eks. Cu^{2+} , Pb^{2+}) opp i patronen, mens annet materiale passerer gjennom. Vannet filtreres først over et sprøytefilter for å fjerne partikulært materiale ($<0,45 \mu\text{m}$). For en mer helhetlig spesiering kan vannprøvene fraksjoneres gjennom både en kationbytter og en anionbytter. Andelen av kationiske metaller som sitter igjen på kationbytter kan regnes som den labile biotilgjengelige fraksjonen (Heier m. fl., 2004), og omvendt for anionske metalloider. Filtrering, koblet sammen med ionebytte og analyse av organisk materiale i de forskjellige oppsamlede fraksjonene vil gi en god karakterisering av hvilke former metallene er i vannet.

3.5 Biologiske metoder

En metode som gir informasjon om biologisk relevante konsentrasjoner av forurensede stoffer er å benytte biota. Her kan organismen benyttet tilpasses vannforekomsten og hvilket stoff man vil se på. Organismene settes ut for en begrenset periode, hvor de passivt akkumulerer metaller. Etter endt eksponering kan vev fra organismen analyseres (Lopez m. fl., 1994; Vrana m. fl., 2005; Gecheva og Yurukova, 2013). Slike organismer kan være blant annet moser og krepsdyr som tanglopper. Dette er arter som finnes i ferskvann i hele Europa og som akkumulerer spormetaller (Bourgeault m. fl., 2013). Dette er en metode som kan sammenlignes med passive prøvetakere. Utfordringen er å beregne andelen biotilgjengelig metall i vannet ut fra opptaket i organismen. Dette kan gjøres ved å beregne opptakraten på tilsvarende måte som på DGT, men er ikke standardisert på tilsvarende måte.

Opptak av metaller i vannmose har vært benyttet av NIVA i overvåkingen av norske skytefelt og de fant god korrelasjon mellom konsentrasjon i vannet og opptak i mosene (Rognerud 2000). Metoden synes å fungere godt hvis man ønsker å sammenligne oppkonsentrering av metaller mellom forskjellige vann. Dette kan si noe om biotilgjengeligheten av metallene i forskjellige vannkvaliteter. Metoden synes foreløpig mindre egnet til å beregne den biotilgjengelige andel av metallene i et vann.

En annen metode for å finne biotilgjengelige metaller er ved hjelp av rekombinante sensorbakterier. Noen bakterier vokser i metallforurensede områder. Disse er vanligvis tilpasset tilstedeværelsen av giftige metaller ved genetisk kodede resistensmekanismer. Mange av disse mekanismene fungerer ved ekskludering av metaller gjennom en energiavhengig pumpe i cellemembranen. Den presise reguleringen av resistansgenet har blitt benyttet for å konstruere spesifikke sensorbakterier. I sensorbakteriene er regulerings-elementet koblet til uttrykket av et rapporteringsgen. Rapporteringsgenet kan være et gen fra ildflue (luciferase) som produserer lys som kan kvantifiseres (Tauriainen m. fl., 1998, Tauriainen m. fl., 2000). Bruk av biosensorer vil sannsynligvis være en mye brukt teknikk for å identifisere biotilgjengelige former av både uorganiske og organiske stoffer (Kaur m. fl., 2015).

4 Metoder for å måle biotilgjengelig andel av metaller i jord

Jord er en komplisert matriks som består av forskjellige uorganiske mineraler, organisk materiale, vann og luft. De uorganiske mineralpartiklene og det organiske materialet er ofte bundet sammen i aggregater. Jord dannes av erosjonsprosesser av underliggende berggrunn, eller fra vanntransporterte avsetninger, i et samspill med dyr og planter, og klima. Klimaet er sannsynligvis den viktigste faktoren i jorddannelsesprosessen. Klimaet bestemmer om det primært vil foregå en kjemisk, eller mekanisk erosjonsprosess og hvor raskt prosessen skjer. Jorden som er dannet ved mekanisk forvitring kalles primærmateriale, mens jord som er dannet ved kjemisk forvitring er sekundærmateriale (Tarbuck and Lutgens, 1990; , Vogt and Seip, 1999). I områder med mye regn vil for eksempel lettløselige mineraler som for eksempel kalsiumkarbonat vaskes ut og tyngre løselige Fe- og aluminiumoksider akkumuleres. Organisk material fra vegetasjon som brytes ned kan danne et surt miljø og øke utvaskingen og erosjonen av jordmineraler. De fleste jordtypene er en blanding av grus (> 2mm), sand (0,02-2mm), silt (0,002-0,02mm) og leire (< 0,002 mm), iblandet varierende mengder organisk materiale. Jorddannelsen skjer fra overflaten og nedover og det vil oppstå såkalte soner eller lag som utgjør jordprofilen. Den største andelen organisk materiale finner man som regel på overflaten av jordprofilen og stammer for det meste fra dødt plantemateriale. Det organiske materiale som er fullstendig nedbrutt består av en rekke makromolekyler med molekylvekt fra noen tusen til mer enn 100 000 og kalles humus. Molekylene inneholder som regel mange fenol-, karboksylsyre-, amino-, alkohol- og sulfhydrylgrupper. Selv om jord vanligvis kun inneholder en liten andel humus (<10 % vekt/volum), har den likevel stor innvirkning på jordas kjemiske egenskaper (Vogt and Seip, 1999, van Loon and Duffy, 2000). Humus har stor kationbyttekapasitet, evne til å bufre pH, binde metallioner (kationer), binde hydrofobe organiske molekyler og holder på mye vann (Vogt and Seip, 1999, Humus, 2011). pH i jorden avhenger av jordas sammensetning og jordas historie. Jord med høyt innhold av karbonatmineraler er ofte basiske, mens jord som inneholder stor mengde humus eller Fe og aluminium ofte er sure (van Loon and Duffy, 2000).

Anioniske metalloider som Sb, og kationiske metaller som Pb og Cu kan binde seg til jord på forskjellig måter og med forskjellig styrke. Metallene kan adsorbere til en jordpartikkeloverflate som et ytre- (ikke-spesifikk adsorpsjon) eller indre-sfærekompleks (spesifikk adsorpsjon). I tillegg kan ioner bli adsorbent til jord ved å diffundere inn i mikroporer i jordmineralene eller i det organiske materialet, og ioner kan danne utfellingsprodukter med jordmineraler (Zhou m. fl., 2008). Ytre-sfærekomplekser dannes av elektrostatisk tiltrekking på en ladet overflate. Ioner som er adsorbent i et ytre sfærekompleks er relativt lett adsorbent til partikkeloverflaten og kan løses ut gjennom ionebytterprosesser, eller ved å manipulere med ladningsforholdene på partikkeloverflaten ved for eksempel å endre pH. Indre-sfærekomplekser er en kjemisk binding av ionet med en komponent på partikkeloverflaten, for eksempel en hydroksylgruppe i et silikat eller jernoksid. Indre-sfærekomplekser er hardt bundet til jordpartikkelen og det kreves mer energi å løse ionet fra partikkelen den er bundet til, for eksempel ved å bruke sterke syrer. Ioner som er hardt bundet som et indre-sfærekompleks trenger derfor ikke være biotilgjengelig i et

vandig miljø, men bli tilgjengelig for opptak i en organisme hvis den havner i magen på et dyr på grunn av den sure magesaften. I jord vil sannsynligvis alle former for komplekser dannes og andelen hardt- og løst bundet ion i en type jord vil over tid forandre seg. Sannsynligvis vil andelen av indre-sfærekomplekser av ionene øke over tid, ettersom dette er en mye mer langsom bindingsprosess enn adsorpsjon som følge av elektrostatiske krefter. Dette kan forstås som elding av stoffet i jorda.

For at et stoff i jord skal kunne gjøres tilgjengelig for opptak i en organisme må det være en interaksjon mellom stoffet bundet til jord og stoffet løst i en væskefase, som for eksempel porevann. Det er den andelen av stoffet som kan løses ut i en væskefase som regnes som den biotilgjengelige andelen av stoffet i jorda. Væskefasen kan være porevannet i jorda, eller magesyren til en organisme. Hvorvidt stoffet faktisk er tilgjengelig for opptak i en organisme avhenger av hvilken tilstandsform stoffet er løst i væskefasen. Biotilgjengeligheten av et stoff i jord styres dermed av jordtypen og av det miljøet jorda til en hver tid befinner seg i. For å vurdere biotilgjengeligheten til et stoff i jord må man derfor vite hva slags organisme som eksponeres og hvordan organismen eksponeres. For å beregne den biotilgjengelige andelen av et spormetall i jord skal man ideelt sett måle den andelen av spormetallene som faktisk blir tatt opp/påvirker organismen i forhold til andelen som er i jorda. Dette er i de fleste tilfeller umulig å gjennomføre både av praktiske og økonomiske hensyn. Man må da bruke metoder som kan gi en tilnærmet beregning av den biotilgjengelige andelen. Det er flere metoder som er forsøkt benyttet. Selektiv ekstraksjon med et løsemiddel som simulerer det miljøet organismen eksponeres i; passive prøvetakere i jorda som skal simulere en organisme; prøvetakere for porevann som blir ilagt et vakuum som suger opp væsken gjennom en membran.

4.1 Sekvensiell ekstraksjon

Sekvensiell ekstraksjon av jord benyttes for å vurdere hvordan et stoff er adsorbent. Prinsippet for metoden er å ekstrahere stoffet fra jorda i flere trinn med økende styrke på ekstraksjonsmiddelet. Med økende styrke vil si å trinnsvis forandre egenskapene til ekstraksjonsmiddelet slik at det etterfølgende ekstraksjonssteget vil ekstrahere ut hardere bundet metall enn det foregående ekstraksjonssteget, for eksempel ved å redusere pH eller benytte et oksidasjonsmiddel for å bryte bindingen mellom metall og organisk materiale. En slik metode kan gi en relativt detaljert informasjon om hvordan et stoff er bundet til en jordprøve, dets potensiale for å bli mobilisert og biologisk tilgjengelighet, og hvordan stoffet fordeler seg mellom fraksjonene. For å vurdere utlekking av spormetaller- og metalloider fra jord og sediment er det gjennom årene blitt testet ut mange forskjellige ekstraksjonsmidler (Fedotov m. fl., 2012; Filgueiras m. fl., 2002). Den mest benyttede metoden er basert på metoden av Tessier m. fl., (1979) der en jordprøve ekstraheres i 5 fraksjoner (Tabell 1). Denne metoden har gjentatte ganger blitt modifisert, og en mye brukt variant av metoden benyttes på fakultet for miljøvitenskap og naturforvaltninga på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) (Oughton m. fl., 1992; Kennedy m. fl., 1997). På NMBU har de inkludert en ekstra vannløselig fraksjon, i tillegg til at den siste fraksjonen ikke oppsluttes med flussyre, men med salpetersyre. Grovt sett kan man anse de to eller tre første fraksjonene som de mest mobile og biotilgjengelige fraksjonene i et naturmiljø. Dette er ioner som er adsorbent til jorda som ytre-

sfærekomplekser, i mikroporer, og felt ut, eller assosiert med karbonater. Spormetaller assosiert med disse fraksjonene er følsomme for pH endringer i jorda og forandringer i den kjemiske sammensetningen i jordas porevann, for eksempel økt, eller redusert ionestyrke. De senere fraksjonene er assosiert med spormetaller som i større grad danner indre-sfærekomplekser og som er hardere bundet til jorda. Disse fraksjonene anses som mindre biotilgjengelig i et naturmiljø, men under gitte betingelse som for eksempel i magesekken på et dyr, kan spormetaller assosiert med disse fraksjonene bli tilgjengeliggjort for opptak.

Tabell 4.1 Prosedyre for sekvensiell ekstraksjon av jordprøver etter Tessier m. fl., 1979

Ekstraksjonssteg	Fraction	Reagenser til 1 g tørr jord	pH	Tid (h)	Temp. (°C)
Fraksjon 1	Reversibelt bundet	8 mL 1 M NH ₄ OAc, eller 8 mL 1M MgCl ₂	8,2	1	20
			7,0	1	
Fraksjon 2	Reversibelt bundet, assosiert med karbonater	8 mL 1 M NH ₄ OAc (pH justert med HOAc)	5,0	2	20
Fraksjon 3	Lett reduserbart materiale (Fe/Mn hydroksider)	20 mL 0,04 M NH ₂ OH•HCl i 25% HOAc	3,0	6	80
Fraksjon 4	Oksiderbare komponenter, bundet til organisk materiale	a) 3 ml 0,02M HNO ₃ + 5 ml 30% H ₂ O ₂ (pH justert med HNO ₃)	2,0	2	85
			2,0	3	
			2,0	0,5	
Fraksjon 5	Hardt bundet og syreopløselig	HF-HClO ₄ (5:1)			

Metoden for sekvensiell ekstraksjon av spormetaller fra jord og sediment etter Tessier m. fl., (1979) er primært tilpasset kationiske spormetaller, selv om den også blir benyttet for anioniske metalloider som As og Sb. En av utfordringene ved sekvensiell ekstraksjon er at spormetallet readsorberes til jorda, for eksempel når ekstraktet avkjøles etter oppvarming. Dette er et problem som avhenger av det stoffet man er interessert i å studere. I en studie av Gruebel m. fl., (1988) ble det observert at en betydelig andel av As kunne readsorbere til mineralfasen ved bruk av vanlige benyttede ekstraksjonsmetoder. Wenzel m. fl., (2001) har utviklet en metode som er tilpasset As. I denne metoden ekstraheres jordprøven i fem fraksjoner i henhold til tabell 2. Her utgjør fraksjon 1 og delvis fraksjon 2 arsenanioner som er adsorbent til jorda som ytre-sfærekomplekser, og vil anses som den biotilgjengelige fraksjonen. De påfølgende fraksjonene er As adsorbent til jorda som indre-sfærekomplekser hvorav to av fraksjonene er assosiert med hhv amorfe eller krystallinske Fe, Mn-, og Al-oksider. Et interessant poeng er at i fraksjon 2

benyttes en ammonium-dihydrogenfosfatløsning som ekstraksjonsmiddel. Her antar man at fosfatet fungerer som en slags anionbytter som mobiliserer arsenat fra jordpartiklene. Tilsvarende mekanisme er det som sannsynligvis oppstår når man behandler forurensete jord med fosfat for å immobilisere Pb og man ser en kraftig mobilisering av Sb.

Tabell 4.2 Prosedyre for sekvensiell ekstraksjon av jordprøver med anioniske metallspesier (etter Wentzel *et al.*, 2001).

Ekstraksjonssteg	Fraction	Reagenser	pH	Tid (h)	Temp. (°C)
Fraksjon 1	Reversibelt, ikke-spesifikt bundet	0,05 M (NH ₄) ₂ SO ₄		4	20
Fraksjon 2	Spesifikt bundet	0,05 M (NH ₄)H ₂ PO ₄		16	20
Fraksjon 3	Bundet til amorfe Fe-, Mn- og Al-oksider	0,2 M NH ₄ -oxalate buffer	3,25	4 (mørkt)	20
Fraksjon 4	Bundet til krystallinske Fe-, Mn- og Al-oksider	0,2 M NH ₄ -oxalate buffer + 0,1 M askorbinsyre	3,25	0,5	96
Fraksjon 5	Restfraksjon	HNO ₃ /H ₂ O ₂ (mikrobølgevekstraksjon)			

En modifisert prosedyre av metoden er benyttet for ekstraksjon av Sb der man har kuttet ut ekstraksjonssteg 3 og ekstrahert restfraksjonen med en sterkere syreblanding. Årsaken til at man kuttet ut fraksjon 3 i prosedyren var at den også løser ut Sb bundet til krystallinske jernoksider (Okkenhaug m. fl., 2011; Leuz 2006). Videre så er det godt kjent at for å løse ut alt Sb fra en jordprøve må man totalopplutte prøven med en flussyreblanding eller med kongevann (Mariussen 2012; Nash m. fl., 2000; Hjortenkrans m. fl. 2009). En mulig svakhet med metoden av Wentzel m. fl., (2001) er at den ikke selekterer på anioner bundet til organisk materiale. Wentzel m. fl., (2001) fant i sin studie at bare en liten andel av As var assosiert med organisk materiale. Senere studier har imidlertid vist at Sb kan være assosiert med organisk materiale i jord, særlig i humusrik jord, og danne indre-sfærekomplekser. Det vil derfor være relevant å inkludere steg 4 i metoden til Tessier m. fl. (1979) hvis man ønsker å benytte seg av metoden til Wentzel m. fl. (2001) for sekvensiell ekstraksjon av Sb i jordprøver.

En sekvensiell ekstraksjon er av særskilt interesse for å antyde bindingsmekanismene for et spormetall i et fast stoff. Metodene som er beskrevet her kan gjøres enda mer selektive ved å inkludere flere trinn i fraksjoneringen som beskrevet i Kaczorek m. fl., (2009), eller i Filgueiras m. fl., 2002. Her ble det inkluderte sju forskjellige ekstraksjonstrinn som i prinsippet er basert på en videreutvikling av metodene til Tessier m. fl., (1979) og Wentzel m. fl., (2001) som beskrevet ovenfor.

På grunn av de mange forskjellige måtene ekstraksjon av jord og sediment har blitt utført på, har man forsøkt å etablere en standardisert protokoll for sekvensiell ekstraksjon. Dette er blitt forsøkt gjennom EUs måle- og testeprogram, BCR (Community Bureau of Reference), der det har blitt gjennomført en rekke interlaboratoriestudier for å sammenligne ekstraksjoner av jord- og sedimentprøver (Ure m. fl., 1993; Rauret m. fl., 1999). Gjennom dette arbeidet ble det foreslått en standard protokoll for sekvensiell ekstraksjon av jord og sediment. Den såkalte BCR-metoden for sekvensiell ekstraksjon er vist i tabell 4.3. Denne metoden er også basert på protokollen til Tessier m. fl., (1979).

Tabell 4.3 Prosedyre for sekvensiell ekstraksjon av jordprøver med BCR-metoden.

Ekstraksjons-steg	Fraction	Reagenser	pH	Tid (h)	Temp. (°C)
Fraksjon 1	Reversibelt, ikke-spesifikt bundet	0,11 M HOAc (LS40)		16	20
Fraksjon 2	Bundet til amorfe og krystallinske Fe-, Mn- og Al-oksider	0,5 M NH ₂ OH•HCl i 0,05 M HNO ₃ (LS40).		16	20
Fraksjon 3	Oksiderbare komponenter, bundet til organisk material	30% H ₂ O ₂ (pH justert til 2-3 med HNO ₃ , LS20)	2-3	3	85
		1 M NH ₄ OAc (pH justert til 2-3 med HNO ₃ , LS50)	2	16	20
Fraksjon 4	Restfraksjon	Flussyre- eller konge vannoppløsning i mikrobølgeovn.			

4.2 Ristetester

En sekvensiell ekstraksjon av jord og sediment med ekstraksjonsmidler med økende styrke sier noe om hvordan et spormetall er bundet til jorda. Metoden kan antyde hvor stor andel av spormetallet som potensielt vil være tilgjengelig for opptak i en organisme. For å få et bedre estimat på den faktiske biotilgjengelige andelen av et spormetall i jord må man imidlertid forsøke å simulere det miljøet en organisme eksponeres i. Dette kan gjøres med relativt enkle ristetester som i prinsippet blir å utføre ett eller helst to av trinnene i en sekvensiell ekstraksjon. Det første trinnet blir å ekstrahere jordprøven i et relevant ekstrakt og det andre trinnet blir å oppslutte prøven for å beregne restinnholdet av spormetallet. For å vurdere biotilgjengeligheten til et stoff i jord må man altså vite hva slags organisme som eksponeres og hvordan organismen eksponeres. Ideelt sett så skal denne andelen som ekstraheres ut fra jorda være den samme som blir tatt opp/påvirker organismen. I praksis så er det vanskelig å finne et slikt ekstraksjonsmiddel, blant annet fordi den andelen av spormetaller som ekstraheres kan befinne seg i mer, eller mindre biotilgjengelige former/spesier og man vil heller aldri greie eksakt å simulere det miljøet organismen eksponeres i. Man sier derfor at det som ekstraheres ut er den

andelen som blir tilgjengeliggjort for opptak. Det er ikke et godt ord for dette på norsk, men på engelsk sier man “the bioaccessible portion”. For å lage gode tilnærminger for å estimere den biotilgjengelige andelen av et spormetall prøver man å korrelere andelen av metallet som ekstraheres ut fra jorda med opptak i en organisme. Det er åpenbare svakheter med denne metoden ettersom opptak i en organisme kan korrelere med totalinnholdet i jorda, selv om man vet at mesteparten likevel ikke er biotilgjengelig. Ideelt sett så skal ikke den biotilgjengelige andelen nødvendigvis korrelere med totalinnholdet av spormetallet i jorda ettersom den biotilgjengelige andelen vil avhenge av hvordan spormetallene er bundet. Ved å benytte noen av metodene som beskrevet ovenfor om analyse i vann, for eksempel voltammetri og elektrokjemisk deteksjon, vil man kunne gjøre bedre estimat på hva som er biotilgjengelig. Metodene for å vurdere biotilgjengelighet ved hjelp av ristetester av jord kan grovt deles inn i tre grupper, henholdsvis for planter, jordlevende organismer, og høyerestående dyr og mennesker som blir eksponert via mage-tarmsystemet.

4.2.1 Planter

Spormetalloptak i planter er kompliserte prosesser som avhenger av jordtypen, spormetallet og planten selv. Det er vist i mange studier at det for blant annet Pb er en korrelasjon mellom konsentrasjon i jorda og opptak i planter. Tilsvarende korrelasjon er ikke funnet for Cu, noe som kan skyldes at kobberopptak i planter er nøye regulert, i motsetning til Pb som ikke har noen kjent funksjon i noen levende organismer. For å vurdere biotilgjengelighet av spormetaller- og metalloider fra jord og sediment er det gjennom årene blitt testet ut svært mange forskjellige ekstraksjonsmidler (Fedotov m. fl., 2012). For å simulere opptak fra jord i planter har man tradisjonelt brukt svake ekstraksjonsmidler med fortynnede saltløsninger av for eksempel CaCl_2 , MgCl_2 og NaNO_3 og ammoniumacetat. I tillegg har det blitt benyttet såkalte kelatorer som EDTA der man kan øke selektiviteten til ekstraksjonsmiddelet. Dette skal simulere mikromiljøet, eller rhizosfæren, som utgjør grensesjiktet mellom plantens rotsystem og jordpartiklene. Dette er et miljø som består av mikroorganismer, plantesekret og porevann med en mineralsammensetning som gjenspeiler jordas mineralsammensetning. Vann som ekstraksjonsmiddel er ikke blitt anbefalt på grunn av at det i liten grad vil simulere mikromiljøet rundt rotsystemet til planter, og ikke har noen bufferkapasitet. Vann vil derfor sannsynligvis underestimere andelen som er biotilgjengelig. For å vurdere egnetheten til metodene har man forsøkt å korrelere opptak i planter med andelen av spormetaller som ekstraheres fra jorda. Metoden som for kationiske spormetaller har vist best korrelasjon i de fleste studier har vært en løsning av 0,01 M CaCl_2 og 1 M ammoniumacetat (Fedotov m. fl., 2012). For metalloider som As har ammoniumacetat og ammoniumsulfat $[(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)]$ blitt foreslått som egnet (Fedotov m. fl., 2012). Selv om As og Sb har mange fysisk-kjemiske fellestrekk kan man ikke helt uten videre ekstrapolere eksperimenter på As til også å gjelde for Sb. Det er gjort relativt få studier på Sb, og til tross for at mange studier har vist at Sb har en høy mobilitet i jord er det få studier som har vist en betydelig akkumulering i planter eller en tydelig sammenheng mellom utlekking og opptak i planter.

4.2.2 Meitemark og andre jordlevende organismer

Jordlevende organismer som meitemark vil kunne ta opp forurensinger via adsorpsjon gjennom huden, eller mage- og tarmsystemet. I følge Weltje (1998), har det blitt hevdet at den viktigste opptaksveien for spormetaller i meitemark er via huden, men flere studier har vist at det også er et vesentlig opptak via markens mage- og tarmsystem (Becquer m. fl., 2005; Ma m. fl., 2009). For å vurdere biotilgjengeligheten av spormetaller i jord i meitemark har tilsvarende metoder som for planter blitt benyttet, for eksempel en løsning av 0,01 M CaCl_2 . Mange studier har imidlertid ikke funnet en god korrelasjon mellom toksiske effekter, bioakkumulering og den CaCl_2 -ekstraherbare fraksjonen. Som for planter så vurderes egnetheten til en metode ved å korrelere opptak, eller effekt av spormetallet med andelen av spormetaller som ekstraheres fra jorda. CaCl_2 er et svakt ekstraksjonsmiddel og for å øke styrken på ekstraksjonsmiddelet har man derfor i noen studier benyttet kelatorer som DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) i blanding med 0,01 M CaCl_2 (Lindsay and Norvell, 1978; Dai m. fl., 2004). DTPA er en kelator med sterk affinitet til kationiske spormetaller. I følge Dai m. fl., (2004) kan DTPA frigjøre den løselige og utbyttbare fraksjonen av spormetaller, samt en andel av metaller bundet til organisk materiale. Det er foreslått at spormetaller assosiert med organisk materiale kan være spesielt biotilgjengelig i mage- tarmsystemet til meitemark (Smith m. fl., 2010; Ma m. fl., 2009). Den biotilgjengelige andelen av spormetaller i jord er også forsøkt beregnet ved å simulere miljøet i meitemarkens mage- tarmsystem (Smith m. fl., 2010; Ma m. fl., 2009). I disse studiene ble en blanding av forskjellige enzymer som cellulase, amylase, fosfatase og trypsin i vann sammenlignet med en standard blanding av CaCl_2 . Konklusjonen var at enzymblandingen gav et bedre mål på jordas toksiske potensial enn 0,01 M CaCl_2 alene (Smith m. fl., 2010). Enzymblandingen viste seg særlig bedre egnet for Cu. Dette ble forklart med at enzymblandingen, i motsetning til CaCl_2 , sannsynligvis kunne løse ut en andel av organisk bundet Cu. Tilsvarende trend ble vist av Ma m. fl., (2009) som viste at enzymblandingen var mer effektiv i å ekstrahere ut Cu enn CaCl_2 . Forskjellene var mindre for Pb, og trenden for Pb var at CaCl_2 var et mer effektivt ekstraksjonsmiddel enn enzymblandingen (Smith m. fl., 2010). En utfordring når man skal korrelere et effektmål med den antatt biotilgjengelige andelen av et spormetall i jord er at jorda inneholder mange forskjellige metaller og at metallene responderer forskjellig på de ekstraksjonsmidlene som benyttes for å vurdere biotilgjengelighet. I tillegg vil spormetaller som Cu, Zn og Pb i relativt liten grad bioakkumulerer i jordlevende organismer som meitemark. Det gjør det vanskelig å bestemme hvilket stoff som er ansvarlig for den observerte effekten og som utgjør den største risikoen for effekt. I studien til Smith m. fl., (2010) var det beste ekstraksjonsmiddelet for å predikere toksisiteten av Cu i jord, en enzymblanding som simulerte mage- og tarmsystemet til meitemark.

I andre typer jord med en annen sammensetning av forurensingene vil kanskje et annet ekstraksjonsmiddel være bedre egnet for å vurdere den biotilgjengelige andelen. Av praktiske hensyn bør man derfor kanskje vurdere å benytte et ekstraksjonsmiddel som ikke er for svakt slik at man risikerer å underestimere jordas toksiske potensial, som for eksempel CaCl_2 for Cu. Ekstraksjonsmiddelet bør heller ikke være for komplisert å lage eller kreve spesielle lagringsforhold, som for eksempel en enzymblanding. CaCl_2 i blanding med en kelator kan derfor være et godt kompromiss, ettersom den vil være enkel å gjennomføre og lage, samtidig

som den har en ekstraksjonsstyrke som er noe høyere enn CaCl_2 alene. En konsekvens kan imidlertid være at jordas toksiske potensial blir noe overestimert, for eksempel for Pb.

4.2.3 Mennesker og andre høyere organismer

Mennesker og høyere organismer vil primært bli eksponert for metallforurensinger i jord gjennom mage- og tarmsystemet. Magesaften til de fleste høyere organismene er i større eller mindre grad et surt miljø som består av saltsyre og forskjellige typer av enzymer som bidrar til å bryte ned maten som blir spist. Også hos drøvtyggere vil maten som blir konsumert gå gjennom en mage (løypemagen) med magesaft av saltsyre og enzymer. Et surt miljø vil øke biotilgjengeligheten til de fleste kationiske spormetaller, også Cu og Pb. Ettersom Pb regnes som en høy risikofaktor for human eksponering er det gjort ganske mange studier der man forsøker å estimere biotilgjengelighet av Pb i forskjellige typer materiale gjennom mage- og tarmsystemet. Ettersom man har human eksponering som utgangspunkt er de fleste studiene gjort på gnagere og gris (Deshomme m. fl., 2012). I forsøket på å finne egnede metode for å simulere mage- tarmsystemet til høyere organismer er det blitt testet ut flere forskjellige blandinger som man har ristet sammen med jord og annet materiale. Dette inkluderer blandinger som består av saltsyre, glycin, eddiksyre og enzymer som pepsin og mucin (Deshommes m. fl., 2012; Oomen m. fl., 2002). En enkel metode (Relative Bioavailability Leaching Procedure, RBALP) som har vist god korrelasjon med opptak av Pb i grisunger, benytter en blanding av HCl og glycin ved pH 1,5 og som ristes på vannbad ved 37°C i 1 time. Denne metoden kalles også SBET-metoden (Simple Bioaccessibility Extraction Test). Syreblandingen blandes med jorda i et LS100 forhold (Drexler og Brattin 2007). SBET-metoden er en forenklet versjon av den såkalte PBET-metoden (Physiologically Based Extraction Test) som benytter en blanding av HCl, pepsin og organiske syrer. PBET-metoden har også en prosedyre for å simulere opptak i tarmen (Ruby m. fl., 1993). For å simulere opptak i tarm benyttes en blanding av gallesaft, pancreatin og NaHCO_3 .

4.3 Spesiering i fast stoff

Bruk av sekvensiell ekstraksjon av jord og sediment for å vurdere bindingsegenskaper av spormetaller i jord har blitt kritisert fordi metoden forutsetter at ekstraksjonsmidlene er selektive for spesifikke faser (D'Amore m. fl., 2005), for eksempel at ammoniumacetat ved pH 7 bare løser lett adsorberte uspesifikt bundne spormetaller. Andre begrensinger som er beskrevet er at metodene for sekvensiell ekstraksjon ikke er tilpasset, eller utviklet for de fleste jordtyper, at spormetaller kan reabsorberes til jordmatriks, at utbytte fra ekstraksjonene avhenger av rekkefølgen på ekstraksjonsstegene, samt andre momenter som temperatur, tid, tørking av prøven, styrke på ekstraksjonsmidlene, væske-fastfase forhold (LS-forhold) og kornstørrelse. Et svar på kritikken har vært å standardisere prosedyrene som beskrevet ovenfor. Det finnes imidlertid mange metoder for å analysere metallspesier i jord og sediment, som inkluderer forskjellige massespektrometriske metoder, røntgenanalyser, elektronmikroskopi, voltametri, kjernemagnetisk resonans (NMR) med flere, oppsummert i oversiktsartikkelen av D'Amore m. fl., (2005). For å gjøre en god spesieringsanalyse av jord anbefales derfor å bruke

komplementære metoder som inkluderer både analyse i fast stoff og sekvensiell ekstraksjon/ristetester.

4.4 Andre metoder

Mange av de samme metodene for å måle biotilgjengelighet av metaller i vann kan også benyttes i jord og jordvæske. Som for vann finnes mange likevektsbaserte modeller for å estimere metallspesier i jord- og jordvæske. Det finnes passive prøvetakere tilpasset jord. Disse skal fange opp den labile andelen metaller i jordvæsken og simulere opptak og biotilgjengelighet av metallene i planter (Degryse m. fl., 2009). Flere studier er blitt gjort med DGT i jord og sediment og i følge Degryse m. fl. (2009) kan de fungere godt som et mål på den biotilgjengelige andelen av metaller i jord, spesielt for metallspesier som tas opp i planten ved diffusjon og ikke aktiv blir transport inn i planten. Nolan m. fl. (2003) benyttet Donnan dialyse membran for å beregne andelen frie metallioner i jordvæske fra landbruksjord og sammenlignet med estimer gitt av likevektsmodellene WHAM og GEOCHEM.

5 Oppsummering og diskusjon

Det har vært gjort et utall studier både, laboratorie- og feltstudier, der man har forsøkt å beregne den biotilgjengelige andelen av metaller i vann, jord og sediment. Den biotilgjengelige andelen regnes i prinsippet som andelen fritt metall, men kan også inkludere andre spesier som for eksempel metaller som er løst assosiert med organiske kolloider. Man opererer derfor med begrepet labile, eller reaktive metallformer som er biotilgjengelig. Metaller løst i vann og jord har en komplisert kjemi og kan assosieres til organiske og uorganiske partikler og kolloider, og avhengig av pH så kan de danne forskjellige molekyllære forbindelser som blant annet hydroksider og karbonater. Ettersom biotilgjengelig andel av metaller som Pb og Cu i vann, kan inkludere både frie ioner og metaller assosiert med kolloider, kan metoder som identifiserer bare frie ioner være utilstrekkelige. I en sammenlignende studie av Sigg m. fl. (2006) detekterte DGT og GIME-VIP høyere konsentrasjoner av Pb, Cu og Cd, enn mer selektive metoder som PLM og DMT. Noen metoder kan derfor kanskje overestimere andelen biotilgjengelig metall, mens andre kan underestimere andelen. I overvåkingssammenheng bør det derfor benyttes metoder som i størst grad fanger opp den faktiske biotilgjengelige andelen av metaller

Ioneselektive elektrokjemiske detektorer og noen former for voltammetriske detektorer kan i prinsippet måle fritt metallion direkte. De ioneselektive elektrokjemiske detektorene har inntil nylig hatt for dårlige deteksjonsgrenser til å kunne benyttes i naturlige vann. De voltammetriske metodene er under sterk utvikling og vil sannsynligvis i fremtiden være en foretrukket metode for måling av labile metallformer i felt. De fleste andre metodene baserer seg på indirekte beregninger av andelen fritt og biotilgjengelig metall. I de passive prøvetakerne ligger det en

forutsetning at det er de labile metallioner blir tatt opp som inkluderer frie metallioner og metaller bundet til små organisk og uorganiske kolloider. I de teoretiske modellene som WHAM og Hydroqual må man ha god kjennskap til vannkjemien og beregningene kan påvirkes av type organisk materiale som er løst i vannet. Tilsvarende gjelder også for BLM-modellen som bare er validert for en vannkemi innenfor visse grensevariabler.

I overvåkningssammenheng bør det være en forutsetning at metodene er godt uttestet, relativt enkelt kommersielt tilgjengelig og ikke for komplisert å bruke. Av de passive prøvetakerne for vann er det DGT som mest testet. DGT skal gi en god presisjon i målingene i både ferskvann og saltvann og er enkel å benytte. DGT oppfører seg langt på veg som en biotisk ligand. DGT kan allikevel i visse tilfeller overestimere andelen biotilgjengelige labile metaller, fordi kompleksbinderen i DGT (chelex 100) er svært sterk og akkumulerer kompleksbundne metaller (for eksempel Buzier m. fl., 2006). Selv om DGT i noen tilfeller kan være et konservativt mål på biotilgjengelige metaller i vann, er det likevel en metode som anbefales. Dette fordi den er svært enkel, billig, og det kreves ikke at flere parametere analyseres. Dette gjelder også de andre passive prøvetakerne, men disse er ikke like utprøvd som DGT. For å få et mer nøyaktig bilde av biotilgjengeligheten av metaller i vann, kan man koble DGT-målinger, sammen med enkle filtrerings og ionebyttemetoder, og beregningsmodell som for eksempel WHAM. Prøvetaking og analyse blir da mer kompleks, men man kan få et bedre grunnlag for å vurdere hvordan spormetallene er løst i vannet. Separasjon av metallspesier med ioneselektive kolonner og ultrafiltrering er også relativt enkel metodikk for å vurdere metallenes tilstandsform i vann. For å vurdere om de kan benyttes i risikovurdering av forurensinger i vann må metodene sammenlignes med andre mer anerkjente metoder som for eksempel DGT og BLM.

Voltammetriske metodene som er tilpasset feltbruk vil sannsynligvis i fremtiden være en foretrukket metode for måling av labile biotilgjengelige spormetallmetallformer. Foreløpig er det imidlertid få analysesystemer basert på voltammetri som er kommersielt tilgjengelig. Et tilgjengelig system for metallanalyse med voltammetri i felt er såkalt VIA-field, som måler trykk, pH, temperatur, oksygen, konduktivitet, saltinnhold, redoks, turbiditet og klorofyll, og i tillegg tre fraksjoner av spormetaller: frie ioner, dynamisk metallspesier og totalt ekstraherbart metall. Dette systemet er relativt stort og krever sannsynligvis en del erfaring å operere. Systemet er også relativt lite testet, men har et potensiale om det fungerer slik som leverandør lover.

BLM er en modell som skal fungere relativt godt under de forhold den er utviklet for, men den er ikke tilpasset vannkjemien i de fleste norske vann. Det tar lang tid å validere BLM-modeller og tilgjengelige modeller har varierende grad av brukervennlighet. For spormetaller som er relevant for norske skytefelt er det validert BLM-modeller for flere organismer for Cu og Zn. For Pb er det noe mer komplisert ettersom det sannsynligvis er de kroniske effektene av eksponering som er mest avgjørende. Noen modeller er i ferd med å etableres, og i forbindelse med etableringen av EUs vanddirektiv er det foreslått en forenklet modell for å beregne biotilgjengelig konsentrasjon av Pb og stedsspesifikke PNEC-verdier. Den er ikke validert for sure vann og ved å sette inn vannkvalitetsdata fra Kyrstjønn inn i modellen viste resultatene at den sannsynligvis underestimerer både risiko for effekter og andel biotilgjengelig Pb. BLM-

metoden er den eneste metoden som baserer seg på spormetallenes toksisitet som funksjon av vannkjemien, og det ville derfor være interessant å sammenligne BLM-data med data fra andre metoder som passive prøvetakere for å se hvordan de kommer ut i forhold til hverandre.

BLM er en geokjemisk likevektsmodell koblet med en toksikologisk dose-responsmodell, som predikerer hvor mye av metallene som vil binde seg til den biotiske liganden. Den geokjemiske delen baserer seg på forskjellige modeller, for eksempel WHAM-modellen. Valg av teoretisk modell kan være avgjørende for hvor bra tilnærminger de gjør. Spesielt innhold av og type løst organisk material kan være avgjørende for hvor godt modellen fungerer. Nolan m. fl. (2013) fant at WHAM antok en mye sterkere binding av Pb^{2+} og Cu^{2+} til løst organisk materiale enn det som ble antatt av GEOCHEM.

Metoder for å måle biotilgjengelig andel av metaller i jord er i stor grad de samme som i vann. Man kan benytte teoretiske modeller for å predikere løselighet og bindingsstyrke av metaller i jord, man kan gjøre forskjellige labstudier som ristetester, benytte forskjellige prøvetakingsteknikker som DGT, eller benytte analyseinstrumenter til å måle metaller direkte eller i løsning. En forskjell mellom vann og jord er at jord er en mye mer komplisert matriks enn vann. Derfor er det etablert forskjellige ekstraksjonsmetoder for å vurdere hvordan og hvor hardt metallene er bundet til jordmatriksen. Biotilgjengeligheten til metaller i jord avhenger av det miljøet jorda befinner seg i og en utfordring har vært å simulere slike miljøer i labforsøk, for eksempel det vandige mikromiljøet mellom planters rotsystem og jorda.

Referanser

- Achterberg EP, Braungardt C (1999). Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. *Anal. Chim. Acta* 400, 381-397.
- Antoniadis V, Golia EE (2015). Sorption of Cu and Zn in low organic matter-soils as influenced by soil properties and by the degree of soil weathering. *Chemosphere* 138, 364-369.
- Appelo and Postma (2007): *Geochemistry, Groundwater and Pollution*. AA Balkema Publishers, Leiden, The Netherlands.
- ASTM (1998). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation test with the lumbricid earthworm *Eisenia foretida*. E 1676-97. Philadelphia, PA.
- Balistrieri LS, Blank RG (2008). Dissolved and labile concentrations of Cd, Cu, Pb, and Zn in the South Fork Coeur d'Alene River, Idaho: Comparisons among chemical equilibrium models and implications for biotic ligand models. *Appl. Geochem.* 23, 3355-3371.

-
- Becquer T, Dai J, Quantin C, Lavelle P (2005). Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1564-1568
- BIO-MET. Bioavailability of metals and the Water Framework Directive [Online]. Available: <http://bio-met.net/> [Accessed 06.04. 2016].
- Bourgeault A, Ciffroy P, Garnier C, Cossu-Leguille C, Masfaraud JF, Charlatchka R, Garnier, JM (2013). Speciation and bioavailability of dissolved copper in different freshwaters: Comparison of modelling, biological and chemical responses in aquatic mosses and gammarids. *Sci. Tot. Environ.* 452-453, 68-77.
- Braun U, Pusterla N, Ossent P, 1997. Lead poisoning of calves pastured in the target area of a military shooting range. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 139, 403-7.
- Buffle J, Tercier-Waeber ML(2005). Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends Analyt. Chem.* 24, 172-191.
- Buschmann J, Sigg L, (2004) Antimony(III) binding to humic substances: Influence of pH and type of humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4535–4541
- Buzier R, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM (2006). Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. *Sci. Tot. Environ.* 358, 277-285.
- Cao XD, Ma LQ, Chen M, Hardison DW, Harris WG (2003). Weathering of lead bullets and their environmental effects at outdoor shooting ranges. *J. Environ. Qual.* 32, 526-534
- Charriau A, Lissalde S, Poulier G, Mazzella N, Buzier R, Guibaud G (2016). Overview of the Chemcatcher (R) for the passive sampling of various pollutants in aquatic. *Talanta* 148, 556-571
- Chen Z, Zhu L, Wilkinson KJ, 2010. Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures: Bioaccumulation of Lead and Copper. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3580-3586.
- Cooper NL, Bidwell JR, Kumar A (2009). Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1523-1528.
- Cousins AP, Jönsson A, Iverfeldt Å (2009). Testing the Biotic Ligand Model for Swedish surface water conditions - a pilot study to investigate the applicability of BLM in Sweden. IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd.
- Dai J, Becquer T, Rouiller JH, Reversat G, Bernhard-Reversat F, Nahmani J, Lavelle P (2004). Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 91-98
- D'Amore JJ, Al-Abed SR, Scheckel KG, Ryan JA (2005). Methods for speciation of metals in soils: a review. *J. Environ. Qual.* 34, 1707-1745.
- DEFRA 2014. Water Framework Directive implementation in England and Wales: new and updated standards to protect the water environment. Department for Environment Food & Rural Affairs.

-
-
- Degryse F, Smolders E, Zhang H, Davison W (2009). Predicting availability of mineral elements to plants with the DGT technique: a review of experimental data and interpretation by modelling. *Environ. Chem.* 6, 198-218
- De La Torre MCA, Beaulieu PY, Tessier A (2000). In situ measurement of trace metals in lakewater using the dialysis and DGT techniques. *Anal. Chim. Acta* 418, 53-68.
- Denney S, Sherwood J, Leyden J, (1999). In situ measurements of labile Cu, Cd and Mn in river waters using DGT. *Sci. Tot. Environ.* 239, 71-80.
- Deshommes E, Tardif R, Edwards M, Sauve S, Prevost M, (2012). Experimental determination of the oral bioavailability and bioaccessibility of lead particles. *Chem. Cent. J.* 6, 138
- Desmond D, Lane B, Alderman J, Hill M, Arrigan DWM, Glennon JD (1998). An environmental monitoring system for trace metals using stripping voltammetry. *Sensor Actuat. B-Chem.* 48, 409-414.
- Drexler JW, Brattin WJ (2007). An in vitro procedure for estimation of lead relative bioavailability: With validation. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 13, 383-401.
- Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383-2396.
- Domingos RF, Huidobro C, Companys E, Galceran J, Puy J, Pinheiro JP (2008). Comparison of AGNES (absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping) and SSCP (scanned stripping chronopotentiometry) for trace metal speciation analysis. *J. Electroanal. Chem.* 617, 141-148.
- Dong Z, Lewis CG, Burgess RM, Shine JP (2015). The gellyfish: an in situ equilibrium-based sampler for determining multiple free metal ion concentrations in marine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 983-992
- European Commission (2014). Technical guidance to implement bioavailability-based environmental quality standards for metals.
- European Commission (2011). Lead and its compounds. Lead EQS dossier, 2011.
- EVISA. WHAM: Windermere Humic Aqueous Model [Online]. Available: <http://www.speciation.net/Database/Links/WHAM-Windermere-Humic-Aqueous-Model-;i589> [Accessed 28.04. 2016].
- Fedotov PS, Kordel W, Miro M, Peijnenburg WJGM, Wennrich R, Huang PM (2012). Extraction and fractionation methods for exposure assessment of trace metals, metalloids, and hazardous organic compounds in terrestrial environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 1117-1171
- Filgueiras AV, Lavilla I, Bendicho C. (2002). Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. *J. Environ. Monit.* 4, 823-857.
- Garmo Ø (2016). Overvåking av avrenning fra nedlagte skyte- og øvingsfelt. Årsrapport for 2015. Rapport 6948-2016. ISBN: 978-82-577-6683-2.

-
- Garmo Ø, Hertel-Aas T, Ranneklev SB, Meland S (2015). Vurdering av biotilgjengelighetsmodeller som verktøy for karakterisering av resipienters sårbarhet for metallforurensing fra veg. *Vann* 50, 278-290.
- Gecheva G, Yurukova L. (2014), Water pollutant monitoring with aquatic bryophytes: a review. *Enviro. Chem. Lett.* 12, 49-61
- Gruebel KA, Davis JA, Leckie JO (1988). The feasibility of using sequential extraction techniques for arsenic and selenium in soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 390-397.
- Gustafsson Ö, Gschwend PM (1997) Aquatic colloids: Concepts, definitions, and current challenges. *Limnol. Oceanogr.* 42: 519-528
- Han, S., Naito W, Hanai Y, Masunaga S (2013). Evaluation of trace metals bioavailability in Japanese river waters using DGT and a chemical equilibrium model. *Wat. Res.* 47, 4880-4892.
- Hatano A, Shoji R (2010). A new model for predicting time course toxicity of heavy metals based on Biotic Ligand Model (BLM). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 151, 25-32.
- Heier LS, Lien IB, Stromseng AE, Ljones M, Rosseland BO, Tollefsen KE, Salbu B, (2009). Speciation of lead, copper, zinc and antimony in water draining a shooting range-Time dependant metal accumulation and biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.) *Sci. Tot. Environ.* 407, 4047-4055.
- Heier LS, Strømseng AE, Ljønes M (2004). Analyse og vurdering av ulike tilstandsformer til tungmetaller i avrenningsbekker fra skytebaner. FFI/RAPPORT-2004/02971.
- Hernandez D, Plaza C, Senesi N, Polo A (2007). Fluorescence analysis of copper(II) and zinc(II) binding behaviour of fulvic acids from pig slurry and amended soil. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 900-908
- Hettiarachchi GM, Pierzynski GM (2004), Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: a review. *Environ. Prog.* 23, 78–93.
- Hjortenkrans DST, Mansson NS, Bergback BG, Haggerud AV (2009). Problems with Sb analysis of environmentally relevant samples. *Environ. Chem.* 6, 153-159
- Holm P E, Andersen S, Christensen TH (1995). Speciation of dissolved cadmium: Interpretation of dialysis, ion exchange and computer (GEOCHEM) methods. *Wat. Res.* 29, 803-809.
- Hoppe S, Garmo OA, Leppanen MT, Borg H, Ndungu K (2015). Soft and sour: The challenge of setting environmental quality standards for bioavailable metal concentration in Fennoscandinavian freshwaters. *Environ. Sci. Pol.* 54, 210-217.
- HUMUS. 2011. UiO, institutt for biovitenskap. Available: <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/h/humus.html> [Accessed 30.03. 2016].

-
-
- HVMFS 2015. Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om ändring i Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter (HVMFS 2013:19) om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten.
- Hydroqual 2005. The Biotic Ligand Model Windows Interface, Version 2.2.3: User's Guide and Reference Manual. Mahwah, New Jersey.
- Idronaut, Cabe, Imt 2002. Voltammetric in-situ profiling system - introducing the only existing submersible voltammetric probe for in situ trace element monitoring and profiling. Produktbeskrivelse fra Idronaut (<http://www.idronaut.it/products-groundwater-voltammetric-probes>).
- ILA. 2016. Lead BLM tool [Online]. International Lead Association. Available: <http://www.ila-lead.org/responsibility/lead-blm-tool> [Accessed 06.04. 2016].
- Ilgén AG, Majs F, Barker AJ, Douglas YA, Trainor TP (2014) Oxidation and mobilization of metallic antimony in aqueous systems with simulated groundwater. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 132, 16-30
- INAP 2002. Diffusive Gradients in Thin-films (DGT) - a Technique for Determining Bioavailable Metal Concentrations. International Network for Acid Prevention.
- Johansen SL, Thygesen H (2013). Økologisk risikovurdering med biotisk ligandmodell - En feltstudie av tunnelvanskevann og vegavrenning i rensebasseng. Rapport nr. 230, Statens Vegvesen.
- Johnson CA, Moench H, Wersin P, Kugler P, Wenger V (2005) Solubility of Antimony and other elements in samples taken from shooting ranges. *J. Environ. Qual.* 34: 248–254
- Johnsen IV, Mariussen E, Voie Ø (2016). Beitedyr på skyte- og øvingsfelt. Eksponering og effekter av ammunisjonsrelaterte metaller – en litteraturstudie. FFI-rapport 16/00640
- Kaczorek D, Bruemmer GW; Sommer M (2009). Content and Binding Forms of Heavy Metals, Aluminium and Phosphorus in Bog Iron Ores from Poland. *J. Environ. Qual.* 38, 1109-1119.
- Kaur H, Kumar R, Babu JN, Mittal S (2015). Advances in arsenic biosensor development - A comprehensive review. *Biosen. Bioel.* 63, 533-545
- Kennedy VH, Sanchez AL, Oughton DH, Rowland AP, (1997). Use of single and sequential chemical extractants to assess radionuclide and heavy metal availability from soils for root uptake. *Analyst* 122, R89-R100
- Kocherginsky NM, Yang Q, Seelam L (2007). Recent advances in supported liquid membrane technology. *Sep. Puri. Technol.* 53, 171-177.
- Leuz AK (2006). Redox reactions of Antimony in the aquatic and terrestrial environment. Diss. ETHNO. 16582, Swiss federal Institute of Technology Zurich, Zurich.
- Lin Z, Comet B, Qvarfort U, Herbert R. (1995). The chemical and mineralogical behaviour of Pb in shooting range soils from central Sweden. *Environ Pollut.* 89, 303-309.

-
- Lin ZX (1996). Secondary mineral phases of metallic lead in soils of shooting ranges from Orebro county. Sweden. *Environ. Geol.* 27, 370-375.
- Lindsay WL, Norvell WA. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 42,421-428.
- Lissalde S, Charriau A, Poulhier G, Mazzella N, Buzier R, Guibaud G (2016). Overview of the Chemcatcher® for the passive sampling of various pollutants in aquatic environments Part B: Field handling and environmental applications for the monitoring of pollutants and their biological effects. *Talanta* 148, 572-582.
- Lopez J, Vazquez MD, Carballeira A (1994). Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *fontinalis-antipyretic*. *Freshwat. Biol.* 32, 185-198
- Ma WK, Smith BA, Stephenson GL, Siciliano SD (2009). Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil. *Environ Toxicol. Chem.* 28, 1439-1446. .
- Mariussen E, Heier LS, Teien HC, Pettersen MN, Holth TF, Salbu B, Rosseland BO (2017). Accumulation of lead (Pb) in brown trout (*Salmo trutta*) from a lake downstream a former shooting range. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 135, 327-336.
- Mariussen E (2012). Analysis of antimony (Sb) in environmental samples FFI-rapport 2012/00347. ISBN: 978-82-464-2049-3.
- Mariussen E, Voie ØA, Strømseng AE (2008). Avhending av skyte- og øvingsfelt lagt på myr. FFI-rapport-2008/02225. ISBN: 978-82-464-1487-4.
- McGraw CM, Radu T, Radu , Diamond D (2007). Evaluation of Liquid- and Solid-Contact, Pb²⁺-Selective Polymer-Membrane Electrodes for Soil Analysis. *Electroanal.* 20, 340-346.
- Miljødirektoratet (2016). Grenseverdier for klassifisering av vann, sediment og biota. Miljødirektoratet M-608.
- Mineql+ (2015). MINEQL+ 4.6 [Online]. software.informer. Available: <http://mineql.software.informer.com/4.6/>.
- Nash MJ, Maskall JE, Hill SJ (2000). Methodologies for determination of antimony in terrestrial environmental samples. *J. Environ. Monit.* 2, 97-109
- Neff, JM (1997). Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 917-927
- Nolan AL, McLaughlin MJ, Mason SD (2003). Chemical speciation of Zn, Cd, Cu, and Pb in pore waters of agricultural and contaminated soils using Donnan dialysis. *Environ. Sci. Technol.* 37, 90-98
- NRC (2003). Bioavailability of contaminants in soil and sedimentsØ: processes, tools and applications, National Research Council. The National Academic Press. Washington D.C.
- Okkenhaug G, Zhu YG, Luo L, Lei M, Li X, Mulder J (2011). Distribution, speciation and availability of antimony (Sb) in soils and terrestrial plants from an active Sb mining area. *Environ. Poll.* 159, 2427-2434.

-
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, Verstraete W, Van de Wiele T, Wragg J, Rempelberg CJ, Sips AJ, Van Wijnen JH. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3326-3334
- Oughton MI, Salbu B, Riise G, Lien H, Østby G, Noren A (1992) Radionuclide mobility and bioavailability in Norwegian and Soviet soils. *Analyst* 117, 481-486
- Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, Mcgeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu KB (2002). The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 133, 3-35.
- Paquin PR, Santore RC, Wu KB, Kavvadas CD, Di Toro DM (2000). The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environ. Sci. Pol.* 3, Supplement 1, 175-182.
- Parat C, Pinheiro JP (2015). ISIDORE, a probe for in situ trace metal speciation based on Donnan membrane technique with related electrochemical detection part 1: Equilibrium measurements. *Anal. Chim. Act.* 896, 1-10.
- Parthasarathy N, Pelletier M, Buffle J (2004). Permeation liquid membrane for trace metal speciation in natural waters - Transport of liposoluble Cu(II) complexes. *J. Chrom. A* 1025, 33-40
- Pédrot M, Dia A, Davranche M, Bouhnik-Le Coz M, Henin O, Gruau G (2008) Insights into colloid-mediated trace element release at the soil/water interface, *J. Colloid Interface Sci.* 325, 187-197.
- Peijnenburg, W. J. G. M. & Jager, T. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 63-77.
- Pesavento M, Alberti G, Biesuz R (2009). Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Anal. Chim. Act.* 631, 129-141.
- Powell KJ, Brown PL, Byrne RH, Gajda T, Hefter G, Leuz AK, Sjöberg S, Wanner H (2013). Chemical speciation of environmentally significant metals with inorganic ligands. Part 5: The Zn²⁺ + OH⁻, Cl⁻, CO₃²⁻, SO₄²⁻, and PO₄³⁻ systems (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 85, 2249-2311.
- Powell KJ, Brown PL, Byrne RH, Gajda T, Hefter G, Leuz AK, Sjöberg S, Wanner H (2008). Chemical speciation of environmentally significant metals with inorganic ligands. Part 3: The Pb²⁺, OH⁻, Cl⁻, CO₃²⁻, SO₄²⁻, and PO₄³⁻ systems (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 81, 2425-2476
- Powell KJ, Brown PL, Byrne RH, Gajda T, Hefter G, Sjöberg S, Wanner H (2007). Chemical speciation of environmentally significant metals with inorganic ligands - Part 2: The Cu²⁺

-
- OH-, Cl-, CO₃²⁻, SO₄²⁻, and PO₄³⁻ systems - (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem* 79, 895-950
- Pretsch E (2002). The new wave of ion-selective. *Anal. Chem.* 74, 420A-426A.
- Princeton-Applied-Research. RE: Application Note S-6, Subject: Fundamentals of Stripping Voltammetry. http://www.ameteki.com/-/media/ameteki/download_links/documentations/library/princetonappliedresearch/application_note_s-6.pdf?la=en.
- Qiu P, Leygraf C (2011) Initial oxidation of brass induced by humidified air. *Appl. Surface Sci.* 258, 1235-1241
- Rand and Petrocelli (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Taylor and Francis, Hemisphere Publishing corporation, USA.
- Rauret G, Lopez-Sanchez JF, Sahuquillo A, Rubio R, Davidson C, Ure A, Quevauviller P (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Mon.* 1, 57-61.
- Rogers JT, Wood CK (2004). Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813-825.
- Rognerud S (2000). Overvåking av metallforurensing i militære skytefelt og demoleringsplasser. Resultater fra 9 års overvåking. NIVA-rapport 4209-2000.
- Ruby MV, Davis A, Link TE, Schoof R, Chaney RL, Freeman GB, Bergstrom P (1993). Development of an in-vitro screening-test to evaluate the in-vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ. Sci. Technol* 27, 2870-2877.
- Santillan-Medrano J, Jurinak JJ (1975) The chemistry of Lead and cadmium in soil: solid phase formation. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 39, 851-856
- Scally S, Davison W, Zhang H (2006). Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Anal. Chim. Act.* 558, 222-229.
- Shaff J, Schultz B, Craft E, Clark R, Kochian L (2010). Geochem-EZ: a Chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant and Soil* 30, 207-214.
- Sigg L, Black F, Buffle J, Cao J, Cleven R, Davison W, Galceran J, Gunkel P, Kalis E, Kistler D, Martin M, Noel S, Nur Y, Odzak N, Puy J, Van Riemsdijk W, Temminghoff E, Tercier-Waeber ML, Toepperwien S, Town RM, Unsworth E, Warnken KW, Weng L, Xue H, Zhang H 2006. Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1934-41.
- Smith BA, Greenberg B, Stephenson GL. (2010). Comparison of biological and chemical measures of metal bioavailability in field soils: test of a novel simulated earthworm gut extraction. *Chemosphere* 81, 755-766.
- Tarbutck EJ, Lutgens FK (1990). *The Earth an introduction to physical geology*. Third edition. Macmillian publishing company, Nw York.

-
-
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W. & Virta, M. 1998. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosen. Bioele.* 13, 931-938.
- Tauriainen, S. M., Virta, M. P. J. & Karp, M. T. 2000. Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. *Wat. Res.* 34, 2661-2666.
- Temminghoff EJM, Plette ACC, Van Eck R, Van Riemsdijk WH (2000). Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the Wageningen Donnan Membrane Technique. *Anal. Chim. Act.* 417, 149-157
- Tercier ML, Buffle J, Graziottin F (1998). A Novel Voltammetric In-Situ Profiling System for Continuous Real-Time Monitoring of Trace Elements in Natural Waters. *Electroanal.* 10, 355-363.
- Tercier-Waeber ML, Confalonieri F, Koudelka-Hep M, Dessureault-Romppe J, Graziottin F, Buffle J (2008). Gel-integrated voltammetric microsensors and submersible probes as reliable tools for environmental trace metal analysis and speciation. *Electroanal.* 20, 240-258
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson M (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace-metals. *Anal. Chem.* 51: 844-851
- Tighe M, Lockwood P, Wilson S (2005) Adsorption of antimony(v) by floodplain soils, amorphous iron(III) hydroxide and humic acid. *J. Environ. Monit.* 7, 1177-1185
- Tipping E (1994). WHAM—A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Comp. Geosci.* 20, 973-1023.
- Ure AM, Quevauviller P, Muntau H, Griepink B (1993). Speciation of heavy-metals in soils and sediments - an account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the bcr of the commission-of-the-european-communities. *International Journal Of Environmental Anal. Chem.* 51, 135-151
- USEPA (2003) The Biotic Ligand Model: Technical Document for Its Application to the Evaluation of water Quality Criteria for Copper. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology.
- Van Loon GW, Duffy SJ (2000). *Environmental chemistry - a global perspective*, Oxford University Press.
- Vannforskriften 2006. Forskrift om rammer for vannforvaltning. Klima- og miljødepartementet.
- Vega FA, Weng LP, Temminghoff EJM, van Riemsdijk WH (2010). Donnan Membrane Technique (DMT) for Anion Measurement. *Anal. Chem.* 8 2932-2939
- Vogt RD, Seip HM (1999). *Jordkjemi*. Kjemisk institutt: UIO.
- Vrana B, Allan IJ, Greenwood R, Mills GA, Dominiak E, Svensson K, Knutsson J, Morrison G (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analyt.Chem.* 24, 845-868.

-
- Wang J (2005). Stripping Analysis at Bismuth Electrodes: A Review. *Electroanal. Chem.* 17, 1341-1346.
- Weltje L (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: A critical evaluation of data. *Chemosphere* 36, 2643-2660
- Wenzel WW, Kirchbaumer N, Prohaska T, Stingeder G, Lombi E, Adriano DC (2001). Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta* 436, 309-323.
- Wu Y, Li NB, Luo HQ (2008). Simultaneous measurement of Pb, Cd and Zn using differential pulse anodic stripping voltammetry at a bismuth/poly(p-aminobenzenesulfonic acid) film electrode. *Sens. Actuators B-Chem.* 133, 677-681.
- Zhou SW, Xu MG, Ma YB, Chen SB, Wei DP (2008). Aging mechanism of copper added to bentonite. *Geoderma* 147, 86-92

About FFI

The Norwegian Defence Research Establishment (FFI) was founded 11th of April 1946. It is organised as an administrative agency subordinate to the Ministry of Defence.

FFI's MISSION

FFI is the prime institution responsible for defence related research in Norway. Its principal mission is to carry out research and development to meet the requirements of the Armed Forces. FFI has the role of chief adviser to the political and military leadership. In particular, the institute shall focus on aspects of the development in science and technology that can influence our security policy or defence planning.

FFI's VISION

FFI turns knowledge and ideas into an efficient defence.

FFI's CHARACTERISTICS

Creative, daring, broad-minded and responsible.

Om FFI

Forsvarets forskningsinstitutt ble etablert 11. april 1946. Instituttet er organisert som et forvaltningsorgan med særskilte fullmakter underlagt Forsvarsdepartementet.

FFIs FORMÅL

Forsvarets forskningsinstitutt er Forsvarets sentrale forskningsinstitusjon og har som formål å drive forskning og utvikling for Forsvarets behov. Videre er FFI rådgiver overfor Forsvarets strategiske ledelse. Spesielt skal instituttet følge opp trekk ved vitenskapelig og militærteknisk utvikling som kan påvirke forutsetningene for sikkerhetspolitikken eller forsvarsplanleggingen.

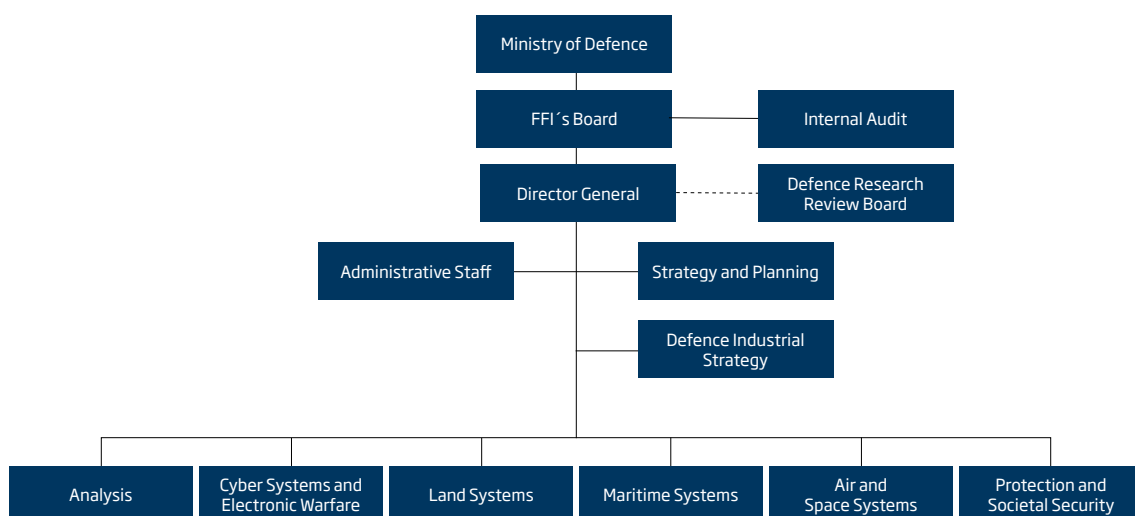
FFIs VISJON

FFI gjør kunnskap og ideer til et effektivt forsvar.

FFIs VERDIER

Skapende, drivende, vidsynt og ansvarlig.

FFI's organisation



Forsvarets forskningsinstitutt
Postboks 25
2027 Kjeller

Besøksadresse:
Instituttveien 20
2007 Kjeller

Telefon: 63 80 70 00
Telefaks: 63 80 71 15
Epost: ffi@ffi.no

Norwegian Defence Research Establishment (FFI)
P.O. Box 25
NO-2027 Kjeller

Office address:
Instituttveien 20
N-2007 Kjeller

Telephone: +47 63 80 70 00
Telefax: +47 63 80 71 15
Email: ffi@ffi.no