

Opptak og utskillelse av 2, 4, 6 Trinitrotoluene i
Atlantisk laks (*Salmo salar*).

Uptake and excretion of 2, 4, 6 Trinitrotoluene
in Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Siv Marie Stornes

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITTENSKAP
INSTITUTT FOR PLANTE OG MILJØVITTENSKAP
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2012



Forord

Denne mastergradsoppgaven ble utført ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB), institutt for plante- og miljøvitenskap (IPM). Oppgaven er en avsluttende del av mastergradsprogrammet i teknologi - studieretning uorganisk miljøkjemi på 300 studiepoeng ved instituttet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM). Forsøket er finansiert av Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) gjennom et samarbeidsprosjekt sammen med UMB som heter ammunisjonsrelatert forurensing på akvatiske organismer (2010 – 2013). Denne oppgaven har vært meget interessant og jeg har lært utrolig mye gjennom denne prosessen.

En stor takk til min hovedveileder, post doc Lene Sørlie Heier, for all hjelp med utforming av oppgaven og for veldig god veiledning underveis. Takk til medveiledere Espen Mariussen ved Forsvarets Forskningsinstitutt (FFI) og professor Brit Salbu ved isotoplaboratoriet (UMB).

Jeg vil også takke Tove, Marit, Anicke og Merete for all hjelp underveis på isotoplaboratoriet samt takk til gutta på fiskefjøset som hjalp til under forsøket.

Sammendrag

Forsvaret bruker i dag et bredt spekter av ammunisjon som kan inneholde miljøfarlige stoffer. Større våpen er gjerne sammensatt av flere komponenter og inneholder eksplosiver. Den mest giftige organiske forbindelsen som man finner i eksplosiv ammunisjon er 2, 4, 6 - trinitrotoluen (TNT). Rapporteringsgraden på mengde eksplosivholdig ammunisjon som blir avsatt ute i miljøet er lav og toksikologiske studier har påvist rester av slik ammunisjon i terrestriske og akvatiske miljø.

Det er per i dag lite forskning på hvordan eksplosivet TNT vil påvirke fisk. I denne tracer studien ble opptak og utskillelse av ^{14}C - TNT undersøkt i Atlantisk laks (*Salmo salar*). Opptak og utskillelse av TNT ble målt som total ^{14}C - aktivitet i organer over en tidsperiode på 96 timer. Det ble gjort 6 prøveuttak for opptaksperioden og 6 prøveuttak for utskillellesperioden. For hvert prøveopptak ble det tatt ut 6 fisker og 10 organer ble dissekert ut fra hver fisk. Det ble ikke skilt på hovedstruktur TNT og dens metabolitter. Eksponeringen ble utført i et ionefattig råvann som er en typisk ferskvannstype i Norge.

Det ble målt et signifikant opptak av ^{14}C - TNT i 8 av 10 organer etter 6 timer og etter 48 timers eksponering var det et signifikant opptak i alle organer, noe som viser at ^{14}C - TNT tas raskt tatt opp i laks. Ved utskillelse var det ingen signifikante forskjeller mellom 48 timers opptak og 48 timers utskillelse bortsett fra i hjerne og tarm. Det kan tyde på at utskillelse er en mer langsom prosess som tar lengre tid enn 48 timer, og at biologisk halveringstid er lengre enn 48 timer for laks i et ione fattig vann. Aktiviteten av ^{14}C - TNT var høyest i organer som galle og tarm, og lavest i blod og muskel under forsøket. Dette tyder på at ^{14}C - TNT ikke opphopes i muskelvev og at blod distribuerer ^{14}C - TNT ut til organene. ^{14}C - TNT blir tatt opp gjennom gjellene og videre transportert til indre organer via blodet. Det at det var målt aktivitet i hjernen tyder også på at ^{14}C - TNT muligens har trengt gjennom blod - hjerne barrieren via blodbanen. Det at det ble påvist et signifikant opptak i samtlige organer, gjør at TNT holdige eksplosiver kan være svært farlig for fisken siden det involverer samtlige organer som er blitt prøvetatt i dette forsøket. Hvordan TNT vil påvirke fisken vet man ikke og må utredes ved videre forskning.

Abstract

Force currently uses a broad range of munitions that contain hazardous substances. Larger weapons are often composed of several components and include explosives. The most toxic compound found in explosive ammunition is 2, 4, 6 - Trinitrotoluene (TNT). Reporting degree of quantity explosive-containing munitions that are allocated out of the environment is low and toxicological studies have identified the remains of such ammunition in terrestrial and aquatic environment.

Little is currently known how explosive TNT will affect fish. In this study, tracer uptake and excretion of ^{14}C - TNT was examined in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Uptake and elimination of TNT was measured as total ^{14}C - activity in different organs over a period of 96 hours. There were six sampling during the 48 hours uptake period as well as 6 samplings during the elimination period. The exposure was performed in a low conductivity water quality for Norway.

A significant activity of ^{14}C - TNT was measured in 8 of 10 organs after 6 hours and after 48 hour exposure, there was a significant uptake in all organs, indicating that ^{14}C - TNT is rapidly taken up by fish. During the elimination, there were no significant differences between 48-hour uptake and 48-hour elimination except in the brain and intestinal. This may suggests that the separation takes longer than 48 hours and that the biological half-life is longer than 48 hours for salmon in a ion poor water than for other fish species that has been previously researched. The activity of ^{14}C - TNT was highest in organs such as bile, intestine and lowest in blood and muscle during the experiment. This suggests that the ^{14}C - TNT does not accumulate in muscle tissue and blood that distributes ^{14}C - TNT to the organs. ^{14}C - TNT was taken up through the gills and transported to internal organs via the blood. The fact that it was measured in brain activity suggests that ^{14}C - TNT has penetrated through the blood brain barrier via the bloodstream. The evidence of a significant uptake in all organs makes the TNT-containing explosives can be very dangerous for the fish since it involves all the agencies that have been sampled in this study.

Innhold

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
1 Innledning.....	1
2 Teori.....	3
2.1 Kilder.....	3
2.2 2, 4, 6 Trinitrotoluen (TNT, C ₆ H ₂ (NO ₂) ₃ CH ₃).....	4
2.3 Nedbrytningsprodukter av TNT.....	6
2.4 TNT og opptak i biota.....	7
2.5 Tracerteknikk.....	8
3 Materialer og metode.....	9
3.1 Eksponeringsoppsett og forsøksorganismer.....	9
3.2 Prosedyrer ved prøvetaking og registreringer.....	10
3.2.1 Prøvetaking av fisk.....	10
3.2.2 Kondisjonsfaktor.....	11
3.2.2 Prøvetaking av vann.....	11
3.2.3 Oppslutning av organer til analyse.....	11
3.2.4 Måling av radioaktivitet.....	12
3.3 Beregning av biokonsentrasjonsfaktoren (BCF).....	13
3.4 Statistikk.....	13
4 Resultat og diskusjon.....	14
4.1 Karakterisering av eksponeringsvann.....	14
4.1.1 Generell vannkjemi.....	14
4.1.2 Gasser.....	14
4.1.3 TNT (total og ultrafiltrert).....	15
4.2 Fysiologisk status hos forsøksfisken.....	16

4.3 Akkumulering av ^{14}C - TNT i organene	17
4.3.1 Opptak av ^{14}C - TNT.....	17
4.3.2 Utskillelse av ^{14}C - merket TNT	22
4.4 Biokonsentrasjon TNT.....	24
4.5 Multivariat analyse.....	26
4.5.1 Opptaks periode	26
4.5.2 Utskillelse periode	29
5 Konklusjon	32
7 Litteraturliste	34
Vedlegg 1	i
Vedlegg 2	ii
Vedlegg 3	v
Vedlegg 4	vi
Vedlegg 5	vii

1 Innledning

I Norge finnes det et sted mellom 500 og 800 skytebaner, som er spredt rundt i ulike militære øving og skytefelt (Voie *et al.* 2010). Skyte- og øvingsfeltene vil oftest inneholde forskjellige baner der ulike våpen blir benyttet. Det vil være baner for håndvåpen, artilleri og bombekastere, stridsvogn, panservern, håndgranater og bomber. Til disse våpensystemene blir det benyttet en mengde ulike ammunisjonstyper. Hvor mye som blir forbrukt av det som blir utlevert er usikkert da rapporteringsgraden for alle typer ammunisjon er relativt lav. I 2010 var rapporteringsgraden på 44 % og i følge forsvarssektorens miljøregnskap for 2010 var forbrukt mengde eksplosiver i norske skyte- og øvingsfelt estimert til 58 231 kg (Ringnes *et al.* 2011).

Ammunisjonstypene som blir benyttet i militære sammenhenger kan inneholde eksplosiver, enten i form av sprengladninger, drivladninger eller pyrotekniske virkemidler samt en rekke metaller (Department of the US Army 1984). Ammunisjonsrester i form av eksplosiver som blir liggende igjen kan utgjøre en risiko for både terrestriske og akvatiske organismer (Hovatter *et al.* 1997; Lotufo 2011; Zitting *et al.* 1982). Det har vært mye fokus på forurensinger av tungmetaller (Rognerud & Qvenild 2002) fra håndvåpen ammunisjon i militære skyte- og øvingsfelt i Norge (Heier *et al.* 2009; Heier *et al.* 2010; Rognerud 2011; Strømseng & Ljønes 2002) mens forurensing fra ammunisjon med større kaliber som inneholder eksplosiver har i mindre grad blitt undersøkt (Johnsen *et al.* 2008).

Eksplosiver som blir benyttet av forsvaret består av energetiske forbindelser som er organiske og uorganiske (Department of the US Army 1984). Man definerer et eksplosiv som et kjemisk materiale som under påvirkning av termisk eller mekanisk sjokk vil dekomponere raskt med utvikling av et stort volum av varme og gass (Shreve 1984). Man utnytter de unike egenskapene ved hvert enkelt sprengstoff til å lage kjedereaksjoner der hovedladningen ofte består av 2, 4, 6 trinitrotoluen (TNT) (Department of the US Army 1984) som er det mest kjente og brukte høyeksplosivet i ammunisjon (Macek 1961) sammen med nitraminene 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazin (RDX) og 1,3,5,7-tetranitroperhydro-1,3,5,7-tetrazosin (HMX) (Department of the US Army 1984). Restene av disse organiske eksplosivene kan omdannes i naturen til en serie nedbrytningsprodukter med andre fysiske, kjemiske og toksikologiske egenskaper og kan utgjøre en fare for omverdenen (Conder *et al.* 2004; Ownby, D. R. *et al.* 2005; Rylott *et al.* 2011).

I USA og Canada er det blitt gjort undersøkelser i de fleste skytebaner for større våpen og det er blitt gjort funn av eksplosiver som hovedsakelig er lokalisert til målområdet, men det er også funnet rester ved standplass (Ampleman, G *et al.* 1998; Martel *et al.* 2006). Det er også rapportert at eksplosivpartikler kan migrere fra skyte- og øvingsfelt via vann (Taylor *et al.* 2009b). Det er derfor grunn til å tro at det kan være områder som er forurenset av eksplosiver fra ammunisjon i Norge også, noe som bekreftes da målinger utført av Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) har målt forhøyede nivåer av eksplosiver i skyte- og øvingsfelt samt i demoleringsområder (Voie 2008).

Det er få studier som viser opptak og utskillelse av TNT i fisk og annen akvatisk biota. Studiene viser at det forekommer opptak av TNT og dens metabolitter i fisk ved eksponering av ^{14}C - TNT (Ownby, D. R *et al.* 2005; Talmage S. S *et al.* 1999; Yoo *et al.* 2006). Opptaket av TNT stabiliseres etter 4 timer og at TNT hovedsakelig akkumuleres i deler som hodet, milt og innvoller (Lotufo 2011; Ownby, D. R *et al.* 2005), og skilles raskt ut igjen (Yoo *et al.* 2006). Bunnlevende organismer som (*Chironomus tentans* og *Lumbriculus variegatus*) viser også opptak (Belden *et al.* 2005). Man har ikke tilstrekkelig kunnskap om hvordan opptak og utskillelses kinetikk skjer når det gjelder TNT eksponering av akvatiske organismer. Opptak av kjemikalier i akvatiske organismer er blant annet avhengig av konsentrasjoner, kjemikalies biotilgjengelighet samt biotransformasjonene til kjemikaliet. I vann vil fisk hovedsakelig ta opp kjemikalier via gjeller og over skinn eller via føde (Ostrander 2000).

Siden man ikke vet hvordan opptak av TNT fordelerer seg og hvor lang oppholdstid TNT og dens metabolitter har før TNT eventuelt skilles ut fra akvatiske organismer som fisk, er det grunn til å undersøke opptak og utskillelse i flere organer samtidig for å se på biotilgjengelighet og akkumulering over tid samt konsentrasjonsvariasjoner i de ulike organene ved opptak og utskillelse.

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke opptak og utskillelse av TNT i fisk som funksjon av tid. Forsøket ble gjennomført ved bruk av radioaktiv tracer teknikk der laks ble eksponert for ^{14}C merket TNT via vann. Fisk ble eksponert i 48 timer før den ble flyttet over på rent vann for å følge utskillelsen i 48 timer. Opptaket og utskillelsen ble målt i 10 ulike organer hos fisken. Denne kunnskapen vil være nyttig i forhold til risikovurderinger av resipienter tilknyttet skytefelt der det blir og har blitt brukt eksplosiver.

2 Teori

2.1 Kilder

Eksploder og metaller er jordforurensinger som kan forekomme i militære øvingsområder (Pennington & Brannon 2002; US.EPA 2000) og i krigsområder. TNT er den mest giftige organiske forbindelsen som finnes i ammunisjon (Dave *et al.* 2000; Dodard *et al.* 1999). Eksploder som er funnet i militære øvingsfelt er hovedsakelig TNT samt eksploderne 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazin (RDX) og 1,3,5,7-tetranitroperhydro-1,3,5,7-tetrazosin (HMX) (Ampleman. G *et al.* 1998; Johnsen *et al.* 2008). Forurensing av eksploder i slike områder skjer ved at ammunisjon ikke blir fullstendig detonert (Engen Karsrud *et al.* 2010; Thiboutot *et al.* 1998). Eksploder er faste stoffer som raskt går over til gasser samtidig som det utvikles svært høye temperaturer. Den raske omsetningen gjør at omgivelsene blir utsatt for kraftig støt og trykk. Mesteparten av eksploderne vil ved detonasjon omdannes til lite giftige forbindelser som vanndamp (H₂O), nitrogen (N₂) og karbondioksid (CO₂), men sprenggassene kan også inneholde nitrose gasser og karbonmonoksid (CO) som er giftig og helseskadelig (Department of the US Army 1984; Yinon & Zitrin 1993), men noe av eksploderne vil bli liggende igjen udetonert (Hewitt *et al.* 2005; Taylor *et al.* 2006). I gamle skytefelt kan målområder ha blitt flyttet slik at udetonerte partikler kan være fordelt over store områder (Parmer *et al.* 2010) og ved flomepisoder og snøsmelting kan slike partikler bli transportert ut av det forurensete området og avsatt i akvatiske miljø (Taylor *et al.* 2009b). Partiklene vil kunne flyte i vannet og bli festet på jordpartikler eller bli re - mobilisert (Taylor *et al.* 2009a) og bli tilgjengelig for vannlevende organismer som fisk.

Udetonert og delvis detonert ammunisjon er kilder til høye konsentrasjoner av eksploder som kan være til skade for naturen (Hewitt *et al.* 2005) og vil være et avfallsproblem for militære installasjoner. Udetonert ammunisjon som forekommer under øvelse blir som oftest demolert ute i felten med ladninger av TNT (Hewitt *et al.* 2003) eller i demoleringsfelt nær skytefeltet (Johnsen *et al.* 2008). Udetonert ammunisjon som har ligget lenge i terrenget og er skadet av korrosjon vil lekke TNT, som kan spre seg via vann og jordpartikler (Ampleman. G *et al.* 1998; Johnsen *et al.* 2008). Gammel og delvis detonert ammunisjon fra andre verdenskrig blir også demolert med TNT i regulerte demoleringsfelt og kan medføre spredning av TNT partikler som ikke blir fullstendig demolert (Johnsen *et al.* 2008). TNT i vann vil primært degraderes ved fotolyse og TNT halveringstid vil være avhengig av partikkelstørrelse samt lysforhold (Talmage S. S *et al.* 1999). Ulikt mange andre organiske forurensinger har TNT relativt liten

affinitet til jordpartikler og man vil anta at slike partikler migrerer raskt til grunnvann og overflatevann (Alavi *et al.* 2011).

Mesteparten av eksplosivholdig ammunisjon som demoleres i Norge blir innlevert til Øyradalen destruksjonsanlegget i Lærdal som ble etablert i 1976 og resultater fra grunnmålinger i området Øyradalen viser ingen kritiske verdier av eksplosiver (Johnsen & Voie 2011). Før demoleringsanlegget ble opprettet ble gammel ammunisjon deponert i nedlagte gruver, men det er i dag ikke påvist verdier i avrenningsvann fra gruvene som vil utgjøre en miljørisiko. I Sverige har det blitt gjennomført overvåkning av en gruve der det har blitt dumpet over 900 tonn eksplosiver. Vann som renner ut fra gruve hadde ingen spor av eksplosiver (Liljedahl & Qvarfort 1997). Det norske Forsvaret og Raufoss ASA har også dumpet ammunisjon med eksplosiver i Mjøsa (Voie 2005).

Eksplosivene vil holde seg i granaten så lenge den ikke korroderer i stykker. I ferskvann er det lite salt og det kan være oksygenfattige forhold på bunnen som vil redusere korrosjonshastigheten. I marine miljøer er det mye mer salter og ofte mer oksygenrike forhold og derfor vil korrosjonen gå raskere, slik at utslipp av TNT umiddelbart blir en fare for miljøet (Ek *et al.* 2008; Talmage S. S *et al.* 1999). Hvis eksplosivene først lekker ut vil de bli utsatt for både abiotisk og biotisk nedbrytning. Hvor raskt dette vil skje er avhengig av stabiliteten av stoffene i miljøet det spres i, om det tas opp av organismer eller planter samt konsentrasjon av eksplosivene (Esteve - Nunez A *et al.* 2001; Krumholz *et al.* 1997; Van Aken *et al.* 2004).

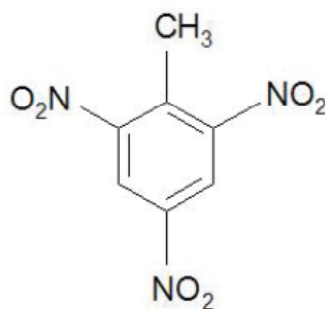
Forurensinger av eksplosiver forekommer også fra produksjon av TNT særlig i jordsmonn og grunnvann rundt produksjonslokaler, men siden TNT har lavt damptrykk $1,99 \times 10^{-4}$ mm Hg ved 20 °C vil det mest sannsynlig ikke være fare for luftforurensning. Forurensinger fra TNT sees ofte som en rødlig farge i vann og jord (Talmage S. S *et al.* 1999).

2.2 2, 4, 6 Trinitrotoluen (TNT, C₆H₂(NO₂)₃CH₃)

TNT blir også kalt trinitrotoluen, trinol og trotyl. TNT ble første gang fremstilt av den tyske forskeren Julius Willibrand i 1863. Det er et lysegult, krystallinsk stoff med molekylvekt på 227,13 mol/g, smelter ved 82 °C og det eksploderer ved 240 °C (Department of the US Army 1984) (vedlegg 1).

Hvordan organiske forbindelser opptrer i miljøet er avhengig av molekylstruktur, størrelse, form samt de funksjonelle grupper. Ut fra strukturen er TNT et substituert benzenderivat. Hvor løselig en organisk forbindelse er i vann er avhengig av polaritet. Polaritet er videre avhengig av antall polariserende atomer som oksygen og nitrogen. Slike atomer har en tendens til å øke ladningsseparasjonen og som konsekvens av dette øke løseligheten i vann (Walker *et al.* 2006). TNT har en løselig på 130 mg/l ved 20 °C vann (Ryon 1987) og er lett løselig i aceton, benzen, toulen og pyrimidin og kan også løses i eter og varm alkohol (Department of the US Army 1984).

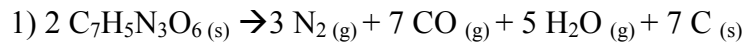
Til å begynne med ble TNT brukt som fargestoff i farge og tekstilindustrien. Det ble ikke benyttet i militær sammenheng før det tyske forsvaret begynte å bruke TNT som et eksplosiv i artillerigranater i 1902 og det britiske forsvaret i 1907. TNT ble klassifisert som et eksplosiv av britiske myndigheter i 1910. I 1912 ble det vedtatt at eksplosivet skulle brukes som standard sprengladning i høyeksplosive komponenter for feltartilleri til det amerikanske forsvaret (Department of the US Army 1984). Trinitrotoluen er det mest brukte eksplosivet i militære sammenhenger på grunn av høy eksplosiv kraft, kjemisk stabilitet, lav følsomhet for ytre påvirkning og at det er enkelt å produsere (Ownby, D. R *et al.* 2005). I tillegg er det kompatibelt med andre eksplosiver samt gunstig for omsmelting og omstøping (Department of the US Army 1984). Siden 1945 og fram til 1980- tallet har USA produsert 65 tonn TNT daglig (Lewis *et al.* 2004).



Figur 1: Strukturformel av TNT

TNT beskrives som moderat giftig og det kan eksistere som seks mulige ring isomerer, men det er bare alfa isomerer (figur 1) som er av militær interesse (Department of the US Army 1984). TNT molekylet har underskudd av oksygen og må derfor blandes med andre eksplosiver for å få en positiv oksygen balanse. Når ren TNT blir avsatt produseres det sort røyk som indikerer en negativ oksygenbalanse. Det vil si at TNT, som ikke inneholder nok

oksygen ikke vil klare å oksidere karbon atomene fullstendig til karbondioksid. For å optimalisere effekten av eksplosivet blir det blandet inn ammoniumnitrat. Denne blandingen har høyere eksplosiv styrke enn ren TNT (Department of the US Army 1984). Ligning 1 viser hvilke produkter som dannes ved detonasjon av TNT.



Når TNT detoneres blir det frigjort energi og produsert stabile forbindelser som karbonmonoksid (CO), karbondioksid (CO₂) og nitrogen (N₂) (Yinon & Zitrin 1993). Dette er et felles trekk for de fleste eksplosiver, da de alltid består av mange nitrogen eller oksygen grupper, vanligvis i form av to, tre eller flere nitro - grupper som er festet til en rekke karbonatomer noe som gjør eksplosiver stabile (Department of the US Army 1984).

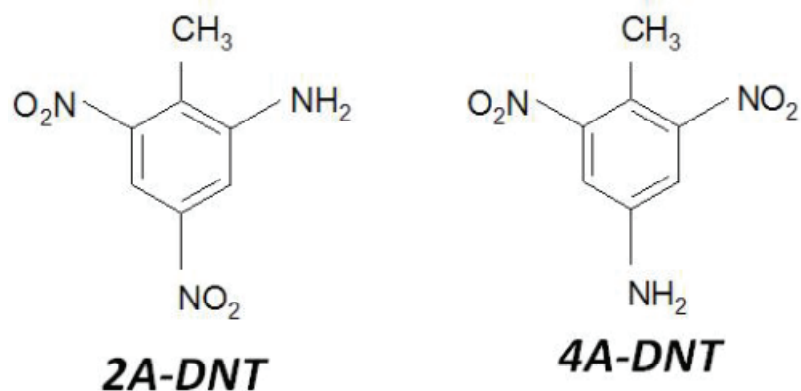
Krav til militære eksplosiver er at de må være følsomme ovenfor støt og friksjon. De skal ikke kunne detonere ukontrollert fra håndvåpen ved bruk. I tillegg må de ha evner til å tåle lang lagringstid, kunne skytes i prosjektiler eller slippes fra fly uten at det eksploderer før eksplosivet treffer tenkt mål (Department of the US Army 1984).

2.3 Nedbrytningsprodukter av TNT

Nedbrytningsprodukter av TNT har vært kjent i lang tid, men det er få studier som viser konsekvenser av disse produktene i miljøet. Nedbrytning av TNT skjer hovedsakelig ved en sekvensiell reduksjon der nitro - gruppene reduseres til aminer (Kaplan & Kaplan 1982; Pennington & Brannon 2002). Det forekommer ulike typer nedbrytning av TNT, både ved fotolyse og biologisk nedbrytning (Rylott *et al.* 2011). Biologisk nedbrytning er godt dokumentert og viser gjennom mikrobiell aktivitet at TNT vil brytes ned til en mengde nedbrytningsprodukter. Denne nedbrytningen kan skje i både anaerobt og aerobt miljø (Esteve - Nunez A *et al.* 2001; Rylott *et al.* 2011).

Laboratoriestudier rapporterer at TNT brytes raskere ned i ferskvann ved tilgang av sollys enn når det er mørkt, men at det er lite dokumentasjon på hvor raskt nedbrytningen skjer, samt at TNT er mer stabilt i saltvann (Talmage S. S *et al.* 1999). Begrepet rødt vann kan være et resultat av fotolyse av nitro forbindelser i vann. De primære nedbrytningsproduktene til TNT i vann er 1,3,5-trinitrobenzen, 4,6-dinitroantranil, 2,4,6-trinitrobenzaldehyd, 2,4,6-trinitrobenzonitril, og 2,4,6-trinitrobenzosyre (Talmage S. S *et al.* 1999). Studier av ¹⁴C - TNT har påvist metabolitter som 2 - amino - 4,6- dinitrotoulen (2ADNT) og 4, amino 2, 6-

dinitrotoulene (4ADNT) i sedimenter, jord og vann (figur 2) (Ek *et al.* 2008; Spain 1995; Talmage S. S *et al.* 1999).



Figur 2: Metabolitter av TNT som er mest funnet i skyte- og øvingsfelt.

I en studie med meitemark (*Tubifex tubifex*) i bunnsedimenter ble det observert en signifikant nedbrytning av TNT i vannet der 4 - ADNT var det primære nedbrytningsproduktet. Det ble også observert at nedbrytningshastigheten i vann var større enn for sedimenter, og at 6 % av TNT var brutt ned etter 24 timer og 28 % var brutt ned etter 54 timer (Conder *et al.* 2004). I en studie med fisk ble det observert at allerede etter 10 minutter kunne man finne 2 - ADNT og 4 - ADNT i fiske vev (Yoo *et al.* 2006).

2.4 TNT og opptak i biota

Terrestriske og vannlevende organismer vil ta opp TNT forskjellig. Vannlevende organismer vil være utsatt for en mer konstant eksponering via vann der også mat er en viktig eksponeringsvei (Houston & Lotufo 2005; Walker *et al.* 2006). For terrestriske organismer vil ikke eksponeringen være like konstant da TNT vil foreligge som sporadiske forurensinger i jord samt eksponering via mat. Meitemark som forsøksorganisme viser at TNT kan bli tatt opp via mat og gjennom hud fra jord (Houston & Lotufo 2005; Lachance *et al.* 2004; Pennington & Brannon 2002; Robidoux *et al.* 1999). De viktigste opptaks veier for TNT i fisk er gjennom mage og tarm samt gjeller hvor den kan spres til andre organer via blod- og lymfesystemet. For å bli tatt opp må stoffet passere flere barrierer som for eksempel cellemembranene i tarm og gjeller. Opptaket gjennom cellemembranen kan skje både gjennom passiv diffusjon og aktiv transport. Hvordan og hvor effektiv et stoff tas opp er avhengig av blant annet fettløselighet og molekylstørrelse (Walker *et al.* 2006). Forskning på ulike fiske arter tyder på at TNT - metabolitter hopper seg opp i større grad enn utgangsstoffet og at metabolittene binder seg kovalent til cellulære proteiner og andre makromolekyler, men

skadevirkninger og effekter er ikke så kjent (Conder *et al.* 2004; Ownby, D. R. *et al.* 2005). Et mål på opptak i fisk er biokonsentrasjonsfaktor (BCF), som beskriver forholdet mellom konsentrasjon i organismen eller organet og det eksponerte vannet (Walker *et al.* 2006).

Det er ikke funnet litteratur på tidligere opptak og utskillelser studier med TNT der man har undersøkt 10 organer i fisk samtidig, men det er rapportert BCF på 20,5 ml/g basert på metoden log Kow 2,2 av TNT i ulike vevsprøver fra fisk (Liu *et al.* 1983) og 0,79 ml/g (Ownby, D. R. *et al.* 2005). Det er generelt rapportert høyere konsentrasjoner av nedbrytningsprodukter fra TNT enn av hovedmolekylet TNT (Conder *et al.* 2004). Ved eksponering over tid vil konsentrasjonen øke i organismen til det oppnås en likevekt mellom opptak og utskillelse. (Lotufo 2011; Ownby, D. R. *et al.* 2005; Yoo *et al.* 2006).

2.5 Tracerteknikk

Tracerteknikk er svært anvendelig i spesieringsstudier (Salbu 1987). En tracerteknikk er basert på at radioaktive isotoper er kjemisk identisk til de stabile isotopene. For eksempel ^{14}C som er den radioaktive isotopen til C. Når man til et stabilt grunnstoff tilsetter spor av en radioaktiv isotop av det samme grunnstoffet, kan man ved hjelp av den radioaktive strålingen fra den tilsatte isotopen studere hvordan grunnstoffet deltar i reaksjoner og fordeler seg i organismen (Choppin *et al.* 2002).

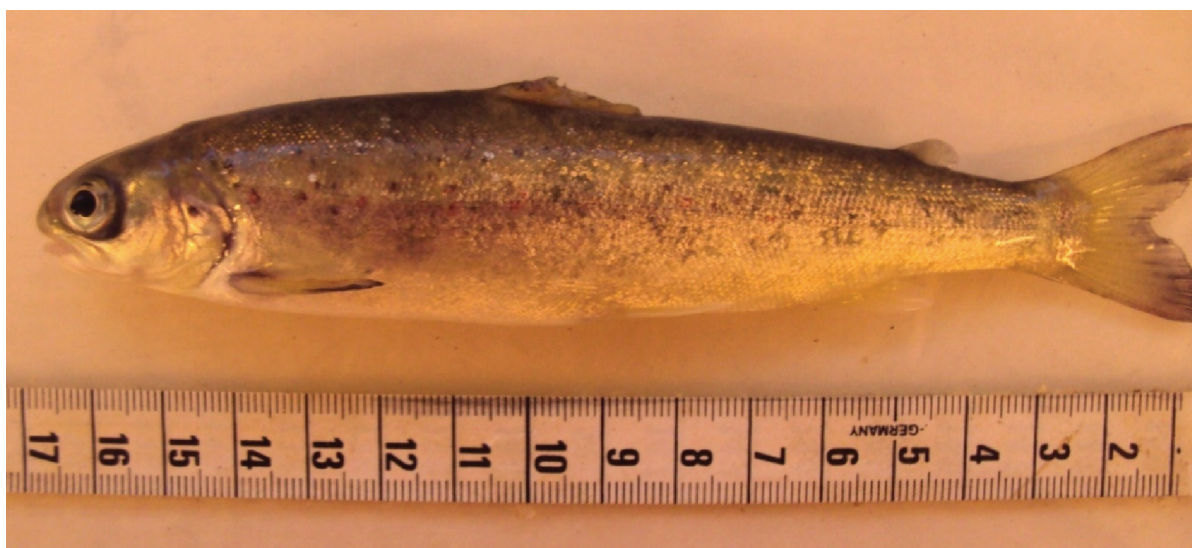
Ved valg av traser er det veldig viktig å tenke på at traseren må kunne følge prosessen man er ute etter, dens strålingsegenskaper som type stråling, energi og halveringstid. I tillegg er strålevern viktig. Strålevern er å iverksette administrative og tekniske tiltak for å holde stråledosene så lave som mulig (ALARA-prinsippet, As Low As Reasonably Achievable). Når det gjelder halveringstiden så må den ikke være for kort og heller ikke for lang. Er den for kort kan traseren være utdødd før forsøket er ferdig og er den for lang kan det bli problemer med avfall fra forsøket. Det er også viktig at det er enkelt å måle aktiviteten fra traseren. Traseren som ble valgt i dette forsøket var en betaemitter som enkelt kan måles på en Liquid Scintillation Counter (LSC) (Choppin *et al.* 2002).

3 Materialer og metode

3.1 Eksponeringsoppsett og forsøksorganismer

Forsøket ble utført på Isotoplaboratoriet ved Fiskefjøset, UMB. To 90 L svarte stamper ble fylt med 50 L vann fra Maridalsvannet som råvann. Vannet i forsøkskarene ble temperert i forhold til romtemperaturen på ca 10 °C før forsøkstart, og ble tilført oksygen i form av ei pumpe med to luftesteiner. Begge karene hadde isopor - lokk for at det skulle være mørkt og for at fisken ikke skulle hoppe ut. Lignende eksperimentelle oppsett har vært brukt tidligere uten å forårsake noen skadevirkninger for fisken. Forsøket er godkjent av The Norwegian Animal Research Authority (NARA) / Forsøksdyrutvalget (FDU).

Forsøksfisken, Atlanterhavslaks (*Salmo Salar*) (figur 3) ble sultet i fem dager før eksperimentets start. Fisken var ca 6 måneder samt $24,9 \pm 5$ g og $14,1 \pm 1,1$ cm lang. Under sortering ble det benyttet tricaine methanesulfonate (MS222, Argent Chemical Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA) og det ble sortert ut 144 fisk. Det ble satt 72 fisk i et eksponeringskar og 72 fisk i et kontrollkar. Ved start var det en biomasse på 1797 gram i eksponeringskaret og 1832 gram i kontrollkaret. Etter at fiskene var satt ut i forsøkskarene ble eksponeringskaret tilsatt 1,8 ml C-14 merket TNT tracer fra American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) med en renhet på > 99 %. Den spesifikke aktiviteten på traceren var 5 mCi/mmol og konsentrasjonen var 0,1 mCi/ml.



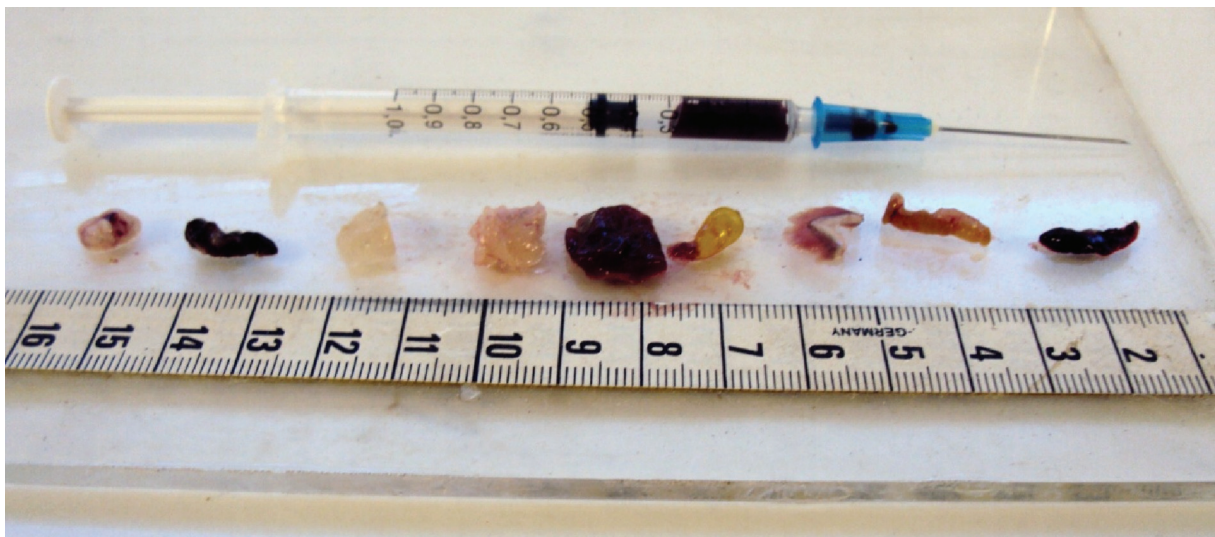
Figur 3: Et eksemplar av forsøksfisken (*Salmo salar*). Foto S. Stornes

3.2 Prosedyrer ved prøvetaking og registreringer

3.2.1 Prøvetaking av fisk

Det ble tatt opp 6 fisker for hvert prøveuttak som ble dissekert etter følgende tidspunkter: 1, 3, 6, 12, 24 og 48 timer for både opptaks og utskillellesperiode. Etter 48 timers opptak var det igjen 36 fisk i hvert kar. Fiskene ble flyttet fra kontrollkar og eksponeringskar over i nytt kontrollkar og eksponeringskar for utskillelse.

Fisken ble avlivet med et slag i hodet, og rett etter avlivning ble det umiddelbart tatt blodprøver. Blod ble overført til forhåndsveide Econo Glass Vial, A-quality for liquid scintillation counting (PerkinElmer, Waltham, USA) og ved noen utvalgte uttak ble blodprøver analysert for glukose og for plasma ionene natrium (Na), kalium (K) og klor (Cl) ved bruk av I-STAT®system (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Blodprøvene ble tatt rett etter opptak på fiskefjøset da blod koagulerer raskt etter avlivning. Fisken ble deretter transportert til isotoplaboratoriet for videre disseksjon. Fisken ble veid og målt før dissekering. Følgende organer ble dissekert ut: gjelle, galle, lever, nyre, milt, mage, tarm, hjerne og muskel. Figur 4 viser størrelsesforholdet på hvert organ som ble tatt ut. Organene ble fortløpende lagt i forhåndsveide rør etter disseksjon, som var merket med forsøkskode, fiskenummer og type organ. Alle fiske organene ble prøvetatt etter EMERGE prøvetakningsprotokoll for fiskeprøver fra levende fisk (Rosseland *et al.* 2001).



Figur 4: Størrelsesforhold på organene som ble dissekert ut. Fra venstre: hjerne, nyre, muskel, mage, lever, galleblære, gjelle, tarm og milt samt blodprøve da organene i forsøket ble lagt rett i forhåndsveide vials. Foto. S. Stornes

3.2.2 Kondisjonsfaktor

Fiskens kondisjonsfaktor (k) ble beregnet ut fra fiskens vekt (gram) og totale lengde (cm) etter Fultons formel:

$$K = \frac{\text{vekt} \times 100}{\text{lengde}^3}$$

3.2.2 Prøvetaking av vann

Vannprøver ble samlet inn for hvert prøveopptak og Ultima Gold^{AB} (PerkinElmer, Waltham, USA) tellevæske ble tilsatt før analyse på LSC, se tabell 1 for detaljer. pH og konduktivitet ble målt ved hvert prøveuttak (Extech Extick II EC510). Temperatur ble avlest med OxyGuard temperaturmåler (Birkerød, Danmark). Oksygen (O₂) og CO₂ ble målt med OxyGuard Type III Oksygen probe med en nøyaktighet på ± 1mg/l.

Ammonium (NH₄⁺), nitritt (NO₂) og nitrat (NO₃) ble analysert med følgende analysekitt: Ammonium- test 1147520001, metode indophenol blue med målområde 0,010 - 3,00 mg/l NH₄ – N (Merck, Darmstadt, Germany). Nitritt – test 1147760001, metode griess reaction med målområde 0,005 – 1,000 mg/l NO₂ – N (Merck, Darmstadt, Germany) og nitrat - test 1097130001, metode 2,6 – Dimetylphenol med målområde 0,10 – 25,0 mg/l NO₃ – N (Merck, Darmstadt, Germany). Prøvene ble analysert med spektrofotometeret Spectroquant, NOVA 60 (Merck, Darmstadt, Germany). Når ammoniumnitrat fra feces løses i vann dannes ammonium (NH₄⁺) og ammoniakk (NH₃). Den totale konsentrasjonen av disse to stoffene kalles TAN – totalt ammoniumrelatert nitrogen. NH₄⁺ ble konvertert til nitrogen i ammonium ion (NH₄⁺ - N) ved å multipliseres mengde NH₄⁺ med ratio verdi 0,776 (US.EPA. 1999).

Det ble utført ultrafiltrering (Millipore Amicon®Ultra- 15, molekylvekt cutoff 10 kDa, Amicon) av vannprøver ved tid 0 og etter 48 timers eksponering for å skille lavmolekylære fra høymolekylære forbindelser. Prøvene ble sentrifugert i en Heraeus Labofuge (Buckinghamshire, England) sentrifuge på 3000 rpm i 60 minutter. Det ble pipettert ut 5 ml filtrat som ble tilsatt Ultima Gold (PerkinElmer, Waltham, USA) tellevæske før analyse.

3.2.3 Oppslutning av organer til analyse

Vevsprøvene ble oppsluttet med Solvable (Perkin Elmer, Waltham, USA) som er et alkalisk løsningsmiddel som løser opp organisk vev. Solvable ble tilsatt direkte i vialsene med organene som deretter ble satt på vannbad, se tabell 1 for detaljer. For noen av organene (eksempel blod) fikk løsningen en gulaktig farge, som ble fjernet ved å tilsette 30 % H₂O₂

(Merck) som er et kraftig oksiderende middel. Prøvene ble deretter satt på vannbad og løsningen ble blank. Deretter ble prøvene avkjølt til romtemperatur før tellevesken ble tilsatt.

Det ble benyttet Hionic Fluor som telleveske (Perkin Elmer, Waltham, USA) til de prøvene som ble tilsatt 30 % H₂O₂ (Merck) og Ultimate Gold (Perkin Elmer, Waltham, USA) til organene hjerne og muskel som ikke ble tilsatt H₂O₂. Ultima Gold^{AB} som telleveske (Perkin Elmer, Waltham, USA) og Ultimate Gold (Perkin Elmer, Waltham, USA) er ikke kompatible med 30 % H₂O₂ (Merck) da prøvene ble blakket og kan føre til fargequench. Tabell 1 viser mengder for de ulike organene.

Tabell 1: Oversikt over mengder kjemikalier til analyse av organer og vannprøver.

Organ (min/max)	Solvable ml	60 °C vannbad min	30 % H ₂ O ₂ µl	60 °C vannbad min	Telleveske	Telleveske ml
Blod (0,2-0,5ml)	2	60	200	60	Hionic Fluor	15
Gjeller (10–50mg)	2	120	200	30	Hionic fluor	10
Lever (50-100mg)	2	90 – 120	200	30 – 60	Hionic fluor	10-15
Nyre (50-100mg)	1 – 2	90 – 120	200	30	Hionic fluor	10- 15
Milt (20mg)	1	60	200	30	Hionic fluor	10
Mage (50-100mg)	1 – 2	60 – 90	200	30	Hionic fluor	10-15
Tarm (20 mg)	1 – 2	120	200	60	Hionic fluor	10-15
Hjerne (50-150mg)	1	120	0	0	Ultima Gold	10
Muskel (150-200mg)	2	120 – 150	0	0	Ultima Gold	10-15
Vannprøver (5ml)	0	0	0	0	Ultima Gold ^{AB}	10

3.2.4 Måling av radioaktivitet

Karbon- 14 er en β- emitter og avgir en energi på maksimal 156 keV. Prøvene ble målt med en TRI-CARB 2900 TR Liquid Scintillation Analyzer fra Packard (USA). Prøvene ble målt til telleusikkerheten var under 2 %, eller de ble målt i 30 minutter dersom høyere telleusikkerhet. Tellesikkerheten ble beregnet av instrumentet.

Effektiviteten til instrumentet avhenger av mengde quench som forekommer. Quench reduserer telleeffektiviteten som følge av tap av målt energi. Det kan forekomme tre ulike typer quench. Kjemisk quench skyldes partikler i prøven og farge quench kan forekomme ved farge i prøveløsningen. Også foton quench kan forekomme ved ufullstendig overføring av beta partikkel energi til løsemiddelmolekyler (Choppin *et al.* 2002). Instrumentet korrigerer for quench etter quench kurve, se figur 1 i vedlegg 1. Quench kurven er laget av Perkin Elmer Carbon-14 quenched standards set prod. Nr. 6008502 (PerkinElmer CT, USA).

Bakgrunnen til instrumentet ble målt ved å måle de aktuelle telleveskene som skulle benyttes. Ved å beregne gjennomsnittet for n=3 tellevesker ble denne bakgrunnen trukket fra ved måling av prøvene. Prøvene med lik telleveske ble kjørt sammen. Det ble satt en blankprøve for kontroll på bakgrunnsmåling.

3.3 Beregning av biokonsentrasjonsfaktoren (BCF)

Biokonsentrasjonsfaktoren (BCF) gitt som ml/g ble beregnet for å se i hvilken grad organene akkumulerte TNT fra vannet. Biokonsentrasjonsfaktoren angir aktiviteten av TNT i organet i forhold til aktiviteten i vannet og ble beregnet ved å dele aktiviteten av TNT i organet på aktiviteten i vannet etter følgende ligning: $BCF = \frac{C_f}{C_w}$. BCF =100 betyr at det er 100 x høyere konsentrasjon i organet enn i vann for oppkonsentrert total TNT i fisken.

3.4 Statistikk

Statiske analyser ble utført ved bruk av Minitab 15® Statistical Software. Normalfordeling og varians ble sjekket ved bruk av Anderson- Darling test. Data som ikke var normalfordelt ble transformert ved bruk av Johnson transformasjon funksjon i programvaren. Levens test og Bartlets test ble benyttet for å vurdere homogenitet i datasettet. For å teste om det var signifikante forskjeller mellom ulike grupper ble det brukt ANOVA med 95 % konfidensintervall (General linear modell). Tukey post hoc test ble brukt for å skille mellom gruppene gjennomsnitt ved de ulike prøvetidspunkt. $P < 0,05$ ble satt som statistisk signifikant. Korrelasjoner mellom organer ble undersøkt med Pearson produkt-moment test. Testen måler kun styrken av lineære sammenhenger der null lineær sammenheng er $r = 0$ og god lineær sammenheng er $r = \pm 1$, men lave r verdier trenger ikke å bety at det ikke er relasjon mellom variablene. Lineære sammenhenger må også sees sammen med signifikans verdier (Løvås 2004).

Multivariat statistikk ble utført ved hjelp av principal component analysis (PCA) der målet var å forklare variasjonen i dataene. PCA baserer seg på et n-dimensjonalt koordinatsystem, der n er antall variabler eller, som i dette tilfellet, ti organer. Objektene i PCA er de seks prøvetakningstidspunktene og disse objektene blir liggende som punkter i det 10 - dimensjonale koordinatsystemet. Koordinatsystemet kan beskrives ved hjelp av prinsipalkomponenter (PC) der PC1 beskriver mest av variansen i datasettet, mens PC2 beskriver en mindre del enn variansen av PC1 osv. Loadingen til en variabel kan variere fra +1 til -1 og sier noe om hvor mye variabelen har å si for prinsipalkomponenten.

4 Resultat og diskusjon

Hovedmålet med oppgaven var å se på opptak og utskillelse av ^{14}C - TNT i ulike organer hos laks, som funksjon av tid. Det ble tilsatt radioaktivt merket TNT, der ett karbonatom i ringstrukturen til TNT var merket. Ved måling av ^{14}C - TNT under forsøket kan det ikke skilles mellom TNT og dens metbolitter 2 - ADNT og 4 - ADNT, og dataene på aktivitet som er presentert er derfor summen av TNT og dens metabolitter.

4.1 Karakterisering av eksponeringsvann

4.1.1 Generell vannkjemi

Maridalsvann som ble brukt som råvann er en relativ ionefattig vannkvalitet med lave til moderate mengder humus, noe som er dominerende for norske ferskvann (Henriksen *et al.* 1989; Skjelkvale *et al.* 2007). Vannkjemi for Maridalsvannet gitt i tabell 2.

Tabell 2: **Generell vannkjemi for Maridalsvannet. Verdiene er gitt som mg/L.**

TOC	Ca	Mg	Na	K	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
5,2	3,0	0,60	1,7	0,60	1,7	0,20	2,7

Temperatur og pH i vannet var relativt stabil under eksponering, mens konduktiviteten økte noe (tabell 3). Økning i konduktivitet skyldes mest sannsynlig utskillelse av salter fra fisken under forsøket.

Tabell 3: Konduktivitet, pH og temperatur under opptaksperioden.

Time	pH	Konduktivitet (μS/cm)	Temp C°
1	6,7	38	10,9
3	6,8	41	9,7
6	7,3	43	9,6
12	7,4	47	9,7
24	7,3	50	9,9
48	7,5	52	10,1

4.1.2 Gasser

Oksygen innholdet (O₂) i vannet var innenfor normal verdier for ferskvann da normal verdier i temperatursjiktet 0 til 10° C er 8,02 mg/L til 10,29 mg/L (tabell 4) (Schmidt - Nielsen 1997). Karbondioksid (CO₂) holdt seg stabil gjennom hele eksponeringsperioden med en konsentrasjon på 2,0 mg/L, se tabell 4, og disse verdiene førte ikke til negative forhold for fisken.

Tabell 4: TAN og konsentrasjoner av O₂ og CO₂ fra forsøkskaret forsøket.

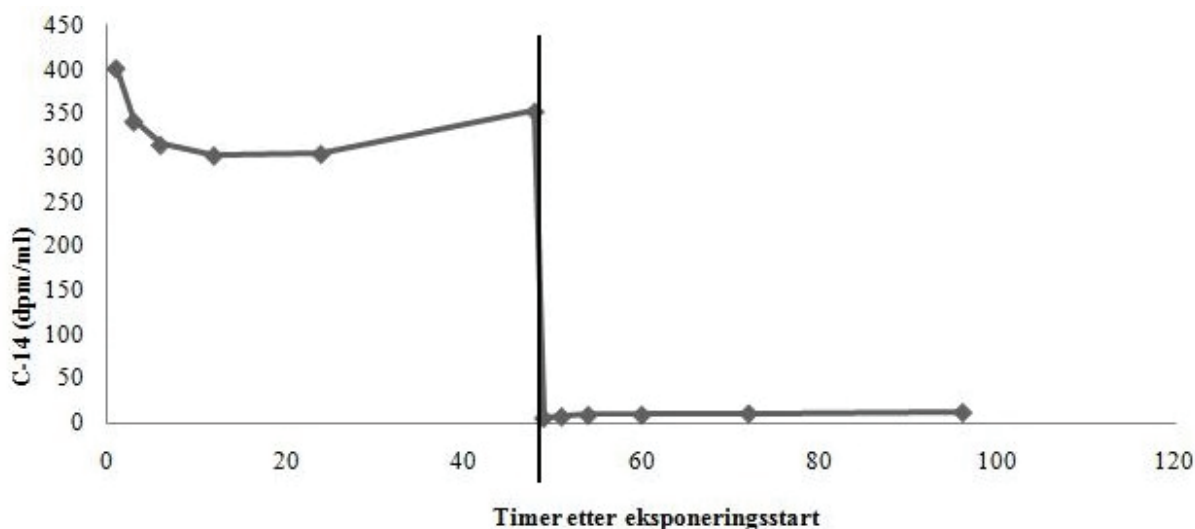
Dag	TAN mg/L	O ₂ mg/L	CO ₂ /L
1	2,2	9,4	2,0
2	2,8	9,5	2,0
3	0,5	*	*
4	0,7	10,1	2,0

*) ikke prøvetatt.

Ammoniakk utgjør det meste av det metabolske nitrogenavfallet fra fisk (Schmidt - Nielsen 1997; US.EPA. 1999). TAN var noe høy under opptaksperioden men ble lavere under utskillelsesperioden fordi biomassen ble lavere (tabell 4). Alle målingene var innenfor Mattilsynets normal TAN – verdier for denne type fisk (Rosten *et al.* 2004).

4.1.3 TNT (total og ultrafiltrert)

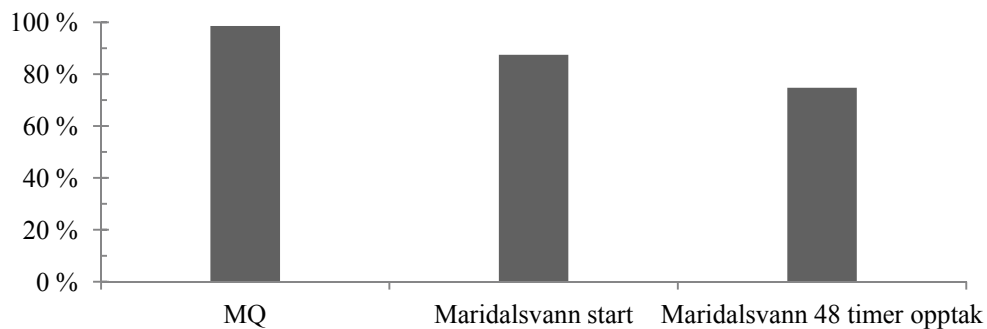
Vannprøver samlet inn ved hvert prøveopptak under opptaksperioden, indikerte at målt ¹⁴C - aktivitet i vannet var relativt stabil. ¹⁴C – TNT konsentrasjonen i vannet under opptaksperioden på 48 timer var innenfor 25 % av start konsentrasjonen for hvert prøveopptak (se figur 5).



Figur 5: Aktivitet av ¹⁴C i vannet under eksponeringsperioden og utskillelsesperioden. Vertikalstrekk indikerer skille mellom opptaks og utskillelses periode.

Ultrafiltrering av vannprøver med MilliQ vann (MQ), som ble tilsatt ¹⁴C - TNT og med Maridalsvann ved start og etter 48 timers eksponering tyder på at ¹⁴C - TNT - aktiviteten foreligger som lavmolekylære forbindelser (<10kDa) da mesteparten av aktiviteten slipper gjennom membranen (figur 6). I MQ – vann slipper 99 % av aktiviteten igjennom membranen og med Maridalsvann ved start slipper 88 % igjennom membranen. Maridalsvannprøven etter

48 timer slipper 75 % av ^{14}C - TNT aktiviteten gjennom membranen og det tyder på at noe av aktiviteten kan ha festet seg til membranen via partikler i Maridalsvannet.



Figur 6: Ultrafiltrering av MQ vann, Maridalsvann ved tid 0 og etter 48 timers optak i forhold til total mengde.

Man vil anta at organiske kjemikaler binder godt til organisk materiale. Siden TNT har en antatt løselighet i vann på 130 mg/l ved 20 °C og at løseligheten øker ved økning i temperatur samt endring i pH (Ro *et al.* 1996) er det flere studier som viser at TNT ikke absorberes lett til humuspartikler og humussyrer selv ved lavere temperaturer (Selim *et al.* 1995). Studier viser også at absorpsjon til humussyrer er noe pH avhengig samt at humussyrer har lav absorpsjon til TNT (Selim *et al.* 1995).

4.2 Fysiologisk status hos forsøksfisken

Blodplasmaverdiene for glukose, Na, K og Cl var ikke signifikant forskjellig fra kontrollgruppen noe som betyr at man kan konkludere med at forsøket ikke medførte noe fysiologisk stress hos fiskene.

Tabell 5: Plasmaverdier av glukose, Na, K og Cl fra forsøksfisken med standardavvik. Verdier gitt som mmol /L ± STD.

Tid	n	Glukose	Na	K	Cl
0	3	4,2 ± 0,6	146 ± 0,6	5,1±1,1	134 ± 2,1
24	4	4,2 ± 1,3	147 ± 2,2	3,9±0,6	135 ± 2,5
48	4	3,7 ± 0,3	144 ± 2,1	5,9±1,3	134 ± 1,0
48k	4	5,4 ± 3,7	143 ± 2,8	6,2 ± 1,8	131 ± 4,4
54	4	4,4 ± 2,2	140 ± 3,3	4,4 ± 0,7	133 ± 1,0
72	3	6,6 ± 2,3	143 ± 5,5	5,2 ± 0,8	132 ± 3,8
96	2	3,8	145	3,5	134

Gjennomsnittlig k – verdi for de 72 forsøksfiskene, som beskriver fiskens fysiologiske tilstand i forhold til vekt og lengde, var $0,881 \pm 0,06$ noe som er normalt for 6 måneders gammel laks (Strand & Heggberget 1996).

4.3 Akkumulering av ^{14}C - TNT i organene

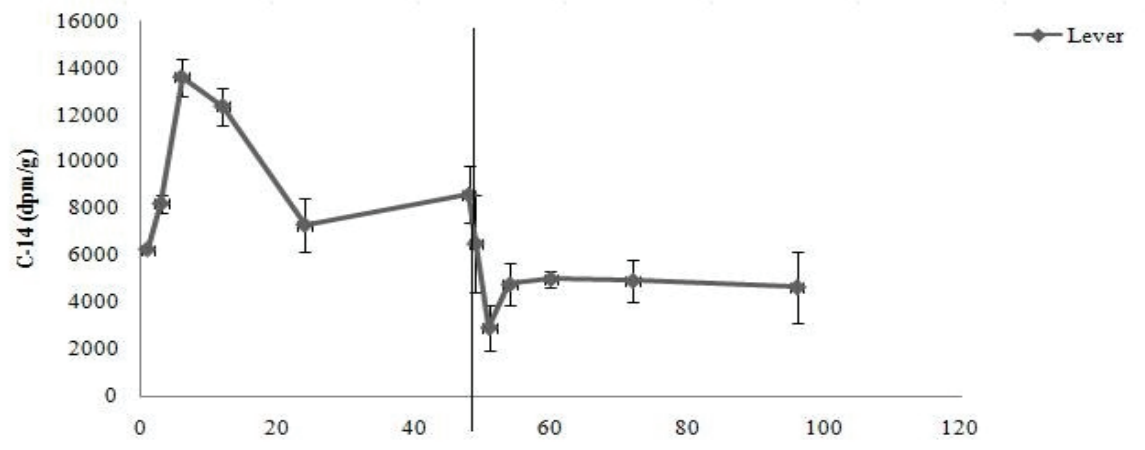
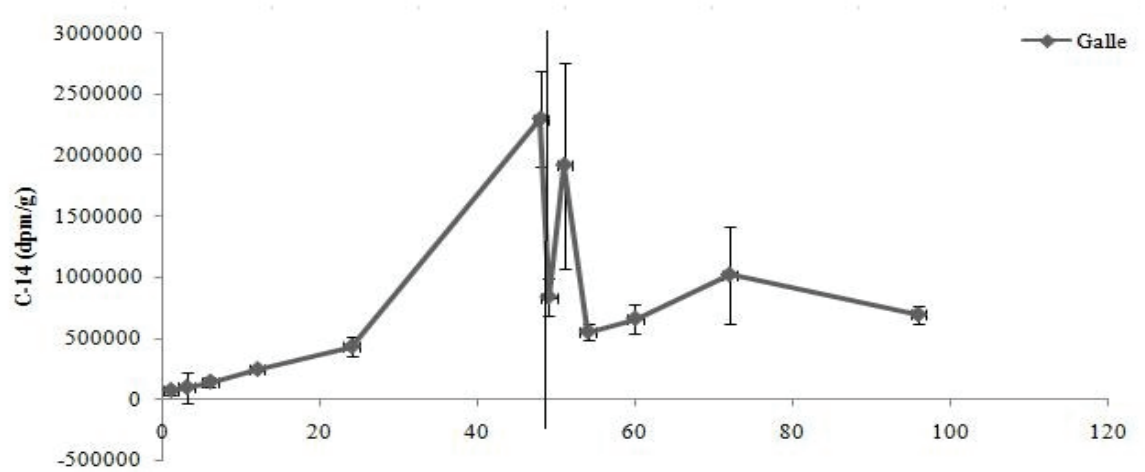
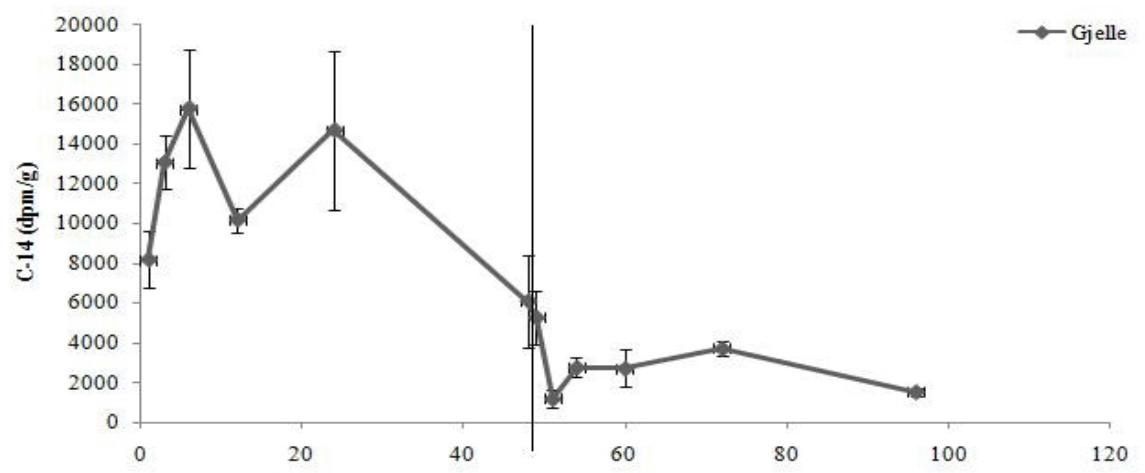
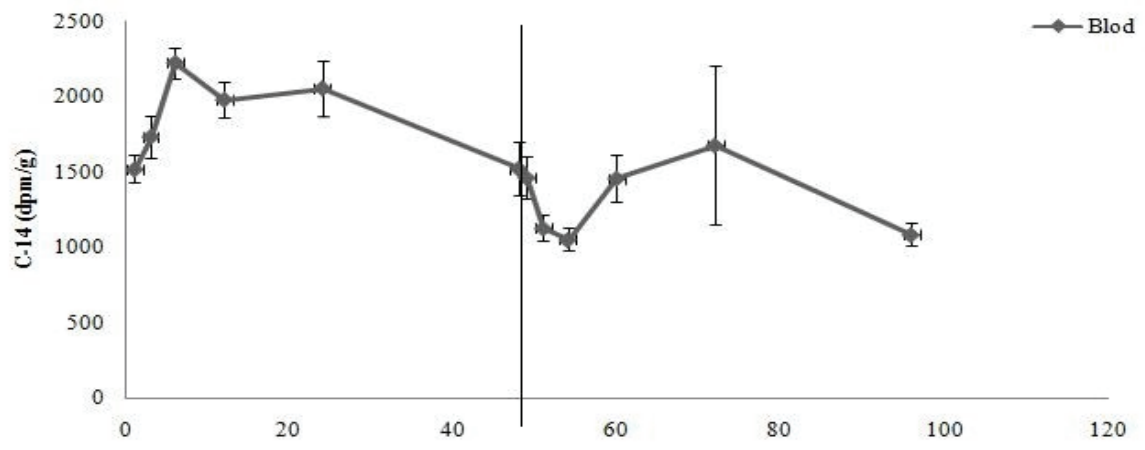
4.3.1 Opptak av ^{14}C - TNT

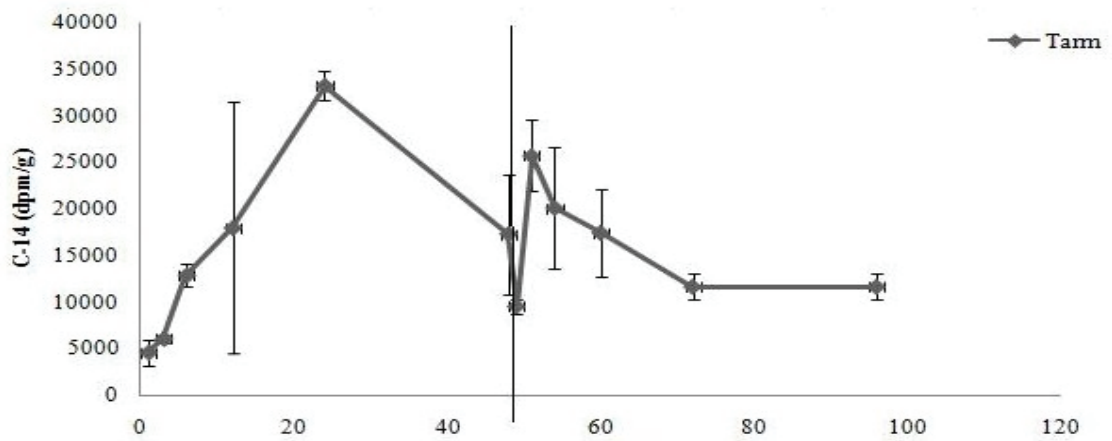
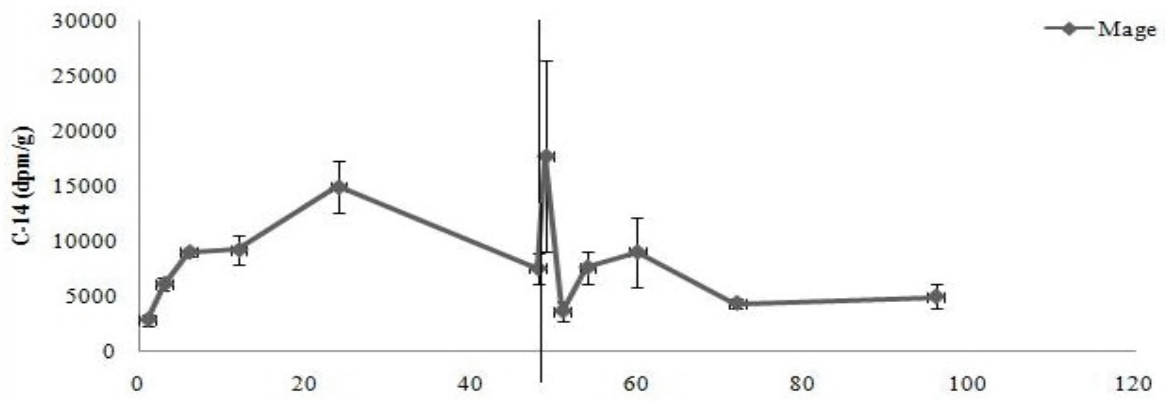
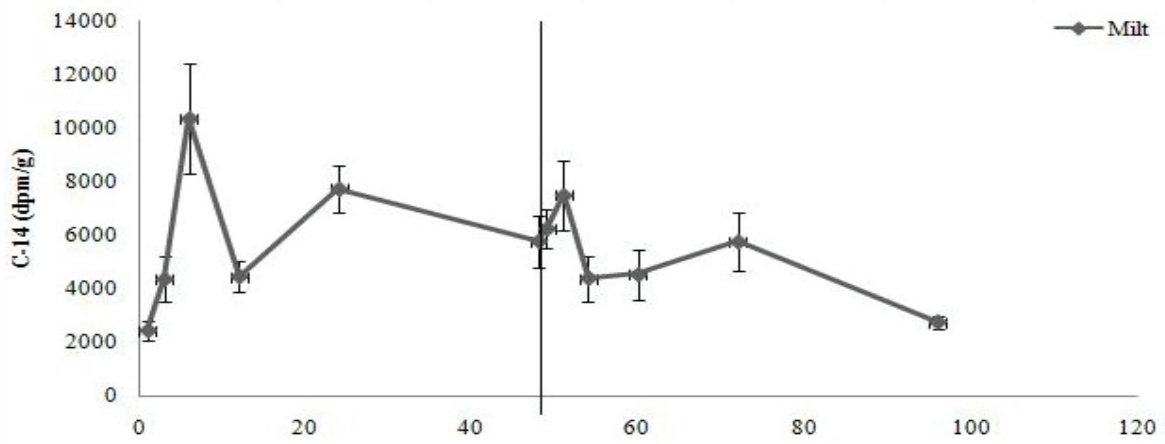
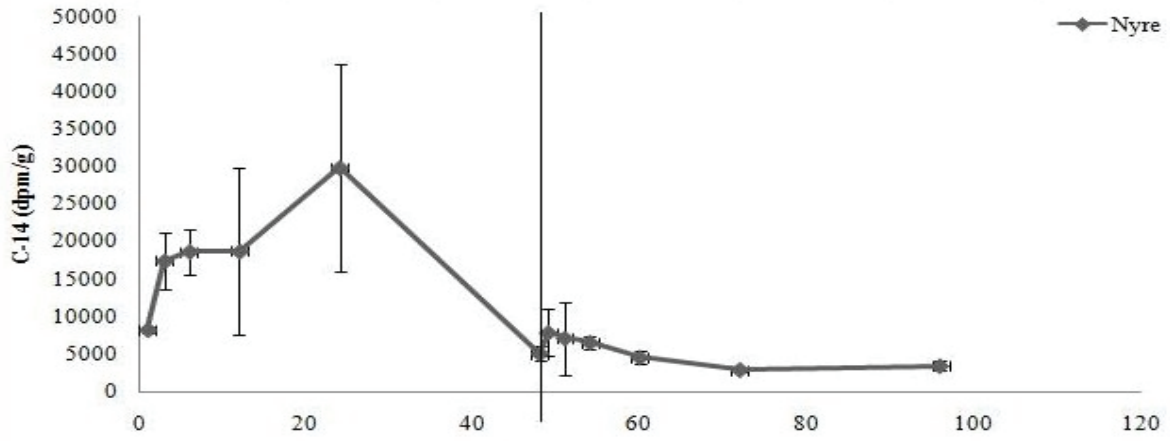
Eksponeringsvei for fisken i dette forsøket var via vannet. Etter 1 time var det et signifikant opptak av ^{14}C – TNT i blod, hjerne, muskel og etter 3 timer var det også et signifikant opptak i gjelle, lever og mage. Etter 24 timer var det opptak i alle organer unntatt galle og tarm men etter 48 timers eksponering var det et signifikant opptak i alle 10 organene (tabell6). Det man ikke kan si sikkert er om man har målt bare lever og nyrer siden disse organene inneholder mye blod som kan ha innvirket på måleresultatet. Ut fra figur 7 kan man se at mange organer har en økning i opptak av ^{14}C – TNT fram til 6 – 12 timer for deretter et avtagende opptak. I tarm og galle kommer denne økningen noe senere. Signifikant opptak av ^{14}C - TNT i organene blod, hjerne, muskel og gjelle etter 1 til 3 timer kan tyde på at fisken tar opp ^{14}C – TNT fra gjeller og inn i blodet før utskillelse til tarm. Det kan også virke som om opptaket over gjellene reduseres eller stabiliseres til tross for at fisken fortsatt eksponeres og at halveringstiden er relativt kort. Det at fisken raskt tar opp TNT samsvarer med tidligere eksponeringsstudier (Ownby, D. R *et al.* 2005; Yoo *et al.* 2006) som også rapporterer at ^{14}C – TNT raskt blir tatt opp i fiske vev.

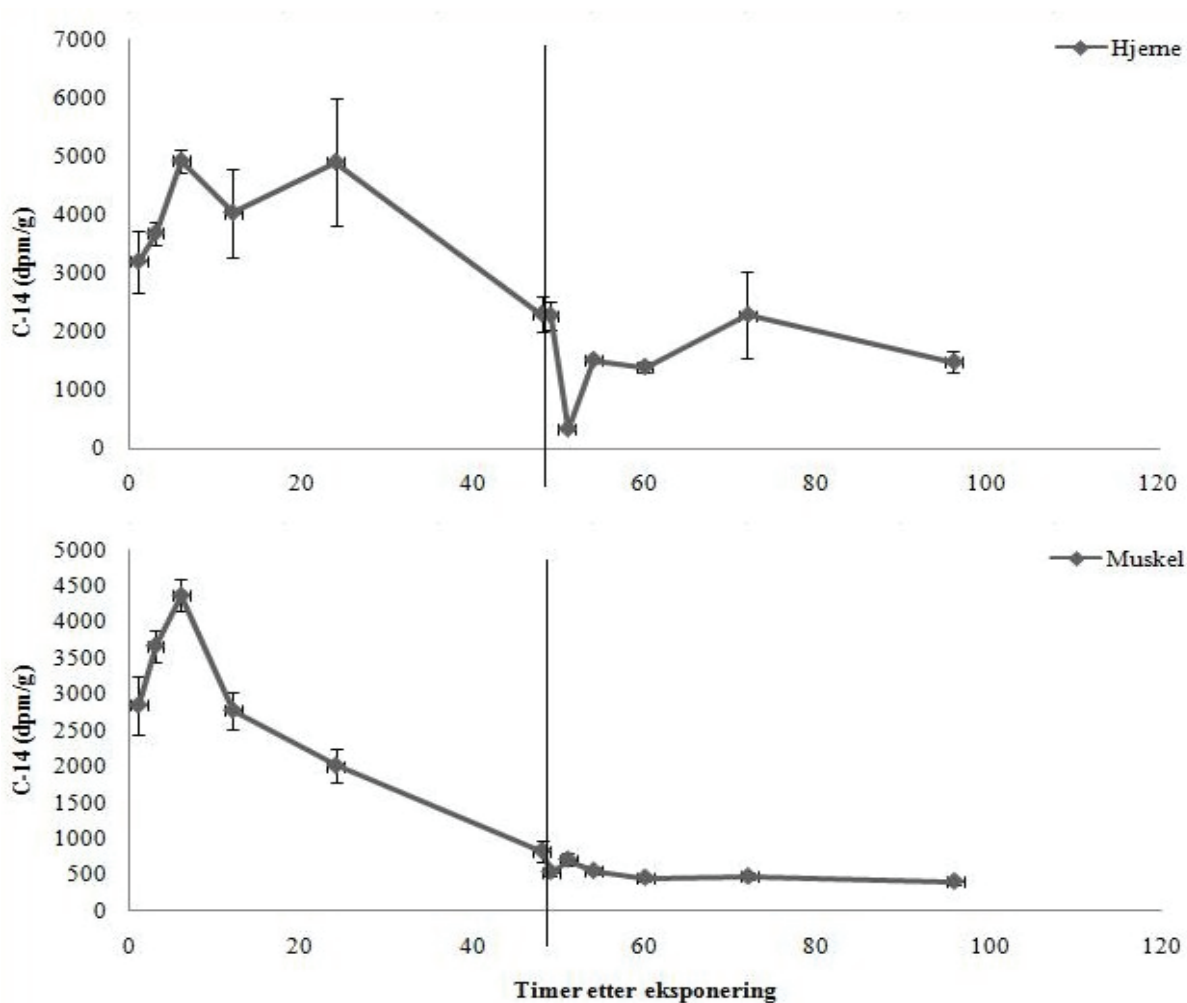
Tabell 6: P-verdier fra ANOVA GLM med post hoc Tukey test mellom kontrollgruppe og prøvetidspunkter. Signifikant forskjellige verdier er uthevet.

Organ	k - 1 t	k - 3 t	k - 6 t	k - 12 t	k - 24 t	k - 48 t	1 t - 48 t
Blod	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,00
Gjelle	0,236	0,031	0,004	0,275	0,045	0,589	0,983
Galle	1,00	0,999	0,999	0,988	0,834	0,000	0,000
Lever	0,071	0,016	0,000	0,000	0,032	0,004	0,863
Nyre	0,857	0,082	0,040	0,289	0,080	0,987	0,996
Milt	0,529	0,051	0,000	0,019	0,000	0,007	0,041
Mage	0,855	0,047	0,001	0,069	0,000	0,004	0,058
Tarm	0,999	0,997	0,906	0,006	0,605	0,028	0,055
Hjerne	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,539
Muskel	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,371	0,000

Under eksponeringsperioden var det variasjoner i ^{14}C – TNT aktivitet i de forskjellige organene. Denne variasjonen kan skyldes at det er tatt ut relativt lite vev per prøve slik at dette kan ha påvirket mengde målt radioaktivitet per gram. Det kan også skyldes tilfeldigheter og feil i prøvetakingen.

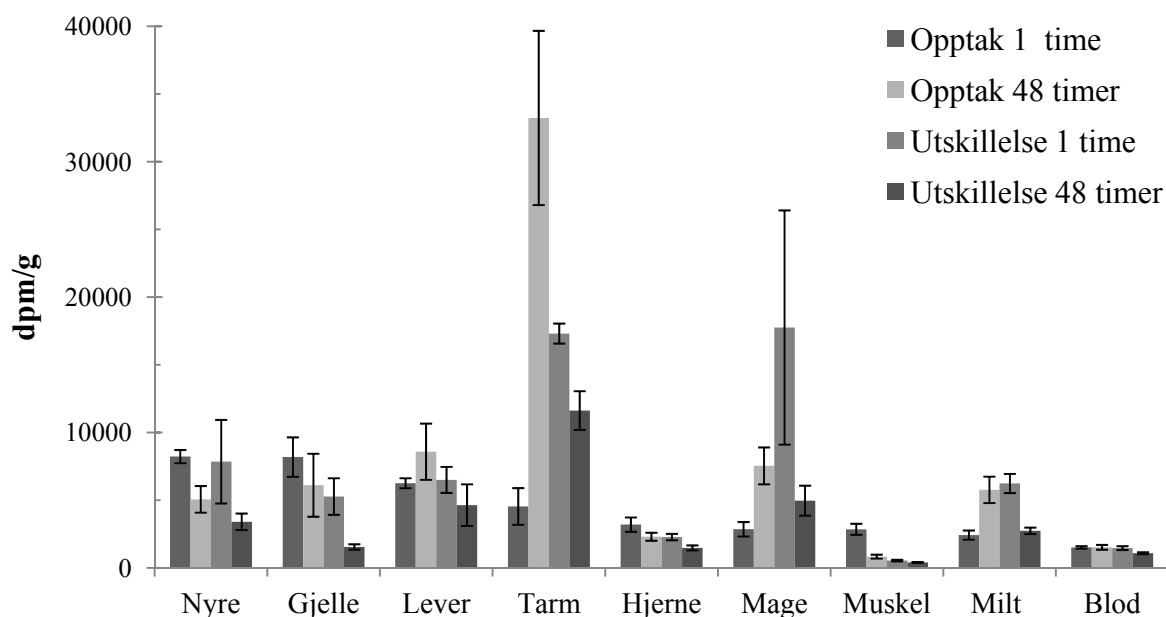






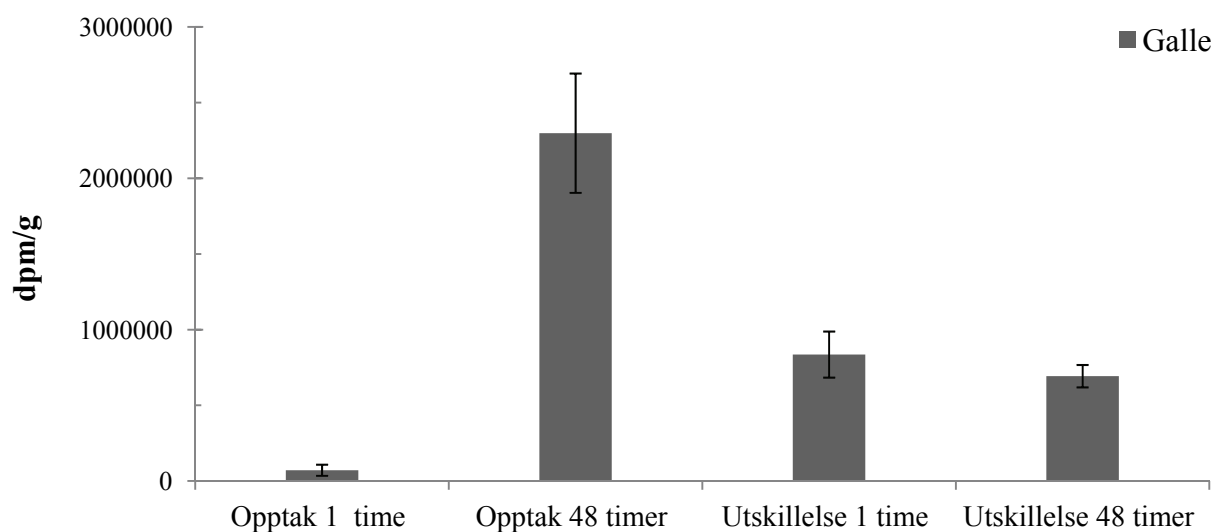
Figur 7: Aktiviteten av ^{14}C merket TNT gitt som dpm C-14/g \pm standard feil organ som funksjon av tid, under opptak og utskillelse i organene blod, gjelle, galle, lever, nyre, milt, mage, tarm, hjerne og muskel. Vertikalstrek skiller opptak og utskillelses periode.

Fra 1 time til 48 timers eksponering var det en signifikant økning i galle og milt (figur 8 og 9). Dette tyder på at ^{14}C - TNT sirkulerer og oppkonsentrerer seg i disse organene som kan være en forbindelse med ekskresjon og utskillelse av TNT i organismen, mens den avtagende aktiviteten i muskel skyldes at det mest sannsynlig ikke skjer noen opphopning av ^{14}C - TNT i muskelvev.



Figur 8: Gjennomsnittlig aktivitet av ¹⁴C- TNT gitt som dpm pr gram organ under opptak og utskillelses periode med standardfeil.

Galle ble satt i egen figur på grunn av mye høyere verdier enn de andre organene.



Figur 9: Gjennomsnittlig aktivitet av ¹⁴C- TNT gitt som dpm pr gram galle under opptak og utskillelses periode med standardfeil.

Aktiviteten i galle økte signifikant fra 1 time til 48 timer (se figur 9 og tabell 6) og aktiviteten var etter 48 timer en faktor 32 ganger høyere enn etter 1 times opptak (vedlegg 2). Vi kan ikke si noe om aktiviteten i galle ville ha blitt høyere eller lavere ved en lengre opptaksperiode siden opptaket i denne studien ble avsluttet etter 48 timer. Galle hadde en aktivitets faktor på 8,7 ganger høyere enn nyre og gjelle som hadde nest høyest aktivitet etter 1 time. Etter 48 timers opptak var aktiviteten i galle 69 ganger høyere en tarm og 268 ganger høyere enn lever

og 305 ganger høyere enn mage som var de organene som hadde nest høyest aktivitet etter 48 timers opptak. Det var galle og tarm som hadde høyest aktivitet i opptaksperioden noe som bekrefter at ^{14}C - TNT oppkonsentreres i disse organene (figur 7, 8, 9 og vedlegg 2).

Det at galle og tarm, og spesielt galle, har mye høyere aktivitet enn de andre organene, kan skyldes at det skjer en aktiv fjerning av TNT fra lever til galle før galle deretter tømmes i tarm og at 95 % av gallesaltene blir reabsorbent i tarmen og returnert til leveren. Dette kan tyde på at gallesalter som taurin kan ha egenskaper som binder ^{14}C - TNT og dens metabolitter.

4.3.2 Utskillelse av ^{14}C - merket TNT

Under utskillelsesperioden var det kun en signifikant forskjell i organene milt, mage og hjerne. Milt hadde en økning av ^{14}C - TNT fra 3 timer til 6 timer deretter en nedgang mot 48 timer. For mage var det en signifikant økning fra 1 time til 3 timers utskillelse og for hjerne var det en signifikant nedgang fra 1 time til 3 timer og deretter en økning mot 24 timer før ^{14}C - TNT aktivitet gikk signifikant ned (figur 7).

Fra 48 timers opptak til 48 timers utskillelse var det kun signifikant nedgang av ^{14}C - TNT i organene hjerne og tarm, som tyder på at det tar lengre tid enn 48 timer for utskillelse av ^{14}C - TNT i 8 av 10 organ i Atlantisk laks (*Salmo salar*), men det kan tyde på at organer som når maks aktivitet etter 6, 12 og 24 timer får en utskillelsesperiode før en økning av ^{14}C - TNT (figur 7). Det kan tyde på at utskillelsen av ^{14}C - TNT skjer i to faser for organene tarm og hjerne da det er en signifikant rask utskillelse etter 3 timer og deretter en utskillelse igjen etter 48 timer (tabell 7).

Tabell 7: P-verdier fra ANOVA GLM med post hoc Tukey test mellom 48 timers opptak og prøvetidspunkter. Signifikant forskjellige verdier er uthevet.

Organ	48 t opp – 1 t ut	48 t opp – 3 t ut	48 t opp – 6 t ut	48 t opp - 12 t ut	48 t opp - 24 t ut	48 t opp - 48 t ut
Blod	0,982	0,455	0,603	0,973	0,998	0,788
Gjelle	1,000	0,140	0,408	0,514	0,925	0,323
Galle	0,153	1,000	0,128	0,233	0,549	0,316
Lever	0,670	0,054	0,417	0,558	0,590	0,694
Nyre	0,986	0,981	0,997	1,000	0,999	1,000
Milt	1,000	0,458	0,736	0,944	1,000	0,388
Mage	0,789	0,430	0,992	0,989	0,780	0,900
Tarm	0,137	0,004	0,173	0,293	0,196	0,048
Hjerne	1,000	0,000	0,343	0,136	1,000	0,001
Muskel	0,438	0,962	0,563	0,094	0,177	0,078

Ut fra figur 7 ser man at enkelte organer etter noen timer når maks aktivitet og flater deretter ut. Dette kan tyde på at ^{14}C – TNT sirkulerer i enkelte organer og at det tar lengre tid enn 48 timer før enkelte organer har kvittet seg med all ^{14}C – TNT (tabell 7). Dette er tydelig for lever som når en maks aktivitet etter 6 timer og nyre etter 3 timer samt mage etter 24 timer med en gjennomsnittlig aktivitet på 5000 dpm per gram organ (figur 7 og vedlegg 2).

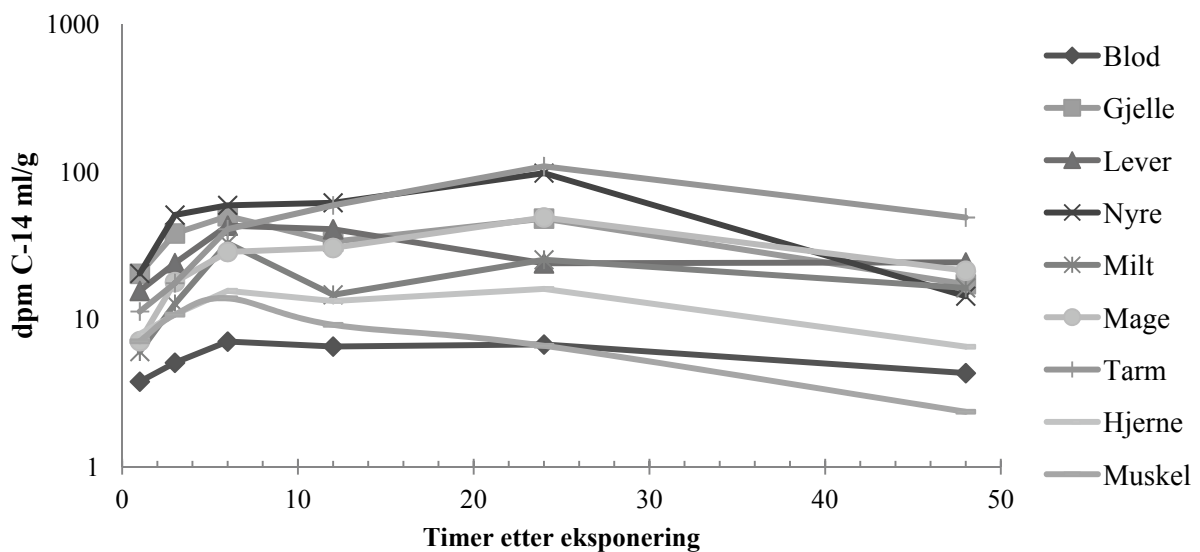
^{14}C – TNT blir transportert med blod og ulike enzymer til lever fra andre organene og videre derfra til galle og tarm. Både lever og galle er viktig for fordøyelse og lever er et utsatt organ for toksisk påvirkning da lever inneholder høye konsentrasjoner av metaboliserende enzymer og metabolsk aktiviteter. Kjemiske stoffer i lever vil kunne metaboliseres til vannløselige forbindelser i leveren, og skilles ut i tynntarmen via gallen og blir konsentrert opp til høye verdier. Siden blod har en relativ konstant aktivitet under eksponeringen av ^{14}C – TNT kan det være at det er vannløselige forbindelser av TNT som går over i blodet i vannløselig form og filtreres gjennom nyrene der nyrene skiller ut vannløselige sluttprodukter fra metabolisme. Galle inngår i mange funksjoner som absorpsjon av lipider, nøytralisering av syrer fra magen og absorpsjon av giftige stoffer som for eksempel ^{14}C – TNT som blir ført tilbake gjennom gallekanalen til tarmen og deretter skilt ut med tarminnholdet. Det at tarm måler en maks aktivitet etter 24 timer med en gjennomsnittlig aktivitet på 10000 dpm per gram organ (vedlegg 2) tyder på at ^{14}C – TNT blir konsentrert og skilt ut via tarmen. Konjugerte forbindelser kan imidlertid spaltes av mikroorganismer i tynntarmen, og dersom den forbindelsen som frigjøres er tilstrekkelig fettløselig kan den igjen absorberes av tynntarmen, og bli transportert tilbake til leveren der stoffet på nytt blir konjugert og skilt ut i tynntarmen. På denne måten elimineres enkelte kjemiske stoffer langsommere fra organismen og dersom de er giftige vil skadevirkningene øke (Casarett *et al.* 1986).

Aktiviteten er lavest i organer som gjelle og muskel etter 48 timers utskillelse noe som betyr at ^{14}C – TNT skilles raskest ut i disse organene. Muskel måler maks aktivitet etter 1 times utskillelse (figur 7) med en gjennomsnittlig aktivitet på 500 dpm per gram muskelvev. De øvrige organene har fortsatt høye telletall som tyder på at det er mye ^{14}C – TNT igjen i organene. Galle og tarm er de organene med høyest aktivitet av ^{14}C – TNT etter 48 timers utskillelse (vedlegg 2 og figur 7). Det at blod og hjerne har likt forløp i utskillelisesperioden kan tyde på at blod transporterer ^{14}C – TNT ut til hjernen slik at ^{14}C – TNT kan trenge gjennom blodhjerne barrieren eller at man ikke har klart å dissekert ut bare hjernevev slik at det har fulgt med blodrester som har blitt målt.

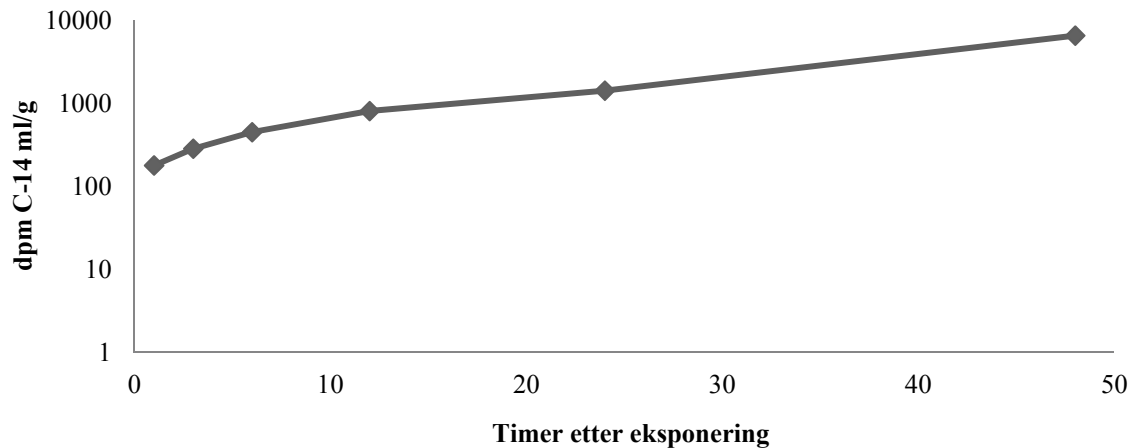
Det at aktiviteten endrer seg i organene ved ulik tidspunkt viser hvordan ^{14}C – TNT distribueres i fisken og utskillelse skjer via fordøyelsesprosesser. Disse resultatene skiller seg fra en tidligere studie av ulike vevsprøver fra fisken (*Pimephales promelas*) som antyder at utskillelse av total ^{14}C - TNT er ute etter 1,5 time og at etter 6 timer er det ingen målbar aktivitet igjen (Yoo *et al.* 2006).

4.4 Biokonsentrasjon TNT

Biokonsentrasjonsfaktoren for de 10 organene er vist som log konsentrasjon som funksjon av eksponeringstid (figur 10 og figur 11). Konsentrasjonen av ^{14}C – TNT i vannet var relativt konstant og BCF økte eksponentielt fra 1 time til 6 timers eksponering før aktiviteten flater ut i organene blod, gjelle, lever, milt, hjerne og muskel, mens BCF fortsatte å øke fram til 24 timers eksponering for organene tarm, mage og nyre før aktiviteten flater ut (figur 10). Ut fra figur 10 og figur 11 kan man se at galle skiller seg ut med de høyest BCF og blod og muskel med de lavest BCF.



Figur 10: BCF gitt som log konsentrasjon, dpm C-14 ml/g som funksjon av tid for organene blod, gjelle, lever, nyre, milt, mage, tarm, hjerne og muskel.



Figur 11: BCF gitt som log konsentrasjon, dpm C-14 ml/g som funksjon av tid for galle.

Det finnes lite litteratur på BCF av TNT for hvert enkelt organ, men en tidligere studie viser at hovedmolekylet til TNT blir i størst grad biokonsentrert i gjellene mens total TNT aktivitet er høyest i de indre organene med en BCF på 10,5 L/kg hos arten (*Ictalurus punctatus*) (Ownby, D. R *et al.* 2005). Andre studier rapporterer en BCF på 338 L/kg i indre organer og 9,5 L/kg i muskelvev i arten (*Lepomis macrochirus*) (Liu *et al.* 1983) og 9,5 L/kg totalt i hele kroppen til arten (*Cyprinodon variegatus*) (Lotufo & Lydy 2005). En studie av Lotufo (2011) rapporterer med arten (*Cyprinodon variegatus*) en gjennomsnittlig BCF på 707,7 L/kg i lever, 106,6 L/kg i indre organer, 33,2 L/kg i gjeller og 51,3 L/kg totalt for hele fisken etter opptak av ^{14}C – TNT. Disse studiene har benyttet forskjellige fiske arter og forskjellige vannkvaliteter samt forskjellige prøvetakingstidspunkter enn hva det har blitt gjort i denne studien, men resultater i denne studien av lever viser et gjennomsnitt på 670,7 ml/g og gjelle med 35 ml/g som samsvarer bra med studien til Lotufo (2011), mens resten av organene som inngår som indre organer er mye høyere i denne studien enn det tidligere forskning viser da galle viser veldig høy BCF.

Tidligere studie indikerer at en BCF likevekt inntreffer for hele organismen etter 4 timer (Ownby, D. R *et al.* 2005) men i denne studien kan man se at enkelte organer ikke når likevekt før etter 6 timer og 24 timer (figur 9). Trenden i tidligere studier er at BCF er høyest i indre organer noe som man også kan se i dette studiet. Man ser at total TNT akkumulerer raskt, og mest i de indre organene. Det tyder på at det er indre organer som er primær målet for TNT metabolisme og toksisitet.

4.5 Multivariat analyse

4.5.1 Opptaks periode

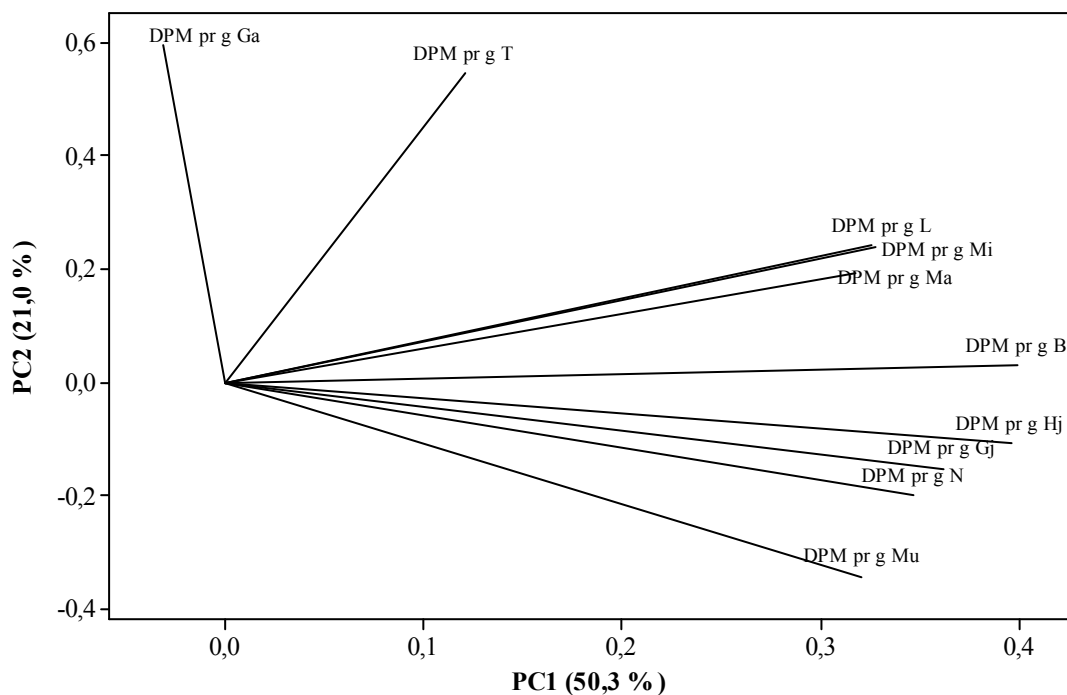
For å se sammenhenger i opptak mellom organ og tid ble et PCA plot utarbeidet. I følge egenverdiene (Tabell 9) kan 71,3 % av variansen i datasettet forklares ut fra PC1 og PC2, der PC1 alene beskriver 50,3 % av variansen. De resterende prinsipalkomponentene forklarer en så liten del av variansen at de ikke vil bli diskutert her.

Tabell 9: Egenverdier og varians fra PCA.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Eigenvalue	5,0333	2,0985	0,9630	0,6002	0,4235	0,2979	0,2442	0,1771	0,0927	0,0695
Proportion	0,5030	0,2100	0,0960	0,0600	0,0420	0,0300	0,0240	0,0180	0,0090	0,0070
Cumulative	0,5030	0,7130	0,8090	0,8700	0,9120	0,9420	0,9660	0,9840	0,9930	1,0000

Variabler med høye absoluttverdier har mest å si for prinsipalkomponenten og PC1 akse er mer betydningsfull enn PC2 akse. Det at 8 av 10 organer ligger samlet rundt PC1 tyder på at disse organene gjør et raskt opptak og det kan være en sammenheng mellom blod og gjelle som kan tyde på at ^{14}C - TNT blir tatt opp via gjellene og inn i blodet og man kan anta at blod transporterer ^{14}C - TNT ut til organene i fisken. For PC2 er galle og tarm de mest dominerende variablene.

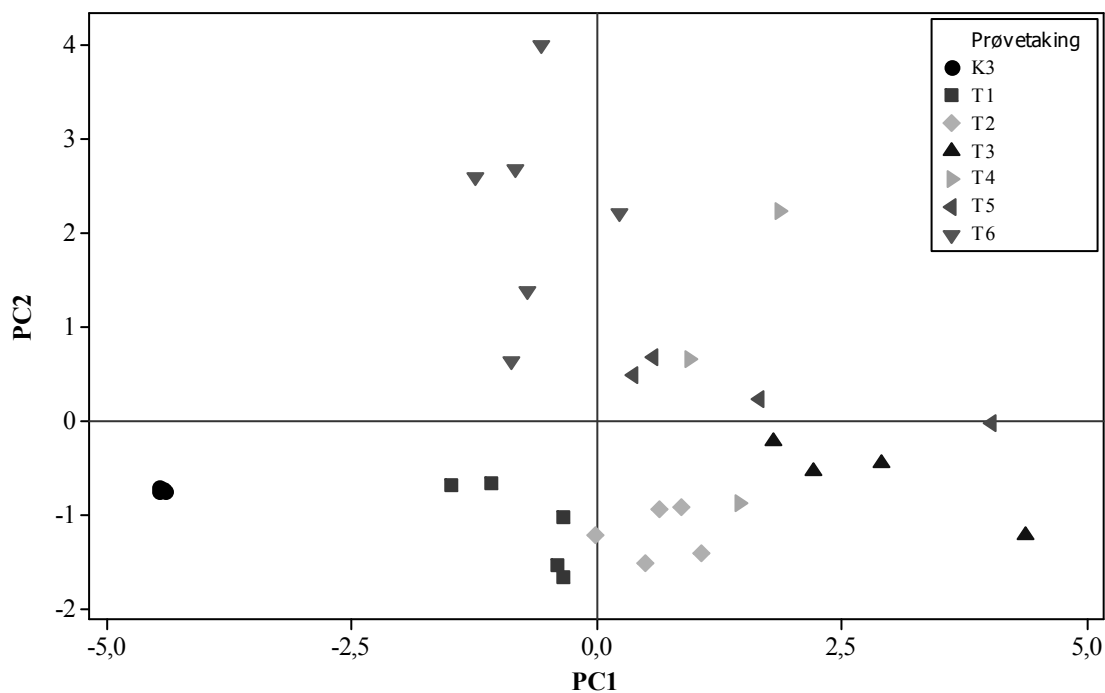
Ved å plote loadingene til PC1 og PC2 mot hverandre (Figur 12), sammen med Pearson produkt-moment test, skapes det et bilde på hvilke variabler som er positivt korrelert med hverandre og hvilke variable som er negativt korrelert med hverandre. Variabler som går i motsatt retning er negativt korrelert, og variabler som går i samme retning er positivt korrelerte. Ut fra (figur 12 og vedlegg 4) kan man se at alle organer følger samme opptaksmønster, bortsett fra galle og tarm.



Figur 12: Loading plot for variablene til PCA opptak. DPM per gram organ er total ^{14}C – merket TNT under opptaksperioden.

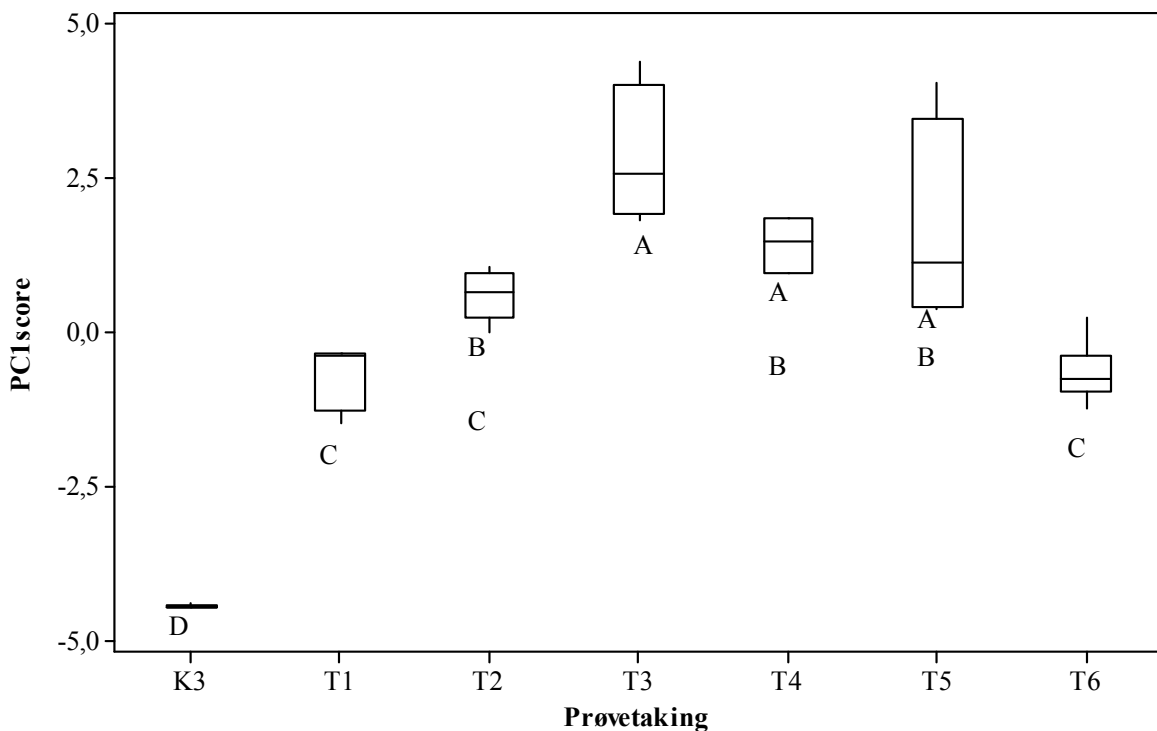
Pearson produkt-moment test av samtlige organer sier noe om det er korrelasjoner og signifikans mellom organene når det gjelder opptak av ^{14}C – TNT og ut fra dette kan man se sammenhenger mellom organer når det gjelder opptak. Trenden er at galle og tarm skiller seg ut (figur 12 og vedlegg 4) for hvilke organer som korrelerer og er signifikante i forhold til hverandre. For nærmere korrelasjonsfaktorer og p- verdier (vedlegg 4).

Dette tyder på at ^{14}C – TNT kommer inn via gjellene. Det at blod er signifikant og korrelerer med alle organer unntatt galle og tarm tyder på at ^{14}C – TNT blir transportert via blodbanen. Det at blod korrelerer med hjerne kan også tyde på at ^{14}C – TNT trenger inn i blod - hjerne barrieren eller at man ikke har klart å måle kun hjernevev men også rester av blod. Det er tydelig at galle og tarm skiller seg ut både (figur 12) ved korrelasjoner samt p- verdier i forhold til signifikans (vedlegg 4). Tarm korrelerer og er signifikant med galle og lever som viser at disse organene henger sammen når det gjelder funksjon og at det oppstår en opphopning av ^{14}C – TNT i disse organene, noe som tyder på en sirkulasjon. Man kan bare si at det skjer en oppkonsentrasjon av ^{14}C – TNT i disse organene under opptaksperioden slik at disse organene måler mye høyere telletall enn de utenomliggende organene og ikke hvordan og hvilke mekanismer som virker.



Figur 13: PCA score plot av prøvetakings tidspunkter orientert i henhold til PC1 og PC2. Totalt er 71,3 % av variansen mellom prøver forklart: PC1 = 50,3 % og PC2 = 21 %. K3 er kontrollgruppe. T1 = 1 time, T2 = 3 timer, T3 = 6 timer, T4 = 12 timer, T5 = 24 timer og T6 = 48 timer. N varierer fra 3 til 5.

Figur 13 viser prøvetakingstidspunkt for de 10 organene som ble prøvetatt. Kontrollgruppen (K3) ligger helt ut til venstre mot PC1. Ut fra prøvetakingstidspunktene T1, T2 og T3 som beveger seg langs PC1 akse mot høyre kan tyde på at aktiviteten er stigende for hvert tidspunkt og at etter 6 timer er aktivitet høyest. T4, T5 og T6 som ligger til høyre beveger seg noe tilbake og opp langs PC2 som tyder på at aktivitet av ^{14}C - TNT sirkulerer i fisken.



Figur 14: Boksplot av PC1 mot prøvetakingstidspunkt for opptak. Boksplottene viser grafisk framstilling av minste og største observasjon, median, nedre og øvre kvartil (henholdsvis 25 % og 75 %) for PCA score vist i Fig 13. Signifikante forskjeller er testet med Tukey All Pairs, og er merket med ulike bokstaver.

Boksplottet (figur 14) viser kontrollgruppe og prøvetidspunkt der aktiviteten i organene øker mot T3 = 6 timer før aktiviteten går ned. Til senere forskning er 6 til 12 timer opptak tilstrekkelig for lignende forsøk for de fleste organer men at tarm og galle ikke viste signifikant opptak før etter 48 timer.

General Lineær Model viser om det er signifikans mellom prøvetakningstiden med Tukey All Pairs test og illustreres med ulike bokstaver. Det er en klar signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og prøvetakningsgruppene som tyder på at det ikke har forekommet noen forurensinger fra eksponeringskaret under eksperimentet (figur 14). Det er en signifikant forskjell mellom 1 time og 6 timers opptak ($p=0,000$) som tyder på økende opptak. Etter 6 timer går opptaket signifikant ned mot 48 timer.

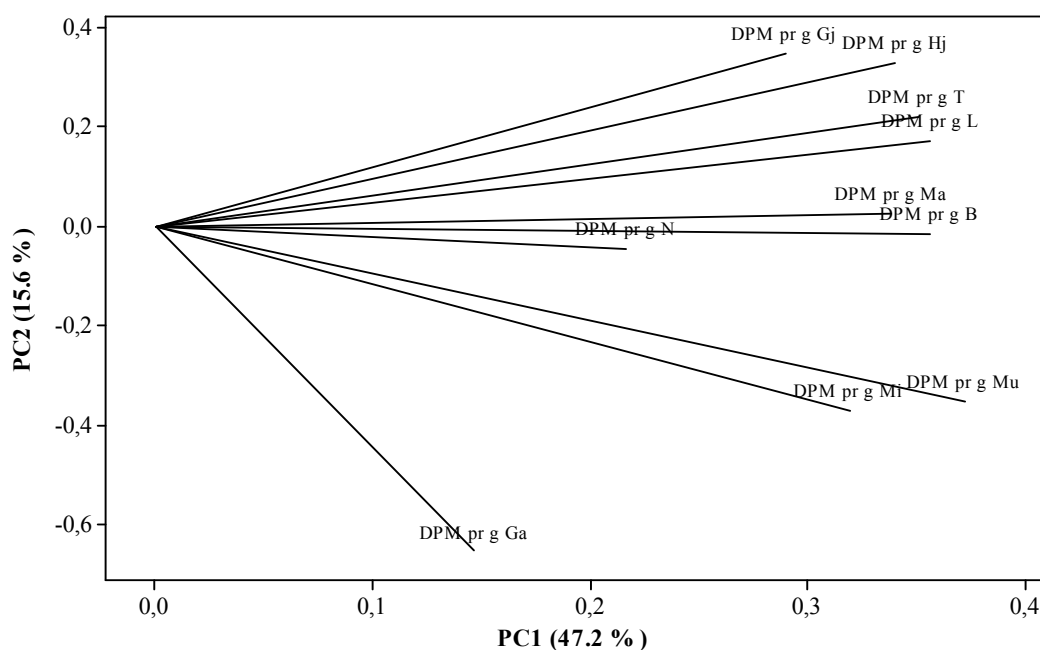
4.5.2 Utskillelse periode

I følge egenverdiene (Tabell 10) kan 62,8 % av variansen i datasettet forklares ut fra PC1 og PC2, der PC1 alene beskriver 47,2 % av variansen. De resterende prinsipalkomponentene forklarer en så liten del av variansen at de ikke vil bli diskutert her.

Tabell 10: Egenverdier og varians fra PCA.

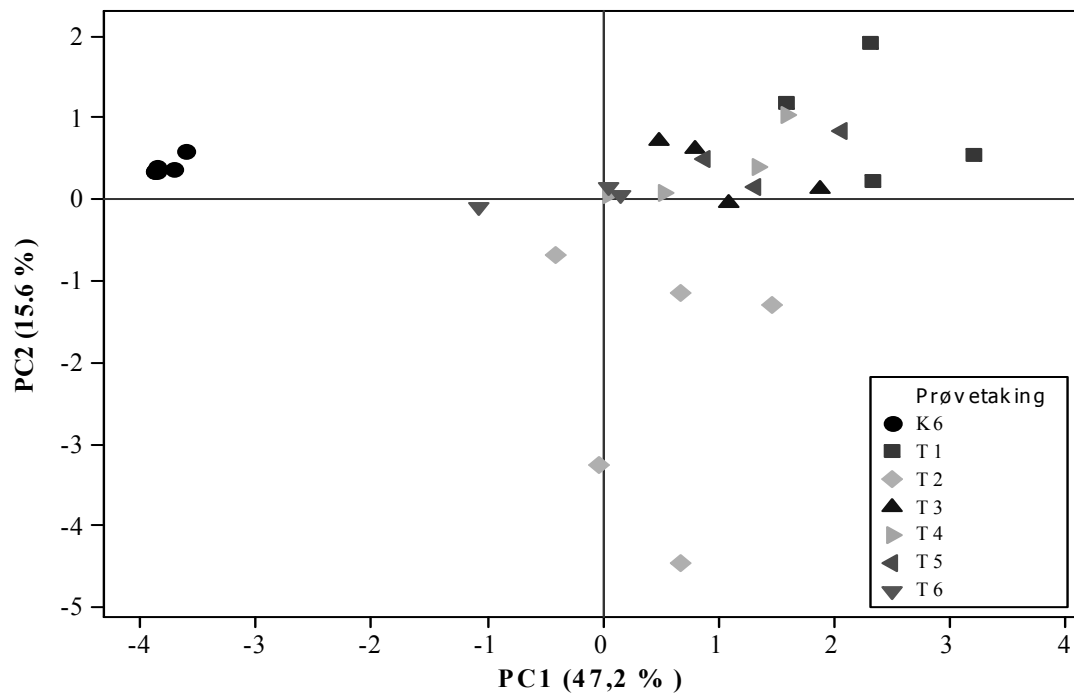
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Eigenvalue	4,7195	1,5568	0,9545	0,7223	0,6414	0,4496	0,3568	0,2813	0,1781	0,1396
Proportion	0,472	0,156	0,095	0,072	0,072	0,045	0,036	0,028	0,018	0,0140
Cumulative	0,472	0,628	0,723	0,795	0,795	0,904	0,94	0,968	0,986	1,0000

Høye absoluttverdier har mest å si for prinsipalkomponenten. Positiv eller negativ verdi på loadingen sier noe om hvordan variablene forholder seg til hverandre og til prinsipalkomponentene. Alle 10 organene forholder seg positivt og er omtrent like i forhold til hverandre og PC1. Organene blod, galle, nyre, milt og muskel forholder seg negativt til PC2. Dette tyder på at det fortsatt er høyere aktivitet av ^{14}C – TNT i disse organene, spesielt galle (figur 15 og vedlegg 2). Også i dette loading plottet skiller galle seg ut med lavest loading verdi i PC1 og høyest verdi i PC2, som tyder på at det er mye høyere aktivitet i galle enn i de andre under utskillelsesperioden (figur 15).

**Figur 15:** Loading plot for variablene til PCA opptak. DPM per gram organ er total ^{14}C – merket TNT under utskillelsesperioden.

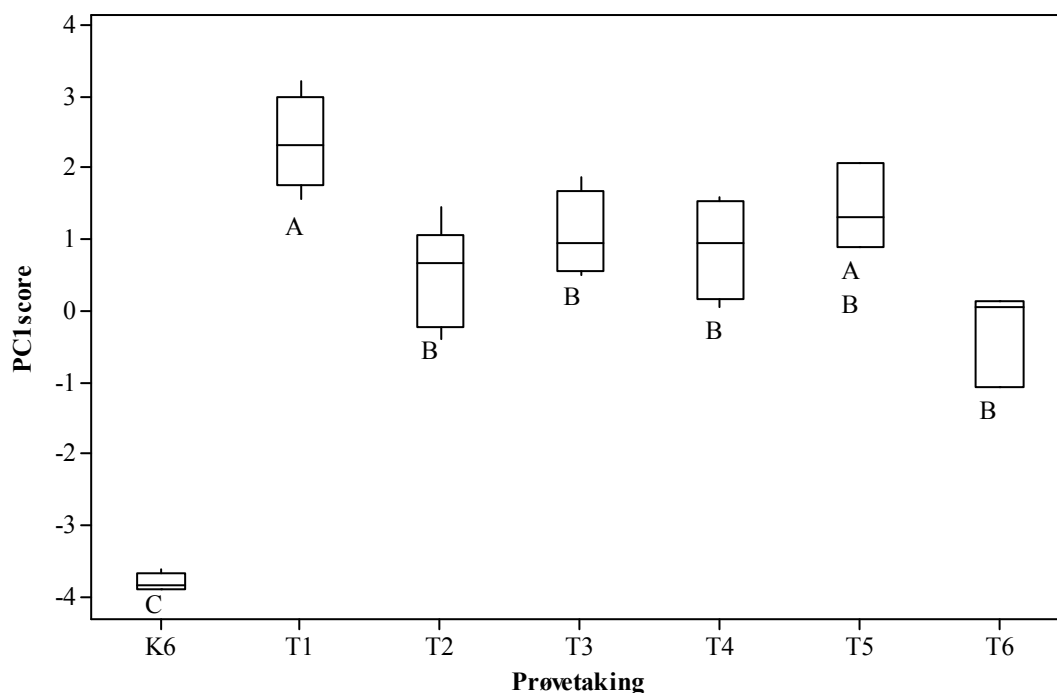
Pearson produkt - moment test av samtlige organer sier noe om det er korrelasjoner og signifikans mellom organene når det gjelder utskillelse av ^{14}C – TNT. Blod er ikke korrelert eller signifikant med noen av organene under utskillelsesperioden, men gjelle korrelerer og er signifikant med hjerne. Det kan tyde på at hjerne og gjelle skiller ut ^{14}C – TNT raskest da det

ikke hopes opp i disse organene, men blir transportert videre via blod. Galle korrelerer og er signifikant med muskel og milt (figur 15). Lever korrelerer og er signifikant med mage, tarm og hjerne. Nyre korrelerer og er signifikant med lever, og milt korrelerer og er signifikant med galle og muskel. Mage korrelerer og er signifikant med hjerne og lever, mens lever korrelerer og er signifikant med hjerne. Hjerne korrelerer og er signifikant med tarm, gjelle og lever, samt muskel korrelerer og er signifikant med milt og galle (vedlegg 4).



Figur 16: PCA score plot av prøvetakings tidspunkter orientert i henhold til PC1 og PC2 for utskillelse. Totalt er 62,8 % av variansen mellom prøver forklart: PC1 = 47,2 % og PC2 = 15,6 %. K3 er kontrollgruppe. T1 = 1 time, T2 = 3 timer, T3 = 6 timer, T4 = 12 timer, T5 = 24 timer og T6 = 48 timer. N varierer fra 3 til 5.

Kontrollgruppen ligger helt ut til venstre og man kan se at opptaksgruppene T1, T3, T4, T5, fordeler seg langs PC1 akse der 1 time ligger helt til høyre med høyest aktivitet. T2 skiller seg ut med å ligge langs PC2, som kan bety at ^{14}C – TNT rett etter overførsel til rent vann går noe ned (figur 16). De andre prøvetakingstidspunktene ligger samlet langs PC1 med en liten bevegelse mot høyre, som tyder på at utskillelse tar lengre tid enn opptak.



Figur 17: ANOVA på PC1 mot prøvetakingstidspunkt for utskillelse. Boksplottene viser grafisk framstilling av minste og største observasjon, median, nedre og øvre kvartil (henholdsvis 25 % og 75 %). Signifikante forskjeller er testet med Tukey All Pairs, og er merket med ulike bokstaver. Benevnning for y-aksen er hovedsakelig dpm per gram.

Kontrollgruppen er signifikant forskjellig fra alle prøvetagningstidene som viser at det ikke er noe aktivitet av ^{14}C – TNT. Tid 1 er signifikant forskjellig fra tid T2, T3, T4 og T6 som viser at aktiviteten er noe lavere enn ved tid T1, men at aktiviteten ikke går noe ned fra m til T5. T5 er derimot signifikant forskjellig fra T6 som tyder på at aktiviteten er lavere (figur 17).

5 Konklusjon

Atlantisk laks (*Salmo salar*) ble eksponert for ^{14}C - TNT i et ione fattig Norsk råvann. Resultatene viste at TNT raskt blir tatt opp i alle organer og at tarm og galle var de organene som målte høyest aktivitet av ^{14}C - TNT. BCF varierte mellom 2 og 6516 dpm C – 14 ml/g, der galle viste høyest BCF på 6516 dpm C – 14 ml/g etter 48 timers opptak.

Multivariate statistisk analyse viste at blod korrelerte med alle organene i opptaksperioden noe som tyder på at ^{14}C - TNT kommer inn via gjellene og inn i blodbanen som transporterer ^{14}C - TNT til alle organene. Det indikerer at blod er distribusjonsorganet for ^{14}C - TNT i laks, men man kan ikke sikkert si at man har målt kun lever og nyre siden disse organene inneholder mye blod som kan gi unøyaktige måleresultater.

Under utskillellesperioden avtok konsentrasjonen raskest i tarm og hjerne, mens i de andre organene var det ingen signifikant nedgang under perioden. Dette indikerer at den biologiske halveringstiden kan være lengre enn vist i tidligere studier.

Multivariate statistisk analyse viste at under utskillelsen var det galle som skilte seg ut fra de andre organene med mye høyere verdier av ^{14}C – TNT og i følge figur 17 så får aktiviteten av ^{14}C – TNT en nedgang etter 3 timer og mot 48 timer som kan antyde at det er to utskillelles faser.

Forslag til videre arbeid er å gjøre flere forsøk med flere replikaer der man kjører en lengre utskillelles periode. Dette for å se om organene oppnår likevekt og for å se hvor lang tid det tar før ^{14}C - TNT er helt utskilt av alle organer. Opptakstiden trenger ikke å være lengre enn 6 til 12 timer da mange organer når en maks aktivitet av ^{14}C - TNT allerede da men etter 48 timer viser alle organer et signifikant opptak av ^{14}C - TNT.

I denne studien har man kun fokusert på opptak og utskillelse av total TNT. For videre forskning kan man se på hvilke metabolismeprodukter av TNT som blir tatt opp og transportert i de ulike organene da spesielt i galle da det er en opphopning av ^{14}C – TNT i gallen. Dette kan muligens skyldes en aktiv fjerning av TNT fra leveren til galle før gallen tømmes deretter i tarmen. Er det for eksempel ADNT, morsstoffet eller konjugert TNT via et eller annet fase II enzymssystem som bidrar til at TNT blir transportert i organismen, og hvilke enzymer, aminosyrer og gallesalter som fører til at TNT sirkulerer i organer som tarm, lever og galle. Det at man målte ^{14}C – TNT aktivitet i hjernen må undersøkes nærmere da det kunne ha vært blodrester som inneholdt ^{14}C – TNT som ble målt og ikke selve hjernestrukturen, hvis ikke se på hvordan ^{14}C – TNT da kunne ha trengt gjennom blod - hjerne barrieren. Det som også er interessant er å se hvilke effekter TNT og dets metabolitter vil ha på de ulike organene og hvilke konsentrasjoner som vil utgjøre kroniske og akutte effekter på ulike fiske arter som kan være i fare for å bli eksponert for TNT og hvordan fiskens forsvarmekanismer iverksetter tiltak mot miljøgiften i de vitale organer.

7 Litteraturliste

- Alavi, G., Chung, M., Lichwa, J., D'Alessio, M. & Ray, C. (2011). The fate and transport of RDX, HMX, TNT and DNT in the volcanic soils of Hawaii: A laboratory and modeling study. *Journal of Hazardous Materials*, 185 (2-3): 1600-1604.
- Ampleman, G., Thiboutot, S., Gagnon, A., Marols, A., Martel, R. & Lefebvre, R. (1998). Study of the impacts of ob/ od activity on soils and groundwater at the destruction area in fca dundurn. *Research and development branch department of national defence Canada*, DREV-R9827.
- Belden, J. B., Ownby, D. R., Lotufo, G. R. & Lydy, M. J. (2005). Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 2 - Bioconcentration in aquatic invertebrates and potential for trophic transfer to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 58 (9): 1161-1168.
- Casarett, L., Doull, J., Klaassen, D. C. & Amdur, M. O. (1986). *Toxicology: The Basic Science of Poisons* 3th edition, McGraw-Hill, NY.
- Choppin, G. R., Liljenzin, J. O. & Rydberg, J. (2002). *Radiochemistry and nuclear chemistry*. [Oxford]: Butterworth-Heinemann. 709 s. s.
- Conder, J. M., La Point, T. W. & Bowen, A. T. (2004). Preliminary kinetics and metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene and its reduced metabolites in an aquatic oligochaete. *Aquatic Toxicology*, 69 (3): 199-213.
- Dave, G., Nilsson, E. & Wernersson, A. S. (2000). Sediment and water phase toxicity and UV-activation of six chemicals used in military explosives. *Elsevier Science, Aquatic Ecosystem Health and Management* 3 (2000): 291-299.
- Department of the US Army. (1984). Military Explosives. *Department of the army technical manual*, TM 9-1300-214.: 349.
- Dodard, S. G., Renoux, A. Y., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S. & Sunahara, G. I. (1999). Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites. *Chemosphere*, Vol. 38, No. 9: pp. 2071-2079.
- Ek, H., Nilsson, E. & Dave, G. (2008). Effects of TNT leakage from dumped ammunition on fish and invertebrates in static brackish water systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69 (1): 104-111.
- Engen Karsrud, T., Johnsen, A., Strømseng, A., Parmer, M. P., Rossland, H. K. & Mariussen, E. (2010). Transport av eksplosiver – utlekking av eksplosiver under episode. *Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)*, FFI-rapport 2010/00431.
- Esteve - Nunez A, Caballero A & L, R. J. (2001). Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *American Society for Microbiology.*, vol 65: p. 335–352.
- Heier, L. S., Lien, I. B., Strømseng, A. E., Ljones, M., Rosseland, B. O., Tollefsen, K. E. & 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). *Science of the Total Environment*, 407 (13): 4047-4055.
- Heier, L. S., Meland, S., Ljones, M., Salbu, B. & Strømseng, A. E. (2010). Short-term temporal variations in speciation of Pb, Cu, Zn and Sb in a shooting range runoff stream. *Science of the Total Environment*, 408 (11): 2409-2417.
- Henriksen, A., Lien, L., Rosseland, B. O., Traaen, T. S. & Sevaldud, I. S. (1989). Lake acidification in Norway - present and predicted fish status. *Ambio*, 18 (6): 314-321.
- Hewitt, A. D., Jenkins, T. F., Ranney, T. A., Stark, J. A., Walsh, M. E., Taylor, S., Walsh, M. R., Lambert, D. J., Perron, N. M., Collins, C. M., *et al.* (2003). Estimates of explosives residue from the detonation og Army munitions. *U.S. Army Engineer Research and Development Center, Cold Regions Research and Engineering Laboratory, Hanover, New Hampshire, ERDC/CRREL TR-03-16*, 2003.

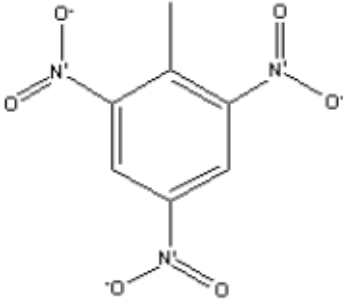
- Hewitt, A. D., Jenkins, T. F., Walsh, M. E., Walsh, M. R. & Taylor, S. (2005). RDX and TNT residues from live-fire and blow-in-place detonations. *Chemosphere*, 61 (2005) 888–894.
- Houston, J. G. & Lotufo, G. R. (2005). Dietary Exposure of Fathead Minnows to the Explosives TNT and RDX and to the Pesticide DDT using Contaminated Invertebrates. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2005, 2(2), : 286–292.
- Hovatter, P. S., Talmage, S. S., Opresko, D. M. & Ross, M. (1997). Ecotoxicity of nitroaromatics to aquatic and terrestrial species at army superfund sites. Environmental Toxicology and Risk Assessment: Modeling and Risk Assessment. (F.J. Dwyer, T.R. Doane and M.L. Hinman, Eds.) American Society for Testing and Materials., 6th: 117-129.
- Johnsen, A., Engen Karsrud, T., Rosslund, H. K., Larsen, A., Myran, A. & Kjetil Longva, K. (2008). Forurensninger av eksplosiver i Forsvarets skyte- og øvingsfelt – forundersøkelse av ulike baner med vekt på prøvetakingsmetoder. *FFI-rapport*, 2008/00535.
- Johnsen, A. & Voie, Ø. (2011). Overvåkning av tungmetallforurensning ved Forsvarets destruksjonsanlegg for ammunisjon i Lærdal kommune – resultater for 2010. *FFI-rapport* 2011/01306.
- Kaplan, D. L. & Kaplan, A. M. (1982). Thermophilic Biotransformations of 2,4,6-Trinitrotoluene Under Simulated Composting Conditions. *American Society for Microbiology*, Vol. 44, No. 3: p. 757-760.
- Krumholz, L. R., Li, J., Clarkson, W. W., Wilber, G. G. & Suflita, J. M. (1997). Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18 (2-3): 161-169.
- Lachance, B., Renoux, A. Y., Sarrazin, M., Hawari, J. & Sunahara, G. I. (2004). Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. *Chemosphere*, 55 (10): 1339-1348.
- Lewis, T. A., Newcombe, D. A. & Crawford, R. L. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management*, 70 (4): 291-307.
- Liljedahl, B. & Qvarfort, U. (1997). Dumpad ammunition i gruvskakt Dalkarsberg. En miljöriskbedömning. *Rapport FOA NBC-skydd*. 85 pp. Umeå, ADP010596.
- Liu, D. H. W., Spangford, R. J., Bailey, H. C., Javitz, H. S. & Jones, D. C. (1983). Acute Toxicity of LAP Wastewater and 2,4,6-Trinitrotoluene. *AD-A*, Final Report Volume 1 142 144.
- Lotufo, G. R. & Lydy, M. J. (2005). Comparative Toxicokinetics of Explosive Compounds in Sheepshead Minnows. *Environ. Contam Toxicol.* , 49: 206-214.
- Lotufo, G. R. (2011). Whole-body and body-part-specific bioconcentration of explosive compounds in sheepshead minnows. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (3): 301-306.
- Løvås, G. G. (2004). *Statistikk. For universiteter og høyskoler*. Universitetsforlaget, Oslo.
- Macek, A. (1961). *Sensitivity of explosives*. Atlantic Research Corporation, Alexandria, Virginia og US Naval Ordnance Laboratory, White Oak, Maryland.
- Martel, R., Robertson, T., Lewis, J., Parent, M., Ampleman, G., Thiboutot, S., Ross, M. & Clairet-Baril, G. (2006). Distribution and Fate of Energetics on DoD Test and Training Ranges. *Institut national de la Recherche Scientifique, Quebec*, INRS-ETE Report R-739, 2004.
- Ostrander, G. K. (2000). *The Laboratory Fish*. Academic Press. Bath, Somerset, GB.
- Ownby, D. R., Belden, J. B., Lotufo, G. R. & Lydy, M. J. (2005). Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 1 - Bioconcentration and distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 58: 1153-1159.

- Ownby, D. R., Belden, J. B., Lotufo, G. R. & Lydy, M. J. (2005). Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 1 - Bioconcentration and distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 58 (9): 1153-1159.
- Parmer, M. P., Engen Karsrud, T., Johnsen, J., Rosslund, H. K., Nordås, S. V., Larsen, A., Myran, A. & Voie, Ø. (2010). Tiltak på eksplosivforurensning grunn – innledende studier på laboratoriet og i felt. *FFI-rapport*, 2010/00398.
- Pennington, J. C. & Brannon, J. M. (2002). Environmental fate of explosives. *Thermochimica Acta*, 384 (1–2): 163-172.
- Ringnes, H., Reistad, T., Myhre, O., Prydz, A. P. & Longva, K. S. (2011). Forsvarssektorens miljøregnskap for 2010. *Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)*, 2011/00452.
- Ro, K. S., Venugopal, A., Adrian, D. D., Constant, D., Qaisi, K., Valsaraj, K. T., Thibodeaux, L. J. & Roy, D. (1996). Solubility of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 41 (4): 758-761.
- Robidoux, P. Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G. & Sunahara, G. I. (1999). Acute toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44 (3): 311-321.
- Rognerud, S. & Qvenild, T. (2002). Kvikksølv i fisk og næringskjedens struktur i fjellsjøer i Nord - Østerdalen. *NIVA*, 4540 - 2002.
- Rognerud, S. (2011). Hjerkinnskytefelt 2001-2010. Overvåking av metaller i bekker, elver og grunnvannsbrønner. *NIVA*, 6123-2011.
- Rosseland, B. O., Massabuau, J.-C., Grimalt, J., Hofer, R., Lackner, R., Raddum, G., Rognerud, S. & Vives, I. (2001). Fish ecotoxicology, The EMERGE fish sampling manual for live fish. *European Mountain lake Ecosystems: Regionalisation, diagnostic & socio-economic Evaluation*.
- Rosten, T., Åtland, Å., Kristensen, T., Rosseland, B. O. & Braathen, B. (2004). Vannkvalitet og dyrevelferd. *Mattilsynet*, 200440 / 11 88 67.
- Rylott, E. L., Lorenz, A. & Bruce, N. C. (2011). Biodegradation and biotransformation of explosives. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (3): 434-440.
- Ryon, M. G. (1987). Water Quality Criteria for 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Department of Energy, Washington, DC*, orwl-6304: 146.
- Salbu, B. (1987). Radioactive - tracer techniques in speciation studies. *Environmental Technology Letters*, 8 (8): 381-392.
- Schmidt - Nielsen, K. (1997). Animal physiology: adaptation and environment (5. ed). *Cambridge University Press*, Cambridge UK.
- Selim, H. M., Xue, S. K. & Iskandar, I. K. (1995). Transport of 2, 4, 6 - trinitrotoluene and hexahydr - 1, 3, 5 - trinitro - 1, 3, 5 - triazine in soils. *Soil Science*, 160 (5): 328-339.
- Shreve, R. N. (1984). *Chemical Process Industries*. 3rd ed., McGraw-Hill, NY.
- Skjelkvale, B. L., Borg, H., Hindar, A. & Wilander, A. (2007). Large scale patterns of chemical recovery in lakes in Norway and Sweden: Importance of seasalt episodes and changes in dissolved organic carbon. *Applied Geochemistry*, 22 (6): 1174-1180.
- Spain, J. C. (1995). Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Review of Microbiology*, 49: 523-555.
- Strand, R. & Heggberget, T. G. (1996). Kilenotfiske; maskeviddens betydning for fangsteffektivitet og størrelsesseleksjon. *NINA*, Oppdragsmelding 440: 1-13.
- Strømseng, A. E. & Ljønes, M. (2002). Miljømessige vurderinger av blyfri ammunisjon – Utvaskingsforsøk med forurenset jord., *FFI/RAPPORT-2002/00818*.
- Talmage S. S., Opresko D. M., Maxwell C. J., Welsh C. J., Cretella F. M., Reno P. H. & B. D. F. (1999). Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 161: 1-156.

- Taylor, S., Campbell, E., Perovich, L., Lever, J. & Pennington, J. (2006). Characteristics of Composition B particles from blow-in-place detonations. *Chemosphere* 65 (2006): 1405–1413.
- Taylor, S., Lever, J., Fadden, J., Perron, N. & Packer, B. (2009a). Outdoor weathering and dissolution of TNT and Tritonal. *Chemosphere*, 77: 1338–1345.
- Taylor, S., Lever, J., Fadden, J., Perron, N. & Packer, B. (2009b). Simulated rainfall-driven dissolution of TNT, Tritonal, Comp B and Octol particles. *Chemosphere*, 75 1074–1081.
- Thiboutot, S., Ampleman, G., Gagnon, A., Marois, A., Jenkins, T. F., Walsh, M. E., Thome, P. G. & Ranney, T. A. (1998). Caraceterization of antitank firing ranges at cfb valcartier, wate wainwright and cfad dundrun. *Defence recherche establishment centre de recherches pour la defense valcartier, Quebec*, DREV - R - 9809.
- US.EPA. (2000). Used or fired munitions and unexploded ordnance at closed, transferred, and transferring military ranges *Interim report and analysis of EPA survey results. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC*, EPA 505-R-00-01.
- US.EPA. (1999). Update of ambient water quality criteria for ammonia. *Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, D.C.*, EPA-822-R-99-014: pp 153.
- Van Aken, B., Yoon, J. M. & Schnoor, J. L. (2004). Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, an octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1): 508-517.
- Voie, Ø. (2005). Toksikologiske og kjemiske egenskaper av sprengstoff og komponenter i ammunisjon. *FFI-rapport*, 2005/00444.
- Voie, Ø. (2008). Effekter av eksplosiver på vannlevende organismer. *FFI-rapport* 2008/00451.
- Voie, Ø., Strømseng, A., Johansen, A., Rosseland, H. K., Karsrud, T. & Longva, K. (2010). Veileder for undersøkelse, risikovurdering, opprydning og avhending av skytebaner og øvingsfelt. *FFI-rapport* 2010/00116.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. & Peakall, D. B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. 3rd ed. Taylor&Francis Group, LLC.
- Yinon, J. & Zitrin, S. (1993). *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosives. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England (1993)*.
- Yoo, L. J., Lotufo, G. R., Gibson, A. B., Steevens, J. A. & Sims, J. G. (2006). Toxicity and bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (12): 3253-3260.
- Zitting, A., Szumanska, G., Nickels, J. & Savolainen, H. (1982). Acute toxic effects of trinitrotoluene on rat -brain, liver and kidney - role of radical production. *Archives of Toxicology*, 51 (1): 53-64.

Vedlegg 1

Vedlegg 1: Kjemiske og fysiske egenskaper til 2, 4, 6 – Trinitrotoluen (Talmage S. S *et al.* 1999).

2,4,6-Trinitrotoluen (TNT)	
Engelske synonymmer	1-methyl-2,4,6-trinitrobenzene; 2,4,6-Trinitrotoluene; 2-methyl-1,3,5-trinitrobenzene; alpha-trinitrotoluol; entsufon; methyltrinitrobenzene; s-trinitrotoluene; s-trinitrotoluol; sym-trinitrotoluene; sym-trinitrotoluol; TNT; tolite; trilit; Trinitrotoluene; Trinitrotoluene, 2,4,6- ; trinitrotoluol; trotyl;
	
Struktur:	
CAS nr.	118-96-7
Molekylvekt	227,13
Farge	Gul-hvit
Fysisk tilstand	Monokliniske nåler
Smeltepunkt	80,1 °C
Dekomp.punkt	240 °C
Lukt	Ingen
Løselighet i vann	130 mg/l ved 20 °C
Log Kow	2,2
Log Koc	1100
Damptrykk	$1,99 \times 10^{-4}$ mm Hg ved 25 °C
H	$9,87 \times 10^{-8}$ atm.m ³ /mol ved 25 °C

Vedlegg 2

Vedlegg 2: Tabell over gjennomsnittlig telletall som dpm per gram organer ved de ulike prøvetaknings tidspunkt i opptak og utskillelses perioden. Standardavvik samt min og maks verdier er gitt.

1 Timer	Organ	n	Gj.snitt	± SE	Min	Max
Opptak	Blod	6	1518	91	1265	1781
	Gjelle	6	8187	1459	4432	13738
	Galle	6	71479	36721	6551	189643
	Lever	5	6257	366	5269	14954
	Nyre	6	8222	486	6663	9562
	Milt	6	2424	339	1579	3750
	Mage	6	2858	535	1712	5319
	Tarm	6	4539	1356	1957	10638
	Hjerne	6	3198	528	1944	5049
	Muskel	6	2852	406	1942	4532
3 Timer Opptak	Blod	6	1733	136	1387	2298
	Gjelle	6	13057	1338	8688	17500
	Galle	6	96616	129008	67315	154896
	Lever	6	8209	794	5934	11049
	Nyre	6	17415	3789	9553	35155
	Milt	6	4345	853	2009	6739
	Mage	6	6108	577	4160	8290
	Tarm	6	6008	415	4140	7019
	Hjerne	5	3684	198	3147	4290
	Muskel	6	3677	224	2961	4563
6 Timer Opptak	Blod	6	2223	101	1949	2586
	Gjelle	5	15763	2970	10346	27191
	Galle	6	140895	41977	7685	271099
	Lever	6	13599	798	12602	16782
	Nyre	6	18677	3032	14268	33452
	Milt	5	10353	2051	5722	17857
	Mage	6	9014	417	7541	10620
	Tarm	6	12849	1241	7736	16360
	Hjerne	6	4919	196	4497	5619
	Muskel	6	4373	215	3613	5120
12 Timer Opptak	Blod	6	1979	119	1563	2403
	Gjelle	6	10172	593	8881	12337
	Galle	5	243480	10939	212602	279243
	Lever	6	12361	1144	9515	17481
	Nyre	5	18704	11087	9212	36800
	Milt	6	4445	588	3434	7292
	Mage	6	9232	1293	5552	12341
	Tarm	6	30528	13491	9708	95000
	Hjerne	6	4031	750	986	6224
	Muskel	5	2781	252	1999	3538
24 Timer Opptak	Blod	6	2054	183	1568	2862
	Gjelle	6	14670	4001	6923	29375
	Galle	5	430957	78324	208654	692069
	Lever	6	7296	1213	3119	11887
	Nyre	6	29860	13820	6905	93571
	Milt	6	7718	868	4700	10215
	Mage	6	14936	2348	6379	21954

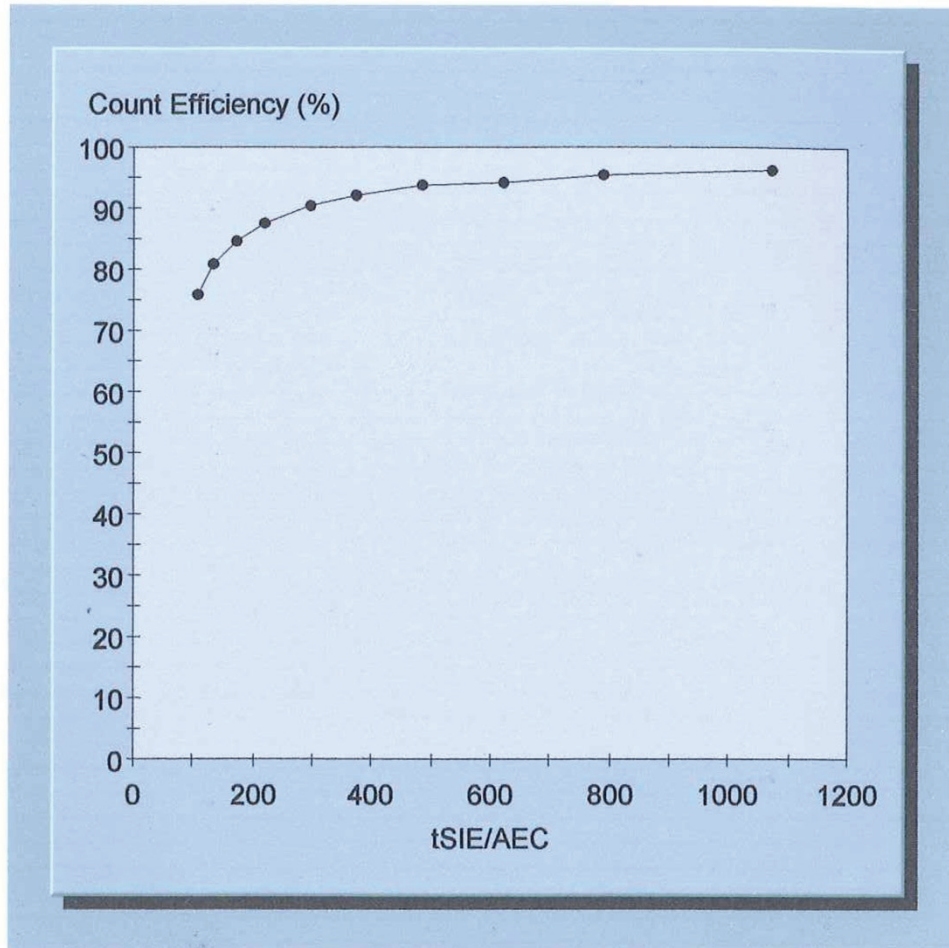
	Tarm	6	17944	1506	13638	24557
	Hjerne	6	4900	1081	3200	10250
	Muskel	6	2014	234	1506	2800
48 Timer	Blod	6	1522	177	1111	2190
Opptak	Gjelle	6	6108	2325	2632	17381
	Galle	6	2298553	394258	842987	3221857
	Lever	6	8583	2076	5226	18467
	Nyre	6	5064	984	3111	9628
	Milt	6	5767	976	2842	7941
	Mage	6	7536	1363	3274	13291
	Tarm	6	33235	6434	17433	57619
	Hjerne	6	2302	297	1621	3248
	Muskel	6	833	146	536	1418
1 Timer	Blod	6	1462	142	1121	2101
Utskillelse	Gjelle	5	5273	1351	2383	10213
	Galle	6	836055	152297	354685	1283672
	Lever	6	6501	961	4586	11063
	Nyre	6	7847	3087	2886	22154
	Milt	5	6236	709	3636	7606
	Mage	6	17756	8649	4979	60000
	Tarm	5	17312	738	15455	18869
	Hjerne	6	2277	237	1464	2879
	Muskel	6	541	57	395	778
3 Timer	Blod	6	1129	86	937	1410
Utskillelse	Gjelle	6	1192	476	266	3200
	Galle	6	1918718	841802	115220	4508111
	Lever	4	2918	916	973	7148
	Nyre	6	7113	4854	465	30758
	Milt	6	7478	1306	3770	12222
	Mage	6	3653	849	1227	6386
	Tarm	6	9496	3828	2743	24856
	Hjerne	6	331	41	179	434
	Muskel	5	713	83	486	894
6 Timer	Blod	5	1051	75	862	1252
Utskillelse	Gjelle	6	2773	505	1980	5238
	Galle	6	553153	68884	402470	851948
	Lever	6	4761	332	3815	5740
	Nyre	6	6541	914	2239	9677
	Milt	6	4385	846	2404	7778
	Mage	6	7626	1488	3243	14179
	Tarm	6	25684	6568	14715	57451
	Hjerne	5	1513	23	1426	1556
	Muskel	6	556	50	396	745
12 Timer	Blod	5	1458	155	1021	1792
Utskillelse	Gjelle	5	2714	946	161	5811
	Galle	5	659361	123511	205636	939637
	Lever	5	4991	883	2708	8059
	Nyre	5	4542	777	3108	7444
	Milt	5	4519	920	2319	7275
	Mage	5	9015	3195	3061	21224
	Tarm	4	20097	4698	13787	34057
	Hjerne	5	1393	86	1225	1701
	Muskel	5	461	50	335	642
24 Timer	Blod	3	1676	528	1064	2726

Utskillelse	Gjelle	3	3716	345	3367	4405
	Galle	3	1019977	400632	34013	1733936
	Lever	3	4910	1550	2632	7871
	Nyre	3	2890	200	2585	3268
	Milt	3	5744	1094	4026	7778
	Mage	3	4375	442	3507	4956
	Tarm	3	17422	1355	15354	19973
	Hjerne	3	2285	736	1201	3689
	Muskel	3	476	46	417	566
48 Timer	Blod	4	1085	76	931	1231
Utskillelse	Gjelle	4	1544	202	1081	2018
	Galle	6	693217	74061	520258	839808
	Lever	4	4639	1536	2826	9237
	Nyre	4	3406	609	1879	4682
	Milt	4	2739	238	2167	3333
	Mage	4	4969	1105	2245	7652
	Tarm	3	11624	1428	9440	14310
	Hjerne	3	1478	184	1294	1662
	Muskel	4	407	35	333	477

Vedlegg 3

Vedlegg 3: Quench kurve til ^{14}C som ble brukt i LSC

Quench Curve - 14C



Last Edit Date: 07/09/2010

Quench Indicator: tSIE/AEC

Vedlegg 4

Results for: opptak

Correlations: DPM pr g B; DPM pr g Gj; DPM pr g Ga; DPM pr g L; DPM pr g N;

...

DPM pr g Gj	DPM pr g B 0,642 0,000	DPM pr g Gj	DPM pr g Ga	DPM pr g L	DPM pr g N
DPM pr g Ga	-0,047 0,800	-0,146 0,432			
DPM pr g L	0,642 0,000	0,354 0,051	0,160 0,390		
DPM pr g N	0,649 0,000	0,740 0,000	-0,298 0,104	0,399 0,026	
DPM pr g Mi	0,664 0,000	0,467 0,008	0,221 0,231	0,632 0,000	0,374 0,038
DPM pr g Ma	0,633 0,000	0,615 0,000	0,214 0,247	0,322 0,077	0,544 0,002
DPM pr g T	0,243 0,189	0,047 0,804	0,516 0,003	0,568 0,001	0,039 0,834
DPM pr g Hj	0,791 0,000	0,673 0,000	-0,199 0,283	0,660 0,000	0,628 0,000
DPM pr g Mu	0,571 0,001	0,642 0,000	-0,404 0,024	0,480 0,006	0,567 0,001
DPM pr g Ma	DPM pr g Mi 0,674 0,000	DPM pr g Ma	DPM pr g T	DPM pr g Hj	
DPM pr g T	0,271 0,140	0,282 0,124			
DPM pr g Hj	0,503 0,004	0,507 0,004	0,175 0,345		
DPM pr g Mu	0,351 0,053	0,203 0,274	-0,176 0,343	0,785 0,000	

Cell Contents: Pearson correlation
P-Value

Vedlegg 5

Results for: utskillelse

Correlations: DPM pr g B; DPM pr g Gj; DPM pr g Ga; DPM pr g L; DPM pr g N;

...

DPM pr g Gj	DPM pr g B 0,323 0,133	DPM pr g Gj	DPM pr g Ga	DPM pr g L	DPM pr g N
DPM pr g Ga	0,040 0,857	-0,127 0,564			
DPM pr g L	0,379 0,074	0,479 0,021	-0,094 0,671		
DPM pr g N	0,139 0,528	0,182 0,406	-0,023 0,919	0,466 0,025	
DPM pr g Mi	0,173 0,430	0,180 0,412	0,418 0,047	0,178 0,416	0,213 0,328
DPM pr g Ma	0,327 0,128	0,249 0,253	0,080 0,718	0,448 0,032	0,217 0,319
DPM pr g T	0,375 0,078	0,377 0,076	-0,321 0,135	0,424 0,044	-0,003 0,990
DPM pr g Hj	0,294 0,173	0,640 0,001	-0,147 0,504	0,655 0,001	0,045 0,838
DPM pr g Mu	0,402 0,057	0,048 0,828	0,457 0,028	0,194 0,376	0,256 0,238

DPM pr g Ma	DPM pr g Mi 0,102 0,642	DPM pr g Ma	DPM pr g T	DPM pr g Hj
DPM pr g T	0,227 0,298	0,288 0,183		
DPM pr g Hj	0,027 0,903	0,408 0,054	0,513 0,012	
DPM pr g Mu 0,005	0,568 0,113	0,339 0,170	0,296 0,518	0,142

Cell Contents: Pearson correlation
P-Value