

Er der gift i vandet?

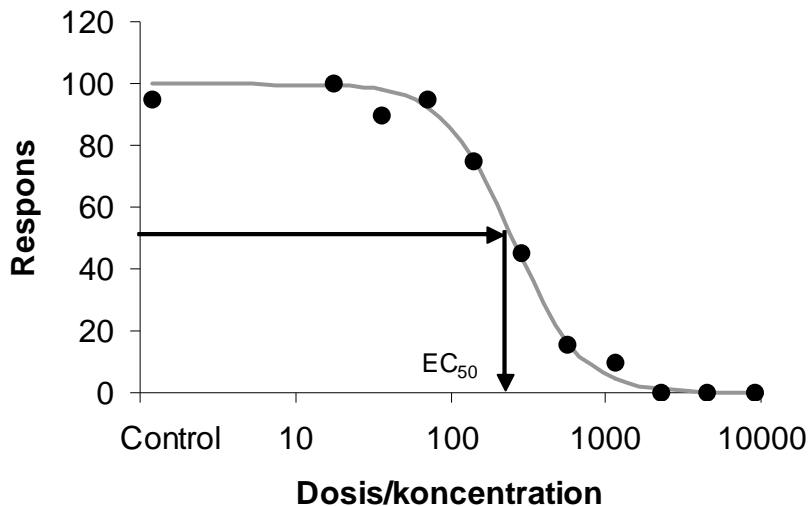
–Hvordan måler man giftighed? Og hvordan fastsætter man grænseværdier?

Introduktion

I pressen ser man ofte overskrifter som ”Gift fundet i grundvandet” eller ”Udslip af farlige miljøgifte i X-strup Å”. Men hvad er gift? Og hvordan måler man giftighed? Pressen vil nok ofte definere gift som menneskeskabte kemikalier, der kan have en negativ effekt på vores sundhed og miljø. Men der findes jo også masser af naturlige gifte, tænk bare på eksempler som svampegifte, heroin eller køkkensalt, som man f.eks. har brugt til at begå selvmord med, men som havene alligevel er fulde af. Og der findes masser af menneskeskabte kemikalier, som vi ikke kan måle nogen negativ effekt af, men kun positive effekter, når bare vi ikke får for meget. Paracellus, som var læge i 1500-tallet, sagde: ”Alt er gift og intet er gift, om noget er gift afhænger alene af dosen”. Så om et kemikalie er giftigt, afhænger både af det enkelte kemikalies evne til at påvirke processer i levende organismer og af, hvilken dosis organismen bliver udsat for.

Når man skal måle om noget er giftigt udsætter man derfor sine forsøgsorganismer for stigende doser/koncentrationer af et kemikalie, og måler hvordan det reagerer. Når det gælder måling af giftighed af kemikalier overfor vandmiljøet, hvoraf pesticider er den bedst testede kemikalie-gruppe, ser man, i første omgang, på væksten og overlevelsen af alger, dafnier og fisk. For ukrudtsmidler måler man også effekten på væksten af andemad og for insektmidler inkluderer man nogle vandlevende insekter. Hvis man vurderer, at den koncentration, der har en effekt, er i nærheden af koncentrationer (indenfor en faktor 10), som i værste tilfælde kunne forefindes i miljøet, laver man yderligere undersøgelser af organismernes vækst, udvikling og reproduktion og man inkluderer eventuelt andre organismer.

Når man skal vurdere effekten af kemikalier på vores sundhed, er der en lang række tests. Den test som danner basis for farlighedsklassifikationerne der findes på forpackninger af kemikalier, de såkaldte R-sætninger, er en akut-test på rotter, hvor man måler dødelighed efter at rotterne har indtaget en specifik dose af kemikaliet. Men supplerer dog i højere og højere grad med såkaldte *in vitro* tests, som er tests på cellekulturer og genmodificerede mikroorganismer. Disse tests kan pege mere specifikt på specielle egenskaber ved et kemikalie. F.eks. om det er mutagent, potentielt kræftfremkaldende eller har hormonforstyrrende effekt. Men for alle tests er princippet med at måle på organismer ved stigende koncentrationer den samme.



Figur 1. Den målte respons (vækst, overlevelse el.lig) afbildes som funktion af den dosis eller koncentration som test-organismen er blevet udsat for. På en logaritmisk skala giver det som regel en s-formet kurve. Den dosis (D) eller koncentration (C) som har en 50% virkning (effect (E)) kaldes ED₅₀ eller EC₅₀. Hvis responsen er overlevelse kaldes den LD₅₀ eller LC₅₀, hvor "L" står for "lethal". Man kan også være interesseret i mindre virkninger på f.eks. 10%. En 10% effekt dosis/koncentration skrives som for 50%, men med 10 i stedet: f.eks. ED₁₀. Data vist på figuren her er procent mobile dafnier efter 48 timer som funktion af en blanding af pesticider.

Når man har bestemt hvor giftigt et kemikalie er overfor udvalgte test-organismer, kan man fastsætte grænseværdier under hvilke, man vurderer at kemikaliet ikke vil have nogen betydelig effekt. Når man fastsætter grænseværdier tager man højde for at der er forskel mellem arter (mennesker reagerer jo ikke nødvendigvis som rotter), at følsomheden kan variere mellem individer og i forhold til de levevilkår organismene har i naturen, og at der kan være andre biologiske processer, der er mere følsomme end den målte. Dette gøres ved at indsætte en sikkerhedsfaktor mellem den effekt man har målt og grænseværdien. M.h.t. pesticider og vandmiljøet ligger sikkerhedsfaktoren man indsætter mellem effekt koncentration (f.eks. EC₅₀) og grænseværdi på 100-1000, afhængigt af om det er en akut-test (overlevelse over få dage) eller en kronisk test (eksponering over en til flere generationer). Indenfor humantoksikologi ligger grænseværdierne som regel betydeligt højere, da vi jo er mindre tolerante overfor små sandsynligheder for effekter på mennesker end vi er overfor små effekter på f.eks. dafnier.

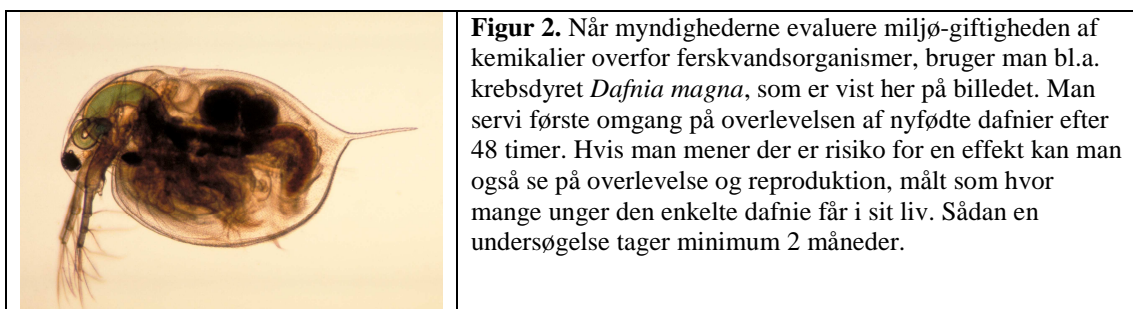
M.h.t. til grænseværdier skal det nævnes at de europæiske grænseværdier for pesticider i drikkevand er fastsat på baggrund af princippet om, at de ikke må være der. D.v.s. at man i 1980'erne satte grænseværdien til 0,1 µg/L, da dette var detektionsgrænsen for analysen af de fleste pesticider. Til sammenligning kan det nævnes at grænseværdierne for glyphosat (aktivstoffet i Roundup) i USA er 700 µg/L og i WHO er 500 µg/L, da disse grænseværdier bygger på toksisitets data og ikke på principper om detektionsgrænser. Omvendt er der insekticider, som er giftige ved 0,1 µg/L, og hvor de toksisitets-betømte grænseværdier derfor er lavere end 0,1 µg/L.

Man har siden 1980'erne viderudviklet målemetoder, og man kan nu måle endnu lavere koncentrationer. Det betyder, at man finder kemikalier i vand, hvor man før ikke fandt noget, - hvilket jo kan give anledning til nogle vældige overskrifter i medierne.

Det er dog vigtigt at man sammenholder de fundne koncentrationer med den potentielle effekt, inden man går ud og råber højt om farlige gifte. For jo bedre vi bliver til at måle, jo mere vil vi uværligt finde. Ikke fordi der nødvendigvis findes mere, men fordi vi nu er i stand til at måle det.

Forsøg

Formålet med forsøget er, at illustrere princippet bag måling af giftighed på baggrund af dosis-respons kurver. Til det formål har vi valgt at lave forsøg med et lille saltvandskrebsdyr, der hedder *Artemia salina*. *Artemia salina* kan klækkes fra æg, og bruges i stor udstrækning som foder til akvariefisk. De stoffer som man kunne prøve at undersøge giftigheden af kunne være f.eks. afløbsrens, klorin, hår-blege middel, tobak lagt i blød i vand (nikotin er et gammels insekt-middel) eller andre kemikalier vi bruger i dagligdagen og som vi tror, kunne være giftige overfor små dyr.



Materialer

Artemia æg (Købes i en akvarie forretning)

Artemia salt (Købes i en akvarie forretning)

1 liter kolbe/flaske

Luftpumpe med slange og boblesten

Pipette (0.5-2 mL)

Pipette (0.25 mL)

5x20 ml glasvials

Holder til glasvials

1 stk 24 brønds TC-plade

Handsker

Stereolup

”Gift” f.eks.

Opvaskemiddel (Prøv højeste koncentration: 0.1 ml L⁻¹)

Afløbsrens (Prøv højeste koncentration: 10 ml L⁻¹)

Hårblegemiddel (Prøv højeste koncentration: 1 ml L⁻¹)

klorin

Cigaretter

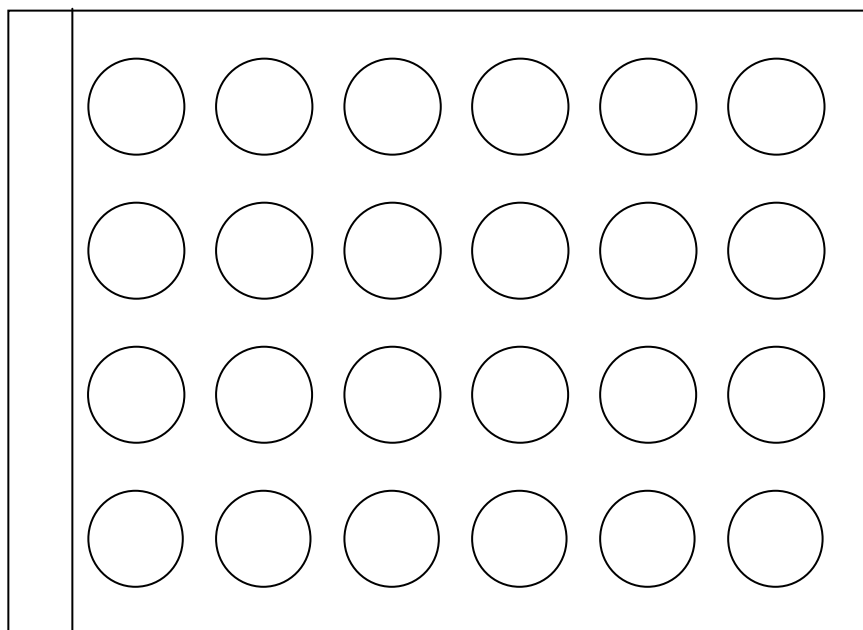
Chili

Etc.

Metode

1. To-tre dage før forsøgsstart sættes 2 skefulde æg over i 1 L demineraliseret vand tilsat artemia-salt. Saltvandet skal indeholde 3,5 % salt. Kolben placeres ved ca. 20°C med gennemluftning.
2. Til forsøget skal der nu fremstilles en række af kemikaliekoncentrationer, der kan tilsættes dyrene. Opløsningen skal laves på artemia-saltvand, da vi vil finde virkningen af giften og ikke af manglende salt. Husk at bruge handsker. Får du noget på handskerne, så skift dem. Vi laver koncentrationerne 5 gange stærkere end de tiltænkte. Derved kan vi tilsætte 0.25 ml insektmiddel til 1 ml medie og opnå den tiltænkte koncentration.

3. Koncentrationsrækken er eksponentiel, d.v.s., at den stiger (eller falder) med en bestemt faktor (f.eks. en faktor 2) i stedet for med en bestemt andel (f.eks. med $1 \mu\text{g L}^{-1}$). Vi starter med den højeste koncentration og halvere derefter denne koncentration 5 gange. Dette gøres i glasvials, der mærkes med numrene 1-5. Først tilsættes 2 mL af den højeste koncentration (stamopløsningen) til glas "1". Sæt låg på. Derefter tilsættes 2 ml stamopløsning og 2 ml saltvand til glas "2". Låget sættes på og glasset rystes. Der udtages nu 2 ml af dette glas, der tilsættes glas "3" sammen med yderligere 2 ml saltvand. Glasset rystes og der udtages 2 ml til glas "4" etc. Hvis I skal prøve at test en "ny" gift, så start med en meget høj koncentration og lav flere end fem fortyndinger (f.eks. 19). Så er chancen for at slå alle dyr ned ved en høj koncentration og stadig have levende dyr ved den lave koncentration større.
4. Der tilsættes nu 1 ml af vandet med artemia til hver af de 24 brønde i pladen. Antallet af dyr i hver brønd tælles under steriolup (eller ved godt lys) og noteres på tegningen og i et regneark i excel.
5. Nu tilsættes 0.25 ml af hver af de 5 kemikalieopløsninger til hver 4 brønde. De resterende 4 brønde tilsættes 0.25 mL saltvand. Start med de lave koncentrationer (rent saltvand, glas "5", glas "4" etc), så behøver I ikke at skifte pipettespids mellem koncentrationerne. Hvilke brønde, der får hvilken behandling noteres på tegningen nedenfor og i excel regnearket.
6. Dyrene stilles gerne mørkt (ikke i direkte sol) og i et rum ved ca. 20°C . Antallet af mobile dyr noteres efter 24 og 48 timer.



Overholder I grænseværdien? Hvor meget skal jeres kemikalie fortyndes for at overholde grænseværdien? Vi det så stadig være ufarligt, hvis nu også jeres naboer udleder kemikalier til det samme afløb?