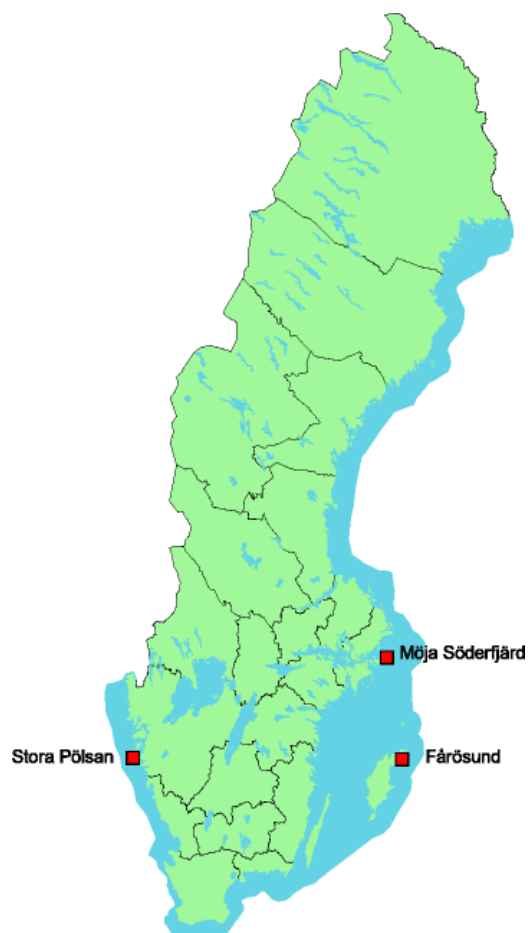


Simulering av TNT-läckage i havsmiljö

Ann-Christin Andersson, Johan Eriksson, Lars Hägglund, Yvonne Nygren, Thorsten Johansson och Mats Forsman



Vetenskaplig rapport

Simulering av TNT-läckage i havsmiljö

Ann-Christin Andersson, Johan Eriksson, Lars Hägglund, Yvonne Nygren, Thorsten
Johansson och Mats Forsman

Utgivare Totalförsvarets Forskningsinstitut - FOI	Rapportnummer, ISRN FOI-R--0304--SE	Klassificering Vetenskaplig rapport
	Forskningsområde 9. Civila tillämpningar inklusive miljöfrågor	
	Månad, år December 2001	Projektnummer E4637
	Verksamhetsgren 2. NBC-skyddsforskning	
	Delområde 93. Miljöfrågor	
Författare/redaktör Ann-Christin Andersson Johan Eriksson Lars Häggglund Yvonne Nygren Thorsten Johansson Mats Forsman	Projektledare Jan Sjöström	
	Godkänd av	
	Uppdragsgivare/kundbeteckning	
	Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig Mats Forsman	
Rapportens titel Simulering av TNT-läckage i havsmiljö		
Sammanfattning (högst 200 ord) Efter andra världskriget användes dumpning som en snabb och enkel metod för att bli av med omodern, överbliven och opålitlig ammunition. Dumpning i svenska vatten genomfördes mellan 1940 och 1968 främst i insjöar men också i havsområden och nedlagda gruvhål. Försvarsmakten utreder (i samarbete med Naturvårdsverket (NV)) de säkerhetsmässiga och ekologiska frågeställningarna kring den åldrade ammunitionen. Trotyl eller trinitrotoluen (TNT) klassas som ett miljöfarligt ämne och är en huvudkomponent i ammunitionsdumpningarna. Genomförda undersökningar har visat att endast ett begränsat utläckage av TNT i insjöar kommer att ske, eftersom TNT snabbt omvandlas till metaboliter och adsorberas hårt till sedimenten. Skillnaderna mellan förhållanden i sjö och hav är dock stora. Bland annat är korrosionen avsevärt högre i havet, vilket medför att läckage av explosivämnen kan förväntas ske betydligt tidigare i havsvatten än i sjö och gruvmiljö. Därför har FOI på uppdrag av Försvarsmakten (FM) genomfört simulering av TNT-läckage i havsmiljö. Undersökningen redovisas i föreliggande rapport. Sediment och vatten från tre olika havsdumpningsmiljöer användes. Från Östersjön valdes en provplats med syrerik botten och en med syrefattig botten, Möja respektive Fårö. Västerhavet representerades av prov från en syrerik botten, Stora Pölsan. Resultaten från denna studie visade på att en snabb omvandling av TNT till metaboliter även sker i havsvatten. Metaboliterna adsorberades hårt till de olika sedimenten i studien, men en avsevärt mindre mängd adsorberades till sedimenten under syrefria förhållanden. Vattenlösliga metaboliter härrörande från TNT bildades under syrefria förhållanden och långtidsutlakningen av TNT-metaboliter var i samtliga fall mindre än 10 % av den totala sedimentinbundna mängden.		
Nyckelord dumpad ammunition, TNT, hav sediment, miljörisk, spridning		
Övriga bibliografiska uppgifter	Språk Svenska	
ISSN 1650-1942	Antal sidor: 22	
	Pris: Enligt prislista	

Issuing organization FOI – Swedish Defence Research Agency	Report number, ISRN FOI-R--0304--SE	Report type Scientific Report
	Research area code 9 Civilian Applications including Enviromental studies	
	Month year December 2001	Project no. E4637
	Customers code 2. NBC Defence Research	
	Sub area code 93. Environmental studies	
Author/s (editor/s) Ann-Christin Andersson Johan Eriksson Lars Hägglund Yvonne Nygren Thorsten Johansson Mats Forsman	Project manager Jan Sjöström	
	Approved by	
	Sponsoring agency	
	Scientifically and technically responsible Mats Forsman	
Report title (In translation) Simulation of TNT leakage in sea environment		
Abstract (not more than 200 words) <p>After World War II, since no destruction plant for explosives was available, explosives were dumped in various places in Sweden. Between 1940 and 1968 munitions were dumped in lakes, abounded mineshafts and sea areas. Presently, the Swedish Armed Forces is investigating security risks and ecological risks connected with the dumped obsolete ammunition.</p> <p>TNT, which is classified as an environmental hazardous compound, is the main component of the explosives that has been dumped. In this context and with the knowledge that TNT is transformed in nature, experiments have previously been conducted to mimic leakage of TNT in lake environment. However, deep-lake and deep-sea environments are substantially different. Therefore, FOI has in the present report, by order of the Swedish Armed Forces, mimicked leakage of TNT in sea environment. Sediment and water from three different sea dumping locations were collected. From the Baltic Sea, one location with aerobic and one location with anaerobic sediment were selected. From the western sea only one aerobic sediment location was chosen.</p> <p>The results of this study showed that TNT was rapidly transformed to other metabolites also in sea environment. The metabolites were adsorbed firmly to the tested sediments, but lower amounts were bound under anaerobic conditions. Water-soluble metabolites originating from TNT were primarily formed during anaerobic conditions but the long-term leakage was for all sediments, lower than 10% of the total amount bound to sediment.</p>		
Keywords Dumped ammunition, TNT, environmental risk assessment, transport, sea, sediment		
Further bibliographic information	Language Swedish	
ISSN 1650-1942	Pages 22	
	Price acc. to pricelist Security classification	

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	5
Inledning.....	6
2.1 Material.....	7
2.2 Analys av vatten och sediment.....	7
2.3 Försöksuppställning för simuleringsförsök.....	8
2.5. Extraktion av sediment.....	9
3 Resultat.....	10
3.1 Analys av vatten och sediment.....	10
3.2 Simuleringsförsök.....	12
3.3 Extraktion av sediment.....	15
Diskussion.....	18
Referenser.....	21

Förkortningar och förklaringar

4-ADNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen
DANT	diaminonitrotoluen
2,4-DANT	2,4-diamino-6-nitrotoluen
TAT	2,4,6-triaminotoluen
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
Mineralisering	Omvandling till CO ₂ och H ₂ O
Anaerob	syrefria förhållanden
Anaeroba	syrerika förhållanden
HPLC	high performance liquid chromatography
GC/MS	gaskromatografi/masspektrometri
KOH	Kaliumhydroxid
¹⁴ C	Radioaktiv isotop av kol
L/S	mängd extraktionsvätska/mängd sediment (Liquid over solid, v/w)

Sammanfattning

Efter andra världskriget användes dumpning som en snabb och enkel metod för att bli av med omodern, överbliven och opålitlig ammunition. Dumpning i svenska vatten genomfördes mellan 1940 och 1968 främst i insjöar men också i havsområden och nedlagda gruvhål. Försvarsmakten utreder (i samarbete med Naturvårdsverket (NV)) de säkerhetsmässiga och ekologiska frågeställningarna kring den åldrade ammunitionen. Trotyl eller trinitrotoluen (TNT) klassas som ett miljöfarligt ämne och är en huvudkomponent i ammunitionsdumpningarna.

Genomförda undersökningar har visat att endast ett begränsat utläckage av TNT i insjöar kommer att ske, eftersom TNT snabbt omvandlas till metaboliter och adsorberas hårt till sedimenten. Skillnaderna mellan förhållanden i sjö och hav är dock stora. Bland annat är korrosionen avsevärt högre i havet, vilket medför att läckage av explosivämnen kan förväntas ske betydligt tidigare i havsvatten än i sjö och gruvmiljö. Därför har FOI på uppdrag av Försvarsmakten (FM) genomfört simulering av TNT-läckage i havsmiljö. Undersökningen redovisas i föreliggande rapport

Sediment och vatten från tre olika havsdumpningsmiljöer användes. Från Östersjön valdes en provplats med syrerik botten och en med syrefattig botten, Möja respektive Fårö. Västerhavet representerades av prov från en syrerik botten, Stora Pölsan.

Resultaten från denna studie visade på att en snabb omvandling av TNT till metaboliter även sker i havsvatten. Metaboliterna adsorberades hårt till de olika sedimenten i studien, men en avsevärt mindre mängd adsorberades till sedimenten under syrefria förhållanden. Vattenlösliga metaboliter härrörande från TNT bildas under syrefria förhållanden och långtidsutlakningen av TNT-metaboliter var i samtliga fall mindre än 10 % av den totala sedimentinbundna mängden.

Inledning

Efter andra världskriget användes dumpning som en snabb och enkel metod för att bli av med omodern, överbliven och opålitlig ammunition. Detta tillvägagångssätt användes pga. att det saknades destruktionsanläggningar. Verksamheten upphörde då London-konventionen upprättades 1972, som innebar förbud mot dumpning och förbränning i alla hav.

Dumpning i svenska vatten genomfördes mellan 1940 och 1968 främst i insjöar men också i havsområden och nedlagda gruvhål. Det finns 106 kartlagda platser i Sverige där dumpning av ammunition har skett: 25 dumpningar har skett i hav, 72 i sjöar, 6 i gruvor, och 3 på land. De flesta havsdumpningarna har skett i Östersjön.

Försvarsmakten utreder i samarbete med Naturvårdsverket de säkerhetsmässiga och ekologiska frågeställningarna kring den åldrade ammunitionen. Ur miljösynpunkt är det huvudsakligen risken för läckage av tungmetaller och (trinitrotoluen) TNT som är av betydelse (Berglind & Liljedahl, 1998). TNT är huvudkomponent i det explosivämne som finns i bl. a granater. Dessutom utgör TNT ett av de miljöfarliga ämnen som har mest spridning i markområden runt militära anläggningar.

Efter närmare 50 år i sjöar och gruvor kan ingen kemisk påverkan på omgivande vatten eller sediment ses (Liljedahl & Qvarfort, 1997, Sjöström *et al.*, 1999). Någon påverkan på bottenfaunan har inte heller kunnat påvisas (Sjöström *et al.*, 1999). En avgörande orsak är att ammunitionen i sjöar och gruvor är i stort sett intakt. Granater som bärgats i Rammträsk på Gotland och i sjön Tärnet i Skaraborgslän, liksom sprängkapslar som påträffats i gruvschakt, visar att metallen ännu inte korroderat. Vare sig tungmetaller eller TNT har börjat läcka ut till omgivningen.

I laboratorieförsök har läckage av TNT till vatten och sediment simulerats (Andersson *et al.*, 1998; Sjöström *et al.*, 1999; Wikström *et al.*, 2000). Detta dels för att se vilka halter som uppstår i vatten- och sedimentfas, dels för att se om någon giftighet uppstår. Hittills har försök huvudsakligen genomförts med sediment och bottenvatten från ett antal kända dumpningsplatser i sjöar. Då sjöar har mycket olika kemi valdes fyra olika typsjöar bland de sjuttioalet dumpningsplatserna. De fyra sjöar som ingick i undersökningen var en näringsrik slättsjö, en norrländsk skogstjärn, en kalkad medelstor sjö och en myrtjärn. En kompletterande kartläggning av samtliga sjöars vattenkemi genomfördes också, detta för att fördjupa kunskapsunderlaget (Larsson M., 1999).

Effekterna på sjöarna av ett TNT läckage har bedömts vara begränsat. Det har visat sig att 98 % av TNT transformeras och binder till sedimentet och därefter är mycket svårt att få loss igen. Vare sig vatten eller sedimenten i sjöförsöken har visat sig ge negativ ekologisk effekt i tester på vattenloppa. Skillnaderna mellan sjövattnen och havsvattnen är stora. Bland annat är korrosionen avsevärt högre i havet. Således kan läckage av sprängämnen förväntas ske betydligt tidigare i havsvattnen jämfört med sjö- och gruvmiljö. Därför har i föreliggande rapport, på uppdrag av försvarsmakten, gjorts ett motsvarande simuleringsförsök för tre olika havsmiljöer representerande dumpningar i Möja och Fårö i Östersjön, samt Stora Pölsan i Västerhavet.

Material och Metoder

2.1 Material

Sediment och vatten togs från tre olika havsmiljöer: Möja och Fårö i Östersjön, samt Stora Pölsan i Västerhavet. Provtagningen utfördes i samarbete med Per Jonsson, Naturvårdsverket (NV). För att bättre kunna följa TNT-omvandling och -fördelning användes ^{14}C -märkt TNT i försöken. Detta syntetiserades av Patrik Goede vid Avdelningen för Vapen och Skydd, FOI Grindsjön med ^{14}C -toluen som utgångsmaterial.

2.2 Analys av vatten och sediment

Vatten- och sedimentprov från de tre dumpningsplatserna analyserades med avseende på TNT och dess primära nedbrytningsprodukter vid FOI NBC-skydd. Sedimentproverna avvattnades genom Buchner-filtrering. Prover som hållits under anaeroba (syrefattiga) förhållanden filterades under kvävgasmiljö. Dessa prover representerar bottenmiljön för dumpningarna vid Fårösund. Varje prov extraherades därefter med 2 x 10 ml diklormetan i ultraljudsbad 2 x 30 minuter. De sammanslagna extrakten torkades med aktiverad natriumsulfat och indunstades därefter under kvävgas till ca 1 ml. De färdiga extrakten överfördes därefter till en autosamplerflaska för analys med gaskromatografi/masspektrometri -selective ion recording (GC/MS-SIR).

Vattenproverna extraherades på fastfaskolonn (Lichrolut EN). Föreningar som kvarhållits till kolonnen eluerades med 1+1.5 ml acetonitril/metanol (1/1). Eluatet evaporerades på rullindunstare till ca 1 ml. De färdiga extrakten överfördes därefter till en autosamplerflaska för analys med GC/MS-SIR.

Separation av de i provet ingående komponenterna gjordes på en 30 x 0.25;0.25 μm DB-1701 kapillär kolonn. Injektionstemperaturen som hölls i 1 minut var 60°C och kolonnen programmerades därefter med 10°C/minut till 280°C som hölls i 5 minuter. Masspektrometern arbetade i SIR-mode. Joniseringsenergin var 70 eV och temperaturen i jonkällan ca 200 °C.



Figur 1. Försökupställning, bilden till vänster visar en aerob upställning med KOH-fällor, (Stora Pölsan A-D). Till höger ses kolvar placerade i anaerobbox (Fårö A-D).

2.3 Försökupställning för simuleringsförsök

Sediment och vatten från de olika havsområdena fördelades på 12 st. 5 liters kolvar fyra för varje havsmiljö. Då vatteninnehållet var högt i två av sedimenten (Möja och Fårö), centrifugerades dessa först i 5000 x g 5 min (Beckman JLA-10,500). Därefter tillsattes de olika sedimenten och havsvattnen till kolvarna enligt tabell 1. Parallellt gjordes en torrviktsbestämning av sedimenten. Kolvarna med två av havsmiljöerna, Möja och Stora Pölsan, syresattes genom att ett svagt luftflöde (20/ml/min) fick bubbla genom havsvattnet, medan kolvar med sediment och vatten från Fårö placerades i en anaerobbox med genomflöde av kvävgas (figur 1). Dessutom fick ett svagt flöde av kvävgas passera genom kolvarna i boxen. Den utgående gasen från boxen passerade en kolv med vatten för att hindra eventuellt återflöde av luft. Samtliga kolvar inkuberades i mörker under en vecka vid 12°C innan havsvatten med TNT tillsattes enligt tabell 1. I tre E-kolvar löstes ¹⁴C-TNT i aceton, lösningen fick indunsta varefter filtrerat vatten från respektive havsområde tillsattes. Lösningarna behandlades därefter som redan beskrivits i Sjöström *et al.* (1999). Prover togs till koncentrationsbestämning med HPLC och motsvarande mängd radioaktivitet. Varje kolv med havsvatten och löst ¹⁴C-TNT fördelades på tre kolvar innehållande sediment och vatten från respektive havsområde (Tabell 1). De aeroba kolvarna passerades därefter åter med luft under totalt 70 dagar, medan de anaeroba kolvarna hade ett självflöde av avgående gaser under samma tid. Flödet av kvävgas genom anaerobboxen var konstant under hela försökstiden. Alla kolvar försågs med en 1 M KOH-fälla där den utgående luften/kvävgasen fick passera för att kunna detektera eventuell avgående ¹⁴CO₂.

Tabell 1 Försöksbetingelser för simulerat TNT-utsläpp i kolvar med havssediment

Kolv	Sediment (g) TS ^a	Vatten (l)	¹⁴ C-TNT (mg/l)	Aerob/anaerob
Möja A	156	2,5	-	Aerob
Möja B-D (triplikat)	156	2,5	25	Aerob
Fårö A	162	2,5	-	Anaerob
Fårö B-D (triplikat)	162	2,5	25	Anaerob
Stora Pölsan A	440	2,5	-	Aerob
Stora Pölsan B-D (triplikat)	440	2,5	25	Aerob

^aTS= torrsubstans,

Tabell 2 Sammanställning över uttagen mängd ^{14}C vid de olika provtagningstillfällena

Dag	Uttagen mängd vatten (ml)	Uttagen mängd ^{14}C -TNT (mg)		
		Möja	Fårö	Stora Pölsan
0	285	6,47±0,04	6,56±0,76	6,56±0,39
1	85	1,64±0,03	1,76±0,29	1,74±0,07
3	85	1,42±0,03	1,61±0,11	1,40±0,01
6	85	1,15±0,04	1,72±0,06	0,82±0,07
13	85	0,67±0,08	1,16±0,03	0,70±0,03
20	85	0,39±0,08	1,10±0,06	0,48±0,02
42	85	0,12±0,03	0,94±0,06	0,18±0,01
70	335	0,27±0,02	2,93±0,08	0,32±0,01
Totalt uttag	1130	12,13±0,35 (19%)	17,74±1,44 (29%)	12,14± 0,60 (21%)

2.4 Analys av prover från simuleringsförsök

Alla kolvar analyserades med avseende på bildad CO_2 , redoxpotential, konduktivitet, pH, antal mikroorganismer i vattenfasen och radioaktivitet i vatten och luftfas. Total mängd uttaget prov visas i tabell 2. KOH-fällorna analyserades med avseende på CO_2 -mättnad och radioaktivitet.

Totala mängden CO_2 i luften som avgick från de aeroba kolvarna mättes med ett direktvisande instrument. Q-checkTM 8730 (TSI) enligt procedur som tidigare har beskrivits (Sjöström *et al.*, 1999). Redoxpotential och konduktivitet mättes med Check-mate 90 och pH med X-mate^{PRO} (Mettler-Toledo AG). Relativ biomassa bestämdes med flödescytometri (Becton Dickinson FACsort) Totala mängden mikroorganismer infärgades med propidiumjodid enligt en modifiering av (Mansour *et al.*, 1985). För att permeabilisera mikroorganismerna användes värmepuls (70°C , 5 minuter). Därefter kylde proverna på is i 15 minuter och propidiumjodid tillsattes (slutkoncentration $50\ \mu\text{g/ml}$) och därefter inkuberades proverna ytterligare 20 minuter i mörker i rumstemperatur innan analys. Radioaktivitet i vattenproverna och luftfällorna mättes med scintillationsräknare (Beckman LS 5000CE) enligt tidigare beskriven procedur (Sjöström *et al.*, 1999). CO_2 -halt i KOH-fällorna bestämdes med pH-mätning mot en CO_2 -mättad KOH-lösning med samma molaritet. Syrehalt i anaerobboxen mättes med direktvisande instrument (Dräger Pac 111).

2.5. Extraktion av sediment

Bindningen av de bildade TNT-metaboliterna till sedimentet i de olika kolvarna analyserades genom olika extraktionsförfaranden enligt Caton *et al.* (1995). Efter 85 dagar extraherades sedimenten först med vatten (3 timmar) till motsvarande ett L/S på ca 30, sedan med acetonitril (24 timmar) motsvarande ett L/S på ca 20, 0,2 M HCL (24 timmar) motsvarande ett L/S på ca 30 och slutligen med 10 % KOH löst i 99 % etanol motsvarande ett L/S på ca 20. KOH-lösningen tillsattes sedimenten och därefter inkuberades blandningen först vid 60°C i 3 timmar sedan i rumstemperatur 24 timmar. Vid samtliga extraktioner mättes mängden frisatt ^{14}C . Mängden ^{14}C normaliserades mot mängden torrsbstans av sedimenten

3 Resultat

3.1 Analys av vatten och sediment

Sediment och vatten från tre olika havsdumpningsmiljöer användes. Från Östersjön valdes en provplats med syrerik botten och en med syrefattig botten, Möja respektive Fårö. Västerhavet representerades av prov från en syrerik botten, Stora Pölsan.

Karakterisering av sedimentegenskaper finns redovisade i Tabell 3. Noterbart är att kol och kvävehalten hos de olika sedimenten är låg.

Tabell 3 Karaktärisering av sediment.

Parameter	Enhet	Möja	Fårö	Stora Pölsan
Kornstorleksfördelning	d, mm	<0,063 (74,7%)	<0,063 (75,5%)	<0,063 (58,8%)
TS-halt	g/kg	142	221	481
pH		7,8	6,9	8,4
C	% av TS	6,6	3,6	2,8
Totalkväve	% av TS	0,5	0,3	0,1
H		0,9	0,2	<0,1
Al ₂ O ₃	% TS	12,1±0,1	15,4 ±0,1	10,4±0,1
CaO	%TS	1,37±0,01	1,44±0,01	5,53±0,01
Fe ₂ O ₃	%TS	6,23±0,01	7,72±0,01	4,20±0,01
MnO ₂	%TS	0,345±0.001	0,138±0,001	0,0766±0,0001

Alla sedimenten analyserades med avseende på TNT och dess primära nedbrytningsprodukter 2-A-4,6-DNT och 4-A-2,6-DNT innan tillsats av TNT och efter avslutat experiment.

Ursprungsmaterial från provplatserna Möja, Fårö och Stora Pölsan visade sig inte innehålla några spår av analyserade komponenter.

Samtliga sedimentprov där TNT tillsatts i vattenfasen visade efter slutfört experiment låga mängder nedbrytningsprodukter av TNT. I sediment från Fårö som hållits under anaeroba förhållanden under försökstiden kunde dessutom oförändrat TNT verifieras genom extraktionen. Vattenfasen från Stora Pölsan kolvarna innehöll nedbrytningsprodukter av TNT. Från Stora Pölsan kolv C och D kunde dessutom oförändrat TNT spåras. Resterande vattenprover uppvisar inga mätbara halter av sökta komponenter. Analyserade mängder redovisas i tabell 4A-C.

Tabell 4A. Analyserade mängder av TNT och dess primära metaboliter i sediment och vatten kolvar Möja efter avslutat experiment

Provplats	Prov	TNT (µg/kg)	2-A-4,6- DNT (µg/kg)	4-A-2,6- DNT (µg/kg)
Möja	Kolv B Sediment	nd	3,5	3,0
Möja	Kolv C Sediment	nd	1,5	3,3
Möja	Kolv D Sediment	nd	2,8	1,8
Möja	Kolv B Vatten	nd	nd	nd
Möja	Kolv C Vatten	nd	nd	nd
Möja	Kolv D Vatten	nd	nd	nd
		nd= <0,1	nd= <0,02	nd= <0,02

Tabell 4B. Analyserade mängder av TNT och dess primära metaboliter i sediment och vatten kolvar Fårö efter avslutat experiment

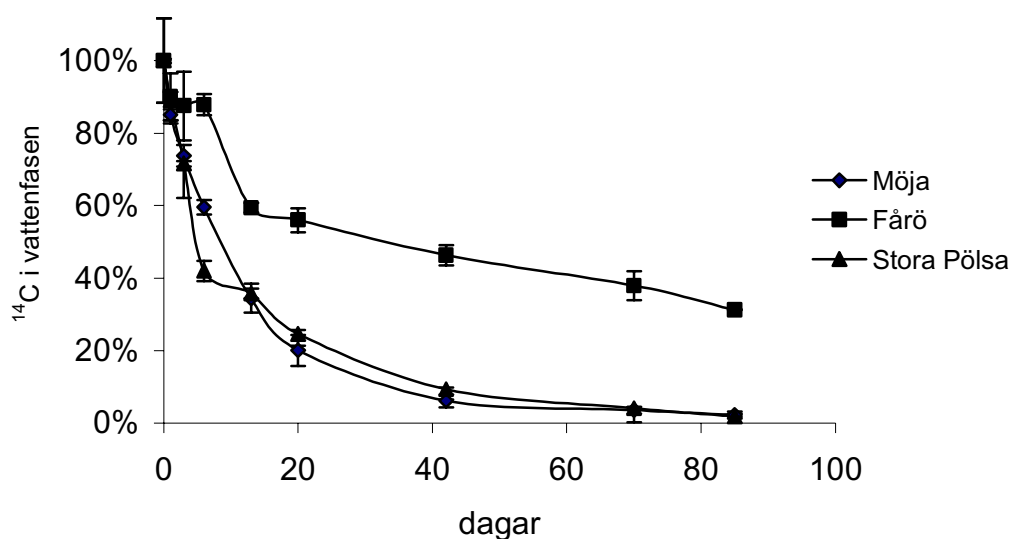
Provplats	Prov	TNT (µg/kg)	2-A-4,6- DNT (µg/kg)	4-A-2,6- DNT (µg/kg)
Fårö	Kolv B Sediment	nd	2,9	2,0
Fårö	Kolv C Sediment	8,8	nd	0,9
Fårö	Kolv D Sediment	10,7	3,6	0,8
Fårö	Kolv B Vatten	nd	nd	nd
Fårö	Kolv C Vatten	nd	nd	nd
Fårö	Kolv D Vatten	nd	nd	nd
		nd= <0,1	nd= <0,02	nd= <0,02

Tabell 4C. Analyserade mängde av TNT och dess primära metaboliter i sediment och vatten kolvar Stora Pölsan efter avslutat experiment

Provplats	Prov	TNT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2-A-4,6- DNT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	4-A-2,6- DNT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Stora Pölsan	Kolv B Sediment	nd	10,9	7,1
Stora Pölsan	Kolv C Sediment	nd	13,6	10,0
Stora Pölsan	Kolv D Sediment	nd	2,6	2,7
Stora Pölsan	Kolv B Vatten	0,1	0,9	0,7
Stora Pölsan	Kolv C Vatten	nd	1,2	1,0
Stora Pölsan	Kolv D Vatten	0,1	1,4	1,1
		nd= <0,1	nd= <0,02	nd= <0,02

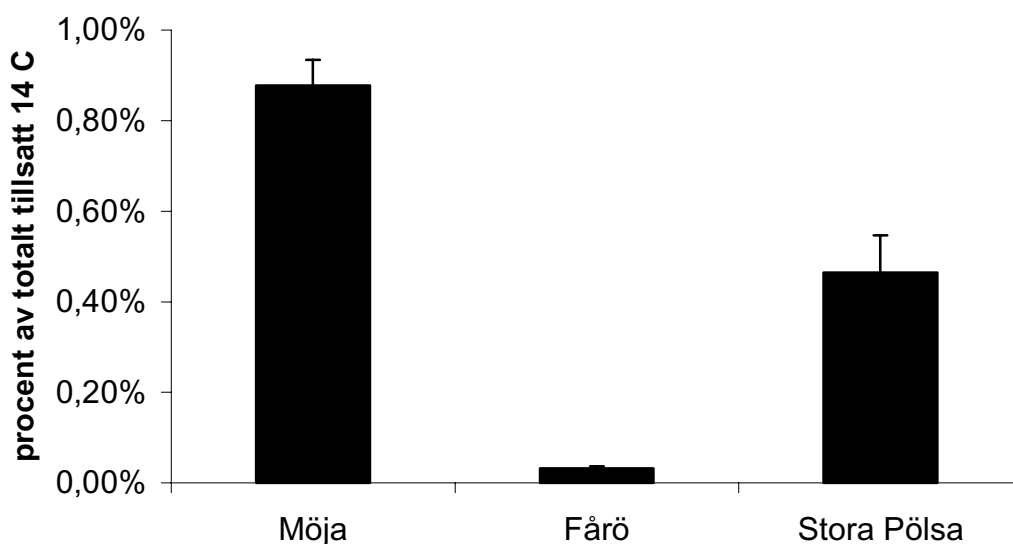
3.2 Simuleringsförsök

Mängden radioaktivitet mätt över tiden i de olika kolvarna visade att då gasflödet avbröts efter 70 dagar hade ca 60 % av tillsatt TNT försvunnit från vattenfasen i de kolvar som representerade Fårö. Ungefär 95 % av tillsatt TNT försvann från de kolvar som representerade Möja och Stora Pölsan. Radioaktiviteten i vattenfasen följdes under ytterligare 15 dagar. Tydligt från resultatet som visas i Figur 2 är att minskningen av TNT-koncentrationen fortsätter hela tiden.



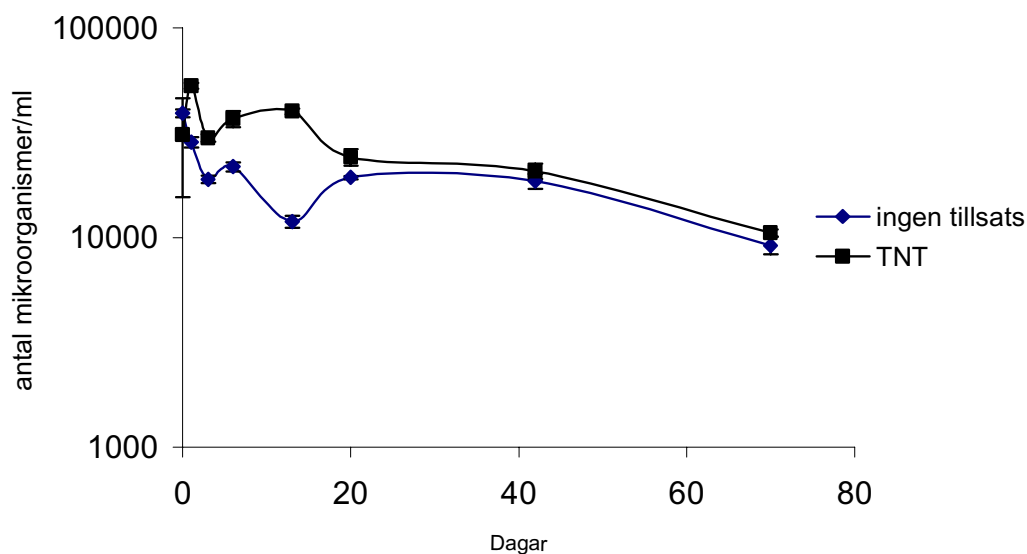
Figur 2 ^{14}C i vattenfasen i de olika kolvarna över tiden (medelvärde \pm SD, $n=3$ angivet.)

Mängden CO₂ som passerade KOH-fällan visade för samtliga kolvar värden mindre än bakgrunden från den tillförda luften. Mätningar av pH och konduktivitet i de olika lutfällorna visade efter 70 dagar högre pH (> 13) och konduktivitet än en CO₂ mättad KOH-lösning (pH 9,1) av samma molaritet. Detta tyder på att lutfällorna inte var mättade. Någon mineralisering av TNT kunde inte detekteras. Mindre än 1 % av tillsatt ¹⁴C avgick från kolvarna i form av ¹⁴CO₂ (Figur 3).

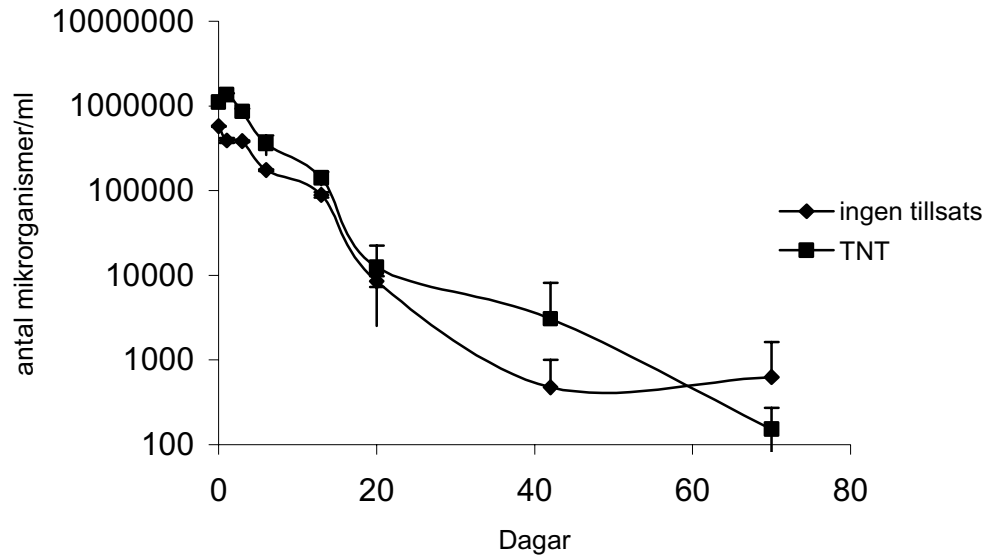


Figur 3. Ackumulerad mängd ¹⁴C i KOH-fälla efter 70 dagar angivet som procent av den totalt tillsatta mängden ¹⁴C i de olika kolvarna (medelvärde ±SD, n=3 angivet).

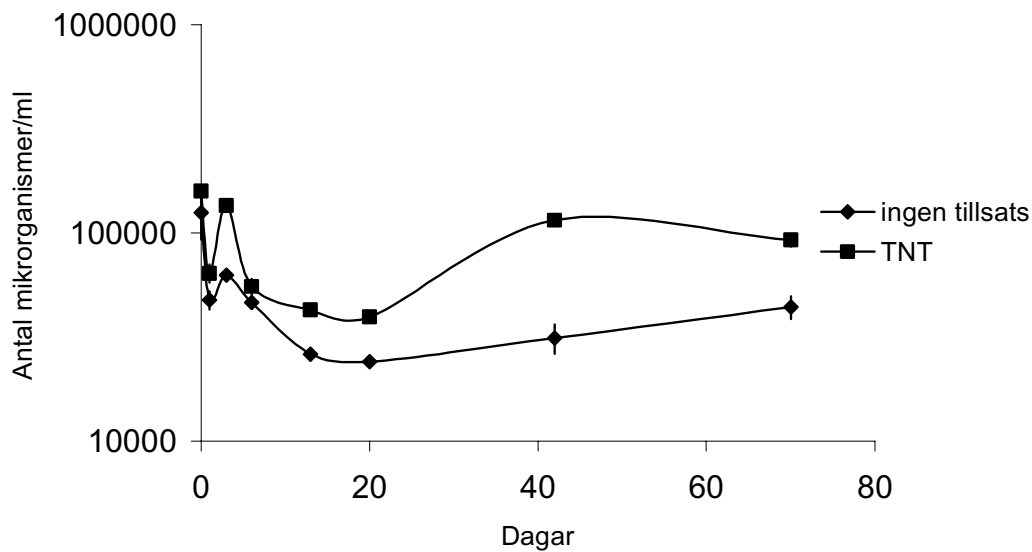
Den totala mängden avgiven CO₂ mättes också över tiden. Resultatet visade inte på någon tydlig ökning av den mikrobiella aktiviteten i någon av kolvarna. De olika kolvarna visade genomgående inte heller på någon tydlig ökning av biomassan över tiden (Figur 4-6) för såväl kolvar tillsatta med TNT som kolvar utan tillsats av TNT.



Figur 4 Biomassan i vattenfasen över tiden i kolvar representerande Möja (medelvärde \pm SD, $n=3$ angivet)



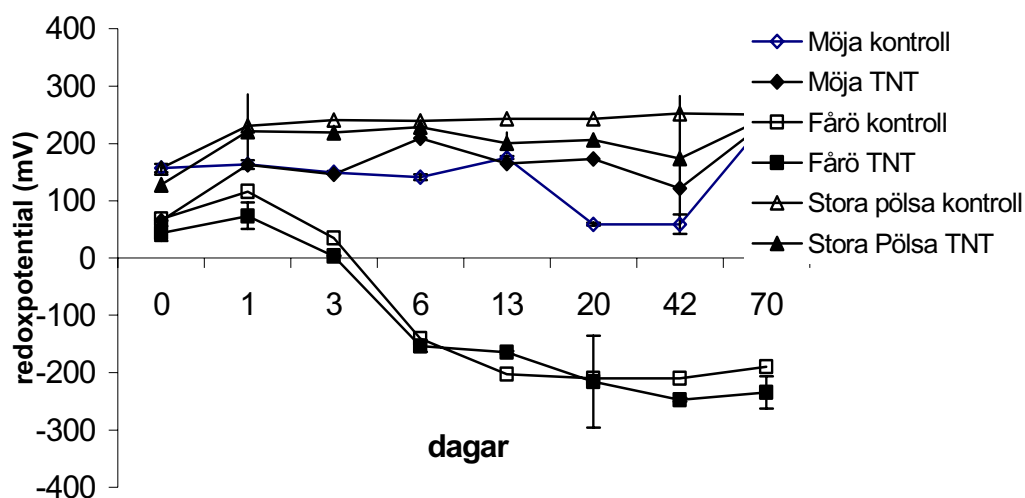
Figur 5. Biomassan i vattenfasen över tiden i kolvar representerande Fårö (medelvärde \pm SD, $n=3$ angivet)



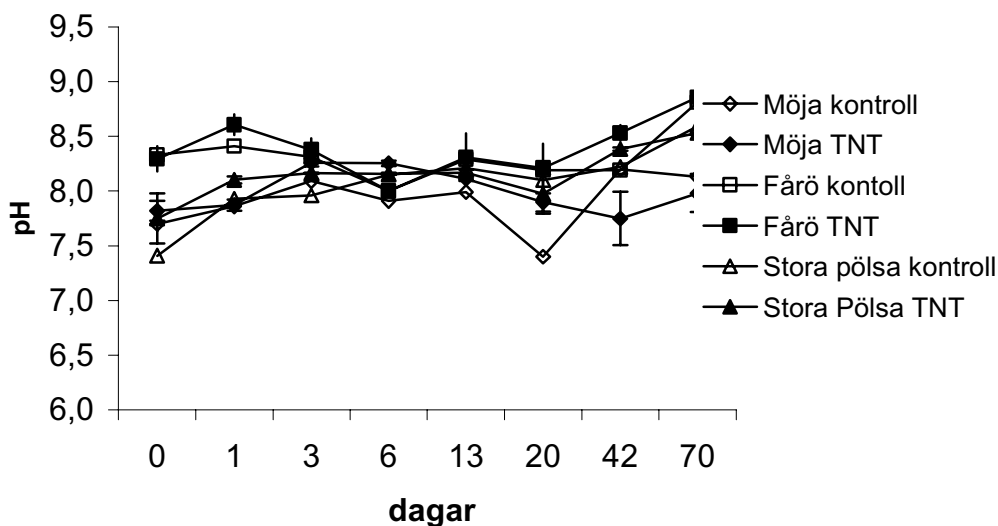
Figur 6. Biomassan i vattenfasen över tiden i kolvar representerande Stora Pölsan (medelvärde \pm SD, $n=3$ angivet).

Redoxpotentialen korrelerade väl mot passagen av kväve respektive luft, ingen skillnad kunde dock märkas mellan kolvar tillsatta med TNT och kolvar utan tillsats (Figur 7). Kolvar med sediment och vatten från Fårö, vilka hade en negativ redoxpotential uppvisade mindre inbindning av TNT än de båda andra simulerade havsmiljöerna under de dagar försöket

pågick (Figur 2). Tillsats av TNT påverkade inte heller pH (Figur 8). Den högre konduktiviteten i vatten från Stora Pölsan (60 mS) än i vatten från Möja (10,8 mS) och Fårö (11,0 mS) hade ingen mätbar betydelse för inbindningen till sedimentet. Ingen skillnad i konduktivitet fanns mellan kolvar tillsatta med TNT och kolvar utan TNT.



Figur 7. Redoxpotentialen för de olika kolvarna över tiden (se Tabell 1). För kolvar med TNT-tillsats visas medelvärde och SD ($n=3$).

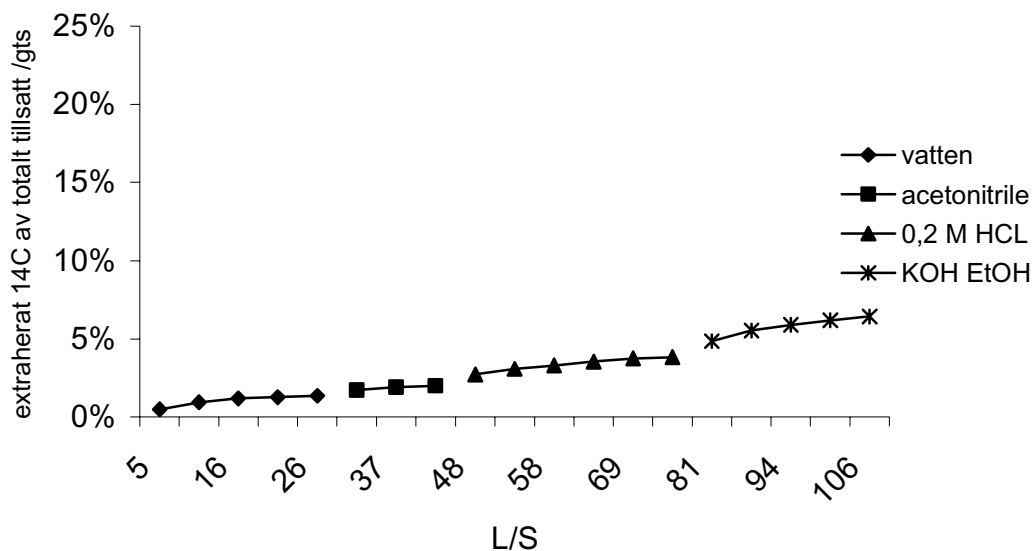


Figur 8 pH i vattenfasen i de olika kolvarna över tiden. För kolvar med TNT-tillsats visas medelvärde och SD ($n=3$)

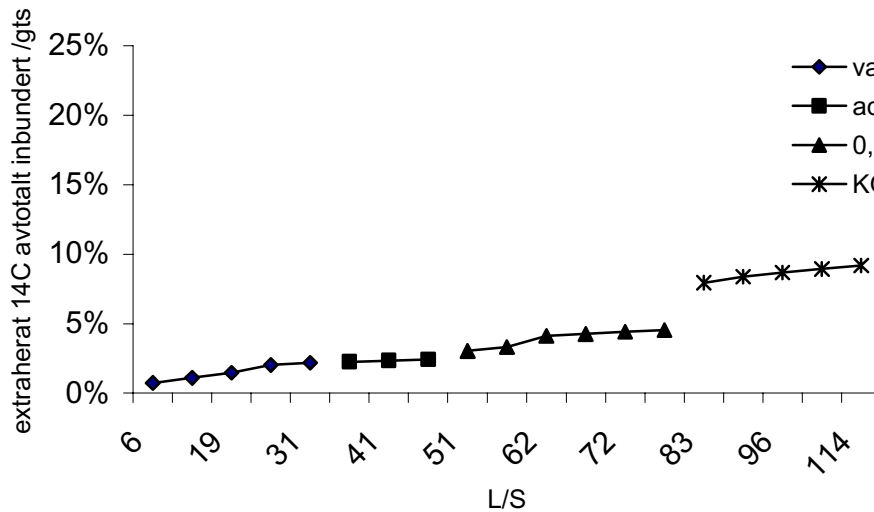
3.3 Extraktion av sediment

I nästa steg undersöktes hur hårt TNT och dess metaboliter bundit till sedimenten i de olika kolvarna. Extraktionen utfördes i fyra steg: sedimenten extraherades först med vatten sedan med acetonitril, saltsyra och slutligen Kaliumhydroxid (Figur 9 A-C). Varje steg upprepades

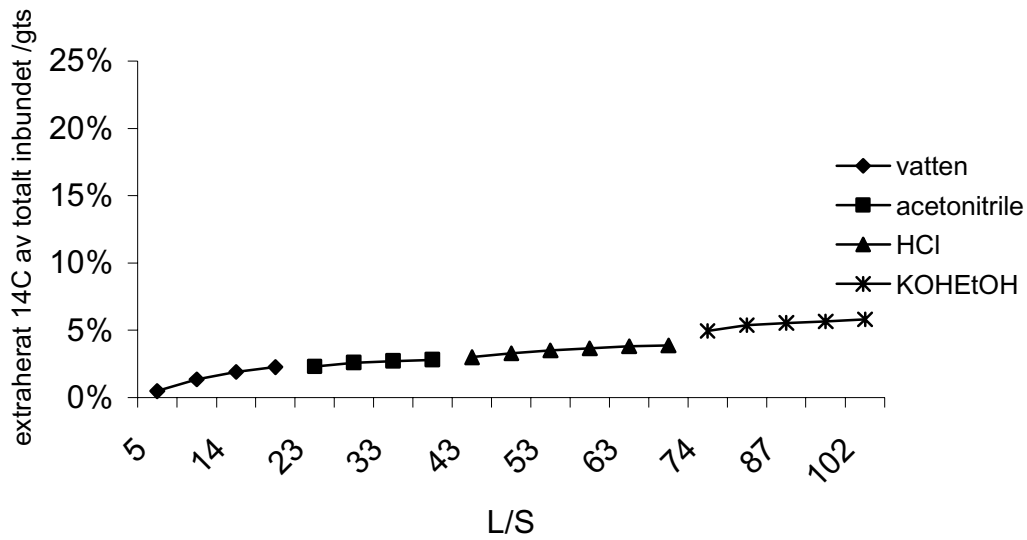
till ingen radioaktivitet längre kunde mätas. De olika extraktionsstegen gav en sammanlagd långtidsläkning på ungefär en månad. Resultaten visar att TNT bundit mycket hårt mot sedimenten. Den största mängden ca 5 % extraherades med KOH från Färö-sedimentet.



Figur 9A. Frisättning av ^{14}C vid fyra olika konsekutiva extraktionsförfaranden av sediment från Möja. I sedimentet fanns före extraktion 98 % av den totalt tillsatta mängden ^{14}C TNT.



Figur 9B Frisättning av ^{14}C vid fyra olika konsekutiva extraktionsförfaranden av sediment från Färö. I sedimentet fanns före extraktion 64 % av den totalt tillsatta mängden ^{14}C TNT.



Figur 9C. Frisättning av ^{14}C vid fyra olika konsekutiva extraktionsförfaranden av sediment från Stora Pölsan. I sedimentet fanns före extraktion 98 % av den totalt tillsatta mängden ^{14}C TNT.

Diskussion

Simulering av TNT-läckage i olika havsmiljöer har genomförts i syfte att beskriva hur TNT uppträder i direkt kontakt med bottenvatten och sediment. Försöket ger en forcerad bild av verkligheten, skälen till detta är flera. En utlakning av TNT i miljön från dumpad ammunition förutsätter dels att det omslutande materialet korroderas eller på annat sätt blir genomsläppligt för TNT, dels att TNT löser sig i vattnet. Båda dessa processer tar mycket lång tid (Carlsson *et al.* 1996). Hela experimentserien utfördes dessutom vid 12° C, vilket är en i sammanhanget relativt hög temperatur. I det modellsystem som användes tillsattes ¹⁴C –TNT en gång vid försökets början. Detta innebär att experimenten bara visar hur just den tillsatta mängden ¹⁴C –TNT omvandlas och binder till sedimenten. I verkligheten kommer det att ske en kontinuerlig ”påfyllning” av TNT, t ex genom att metallhöljet på en granat rostat sönder.

Eftersom ingen mineralisering av TNT kunde detekteras, måste över 95 % av tillgängligt TNT eller dess omvandlingsprodukter ha bundit till sedimenten i de kolvar som passerats med luft d.v.s. Möja Söderfjärd och Stora Pölsan. Den högre saliniteten i vatten från Västerhavet (Stora Pölsan) visade sig inte ha någon betydelse för inbindningen av TNT till sedimenten. Däremot visade sig anaeroba förhållanden (sedimentet från Fårösund) påverka inbindningen negativt. Endast ca 60 % av tillsatt mängd TNT kunde hänföras till sedimentfasen under anaeroba förhållanden.

Det har tidigare visats att de mer reducerade aminoderivatet härrörande från mikrobiell omvandling av TNT i miljön binds kovalent och irreversibelt till den organiska fasen i jorden (Rieger & Knackmuss 1995), medan TNT och de lägre reducerade aminoderivatet 2-ADNT och 4-ADNT adsorberas hydrofobt, men fullt reversibelt (Daun *et al.* 1998).

Omvandling av TNT i naturen sker både vid aeroba och anaeroba förhållanden. Aeroba bakterier i kultur transformerar TNT genom att en eller två nitro-grupper reduceras till hydroxyamino- eller aminogrunder. Dessa partiellt reducerade former av TNT kan också under närvaro av syre reagera med sig själva och bildar då olika tetranitroazoxytoluener. Dessa föreningar är mera persistenta (stabila) och kan i några fall vara mer toxiska än utgångsubstanten TNT. Anaerob nedbrytning av TNT sker också genom en reduktiv mekanism, vilken resulterar i bildandet av DANT eller TAT och låga mängder av hydroxylintermediärer och tetranitroazoxytoluener. Anaerob nedbrytning av TNT resulterar således i mindre toxiska och persistenta metaboliter (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Det är t.ex. väl känt att den slutliga anaeroba reduktionsprodukten av TNT, TAT polymeriseras till svartfärgade makromolekyler som troligen inkorporeras till humus (Rieger & Knackmuss 1995). För att TAT skall bildas krävs dock en redoxpotential som är lägre än -250 mV (Lenke *et al.* 1994), vilket sällan är fallet under naturliga förhållanden. Dessutom är TAT och andra reduktionsprodukter som kan bildas från TNT och 2,4-DANT väldigt reaktiva och det har visats att dessa reagerar med lipider, proteiner och kolhydrater (Carpenter *et al.* 1978, Channon *et al.* 1944, McCormick *et al.* 1978, Vorbeck *et al.* 1998). Detta innebär troligen att den toxiska effekten av TNT huvudsakligen beror på bildandet av dessa reaktiva metaboliter. I så fall skulle det också förklara varför TAT och andra reduktionsprodukter från TNT och 2,4-DANT inte har detekteras under naturliga förhållanden, d.v.s. eftersom dessa reagerar direkt med biota eller den organiska fraktionen i jorden.

Under naturliga förhållanden ackumuleras istället TNT troligen som 2,4-DANT. Irreversibel bindning av TNT, 4-ADNT och 2,4-DANT sker genom mikrobiell inverkan. En hypotes som

experimentellt verifieras av Held *et al.* 1997 är att TNT inkorporeras i form av 2,4-DANT. Mikroorganismer som växer i jord försöker under kvävebegränsande förhållanden komma åt kväveinnehållet i humus. Humus är en komplex strukturellt varierande molekyl. För att bryta ned denna molekyl använder vissa mikroorganismer peroxidaser, som är en klass av enzymer som genererar hydroxylradikaler som till sin natur är väldigt reaktiva och ospecifika. Hypotesen är att dessa peroxidaser reagerar med 2,4-DANT och kovalent kopplar dessa molekyler till humus i jorden. Stöd för denna hypotes är bl. a. att peroxidaser reagerar med 2,4-DANT, men inte med 4-ADNT eller TNT (Held *et al.* 1997). Elovitz och Weber (2001) har också visat en korrelation mellan irreversibel sorption till sediment och mikrobiell produktion av 2,4-DANT under aeroba förhållanden. Under anaeroba förhållanden däremot korrelerade inte 2,4-DANT produktionen tydligt med irreversibel sorption till sedimenten. Istället omvandlades 2,4-DANT till två okända substanser som kvarstannade i vattenfasen, vilket innebar en partiell inhibering av kovalent inbindning av TNT-metaboliter till sedimentfasen. Troligtvis, kan denna observation också förklara varför ca 40% av tillsatt mängd ¹⁴C fortfarande, efter avslutat försök, fanns kvar i vattenfasen i de kolvar där en anaerob miljö vidmakthölls. Den kemiska analysen av vattenfasen från dessa kolvar visade också att varken TNT eller någon av de analyserade metaboliterna av TNT fanns i vattenfasen.

De genomförda försöken visade att reduktionsprodukter från TNT binder hårt till sedimentet. Detta trots den låga mikrobiella aktivitet som råder i det relativt näringsfattiga sedimentet. I de extraktionsförsök som genomfördes kunde endast en mindre del avlägsnas från sedimentet oberoende om sedimentet inkuberats under aeroba eller anaeroba förhållanden. Likaså visade den kemiska analysen av sedimenten låga värden. Även om mindre inbindning till sediment sker under anaeroba förhållanden förefaller den del som bundit motstå hydrolytisk behandling. Den kemiska analysen av vattenfasen i kolvarna visade endast spårmängder av TNT i två aeroba replikatkolvar med material från Stora Pölsan (Tabell 4C). Achtnich *et al.*, 1999a har visat att anaerob/aerob behandling av TNT-kontaminerad jord verkligen resulterar i kovalent bindning till jordmaterialet. Detta visades genom NMR-studier av ¹⁵N-märkt TNT. Även långtidslakning med vatten under 21 månader utfördes (Achtnich *et al.*, 1999b). Endast några procent av den bundna mängden ¹⁴C-TNT lösgjordes och då under de första veckorna. I en senare studie (Achtnich & Lenke, 2001), undersöktes hur påväxt av peroxidasproducerande svamp, stora temperaturvariationer och påväxt av gröna växter påverkar desorptionen av mikrobiellt inbundna TNT-metaboliter i jord. Insignifikanta mängder av TNT metaboliter frisläpptes i de två förstnämnda fallen. Vid påväxt av gröna växter frisläpptes upp till 8 % av den inbundna mängden TNT-metaboliter. Denna mängd var dock associerad med löst organiskt material i vattenfasen som frisläpptes på grund av den pH sänkning som skedde när växterna kataboliserade övrigt organiskt material i jorden.

De lakningsförsök som har utförts här styrker att långtidsutlakningen av mikrobiellt inbundna TNT-metaboliter till sediment är försumbar. Lakningen genomfördes i flera steg under totalt en månads tid; först extraherades sedimenten med vatten motsvarande ett L/S på ca 30, därefter extraherades sedimenten med acetonitril motsvarande ett L/S på 20. Därefter genomfördes extraktion med 0,2 M HCL motsvarande ett L/S på ca 30 och slutligen vidtogs extraktion med 10 % KOH löst i 99 % etanol vid 60°C motsvarande ett L/S på ca 20. Detta extraktionsförfarande motsvarade ett totalt L/S på mer än 100 och innefattade både organisk, sur och hydrolytisk extraktion och torde motsvara en extrem långtidsutlakning under naturliga förhållanden. Sammanfattningsvis, tyder resultat rapporterade här och i litteraturen (Drzyzga *et al.*, 1998, Drzyzga *et al.*, 1999) på att mikrobiellt immobiliserade TNT-metaboliter byggs in i strukturen i ett naturligt sediment eller jord

Trots att en stark inbindning till sedimentet av reducerade TNT-metaboliter kan förväntas också under naturliga förhållanden på havsbotten, kommer det alltid att finnas en jämviktkoncentration i porvattnet i omedelbar närhet till en vattenexponerad, sedimenttäckt TNT-yta. Denna jämviktkoncentration kommer att bestämmas av temperatur, utlakningshastighet, utspädningshastighet mm. Eftersom en lägre inbindning sker under anaeroba förhållanden kommer jämviktkoncentrationen att vara högre i syrefria sedimentbottnar. Detta betyder, att sedimentets porvatten som befinner sig i absolut närhet av en exponerad TNT-yta också kan vara toxiskt ($LC_{50} > 8 \text{ mg/l}$) (Sjöström et al., 1999). Frågan om sediment i sig med irreversibel bundna TNT-metaboliter också kan vara toxiskt kommer att undersökas i nästa fas av detta uppdrag.

Referenser

1. **Achnich C., Sieglen U., Knackmuss H. J., & Lenke, H.** 1999a. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol.* 18:2416-2423.
2. **Achnich C. Fernades, E., Bollag J. M., Knackmuss H. J., & Lenke, H.** 1999b. Covalent binding of reduced metabolites of [¹⁵N₃]TNT to soil organic matter during bioremediation process analyzed by ¹⁵N NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33:4448-4456.
3. **Actnich C. & Lenke, H.** 2001. Stability of immobilized 2,4,6-trinitrotoluene metabolites in soil under long-term leaching conditions. *Environ. Tox. Chem.* 20:280-283.
4. **m** Miljöriskbedömning av oexploderad ammunition i akvatisk miljö : förstudie. FOA-R--98-00814-222—SE.
5. **Berglind R. & Liljedahl B., 1998.** Miljöfarliga ämnen i dumpad ammunition. FOA-R--96-00299-864—SE.
6. **Carlsson T., Gjöthlén A., & Lamnevik S., 1996.** Explosiva varor i Väneren.FOA dnr 96-1676/S
7. **Carpenter D. F., McCormick, N. G., Cornell J. H., & Kaplan, A. H. 1978.** Microbial transformation of ¹⁴C labeled 2,4,6-trinitrotoluene in an activated sludge system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:949-954.
8. **Caton J.E., Ho H. C., Williams R. T., Griest, W. H. 1994.** Characterization of insoluble fractions of TNT transformed by composting. *J. Environ. Sci. Health.* 29:659-670.
9. **Channon H. J., Mills G. T., & Williams, R. T. 1944.** The metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Biochem J.* 38:70-85.
10. **Daun. G., Lenke H., Reuss M., & Knackmuss H- J- 1998.** Biological treatment of TNT-contaminated soil. 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ. Sci. Technol.* 32:1956-1963.
11. **Dryzga O., Bruns-Nagel D., Gorontzy T., Blotvogel K-H., Gemsa D., & von Eberhard L.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 32:3529-3535.
12. **Dryzga, O., Bruns-Nagel D., Gorontzy T., Blotvogel K-H., & von Eberhard, L.** 1999. Anaerobic incorporation of the radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic matrix of contaminated soil after different treatment procedures. *Chemosphere* 38:2081-2095.
13. **Elovitz M. S., & Weber E. J., 1999.** Sediment-mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and fate of the resulting aromatic (poly)amines. *Environ. Sci. Technol.* 33:2617-2625.

14. **Esteve-Núñez A., Caballero A., Ramos J. L., 2001.** Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:335-352.
15. **Forsman M., Larsson B. L., Lindmark P., 1995.** Biologiska metoder för sanering av förorenade markområden. FOA-B--95-00052-4.4—SE.
16. **Held, T. Draude, G. Schmidt, F R J. Brokamp, A. Reis, K H. 1997.** Enhanced humification as an in-situ bioremediation technique for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soils.. *Environmental Technology* 18:479-487
17. **Larsson, M., 1999.** Dumpad ammunition i svenska insjöar. Klassindelning med avseende på vattenkemiska data, sjöars fysikaliska egenskaper samt tillgänglighet. Examensarbete i kvartärgeologi, 20 poäng. Institutionen för geovetenskaper, Uppsala universitet.
18. **Lenke H., Wagener B., Daun G., and Knackmuss H- J. 1994.** TNT-contaminated soil: a sequential anaerobic/aerobic process for bioremediation., 94th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Abst. Q-383:454.
19. **Liljedahl B. Och Qvarfort U. 1997.** Dumpad ammunition i gruvschakt, Dalkarlsberg: en miljöriskbedömning. FOA-R--97-00651-222—SE.
20. **McCormick N. G., Cornell J. H., Kaplan A. M., 1978.** Identification of biotransformation products from 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:945-948.
21. **Mansour J.D., Robson J.A., Arndt C.W., Schulte T.H., 1985.** Detection of *Escherichia coli* in blood using flow cytometry. *Cytometry.* 6:186-90
22. **Rieger P-G., Knackmuss H-J. 1995.** Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds* Edited by SPAIN JC. 49, pp 1-18. Plenum press, New York.
23. **Sjöström J., Liljedahl B. Forsman M., 1999.** Miljöriskbedömning av dumpad ammunition i svenska insjöar : explosivämnen och metallers uppträdande i vatten- och sedimentfas. FOA-R--99-01070-222—SE.
24. **Vorbeck C., Lenke H., Fisher P., Spain J., and Knackmuss H- J. 1998.** Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:246-252.
25. **Wikström P., Andersson A-C., Nygren Y., Sjöström J., & Forsman M. 2000.** Influence of TNT transformation on microbial community structure in four different lake microcosms. *J. Applied Microbiol.* 89:302-308.