



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for Miljøvitenskap

Masteroppgave 2014
30 stp

Effekten av pH på endring av urans tilstandsformer og toksisitet mot *C. elegans*

THE EFFECT OF PH ON THE SPECIATION
AND TOXICITY OF URANIUM TO *C.*
ELEGANS

Sondre Tvetene Malme

Forord og takk

Denne masteroppgaven er siste del av en femårig sivilingeniørutdanning i kjemi og bioteknologi med spesialisering i uorganisk kjemi og miljøkjemi. Utdanningen har skjedd ved Instituttet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) og ved Instituttet for Miljøvitenskap (IMV). Begge disse instituttene tilhører Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Utgifter til laboratoriearbeid ble dekket av prosjektet CERAD (Centre for Environmental Radioactivity).

Jeg vil gjerne få takke min hovedveileder professor Deborah H. Oughton (NMBU, IMV) og mine tre medveiledere førsteamanuensis Ole Christian Lind (NMBU, IMV), forsker Dag Anders Brede (NMBU, IMV) og forsker Hans-Christian Teien (NMBU, IMV). Disse fire har hjulpet med planlegging, laboratoriearbeidet og skriving. Underveis har de gitt uvurderlige råd og hjelpsom innsikt. I tillegg til disse vil jeg gjerne takke overingenør Marit Nandrup Pettersen (NMBU, IMV) og ingeniør May-Britt Selvåg Hovet (NMBU, IKBM) for stor hjelp ved utførelse av laboratoriearbeid på NMBU sine laboratorier. Jeg vil også takke Karl-Andreas Jensen (NMBU, IMV) for hjelp med ICP-MS instrumentet og tilhørende analyser.

Til sist vil jeg takke mine venner og familie for tålmodighet, hjelp og motivasjon, under skrivingen av denne oppgaven og studietiden generelt. Særlig vil jeg takke faren min og kjæresten min for korrekturlesing og støtte.

Ås, mai 2014.

Sondre Tvetene Malme

Sammendrag

Uran er et radioaktivt grunnstoff som kan opptre som en miljøgift. Antropogene kilder omfatter lekkasje fra urangruver og kjernekraftverk, forbrenning av petroleumsbasert drivstoff (som kull) og produksjon av og bruk av fosfatbasert gjødsel (Markich 2002). Naturlige høye mineralforekomster av uran kan også være kilder til økt urankonsentrasjon i miljøet. Uran er både kjemisk og radiologisk giftig, men biotilgjengelighet og toksisitet kan påvirkes både av urans tilstandsform og jord eller vanns kjemiske parametere. Tidligere studier med uran og juvenil laks har vist at pH-verdien i vann har stor effekt på urans tilstandsform (Teien 2013). Det ble observert at endringer i pH-verdi førte til en endret toksisitet fra uran mot laks. LC-50 (Lethal Concentration 50%) falt fra 25 mg/l til 1.4 mg/l ved økning i pH fra pH 6.0 til pH 7.9 (Teien 2013).

Problemstillingen for denne masteroppgaven er: I hvilken grad er endring av urans tilstandsformer, og urans toksisitet mot nematoden *C. elegans*, avhengig av pH? Siden modellorganismen *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) hadde blitt brukt til å undersøke urans toksisitet flere ganger før (Dutilleul et al. 2013; Goussen et al. 2013; Jiang et al. 2009), ble det bestemt å bruke denne som testorganisme. *C. elegans* nematoder lever naturlig i jord, derfor ble kunstig jordporevann brukt som testmedium. Varmeinaktivert *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterier ble anvendt som næringskilde for nematodene.

Hovedhypotesen for oppgaven er: Et fall fra pH 7.5 til pH 6.0 i en jordporevannløsning vil føre til endringer i urans tilstandsform og derav vil urans toksisitet mot nematoden *C. elegans* øke. Hypotesen ble testet ved å eksponere nematodene for forskjellige urankonsentrasjoner (90, 10, 1.0 og 0.10 μM) ved forskjellige pH-verdier (7.5, 7.0, 6.5, 6.0 og 5.5). Eksponeringen ble gjort i brønner på mikrotiterplater; ca. 30 nematoder ble tilsatt til hver brønn. SSPW (simulated soil pore water) ble brukt som testmedium, og pH ble justert med salpetersyre. Kontroll-løsninger uten uran ble opparbeidet for å kontrollere naturlig dødelighet for de forskjellige pH-verdiene. Løsninger med natriumnitrat ble også opparbeidet for å kontrollere toksisiteten til nitrat. Etter en 96 timers inkubering ved 18 °C ble prosent nematodedød per konsentrasjon per pH regnet ut, basert på antallet nematoder som overlevde. For urankonsentrasjon 10 μM ble to repetisjoner utført for å øke statistisk signifikans av data.

Konsentrasjonene av uran og dets tilstandsformer i SSPW ble kontrollert under forsøket. Prøver ble fraksjonert med enten høy-hastighets sentrifugering, membran ultrasentrifugering eller sprøytefilter filtrering. Uraninnholdet i både fraksjon- og totalprøvene ble bestemt med et ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) instrument. Uraninnholdene i prøvene ble sammenlignet for å gi en oversikt over endring av urans tilstandsformer med hensyn på pH.

Kontroll-løsningene med SSPW viste at hverken pH (5.5 til 7.5) eller natriumnitrat (0.20 til 0.00020 mM) hadde effekt på nematodene. Fraksjonering av prøver med nominell urankonsentrasjon 10 μ M viste et omslagspunkt ved pH 7.4. Uran fra SSPW med pH under dette omslagspunktet var i liten grad løst, og var kompleksbundet til organisk materiale i form av døde *E. coli* bakterier. Uran fra SSPW med pH over 7.4 var i stor grad løst som tilstandsformer med lav molekylær masse. Nematodedødelighet for SSPW med nominell urankonsentrasjon 10 μ M og pH 7.55 ± 0.070 var 18 ± 5.2 % døde. Nematodedødeligheten for SSPW med samme urankonsentrasjon og pH under 7.4 var 64 ± 3.8 % døde eller mer. pH påvirket altså tydelig urans toksisitet. Videre var endringen i toksisitet mot nematoden *C. elegans* korrelert med endring av urans tilstandsform, noe som støtter hypotesen.

Abstract

Uranium is a radioactive element that can act as an environmental toxin. Anthropogenic sources include leakage from uranium mines and nuclear power plants, combustion of petroleum based fuels (such as coal) and the production and use of phosphate based fertilizers (Markich 2002). Naturally high levels of uranium in minerals can also be sources of contamination in the environment. Uranium is both chemically and radiologically toxic, but its bioavailability and toxicity can be affected by its speciation and the chemical parameters of the soil/water. Previous studies with uranium and juvenile salmon had shown that pH in water had a major effect on the speciation of uranium (Teien 2013). It was observed that changes in pH resulted in an altered toxicity of uranium to the salmon. The LC -50 (Lethal Concentration 50%) dropped from 25 mg/l to 1.4 mg/l after an pH increase from pH 6.0 to pH 7.9 (Teien 2013).

The objective of this thesis is to determine to what extent the speciation, and toxicity against *C. elegans*, of uranium is dependent on pH. Since the model organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) had been used to investigate uranium toxicity several times before (Dutilleul et al. 2013; Goussen et al. 2013; Jiang et al. 2009), it was chosen as the test organism. *C. elegans* nematodes live naturally in soil, therefore simulated soil pore water (SSPW) was used as test medium. Heat-inactivated *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria were used as a nutrient source for the nematodes.

The main hypothesis of the thesis is: A fall from pH 7.5 to pH 6.0 in a simulated soil pore water solution will induce changes in the speciation of uranium and hence its toxicity to the nematode *C. elegans* will increase. The hypothesis was tested by exposing the nematodes to different uranium concentrations (90, 10, 1.0 and 0.10 μM) at different pH values (7.5, 7.0, 6.5, 6.0 and 5.5). The exposure was executed in the wells of microtiter plates; approximately 30 nematodes were added to each well. SSPW was used as the test medium, and the pH was adjusted with nitric acid. Toxicity was also tested using control solutions without uranium to control for natural mortality induced by the different pH values. The mortality induced by sodium nitrite was tested to control the toxicity of nitrate. After a 96 hour incubation at 18 ° C, the percentage nematode mortality per concentration per pH was calculated based on the number of nematodes that survived the exposure. Two more replicates were carried out for the exposures at uranium concentration 10

μM, to increase the statistical significance of data for this concentration.

The concentrations of uranium and its speciation in SSPW was controlled during the experiment. Samples were fractionated by either high speed centrifugation, membrane ultra-centrifugation or syringe filter filtration. Uranium levels in both the fractionated samples and the total samples were determined with an ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) instrument. The uranium levels were compared between samples to provide an overview of the speciation of uranium with changing pH.

Control solutions of SSPW showed that neither pH (5.5 to 7.5) nor sodium nitrate (0.20 to 0.00020 mM) had any effect on the nematodes. Fractionation of samples with nominal uranium concentration of 10 μM showed a critical point at pH 7.4. Uranium from SSPW with pH below this point was hardly dissolved and had formed complexes with organic material in the form of dead *E. coli* bacteria. Uranium from SSPW with pH above 7.4 was dissolved as species with low molecular mass. Nematode mortality for SSPW with nominal uranium concentration of 10 μM and pH 7.55 ± 0.070 was 18 ± 5.2 % dead. Nematode mortality for SSPW with same uranium concentration and pH below 7.4 was 64 ± 3.8 % dead or more. Clearly pH influenced the toxicity of uranium. Furthermore, this change in toxicity against *C. elegans* correlated with the change in uranium speciation, which supports the main hypothesis.

Innholdsfortegnelse

Forord og takk	1
Sammendrag	2
Abstract	4
1. Innledning	8
2. Teori.....	10
2.1 Uran.....	10
2.1.1 Urans grunnleggende egenskaper og forekomst	10
2.1.2 Bruksområder for uran.....	11
2.1.3 Urans kjemiske og toksikologiske egenskaper	12
2.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
2.2.1 Grunnleggende fakta.....	17
2.2.2 Dokumenterte effekter av uran og pH på <i>C. elegans</i>	20
2.3 Anvendte teknikker.....	21
2.3.1 Kultivering av <i>C. elegans</i>	21
2.3.2 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer)	21
2.3.3 Fraksjonerings teknikker	23
3. Utstyr og metode	25
3.1 Metodeoversikt for eksponering av <i>C. elegans</i>	27
3.1.1 Tillaging av arbeidsløsninger og medium	27
3.1.2 Synkronisering av <i>C. elegans</i> og varmeinaktivering av <i>E. coli</i>	29
3.1.3 Eksponering av <i>C. elegans</i> nematoder	30
3.1.4 Prøveopparbeidelse til ICP-MS analyse	33
3.2 Eksperimentelle spesifikasjoner for pilotforsøk, vurdering av urans toksisitet mot <i>C. elegans</i>	35

3.3 Kartlegging av uran sin løselighet i SSPW	35
3.4 Eksperimentelle betingelser for testing av effekten av pH på urans toksisitet mot <i>C. elegans</i>	37
3.5 Eksperimentelle betingelser for testing av effekten av pH på urans toksisitet mot <i>C. elegans</i> , repetisjoner ved urankonsentrasjon 10 μ M	39
4. Resultater	40
4.1 Resultater fra pilotforsøk for vurdering av urans toksisitet mot <i>C. elegans</i>	40
4.2 Resultater fra kartlegging av uran sin løselighet i SSPW	42
4.3 Resultater fra testing av effekten av pH på urans toksisitet mot <i>C. elegans</i>	42
4.3.1 Nematodedød og pH.....	42
4.3.2 ICP-MS målinger av uran, resultater for kontroll-løsninger og løsninger med nominell urankonsentrasjon 90, 1.0, eller 0.10 μ M.....	45
4.3.3 ICP-MS målinger av uran, resultater for SSPW-løsninger med nominell urankonsentrasjon 10 μ M.....	48
5. Diskusjon	51
5.1 Analytiske og metodiske aspekter	51
5.2 Nematodedød og pH, variasjon i urans toksisitet observert under forsøkene	53
5.3 Effekt av organisk materiale (død <i>E. coli</i>) og pH på urans tilstandsformer	55
6. Konklusjon.....	59
6.1 Vurdering av metode og forslag til videre forskning.....	59
6.2 Konklusjon på problemstilling og vurdering av hypotese	60
Referanser	61
Appendiks.....	65
A1: Resultater for pilotforsøk og løselighetseksperiment	65
A2: Nematodedød og pH-målinger	68
A3: ICP-MS målinger fra hovedforsøket, og behandlede ICP-MS data	70

1. Innledning

Uran er et radioaktivt grunnstoff som finnes naturlig som tre forskjellige isotoper; ^{238}U , ^{235}U og ^{234}U . Det vanligste bruksområdet for uran er som energikilde i kjernekraftverk eller som råmateriale for kjernevåpen. Det har vært flere tilfeller hvor naturlig uran har lekket ut i nærliggende vannforekomster eller jordsmonn fra gruver (Flury et al. 2000). Andre antropogene kilder omfatter forbrenning av petroleumsbasert drivstoff (som kull) og produksjon av og bruk av fosfatbasert gjødsel (Markich 2002). Toksisiteten til uran i jord og vann er aktuell, både med hensyn på mennesker og miljø.

Sommeren 2013 utførte Isotoplaboratoriet ved NMBU et forsøk med uran og juvenil laks for prosjektene Strategy for Allied Radioecology (EU-STAR) og Centre for Environmental Radioactivity (CERAD). Hensikten var datainnsamling til en biotisk ligandmodell (BLM) for atlantisk laks og uran. I samsvar med tidligere arbeider (Hyne et al. 1992; Markich 2002), viste resultatene fra dette forsøket at pH-verdien i vannet hadde stor effekt på urans toksisitet. Øking av pH fra 6.0 til 7.9 endret LC-50 (Lethal Concentration 50 %, konsentrasjon av et giftstoff som dreper 50 % av en testpopulasjon etter en viss tid) fra 1.4 mg/l til 25 mg/l (Teien 2013). Avsetning av uran på laksens gjeller varierte med pH-verdiene i vannet. Konklusjonen var at endringer i pH-verdi førte til en endret tilstandsform av uran, og derav endret toksisitet. Grunnlaget for denne masteroppgaven ble å utforske dette fenomenet; nemlig å kartlegge effekten pH kan ha på urans toksisitet.

For å undersøke toksisiteten til uran var det hensiktsmessig å bruke en modellorganisme som grunnlaget for denne forskningen. Til dette ble nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) brukt. Bruk av en modellorganisme som grunnlaget for et eksperiment gjør at man kan anvende etablerte metoder samt kunne sammenligne resultatene med andre miljøgifter. *C. elegans* er en godt dokumentert organisme med relativt kort livssyklus som har blitt brukt i vitenskapelig sammenheng før til å kartlegge en rekke forskjellige miljøgifter, inkludert urans toksisitet (Dutilleul et al. 2013; Goussen et al. 2013; Jiang et al. 2009). For å gjenskape nematodenes naturlige miljø ble det bestemt at kunstig jordporevannløsning (SSPW, simulated soil pore water) skulle brukes som testmedia. Det var i vann at pH-avhengig endring av urans tilstandsformer hadde blitt observert under CERAD-forsøket med laks. Med organismen *C. elegans*, uran og pH som grunnlag,

ble problemstillingen for denne studien som følger: I hvilken grad er endring av urans tilstandsformer, og urans toksisitet mot nematoden *C. elegans*, avhengig av pH?

Basert på tidligere studier ble følgende hovedhypotese utarbeidet: Et fall fra pH 7.5 til pH 6.0 i en jordporevannløsning vil føre til endringer i urans tilstandsform og derav vil urans toksisitet mot nematoden *C. elegans* øke. For å teste denne hypotesen skulle urans toksisitet mot *C. elegans* bestemmes under forskjellige urankonsentrasjoner og pH-verdier, med bruk av en standard 96 timers overlevelsestest basert på ISO/TC (2010). Uranylnitrat skulle anvendes, derfor ble effekten av nitrat, samt pH alene, kontrollert.

Urankonsentrasjon og spesiering skulle bestemmes med en kombinasjon av fraksjonering og ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) analyse. Tre fraksjoneringsteknikker ble anvendt; høy-hastighets sentrifugering, membran ultrasentrifugering og sprøytefilter filtrering. For å kontrollere urans spesiering uten organisk materiale ble også løsninger uten *E. coli* og nematoder opparbeides, og tatt prøver av. Hensikten med disse prøvene og de forskjellige fraksjoneringsteknikkene var å danne en oversikt over urans spesiering under forskjellige pH-verdier og forhold. Denne oversikten kunne så relateres til urans toksisitet gjennom nematodedød registrert i de forskjellige løsningene.

Studien var basert på to forsøk: et pilotforsøk og et hovedforsøk. Hovedeksponeringsforsøket skulle omhandle fem pH-verdier og fire urankonsentrasjoner. Pilotforsøket, med to pH-verdier og fem urankonsentrasjoner ble utført for å teste den planlagte metoden, undersøke hvilke urankonsentrasjoner som var pH-avhengig og for å belyse eventuelle utfordringer. Til slutt skulle to repetisjoner av hovedforsøket utføres, for den urankonsentrasjonen som viser størst pH-indusert endring i toksisitet. Repetisjonene ble utført for å øke statistisk signifikans av data for denne konsentrasjonen.

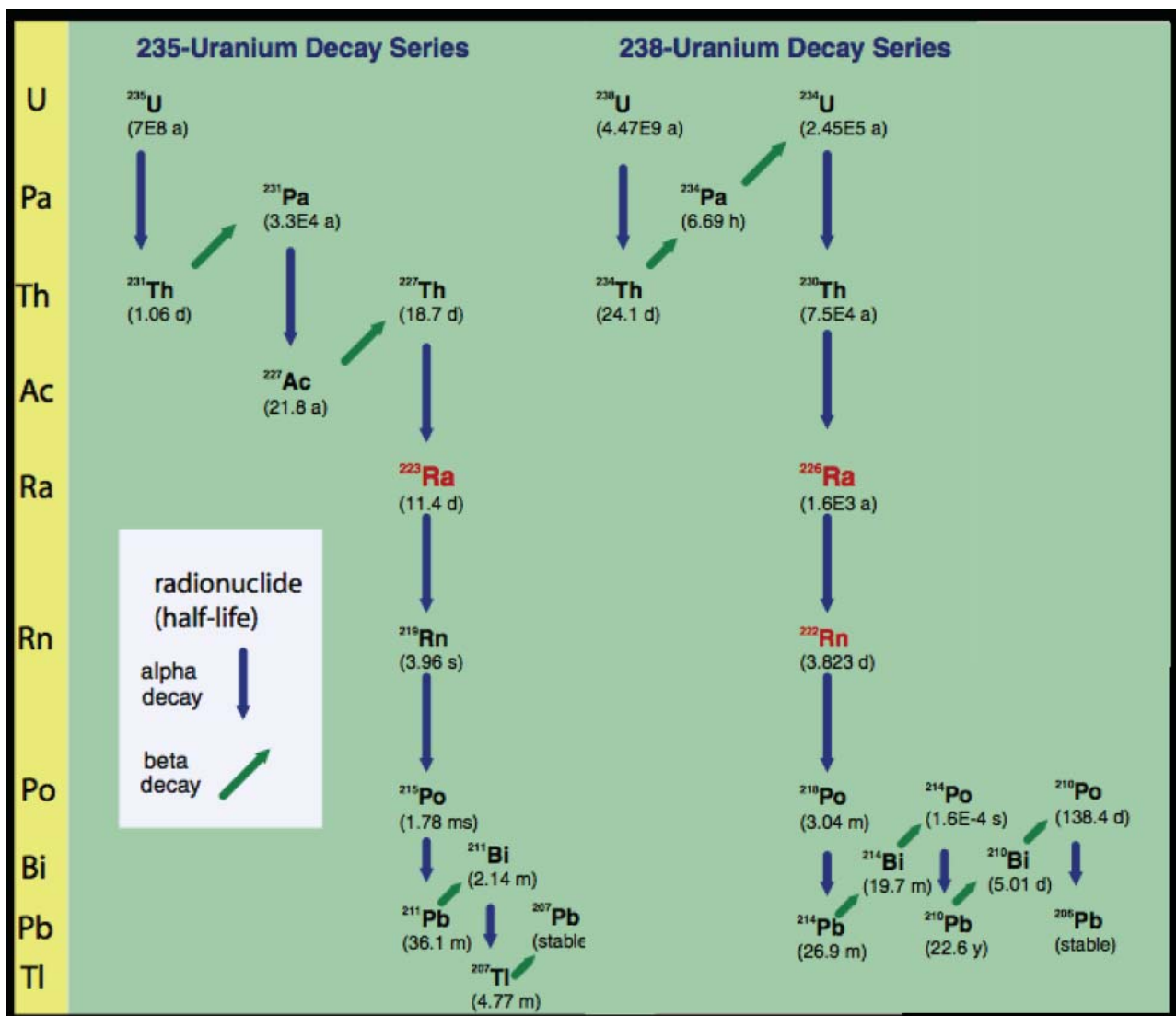
2. Teori

2.1 Uran

2.1.1 Urans grunnleggende egenskaper og forekomst

Uran er et sølvgrått metall som ligger i blokk f, periode 7 i periodesystemet og tilhører således actinoidene. Uran har atomnummer 92 og atomvekt 238.03 g/mol. Uran oksideres lett, og forekommer derfor naturlig oftest som oksider. Den foreligger ved oksidasjonstilstandene +3 til +6, men +4 og +6 er vanligst (Sheppard et al. 2005). Den forekommer i flere malmtyper, da særlig som uranitt (UO_2^{2+}) eller beklende ($\text{U}_3\text{O}_8^{2+}$) (Bleise 2002). Gjennomsnittlig konsentrasjon av uran i jordskorpa er 0.0003 % (3 mg/kg), i havet er dette gjennomsnittet ca. 3.0 $\mu\text{g/l}$ (Bleise 2002). Forekomst av naturlig uran i overflatevann varierer fra mindre enn 0.02 $\mu\text{g/l}$ til 3 mg/l (i uran-pit sjøer) (Simon et al. 2010), i grunnvann fra 3×10^{-3} $\mu\text{g/l}$ til 2.0 $\mu\text{g/l}$ (Bleise 2002).

Som alle actinoider er uran radioaktiv. Den har nitten isotoper. Naturlig forekommer uran hovedsakelig som: ^{234}U (0.0055 %) med halveringstid 2.46×10^5 år, ^{235}U (0.72 %) med halveringstid 7.04×10^8 år, og ^{238}U (99.2745 %) med halveringstid 4.47×10^9 år. Alle disse tre isotopene desintegrerer gjennom radioaktivitet, og endrer form over tid til flere andre radioaktive isotoper av andre grunnstoffer ved å sende ut alfa-, beta- og gammastråling. Slutten på disintegrasjonene kommer med nedbrytningsproduktene ^{206}Pb and ^{207}Pb , som er stabile (Emsley 2001). Se Figur 1 under for nedbrytungskjedene til ^{238}U og ^{235}U . Både ^{238}U , ^{235}U og ^{234}U avgir alfastråling, den spesifikke aktiviteten for ^{238}U er 1.24×10^4 Bq/g (Sheppard et al. 2005).



Figur 1: Nedbrytingskjedene til ^{238}U og ^{235}U . Hver radionuklide vises med halveringstiden under, og nedbrytingspilene er fargekodet etter om radionuklidene avgir alfa- (blå pil) eller betastråling (grønn pil) (Johnsen 2012).

2.1.2 Bruksområder for uran

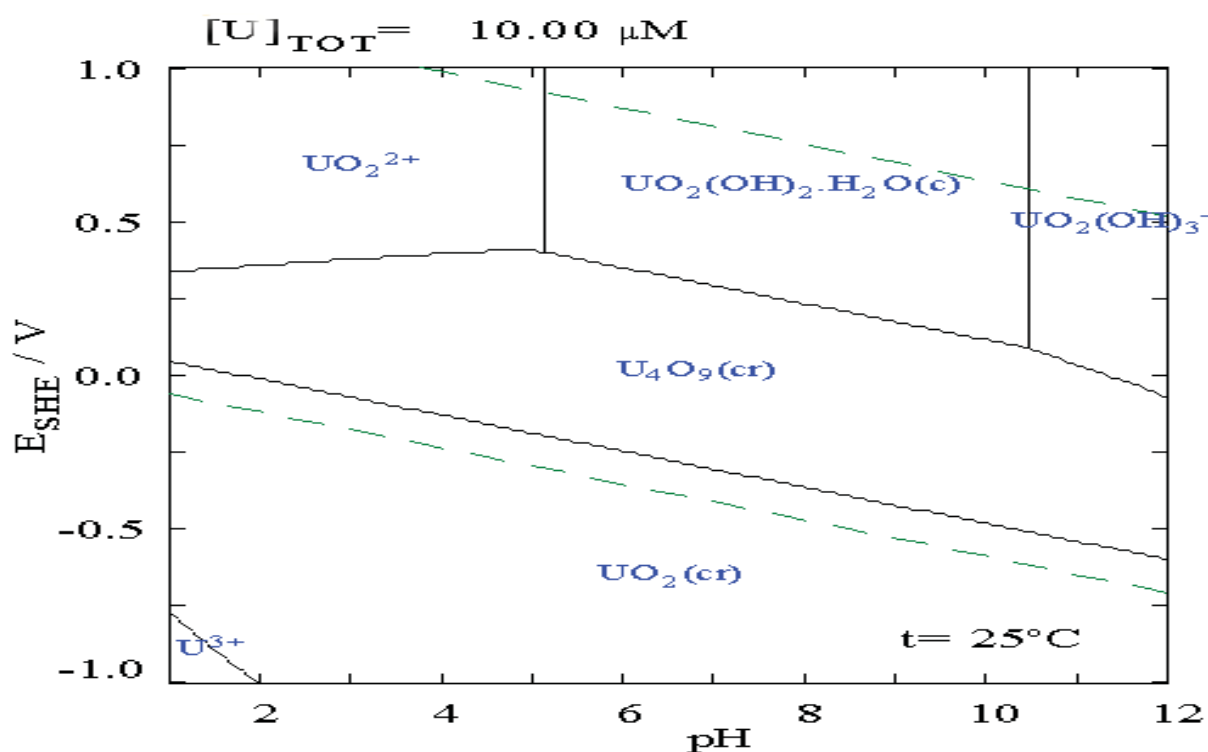
Urans hovedbruksområde er som brensel til atomreaktorer. Selv om naturlig uran kan brukes, så er det vanlig å anrike uran før bruk. Å anrike uran betyr å øke den relative andelen av isotopen ^{235}U , da det er denne isotopen som er spaltbar, og som dermed kan brukes i en atomreaktor (Emsley 2001). En måte uran kan anrikes på er å reagere det med blant annet HF slik at det omdannes til UF_6 . Denne gassen kan så føres gjennom en serie med membraner som forsinker den tyngre isotopen ^{238}U . Dette vil skille ut ^{235}U slik at uran anrikes. Dette er bare én anrikingsmetode, mange andre variasjoner er i bruk. En økning fra 0.7 % til 3.5 % av ^{235}U er vanligvis tilfredsstillende

for et vanlig atomkraftverk (Rayner-Canham & Overton 2010). Uran brukes også til produksjon av fissilt materiale (^{235}U , eller ^{239}Pu laget fra ^{238}U) i kjernefysiske våpen (Federation of American Scientists 1998).

Avfallsproduktet som produseres ved anrikning av uran er *utarmet uran* (engelsk *depleted uranium*, forkortet DU), altså uran med lavere andel ^{235}U og ^{234}U enn vanlig. Utarmet uran er kommersielt nyttig grunnet urans høye tetthet ($19,3 \text{ g/cm}^3$). Det brukes som ballast, for eksempel i fly eller båter, men det har også blitt brukt som strålingsbeskyttelse mot gammastråling (Høibråten 2001). Utarmet uran er også relativt lite radioaktivt og har pyrokinetiske egenskaper, noe som kombinert med dets høye tetthet og hardhet gjør det velegnet for bruk i panserbrytende ammunisjon (Høibråten 2001; Rayner-Canham & Overton 2010).

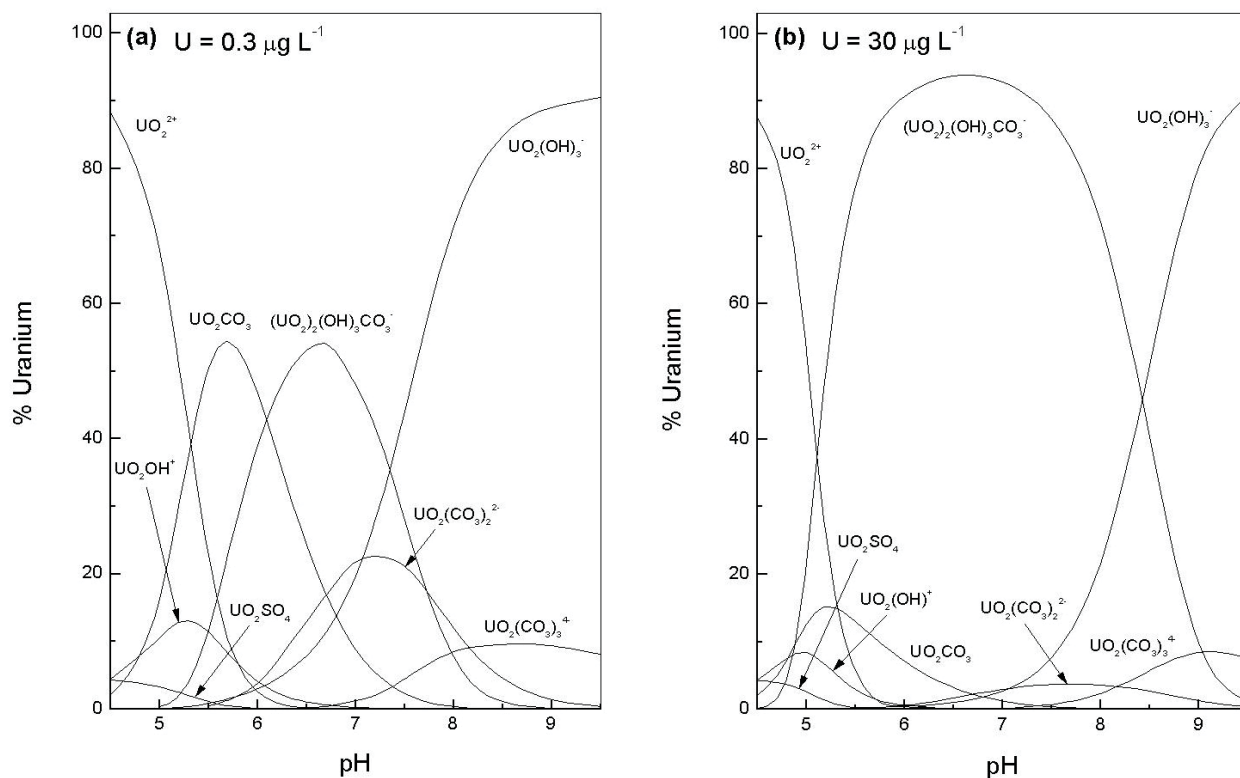
2.1.3 Urans kjemiske og toksikologiske egenskaper

I fast form forekommer uran oftest som UO_2 hvis forholdene er sterkt reduserende. Hvis forholdene heller er litt oksiderende eller basiske, så vil UO_2 oksideres sakte til henholdsvis U_3O_8 eller $\text{U}_2\text{O}_7^{2-}$ (Rayner-Canham & Overton 2010). Uranoksider har i utgangspunktet lav løselighet, men hvis de oksideres til uranyl-ioner (UO_2^{2+}) blir de både mobile og løselige. Derfor er det forskjellige tilstandsformer av uranyl som oftest er hovedfokuset når urans kjemiske egenskaper i en løsning skal utforskes. Disse er også de mest stabile spesiene av uran i løsninger. Se Figur 2 under for Pourbaix-diagram over endring av urans tilstandsformer i vandig løsning.

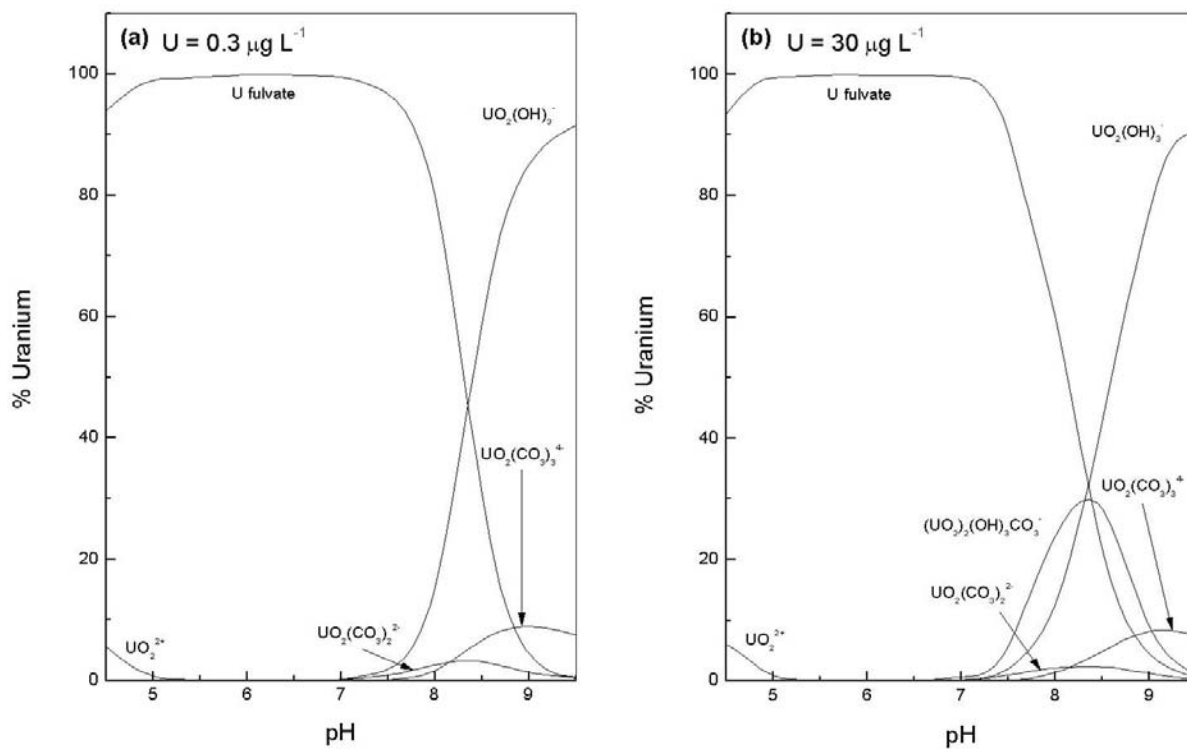


Figur 2: Endring av urans tilstandsformer i en vandig, ikke kompleks-bindende, løsning som funksjon av pH og redokspotensialet (E_{SHE}/V) (Puigdomenech 2004). Grønne linjer angir i hvilket område vann i løsningen er stabilt. cr og c annoterer krystallinsk struktur.

I vann kan uran foreligge som mange forskjellige tilstandsformer, fordelingen mellom de ulike tilstandsformene er avhengig av pH. Tilgjengelig humus vil påvirke denne fordelingen, se Figur 3 under for fordeling av urans tilstandsformer i ferskvann og Figur 4 for fordeling av urans tilstandsformer i ferskvann med tilgjengelig humus. Uran kan kompleksere med tilgjengelig fosfat (Dutilleul et al. 2013). Dette kan føre til utfelling, for eksempel som autunnitt ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2$) (Flury et al. 2000).



Figur 3: Antatt fordeling av tilstandsformer (%) for uran i ferskvann som en funksjon av pH for a) 0.3 og b) 30 $\mu\text{g U/l}$ (Markich 2002).



Figur 4: Antatt fordeling av tilstandsformer (%) for uran i ferskvann, med humus (4.2 mg/l fulvosyre og 4.5 mg/l løst organisk karbon), som en funksjon av pH for a) 0.3 og b) 30 $\mu\text{g U/l}$ (Markich 2002).

Uran er både kjemisk og radiologisk giftig. Uran er mye mer kjemisk giftig enn radiologisk giftig. Dette er fordi uran har lang halveringstid og fordi det ikke bioakkumulerer i stor nok grad til at strålingen gir signifikant biologisk effekt (Sheppard et al. 2005). Naturlig uran, utarmet uran og anriket uran regnes for å ha de samme kjemiske egenskapene og den samme toksisiteten (Høibråten 2001). Risikoen for ekstern eksponering av uran er liten, intern eksponering er både vanligere og mer toksisk. Intern eksponering skjer etter inntak av uran, for mennesker og dyr kan dette skje via tre veier (engelsk: pathways) (Bleise 2002):

1. Fordøyelse gjennom mat og vann.
2. Inhalering av aerosol.
3. Gjensittende splinter/fragmenter eller forurensede sår.

Etter inntak gjennom fordøyelse vil noe uran metaboliseres til uranyl, et løselig ion (Rayner-Canham & Overton 2010). Uran kan dermed tas opp i blodstrømmen. Ca. 90 % av uranyl føres gjennom systemet og ut med ekskrementer, resten kan reagere med flere biologiske molekyler (Bleise 2002; Rayner-Canham & Overton 2010). *In vivo* pleier uran, grunnet kompleksing med fosfat, å ha relativt høy affinitet for skjelettet (Sheppard et al. 2005). Der kan det bli i årevis. Affiniteten for fosfat gjør også at uran kan forstyrre funksjonene til fosfolipider, nukleinsyrer og cystein i proteiner (Rayner-Canham & Overton 2010). Uran kan også gjøre stor skade på nyrer og kan krysse blod-hjerne-barrieren og så forårsake nerveskader (Barillet et al. 2007). Som følge av både dets kjemiske og radiologiske egenskaper kan uran indusere frie oksygenradikaler (engelsk: reactive oxygen species, ROS), og dermed føre til redoks-ubalanse i levende organismer (Wozniak 2002). Spesielt den lett-løselige forbindelsen UF_6 og de formene for uran som er løst ut i organiske væsker er farlige etter inntak gjennom fordøyelse (Sheppard et al. 2005).

Ved inhalering kan også tungtløselige oksider av uran ha effekt. Oftest gjelder dette utarmet uran, da dette kan forekomme som aerosol i tidligere krigssoner. Risikoen fra uraneksponering ved inntak er avhengig av uranspesiet sin løselighet. De forskjellige spesierne av uran deles inn i klassifikasjonene type S ("slow"), type M ("medium") og type F ("fast") basert på hvor lett-løselige de er (Bleise 2002). Uran inntatt i kroppen oksideres hovedsakelig til U_3O_8 , UO_2 eller UO_3 . Disse er alle relativt tungtløselige, UO_2 og UO_3 sin løselighet blir klassifisert som type S. U_3O_8 betraktes som

type M. UF_6 sin løselighet er klassifisert som F (Bleise 2002). Beregnede strålingsdoser for forskjellige organer etter inntak av utarmet uran vises under i Tabell 2.1.3.1 (Bleise 2002). Denne tabellene viser også forskjellen i beregnet strålingsdose etter eksponering fra utarmert uran til naturlig uran.

Tabell 2.1.3.1: Beregnede strålingsdoser etter inntak av 0.5 mg utarmet uran, utregnet etter en ICRP-modell (ICRP 66 1994). Vises med beregnet strålingsdose etter inntak av 0.5 mg naturlig uran som referanse.

Type	Effektiv dose (μSv)	Lunge (μSv)	Bein (μSv)	Lever (μSv)
Type S	61	500	3,4	0,46
Type M	22	170	26	3,5
Type F	3,7	2,3	65	8,9
Naturlig uran (type M)	460	940	18000	610

Som Tabell 2.1.3.1 viser er lungene et organ som er følsomt overfor stråling hvor tungtløselige tilstandsformer av utarmet uran kan deponeres som følge av inhalering, og dermed gjøre skade. Lungekreft er ikke et påvist endepunkt etter eksponering av uran via lunger. Selv om dokumenterte tilfeller av lungekreft blant gruvearbeidere fra urangruver eksisterer, skyldes dette eksponering av andre radionuklider som radon og thorium i synergisk effekt med røyking (Bleise 2002; Høibråten 2001).

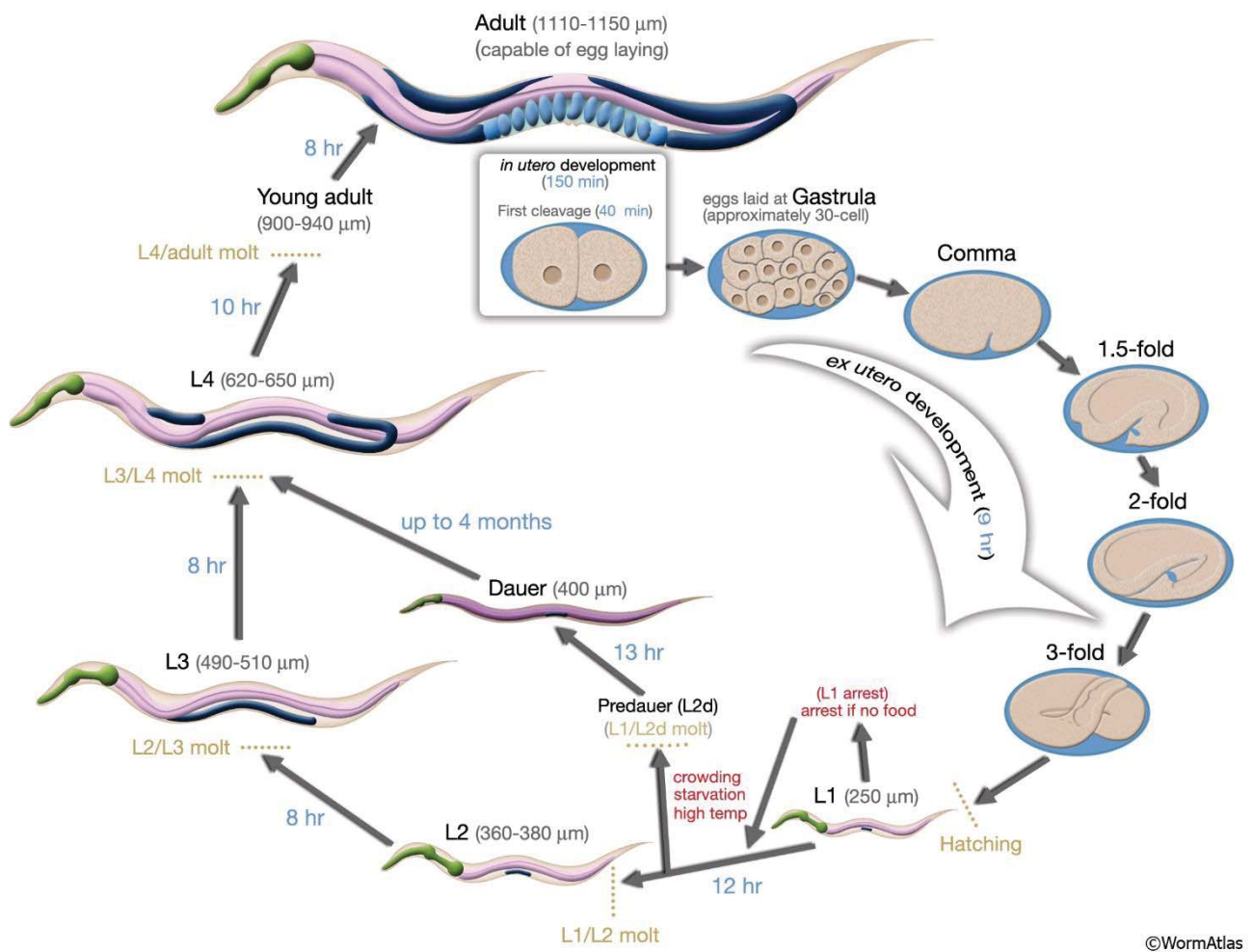
Inntak av uran via splinter/fragmenter eller forurensede sår kan forekomme, spesielt i aktive krigssoner, men er sjeldent (Bleise 2002). Vasking og sterilisering av forurensete sår og fjerning av splinter vil effektivt fjerne uranforurensingen, og det er bare i tilfeller dette ikke er mulig at denne inntaksveien kan føre til varig, skadelig eksponering fra uran (Bleise 2002).

2.2 *Caenorhabditis elegans*

2.2.1 Grunnleggende fakta

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) er en frittlevende, gjennomsiktig nematode (rundorm). Den spiser mikrober, primært bakterier, og finnes i jord mange steder i verden. Med en generasjonstid på rundt tre dager (ved 25 °C) og en utvokst lengde på ca. 1 mm regnes *C. elegans* som en god modellorganisme som ofte brukes til forskning. Den er enkel å kultivere i et laboratorium, har et kompakt genom og har en representativ utvikling for nematoder (Altun & Hall 2009). I et laboratorium kultiveres *C. elegans* på agar-plater eller i flytende medium med en bakterie (f.eks. *Escherichia coli*) som matkilde.

C. elegans er hermafroditter og reproduksjon skjer hovedsakelig ved selvbefruktning. Hvert individ kan legge mange egg. Noen individer (ca. 0.1 %) i en populasjon utvikler seg til hanner, disse sørger for genetisk variasjon ved å befrukte andre nematoder. Livssyklusen til *C. elegans* er delt inn i embryostadiet, fire larvestadier, og voksenstadiet (se Figur 5).



Figur 5: *C. elegans*' utviklingsstadier, hermafroditreproduksjon og livssyklus (Altun & Hall 2009).

Veksthastigheten i de ulike utviklingsstadiene er temperaturavhengig, for eksempel bruker egg ved ca. 25 °C 8-9 timer på å klekke mens ved ca. 16 °C tar det 16-18 timer (Altun & Hall 2009). Etter klekking følger fire larvestadier, L1, L2, L3 og L4. Overgangen mellom disse skjer ved et hamskifte, hvor den gamle ytterhuden kastes og en ny syntetiseres. Se Figur 6 for et bilde av en *C. elegans* ved L2 stadiet.



Figur 6: En *C. elegans* nematode i L2 stadiet i SSPW-løsning. Foto: Sondre Malme.

Etter disse stadiene blir nematoden voksen, og vil legge sine første egg. Dette skjer typisk 45-50 timer etter klekking (22-25 °C), og markerer ferdig livssyklus. Etter dette er en voksen nematode fruktbar i 3-4 dager og vil få ca. 300 avkom (dette kan drastisk økes om den befruktes av en hann). Etter at den ikke lenger er fruktbar kan den leve i ca. 10-15 dager til (Altun & Hall 2009).

Et fenomen som kan være en utfordring under arbeid med *C. elegans* er dauer. Hvis forholdene rundt nematodene ikke er ideelle for vekst kan en *C. elegans* larve ved L1 eller L2 gå over i dauer i stedet for neste stadium i livssyklusen (Hu 2007). Ugjestmilde forhold inkluderer høy temperatur (>27 °C), overbefolkning eller matmangel. Dauer er et arrest-stadium hvor nematoden ikke spiser, ikke eldes og har meget redusert bevegelse. Dette fungerer som en overlevelsesmekanisme som gjør at *C. elegans* kan overleve ugjestmilde forhold i opptil fire måneder. Hvis forholdene senere blir levelige så vil nematoden gå ut av dauer, begynne å spise, og skifte over til L4 stadiet (Altun & Hall 2009). Under laboratorieundersøkelser av *C. elegans* kan dauer være et problem hvis man er interessert i å ha en normal, kort livssyklus. For å unngå dauer er det viktig med nok mat, nok plass og egnet temperatur (18-25 °C).

2.2.2 Dokumenterte effekter av uran og pH på *C. elegans*

Tidligere forskning har vist negative effekter av uran på *C. elegans*. Dette inkluderer nedsatt vekst, redusert antall avkom, forlenget generasjonstid, nedsatt lengde, nedsatt kroppskrumming ("body bend") og nedsatt overlevelse. Disse effektene har vist tydelig effekt-dose sammenheng med de forskjellige konsentrasjonene uran brukt under disse eksperimentene (Dutilleul et al. 2013; Goussen et al. 2013). Ved urankonsentrasjoner fra 0.16 til 0.88 mM (Dutilleul et al. 2013) ble det også observert at disse negative effektene reduseres over flere generasjoner, sannsynligvis ved at nematodepopulasjonen adapterte seg. Ved konsentrasjoner ≥ 1.14 mM (Dutilleul et al. 2013) har det derimot blitt observert at de negative effektene forsterkes over flere generasjoner. Dosene har altså vært for store til at populasjonene kunne adaptere seg mot urans toksisitet. Således kan *C. elegans* regnes for å være en egnet organisme for å vurdere toksiske effekter av uran ved varierende konsentrasjoner.

Et miljø sin pH-verdi påvirker *C. elegans*, men signifikante effekter har bare blitt observert ved spesielt høye eller lave verdier (Khanna et al. 1997). På agar-plater (K-agar) har ingen signifikant økning i dødelighet blitt observert over en 96 timers periode i pH-intervallet 3.2 til 11.8. I vannløsning (MHRW, moderately hard reconstituted water) gjelder det samme for pH-intervallet 3.4 til 11.7 (Khanna et al. 1997). Disse intervallene omfatter vanlig norsk jord, da norsk dyrket jord oftest har pH mellom 5 og 7 og udyrket norsk jord ofte har pH mellom 4 og 5 (Bjørnå 2012). Disse intervallene omfatter også alle surhetsgradene som jord vanligvis deles inn i, utenom "sterkt surt" og "sterkt alkalisk" (vanLoon & Duffy 2010). I tillegg omfatter begge intervallene også alle NRCS (Natural Resources Conservation Service, en del av USAs Landbruksdepartement) sine pH-baserte jordklassifikasjoner, utenom "ultra surt" og "veldig sterkt alkalisk" (Cline et al. 1993). Dette viser at *C. elegans* har en naturlig toleranse for variasjon i pH.

2.3 Anvendte teknikker.

2.3.1 Kultivering av *C. elegans*

Under et forsøk med *C. elegans* bør nematodene kultiveres i et medium som kjemisk tilsvarer deres naturlige miljø (oftest porevann i jord). Ofte brukes en løsning av forskjellige salter (en artificial soil solution, ASS) eller en fast næringsagar. ASS kan imidlertid inneholde høye konsentrasjoner med klorider. Klorider kan føre til utfelling av giftstoffer, for eksempel sølv, noe som ikke er representativt for naturlig porevann (Tyne et al. 2013). På fast næringsagar blir kontakten mellom rundormene og et gitt giftstoff, som uran, mye mindre enn i naturlig porevann (Tyne et al. 2013). For best mulig å gjenskape de kjemiske forholdene til porevann i jord uten slike problemer ble det under dette studiet brukt simulated soil pore water (SSPW). Dette mediet gjenspeiler de kjemiske forholdene til porevann i jord bedre, kan justeres til å ha varierende betingelser (forskjellig pH osv.), og kunne få organisk materiale oppløst i seg slik at *C. elegans* hadde næring (Tyne et al. 2013).

Populasjoner med *C. elegans* kan kultiveres fram på NGM (nematode growth medium) næringsagarer med *E. coli* bakteriekulturer som næringskilde. Iht. standard protokoller for toksisitetstesting brukes synkroniserte populasjoner av *C. elegans* i eksponeringsforsøk (ISO/TC 2010). Dette kan gjøres ved å vaske nematodene av agaren og oppløse dem med en hypokloritt- og lutløsning slik at egg fra gravide nematoder kommer ut i løsningen. Reaksjonen med hypokloritt og lut må ikke pågå for lenge (maksimalt 6 minutter), da det vil drepe eggene. Hypokloritt og lut må så vaskes bort og eggene plasseres på fersk agar. Når disse klekkes kan forsøket begynne, nå med en populasjon hvor alle nematodene er ved L1-stadiet. Denne teknikken fjerner variabler. Så lenge forsøket er kortere enn 96 timer (ved 18 °C) vil mest sannsynlig nematodene ikke rekke å bli voksne og legge egg, altså vil antallet nematoder ikke endre seg. *E. coli*, og eventuelle andre bakterier eller mikroorganismer, fjernes også av denne synkroniseringen. Dette gjør at andre organismer ikke påvirker *C. elegans* sitt testmiljø. Hvis forsøket skal foregå over en lenger periode (>24 timer) så trenger nematodene mat. Da brukes varmeinaktivert *E. coli*, for å unngå at levende bakterier skal forbruke oksygen og påvirke forsøket.

2.3.2 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer)

Uran kan under et forsøk kvantifiseres ved ICP-MS analyse. ICP-MS er et

massespektroskopiinstrument som kan måle grunnstoffkonsentrasjoner i flytende prøver. Instrumentet tar inn prøver som ioniseres og fordampes til plasma som føres gjennom instrumentet med argonplasma. Forurensninger og interferenser fjernes fra dette plasmaet, før konsentrasjoner av analytter detekteres av en elektronmultiplikatordetektor (Agilent Technologies 2005). Grunnstoffene måles etter vekt, altså etter isotopenes masse. ICP-MS kan håndtere store prøveserier, har lave deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, kan håndtere både enkle og kompliserte matrikser, og kan gi informasjon om isotoper (Wolf 2005).

Instrumentet som skulle brukes under de aktuelle forsøkene var en Agilent 8800 QQQ ICP-MS. Denne hadde et dobbelt kvadrupoloppsett, det var altså en kvadrupol før og etter instrumentets kollisjon-reaksjonscelle. I et ICP-MS instrument er det kvadrupoler som skaper et komplekst magnetisk felt som skiller isotopene i prøvene etter masse/ladningsratio. Spektralinterferenser som polyatomære forbindelser, dobbeltladete ioner og isobare atomer, kan overlappe samme masse/ladningsratio som andre grunnstoffer og dermed forskyve signalet (Agilent Technologies 2005). I kollisjon-reaksjonscella kan slike interferenser motarbeides, med for eksempel kinetisk energidiskriminering ved tilsetning av heliumgass eller masseendring ved reaksjon med tilsatt oksyngengass (Agilent Technologies 2005). Et dobbelt kvadrupoloppsett gjør det mulig å fjerne uønskede grunnstoffer før eventuell reaksjon i kollisjons-reaksjonscella. Hvis det er ønskelig å reagere analytten med reaksjonsgass så er det dermed ingen andre stoffer tilstede som også kan reagere til nye interferenser (Agilent Technologies 2012). Noen grunnstoffer, som for eksempel uran, er imidlertid ikke spesielt utsatt for mange spektrale interferenser. Under analyse av slike er dermed bruk av bare en kvadrupol som regel tilstrekkelig for analyse av totalkonsentrasjoner.

Prøver som skal analyseres med ICP-MS dekomponeres ofte ved tilsetning av en egnet syre, eller en egnet løsning av flere syrer. Ett eksempel er HNO_3 , som vil oksidere organisk materiale slik at det blir helt oppløst. Syren må velges etter hva slags prøve som skal dekomponeres. HCl er kompleksbindende og god til å oppløse uorganisk materiale hvor det ikke er noe å oksidere (Berghof 2000). H_2SO_4 har et relativt høyt kokepunkt, men brukes sjeldent alene da mange forbindelser (som Ba^{2+} og Pb^{2+}) kan felle ut med SO_4^{2-} (Jensen 2014). HF er god til å løse silikater (Berghof 2000), men bruk av denne innebærer økt risiko og krever ekstra forholdsregler. HF kan også felle ut med Li , Mg , Sc , Y , Lu , Fe , Al , Th og i noen tilfeller Ca (Jensen 2014). For ICP-MS prøver som inneholder nematoder og *E. coli* er HNO_3 best egnet. Den gir få interferenser og er et sterkt

oksidasjonsmiddel som fungerer bra på organisk materiale (Berghof 2000; Jensen 2014).

2.3.3 Fraksjoneringsteknikker

For å separere forskjellige tilstandsformer i en prøve kan man bruke forskjellige fraksjoneringsteknikker. Disse vil ekskludere/holde igjen forskjellige tilstandsformer basert på teknikkens egne kriterier. Dette gjør at fordelingen av forskjellige tilstandsformer av samme grunnstoff i en prøve kan kvantifiseres, for eksempel ved at en ubehandlet del av prøven analyseres og sammenlignes med analyseresultatene fra en fraksjonert del av samme prøve. Eksempler på slike teknikker er membran filtrering, ultrafiltrering, sentrifugering ved høy hastighet, membran ultrasentrifugering. Valg av teknikk er avhengig av matriks og størrelse på prøve. I dette arbeidet er det fokusert på fraksjoneringsmetoder basert på små volum.

Sentrifugering ved høy hastighet vil påføre en prøve ekstra g-krefter, og dermed få store og tunge partikler til å felle ut. Dette kan brukes til å fraksjonere ut forskjellige tilstandsformer basert på størrelse, tetthet og form. Hva som felles ut styres av sentrifugens hastighet (antall omdreininger per minutt) og tid brukt på sentrifugering. Hastighet og tid kan justeres etter hvilke fraksjoner som er interessante, slik kan forskjellige tilstandsformer skilles ut med denne teknikken. Problemet med sentrifugering er at det kan være en unøyaktig teknikk, da partikler sjeldent er uniformt fordelt i størrelse og form. Dette gjør det vanskelig å få en klar fraksjonering. I tillegg kan store partikler under sentrifugering føre til med-utfelling, de kan altså føre med seg mindre partikler under utfelling. En høy partikkellkonsentrasjon kan også være et problem, da dette kan føre til sammenhoping og uønsket utfelling (Johnsen 2012).

Sprøytefilter filtrering holder igjen partikler i en løsning basert på filterets avgrensing ("cut-off"). Dette er en enkel teknikk som raskt separerer partikler etter størrelse. Sprøytefiltre, spesielt de fineste med avgrensning nede på nanometernivå, har lett for å klogge og kan dermed gi feil resultater. Dette er et mye mindre problem om man bruker sprøytefiltre med relativ høy avgrensing, på mikrometernivå eller grovere, men faren for tetting begrenser likevel bruksområdet til sprøytefiltre. Sprøytefiltre må kondisjoneres før bruk med et lite volum av den aktuelle løsningen. Dette volumet kastes etterpå. Å filtrere et stort volum over et sprøytefilter som ikke har blitt kondisjonert kan føre til at filteret revner, og vil innebære tap av analytt da analytten i de

tidligste volumene vil adsorberes til filteret.

Membran ultrasentrifugering er en fraksjoneringsteknikk hvor filtrering og sentrifugering kombineres. Teknikken utføres ved at en løsning tilsettes et spesielt prøverør med et membranfilter. Dette prøverøret sentrifugeres slik at løsningen filtreres gjennom membranfilteret. Membranfilteret vil holde igjen alle fraksjoner som er større enn membranens avgrensing, slik at bare partikler under en viss størrelse blir sentrifugert ned i bunnen av prøverøret. Membran ultrasentrifugering muliggjør fraksjonering på nanometernivå. Som sprøytefiltre må membranfiltre kondisjoneres før bruk både for å minimalisere risikoen for revning og for å unngå tap av analytt. Dette gjøres ved at et lite volum av den aktuelle løsningen sentrifugeres over membranen. Dette volumet kastes etterpå, og prøverøret (ikke membranen) må så tørkes før påfølgende filtrering av den faktiske prøven.

3. Utstyr og metode

Utstyr:

ICP-MS triple quad (Agilent Technologies 8800 QQQ)

Analysevekt

50 ml prøverør, plast

15 ml prøverør, plast

Eppendorfrør, plast

Labpapir

Pipetter

Datamaskin

Begerglass og målekolber

Akvariepumpe

Vortexer

Shaker (Labnet International, Enduro MiniMix)

Lukket shaker m. inkubatorfunksjon (Infors HT, Multitron Standard)

Inkubatorskap

Glasskolber (250 ml)

Glassflasker m. skrukork (500 ml)

Varmebad

Sentrifuge til eppendorfrør (Beckman Coulter Allegra 64R Centrifuge)

Sentrifuge til 15 ml og 50 ml plastrør (VWR Eppendorf Centrifuge 5804R)

Mikrotiterplate m. 6 brønner (Thermo Fischer Scientific, Nunclon Delta Surface)

Mikrotiterplate m. 24 brønner (Becton Dickinson Labware, Multiwell 24 well)

Glasselektrode (11363-F01, Radiometer)

pH-meter (pH/ION 735, Inolab, WTW)

Ultracentrifugeringsfiltre (Amicon Ultra-0.5 ml, ultracel-3 kDa, (EMD Millipore 2014))

Sprøytefilter (GHF acrodisc 25 mm syringe filter w/0.2 µm GHP membrane, Life Sciences)

Sprøyter til sprøytefilter (1 ml, BD Plastipak)

Toppfilter til flasker (WHP International. Toppfilter PES 0.20 µm, 50 mm, 250 ml)

1 ml engangspipetter av plast

Mikroskop (Wild Heerbrugg, Plan 1x)

Autoklav (SC 500 Matachana, Thune Produkter)

Kjemikalier og løsninger:

Generelt:

Milli-Q vann

$\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fluka Analytical, assay spec 98.0-102%, CAS 13520-83-7)

NaNO_3 (Sigma-Aldrich, assay spec ≥ 99.0 %)

25 % NH_3 (VWR International, AnalaR NORMAPUR, assay spec ≥ 30.4 %)

HNO_3 (69 % (w/w), ultra pure kvalitet)

Sukrose (Merck, P. code: 1.07651.1000)

Hypokloritt (Sigma-Aldrich, reagent grade 10-15 %)

NaOH (Sigma-Aldrich, pellets, assay spec ≥ 97.0 %, CAS 1310-73-2)

ICP-MS:

HNO_3 (69 % (w/w), ultra-pure kvalitet)

Husstandard 1642H, med 1.0 μg U/l (Teien 2014)

Medier:

Bacto tryptone (OX01D LP0042)

Gjærekstrakt (OX01D LP0021)

NaCl (Merck, pro analysi)

Kolesterolpulver (Sigma-Aldrich, assay spec ≥ 99 %, CAS 57-88-5)

Etanol (Sigma-Aldrich, assay spec ≥ 99.5 %, CAS 64-17-5)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, pro analysi, assay spec ≥ 99.5 %)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, pro analysi)

KOH (Merck, pro analysi)

KH_2PO_4 (VWR International, assay spec ≥ 100 %)

Bakteriologisk agar (Sigma Aldrich, CAS 9002-18-0)

Na_2HPO_4 (Merck, pro analysi, assay spec ≥ 99.5 %)

SSPW:

NaHCO_3 (VWR International, assay spec = 100 %)

KNO_3 (Merck, pro analysi, assay spec ≥ 99.0 %)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (VWR International, assay spec ≥ 98.4 %)

MgSO_4 (Sigma-Aldrich, assay spec ≥ 99.5 %)

Na₂HPO₄ x 12H₂O (Sigma-Aldrich, assay spec ≥98.5 %, CAS 7558-79-4)

Jernstandard (1000 µg/ml, (Alfa Aesar 2013b))

Aluminium standard (1000 µg/ml, (Alfa Aesar 2013a))

Organismer:

Escherichia coli, OP50

Caenorhabditis elegans

3.1 Metodeoversikt for eksponering av *C. elegans*

3.1.1 Tillaging av arbeidsløsninger og medium

Først ble arbeidsløsninger av uranylnitrat (UO₂(NO₃)₂·6H₂O) og soil solution pore water (SSPW) laget. Uranylnitratløsningen ble laget ved å løse 4.2472 gram fast uranylnitrat i 100 ml Milli-Q vann. Denne arbeidsløsningen hadde dermed en urankonsentrasjon på 0.1001 M, altså 23.84 g U/l.

SSPW-løsningen ble laget som beskrevet av Tyne et al. (2013). Stokkløsningskonsentrasjon etter fortynning var 0.1 M for alle kjemikaliene, unntatt jern- og aluminiumstandard. Det ble laget fem batcher av 500 ml SSPW (Tabell 3.1.1.1). For å ekvibrere pH mot atmosfærisk CO₂ ble batchene boblet i 48 timer. Det ble opparbeidet og brukt 0.10 M og 1.0 M HNO₃ løsninger til pH-justering av SSPW-løsningene. De fem batchene ble pH-justert til pH 7.5, 7.0, 6.5, 6.0 og 5.5. Etter dette ble løsningene filtrert med et 0.20 µm toppfilter for å fjerne eventuelle uønskede mikroorganismer.

Tabell 3.1.1.1: Tillaging av stokkløsninger, og volumer brukt til å lage en SSPW batch. I tillegg ble HNO₃ (1.0 M) brukt til å titrere pH, totalvolumet ble justert til 500 ml med vann. Kjemikaliene markert med grått var allerede løst til oppgitt konsentrasjon.

Kjemikalier	Mw (g/mol)	Gram per 250 ml (g)	Konsentrasjon etter fortynning (M)	Volum tilsatt til 500 ml SSPW (ml)	Konsentrasjon i SSPW (mM)
NaHCO ₃	84,01	2,1439	0,10	20,0	4,1
KNO ₃	101,11	2,5848	0,10	5,00	1,0
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	236,15	5,8768	0,10	6,25	1,2
MgSO ₄	120,37	3,0229	0,10	2,50	0,50
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O			0,10	0,0050	0,0010
HNO ₃			0,10	0,50	0,10
Iron Standard (Alfa Aesar 2013b)			0,0179	0,280	0,010
Aluminium Standard (Alfa Aesar 2013a)			0,037	0,135	0,010

For å opparbeide kulturer med *C. elegans* ble først *E. coli* OP50 dyrket på fire petriskåler med nematode growth medium (NGM) agar. 200 µl med *E. coli* OP50 ble overført fra en prekultur til de fire agarplatene, dette ble utført aseptisk med pipette i sterilbenk. Disse brønnene ble inkubert ved romtemperatur i 18 timer. Fra en stamkultur med *C. elegans* ble så fire 1.0 cm² biter med agar kuttet ut og overført, én bit til hver skål med *E. coli*. Dette ble utført aseptisk med skalpell i sterilbenk, og bitene ble lagt med den tidligere toppflaten ned i *E. coli* kulturene. De fire petriskålene ble så inkubert ved 25 °C i fem dager.

Flere arbeidsløsninger ble forberedt. Disse skulle brukes til å lage tre medier, som igjen skulle brukes til kultivering av *C. elegans* i eksperimentet. Arbeidsløsningene ble laget etter oppskrift fra ISO/TC (2010), se Tabell 3.1.1.2. En av disse, kolesterolarbeidsløsningen, var tidligere opparbeidet etter denne oppskriften. Den besto av 500 mg kolesterolpulver løst i 100 ml etanol (ISO/TC 2010).

Tabell 3.1.1.2: Oppskrifter for arbeidsløsninger brukt til å lage *C. elegans* kultiveringsmedium.

Kjemikalie brukt	Nominell konsentrasjon (M)	Gram per 1000 ml (g)	Behandling
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,0	147	Løst i 1000 ml vann før autoklaving ved 121 °C i 20 min.
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,0	247	Løst i 1000 ml vann før autoclaving ved 121 °C i 20 min.
KH ₂ PO ₄	1,0	136	Løst i 1000 ml vann, pH ble justert til 6,0 med KOH, før autoclaving ved 121 °C i 20 min.

De tre mediene som ble laget var NGM (nematode growth agar-medium), LB-medium (lysogeny broth medium) og M9-medium (M9-buffer). Disse ble også laget etter oppskrift fra ISO/TC (2010), se Tabell 3.1.1.3 under.

Tabell 3.1.1.3: Oppskrifter for dyrkingsmedier brukt for propagering av *C. elegans*.

Medium	Kjemikalier brukt	Gram brukt (g)	Volum tilsatt (ml/l totalt volum)	Behandling
LB-med.	Bacto tryptone	0,50		Kjemikaliene ble løst i 50 ml vann før autoclaving ved 121 °C i 20 min.
	Gjærekstrakt	0,25		
	NaCl	0,50		
NGM-agar	Bacto tryptone	2,50		Kjemikaliene ble løst i 972 ml vann før autoclaving ved 121 °C i 20 min.
	Bakteriologisk agar	17,0		
	NaCl	3,00		
	Kolesterolarbeidsløsning		1,00	Disse kjemikaliene ble tilsatt flytende NGM-agar (ca. 55 °C) før støping av brønner.
	CaCl ₂ (1,0 M)		1,00	
	MgSO ₄ (1,0 M)		1,00	
	KH ₂ PO ₄ (1,0 M)		25,0	
M9-buffer	Na ₂ HPO ₄	6,00		Kjemikaliene løst i 1000 ml vann.
	KH ₂ PO ₄	3,00		
	NaCl	5,00		
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,25		

NGM-agar ble brukt til å støpe agarskåler. 3 cm og 10 cm petriskåler ble fylt med NGM til de var 2/3 fulle, før de så ble satt på kjølerom til de skulle brukes. 10 cm agarplatene ble brukt til kultivering av *E. coli* og *C. elegans*, mens 3 cm agarplatene ble brukt sammen med M9 til synkronisering av *C. elegans*. LB ble brukt til å opparbeide varmeinaktivererte *E. coli* kulturer som skulle brukes som næringskilde til nematodene.

3.1.2 Synkronisering av *C. elegans* og varmeinaktivering av *E. coli*

Før forsøkene måtte test-kulturene med *C. elegans* synkroniseres. For at det skulle være nok egg før synkroniseringen måtte skålene med kulturene inkuberes i fem dager. Prosessen begynte med å tilsette 5 ml M9 oppi brønnen. Denne ble så virvlet rundt over agaren slik at nematodene ble fanget opp i M9 mediet. De 5 ml ble etterpå pipetert over i et 15 ml prøverør, før dette røret så ble sentrifugert i ett minutt ved 280 g. Supernatanten ble så fjernet, før M9 ble tilsatt opp til 3.5 ml. Til dette ble så 384 µl hypokloritt, 500 µl 5M NaOH og 616 µl M9 tilsatt. 5 M NaOH var tillaget ved å blande ut 20.1 g NaOH pelleter i 100 ml vann.

Hypokloritten og NaOH ble tilsatt for å oppløse alle nematoder ved alle livsstadier i løsningen, utenom egg. For å akselerere denne reaksjonen ble prøverøret vortexet noen sekunder hvert minutt i seks minutter. Etter dette ble prøven sentrifugert ved 280 g i ett minutt, før supernatanten ble fjernet og M9 tilsatt opp til 5 ml. Dette vasketrinnet ble gjentatt én gang før røret ble tilsatt 5

ml M9-buffer, sentrifugert ved 280 g i et minutt, supernatanten fjernet og eggene (pelleten) re-suspendert i 1 ml M9. Denne milliliteren ble så overført til en 3 cm agarskål. Klekking ble indusert ved å inkubere agarskålen med forsiktig risting ved 25 °C i 18 timer.

For å opparbeide *E. coli* til forsøkene ble 200 µl av en kultur med *E. coli* OP50 tilsatt til 100 ml LB-medium i en 250 ml glasskolbe. Denne ble så satt på en lukket shaker, som holdt 37 °C, i 18 timer. Så ble volumet fordelt på to 50 ml prøverør, som ble sentrifugert på 5000 g i ti minutter. Supernatanten ble fjernet, og rørene vasket med 50 ml vann og samme sentrifugeringsprogram. Supernatanten ble igjen fjernet, før pelletene ble løst i 5 ml med SSPW (pH 5.5). Begge disse løsningene ble overført til samme 50 ml prøverør, hvor SSPW ble tilsatt til et totalt volum på 25 ml. Dette prøverøret ble så plassert i et 70 °C varmebad i 20 minutter for å varmeinaktivere *E. coli*-kulturen.

3.1.3 Eksponering av *C. elegans* nematoder

Hvert forsøk inneholdt en parallell per pH-verdi som skulle undersøkes. Hver parallell inneholdt fire mikrotiterplater med seks brønner hver (Nunc Delta Surface, Figur 7). Nominelle pH-verdier ble oppnådd ved å tilsette SSPW med riktig pH i alle brønnene. Hver mikrotiterplate hadde seks brønner, én til en kontrollprøve uten uran og én per urankonsentrasjon som skulle testes. 0.10 M arbeidsløsningen med uranyl nitrat ble fortynnet slik at 0.020 ml ble tilsatt til hver testbrønn, uansett konsentrasjon.



Figur 7: Mikrotiterplate med seks brønner brukt til eksponering av *C. elegans*. Foto: Sondre Malme.

To av mikrotiterplatene per parallell ble tilsatt uran og nematoder. En plate var til testing av nematodedød ved eksponering av uran. Den andre mikrotiterplaten var til pH-måling og ICP-MS analyse, slik at dette kunne gjøres uten å påvirke eksponeringsresultatene. Både ved forsøkets start og slutt ble pH i brønnene målt med glasselektrode og prøver ble tatt til ICP-MS analyse.

En mikrotiterplate per parallell ble tilsatt uran, men ikke nematoder. Denne var også til pH-måling og ICP-MS analyse. Både ved forsøkets start og slutt ble pH i brønnene målt med glasselektrode og prøver ble tatt til ICP-MS analyse. Eventuelle forskjeller fra denne platen til de andre platene ville vise om nematodene eller *E. coli* hadde effekt på urans tilstandsformer eller pH.

En mikrotiterplate per parallell ble tilsatt natriumnitrat istedenfor uranyl nitrat. Dette var for å teste effekten av nitrat alene på nematodene. En 0.20 M arbeidsløsning med NaNO_3 ble tillaget med 1.6942 g NaNO_3 løst ut i 100 ml vann. Nominell konsentrasjon i brønnene på denne platen var tilsvarende nitratkonsentrasjonene i brønnene på de andre platene. 0.20 M arbeidsløsningen med NaNO_3 ble fortynnet slik at 0.020 ml ble tilsatt til hver brønn, uansett konsentrasjon.

Hva de forskjellige brønnene på platene ble tilsatt vises i Tabell 3.1.3.1. En visuell oversikt over de fire platene brukt per parallell, og hva brønnene deres inneholdt, gis under i Figur 8.

Tabell 3.1.3.1: Oversikt over løsninger som ble blandet for å oppnå 2 ml testløsning benyttet i de ulike forsøkene.

Mikrotiterplate	Med uran, men ikke nematoder		Med uran og nematoder	Med uran/natriumnitrat og nematoder	Med natriumnitrat og nematoder
Brønn	Testbrønn uten nematoder	Kontroll uten uran og nematoder	Testbrønn	Kontroll	Kontroll med natriumnitrat
60, 20, 2,0, 0.20 eller 0.020 mM natriumnitratløsning (ml)	0	0	0	0	0,020
30, 10, 1,0, 0.10 eller 0.010 mM uranylnitratløsning (ml)	0,020	0	0,020	0	0
<i>E. coli</i> i SSPW (ml)	0	0	0,100	0,100	0,100
Nematoder i SSPW (ml)	0	0	0,100	0,100	0,100
SSPW (ml)	1,98	2,00	1,78	1,80	1,78
Totalt volum (ml)	2,0	2,00	2,0	2,00	2,0



Figur 8: De fire mikrotiterplatene som ble brukt per parallell, med innhold. Innhold markert med grått ble ikke brukt under alle forsøk, og "eller" mellom urankonsentrasjoner betyr at disse ble brukt ved forskjellige forsøk.

Tilsetning av nematoder til brønner skjedde ved at 1.00 ml SSPW (pH 6.5) ble tilsatt til 3 cm agarskålen med synkroniserte nematoder som hadde vært inkubert ved 25 °C i 18 timer. SSPW ble virvlet rundt litt før 1.00 ml ble tatt ut og lagt under mikroskopet og antall *C. elegans* justert til ca. 200-500 pr ml. Fra denne ble 100 µl tilsatt hver brønn, som allerede nevnt i Tabell 3.1.3.1. Under tilsetning av nematoder ble antall per brønn telt med mikroskop, målet var ca. 30 i hver.

Mikrotiterplatene ble deretter inkubert ved 18 °C i 96 timer. Etter dette ble antall levende og døde nematoder på mikrotiterplatene telt, og prosent nematodedød ble regnet ut. Om ikke alle tilsatte nematoder ble gjenfunnet, enten som levende eller døde, så ble disse regnet som døde under utregning av prosent nematodedød.

3.1.4 Prøveopparbeidelse til ICP-MS analyse

For å bestemme konsentrasjon av uran og dokumentere % løst uran ved de ulike eksperimentelle betingelsene, ble både uran i total konsentrasjon og supernatanten av sentrifugert prøve bestemt vha. ICP-MS. For total konsentrasjon ble 100 µl prøve oppsluttet med 0.50 ml HNO₃ (69 % (w/w), ultra pure kvalitet) og fortynnet til 10 ml med Milli-Q vann (Johnsen 2012). For å måle løst uran ble 150 µl prøve sentrifugert ved 64396 g i én time. 100 µl av den resulterende supernatanten ble deretter oppsluttet og analysert på ICP-MS.

I tillegg til sentrifugering ble også prøver tatt ut ved forsøkets slutt og størrelsesfraksjonert med membran ultrasentrifugering, og sprøytefilter filtrering. Etablert inndeling av tilstandsformer basert på størrelse er som følger (IAEA 2011):

- Fragmenter: > 2 mm.
- Partikler: 0.45 µm - 2mm.
- Kolloider: 1 nm – 0.45 µm.
- Tilstandsformer med lav molekylær masse: < 1 nm.

Totalfraksjonen inneholder alle fragmenter, partikler, kolloider og materiale med både lav og høy molekylær masse. Filtrering med sprøytefilter fjernet partikler slik at fraksjonen inneholdt kolloider og materiale med både lav og høy molekylær masse (<0.2 µm cut-off). Supernatanten til prøvene

som var ultrasentrifugert eller sentrifugert inneholdt materiale med lav molekylær masse (ca. <1-4 nm cut-off), altså løst uran (Johnsen 2012). Etter ICP-MS analyse ville forskjellen i uraninnhold fra de fraksjonerte prøvene til totalfraksjon vise endringer i tilstandsformer av uran som funksjon av pH.

Membran ultrasentifugering ble utført ved å bruke <3 kDa sentrifugeringsfiltre til eppendorfrør. Disse måtte kondisjoneres først, dette ble gjort ved å tilsette og sentrifugere 200 µl SSPW med lik nominell pH som den aktuelle prøven. Sentrifugeringsprogrammet brukt her var 14000 g i 30 minutter, etter produktkatalogen til membranfiltrene (EMD Millipore 2014). Filtrert SSPW ble etterpå kastet og røret ble tørket. Så ble 200 µl fra prøven tilsatt, og sentrifugert ved 14000 g i 30 minutter som anvist i katalogen (EMD Millipore 2014). 100 µl av den filtrerte prøven ble deretter oppsluttet og analysert på ICP-MS.

Sprøytefilter filtrering innebar bruk av 0.2 µm sprøytefilter og 1 ml sprøyte. 200 µl av de aktuelle prøvene som skulle filtreres ble først filtrert igjennom for å kondisjonere filtrene. Disse volumene ble så kastet. Etter det ble 200 µl av prøvene tilsatt og filtrert igjennom. 100 µl av den filtrerte prøven ble deretter oppsluttet og analysert på ICP-MS.

Basert på resultatene fra ICP-MS analyse av kontroll-løsningene med SSPW ble så deteksjonsgrensen (limit of detection, LOD) og kvantifiseringsgrensen (limit of quantification, LOQ) for metoden regnet ut etter henholdsvis Likning 3.1.4.1 og Likning 3.1.4.2 under. Nøyaktigheten til ICP-MS analysen ble sjekket mot en husstandard (1642H), som hadde et uraninnhold på 1,0 µg/l (Teien 2014). Analyseprogrammet som ble brukt på alle prøvene fulgte spesifikasjonene gitt i Tabell 3.1.4.1.

Likning 3.1.4.1: Deteksjonsgrense (µg/l) = 3 * standardavviket av resultatene for alle kontrollprøvene (µg/l)

Likning 3.1.4.2: Kvantifiseringsgrense (µg/l) = 10 * standardavviket av resultatene for alle kontrollprøvene (µg/l)

Tabell 3.1.4.1: Spesifikasjonene for ICP-MS programmet brukt til å analysere prøvene.

Informasjonen er gitt på engelsk for å bevare ICP-MS terminologi.

Gas mode	No-gas, single quad
Power (W)	1550
Nebulizer gas flow (L/min)	1,07
Dwell time (sec)	2
Wash use	5 % (v/v) of nitric acid, 15 sec between samples
Sample introduction	Loop injection (ISIS II)
Calibration	Two point, 0 µg/l and 100 µg/l of uranium
Calibration curve check	Against house standard (1643H)
Other information	Quantification at mass 238: cps for ²³⁵ U and ²³⁸ U were added because the isotope ratio for depleted Uranium is different from "natural" Uranium (U = 235cps+238cps)

3.2 Eksperimentelle spesifikasjoner for pilotforsøk, vurdering av urans toksisitet mot *C. elegans*

Det første pilotforsøket skulle teste den utarbeidete metoden, identifisere interessante urankonsentrasjoner og kartlegge eventuelle utfordringer. pH-verdiene 6.0 og 7.5 ble undersøkt mot urankonsentrasjonene 0.30 mM, 0.10 mM, 10 µM, 1.0 µM og 0.10 µM. Kontroll-løsningene med natriumnitrat inneholdt 0.60 mM, 0.20 mM, 20 µM, 2.0 µM og 0.20 µM natriumnitrat. Pilotforsøket ble utført etter metoden tidligere beskrevet (kap 3.1) med unntak av at ingen prøver ble fraksjonert med membran ultrasentrifugering eller sprøytefiltrering.

3.3 Kartlegging av uran sin løselighet i SSPW

Under tidlig utarbeidelse av metode var urankonsentrasjon 1.0 mM en aktuell konsentrasjon for mulig testing. Ved denne konsentrasjonen resulterte høy pH i grønn gul utfelling. Det ble også observert et kraftig fall i pH ved urankonsentrasjonene 0.10 mM og 1.0 mM. For å kartlegge effekter med hensyn på urankonsentrasjon og pH, ble et løselighetseksperiment planlagt og utført. Målet med dette eksperimentet var å kartlegge høyeste urankonsentrasjon som ikke felte ut i SSPW ved ca. pH 8.0 (antatt høyeste pH-verdi som kunne dukke opp i de andre forsøkene). Utfelling under hovedforsøket ville ikke vært optimalt. Det ville skapt ulike betingelser for de forskjellige SSPW-løsningene og ført til urepresentative ICP-MS analyser av uranfraksjonene.

For å kartlegge urans løselighet ble flere 3.0 ml prøver opparbeidet fra SSPW med varierende

urankonsentrasjoner og pH-verdier. Forskjellig pH ble oppnådd ved å tilsette varierende mengder 1.0 M HNO₃ eller 0.25 % (v/V) NH₃, før pH ble målt etterpå med glasselektrode. Løsningene fikk så stå ved romtemperatur i 48 timer før en visuell inspeksjon avgjorde om bunnfall hadde oppstått.

0.25 % (v/V) NH₃ ble laget ved å fortynne 0.50 µl 25 % (v/V) NH₃ opptil 50 ml med vann. Tilsetning av selv fortynnet NH₃ til SSPW med uran skapte øyeblikkelig bunnfall, så tilsetning av NH₃ måtte gjøres før tilsetning av uran. Dette gjorde spesifikke pH-verdier meget vanskelige å oppnå, derfor ble flere 3.0 ml prøver per urankonsentrasjon produsert. Disse hadde varierende mengde tilsatt NH₃ og HNO₃, slik at forskjellige pH-verdier ble testet. En oversikt over hva de forskjellige prøvene inneholdt, og hvilken pH de hadde, kan sees under i Tabell 3.3.1.

Tabell 3.3.1: Alle prøvene som ble opparbeidet for kartlegging av urans løselighet i SSPW.

Prøvenummer	Nominell urankons. (mM)	Tilsatt uranløsning (µl)	Tilsatt 1,0 M HNO ₃ (µl)	Tilsatt 0,25 % (v/V) NH ₃ (µl)	Tilsatt SSPW (ml)	pH målt
1	0,10	30,0		250	2,720	8,95
2	0,10	30,0	20,0		2,950	6,50
3	0,20	60,0		200	2,740	7,99
4	0,20	60,0	20,0		2,920	7,38
5	0,20	60,0	10,0		2,930	6,50
6	0,25	75,0	10,0		2,915	6,50
7	0,30	90,0		200	2,710	7,67
8	0,30	90,0			2,910	7,23
9	0,35	105		100,00	2,795	7,32
10	0,35	105			2,895	7,06
11	0,35	105	50,0		2,845	7,03
12	0,35	105	10,0		2,885	6,85
13	0,35	105	30,0		2,865	6,85
14	0,40	120		150	2,730	7,15
15	0,40	120			2,880	6,62
16	0,40	120	20,0		2,860	6,19
17	0,50	150		150	2,700	7,05
18	0,50	150			2,850	6,48
19	0,50	150	20,0		2,830	5,94
20	0,60	180		150	2,670	6,92
21	0,60	180			2,820	6,32
22	0,60	180	20,0		2,800	5,66
23	0,70	210		150	2,640	6,77
24	0,70	210			2,790	6,10
25	0,70	210	20,0		2,770	5,25
26	0,80	24,0		200	2,776	6,90
27	0,80	24,0			2,976	5,89
28	0,80	24,0			2,976	5,06
29	0,80	24,0	30,0		2,946	4,78
30	0,90	27,0		200	2,773	6,61
31	0,90	27,0			2,973	5,96
32	0,90	27,0	10,0		2,963	5,73

33	0,90	27,0	20,0		2,953	5,00
34	0,90	27,0	30,0		2,943	4,64
35	1,0	30,0		300	2,670	7,01
36	1,0	30,0		200	2,770	6,29
37	1,0	30,0		200	2,770	6,28
38	1,0	30,0			2,970	5,86
39	1,0	30,0	10,0		2,960	5,33
40	1,0	30,0	30,0		2,940	4,67
41	1,2	36,0		300	2,664	6,58
42	1,2	36,0			2,964	5,50
43	1,2	36,0	30,0		2,934	5,30
44	1,4	42,0		300	2,658	5,84
45	1,4	42,0			2,958	5,06
46	1,4	42,0	30,0		2,928	4,93

3.4 Eksperimentelle betingelser for testing av effekten av pH på urans toksisitet mot *C. elegans*

Under dette forsøket skulle urans toksisitet mot *C. elegans* testes ved pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 og 7.5. Urankonsentrasjonene som ble brukt var 90 µM, 10 µM, 1.0 µM og 0.10 µM. Kontroll-løsningene med natriumnitrat inneholdt 0.20 mM, 20 µM, 2.0 µM og 0.20 µM natriumnitrat. Resultatene oppnådd fikk betegnelsen "Forsøk 1". Forsøket ble utført etter metoden tidligere beskrevet (kap 3.1) med følgende unntak:

1. SSPW-løsningene ble boblet i en uke (ca. 168 timer) i stedet for 48 timer.
2. Etter varmeinaktivert *E. coli* hadde blitt løst i 25 ml SSPW ble pH målt i denne løsningen.
3. Ved t = 0 ble ICP-MS prøver bare tatt fra brønnene med urankonsentrasjon 90 µM.

For å kompensere for den forsurende effekten uran hadde vist under pilotforsøket ble 0.10 mM uranløsningsopparbeidet i SSPW og pH justert (Tabell 3.4.1). Henholdsvis 1.8 ml og 0.20 ml av disse ble tilsatt brønnene som skulle ha urankonsentrasjon 90 µM og 10 µM.

Tabell 3.4.1: Hvor mye av hvilke kjemikalier som inngikk i produksjonen av pH-justerte SSPW-løsninger med 0.10 mM uran.

Nominell pH	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5
pH-verdi oppnådd (målt)	7,53	6,91	6,58	6,02	5,44
Volum uranløsning (10 mM) tilsatt (µl)	100	100	100	100	140
HNO ₃ (1,0 M) tilsatt (µl)	2,0	8,0	10	18	20
HNO ₃ (0,10 M) tilsatt (µl)	80	10	5,0	10	10
Volum av SSPW, justert til pH 7,5, brukt (ml)	9,818	9,882	9,885	9,872	13,83

4. 50 μ l, ikke 100 μ l, fra både fraksjonerte og ubehandlede prøver ble oppsluttet og analysert på ICP-MS.
5. Parallellene med pH 7.0, 6.5 og 6.0 SSPW ble utført på andre mikrotiterplater som hadde flere, men mindre, brønner (Multiwell 24 well, se Figur 9). Alle volumer tilsatt ble halvert for disse platene, totalvolumet per brønn var 1.0 ml. Målantall nematoder per brønn var ca. 20 for disse platene.



Figur 9: Mikrotiterplate med 24 brønner som ble brukt til eksponering av *C. elegans*. Foto: Sondre Malme.

6. Prøvevolumene tatt ut til måling av totalfraksjon og fraksjonering ved sentrifugering ble halvert for parallellene med pH 7.0, 6.5 og 6.0. Altså ble 75 μ l tatt ut til sentrifugering, og 25 μ l ble oppsluttet og analysert på ICP-MS.
7. Fraksjonering med membran ultrasentrifugering og sprøytefilter filtrering ble bare utført på prøver fra brønnene med 10 μ M uran. Dette var fordi resultatene for denne konsentrasjonen fra pilotforsøket viste tydelige pH-avhengige forskjeller (kap. 4.1). Derfor ble denne konsentrasjonen valgt til nærmere undersøkelse.

3.5 Eksperimentelle betingelser for testing av effekten av pH på urans toksisitet mot *C.*

elegans, repetisjoner ved urankonsentrasjon 10 μM

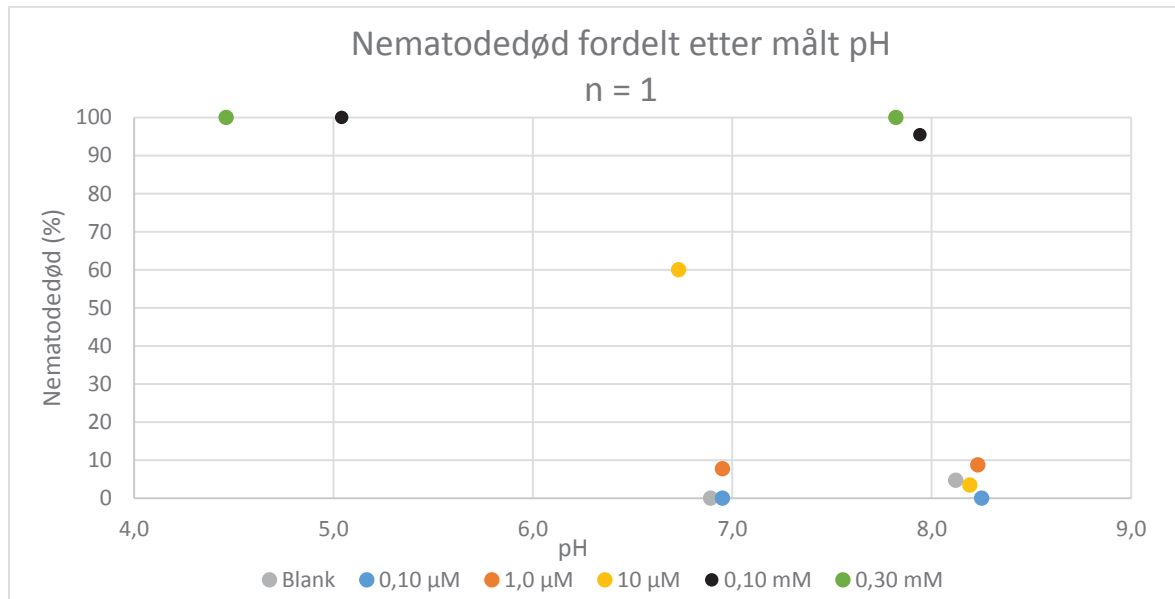
For å øke statistisk signifikans av data for effekt av pH på urans toksisitet, ble to repetisjoner utført. Disse ble gjort ved urankonsentrasjonen 10 μM , som resultatene fra pilotforsøket indikerte var en interessant konsentrasjon (se kap. 4.1). Repetisjonene inneholdt bare kontrollprøver og prøver med urankonsentrasjon 10 μM , ingen andre konsentrasjoner, med igjen ble pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 og 7.5 testet. Kontroll-løsningene var ved pH 5.5 og 7.5 (ytterpunktene). Resultater oppnådd under disse forsøkene fikk betegnelsene "Forsøk 2" eller "Forsøk 3", etter om de var fra henholdsvis første eller andre gjentakelse. Repetisjonene ble utført etter metoden tidligere beskrevet (kap 3.1) med følgende unntak:

1. SSPW-løsningene ble boblet i en uke (ca. 168 timer) i stedet for 48 timer.
2. Ved $t = 0$ ble det ikke tatt noen prøver til ICP-MS analyse.
3. For å kompensere for den forsurende effekten uran hadde vist under pilotforsøket ble pH-justerte SSPW-løsninger med 0.10 mM uran opparbeidet og brukt i brønnene som skulle ha urankonsentrasjon 10 μM (0.20 ml ble tilsatt).
4. 50 μl , ikke 100 μl , fra både fraksjonerte og ubehandlede prøver ble oppsluttet og analysert på ICP-MS.
5. Fraksjonering med sprøytefilter filtrering ble ikke utført.
6. Under disse repetisjonene ble ingen mikrotiterplater med natriumnitrat undersøkt, da oppnådde resultater var så tydelige på dette punktet at videre testing ble ansett som unødvendig (se underkap. 4.3.1).

4. Resultater

4.1 Resultater fra pilotforsøk for vurdering av urans toksisitet mot *C. elegans*

Pilotforsøket ble utført både for å teste metoden og vurdere urans toksisitet mot *C. elegans* ved forskjellige konsentrasjoner. Resultatene fra pH-måling og telling av død *C. elegans* etter eksponering av uran i SSPW under pilotforsøket kan sees under i Figur 10.



Figur 10: Antall døde nematoder i prosent plottet mot målt pH i SSPW-løsningene, punkter fargekodet etter nominell urankonsentrasjon i SSPW-løsningene. Basert på data fra A1.1 og A1.3.

Et teknisk problem gjorde at pH-målingene ved t = 96 t for mikrotiterplaten uten nematoder, med uran og med nominell pH 6.0 gikk tapt. Nematodedød ble fastslått for SSPW-løsningene med natriumnitrat, for å undersøke effekten av nitrat alene mot *C. elegans*. Resultatene for disse kan sees i Tabell 4.1.1.

Tabell 4.1.1: Prosent nematodedød i SSPW med natriumnitrat, n=1.

Nominell pH	Nominell konsentrasjon av natriumnitrat	Nematodedød (%)
7,5	0,60 mM	0,0
	0,20 mM	0,0
	20 µM	0,0
	2,0 µM	7,7
	0,20 µM	11
	Blank	4,8
6,0	0,60 mM	0,0
	0,20 mM	20
	20 µM	25
	2,0 µM	0,0
	0,20 µM	10
	Blank	0,0

Basert på standardavviket til ICP-MS resultatene for kontroll-løsningene med SSPW ble deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen for forsøket regnet ut, se Tabell 4.1.2. ICP-MS analyseresultatene for urankonsentrasjon 10 µM vises under i Tabell 4.1.3. Disse resultatene er basert på ICP-MS prøvene tatt ved t = 0, siden resultatene for prøvene som ble tatt ved t = 96 t fra SSPW med nominell pH 6.0 ble altfor lave (se A1.5). Dette skyldes at for små volumer ble tatt ut til ICP-MS analyse, altså en menneskelig feil. Kontrollmåling av husstandarden 1642H gav 1.1 µg U/l (skulle inneholde 1.0 µg U/l (Teien 2014)).

Tabell 4.1.2: Utrechnet deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) for uran under pilotforsøket (n = 8). 10 µM urankonsentrasjon tilsvarer 2380 µg U/l.

Deteksjonsgrense (µg/l)	Kvantifiseringsgrense (µg/l)
0,13	0,42

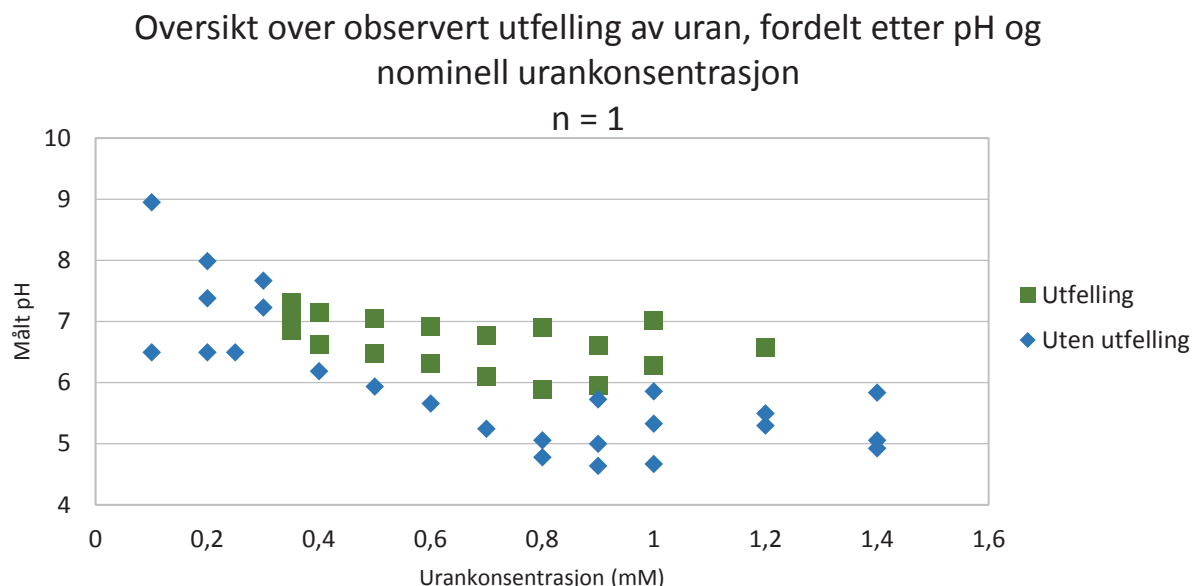
Tabell 4.1.3: ICP-MS resultatene fra prøvene tatt ved forsøkets start for SSPW med nominell urankonsentrasjon 10 µM, n=1.

Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Fraksjonering	Målt pH	Målt urankonsentrasjon (µM)	Prosent uranfraksjon løst (<1-4 nm)
7,5	Med	Ingen	8,3	11	
7,5	Med	Sentrifugering	8,3	11	99
6,0	Med	Ingen	6,8	7,8	
6,0	Med	Sentrifugering	6,8	1,1	14
7,5	Uten	Ingen	8,3	11	
7,5	Uten	Sentrifugering	8,3	11	98
6,0	Uten	Ingen	5,1	9,8	
6,0	Uten	Sentrifugering	5,1	9,9	100

4.2 Resultater fra kartlegging av uran sin løselighet i SSPW

Hensikten med løselighetseksperimentet var å kartlegge uran sin løselighet i

konsentrasjonsområdene og pH-intervallene som var aktuelle for hovedforsøket. Resultatene fra dette eksperimentet vises under i Figur 11.



Figur 11: pH plottet mot nominelle urankonsentrasjoner, fargekodet grønn for synlig utfelling og blå for ingen synlig utfelling. Basert på data fra A1.6.

4.3 Resultater fra testing av effekten av pH på urans toksisitet mot *C. elegans*

4.3.1 Nematodedød og pH

Hovedforsøket ble utført for å teste i hvilken grad urans toksisitet mot *C. elegans* varierte med varierende pH. Nominelle urankonsentrasjoner ble oppnådd med tilsetning av uranyl nitrat. For å undersøke effekten av nitrat alene mot *C. elegans* ble 25 kontroll-løsninger med SSPW og nematoder tilsatt natriumnitrat. Resultatene for disse løsningene kan sees under i Tabell 4.3.1.1.

Tabell 4.3.1.1: Gjennomsnittlig nematodedød med standardavvik for SSPW med natriumnitrat, n = 5 (25 løsninger, data sortert etter både nominell pH og nominell konsentrasjon). Basert på data fra A2.2.

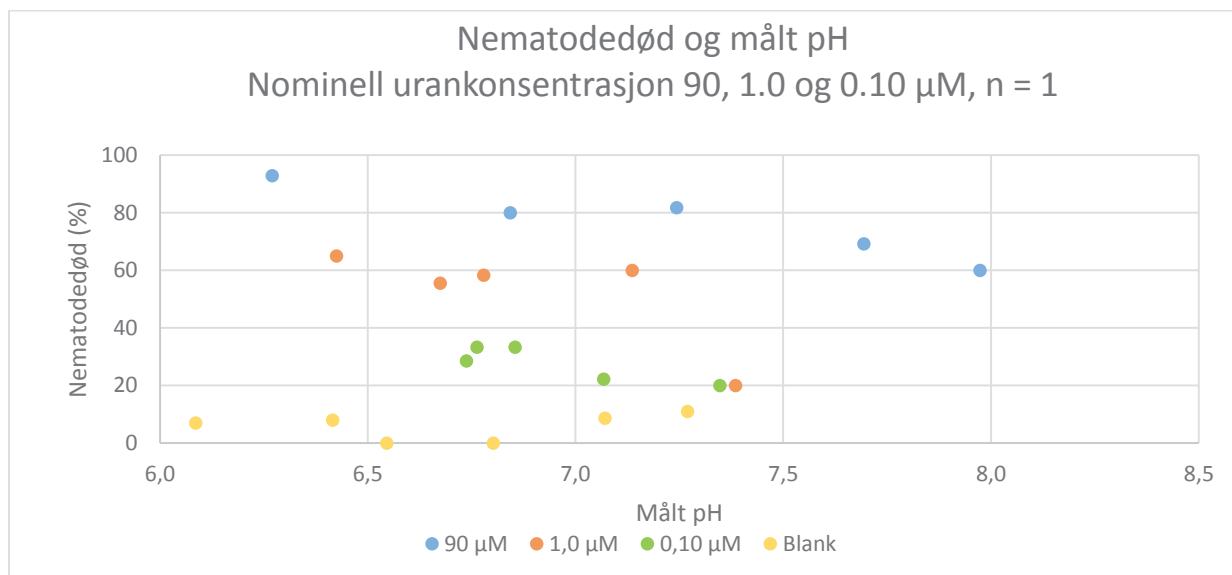
Sortert etter nominell pH	Sortert etter nominell natriumnitratkonsentrasjon	Nematodedød (%)	STA for nematodedød (%)
7,5		13	14
7,0		2	4,4
6,5		1	2,8
6,0		7	8,0
5,5		18	3,6
	0,20 mM	12	11
	20 µm	9	10
	2,0 µm	6	9,0
	0,20 µm	5	8,7

10 kontroll-løsninger ble anvendt for å undersøke naturlig dødelighet av *C. elegans*. En av disse, med nominell pH 5.5, viste 80 % nematodedød. Medregnet denne blir gjennomsnittlig nematodedød for alle kontroll-løsningene 12 % med standardavvik 22 %. Den nevnte kontroll-løsningen lå over tre standardavvik utenfor gjennomsnittet, og ble derfor regnet som en artefakt og følgelig ikke tatt hensyn til under resultatbehandlingen. Gjennomsnittet og standardavviket for kontroll-løsningene uten den nevnte artefakten kan sees i Tabell 4.3.1.2.

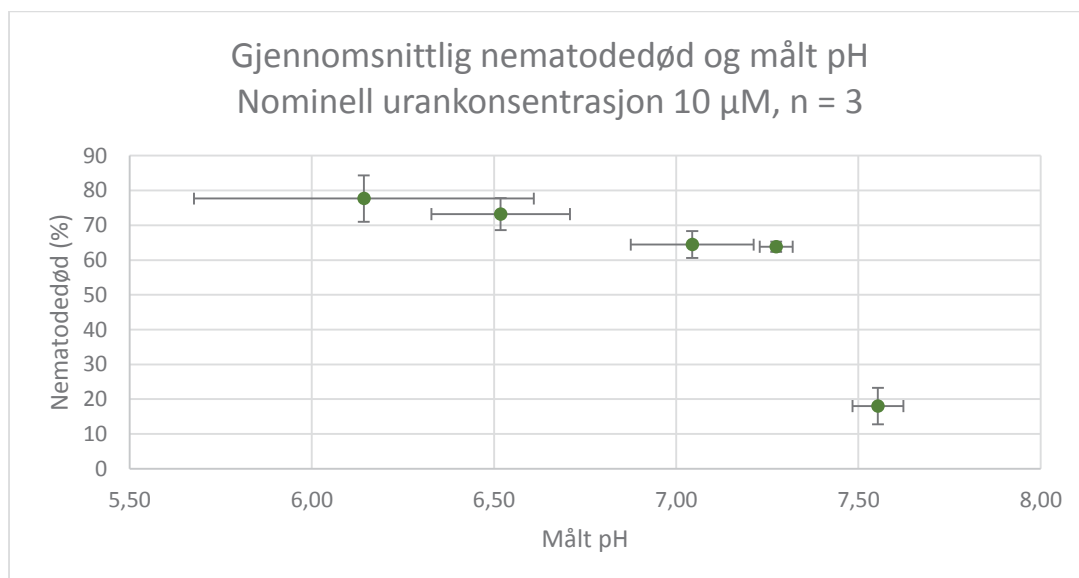
Tabell 4.3.1.2: Gjennomsnittlig nematodedød for alle kontroll-løsningene med tilhørende standardavvik, n = 11. Basert på data fra A2.1.

Nematodedød i kontroll (%)	STA for nematodedød i kontroll (%)
7	5,6

pH i SSPW med *E. coli*-løsningen som ble tilsatt alle løsningene med nematoder ble målt til 6.21. Under i Figur 12 vises nematodedød etter eksponering av uran for alle SSPW-løsninger utenom de med 10 µM uran. Gjennomsnittresultatene for disse løsningene, med standardavvik, vises i stedet i Figur 13. Etter figurene følger Tabell 4.3.1.3. Denne viser en oversikt over målt pH og endring av pH fra SSPW-løsninger uten *E. coli* og nematoder til løsninger med.



Figur 12: Observert nematodedød plottet mot målt pH for kontroll-løsningene og for SSPW med nominell urankonsentrasjon 90, 1.0 og 0.10 µM. Basert på data fra A2.1 og A2.3.



Figur 13: Gjennomsnittlig nematodedød plottet mot gjennomsnittlig pH for SSPW med nominell urankonsentrasjon 10 µM. Viser med standardavvik for både pH og nematodedød. Basert på data fra A2.4.

Tabell 4.3.1.3: Gjennomsnittlig økning i pH fra SSPW uten *E. coli* og nematoder til SSPW med. Viser også gjennomsnittlig målt pH for de samme SSPW-løsningene. Alle løsningene hadde nominell urankonsentrasjon 10 µM, n = 3. Basert på data fra A2.3.

Økning i pH	pH i SSPW uten nematoder	pH i SSPW med nematoder	STA for økning i pH	STA for pH i SSPW uten nematoder	STA for pH i SSPW med nematoder
0,05	7,50	7,55	0,047	0,027	0,070
0,1	7,17	7,27	0,08	0,033	0,045
0,2	6,8	7,0	0,11	0,26	0,17
0,6	5,89	6,5	0,15	0,044	0,19
1,1	5,0	6,1	0,50	0,10	0,47

4.3.2 ICP-MS målinger av uran, resultater for kontroll-løsninger og løsninger med nominell urankonsentrasjon 90, 1.0, eller 0.10 µM

ICP-MS målinger av prøver fra SSPW-løsningene ble tatt for å bestemme de faktiske anvendte urankonsentrasjonene og for å kartlegge endring av urans tilstandsformer ved hjelp av fraksjonering. De utregnete deteksjonsgrensene og kvantifiseringsgrensene for hovedforsøket (kap. 3.4 og kap. 3.5) kan sees i Tabell 4.3.2.1. Alle kontrollprøvene var under kvantifiseringsgrensene. Resultatene for kontrollmåling av husstandard 1642H kan sees i Tabell 4.3.2.2.

Tabell 4.3.2.1: Deteksjonsgrensene og kvantifiseringsgrensene for forsøkene. Basert på data fra A3.1. 10 µM urankonsentrasjon tilsvarer 2380 µg U/l. Basert på data fra A3.1.

Deteksjonsgrense for "Forsøk 1" (µg/l), n = 10	Kvantifiseringsgrense for "Forsøk 1" (µg/l), n = 10	Deteksjonsgrense for repetisjonene (µg/l), n = 4	Kvantifiseringsgrense for repetisjonene (µg/l) n = 4
0,060	0,20	0,004	0,014

Tabell 4.3.2.2: Resultatene for ICP-MS analyse av husstandarden 1642H, som skulle inneholde 1.0 µg U/l (Teien 2014).

Husstandard 1642H	Målt uraninnhold (µg/l)
"Forsøk 1"	1,0
Repetisjoner	1,0

De målte resultatene for SSPW-løsningene med nominell urankonsentrasjon 1.0 eller 0.10 µM inneholdt flere verdier lavere enn kvantifiseringsgrensen. Én av disse, en prøve som hadde nominell pH 5.5, urankonsentrasjon 0.10 µM og som var tatt fra SSPW med nematoder og *E. coli*, inneholdt derimot 29 µM uran. Prøvene fra SSPW med 90 µM uran inneholdt også en artefakt.

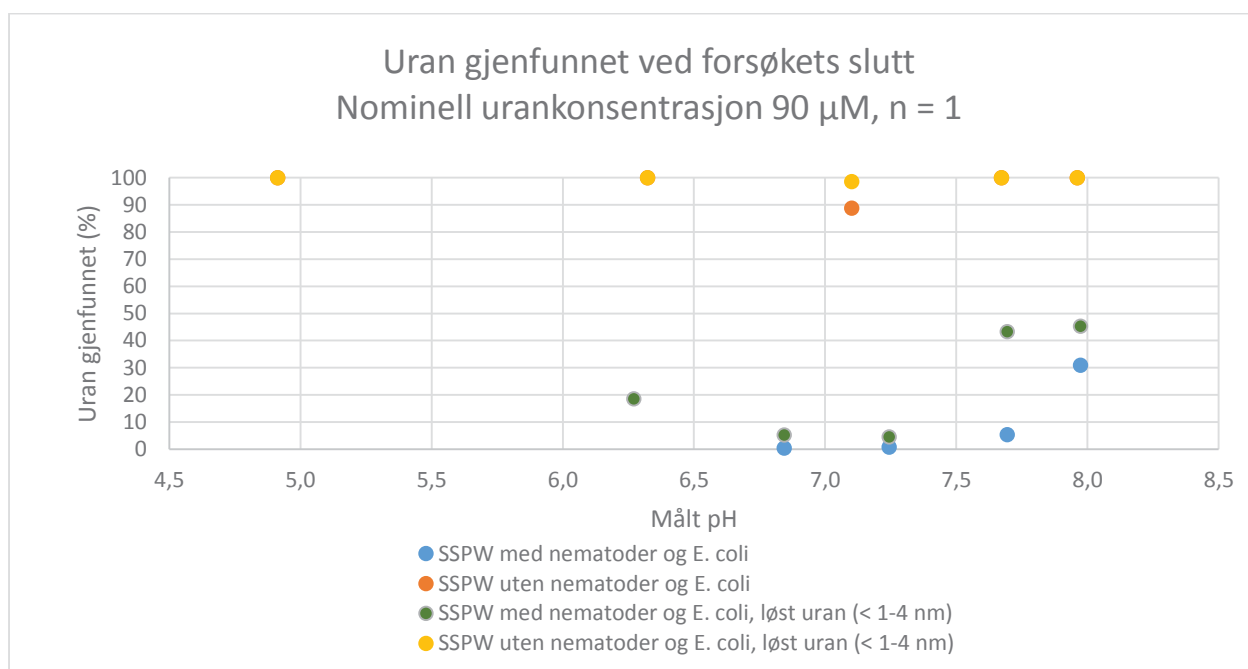
Denne prøven, som også hadde nominell pH 5.5 og som var tatt fra SSPW med nematoder og *E. coli* ved forsøkets start, var under deteksjonsgrensen. Begge disse artefaktene tilskrives at feil volumer ble tatt ut til ICP-MS analyse, altså en menneskelig feil. Gjennomsnittlig urankonsentrasjon for prøvene fra SSPW-løsninger med 90, 1.0 og 0.10 μM nominell urankonsentrasjon kan sees i Tabell 4.3.2.3.

Tabell 4.3.2.3: Gjennomsnittlig målt urankonsentrasjon SSPW med 90, 1.0 eller 0.10 μM nominell urankonsentrasjon. Basert på data fra A3.2.

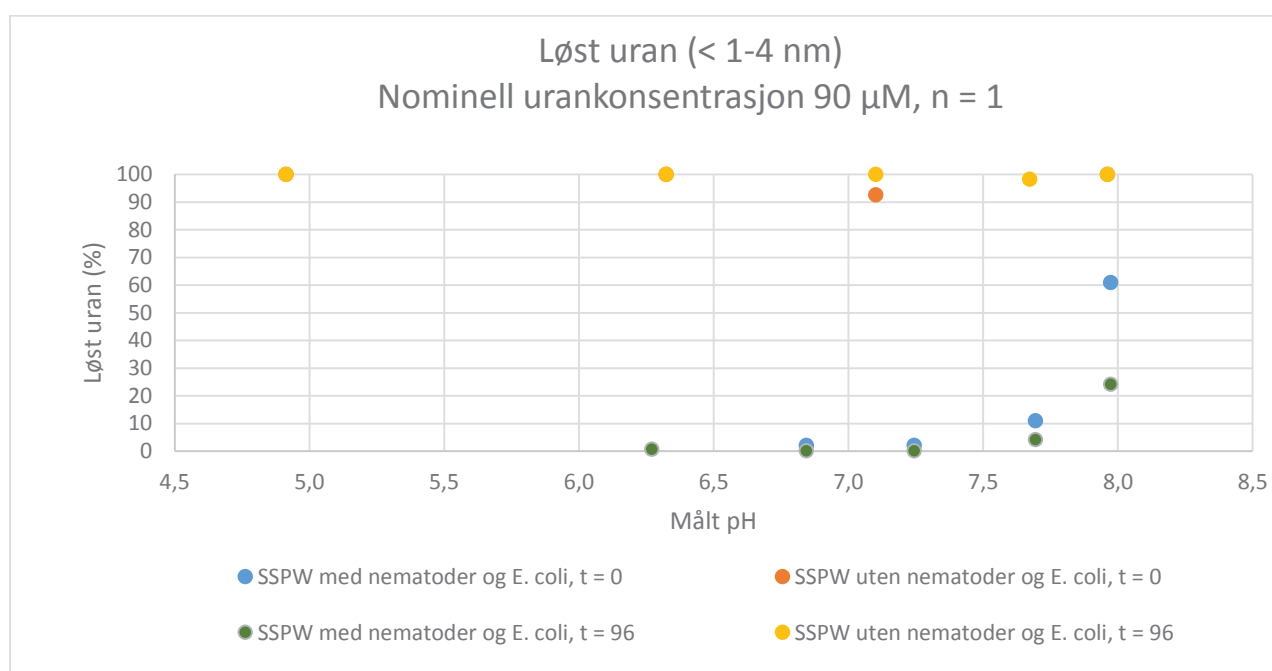
Nominelle urankonsentrasjoner (μM)	SSPW med nematoder		SSPW uten nematoder (μM), n = 5
	Gjennomsnitt (μM)	Antall prøver (n)	
0,10	0,54*	4	0,68*
1,0	0,48*	5	0,47*
90, t = 0	67	4	81
90, t = 96 t	11	5	87

* annoterer at dette gjennomsnittet er basert på en eller flere verdier under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

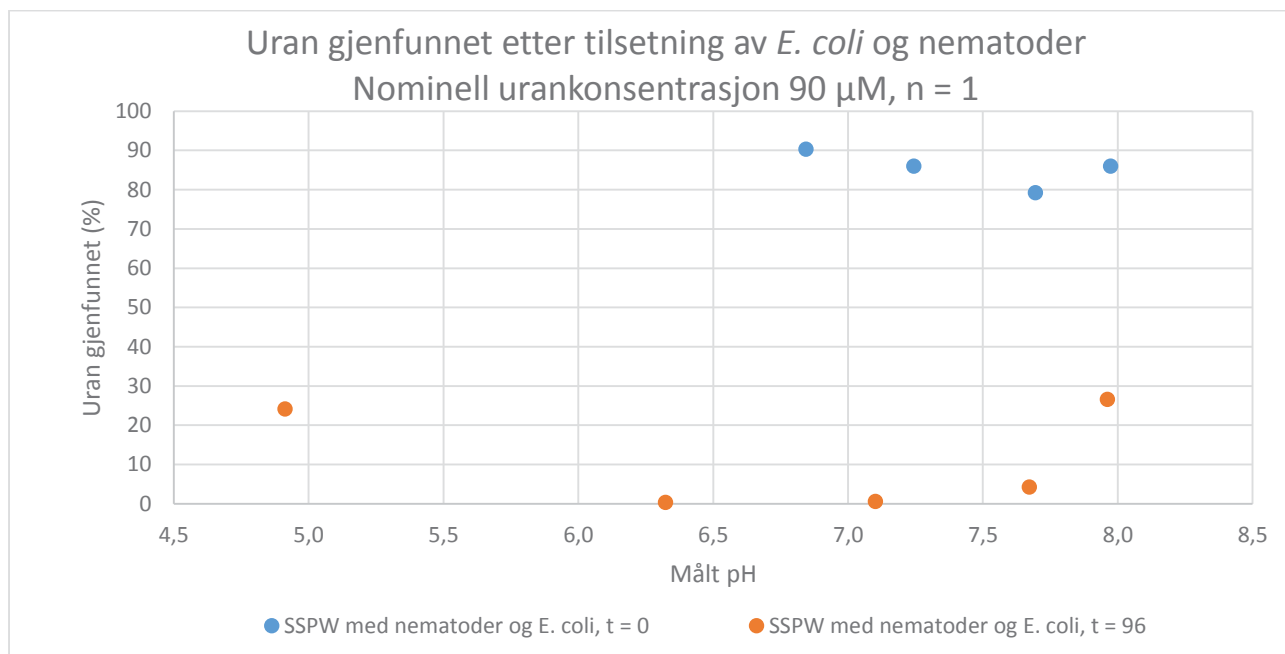
Fra SSPW med nominell urankonsentrasjonen 90 μM ble prøver tatt både ved t = 0 og ved t = 96 t. I Figur 14 under vises hvor mye av uran, i prosent av konsentrasjonene målt ved t = 0, som ble gjenfunnet i prøvene tatt ved t = 96 t. Denne tabellen viser endring i urans tilstandsformer over tid. Videre viser Figur 15 prosent løst uran (< 1-4 nm) av totalfraksjon målt i de sentrifugerte prøvene. Til sist viser Figur 16 hvor mange prosent av uraninnholdet i SSPW uten *E. coli* og nematoder som ble gjenfunnet i SSPW med *E. coli* og nematoder. Denne figuren viser effekten av nematoder og *E. coli* på endring av urans tilstandsformer.



Figur 14: Prosent urankonsentrasjon gjenfunnet fra forsøkets start til forsøkets slutt plottet mot målt pH-verdi i SSPW-løsningene. Basert på data fra A3.4.



Figur 15: Prosent urankonsentrasjon gjenfunnet i sentrifugerte prøver plottet mot målt pH-verdi i SSPW-løsningene prøvene ble tatt ifra. Basert på data fra A3.5.

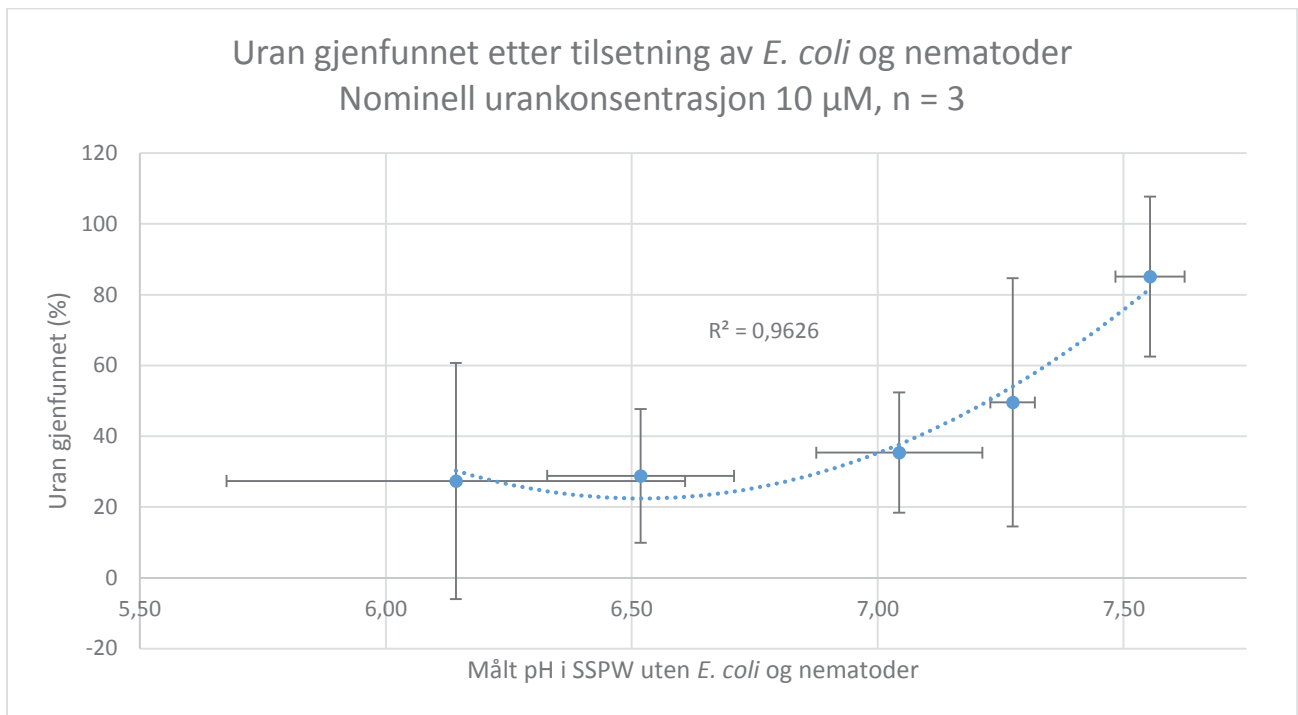


Figur 16: Prosent urankonsentrasjon gjenfunnet i SSPW med *E. coli* og nematoder plottet mot målt pH-verdi i SSPW. Basert på data fra A3.6.

4.3.3 ICP-MS målinger av uran, resultater for SSPW-løsninger med nominell urankonsentrasjon 10 µM

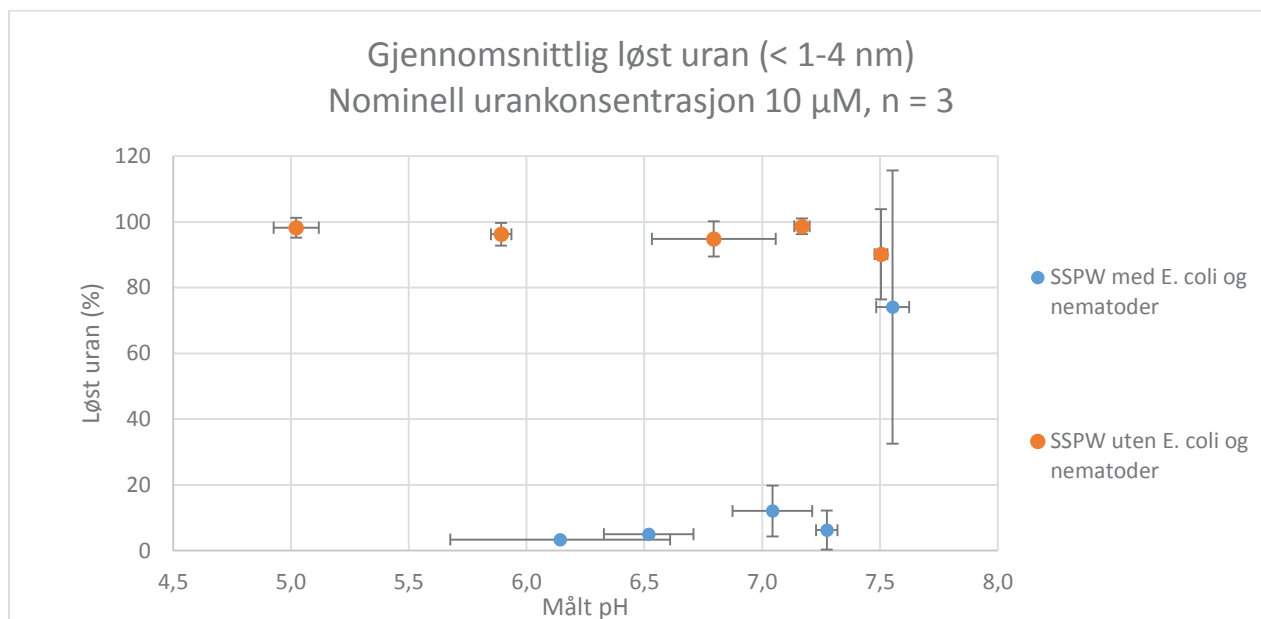
Tre replikater ble utført ved nominell urankonsentrasjon 10 µM for å øke statistisk signifikans av data. Rådata fra ICP-MS målinger av SSPW med denne konsentrasjonen kan sees i A3.3. De målte pH-verdiene for de samme SSPW-løsningene kan sees i A2.3.

I Figur 17 vises hvor mange prosent av målt urankonsentrasjon i SSPW-løsningene uten *E. coli* og nematoder som ble gjenfunnet i SSPW med *E. coli* og nematoder.

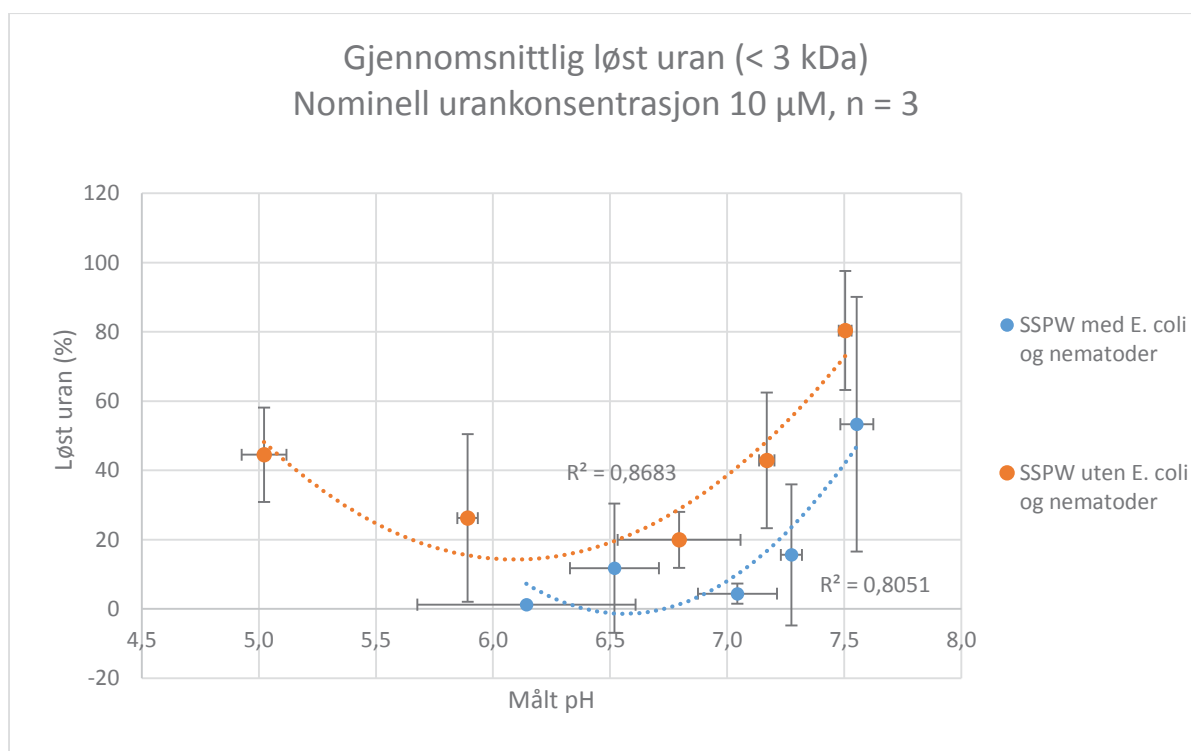


Figur 17: Gjennomsnittlig urankonsentrasjon gjenfunnet i SSPW med *E. coli* og nematoder plottet mot målt pH-verdi i SSPW. Viser med standardavvik for pH og uran gjenfunnet. Polynomisk trendlinje (m. tilhørende R^2 -verdi) inkluderes for presentasjon. Basert på data fra A3.7.

Flere prøver med nominell urankonsentrasjon 10 µM ble fraksjonert ved hjelp av sentrifugering ved høy hastighet og membran ultrasentrifugering. Prosent løst uran (< 1-4 nm) av totalfraksjon, basert på de sentrifugerte prøvene, kan sees i Figur 18, mens prosent løst uran (< 3 kDa) av totalfraksjon, basert på de ultrasentrifugerte prøvene, kan sees i Figur 19 under.

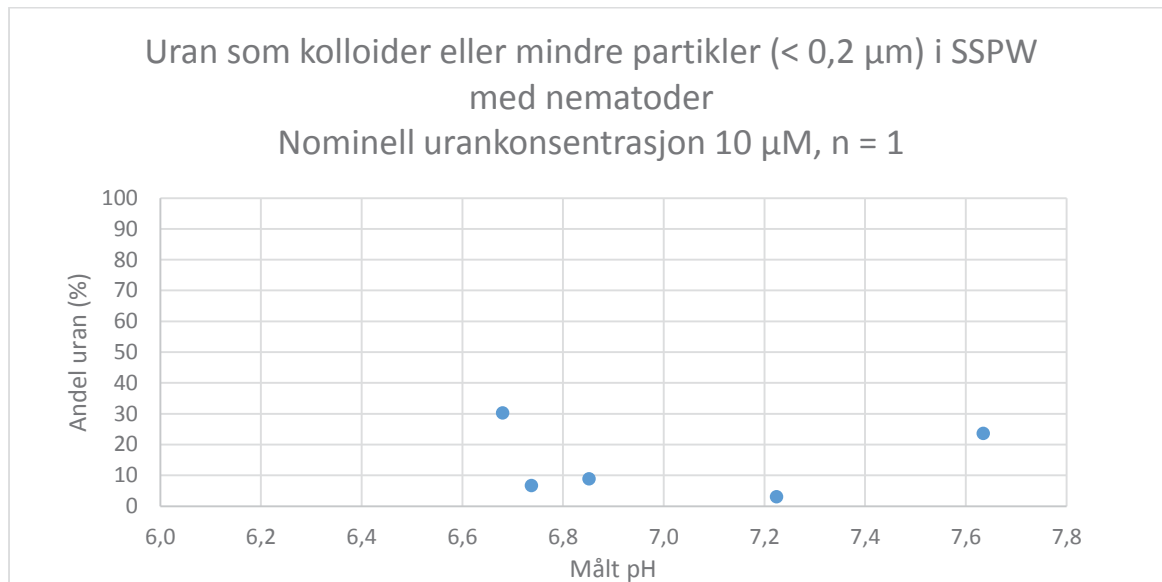


Figur 18: Gjennomsnittlig løst uran (< 1-4 nm) basert på fraksjonering ved høy-hastighets sentrifugering plottet mot målt pH-verdi i SSPW. Viser med standardavvik for pH og uran. Basert på data fra A3.8.



Figur 19: Gjennomsnittlig løst uran (< 3 kDa) basert på fraksjonering ved membran ultrasentrifugering plottet mot målt pH-verdi i SSPW. Viser med standardavvik for pH og uran. Polynomiske trendlinjer (m. tilhørende R^2 -verdier) inkluderes for presentasjon. Basert på data fra A3.9.

Prøver fra SSPW med nematoder, *E. coli* og nominell urankonsentrasjon 10 µM ble sprøytefilter filtrert slik at fraksjoner over 0.2 µm ble holdt igjen. Andel uran som kolloider eller mindre partikler (< 0.2 µm) ble regnet ut basert på disse prøvene, og vises under i Figur 20.



Figur 20: Uran som kolloider eller mindre partikler (< 0.2 µm) basert på fraksjonering ved sprøytefilter filtrering plottet mot målt pH-verdi i SSPW. Basert på data fra A3.10.

5. Diskusjon

5.1 Analytiske og metodiske aspekter

Deteksjons- og kvantifiseringsgrensene (fra pilotforsøket og hovedforsøket) var lave i forhold til de valgte konsentrasjonene av uran, og alle blankprøvene viste målte nivåer lavere enn kvantifiseringsgrensene. Med hensyn på ICP-MS sensitivitet viser dette at det ble jobbet rent under både pilot- og hovedforsøket. Får å få lave deteksjons- og kvantifiseringsgrenser var det viktig å unngå kontaminasjon, siden selv små forurensende konsentrasjoner kunne forskyve resultatet (Agilent Technologies 2005). Måling av husstandarden 1642H under hovedforsøket samsvarte bra med standardens innhold på 1.0 µg U/l, og viser at ICP-MS målingene har vært nøyaktige. Måling av husstandarden under pilotforsøket viste et 10 % avvik (se kap. 4.1). Siden pilotforsøket bare

skulle gi veiledende resultater for hovedforsøket ble dette vurdert til å være akseptabelt.

Stabilitet av pH i SSPW var en utfordring gjennom forsøkene. pH i flere av SSPW løsningene som ble benyttet under pilotforsøket ble mye høyere enn det de nominelt skulle bli (se A1.3). Dette skyldtes sannsynligvis SSPW sin bufferkapasitet, suboptimal bobling før forsøket og tilsetning av *E. coli* og nematoder. Bufferkapasiteten i SSPW kan ha spilt inn på SSPW-løsningene med nominell pH 7.5, da alle disse, med og uten *E. coli* og nematoder, hadde økt pH. Denne bufferkapasiteten var nok i større grad nøytralisert i SSPW med nominell pH 6.0, derfor var disse nærmere nominell verdi. Ved pH 6.0 er det imidlertid tydelig at tilsetning av *E. coli* og nematoder har ført til en økning i pH, da SSPW uten nematoder og *E. coli* hadde målte pH-verdier mye nærmere nominell verdi. SSPW løsningene med nominell urankonsentrasjon 0.30 eller 0.10 mM hadde for lav pH, grunnet uran sin forsurende effekt (se A1.3). Hensikten med pilotforsøket var blant annet å detektere faktorer som kunne påvirke hovedforsøket, som reduksjonene i pH grunnet uran og økningen i pH grunnet nematoder og *E. coli*. Grunnet disse observasjonene ble SSPW-løsningene boblet over lenger tid før hovedforsøket, og ferdig pH-justert SSPW med 0.10 mM urankonsentrasjon ble opparbeidet og anvendt ved urankonsentrasjon 90 og 10 μM .

Selv med økning i boblingstid, var nesten alle målte pH-verdier høyere enn de nominelle verdiene også under hovedforsøket (se A2.3). I likhet med pilotforsøket gjaldt dette særlig SSPW med tilsatte nematoder og *E. coli*, og spesielt for SSPW som skulle ha lavest pH (1.1 ± 0.10 endring ved pH 5.0 ± 0.50 mot 0.05 ± 0.047 endring ved pH 7.50 ± 0.027 , se Tabell 4.3.1.3). SSPW-løsningen med *E. coli* som ble tilsatt brønnene ble målt til pH 6.21, selv om SSPW brukt her i utgangspunktet var justert til 5.5. Det er tydelig at organisk materiale drev pH-verdiene oppover. Som under pilotforsøket var SSPW-løsningene med lav pH mer følsomme, igjen antagelig fordi bufferkapasiteten til SSPW i større grad var nøytralisert i disse løsningene. Det virker som metodens anvendelse av organisk materiale legger begrensning på hvor nøyaktig man kan beregne pH før forsøk. Resultatene vil derfor bli betraktet ut ifra målt pH (snitt av verdiene målt ved forsøkenes start og slutt) i stedet for den nominelle pH-verdien løsningene skulle ha. Denne variasjonen i pH gjorde det vanskelig å regne ut LC-50-konsentrasjoner som funksjon av pH.

Løselighetseksperimentet indikerte at en pH-verdi opptil 8.0 ikke vil føre til utfelling i SSPW med urankonsentrasjoner ≤ 0.2 mM (se Figur 11), men dette er ikke sikkert. Det kan ikke utelukkes at

ved lave urankonsentrasjoner kan den utfelte mengden ha vært så liten, eller brukt så lang tid på å felle ut, at det ikke ble observert. Usikkerheten rundt dette eksperimentet førte til avgjørelsen om at hovedforsøket (kap. 3.4) skulle utføres med 90 µM som høyeste konsentrasjon, ikke 0.2 mM. Det virker sannsynlig at bunnfallet som ble observert var uran som hadde reagert med fosfat i SSPW, gitt urans affinitet for fosfat (Dutilleul et al. 2013; Flury et al. 2000). Dette er imidlertid ren spekulasjon, da ingen kvalitativ kjemisk analyse ble utført på bunnfallet.

5.2 Nematodedød og pH, variasjon i urans toksisitet observert under forsøkene

Det er tydelig at sammenlignet med tidligere rapporterte resultater med *C. elegans* på agar, utført av Dutilleul et al. (2013), så er nematodene mye mer følsomme overfor uran i vandig løsning enn uran i agar. Dutilleul et al. (2013) brukte NGM agar, og testet med urankonsentrasjonene 0, 0.16, 0.48, 0.88, 1.14, 1.34, 1.57, 1.75, 1.97 og 2.53 mM. De observerte 100 % dødelighet etter 96 timer ved konsentrasjoner ≥ 1.57 mM, og fikk en LC-50 verdi på 1.71 ± 0.09 mM for 48 timers eksponering (Dutilleul et al. 2013). Til sammenligning, under denne oppgaven, førte nominell urankonsentrasjon 10 µM gjennomsnittlig til 59 % dødelighet. *C. elegans* er klart mer følsom overfor uran i løsning enn i agar. Dette skyldes sannsynligvis enten at fullstendig nedsenkning i en vandig løsning fører til større kontakt med uran enn på en agarplate eller en økning i urans biotilgjengelighet. Dette gjør bruk av agar til å teste effekten av miljøgifter på *C. elegans* lite økologisk relevant, noe som tidligere har blitt konstatert av Tyne et al. (2013).

Nematodedød for kontroll-løsningene (7 ± 5.6 %, se Tabell 4.3.1.2) viser at noen prosent naturlig dødelighet må påregnes for denne metoden. Dette ansees som lavt nok til å vise at metoden alene ikke var spesielt ugjestmild for *C. elegans*. Nematodedød i kontroll-løsningene sortert etter pH viser høyere dødelighet ved pH 7.3 (se Figur 12), men variasjonen er for stor til at dette kan skilles fra avviksområdet til kontroll-løsningene. Kontrollene gav tilfredsstillende lav prosent nematodedød.

Natriumnitrat har ikke hatt noen markant negativ effekt på *C. elegans*, uansett pH eller konsentrasjon. Ved doble standardavvik overlappet alle avviksområdene med avviksområdet til kontroll-løsningene (se Tabell 4.3.1.1 og 4.3.1.2). Dette vurderes som ingen markant forskjell fra kontroll-løsningene.

Under pilotforsøket ble en tydelig forskjell i dødelighet observert, fra 60 % for pH 6.7 til 3.4 % for pH 8.2. Dette ble observert i SSPW med 10 μ M urankonsentrasjon (se Figur 10). ICP-MS analyse viste at disse inneholdt henholdsvis 11 og 7.8 μ M uran (se Tabell 4.1.3), så det er fullt mulig at endringen i dødelighet kun tilskrives pH-verdier. Resultatene for eksponering ved 10 μ M uran viste stor pH-avhengig variasjon også for urans løselighet (se Tabell 4.1.3). Dette gjorde at prøver med denne konsentrasjonen ble valgt til fraksjonering ved membran ultrasentrifugering og sprøytefilter filtrering under hovedforsøket (kap 3.4). Det ble også bestemt at repetisjoner skulle utføres ved denne konsentrasjonen for å øke statistisk signifikans av data (kap. 3.5).

Under hovedforsøket ble ulike pH-verdier og urankonsentrasjoner testet. Den laveste dødeligheten var $18 \pm 5.2\%$. Dette ble observert i SSPW ved nominell urankonsentrasjon 10 μ M og pH 7.55 ± 0.070 (se Figur 13). Ved doble standardavvik overlappet denne både avviksområdet til kontroll-løsningene ($7 \pm 5.6\%$) og nematodedød ved høy pH for de nominelle urankonsentrasjonene 1.0 og 0.10 μ M (henholdsvis 20 % ved målt pH 7.4 og 20 % ved målt pH 7.3, se Figur 12). Effekten av uran i slike konsentrasjoner ved pH ≥ 7.4 kan altså, basert på disse resultatene, ikke skilles fra naturlig nematodedød. Ved pH under 7.4 var det bare ved nominell urankonsentrasjon 0.10 μ M at dødeligheten holdt seg i dette området (22 % ved pH 7.1, 33 % ved pH 6.8, 29% ved pH 6.7 og 33 % ved pH 6.9, se Figur 12). For 1.0 og 10 μ M var det en høyere dødelighet ved lavere pH, henholdsvis til 58 % ved pH 6.8 og til $64 \pm 1.5\%$ ved pH 7.27 ± 0.045 (se Figur 12 og Figur 13). Resultatene for nematodedød i SSPW med nominell urankonsentrasjon 90 μ M viste også pH-relatert effekt, fra 60 % dødelighet ved pH 8.0 til 93 % dødelighet ved pH 6.3 (se Figur 12). Forskjellene var ikke så store her som ved 10 eller 1.0 μ M, og et tydelig omslagspunkt ved pH 7.4 mangler. Dette kan bety at omslagspunktet øker med urankonsentrasjon. Det kan også bety at andre mekanismer dreper nematodene ved så høye urankonsentrasjoner, og at pH-avhengig toksisitet bare gjelder innenfor et lavere konsentrasjonsintervall. Det er imidlertid vanskelig å konkludere noe sikkert om pH-avhengige effekter på uran sin toksisitet ved 90 μ M, siden bare en forsøksserie ble utført. Dette gjelder også for 1.0 og 0.10 μ M.

Resultatene for eksponering med nominell konsentrasjon 10 μ M er sikrere, siden repetisjoner ble gjort på denne konsentrasjonen for å øke statistisk signifikans. Ved denne konsentrasjonen ble den sterkeste effekten av varierende pH observert; dødelighet ved pH ≤ 7.27 var signifikant forskjellig fra $18 \pm 5.2\%$ dødelighet ved pH 7.55 ± 0.070 (ingen overlapp ved doble standardavviksområder, se

Figur 13). Dette viser tydelig at pH påvirker urans giftighet mot *C. elegans*, noe som tyder på en endring av urans tilstandsformer. Det er også tydelig at det er et viktig omslagspunkt ved omtrent pH 7.4, hvor urans toksisitet som nevnt faller signifikant. De andre datapunktene for nominell urankonsentrasjon 10 µM vitner også om pH-avhengig endring av toksisitet, da 64 ± 1.5 % dødelighet ved pH 7.27 ± 0.045 og 64 ± 3.8 % dødelighet ved pH 7.0 ± 0.17 ikke overlapper avviksområdene til 73 ± 4.6 % dødelighet ved pH 6.5 ± 0.19 og 78 ± 6.7 % dødelighet ved pH 6.1 ± 0.47 (se Figur 13).

Disse resultatene stemmer overens med forskningen på hydra (nesledyr) populasjoner i vann fra Magela Creek (Australia), utført av Hyne et al. (1992). De observerte ingen effekter ved pH 8.5 (1000 ppb uran), men ved pH 6.5 (≥ 200 ppb uran) observerte de effekter på både overlevelse og populasjonsvekst (Hyne et al. 1992). Annen forskning, på urans effekt mot blåskjell *Velesunio angasi* (*V. angasi*) i kunstig Magela Creek ferskvann (Markich 2002), viste at pH-endring førte til femdobling av EC50 (Effect Concentration 50 %, konsentrasjon som reduserer et effektparameter med 50 % etter en viss tid). EC50 gikk fra 556 µg U/l ved pH 6.0 til 103 µg U/l ved pH 5.0. Begge disse tilfellene viste en klar endring i urans toksisitet med endring i pH.

5.3 Effekt av organisk materiale (død *E. coli*) og pH på urans tilstandsformer

SSPW-løsninger fra hovedforsøket med *E. coli* og nematoder ble målt til konsentrasjoner som var lavere enn de nominelle konsentrasjonene (se Tabell 4.3.2.3, A3.2 og A3.3). Disse målte konsentrasjonene varierte i tillegg kraftig med pH, så å bruke disse som sammenligningsgrunnlag for de fraksjonerte prøvene ville jevne ut forskjellene. Dette gjaldt også SSPW-løsningene brukt under pilotforsøket (se Tabell 4.1.3 og A1.5). Målt uran i SSPW-løsningene uten *E. coli* og nematoder lå mye nærmere de nominelle verdiene (se Tabell 4.3.2.3, A3.2 og A3.3). Disse urannivåene ble derfor ansett som totalfraksjon og sammenlignet med resultatene av de forskjellige fraksjoneringene. Sammenligning av prøver tatt ved forsøkets start og slutt fra de samme løsningene (med 90 µM nominell urankonsentrasjon), viste også at dette fallet i målt konsentrasjon økte fra forsøkets start til forsøkets slutt (se Figur 16).

Denne forskjellen i konsentrasjon fra SSPW med *E. coli* og nematoder til SSPW uten skyldes antagelig at uran har blitt kompleksbundet til *E. coli*. *E. coli* har en tendens til å adherere til overflater, bakteriene festet seg til platen i mikrotiterplatene. Dette har sannsynligvis økt

klebrigheten og redusert løseligheten til uran slik at det festet seg til plastbrønnene og ikke blitt med i ICP-MS prøvene. At uranyl danner komplekser med organisk materiale har tidligere blitt slått fast av blant annet Trenfield et al. (2011).

En annen mulig forklaring på hvorfor det ble målt mer uran i SSPW uten tilsatt *E. coli* og nematoder er at det organiske materiale kan ha påvirket bestemmelsen av uran ved å klogge ICP-MS instrumentet. Dette kan ha skjedd hvis salpetersyren som ble brukt ikke har vært tilstrekkelig til å dekomponere død *E. coli* og nematoder fullstendig. Dette er i så tilfelle en feilkilde, siden det betyr at ICP-MS har målt lavere enn faktiske verdier. Dette kunne vært unngått ved dekomponering enten med en ultraklav eller ved plassering av prøvene i et tilstrekkelig varmt varmebad. Denne feilkilden vurderes imidlertid som lite sannsynlig, da en slik systematisk feil ikke ville gitt tydelig pH-avhengig forskjell i de målte urannivåene. Variasjonene i urannivåene korrelerer også ikke med mengden observert organisk materiale i løsningene (se A2.1), noe som taler imot klogging.

De analyserte prøvene fra SSPW-løsningene med nominell urankonsentrasjon 90 µM gav flere interessante indikasjoner om endring av urans tilstandsformer i SSPW. Urankonsentrasjonene i SSPW med *E. coli* og nematoder var høyere ved forsøkets start enn ved forsøkets slutt (se Figur 14). Dette viser at uran ble mindre løselig med tid. Dette gjelder i liten grad for løsningene uten *E. coli* og nematoder, her er konsentrasjonene målt ved start og slutt nesten like. Denne endringen er også mindre i SSPW med målt pH 8.0 og 7.7 (henholdsvis 31 og 5.4 % gjenfunnet mot 0.78 % eller mindre for de andre pH-verdiene, se Figur 14). Fraksjonering ved høy-hastighets sentrifugering av prøver tatt ved forsøkets start og ved forsøkets slutt viser at nesten all uran i SSPW uten *E. coli* og nematoder var løst ut til tilstandsformer med lav molekylær masse (<1-4 nm). Nesten all uran fra SSPW med *E. coli* og nematoder forelå som større kolloider eller partikler (se Figur 15). Igjen viser SSPW med målt pH 8.0 og 7.7 større andel løst uran enn SSPW med lavere pH, både ved forsøkets start og ved forsøkets slutt (henholdsvis 61 og 11 % gjenfunnet mot 4 % eller mindre, og 24 og 4 % gjenfunnet mot 1.0 % eller mindre, se Figur 15). SSPW med nominell urankonsentrasjon 90 µM viste også tydelig effekt fra tilsetning av *E. coli* og nematoder på urans tilstandsformer, da tilsetning her førte til et kraftig fall i målt konsentrasjon sammenlignet med SSPW-løsninger uten *E. coli* og nematoder (se Figur 16). Alle resultatene for nominell urankonsentrasjon 90 µM var imidlertid bare basert på ett utvalg, og er derfor usikre.

Ved nominell urankonsentrasjon 10 μM ble det derimot gjort to repetisjoner for å øke statistisk signifikans av data. Her er det tydelig at pH påvirket hvor mye uran som ble adsorbert til overflater eller død *E. coli*. Ved høy pH (7.55 ± 0.070) ble 85 ± 23 % av uran målt i SSPW uten *E. coli* og nematoder funnet igjen i SSPW med *E. coli* og nematoder (se Figur 17). Dette området overlapper ikke med flere av avviksområdene for lavere pH, som 35 ± 17 % ved $\text{pH } 7.0 \pm 0.17$, 29 ± 19 % ved $\text{pH } 6.5 \pm 0.19$ og 27 ± 33 % ved $\text{pH } 6.1 \pm 0.47$ (Figur 17).

Ved nominell urankonsentrasjon 10 μM er endring i urans tilstandsformer på grunn av pH og tilsatt *E. coli* og nematoder også tydelig i de fraksjonerte prøvene. I de sentrifugerte prøvene fra SSPW-løsninger uten *E. coli* og nematoder var ca. 100 % av uran løst ut som tilstandsformer med lav molekylær masse (alle avviksområdene overlappet 100 %), og det var ingen klar pH-relatert effekt (se Figur 18). I prøvene fra SSPW med *E. coli* og nematoder var gjennomsnittlig prosent løst uran mye lavere for alle prøver unntatt de fra SSPW med høy pH ($\text{pH } 7.55 \pm 0.070$). Her var 74 ± 42 % løst, og avviksområdet overlappet ingen av de andre datapunktene. Nærmeste var 12 ± 7.7 % ved $\text{pH } 7.0 \pm 0.17$ (se Figur 18). Som resultatene for nematodedød viste ser det ut til å være et omslagspunkt ved omtrent pH 7.4. Ved pH 7.4 endrer antagelig uran tilstandsform, fra partikulært og giftig, til mindre giftig og med lav molekylær masse. Dette ble også observert under pilotforsøket, hvor 14 % av uran var løst ved pH 6.8 og 99 % var løst ved pH 8.3 (se Tabell 4.1.3). Antatt fordeling av tilstandsformer for uran etter pH i ferskvann med humus (Figur 2.1.3.3 fra underkap. 2.1.3), fra arbeidet til Markich (2002), tilsier at denne reduserte giftigheten kommer av uranholdig fulvat som endrer tilstandsform til $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ og $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$. Om dette er tilfellet for eksponeringsforsøkene utført kan ikke fastslås sikkert, siden andre parametere ble brukt enn under arbeidet til Markich (2002).

Det at så lite uran var løst i SSPW-løsninger med *E. coli* viser at uran i stor grad formet komplekser med *E. coli*, når dette var tilgjengelig. Dette stemmer overens med tidligere forskning på uran og organisk materiale (Markich 2002; Trenfield et al. 2011). I hvilken grad dødeligheten blant nematodene skyldtes at de spiste *E. coli* med adsorbert uran, eller kontakt med uran via cuticulum (overflate) er umulig å svare sikkert på basert på disse resultatene. Det virket sannsynlig at inntak av uran gjennom fordøyelse har vært den viktigste faktoren, da resultatene fra SSPW med høy pH viste lavere bindingsgrad til *E. coli* og lavere dødelighet, men dette kan ikke fastslås sikkert.

En serie med prøver fra SSPW med nominell urankonsentrasjon $10\text{ }\mu\text{M}$ ble sprøytefilter filtrert. 3-30 % av uran forelå her som kolloider eller mindre partikler ($< 0.2\text{ }\mu\text{m}$), men ingen pH-relatert korrelasjon for disse datapunktene var tydelig (se Figur 20). Disse resultatene var bare basert på ett utvalg prøver, så disse resultatene hadde derfor lav grad av sikkerhet.

De membran ultrasentrifugerte prøvene fra SSPW-løsninger med nominell urankonsentrasjon $10\text{ }\mu\text{M}$ og *E. coli* og nematoder viste forskjell fra prøvene ved $\text{pH } 7.55 \pm 0.070$ til prøvene ved $\text{pH } 7.0 \pm 0.17$ og 6.1 ± 0.47 (se Figur 19). Avviksområdet for løst uran ved $\text{pH } 7.55$ ($53 \pm 37\%$) overlappet ikke avviksområdene for de to andre nevnte datapunktene (henholdsvis $4 \pm 3\%$ og $1.2 \pm 0.24\%$). Imidlertid var ikke 100 % av uran løst i SSPW uten *E. coli* og nematoder, slik som fraksjonering ved høy-hastighet sentrifugering hadde vist. Her var mellom 20 og 80 % løst (se Figur 19). Teoretisk sett skulle membran ultrasentrifugering gi ca. lik fraksjonering som sentrifugering ved høy hastighet (Johnsen 2012). Dette avviket skyldtes antagelig menneskelig feil, da membranfiltrene skulle vært kondisjonert med prøveløsning, og ikke SSPW-løsning uten uran. Mangelen på slik kondisjonering førte trolig til at uran ble adsorbert til membranfilteret uansett tilstandsform. Dette gjør resultatene for alle de ultrasentrifugerte prøvene vanskelig å tolke. Likevel bør det merkes at det både i prøvene med og uten *E. coli* og nematoder var mer uran løst ved høy pH. I SSPW uten *E. coli* og nematoder var $80 \pm 17\%$ løst ved $\text{pH } 7.50 \pm 0.027$. Dette området overlappet ikke avviksområdene for noen av de andre løsningene uten *E. coli* og nematoder. Til tross for at dataene fra membran ultrasentrifugering er forbundet med systematisk, menneskelig, feil, så er det likevel mulig å se at en større andel av uran opptrer som materiale med lav molekylær masse i brønnene med $\text{pH } 7.55 \pm 0.070$. De polynomiske tilpasningene brukt for å vise sammenhengen mellom andel uran $< 3\text{ kDa}$ og pH (se Figur 19) stemmer godt overens med forskning på forvittringshastigheter for uran som funksjon av pH (Kashparov et al. 2000).

6. Konklusjon

6.1 Vurdering av metode og forslag til videre forskning

For både telling av levende/døde nematoder og målinger ved hjelp av ICP-MS eller pH-glasselektrode var standardavvikene generelt lave og to gjeldende siffer ble oppnådd. Noen ganger ble tre gjeldende siffer oppnådd for pH-målingen. Basert på dette ble metoden som helhet vurdert som presis. Kontrollmålingene av husstandarden 1642H under hovedforsøket samsvarte bra med standardens innhold, og viser at ICP-MS målingene har vært nøyaktige. Som tidligere nevnt var alle kontrollprøvene for ICP-MS analysen under de forskjellige kvantifiseringsgrensene. Dette viser at det har blitt jobbet rent. I SSPW uten uran ble også tilfredsstillende lav dødelighet observert.

En åpenbar forbedring av metoden ville være å unngå de detekterte feilkildene. Dette inkluderer å kondisjonere membranfiltrene med prøveløsning, noe som ikke ble gjort under de utførte forsøkene. Det inkluderer også å unngå datatap ved datamaskinfeil og riktig opparbeidelse av alle prøver til ICP-MS analyse (se kap. 4.1 og underkap. 4.3.2). I tillegg ville dekomponering av ICP-MS prøvene ikke bare ved hjelp av syre men også ved hjelp av en ultraklav eller et varmebad, fjernet et usikkerhetsmoment rundt bestemmelsen av de faktiske urankonsentrasjonene i SSPW-løsningene med død *E.coli*.

En annen forbedring, og forslag til videre forskning, ville være flere repetisjoner ved flere konsentrasjoner. Det er mulig at omslagspunktet for dødelighet og endring av urans tilstandsformer, som her var rundt pH 7.4, endres med forskjellige urankonsentrasjoner. Et større forsøk, med bredere pH-spekter og flere repetisjoner slik at et bredt statistisk utvalg ble oppnådd, ville i større grad belyst hvordan pH påvirker endring av urans tilstandsformer ved forskjellige konsentrasjoner. En annen forbedring ville vært å isolere og dekomponere selve nematodene, for så å analysere urannivåene i disse med ICP-MS. Dette ville belyst flere faktorer rundt pH sin effekt på urans toksisitet og nematodenes opptak av dette grunnstoffet.

Det ville vært interessant å forske videre på hvilken rolle tilsetning av *E. coli* spilte med hensyn på urans toksisitet. Et forsøk hvor all uran er kompleksbundet til *E. coli*, slik at annen uran ikke er en faktor, ville vist i hvilken grad observert toksisitet kom av uran bundet til nematodenes

næringskilde eller av kontakt med uran via cuticulum. Videre forskning på det observerte bunnfallet i SSPW med pH > 6.0 og urankonsentrasjon > 0.20 mM (se kap. 3.3) ville også vært interessant. En kvalitativ kjemisk analyse ville fastslått bunnfallets natur og belyst dette aspektet av pH-indusert endring av urans tilstandsformer i SSPW-løsning.

6.2 Konklusjon på problemstilling og vurdering av hypotese

Som de diskuterte resultatene har vist så påvirkes uran, i kunstig jordporevannløsning, sin løselighet, biotilgjengelighet, og toksisitet mot nematoden *C. elegans* i stor grad av pH. Lavere pH førte til økt toksisitet. For urankonsentrasjon 10 µM var det et omslagspunkt ved pH 7.4. Uran under dette omslagspunktet var kompleksbundet til døde *E. coli* bakterier og i liten grad løst i løsningen. Uran over pH 7.4 var i stor grad løst og ikke bundet til *E. coli*. SSPW med urankonsentrasjon 10 µM og pH under 7.4 hadde en nematodedød på 64 ± 3.8 % eller mer, mens SSPW med urankonsentrasjon 10 µM og pH over 7.4 hadde 18 ± 5.2 % nematodedød. pH påvirket altså urans tilstandsformer, og derav dets toksisitet, i stor grad. Hovedhypotesen "Et fall fra pH 7.5 til pH 6.0 i en jordporevannløsning vil føre til endringer i urans tilstandsform og derav vil urans toksisitet mot nematoden *C. elegans* øke" har blitt støttet.

Referanser

- Agilent Technologies. (2005). *ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A Primer*. ICP-MS Handbook.
- Agilent Technologies. (2012). *Agilent 8800 triple quadrupole ICP-MS. Technology transformed. Performance redefined*. Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS Brochure.
- Alfa Aesar. (2013a). *Aluminum, AAS standard solution, Specpure®, Al 1000 µg/ml*. P.nr: 33557. LOT: 61000581.
- Alfa Aesar. (2013b). *Iron, AAS standard solution, Specpure®, Al 1000 µg/ml*. P.nr: 88073. LOT: 61300523.
- Altun, Z. F. & Hall, D. H. (2009). *Introduction*. WormAtlas. Available at: doi:10.3908/wormatlas.1.1 (accessed: 19.03.2014).
- Barillet, S., Adam-Guillermin, C., Palluel, O. & Devaux, A. (2007). Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 497-505.
- Berghof. (2000). *Theory of sample preparation using acid digestion, pressure digestion and microwave digestion (microwave decomposition)*. DIN EN ISO 9001-2000. Labor-Technik, Harretstrasse 1, Germany
- Bjørnå, F. (2012). *Kalking av jord*. Store norske leksikon. Available at: http://snl.no/kalking_av_jord (accessed: 20.03.2014).
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W. (2002). Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, 64.
- Cline, M. G., Fenwick, R. W., Grossman, R. B., Ahrens, R. J. & Engel, R. J. (1993). *Soil Survey Manual - Chapter Three: Examination and Description of Soils*. Soil Conservation Service: U.S. Department of Agriculture. Available at: http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/home/?cid=nrcs142p2_054253 (accessed: 20.03.2014).
- Dutilleul, M., Lemaire, L., Reale, D., Lecomte, C., Galas, S. & Bonzom, J. M. (2013). Rapid phenotypic changes in *Caenorhabditis elegans* under uranium exposure. *Ecotoxicology*, 22 (5): 862-8.

- EMD Millipore. (2014). *Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters for Protein Purification and Concentration*. Product Catalog. Available at:
<http://www.millipore.com/catalogue/module/C82301#0> (accessed: 30.04.2014).
- Emsley, J. (2001). *Nature's building blocks: An A-Z guide to the elements*. Oxford: Oxford University Press.
- Federation of American Scientists. (1998). *Nuclear weapon design*. Available at:
<http://www.fas.org/nuke/intro/nuke/design.htm> (accessed: 03.05.2014).
- Flury, M., Harsh, J. B., Wong, R. W., Wooten, A. C. & German-Heins, J. (2000). Remediation of uranium contaminated mine waste. *State of Washington Water Research Center Report*, WRR-04.
- Goussen, B., Parisot, F., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Pery, A. R. & Bonzom, J. M. (2013). Consequences of a multi-generation exposure to uranium on *Caenorhabditis elegans* life parameters and sensitivity. *Ecotoxicology*, 22 (5): 869-78.
- Hu, P. J. (2007). *Dauer*. WormBook: The C. elegans Research Community. Available at:
doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org> (accessed: 19.03.2014).
- Hyne, R., Rippon, G. & Ellender, G. (1992). pH-dependent uranium toxicity to fresh-water hydra. *Science Of The Total Environment*, 125: 159-173.
- Høibråten, S., Dullum, O., Aas, P. (2001). Ammunisjon med utarmet uran - bakgrunn og virkninger. *FFI-rapport*, 04471.
- IAEA. (2011). Radioactive particles in the Environment: Sources, Particle Characterization and Analytical Techniques. *International Atomic Energy Agency*, IAEA-TECDOC-1663.
- ICRP 66. (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. *ICRP Publication*, 66 (Annals of the ICRP 24 (1-3)).
- ISO/TC. (2010). Water quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *ISO 10872*, 2010(E).
- Jensen, K. A. (2014). *Personlig meddelelse*. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for Miljøvitenskap, Ås.
- Jiang, G. C. T., Hughes, S., Stürzenbaum, S. R., Evje, L., Syversen, T. & Aschner, M. (2009). *Caenorhabditis elegans* metallothioneins protect against toxicity induced by depleted uranium. *Toxicological Sciences*, 111 (2): 345-354.
- Johnsen, I. V. (2012). *Synthesis, characterization and uptake study of uranium nanoparticles (UO₂*

- and U3O8) in eggs of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) Institutt for plante- og miljøvitenskap (IPM). 58 pp.
- Kashparov, V. A., Protsak, V. P., Ahamdach, N., Stammose, D., Peres, J. M., Yoshchenko, V. I. & Zvarich, S. I. (2000). Dissolution kinetics of particles of irradiated Chernobyl nuclear fuel: influence of pH and oxidation state on the release of radionuclides in the contaminated soil of Chernobyl. *Journal of Nuclear Materials*, 279 (2-3): 225-233.
- Khanna, N., Cressman, C. P., 3rd, Tatara, C. P. & Williams, P. L. (1997). Tolerance of the nematode *Caenorhabditis elegans* to pH, salinity, and hardness in aquatic media. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32 (1): 110-4.
- Markich, S. J. (2002). Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal*, 2: 707-729.
- Puigdomenech, I. (2004). *Hydra/medusa chemical equilibrium database and plotting software*. KTH Royal Institute of Technology.
- Rayner-Canham, G. & Overton, T. (2010). *Chapter 24 - The rare earth and actinoid elements*. 4 ed. Descriptive inorganic chemistry. New York: W. H. Freeman and company. Available at: http://content.bfwpub.com/webroot_pubcontent/Content/BCS_2/Rayner_Canham%205e/Student%20Resources/Chapter%2024%20-%20The%20Rare%20Earth%20and%20Actinoid%20Elements/Chapter%2024%20-%20The%20Rare%20Earth%20and%20Actinoid%20Elements.pdf (accessed: 24.03.2014).
- Sheppard, S. C., Sheppard, M. I., Gallerand, M. O. & Sanipelli, B. (2005). Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity*, 79 (1): 55-83.
- Simon, O., Mottin, E., Geffroy, B. & Hinton, T. (2010). Effects of dietary uranium on reproductive endpoints-fecundity, survival, reproductive success of the fish *Daniorerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 220-225.
- Teien, H.-C. (2013). Speciation uptake and toxicity of uranium in atlantic salmon (*salmo salar*). *CERAD 2013 Annual Report*.
- Teien, H.-C. (2014). *Personlig meddelelse*. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for Miljøvitenskap, Ås.
- Trenfield, M. A., Ng, J. C., Noller, B. N., Markich, S. J. & Dam, R. A. (2011). Dissolved organic carbon reduces uranium bioavailability and toxicity. 2. Uranium[VI] speciation and toxicity to three tropical freshwater organisms. *Environmental Science & Technology*, 45 (7): 3082-9.
- Tyne, W., Loftis, S., Spurgeon, D. J., Jurkschat, K. & Svendsen, C. (2013). A new medium for

Caenorhabditis elegans toxicology and nanotoxicology studies designed to better reflect natural soil solution conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (8): 1711-1717.

vanLoon, G. W. & Duffy, S. J. (2010). Chapter 18: Soil properties. In *Environmental Chemistry: A Global Perspective*, p. 434: OUP Oxford.

Wolf, R. E. (2005). *What is ICP-MS?... and more importantly, what can it do?* . Crustal Geophysics and Geochemistry Science Center. Available at:
<http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html> (accessed: 24.03.14).

Wozniak, K. (2002). The genotoxicity of metals. *Cellular And Molecular Biology Letters*, 7: 335.

Appendiks

A1: Resultater for pilotforsøk og løselighetseksperiment

A1.1: Antall nematoder som ble tilsatt og overlevde/døde under pilotforsøket. Inneholder også observasjoner fra forsøket.

Nominell pH	Nominell urankonsentrasjon	Antall tilsatte <i>C. elegans</i> ved t=0	Antall levende <i>C. elegans</i> etter 96 t	Antall døde <i>C. elegans</i> etter 96 t	Nematodedød (%)	Observert organisk materiale (litt<noe<mye <masse)	Observert redusert størrelse på nematoder ved forsøkets slutt, relativt til nematoder i andre brønner (små<mindre)
7,5	0,30 mM	25	0	7	100	Masse	
	0,10 mM	22	1	20	95		små
	10 µM	29	28	1	3,4		
	1,0 µM	46	42	4	8,7		
	0,10 µM	43	43	0	0,0		
	Kontroll	43	41	2	4,7		
6,0	0,30 mM	15	0	8	100	Noe	
	0,10 mM	17	0	7	100	Mye	
	10 µM	15	6	9	60		små
	1,0 µM	26	24	2	7,7		mindre
	0,10 µM	35	35	0	0,0		
	Kontroll	31	31	0	0,0		

A1.2: Antall nematoder som ble tilsatt og overlevde/døde i SSPW med natriumnitrat under pilotforsøket. Det forekom ingen andre interessante observasjoner rundt denne delen av forsøket.

Nominell pH	Nominell natriumnitratkonsentrasjon	Antall tilsatte <i>C. elegans</i> ved t=0	Antall levende <i>C. elegans</i> etter 96 t	Antall døde <i>C. elegans</i> etter 96 t
7,5	0,60 mM	14	14	0
	0,20 mM	30	30	0
	20 µM	24	24	0
	2,0 µM	26	24	2
	0,20 µM	36	32	4
	Kontroll	21	20	1
6,0	0,60 mM	71	71	0
	0,20 mM	5	4	1
	20 µM	4	3	1
	2,0 µM	6	6	0
	0,20 µM	20	18	2
	Kontroll	13	13	0

A1.3: Målt pH for SSPW testet under pilotforsøket.

Nominell pH	Tid pH-måling ble tatt → Nominell urankonsentrasjon	SSPW med <i>E. Coli</i> og <i>C. elegans</i>		SSPW uten <i>E. Coli</i> og <i>C. elegans</i>	
		pH målt ved t=0	pH målt ved t=96 t	pH målt ved t=0	pH målt ved t=96 t
7,5	0,30 mM	7,92	7,82	7,95	7,94
7,5	0,10 mM	7,94	7,94	8,18	8,05
7,5	10 µM	8,31	8,19	8,38	8,25
7,5	1,0 µM	8,28	8,23	8,25	8,40

7,5	0,10 µm	8,29	8,25	8,29	8,20
7,5	Kontroll	8,10	8,12	8,16	8,10
7,5	0,30 mM	4,54	4,46	4,36	*
6,0	0,10 mM	5,13	5,04	4,70	*
6,0	10 µm	6,93	6,73	5,10	*
6,0	1,0 µm	6,86	6,95	5,23	*
6,0	0,10 µm	6,87	6,95	5,26	*
6,0	Kontroll	6,69	6,89	5,20	*

* indikerer teknisk feil og tap av data.

A1.4: ICP-MS resultatene for pilotforsøkets kontroll-løsninger med SSPW, tatt ved forsøkets start.

Resultater lavere enn deteksjonsgrensen eller kvantifiseringsgrensen vises som henholdsvis <LOD og <LOQ. Dette gjelder ikke resultatene for målt innhold av uran i ICP-MS prøvene, da disse ble brukt til å regne ut disse grensene.

Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Fraksjonering	Målt innhold av uran i ICP-MS prøve (µg/L)	Fortynning	Målt urankonsentrasjon, justert for fortynning (µM)
7,5	Med	Ingen	0,10	100	<LOD
7,5	Med	Sentrifugering	0,066	100	<LOD
6,0	Med	Ingen	0,054	100	<LOD
6,0	Med	Sentrifugering	0,029	100	<LOD
7,5	Uten	Ingen	0,15	100	<LOQ
7,5	Uten	Sentrifugering	0,11	100	<LOD
6,0	Uten	Ingen	0,038	100	<LOD
6,0	Uten	Sentrifugering	0,033	100	<LOD

A1.5: ICP-MS resultatene for pilotforsøkets SSPW-løsninger, tatt ved forsøkets slutt. Resultater

lavere enn deteksjonsgrensen eller kvantifiseringsgrensen vises som henholdsvis <LOD og <LOQ.

Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Fraksjonering	Nominell urankonsentrasjon (mM)	Målt innhold av uran i ICP-MS prøve (µg/L)	Fortynning	Målt uran-konsentrasjon, justert for fortynning (µM)
7,5	Med	Ingen	0,00010	<LOQ	100	<LOQ
7,5	Med	Sentrifugering	0,00010	<LOQ	100	<LOQ
6,0	Med	Ingen	0,00010	<LOD	100	<LOD
6,0	Med	Sentrifugering	0,00010	<LOD	100	<LOD
7,5	Med	Ingen	0,0010	2,8	100	1,2
7,5	Med	Sentrifugering	0,0010	2,8	100	1,2
6,0	Med	Ingen	0,0010	<LOQ	100	<LOQ
6,0	Med	Sentrifugering	0,0010	<LOQ	100	<LOQ
7,5	Med	Ingen	0,010	28	100	12
7,5	Med	Sentrifugering	0,010	28	100	12
6,0	Med	Ingen	0,010	0,59	100	0,25
6,0	Med	Sentrifugering	0,010	<LOQ	100	<LOQ
7,5	Med	Ingen	0,10	270	100	113
7,5	Med	Sentrifugering	0,10	270	100	113
6,0	Med	Ingen	0,10	64	100	27
6,0	Med	Sentrifugering	0,10	57	100	24
7,5	Med	Ingen	0,30	680	100	286
7,5	Med	Sentrifugering	0,30	440	100	185
6,0	Med	Ingen	0,30	570	100	239
6,0	Med	Sentrifugering	0,30	550	100	231

A1.6: Resultatet for prøvene som ble brukt under løselighetseksperimentet. Fargekodet etter positiv eller negativ observasjon av utfelling.

Prøvenummer	Nominell urankonsentrasjon (mM)	pH målt	Utfelling observert
1	0,10	8,95	Nei
2	0,10	6,50	Nei
3	0,20	7,99	Nei
4	0,20	7,38	Nei
5	0,20	6,50	Nei
6	0,25	6,50	Nei
7	0,30	7,67	Nei
8	0,30	7,23	Nei
9	0,35	7,32	Ja
10	0,35	7,06	Ja
11	0,35	7,03	Ja
12	0,35	6,85	Ja
13	0,35	6,85	Ja
14	0,40	7,15	Ja
15	0,40	6,62	Ja
16	0,40	6,19	Nei
17	0,50	7,05	Ja
18	0,50	6,48	Ja
19	0,50	5,94	Nei
20	0,60	6,92	Ja
21	0,60	6,32	Ja
22	0,60	5,66	Nei
23	0,70	6,77	Ja
24	0,70	6,10	Ja
25	0,70	5,25	Nei
26	0,80	6,90	Ja
27	0,80	5,89	Ja
28	0,80	5,06	Nei
29	0,80	4,78	Nei
30	0,90	6,61	Ja
31	0,90	5,96	Ja
32	0,90	5,73	Nei
33	0,90	5,00	Nei
34	0,90	4,64	Nei
35	1,0	7,01	Ja
36	1,0	6,29	Ja
37	1,0	6,28	Ja
38	1,0	5,86	Nei
39	1,0	5,33	Nei
40	1,0	4,67	Nei
41	1,2	6,58	Ja
42	1,2	5,50	Nei
43	1,2	5,30	Nei
44	1,4	5,84	Ja
45	1,4	5,06	Nei
46	1,4	4,93	Nei

A2: Nematodedød og pH-målinger

A2.1: Antall nematoder som ble tilsatt og overlevde/døde under hovedforsøket. Inneholder også observasjoner fra forsøkene.

SSPW var fra "Forsøk 1" (1), "Forsøk 2" (2) eller "Forsøk 3" (3)	Nominell pH	Nominell urankonsentrasjon (µM)	Antall tilsatte <i>C. elegans</i> ved t=0	Antall levende <i>C. elegans</i> etter 96 t	Antall døde <i>C. elegans</i> etter 96 t	Nematode -død (%)	Observert organisk materiale (litt<noe<mye<masse)	Observert redusert størrelse på nematoder ved forsøkets slutt, relativt til nematoder i andre brønner (små<mindre)
2	7,5	10	19	16	3	16	Noe	
2	7,0	10	26	9	15	65	Mye	
2	6,5	10	21	7	15	67		
2	6,0	10	30	7	23	77	Litt	Mindre
2	5,5	10	34	5	29	85	Litt	Mindre
2	5,5	Blank	30	28	1	6,7		
3	7,5	10	25	19	6	24	Mye	
3	7,0	10	22	8	14	64	Mye	Mindre
3	6,5	10	15	6	9	60	Noe	
3	6,0	10	25	8	17	68	Mye	Mindre
3	5,5	10	22	6	16	73		Mindre
3	7,5	Blank	25	24	1	4,0		
1	7,5	90	5	2	2	60	Mye	små
1	7,5	10	7	6	1	14	Noe	små
1	7,5	1,0	10	8	2	20	Noe	
1	7,5	0,10	5	4	1	20	Mye	
1	7,5	Blank	6	5	1	17	Noe	
1	7,0	90	13	4	5	69	Mye	små
1	7,0	10	8	3	5	63		små
1	7,0	1,0	20	7	13	65	Noe	små
1	7,0	0,10	18	14	4	22	Litt	
1	7,0	Blank	16	14	2	13		
1	6,5	90	11	2	6	82	Noe	små
1	6,5	10	12	4	8	67	Litt	små
1	6,5	1,0	12	5	7	58		små
1	6,5	0,10	9	6	3	33		
1	6,5	Blank	10	10	0	0,0	Litt	
1	6,0	90	15	3	12	80	Noe	små
1	6,0	10	16	4	12	75	Litt	små
1	6,0	1,0	9	4	5	56		
1	6,0	0,10	14	10	4	29		
1	6,0	Blank	18	17	1	5,6	Litt	
1	5,5	90	14	1	4	93	Mye	små
1	5,5	10	12	3	3	75	Noe	små
1	5,5	1,0	5	2	3	60	Noe	små
1	5,5	0,10	6	4	2	33	Noe	
1	5,5	Blank	5	1	4	80	Noe	

A1.2: Antall nematoder som ble tilsatt og overlevde/døde i SSPW med natriumnitrat. Inneholder også observasjoner fra forsøket.

Nominell pH	Nominell natriumnitratkonsentrasjon	Antall tilsatte <i>C. elegans</i> ved t=0	Antall levende <i>C. elegans</i> etter 96 t	Antall døde <i>C. elegans</i> etter 96 t	Observert organisk materiale (litt<noe<mye<masse)
7,5	0,20 µM	3	3	0	Litt
7,0	0,20 µM	15	15	0	
6,5	0,20 µM	18	17	1	
6,0	0,20 µM	13	13	0	Litt
5,5	0,20 µM	10	8	2	Noe
7,5	0,20 mM	4	3	1	Litt
7,0	0,20 mM	13	13	0	Litt
6,5	0,20 mM	15	15	0	Litt
6,0	0,20 mM	15	13	1	Litt

5,5	0,20 mM	5	4	1	Noe
7,5	2,0 µm	5	5	0	Noe
7,0	2,0 µm	21	23	0	Noe
6,5	2,0 µm	9	10	0	Litt
6,0	2,0 µm	14	12	2	Litt
5,5	2,0 µm	11	9	2	Noe
7,5	20 µm	4	3	1	Noe
7,0	20 µm	45	41	3	
6,5	20 µm	14	14	0	
6,0	20 µm	13	13	0	
5,5	20 µm	8	7	1	Litt
7,5	Kontroll	8	7	1	Litt
7,0	Kontroll	20	19	1	
6,5	Kontroll	10	10	0	
6,0	Kontroll	22	20	2	
5,5	Kontroll	6	6	0	Litt

A2.3: Målt pH for SSPW testet under hovedforsøket.

Nominell pH	SSPW var fra "Forsøk 1" (1), "Forsøk 2" (2) eller "Forsøk 3" (3)	Tid pH måling ble tatt → Nominell urankonsentrasjon (µM)	SSPW med <i>E. Coli</i> og <i>C. elegans</i>		SSPW uten <i>E. Coli</i> og <i>C. elegans</i>	
			pH målt ved t=0	pH målt ved t=96 t	pH målt ved t=0	pH målt ved t=96 t
7,5	1	90	8,02	7,93	8,02	7,90
7,5	1	10	7,51	7,76	7,52	7,55
7,5	1	1,0	7,24	7,53	7,32	7,30
7,5	1	0,10	7,18	7,52	7,19	7,29
7,5	1	Kontroll	7,08	7,46	6,97	7,17
7,0	1	90	7,62	7,77	7,73	7,61
7,0	1	10	7,09	7,36	7,10	7,32
7,0	1	1,0	6,08	6,77	7,01	7,03
7,0	1	0,10	6,90	7,23	6,88	7,03
7,0	1	Kontroll	6,88	7,26	6,77	6,83
6,5	1	90	7,13	7,36	7,05	7,15
6,5	1	10	6,72	6,98	6,35	6,64
6,5	1	1,0	6,60	6,96	6,16	6,32
6,5	1	0,10	6,56	6,96	5,55	5,92
6,5	1	Kontroll	6,58	7,03	5,84	5,45
6,0	1	90	6,67	7,01	6,33	6,31
6,0	1	10	6,59	6,89	5,79	6,08
6,0	1	1,0	6,51	6,84	5,46	5,54
6,0	1	0,10	6,55	6,93	5,41	5,56
6,0	1	Kontroll	6,05	6,78	5,35	5,16
5,5	1	90	5,81	6,73	4,89	4,94
5,5	1	10	6,42	6,94	5,05	4,95
5,5	1	1,0	6,65	7,63	5,15	6,59
5,5	1	0,10	6,52	7,19	5,03	6,65
5,5	1	Kontroll	6,07	7,03	4,83	6,35
7,5	2	10	7,54	7,50	7,43	7,53
7,0	2	10	7,29	7,33	7,08	7,20
6,5	2	10	7,16	7,17	6,88	6,97
6,0	2	10	6,37	6,42	5,81	5,89
5,5	2	10	5,77	6,03	4,88	5,01
5,5	2	Blank	5,91	6,26	4,84	5,14
7,5	3	10	7,51	7,51	7,45	7,55
7,0	3	10	7,28	7,30	7,08	7,24
6,5	3	10	7,14	7,09	6,87	7,07
6,0	3	10	6,39	6,46	5,77	6,01
5,5	3	10	5,84	5,85	5,06	5,19
7,5	3	Blank	7,21	7,38	7,33	7,33

A2.4: Gjennomsnittlig målt pH og gjennomsnittlig nematodedød, med tilhørende standardavvik for begge, for SSPW med nominell urankonsentrasjon 10 µM, n= 3.

Nominell pH	Nematodedød ved 10 µM (%)	STA for nematodedød ved 10 µM (%)	Målt pH	STA for målt pH
7,5	18	5,2	7,55	0,070
7,0	64	1,5	7,27	0,045
6,5	64	3,8	7,0	0,17
6,0	73	4,6	6,5	0,19
5,5	78	6,7	6,1	0,47

A3: ICP-MS målinger fra hovedforsøket, og behandlede ICP-MS data

A3.1: ICP-MS resultatene for kontroll-løsninger med SSPW. Resultater lavere enn deteksjonsgrensen eller kvantifiseringsgrensen vises som henholdsvis <LOD og <LOQ. Dette gjelder ikke resultatene for målt innhold av uran i ICP-MS prøvene, da disse ble brukt til å regne ut disse grensene.

SSPW var fra "Forsøk1" (1), "Forsøk 2" (2) eller "Forsøk 3" (3)	Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Målt innhold av uran i ICP-MS prøve (µg/L)	Fortynning	Målt uran konsentrasjon, justert for fortynning (µM)
1	7,5	Med <i>E. Coli</i>	0,021	200	<LOD
1	7,0	Med <i>E. Coli</i>	0,0087	399	<LOD
1	6,5	Med <i>E. Coli</i>	0,014	399	<LOD
1	6,0	Med <i>E. Coli</i>	0,013	399	<LOD
1	5,5	Med <i>E. Coli</i>	0,056	200	<LOD
1	7,5	Uten <i>E. Coli</i>	0,0086	200	<LOD
1	7,0	Uten <i>E. Coli</i>	0,0080	399	<LOD
1	6,5	Uten <i>E. Coli</i>	0,013	399	<LOD
1	6,0	Uten <i>E. Coli</i>	0,012	399	<LOD
1	5,5	Uten <i>E. Coli</i>	0,062	200	<LOQ
3	7,5	Med <i>E. Coli</i>	0,011	200	<LOD
3	7,5	Uten <i>E. Coli</i>	0,0096	200	<LOD
2	5,5	Med <i>E. Coli</i>	0,013	200	<LOD
2	5,5	Uten <i>E. Coli</i>	0,012	200	<LOD

A3.2: ICP-MS resultatene for SSPW med urankonsentrasjon 90, 1.0 og 1.0 µM. Resultater lavere enn deteksjonsgrensen eller kvantifiseringsgrensen vises som henholdsvis <LOD og <LOQ.

Prøve ble tatt ved t=0 eller t=96 t	Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Fraksjonering	Nominell urankonsentrasjon (µM)	Målt innhold av uran i ICP-MS prøve (µg/L)	Fortynning	Målt uran-konsentrasjon, justert for fortynning (µM)
96	7,5	Med	Ingen	0,10	2,1	200	1,7
96	7,0	Med	Ingen	0,10	<LOQ	399	<LOQ
96	6,5	Med	Ingen	0,10	<LOD	399	<LOD
96	6,0	Med	Ingen	0,10	<LOQ	399	<LOQ
96	5,5	Med	Ingen	0,10	34	200	29
96	7,5	Uten	Ingen	0,10	2,5	200	2,1
96	7,0	Uten	Ingen	0,10	<LOQ	399	<LOQ
96	6,5	Uten	Ingen	0,10	<LOD	399	<LOD
96	6,0	Uten	Ingen	0,10	<LOQ	399	<LOQ
96	5,5	Uten	Ingen	0,10	1,2	200	1,0
96	7,5	Med	Ingen	1,0	1,0	200	0,84
96	7,0	Med	Ingen	1,0	0,29	399	0,49
96	6,5	Med	Ingen	1,0	<LOQ	399	<LOQ
96	6,0	Med	Ingen	1,0	<LOQ	399	<LOQ
96	5,5	Med	Ingen	1,0	0,60	200	0,51
96	7,5	Uten	Ingen	1,0	0,69	200	0,58
96	7,0	Uten	Ingen	1,0	0,24	399	0,40
96	6,5	Uten	Ingen	1,0	<LOQ	399	<LOQ
96	6,0	Uten	Ingen	1,0	0,46	399	0,77
96	5,5	Uten	Ingen	1,0	0,38	200	0,32
0	7,5	Med	Ingen	90	90	200	76
0	7,0	Med	Ingen	90	40	399	67
0	6,5	Med	Ingen	90	35	399	58
0	6,0	Med	Ingen	90	39	399	65
0	5,5	Med	Ingen	90	<LOD	200	<LOD
0	7,5	Med	Sentrifugering	90	64	200	54
0	7,0	Med	Sentrifugering	90	5,5	399	9,3
0	6,5	Med	Sentrifugering	90	0,82	399	1,4
0	6,0	Med	Sentrifugering	90	0,88	399	1,5
0	5,5	Med	Sentrifugering	90	4,4	200	3,7
0	7,5	Uten	Ingen	90	105	200	88
0	7,0	Uten	Ingen	90	51	399	85
0	6,5	Uten	Ingen	90	41	399	68
0	6,0	Uten	Ingen	90	43	399	72
0	5,5	Uten	Ingen	90	108	200	91
0	7,5	Uten	Sentrifugering	90	107	200	90
0	7,0	Uten	Sentrifugering	90	51	399	85
0	6,5	Uten	Sentrifugering	90	38	399	63
0	6,0	Uten	Sentrifugering	90	43	399	72
0	5,5	Uten	Sentrifugering	90	109	200	92
96	7,5	Med	Ingen	90	32	200	27
96	7,0	Med	Ingen	90	2,5	399	4,2
96	6,5	Med	Ingen	90	0,24	399	0,40
96	6,0	Med	Ingen	90	<LOQ	399	<LOQ
96	5,5	Med	Ingen	90	29	200	24
96	7,5	Med	Sentrifugering	90	29	200	24
96	7,0	Med	Sentrifugering	90	2,4	399	4,0
96	6,5	Med	Sentrifugering	90	<LOD	399	<LOD
96	6,0	Med	Sentrifugering	90	<LOD	399	<LOD
96	5,5	Med	Sentrifugering	90	0,81	200	0,68
96	7,5	Uten	Ingen	90	120	200	101
96	7,0	Uten	Ingen	90	58	399	97
96	6,5	Uten	Ingen	90	36	399	60
96	6,0	Uten	Ingen	90	44	399	74
96	5,5	Uten	Ingen	90	120	200	101
96	7,5	Uten	Sentrifugering	90	120	200	101
96	7,0	Uten	Sentrifugering	90	57	399	96
96	6,5	Uten	Sentrifugering	90	37	399	62
96	6,0	Uten	Sentrifugering	90	46	399	77
96	5,5	Uten	Sentrifugering	90	120	200	101

A3.3: ICP-MS resultatene fra SSPW med urankonsentrasjon 10 µM. Resultater lavere enn

kvantifiseringsgrensen vises som <LOQ.

SSPW var fra "Forsøk1" (1), "Forsøk 2" (2) eller "Forsøk 3" (3)	Nominell pH	SSPW med eller uten <i>E. coli</i> og nematoder	Fraksjonering	Målt innhold av uran i ICP-MS prøve (µg/L)	Fortynning	Målt uran konsentrasjon, justert for fortynning (µM)
2	7,5	Med	Ingen	13	200	11
2	7,5	Med	Sentrifugert	20	200	16
2	7,5	Med	Membran ultrasentrifugert	9,7	200	8,0
2	7,5	Uten	Ingen	12	200	11
2	7,5	Uten	Sentrifugert	12	200	10
2	7,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	8,3	200	7,1
2	7,0	Med	Ingen	9,1	200	7,6
2	7,0	Med	Sentrifugert	0,015	200	0,013
2	7,0	Med	Membran ultrasentrifugert	3,9	200	3,3
2	7,0	Uten	Ingen	10	200	8,4
2	7,0	Uten	Sentrifugert	9,9	200	8,4
2	7,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	2,4	200	2,0
2	6,5	Med	Ingen	2,0	200	1,6
2	6,5	Med	Sentrifugert	1,1	200	0,92
2	6,5	Med	Membran ultrasentrifugert	0,47	200	0,39
2	6,5	Uten	Ingen	10	200	8,8
2	6,5	Uten	Sentrifugert	10	200	8,4
2	6,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	1,1	200	1,0
2	6,0	Med	Ingen	1,2	200	1,0
2	6,0	Med	Sentrifugert	0,33	200	0,28
2	6,0	Med	Membran ultrasentrifugert	0,068	200	0,059
2	6,0	Uten	Ingen	7,0	200	5,9
2	6,0	Uten	Sentrifugert	6,8	200	5,9
2	6,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	3,4	200	2,9
2	5,5	Med	Ingen	0,87	200	0,71
2	5,5	Med	Sentrifugert	0,34	200	0,29
2	5,5	Med	Membran ultrasentrifugert	0,10	200	0,084
2	5,5	Uten	Ingen	10	200	8,8
2	5,5	Uten	Sentrifugert	12	200	9,7
2	5,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	5,3	200	4,6
3	7,5	Med	Ingen	13	200	11
3	7,5	Med	Sentrifugert	12	200	11
3	7,5	Med	Membran ultrasentrifugert	9,4	200	8,0
3	7,5	Uten	Ingen	13	200	11
3	7,5	Uten	Sentrifugert	14	200	11
3	7,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	9,5	200	8,0
3	7,0	Med	Ingen	2,7	200	2,3
3	7,0	Med	Sentrifugert	1,2	200	1,0
3	7,0	Med	Membran ultrasentrifugert	0,58	200	0,50
3	7,0	Uten	Ingen	10	200	8,4
3	7,0	Uten	Sentrifugert	9,9	200	8,4
3	7,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	4,3	200	3,6
3	6,5	Med	Ingen	3,8	200	3,2
3	6,5	Med	Sentrifugert	2,3	200	1,9
3	6,5	Med	Membran ultrasentrifugert	0,82	200	0,67
3	6,5	Uten	Ingen	11	200	9,2
3	6,5	Uten	Sentrifugert	11	200	9,2
3	6,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	2,5	200	2,1
3	6,0	Med	Ingen	1,4	200	1,2
3	6,0	Med	Sentrifugert	0,38	200	0,32
3	6,0	Med	Membran ultrasentrifugert	2,5	200	2,1
3	6,0	Uten	Ingen	7,3	200	6,3
3	6,0	Uten	Sentrifugert	7,2	200	5,9
3	6,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	0,039	200	0,033
3	5,5	Med	Ingen	0,86	200	0,71
3	5,5	Med	Sentrifugert	0,38	200	0,32
3	5,5	Med	Membran ultrasentrifugert	0,15	200	0,13
3	5,5	Uten	Ingen	11	200	8,8
3	5,5	Uten	Sentrifugert	10	200	8,8
3	5,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	5,6	200	4,6
1	7,5	Med	Ingen	4,5	200	3,8

1	7,5	Med	Sentrifugert	2,0	200	1,7
1	7,5	Med	Sprøytefilter filtrert	1,8	200	1,5
1	7,5	Med	Membran ultrasentrifugert	0,83	200	0,70
1	7,5	Uten	Ingen	7,6	200	6,4
1	7,5	Uten	Sentrifugert	5,7	200	4,8
1	7,5	Uten	Sprøytefilter filtrert	8,5	200	7,2
1	7,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	8,7	200	7,3
1	7,0	Med	Ingen	1,2	399	2,0
1	7,0	Med	Sentrifugert	0,25	399	0,42
1	7,0	Med	Sprøytefilter filtrert	<LOQ	399	<LOQ
1	7,0	Med	Membran ultrasentrifugert	<LOQ	200	<LOQ
1	7,0	Uten	Ingen	3,8	399	6,4
1	7,0	Uten	Sentrifugert	3,6	399	6,1
1	7,0	Uten	Sprøytefilter filtrert	0,38	200	0,32
1	7,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	4,7	200	4,0
1	6,5	Med	Ingen	1,4	399	2,4
1	6,5	Med	Sentrifugert	<LOQ	399	<LOQ
1	6,5	Med	Sprøytefilter filtrert	0,49	200	0,41
1	6,5	Med	Membran ultrasentrifugert	<LOQ	200	<LOQ
1	6,5	Uten	Ingen	2,7	399	4,6
1	6,5	Uten	Sentrifugert	2,4	399	4,1
1	6,5	Uten	Sprøytefilter filtrert	1,1	200	1,0
1	6,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	1,4	200	1,2
1	6,0	Med	Ingen	1,6	399	2,6
1	6,0	Med	Sentrifugert	0,16	399	0,26
1	6,0	Med	Sprøytefilter filtrert	0,41	200	0,35
1	6,0	Med	Membran ultrasentrifugert	<LOQ	200	<LOQ
1	6,0	Uten	Ingen	3,1	399	5,2
1	6,0	Uten	Sentrifugert	3,0	399	5,0
1	6,0	Uten	Sprøytefilter filtrert	0,32	200	0,27
1	6,0	Uten	Membran ultrasentrifugert	1,8	200	1,5
1	5,5	Med	Ingen	6,1	200	5,2
1	5,5	Med	Sentrifugert	0,31	200	0,26
1	5,5	Med	Sprøytefilter filtrert	2,8	200	2,4
1	5,5	Med	Membran ultrasentrifugert	<LOQ	200	<LOQ
1	5,5	Uten	Ingen	9,3	200	7,8
1	5,5	Uten	Sentrifugert	8,8	200	7,4
1	5,5	Uten	Sprøytefilter filtrert	1,9	200	1,6
1	5,5	Uten	Membran ultrasentrifugert	2,7	200	2,3

A3.4: Hvor mange prosent av urankonsentrasjonene målt ved forsøkets start som ble gjenfunnet ved forsøkets slutt, både for totalfraksjon og løst uran (< 1-4 nm). Prosent høyere enn 100 % ble rundet ned til 100 %. Nominell urankonsentrasjon 90 µM, n = 1.

Uran gjenfunnet i SSPW med nematoder (%)	Uran gjenfunnet i SSPW uten nematoder (%)	Målt pH i SSPW med nematoder	Målt pH i SSPW uten nematoder	Løst uran (< 1-4 nm) gjenfunnet i SSPW med nematoder (%)	Løst uran (< 1-4 nm) gjenfunnet i SSPW uten nematoder (%)
31	100	8,0	8,0	45	100
5,4	100	7,7	7,7	43*	100
0,78	89	7,2	7,1	4,6*	99
0,48	100	6,8	6,3	5,2	100
	100	6,3	4,9	19	100

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

A3.5: Hvor mange prosent løst uran (< 1-4 nm) SSPW-løsningene med urankonsentrasjon 90 µM inneholdt. Prosent høyere enn 100 % ble rundet ned til 100 %, n = 1.

Løst uran i SSPW med nematoder ved t= 0 (%)	Løst uran i SSPW uten nematoder ved t= 0 (%)	Målt pH i SSPW med nematoder	Målt pH i SSPW uten nematoder	Løst uran i SSPW med nematoder ved t= 96 t (%)	Løst uran i SSPW uten nematoder ved t= 96 t (%)
61	100	8,0	8,0	24	100
11	100	7,7	7,7	4	98
2	93	7,2	7,1	0,1*	100
2	100	6,8	6,3	0,1*	100
4	100	6,3	4,9	1	100

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

A3.6: Hvor mange prosent av urankonsentrasjonene målt i SSPW uten *E. coli* og nematoder som ble gjenfunnet i SSPW med *E. coli* og nematoder. Nominell urankonsentrasjon 90 µM, n = 1.

Uran gjenfunnet i SSPW med nematoder ved t = 0 (%)	Uran gjenfunnet i SSPW med nematoder ved t = 96 t (%)	Målt pH i SSPW med nematoder	Målt pH SSPW uten nematoder
86	27	8,0	8,0
79	4,3	7,7	7,7
86	0,67	7,2	7,1
90	0,43*	6,8	6,3
	24	6,3	4,9

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

A3.7: Gjennomsnittlig uran gjenfunnet i SSPW med nematoder og *E. coli*, relativt til SSPW uten nematoder og *E. coli*. Nominell urankonsentrasjon 10 µM, n = 3.

Nominell pH	Uran gjenfunnet i SSPW med nematoder	pH i SSPW med nematoder	STA for uran gjenfunnet i SSPW med nematoder	STA for pH i SSPW med nematoder
7,5	85	7,55	23	0,070
7,0	50	7,27	35	0,045
6,5	35	7,0	17	0,17
6,0	29	6,5	19	0,19
5,5	27	6,1	33	0,47

A3.8: Gjennomsnittlig prosent løst uran (< 1-4 nm) basert på fraksjonering ved høy-hastighets sentrifugering. Nominell urankonsentrasjon 10 µM, n = 3.

pH i SSPW med nematoder	Løst uran i SSPW med nematoder (%)	pH i SSPW uten nematoder	Løst uran i SSPW uten nematoder (%)	STA for pH i SSPW med nematoder	STA for løst uran i SSPW med nematoder (%)	STA for pH i SSPW uten nematoder	STA for løst uran i SSPW uten nematoder (%)
7,55	74	7,50	90	0,070	42	0,027	14
7,27	6	7,17	99	0,045	6	0,033	2
7,0	12*	6,8	95	0,17	7,7*	0,26	5
6,5	5,0	5,89	96	0,19	0,18	0,044	3
6,1	3,4	5,0	98	0,47	0,20	0,10	3

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

A3.9: Gjennomsnittlig prosent løst uran (< 3 kDa) basert på fraksjonering ved membran ultrasentrifugering. Nominell urankonsentrasjon 10 µM, n = 3.

pH i SSPW uten nematoder	Løst uran i SSPW uten nematoder (%)	pH i SSPW med nematoder	Løst uran i SSPW med nematoder (%)	STA for pH i SSPW uten nematoder	STA for løst uran i SSPW uten nematoder (%)	STA for pH i SSPW med nematoder	STA for løst uran i SSPW med nematoder (%)
7,50	80	7,55	53	0,027	17	0,070	37
7,17	43	7,27	16*	0,033	20	0,045	20*
6,8	20	7,0	4*	0,26	8	0,17	3*
5,89	26	6,5	12*	0,044	24	0,19	19*
5,0	45	6,1	1,2*	0,10	14	0,47	0,24*

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.

A3.10: Uran som kolloider eller mindre partikler (< 0.2 µM) i SSPW med nominell urankonsentrasjon 10 µM, *E. coli* og nematoder, n = 1.

Målt pH i SSPW med nematoder	Uran som kolloider eller mindre i SSPW med nematoder (%)
7,6	24
7,2	3*
6,9	9
6,7	7
6,7	30

* annoterer at denne prosenten er basert på en verdi under kvantifiseringsgrensen, og er derfor unøyaktig.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no