



Økotoksikologiske effekter av  
PFOS, PFOA og 6:2 FTS på  
meitemark (*Eisenia fetida*)

## Forord:

De perfluorerte forbindelsene (PFAS) er produsert og brukt siden femtitallet på grunn av sine unike kjemisk-fysiske egenskaper. Stoffene er temperaturbestandige og verken fett- eller vannløselige i særlig grad. I løpet av de senere årene har de perfluorerte forbindelsene kommet i stadig mer fokus. Årsaken til den økte oppmerksomheten skyldes blant annet utviklingen av nye analysemetoder som kan avdekke PFAS-forbindelser ved relevante konsentrasjoner i miljøprøver. Dette har resultert i at man påviser perfluorerte alkylforbindelser i stadig nye arter og geografiske områder. SFT gjennomførte en materialstrømsanalyse for PFAS i 2003. Materialstrømsanalysen viser at de største bruksområdene for PFAS i Norge i 2002 var brannslukningsmidler og impregneringsmidler til tekstiler (SFT 2004). De viktigste bruksområdene for PFOS i Norge ser ut til å være brannslukning i offshoreindustri og landbasert virksomhet som blant annet raffinerier, forsvaret, luftfart og brannøvningsplasser (SFT 2005).

I dette prosjektet har vi tatt for oss to av de vanligste PFAS-forbindelsene, perfluoroktylsulfonat (PFOS) og perfluorinert oktansyre (PFOA), samt en fluortelomersulfonat (6:2 FTS). PFOS er en prioritert miljøgift, og den nasjonale målsetningen er at utslipp av enkelte PFOS-relaterte forbindelser reduseres vesentlig innen 2010. PFAS har spesielle kjemiske og fysiske egenskaper som gjør de interessante i økotoksikologisk sammenheng. Det finnes i dag noe kunnskap om helse- og miljøegenskapene til både PFOS og PFOA, med unntak for terrestrisk miljø hvor det finnes minimalt med informasjon.

Prosjektet har hatt som formål å fremskaffe ny kunnskap om økotoksikologiske effekter av PFOS, PFOA og 6:2 FTS på terrestrisk miljø. Som testorganisme har vi valgt meitemark (*Eisenia fetida*), hvor vi har undersøkt evnen til å overleve og til å reprodusere, samt vekst av avkom fram til de er kjønnsmodne. Meitemarken har økologisk viktige funksjoner både som nedbryter av organisk materiale i jord, og som matkilde for andre jordlevende sekundærkonsumenter, gnagere og ikke minst fugl. Den gjennomtrengelige kroppsoverflaten til meitemark bidrar til at forbindelser som er delvis løst i vann lett tas opp i organismene, og mulighetene for en oppkonsentrering av PFAS-forbindelser i meitemark har derfor også blitt undersøkt.

Prosjektet er gjennomført av Bioforsk jord og miljø på Ås, og ansvarlig for prosjektet har vært Hege Stubberud.

SFT, Oslo, Desember 2006

Hilde Terese Hamre  
Direktør i Lokalmiljøavdelingen

## **Innhold:**

<b>1.</b>	<b>Innledning .....</b>	<b>6</b>
1.1	Økotoksikologiske begreper .....	7
1.2	Eksisterende kunnskap om miljøeffekter av PFAS på terrestrisk miljø .....	7
1.3	Prosjektets mål .....	8
<b>2.</b>	<b>Materialer og metode.....</b>	<b>9</b>
2.1	Jord.....	9
2.2	Kjemikalier og dosering av jord.....	9
2.3	Meitemark .....	9
2.4	Prinsipp for forsøkene med meitemark .....	10
2.4.1	Dosebestemmende forsøk .....	10
2.4.2	Reproduksjonsforsøk .....	10
2.4.3	Utvidet reproduksjonsforsøk.....	10
2.5	Kjemiske analyser og beregning av biokonsentrasjonsfaktor.....	11
2.6	Statistiske analyser .....	11
<b>3.</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>13</b>
3.1	Dosebestemmende forsøk .....	13
3.2	Reproduksjonsforsøk med PFOS og PFOA.....	13
3.2.1	PFOS .....	13
3.2.2	PFOA .....	16
3.3	Utvidet reproduksjonsforsøk med 6:2 FTS .....	19
3.3.1	Reproduksjonsforsøk .....	19
3.3.2	Vekst av avkom (F1-generasjonen) .....	22
3.3.3	Bioakkumulering i foreldre- og F1- generasjonen .....	23
<b>4.</b>	<b>Diskusjon og konklusjon .....</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>Forkortelser .....</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>Kilder.....</b>	<b>30</b>

## Sammenheng:

Det er gjennomført økotoksikologiske forsøk på meitemark (*Eisenia fetida*) med tre perfluoralkylstoffer, henholdsvis perfluoroktylsulfonat (PFOS), perfluoroktylsyre (PFOA) og en fluortelomersulfonat (6:2 FTS). Kunnskapen om effekter av PFAS-forbindelser på terrestrisk miljø er svært begrenset og SFT ønsker med dette prosjektet å bidra til økt kunnskap om effekter på en organisme som er viktig både for jordfunksjonen og den terrestriske næringskjeden.

For alle tre forbindelsene ble det gjennomført reproduksjonsforsøk i henhold til OECD retningslinje 222, men for 6:2 FTS ble i tillegg avkommet eksponert videre fram til de var kjønnsmodne. Hensikten med sistnevnte var å avdekke om og i hvor stor grad effekter på avkom kunne observeres over lang tid. I litteraturen er det rapportert at PFAS-forbindelser kan oppkonsentreres i næringskjeder, men dette er fortrinnsvis undersøkt i akvatiske systemer. Det ble derfor utført kjemiske analyser av meitemark og jordprøver for å beregne biokonsentrasjonsfaktorer (BCF) for de tre undersøkte forbindelsene.

Resultatene viste at PFOS og PFOA var skadelig for meitemarkens reproduksjonsevne når nivået i jorda oversteg henholdsvis 10 og 16 mg/kg. Effekter som ble observert var redusert antall kokonger, redusert klekkesuksess for kokongene (spesielt ved eksponering for PFOA), redusert antall avkom i tillegg til at vekten på avkommet var lav. BCF for PFOS fra jord til meitemark var 2,3. Nivået av PFOS i meitemark var altså mer enn dobbelt så høyt som i omgivelsene. Dette tyder på at oppkonsentrering av PFOS starter på et lavt nivå i næringskjeden. For PFOA var BCF lik 1. Det var altså ingen forskjell i konsentrasjon av PFOA mellom meitemark og dens omgivelser i dette forsøket. Konsentrasjoner av PFAS i jord er ikke funnet rapportert i litteraturen, men nivået av  $\Sigma$ PFAS i slam er rapportert i henholdsvis en nordisk og en norsk rapport. Nivåene som ble målt var 3,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  våtvekt og 3,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tørrvekt slam (Fjeld et al. 2005; Kallenborn 2004).

6:2 FTS var noe mindre giftig for meitemark enn PFOS og PFOA, og skadelige effekter på reproduksjonsevnen ble ikke observert før konsentrasjonen i jorda oversteg 21 mg/kg. Også i dette forsøket ble det observert reduksjon i antall kokonger og avkom, samt redusert vekt av avkom. Ved å følge de juvenile meitemarkene fram til kjønnsmoden alder kunne man observere en tendens til forsinket vekst og utvikling ved høye konsentrasjoner (250 mg/kg og 500 mg/kg) i hele forsøksperioden (totalt 16 uker), men forskjellene fra kontrollen var ikke statistisk signifikant. BCF for både foreldre og avkom ble undersøkt og var henholdsvis 3,0 og 2,7. 6:2 FTS oppkonsentreres altså i meitemark i samme størrelsesorden som PFOS. Det er imidlertid usikkert hvorvidt 6:2 FTS vil være like stabilt i miljø som PFOS.

Rapporten inneholder en detaljert metodebeskrivelse av forsøkene og resultatene er presentert i tabeller og figurer som beskriver dose-responsforholdet for effekter på voksne meitemark og reproduksjonsparametere for PFOS, PFOA og 6:2 FTS.

Forsøkene som er beskrevet i rapporten er alle gjennomført på forskningslaboratoriet til Bioforsk Jord og miljø. Ansvarlig og utførende forsker for prosjektet har vært Hege Stubberud. Kjemiske analyser ble gjennomført av Eurofins.

## Summary

Ecotoxicological tests in earthworms (*Eisenia fetida*) were performed with the following three perfluorinated alkylated substances: perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and 6:2 fluorotelomer sulfonate (6:2 FTS). The knowledge of toxic effects caused by PFAS on the terrestrial environment is limited. With this project the Norwegian Pollution Control Authority wanted to increase the knowledge of effects on an organism with importance to soil function and the terrestrial food web.

Reproduction studies were performed for the three compounds in agreement with OECD guideline 222. However, in the test using 6:2 FTS the juveniles from the reproduction test were further exposed to 6:2 FTS until they reached sexual maturity, in order to reveal possible effects on offspring after prolonged exposure. The potential for bioconcentration of PFOS-related substances is reported in the literature, but is mainly explored in aquatic systems. Therefore, chemical analysis of earthworms and soil samples were performed for calculations of bioconcentration factors (BCF) for all three compounds.

Results indicated that PFOS and PFOA were harmful to earthworm reproduction when the soil concentration levels exceeded 10 and 16 mg/kg respectively. Observed effects were reduced number of cocoons, reduced hatchability (especially in the test with PFOA), and reduced number and weight of juveniles. The soil-to-earthworm BCF was 2.3 for PFOS. The chemical level in earthworms was more than doubled compared to the environment. This indicates that the bioconcentration of PFOS already starts at a low level of the food chain. BCF for PFOA was 1. This means that no indications of bioconcentration of PFOA between earthworms and the environment were observed in this study. No levels of PFAS in soil were found reported in the literature. However, the level of  $\Sigma$ PFAS in sludge was reported in a Nordic and a Norwegian report respectively. The measured levels were 3,8  $\mu$ g/kg wet weight and 3,0  $\mu$ g/kg dry weight sludge (Fjeld et al. 2005; Kallenborn 2004).

6:2 FTS was less toxic to earthworms than PFOS and PFOA. Harmful effects on reproduction were not observed until soil concentration of 6:2 FTS exceeded 21 mg/kg. Reduced number of cocoons and juveniles, and reduced juvenile body weight was also observed in this experiment. By extending the experiment so that juveniles were followed until they reached sexual maturity, a tendency of delayed growth and development was observed at the highest concentrations (250 mg/kg and 500 mg/kg) during the whole exposure period (16 weeks in total). However, the difference in growth and development was not significantly different from the control. BCF were determined for both adults and offspring in this study, and was 3.0 and 2.7, respectively. The bioconcentration of 6:2 FTS in earthworm was similar to that of PFOS. However, it is not certain that 6:2 FTS is as persistent in the environment as PFOS.

The report contains a detailed description of the methods used, and results are presented in tables and figures that describe the dose-response relationships for effects on adult earthworms and reproduction parameters for PFOS, PFOA and 6:2 FTS.

All experiments presented in the report were conducted at the Bioforsk Soil and Environment research laboratory. Responsible and executive researcher for the project has been Hege Stubberud. The chemical analyses were performed by Eurofins.

## 1. Innledning

Perfluoralkylstoffer (PFAS), inkludert perfluoroktylsulfonat (PFOS), fluortelomersulfonater (FTS) og perfluoroktylsyre (PFOA), utgjør en kjemikaliegruppe med unike fysisk-kjemiske egenskaper. Kjemikaliene er brukt i en rekke produkter på grunn av sine temperaturbestandige egenskaper og fordi de i liten grad er fett- eller vannløselige. SFT har tidligere gjennomført en materialstrømsanalyse for PFAS. Materialstrømsanalysen viste at de største bruksområdene i Norge i 2002 var brannslukningsmidler og impregnering til tekstiler (SFT 2004). PFOS er blant annet brukt innen galvanoteknisk industri og brannslukning i offshore industri, landbasert virksomhet som raffinerier, forsvaret, luftfart og brannøvingsplasser (SFT 2005). Utviklingen og produksjonen av PFAS startet på 1940-tallet og allerede på 1980-tallet begynte man å bekymre seg for de toksikologiske effektene av enkelte PFAS. Allikevel var det først med de sensitive analysemetodene som kom på plass på for få år siden at spesielt PFOS og PFOA, ble oppdaget på uventede geografiske områder som Arktis og nordlige deler av Stillehavet, i mange dyrearter inkludert topp-predatorer og ikke minst i blodprøver fra mennesker over hele verden (Giesy and Kannan 2001) (Schultz et al. 2003).

Laboratorieundersøkelser har indikert at adsorpsjonen av PFOS til jordpartikler er moderat. Kd-verdier med ulike jordtyper varierte fra 7 til 35 (Ellefson 2002). Det er imidlertid uvisst hva slags binding som forekommer da man ikke har klart å fastsette en oktanol-vannfordelingskoeffisient for PFOS. Hvorvidt det er binding til organisk materiale eller det er andre bindingsformer som dominerer, blir dermed vanskelig å avgjøre. I 2004 ble det publisert en rapport i regi av Nordisk Ministerråd (NMR) hvor funn av PFAS i ulike miljøprøver fra Norden ble presentert (Kallenborn 2004). Rapporten konkluderte med at det finnes betydelige konsentrasjoner av PFAS i nordisk miljø, og at PFOS og PFOA dominerte i kloakk-prøver fra alle de nordiske landene. Nivåene av  $\sum$ PFAS i slam ble målt til 3,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  våtvekt i denne undersøkelsen (Kallenborn 2004). I en norsk undersøkelse publisert av SFT i 2005 ble det rapportert om nivåer av  $\sum$ PFAS i slam på 3,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tørrvekt (Fjeld et al. 2005). Ved bruk av slam på landområder kan det dermed foregå en spredning av PFOS og PFOA til jord. I følge en dansk rapport antas det imidlertid at den viktigste spredningsårsaken til både luft, vann og jord, er frigjøring ved bruk av produkter som inneholder PFAS samt avfall (Miljøstyrelsen 2005).

Det er fortsatt langt igjen til kunnskapen om effektene av de forskjellige PFAS på mennesker og miljø er tilfredsstillende. Terrestrisk miljø er i tillegg det området hvor man har minst kunnskap om effekter av PFAS. PFOS har inntil nylig vært den mest brukte PFAS-forbindelsen, og er den det er gjort flest undersøkelser av. PFOA brukes primært i produksjon av fluorpolymere. Både PFOS og PFOA er stabile nedbrytningsprodukter for en rekke PFAS, og er de komponentene som i størst grad gjenfinnes i miljø (Kallenborn 2004); (Giesy and Kannan 2001); (Hekster et al. 2003). PFOS og PFOA er ikke flyktige forbindelser, men gjenfinnes allikevel i områder fjernt fra forurensningskildene. En mulig forklaring på denne spredningen kan være langtransport av mer flyktige perfluorforbindelser, som for eksempel fluortelomeralkoholer, med påfølgende nedbrytning til PFOS og PFOA (Stock et al. 2004). Etter at produsentene av PFOS startet den selvpålagte utfasingen av PFOS-produksjonen i USA er det forventet at noen av fluortelomerene vil erstatte PFOS, deriblant 6:2 FTS. Fluortelomersulfonater brukes for å redusere overflatespenningen i brannslukningsskum og i rengjøringsprodukter (Miljøstyrelsen 2005). Telomere med samme karbonantall som PFOS har vist seg å være lettere nedbrytbare enn PFOS, og det er påvist dannelse av flyktige forbindelser ved biologiske nedbrytning av 6:2 FTS. (Key et al. 1998). Det har imidlertid ikke

vært mulig å finne publiserte data hvor økotoksikologiske effekter fra 6:2 FTS har blitt undersøkt.

## 1.1 Økotoksikologiske begreper

Innen økotoksikologi er det vanlig å benytte et sett av begreper som beskriver hvordan og når toksiske effekter oppstår. Her følger en kort beskrivelse av de som blir mest brukt i denne rapporten. I tillegg er forkortelser forklart i kapittel 6.

- NOEC er en forkortelse for "No Observed Effect Concentration" og er definert som den høyeste konsentrasjonen av et stoff som ikke fører til statistisk signifikante endringer sammenlignet med en kontroll.
- LOEC står for "Lowest Observed Effect Concentration" og kan benyttes i de tilfellene der NOEC ikke kan fastsettes, det vil si der den laveste konsentrasjonen fører til en statistisk signifikant endring sammenlignet med kontrollen.
- $EC_x$ -verdier baserer seg på samtlige undersøkte konsentrasjoner ved at de fastsettes ut fra en dose-responskurve laget ved hjelp av regresjonsanalyse.  $EC_x$  betyr "Effect Concentration" og  $x$  angir hvor stor %-effekt som er målt. For eksempel betyr  $EC_{50}$  den konsentrasjonen som gir en respons som tilsvarer 50 % av kontrollen.

## 1.2 Eksisterende kunnskap om miljøeffekter av PFAS på terrestrisk miljø

PFAS er kjemisk svært stabile forbindelser, men er allikevel vist å bindes til proteiner i plasma som albumin og beta-lipoproteiner (Kerstner-Wood et al. 2003) og i lever i høyere organismer ((Kerstner-Wood et al. 2003; Luebker et al. 2002; Miljøstyrelsen 2005). I akvatiske næringskjeder har man vist at spesielt PFOS bioakkumulerer og at toppredatorer som mink, oter og lomvi har høye nivåer i kroppen (Holmstrom et al. 2005; Kannan et al. 2002). I den humantoksikologiske forskningen har man kommet lenger for blant annet PFOS og PFOA enn det som er tilfelle for terrestrisk økotoksikologisk forskning. Noen av funnene som er gjort omfatter virkningsmekanismer på cellenivå som også kan ha betydning for å forståelsen av effekter på laverestående organismer. I dyreforsøk med pattedyr har man funnet at PFOS påvirker kommunikasjonen mellom celler, membrantransport, energiproduksjonen i celler og peroksisomproliferasjon (Sohlenius et al. 1993; Upham et al. 1998). PFOA har i dyreforsøk ført til peroksisomproliferasjon, induksjon av cytochrom P450 systemet og avkopling av oksidativ fosforylering (Schultz et al. 2003).

Ved litteratursøk ble det funnet noe data for PFOS i terrestrisk miljø. Nedenfor følger en punktvis oppsummering av studier gjennomført i regi av 3M:

- På jordlevende dyr er det gjennomført ett akutt meitemarkstudie med PFOS hvor eksponeringstiden var 14 dager (3M 2002). I forsøket ble det benyttet meitemark av arten *Eisenia fetida* og eksponeringen foregikk i OECD jord, hvor meitemarken ble tilført jorda ett døgn etter dosering. Resultatene viste en  $LC_{50}$  etter 14 dager på 373 mg/kg og en NOEC på 77 mg/kg jord. Innholdet av PFOS i meitemark og jord ble analysert ved dag 14 og resultatene ble oppgitt i våtvekt for meitemark og tørrvekt i jord. Beregningene er basert på få observasjoner og det var en betydelig variasjon i resultatene. Biokonsentrasjonsfaktorene (BCF) varierte fra 0,8 til 2,4, og det var ingen dosesammenheng mellom BCF-verdiene.

- To forsøk med bier ble også gjennomført med PFOS, et kontaktforsøk (Wilkins 2001a) og et oralt akutt eksponeringsforsøk (Wilkins 2001b). Kontaktforsøket gav en LD<sub>50</sub> på 59,7 mg/kg kroppsvekt og en NOEL på 24,1 mg/kg kv 96 timer etter påføring av PFOS. Dette karakteriseres som moderat giftig. I forsøket med oral eksponering ble biene føret med en sukroseløsning inneholdende ulike konsentrasjoner av PFOS. Forsøket gav en LD<sub>50</sub> på 5 mg/kg kroppsvekt og en NOEL på 2,6 mg/kg noe som karakteriseres som svært giftig.
- En plantetest med flere arter utført etter OECD retningslinje 208 ble også publisert av 3M (3M 2003). Følgende arter ble undersøkt: løk, raigrass, salat, soyabønner, tomat, lusern og lin. Det mest følsomme endepunktet som ble målt var vekt av plantemateriale etter 3 uker, og EC<sub>25</sub> varierte fra 7,5 til 160 mg/kg jord. De mest følsomme plantene var henholdsvis raigrass, salat, tomat og løk.
- I tillegg ble det gjennomført adsorpsjon/desorpsjonsforsøk med PFOS i ulike jordtyper, sediment og slam (Ellefson 2002). Resultatene fra forsøket viste at en adsorpsjon/desorpsjonslikevekt oppstår i løpet av 24 timer og K<sub>d</sub> varierte fra < 0,12 i slam til 35,3 i sandig leire.

I tillegg er det publisert en studie på den jordlevende nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) hvor toksisiteten av PFOS og PFOA ble undersøkt i et multi-generasjonsforsøk. Eksponeringen er foretatt på agarskåler og negative effekter på reproduksjon ble sett ved konsentrasjoner mellom 10 pM og 100nM. Negative effekter ble ikke observert i de første generasjonene, men i 4. generasjon ble det observert signifikante reproduksjonseffekter. Det var ingen dose-responsammenheng i forsøket, men forfatterne konkluderer allikevel med at perfluoralkylstoffene skadet fruktbarheten hos *C. elegans* (Tominaga et al. 2004).

### 1.3 Prosjektets mål

I flere rapporter ((OECD 2002) (SFT 2004)) som omhandler utbredelse av PFAS-forbindelser og miljøbetydningen av disse konkluderes det med at det finnes svært lite kunnskap om effekter i terrestrisk miljø. Det er imidlertid grunn til å tro at flere av de vanligste forbindelsene og de stabile nedbrytningsproduktene, som PFOS og PFOA, vil ha en toksisk effekt også på jordlevende organismer. Videre kjenner man til at PFOS er giftig for fugl (OECD 2002) og at disse i stor grad lever av jordlevende, virvelløse dyr. På bakgrunn av dette ønsket SFT å frembringe kunnskap om effektene av de to antatt viktigste PFAS-forbindelsene, PFOS og PFOA, samt for telomeren 6:2 FTS som antas å bli en viktig erstatter for PFOS. Dette skulle oppnås ved å gjennomføre reproduksjonsforsøk og opptaksstudier i meitemark. Meitemark ble valgt som forsøksorganisme fordi den har stor betydning i den terrestriske næringskjeden og for jordas funksjonalitet.

## 2. Materialer og metode

### 2.1 Jord

Det ble valgt å benytte en kunstig (OECD) jord i henhold til kravene i OECD retningslinje 222 for reproduksjonsforsøk med meitemark. Jorda ble satt sammen av 70 % kvartssand, 20 % kaolinleire og 10 % hvitmosetorv. pH ble justert til 5.5-6.5 med CaCO<sub>3</sub>. Denne sammensetningen gav et innhold av organisk materiale på omtrent 5 %.

### 2.2 Kjemikalier og dosering av jord

Følgende tre PFAS-komponenter ble undersøkt i prosjektet: Perfluoroktylsulfonat (PFOS) med renhet > 98 %, perfluoroktylsyre (PFOA) med renhet 99,4 % og en fluortelomersulfonat (6:2 FTS) med renhet 97,8 %. Komponentene ble kjøpt fra Chiron AS i Trondheim.

PFAS-forbindelsenes fysiske-kjemiske egenskaper er kompliserte. De er blant annet både vann- og fettavstøtende og har vist moderat binding til jordpartikler. Man antar at det med tiden vil dannes en likevekt mellom stoff som er bundet til partikler og organisk materiale i jord og det som er løst i jordvæsken. For å oppnå en stabil likevekt i forsøkene ble jorda dosert 1 uke før tilsetning av meitemark i samtlige forsøk. Undersøkelser viste at 6:2 FTS var svært lite løselig i vann og en rekke organiske løsemidler. Det ble heller ikke funnet informasjon om løselighet i åpen litteratur. Det ble derfor valgt å tilsette 6:2 FTS som fast stoff til tørr OECD-jord. Dette ble blandet godt før vann ble tilsatt til ønsket vanninnhold var nådd. Prøven ble deretter blandet en gang til. For PFOS og PFOA var vannløseligheten kjent (OECD 2002). Fordi disse forbindelsene har et lavt damptrykk og ikke vil fordampe fra prøven valgte vi å løse stoffene i nødvendig mengde vann, og deretter la eksponeringsbeholderne stå i avtrekksskap uten lokk til vanninnholdet var redusert til ønsket nivå. Når ønsket vanninnhold var nådd ble jorda tatt ut, blandet godt og lagt tilbake i beholderne igjen.

### 2.3 Meitemark



*Eisenia fetida* er den anbefalte meitemarkarten i OECD retningslinje 222. Synkroniserte kulturer av denne arten holdes kontinuerlig ved Bioforsk Jord og miljø sitt forskningslaboratorium. Kulturene blir fornyet en gang per år slik at det ikke blir benyttet individer som er mer enn ett år gamle i forsøk.

## 2.4 Prinsipp for forsøkene med meitemark

Det ble valgt to ulike metoder for undersøkelse av skadelige effekter på meitemark fra PFOS, PFOA og 6:2 FTS. Alle tre forsøkene fulgte OECD retningslinje 222 for reproduksjonsforsøk med meitemark, men for én av forbindelsene ble forsøket utvidet slik avkommet ble fulgt fram til kjønnsmodning. Dette var en kostnadskreven prosedyre og kunne derfor bare gjennomføres for én av forbindelsene. Valg av komponent ble basert på resultatene av de dosebestemmende forsøkene.

### 2.4.1 Dosebestemmende forsøk

To ukers akutforsøk med kjønnsmodne meitemark ble gjennomført for PFOS, PFOA og 6:2 FTS i henhold til OECD retningslinje 207, "Earthworm acute toxicity test".

Det ble benyttet en doserekke bestående av 7 konsentrasjoner og en kontroll. Ett replikat per konsentrasjon ble undersøkt og hvert replikat inneholdt 10 kjønnsmodne meitemark eksponert i 500 g tørrvekt OECD-jord. Vanninnholdet ble justert til 50 % av total vannholdingskapasitet. Total eksponeringstid var to uker, hvor vekt og overlevelse ble registrert dag 0, 7 og 14.

### 2.4.2 Reproduksjonsforsøk

Reproduksjonsforsøkene ble gjennomført i henhold til OECD retningslinje 222.

Basert på resultatene fra de dosebestemmende forsøkene ble det valgt en konsentrasjonsrekke bestående av 7 konsentrasjoner og kontroll. Det ble benyttet 3 replikater for hver konsentrasjon og 5 kontrollreplikater. Kjønnsmodne meitemark (fullt utviklet klitellum) med kroppsvekt mellom 250 og 550 mg ble benyttet, og de ble akklimatisert i OECD-jord i 7 dager før forsøket startet. Meitemarkene ble eksponert i 1 liters glassbeholdere med perforert lokk. Det ble benyttet 500 g tørrvekt jord og 10 meitemark per replikat. Vanninnholdet i jorda ble justert til 50 % av vannholdingskapasiteten. Eksponeringen foregikk i et temperatur- og lysregulert rom ved  $20 \pm 2$  °C og 16:8 timers lys:mørke-syklus med en lysstyrke på omtrent 500 lux.

Hvert glass ble tilført hestemøkk som fôr. For å sterilisere fôret før bruk ble hestemøkka lufttørket og frosset ved -20 °C. Fôret ble mettet med vann, og 3,5 g tørrvekt fôr ble tilsatt på toppen av jorda i hvert replikat.

Forsøket ble fulgt opp ukentlig de første 4 ukene. Antall overlevende individer og total meitemarkvekt per replikat ble undersøkt, samt at fôret ble byttet ut og vanninnholdet kontrollert. Etter 4 uker ble de voksne meitemarkene tatt ut. Replikatene ble deretter tilsatt omtrent 1 g tørrvekt fôr og plassert i forsøksrommet i 4 nye uker for registrering av avkom. De voksne individene som ble tatt ut etter 4 uker ble overført til store petriskåler med fuktet tørkepapir i 48 timer for tømning av tarmen. Deretter ble de oppbevart i beholdere av HD polyetylen ved -20 °C fram til kjemisk analyse. Jordprøver for kjemisk analyse ble tatt ut samtidig, lagt i polypropylenposer og lagret på samme måte. Åtte uker etter oppstart ble alle replikatene undersøkt for avkom i form av kokonger og juvenile mark. Både tomme og fulle kokonger ble registrert, samt totalt antall og total vekt av juvenile.

### 2.4.3 Utvidet reproduksjonsforsøk

For én av komponentene ble det laget dobbelt sett av eksponeringsbeholdere ved oppstarten av forsøket. Samtlige beholdere ble dosert samtidig, men kun halvparten ble benyttet i det vanlige reproduksjonsforsøket. Etter 8 uker da antall juvenile og kokonger ble registrert ble

avkommet i hvert av replikatene delt inn i to grupper etter størrelse. Deretter ble det tatt ut 5 tilfeldige individer fra gruppen med store juvenile og 5 fra gruppen av små juvenile. Totalvekten av de ti juvenile meitemarkene ble registrert før disse ble tilsatt de ubenyttede eksponeringsbeholderne. De ble altså tilført jord som var dosert samtidig og med samme konsentrasjon som den de hadde klekket i. Eksponeringsbeholderne ble tilført noe mindre fôr enn de voksne fikk i hovedforsøket de første ukene, men fôret ble fortsatt byttet ukentlig og mengden økte til 3,5 g tørrvekt per replikat etter noen uker. Med jevne mellomrom ble størrelsen på meitemarken i en av kontrollene undersøkt. Syv uker etter overføring av juvenile til nye beholdere nærmet dyrene seg voksen størrelse og samtlige replikater ble undersøkt for antall individer, total vekt og status på utvikling av klitellum. Klitellum (se bilde) kjennetegner at meitemarken er kjønnsmoden. Deretter ble tilsvarende undersøkelser foretatt minimum hver 14. dag fram til > 80 % av kontrollindividene var kjønnsmodne. Formålet med denne tilleggsundersøkelsen var å avdekke eventuelle effekter på utviklingen av avkom som ikke ville blitt registrert i et vanlig reproduksjonsforsøk. Ved avslutningen av forsøket ble meitemarkene overført til petriskåler med papir for tømming av tarmen på tilsvarende måte som i reproduksjonsforsøket. Meitemark og jordprøver ble deretter frosset ved -20 °C fram til kjemisk analyse kunne foretas.

## 2.5 Kjemiske analyser og beregning av biokonsentrasjonsfaktor

Dosevalget i forsøket er basert på at man skal dekke området hvor en toksisk effekt oppstår. De kjemiske analysene har imidlertid som formål å avdekke potensialet for bioakkumulering i meitemark. I den sammenheng er det mest hensiktsmessig å benytte de laveste konsentrasjonene da vi antar at disse er mest realistiske i forhold til konsentrasjoner som kan oppstå i miljøet. Kjemiske analyser er foretatt av prøver fra de tre laveste konsentrasjonene fra hvert av forsøkene. For komponenten som ble benyttet i det utvidede forsøket ble det foretatt analyser både av voksne individer fra reproduksjonsforsøket og av det kjønnsmodne avkommet. Formålet var å se på eventuell forskjell mellom individer som var eksponert kun mens de var voksne og individer som var eksponert fra klekking til kjønnsmodning. For sistnevnte er den totale eksponeringstiden også betydelig lenger (totalt 18 uker).

Gjennomføring av kjemiske analyser ble gjennomført av Eurofins. Både jordprøver og meitemarkprøver ble ekstrahert med metanol og selve analysen ble utført ved negativ ionisering elektropray LC-MS/MS.

Beregning av biokonsentrasjonsfaktor (BCF) ble utført i henhold til EUs Technical Guidance Document (TGD) (EU 2003) hvor det anbefales at BCF beregnes ut fra våtvekt-konsentrasjoner av forbindelsene, både i jord og meitemark.

$$\text{BCF} = \text{Kons}_{\text{meitemark}} / \text{Kons}_{\text{jord}}$$

## 2.6 Statistiske analyser

For de dosebestemmende forsøkene ble det benyttet lineær regresjonsanalyse for å sammenligne stigningstallet til de 3 forbindelsene. Bestemmelse av eventuell forskjell i kroppsvektendringer hos meitemarkene og reproduksjonsendepunktene i hovedforsøkene ble undersøkt med ANOVA og Dunnett's test. ECx-verdier ble bestemt ved ikke-lineær

regresjonsanalyse. Alle statistiske analyser ble foretatt med programvaren GraphPad Prism versjon 4.0.

### **3. Resultater**

#### **3.1 Dosebestemmende forsøk**

Det var ingen reduksjon i overlevelse i forsøkene med PFOS og 6:2 FTS, mens ved 500 mg/kg PFOA var overlevelsen redusert til 20 %. Overlevelsen var imidlertid 100 % ved alle de andre konsentrasjonene av PFOA slik at det var usikkert hvor sterkt dødeligheten i den høyeste dosen burde vektlegges. Redusert vektøkning med økende konsentrasjon av stoff ble observert for både PFOS, PFOA og 6:2 FTS. Den tydeligste vektreduksjonen ble observert for 6:2 FTS. 6:2 FTS er videre en komponent som det finnes svært lite data på miljøeffekter for, og som antagelig vil øke i forbruk fordi den vil erstatte de ”gamle” PFAS-forbindelsene. Etter diskusjon med SFT ble det derfor bestemt at det utvidede reproduksjonsforsøket skulle gjennomføres med 6:2 FTS. Vanlige reproduksjonsforsøk i henhold til OECD retningsline 222 ble gjennomført med PFOS og PFOA.

#### **3.2 Reproduksjonsforsøk med PFOS og PFOA**

Da de dosebestemmende forsøkene så ut til å ha en effekt på vektøkningen hos de voksne meitemarkene for både PFOS og PFOA ble det bare gjort mindre justeringer i dosevalget for reproduksjonsforsøkene.

##### **3.2.1 PFOS**

###### **3.2.1.1 Effekter**

Ingen reduksjon i overlevelse blant voksne meitemark ble observert i reproduksjonsforsøket med PFOS. Samtlige replikater, inkludert kontroll hadde en svak reduksjon i kroppsvekt hos voksne etter 4 ukers eksponering, men det ble ikke observert behandlingsrelaterte endringer i kroppsvekten. For reproduksjonsparameterene ble det derimot registrert betydelige effekter av PFOS. Se tabell 1.

Tabell. 1. Resultatoversikt for reproduksjonsforsøk med meitemark (*E. fetida*) eksponert for PFOS

Kons (mg/kg)	Voksne		Avkom				
	Overlevelse (%)	Vektendring (%)	Tot.antall kokonger	Klekkesuksess (%)	Tot. antall juvenile	Tot. vekt av juvenile (mg)	Gj.sn. vekt av juvenile (mg)
0	100	92,6 ± 5,8	39,0 ± 6,3	97,5 ± 2,5	110,0 ± 14,2	1102 ± 314	9,88 ± 1,97
10	100	92,6 ± 5,3	35,3 ± 7,6	97,0 ± 3,4	98,0 ± 24,3	730 ± 37	7,75 ± 1,88
20	100	92,3 ± 6,1	35,0 ± 7,6	97,5 ± 2,4	100,3 ± 18,6	710 ± 281	6,91 ± 1,40*
40	100	93,7 ± 6,1	36,3 ± 6,4	93,5 ± 3,8	90,3 ± 30,4	510 ± 224*	5,62 ± 1,21*
80	96,7 ± 5,8	96,4 ± 7,8	23,0 ± 1,7*	82,1 ± 12,5*	52,3 ± 16,6*	285 ± 92*	5,52 ± 1,10*
150	96,7 ± 5,8	98,1 ± 6,3	14,0 ± 2,7*	97,7 ± 9,2	29,0 ± 7,9*	144 ± 37*	5,01 ± 0,65*
250	96,7 ± 5,8	100,4 ± 9,0	5,0 ± 4,0*	96,3 ± 9,4	9,3 ± 5,5*	43 ± 30*	4,24 ± 1,17*
500	100	97,0 ± 2,0	0,3 ± 0,6*	-	0*	-	-

Alle tall er gjennomsnitt av 3 paralleller (5 for kontroll) ± standardavvik.

\* Statistisk signifikant forskjell fra kontroll med ANOVA og Dunnettstest.  $p < 0,05$

Totalt antall kokonger, klekkesuksess og totalt antall juvenile var statistisk signifikant redusert fra og med 80 mg/kg jord, sammenlignet med kontrollen. Totalvekt av avkom var signifikant redusert fra og med 40 mg/kg, og det mest følsomme endepunktet i henhold til variansanalysen var gjennomsnittelig vekt av juvenile som var signifikant redusert fra og med 20 mg/kg jord.

Med klekkesuksess menes antall tomme (klekkede) kokonger dividert med antall fulle kokonger. Det er ingen opplagt endring i klekking med økende dose. Allikevel er det verdt å merke seg at relativt antall uklekkede (fulle) kokonger øker i området der totalantallet av kokonger begynner å reduseres (se tabell 1 ved 80 mg/kg).

Doseresponskurvene for noen utvalgte endepunkter er vist i figur 1. Av kurvene for total og gjennomsnittelig vekt av juvenile ser man at forsøkene med fordel kunne vært gjennomført med enda lavere konsentrasjoner enn 10 mg/kg.

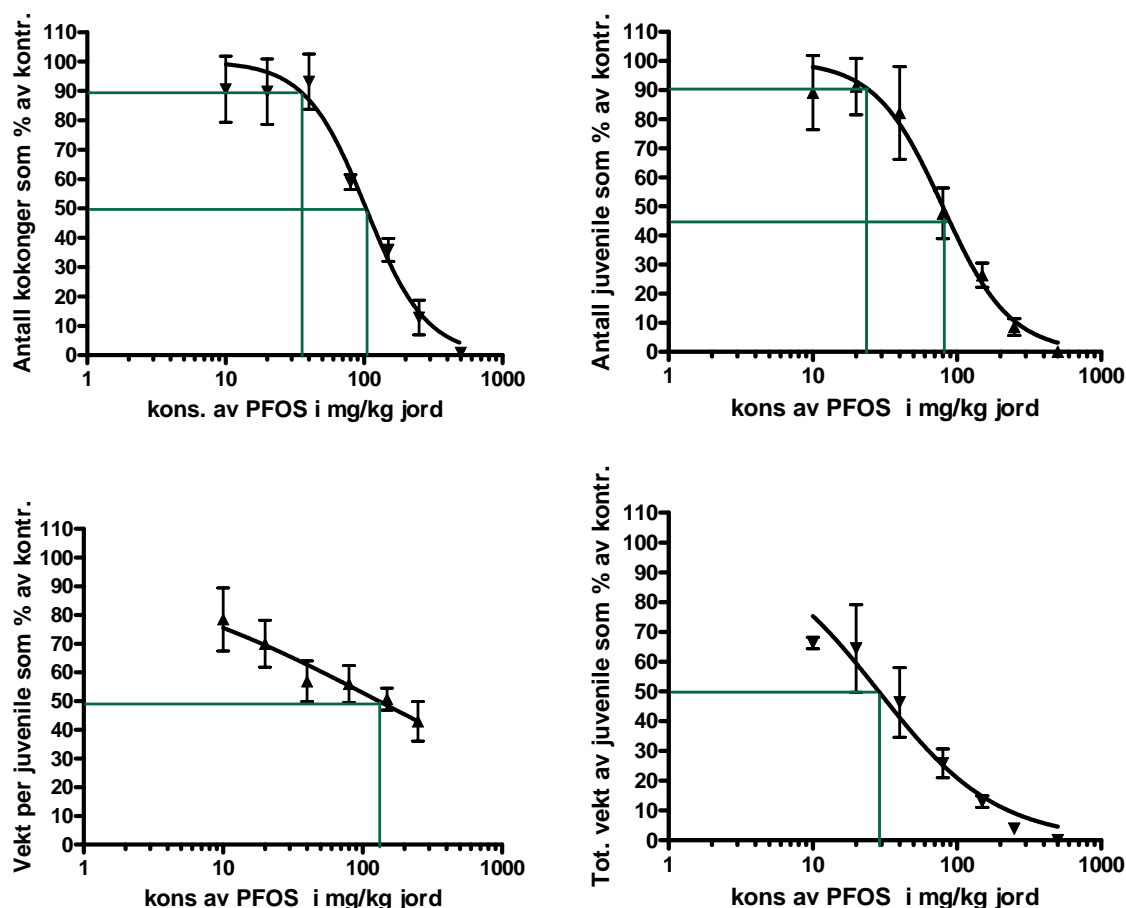


Fig. 1. Dose-responskurver for reproduksjonsparametere hos meitemark (*E. fetida*) eksponert for i PFOS. Respsen er oppgitt som % av kontrollen slik at  $EC_{50}$  og  $EC_{10}$  kan leses av kurven (merket av på figurene). Punktene representerer et gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

Tabell 2 gir en oversikt over  $EC_{50}$ - og  $EC_{10}$ -verdier beregnet ut fra dose-resonskurvene i figur 1. Verdiene er basert på nominelle konsentrasjoner av PFOS i jord. For totalvekt av juvenile og gjennomsnittsvikt per juvenil måtte dose-responskurven ekstrapoleres for å få fastsatt  $EC_{10}$ -verdiene da laveste konsentrasjon i forsøket var 10 mg/kg.

Tabell 2.  $EC_{50}$ - og  $EC_{10}$ -verdier for meitemark (*E. fetida*) eksponert for PFOS.

Endepunkter	$EC_{50}$ (95 % konf. int) i mg/kg	$EC_{10}$ (95 % konf. int) i mg/kg
Antall kokonger	103 (85-127)	43 (21-88)
Antall juvenile	80 (62-103)	25 (14-44)
Totalvekt av juvenile	29 (21-39)	4 (2-8)*
Vekt per juvenil	131 (65-262)	0,9 (0,07-10)*

\* Verdier som er ekstrapolert og som må vektlegges med forsiktighet.

### 3.2.1.2 Bioakkumulering

De analyserte konsentrasjonene av PFOS i jord (tørrvekt) viser god overensstemmelse med de nominelle konsentrasjonene (se tabell 3). Dette tyder også på at det ikke foregikk nedbrytning av PFOS i løpet av forsøket (tid fra tilsetning av stoff til jordprøve ble tatt ut var 5 uker). I henhold til EUs TGD ble BCF beregnet ut fra PFOS i våtvekt jord og våtvekt meitemark. Meitemarktarmen ble tømt før analyse slik at det kun er stoff som er tatt opp av organismen som er oppgitt i tabell 3.

Tabell 3. Oversikt over nominelle og analyserte konsentrasjoner av PFOS i jord og meitemark (*E. fetida*), samt BCF etter 4 ukers eksponering.

Nominell kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. meitemark	BCF
10	9,9 ± 0,2	7,0 ± 0,1	19,3 ± 3,1	2,8
20	21,0 ± 1,7	15,0 ± 1,3	33,3 ± 3,2	2,2
40	42 ± 10,8	25,5 ± 1,7	46,3 ± 1,5	1,8
			<b>Gj.snitt BCF:</b>	<b>2,3 ± 0,5</b>

Analyseverdiene er gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

Analyseresultatene viste at BCF lå mellom 1,8 og 2,8. Det ser ut som om BCF reduseres med økende konsentrasjon av PFOS. Dette kan skyldes at meitemarkene unngår å spise jord på grunn av PFOS-innholdet. Ved de høyeste konsentrasjonene ble det ofte observert at meitemarkene unngikk å grave seg ned i jorda.

## 3.2.2 PFOA

### 3.2.2.1 Effekter

Ingen reduksjon i overlevelse ble observert i reproduksjonsforsøket med PFOA. Det var heller ingen behandlingsrelaterte endringer i kroppsvekt hos de voksne individene.

Reproduksjonsparametrene var imidlertid påvirket av eksponeringen for PFOA, se tabell 4.

Tabell. 4 Resultatoversikt for reproduksjonsforsøk med meitemark (*E. fetida*) eksponert for PFOA

Kons (mg/kg)	Voksne		Avkom				
	Overlevelse (%)	Vekt (% av startvekt)	Tot.antall kokonger	Klekke suksess (%)	Tot. antall juvenile	Tot. vekt av juvenile (mg)	Gj.sn. vekt av juvenile (mg)
0	100	89,9 ± 5,0	46,4 ± 4,5	96,2 ± 2,2	136,6 ± 6,3	1843 ± 175	13,5 ± 1,2
10	100	91,1 ± 3,1	36,3 ± 6,7	96,7 ± 3,6	120,7 ± 16,2	1632 ± 152	13,6 ± 0,6
20	100	89,0 ± 4,6	47,7 ± 13,3	99,2 ± 1,4	149,0 ± 33,8	1239 ± 349*	8,2 ± 0,5*
40	100	89,3 ± 0,7	46,7 ± 1,2	95,7 ± 2,2	126,3 ± 8,5	984 ± 117*	7,8 ± 1,2*
80	100	86,4 ± 2,0	45,3 ± 5,0	98,6 ± 2,5	118,7 ± 14,4	718 ± 143*	6,0 ± 0,7*
150	100	82,8 ± 3,3	44,0 ± 8,9	93,3 ± 1,1	100,0 ± 22,1*	527 ± 135*	5,3 ± 1,3*
250	100	87,1 ± 1,9	30,0 ± 5,3*	80,3 ± 7,5	54,3 ± 16,9*	312 ± 28*	6,1 ± 1,7*
500	100	92,7 ± 5,2	18,0 ± 7,6*	39,1 ± 26,0*	13,3 ± 12,3*	73 ± 54*	5,8 ± 3,4*

Alle tall er gjennomsnitt av 3 paralleller (5 for kontroll) ± standardavvik.

\* Statistisk signifikant forskjell fra kontroll med ANOVA og Dunnets test.  $p < 0,05$

Totalt antall kokonger var statistisk signifikant redusert fra og med 250 mg/kg, og klekkesuksessen var signifikant redusert ved 500 mg/kg. Totalt antall juvenile var signifikant redusert sammenlignet med kontroll fra og med 150 mg/kg. De to mest følsomme endepunktene var totalvekt av avkom og gjennomsnittsvekt per juvenil som var signifikant redusert fra og med 20 mg PFOA/kg jord.

Dose-responskurvene for noen utvalgte endepunkter er presentert i figur 2. For både antall kokonger og klekkesuksess måtte relativt høye konsentrasjoner av PFOA tilsettes før det ble observert en effekt. Ved de to høyeste konsentrasjonene (250 og 500 mg/kg) faller imidlertid kurven bratt. Samme tendens ble observert for antall juvenile, men effektene startet ved noe lavere konsentrasjoner. For totalvekten av juvenile derimot, faller kurven sakte og gradvis fra og med de laveste konsentrasjonene som er undersøkt. Forskjellen i kurveforløpet påvirker  $EC_x$ -verdiene og ikke minst konfidensintervallene. Oversikt over beregnede  $EC_{50}$ - og  $EC_{10}$ -verdier er gitt i tabell 5.

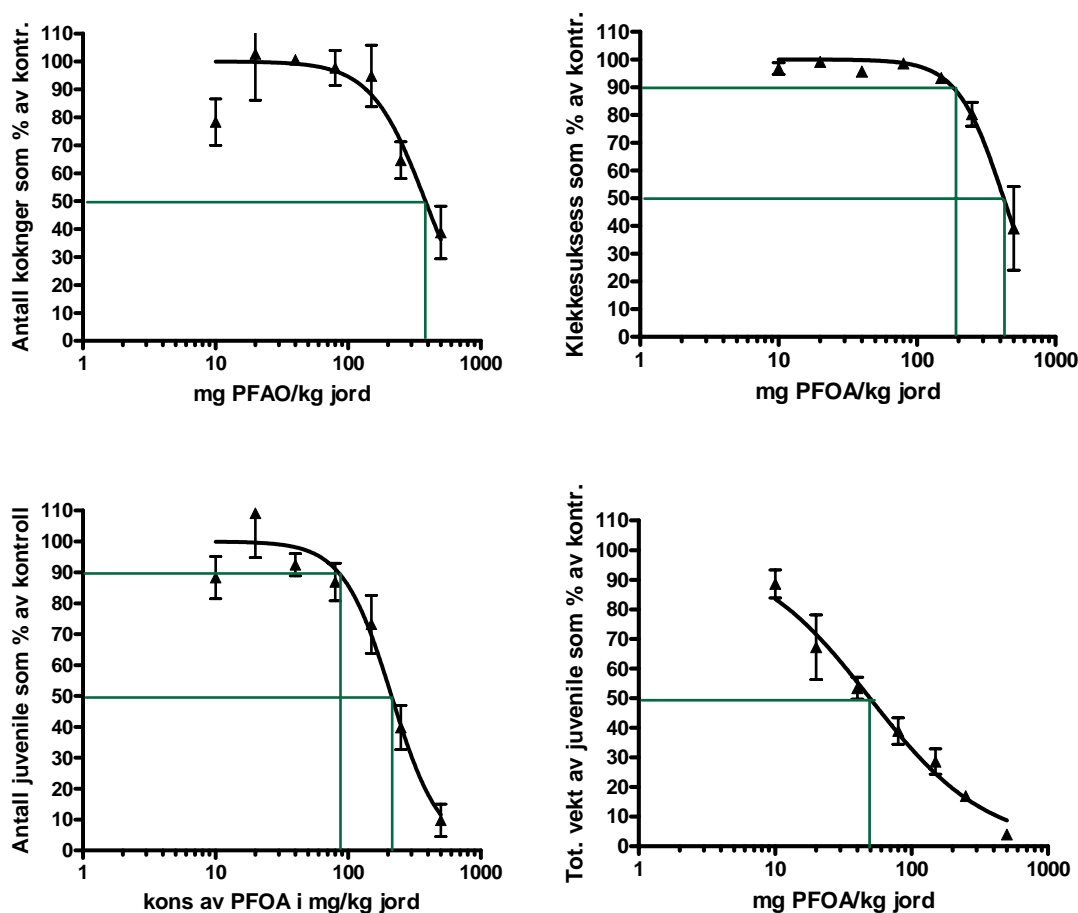


Fig. 2. Dose-responskurver for reproduksjonsparametere for meitemark (*E.fetida*) eksponert for PFOA. Responsen er oppgitt som % av kontrollen slik at EC<sub>50</sub> og EC<sub>10</sub> kan leses av kurven (merket av på figurene). Punktene representerer et gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

I forsøket med PFOA var det vanskelig å fastsette EC<sub>10</sub>-verdier for flere av reproduksjonsendepunktene fordi 95 % konfidensintervallene ble så store at EC<sub>x</sub>-verdiene ble misvisende. I de tilfellene dette gjelder er ikke EC<sub>10</sub> fastsatt. EC<sub>x</sub>-verdiene er basert på nominelle konsentrasjoner av PFOA i jord.

Tabell 5. EC<sub>50</sub>- og EC<sub>10</sub>-verdier for meitemark (*E.fetida*) eksponert for PFOA

Endepunkter	EC <sub>50</sub> (95 % konf. int) i mg/kg	EC <sub>10</sub> (95 % konf. int) i mg/kg
Antall kokonger	383 (281-524)	*
Klekkesuksess	423 (365-491)	189 (116-308)
Antall juvenile	213 (173-261)	94 (49-181)
Totalvekt av juvenile	50 (40-61)	*
Vekt per juvenil	115 (60-223)	*

\* EC<sub>10</sub> kunne ikke beregnes enten fordi det førte til ekstrapolering langt utenfor konsentrasjonsområdet eller fordi konfidensintervallet ble for bredt.

### 3.2.2.2 Bioakkumulering

De analyserte konsentrasjonene av PFOA i jord (tørrvekt) lå en del høyere enn den nominelle konsentrasjonen i jord. Dette skyldes antagelig en forskjell mellom internstandarder benyttet i de kjemiske analysene og det stoffet som ble benyttet i effektstudiene. Resultatene tyder imidlertid på at det ikke har forgått nedbrytning av PFOA i løpet av forsøket. Hvorvidt man ønsker å bruke nominelle eller analyserte konsentrasjoner ved fastsettelse av effektgrenser kan variere. I kapittel 4 blir imidlertid den fastsatte effektgrensen justert for analysert innhold av PFOA i jord. I henhold til EUs TGD beregnes BCF ut fra våtvekt av PFOA i jord og meitemark. Meitemarkarmen ble tømt før analyse slik at det kun er stoff som er tatt opp av organismen som er oppgitt i tabell 6.

Tabell 6. Oversikt over nominelle og analyserte konsentrasjoner av PFOA i jord og meitemark (*E. fetida*) samt BCF etter 4 ukers eksponering.

Nominell kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. meitemark	BCF
10	16,3 ± 2,1	11,6 ± 1,4	11,3 ± 3,0	1,0
20	34,3 ± 2,3	24,3 ± 1,9	24,7 ± 0,6	1,0
40	58 ± 3,2	42,0 ± 2,4	29,0 ± 3,0	0,7
			<b>Gj.snitt BCF:</b>	<b>0,9 ± 0,2</b>

Analyseverdiene er gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

BCF i forsøket med PFOA lå på omtrent 1. Resultatene viste dermed ingen tegn til oppkonsentrasjon av PFOA fra jord til meitemark.

## 3.3 Utvidet reproduksjonsforsøk med 6:2 FTS

### 3.3.1 Reproduksjonsforsøk

Ingen effekter på overlevelse av voksne meitemark ble observert. Derimot var det signifikant lavere vekt og større prosentvis vektreduksjon hos voksne mark ved den høyeste konsentrasjonen (500 mg/kg), sammenlignet med kontrollen. Reproduksjonsparametrene var også påvirket av eksponeringen for 6:2 FTS, se tabell 7.

Tabell. 7 Resultatoversikt for reproduksjonsforsøk med meitemark (*E. fetida*) eksponert for 6:2 FTS

Kons (mg/kg)	Voksne		Avkom				
	Overlevelse (%)	Vekt (% av startvekt)	Tot.antall kokonger	Klekke suksess (%)	Tot. antall juvenile	Tot. vekt av juvenile (mg)	Gj.sn. vekt av juvenile (mg)
0	100	92,0 ± 4,9	39,6 ± 9,4	97,2 ± 1,7	93,6 ± 18,5	530 ± 158	5,9 ± 2,4
10	100	88,3 ± 11,9	42,3 ± 7,8	95,9 ± 4,2	98,3 ± 28,2	544 ± 28	5,8 ± 1,5
20	100	91,7 ± 1,5	46,7 ± 6,0	100 ± 0	113,7 ± 23,4	569 ± 210	5,0 ± 1,4
40	100	94,9 ± 5,2	39,7 ± 4,5	97,4 ± 2,5	91,0 ± 13,2	419 ± 37	4,7 ± 1,2
80	100	97,2 ± 4,8	44,0 ± 2,7	95,4 ± 4,1	100,7 ± 6,1	406 ± 31	4,0 ± 0,2
150	100	93,6 ± 8,6	36,0 ± 2,7	97,3 ± 2,6	74,3 ± 11,9	343 ± 42	4,6 ± 0,2
250	100	89,9 ± 6,5	36,0 ± 5,0	95,2 ± 4,8	72,0 ± 31,3	244 ± 100*	3,4 ± 0,2
500	100	80,2 ± 3,1*	23,0 ± 7,2*	88,8 ± 5,8*	43,3 ± 15,3*	197 ± 20*	4,9 ± 1,6

Alle tall er gjennomsnitt av 3 paralleller (5 for kontroll) ± standardavvik.

\* Statistisk signifikant forskjell fra kontroll med ANOVA og Dunnets test.  $p < 0,05$

Totalt antall kokonger, klekkesuksess og totalt antall juvenile var statistisk signifikant redusert ved 500 mg/kg sammenlignet med kontrollen. Totalvekten av juvenile var signifikant redusert fra og med 250 mg/kg, mens ingen signifikant forskjell fra kontroll ble observert for gjennomsnittsvekten av juvenile.

Dose-responskurver for noen utvalgte endepunkter er vist i figur 3.

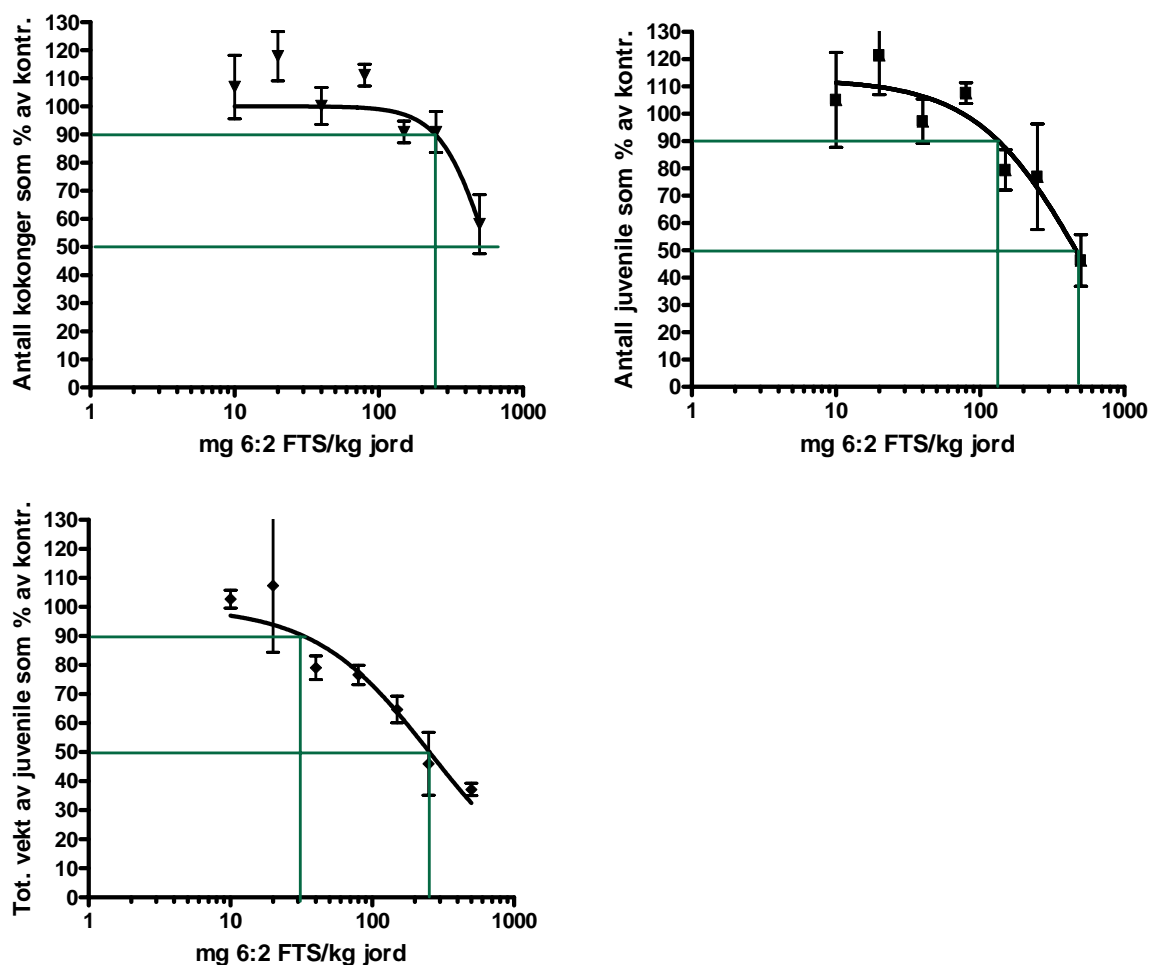


Fig. 3. Dose-responskurver for reproduksjonsparametere hos meitemark (*E.fetida*) eksponert for 6:2 FTS. Responsen er oppgitt som % av kontrollen slik at  $EC_{50}$  og  $EC_{10}$  kan leses av kurven (merket av på figurene). Punktene representerer et gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

Fordi signifikante effekter først ble observert ved høyest eller nest høyeste konsentrasjon var det ikke mulig å fastsette  $EC_{50}$ - og  $EC_{10}$ -verdier for flere av endepunktene som ble undersøkt. Det mest følsomme endepunktet var imidlertid totalvekt av juvenile, hvor det også var mulig å fastsette effektkonsentrasjoner.  $EC_x$ -verdiene er basert på nominelle konsentrasjoner av 6:2 FTS i jord. Se tabell 8.

Tabell 8.  $EC_{50}$ - og  $EC_{10}$ -verdier for meitemark (*E.fetida*) eksponert for 6:2 FTS

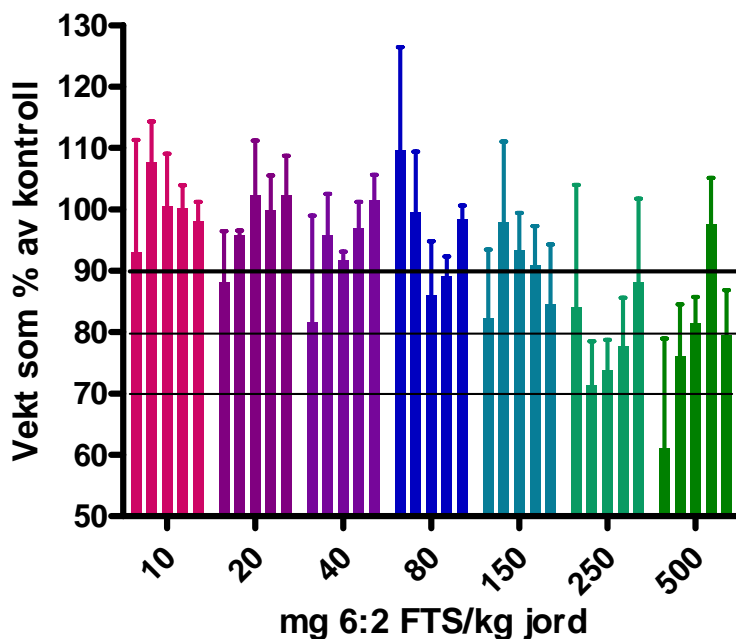
Endepunkter	$EC_{50}$ (95 % konf. int) i mg/kg	$EC_{10}$ (95 % konf. int) i mg/kg
Antall kokonger	566 (401-800)*	247 (127-478)
Totalvekt av juvenile	253 (164-392)	30 (10-89)

\* Ekstrapolerte verdier som bør vektlegges med forsiktighet.

-  $EC$ -verdi kan ikke fastsettes, eller konfidensintervallet er for bredt til å kunne benyttes.

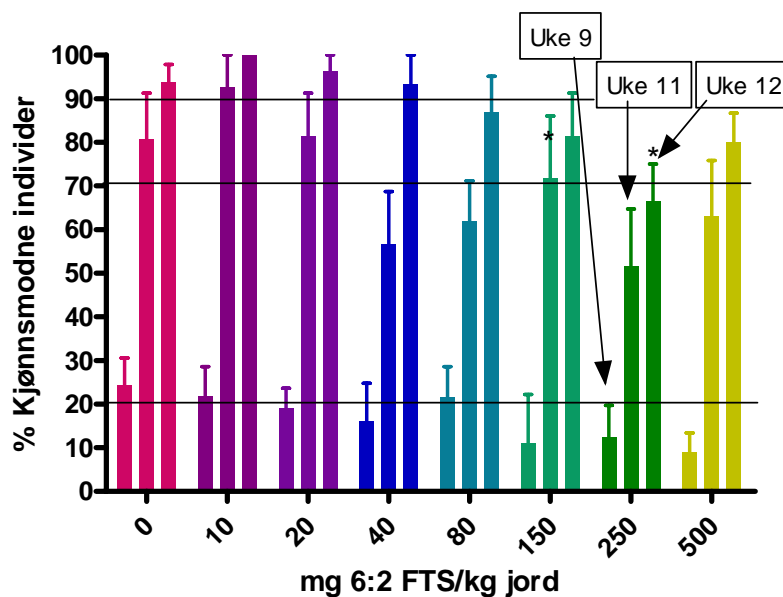
### 3.3.2 Vekst av avkom (F1-generasjonen)

For å undersøke hvorvidt 6:2 FTS kunne ha effekter på oppvekst og kjønnsmodning av avkom ble 10 juvenile fra hver av de tre replikatene fulgt videre i nye eksponeringsbeholdere som beskrevet i kapittel 3. Tidspunktet for flytting av juvenile til nye beholdere blir heretter referert til som uke 0, og videre ukenummer er relatert til dette tidspunktet. Avkommet er ved dette tidspunktet mellom 0 og 4 uker gamle. Resultatet av vekstutviklingen av avkom uttrykt som % av kontroll er vist i figur 4. Det kan observeres noe lavere vekt ved de høyeste konsentrasjonene ved de fleste tidspunktene, men det ble ikke observert statistisk signifikante forskjeller fra kontroll ved noe tidspunkt.



Figur 4. Stolpediagrammet viser vekten av avkommet fra reproduksjonsforsøk med meitemark (*E.fetida*) eksponert for 6:2 FTS. Hver farge representerer én konsentrasjon og stolper med samme farge indikerer vekt som % av kontroll ved tid 0 (avslutning av reproduksjonsforsøk) og etter 7, 9, 11 og 12 uker. Hver stolpe er et gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

Fra og med uke 7 ble samtlige meitemark sjekket i forhold til utvikling av klitellum (se bilde i kapittel 3). Fullt utviklet klitellum er et tegn på at meitemarken er kjønnsmoden. Ved 7 uker var ingen meitemark kjønnsmodne ved noen konsentrasjoner inkludert kontroll. De første kjønnsmodne individene ble observert ved uke 9. Fra uke 11 til 12 økte andelen individer med klitellum betydelig ved alle konsentrasjoner, inkludert kontroll. Utviklingen i antall individer med klitellum fra uke 9 til 12 er vist i figur 5.



Figur 5. Hver konsentrasjon av 6:2 FTS er representert med 3 stolper i samme farge og viser %-andelen meitemark som er kjønnsmodne etter henholdsvis 9, 11 og 12 uker (se forklaring i figuren). Hver stolpe er et gjennomsnitt av 3 paralleller (5 kontroller) med standardavvik.  
\* Signifikant forskjellig fra kontrollen med ANOVA og Dunnets test.  $p < 0,05$ .

Det kan observeres en forsinkelse i kjønnsmodning med økende konsentrasjoner av 6:2 FTS i figur 5, men andelen kjønnsmodne meitemark er kun statistisk signifikant lavere enn kontrollen ved 250 mg/kg etter 12 uker.

### 3.3.3 Bioakkumulering i foreldre- og F1- generasjonen

I det utvidede forsøket med 6:2 FTS ble det foretatt analyser av jord og meitemark fra både foreldregenerasjonen, altså etter 4 ukers eksponering (5 uker etter tilsetning av stoff til jorda) og fra F1-generasjonen som ble klekket i dosert jord og hadde vært eksponert i 12-16 uker. Tabell 9 nedenfor viser resultatene fra foreldregenerasjonen og tabell 10 viser resultatene fra avkommet.

Analysene av 6:2 FTS i jord viste at konsentrasjonene i jord målt 5 uker etter at stoffet ble tilsatt var noe lavere enn de nominelle konsentrasjonene ved 20 og 40 mg/kg. Det er vist at delvis nedbrytning av 6:2 FTS kan forekomme (Key et al. 1998), men det er lite sannsynlig i dette tilfelle da det ikke ble observert noen videre nedbrytning mellom uke 5 og uke 21 etter dosering. Ved 20 mg/kg blir det gjenfunnet omtrent 75 % ved kjemisk analyse og ved 40 mg/kg ble det gjenfunnet 68 %. Standardavviket mellom parallellene er imidlertid lav hvilket tyder på jevn fordeling i prøven. Ved fastsettelse av effektgrenser for 6:2 FTS i kapittel 4 blir det justert for analysert konsentrasjon i jord.

Tabell 9. Oversikt over nominelle og analyserte konsentrasjoner av 6:2 FTS i jord og meitemark (*E. fetida*) samt BCF etter **4 ukers** eksponering.

Nominell kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. meitemark	BCF
10	10,2 ± 0,8	7,4 ± 0,6	31,3 ± 4,0	4,3
20	15,3 ± 1,2	11,8 ± 0,9	21,0 ± 1,7	1,8
40	27,3 ± 2,5	19,9 ± 1,8	61,0 ± 5,0	3,1
			<b>Gj.snitt BCF:</b>	<b>3,0 ± 1,2</b>

Analyseverdiene er gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

På tross av den lave vannløseligheten til 6:2 FTS var opptaket i meitemark (foreldregenerasjonen) relativt høyt med en gjennomsnittelig BCF på 3,0. Hos avkom som ble undersøkt etter omtrent 12-16 ukers eksponering var innholdet i meitemarkene like høyt som hos de voksne, det vil si omtrent 3 ganger så høyt som i jorda. Det ble altså ikke observert noen økning i biokonsentrasjon fra jord til meitemark selv om eksponeringstiden økte betydelig.

Tabell 10. Oversikt over nominelle og analyserte konsentrasjoner av 6:2 FTS i jord og meitemark (*E. fetida*) samt BCF etter **12-16 ukers** eksponering.

Nominell kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg t.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. jord	Analysert kons. i mg/kg v.v. meitemark	BCF
10	6,0 ± 0,2	4,3 ± 0,4	12,7 ± 2,5	2,9
20	13,0 ± 1,7	9,0 ± 1,1	26,0 ± 4,6	2,9
40	28,0 ± 2,0	19,3 ± 1,5	42,0 ± 10,8	2,2
			<b>Gj.snitt BCF:</b>	<b>2,7 ± 0,4</b>

Analyseverdiene er gjennomsnitt av 3 paralleller med standardavvik.

## 4. Diskusjon og konklusjon

Valg av konsentrasjoner for de dosebestemmende forsøkene ble gjort på bakgrunn av akutt toksisitetstests med PFOS gjennomført av 3M på samme meitemark-art og OECD-jord som i dette prosjektet. I våre forsøk ble det imidlertid ikke observert dødelighet ved doser opp til 500 mg/kg jord i motsetning til forsøket som ble gjennomført i regi av 3M (3M 2002) hvor  $LC_{50}$  etter 14 dager var 373 mg/kg. Derimot ble det observert effekter på vektøkning også i dette prosjektet, men bare i akutforsøkene. Etter 4 ukers eksponering ble det ikke lenger registrert forskjeller i vektutvikling mellom kontrollen og voksne meitemark ved noen konsentrasjoner. I forsøkene Bioforsk gjennomførte ble jorda dosert 1 uke før meitemarkene ble tilsatt, til forskjell fra 24 timer før oppstart som ble benyttet i forsøket til 3M. Men i henhold til rapporterte adsorpsjons/desorpsjonsforsøk (Ellefson 2002) innstilles det en likevekt i løpet av 24 timer slik at dette ikke burde ha innvirkning på stoffenes biotilgjengelighet. Forskjellen i toksisitet mellom forsøkene publisert av 3M og resultatene presentert her er vanskelig å forklare. Fordi det ikke ble undersøkt konsentrasjoner over 500 mg/kg i dette prosjektet er det ikke mulig å gi noe fullstendig beskrivelse av forskjellen i den målte toksisiteten mellom de to forsøkene.

Ved avslutningen av reproduksjonsforsøkene med forbindelsene PFOS, PFOA og 6:2 FTS var det klart at PFOS og PFOA var de mest toksiske og 6:2 FTS minst toksisk. Det var også tydelig at reproduksjonsparametere var vesentlig mer følsomme enn endepunkter som overlevelse og vektutvikling hos voksne individer, spesielt for PFOS og PFOA. Mekanismene bak de toksikologiske effektene som observeres er ikke undersøkt, men fra studier med pattedyr er det kjent at blant annet PFOS og PFOA påvirker cellulære mekanismer som energiproduksjon i celler og peroksisomproliferasjon. Dette er vitale mekanismer også for laverestående organismer. Ved kjemiske analyser av jord fra de tre laveste av de undersøkte konsentrasjonene av PFOS, PFOA og 6:2 FTS viste det seg at de analyserte konsentrasjonene for PFOA lå høyere enn de nominelle, mens de for 6:2 FTS lå noe lavere. De konsentrasjonene som ble tatt ut for analyse dekker området for NOEC og/eller  $EC_{10}$  for alle tre forbindelsene. Der det er avvik mellom nominell og analysert konsentrasjon av forbindelsene i jorda, vil den analyserte konsentrasjonen bli benyttet.

### PFOS

For de voksne individene ble det ikke observert signifikante, behandlingsrelaterte forskjeller fra kontrollen for noen av de målte parameterne. For avkom derimot var det mest følsomme endepunktet totalvekten av avkom eller gjennomsnittsvekt per avkom, avhengig av hvilken statistisk metode man vurderer og hvor på dose-responskurven man fokuserer. Det er ikke registrert statistisk signifikant forskjell mellom kontroll og 10 mg/kg jord for noen av de målte endepunktene, dette blir derfor NOEC for forsøket. Da det var overensstemmelse mellom nominell og analysert konsentrasjon av PFOS i jord vil det ikke ha noen innvirkning hvilke av disse man baserer NOEC på.

Sammenligner vi  $EC_{50}$ -verdiene for reproduksjonsendepunktene, ser vi at  $EC_{50}$  for totalvekt av juvenile er betydelig lavere enn  $EC_{50}$  for gjennomsnittsvekten av juvenile. Dette forekommer fordi dose-responskurven for totalvekten av avkom er brattere enn den for gjennomsnittsvekten (se figur 1). Ser vi på de ekstrapolerte  $EC_{10}$  verdiene derimot, er gjennomsnittsvekten per juvenil mest følsomme endepunkt. Dette betyr at man ser en effekt på snittvekten ved lavere konsentrasjoner enn for totalvekt, men at totalvekten av juvenile påvirkes sterkere enn gjennomsnittsvekten når konsentrasjonen av PFOS i jorda øker.

Det blir ofte anbefalt heller å benytte  $EC_{10}$  som et nulleffektsnivå enn NOEC, fordi dette statistisk sett er et mer robust mål. I forsøket med PFOS ser vi imidlertid at  $EC_{10}$  havner utenfor konsentrasjonsområdet som er undersøkt. Fra et statistisk synspunkt bør man ikke sette en  $EC_x$  som er basert på ekstrapolerte verdier fra en regresjonsanalyse, det anbefales derfor å legge størst vekt på NOEC i dette forsøket. Hadde man imidlertid hatt med en til to konsentrasjoner som var lavere enn 10 mg/kg må man anta at nulleffektsnivået hadde blitt noe lavere.

De målte nivåene av PFOS i meitemarkvev var i gjennomsnitt 2,3 ganger høyere enn det analyserte nivået i jorda. Dette er imidlertid beregnet ut fra våtvekt for både jord og meitemark. For å kunne sammenligne resultatene fra dette forsøket med meitemarkforsøket til 3M (3M 2002) må BCF uttrykkes på samme måte i begge forsøk, det vil si våtvekt meitemark og tørrvekt jord. BCF i PFOS-forsøket uttrykt på denne måten blir 1,6, det vil si akkurat samme BCF som i 14-dagers forsøket fra 3M (3M 2002). Det kan tyde på at 14 dager var tilstrekkelig til å oppnå en likevekt mellom meitemark og jord for PFOS.

### **PFOA**

Heller ikke i forsøket med PFOA ble det observert signifikante forskjeller fra kontroll for de målte endepunktene hos voksne individer. Totalvekten av avkom og gjennomsnittvekt per avkom var de mest følsomme reproduksjons-endepunktene. Da det ble målt noe høyere konsentrasjoner av PFOA ved analyse av jorda enn de nominelle konsentrasjonene tilsa, vil de analyserte konsentrasjonene bli benyttet ved fastsettelse av NOEC. Reduksjonen i total- og gjennomsnittsvikt var signifikant fra og med 34 mg/kg og NOEC fastsettes derfor til 16 mg/kg jord. Ved sammenligning av  $EC_{50}$ -verdiene for de to endepunktene (se tabell 5) ser det ut til at totalvekten av avkom er noe mer følsom enn gjennomsnittsvikten, og at det derfor bør regnes som det mest følsomme endepunktet i forsøket.  $EC_{10}$  ble dessverre ikke fastsatt i dette forsøket da verdiene lå langt utenfor det undersøkte konsentrasjonsområdet, og konfidensintervallene ble dermed så vide at det ville være villedende å ta de med. Man bør ut fra dette legge størst vekt på NOEC i dette forsøket.

BCF-verdier basert på analyser av jord og meitemark lå på 1 ved eksponering for PFOA. Det indikerer at det ikke forekom noen oppkonsentrering av PFOA fra jord til meitemark i dette forsøket.

### **Reproduksjonseffekter forårsaket av PFOS og PFOA**

I PFOA-forsøket var totalt antall av kokonger relativt høyt til og med ved 500 mg/kg (nominell konsentrasjon), selv om det var under halvparten av kontrollen. Det som imidlertid er tydelig, er at PFOA hindrer klekking av kokongene (se tabell 4 og figur 2). Klekkesuksess begynner å synke ved 250 mg/kg og forskjellen fra kontroll er statistisk signifikant ved 500 mg/kg. Man så tendenser til tilsvarende respons for PFOS, men fordi antallet kokonger var lavt ved de høyeste konsentrasjonene, ble resultatene usikre. Det ble både for PFOS og PFOA, observert redusert klekking samtidig med at reduksjonen i totalt antall kokonger startet (se tabell 1 og 4). Man kan spekulere i hvorvidt PFOS og spesielt PFOA har en spesifikk virkningsmekanisme som påvirker reproduksjonen hos meitemark. Effekter på reproduksjon og avkom fra PFOS og/eller PFOA er også tidligere observert i organismer som nematoder, rotter og mus (Luebker et al. 2005; OECD 2002; Tominaga et al. 2004). Både PFOS og PFOA er dessuten foreslått klassifisert som reproduksjonsskadelig for mennesker. Videre studier som kan kartlegge mekanismene bak de negative effektene på reproduksjon hos flere arter ville være interessant.

## 6:2 FTS

Fluortelomeren var den eneste forbindelsen som vi hadde problemer med å løse i vann og derfor måtte tilsettes som tørt stoff. Det var derfor usikkert om stoffet i det hele tatt ville være biotilgjengelig for meitemark. 6:2 FTS er imidlertid den eneste av de tre undersøkte forbindelsene som har vist statistisk signifikante effekter på de voksne meitemarkene. Det ble ikke observert effekter på overlevelse, men vekten var signifikant redusert ved 500 mg/kg sammenlignet med kontrollen. Dette indikerer at 6:2 FTS var biotilgjengelig for meitemark. Reproduksjonsparameterene var imidlertid langt mindre følsomme for 6:2 FTS enn for PFOS og PFOA. Totalvekt av juvenile var signifikant redusert ved de to høyeste konsentrasjonene (fra og med 250 mg/kg), men ellers var både totalt antall kokonger, klekkesuksess og totalt antall juvenile kun negativt påvirket ved 500 mg/kg. Da vi også så effekter på vektutviklingen til de voksne individene ved denne konsentrasjonen kan det ikke utelukkes at reproduksjonseffektene oppstår som følge av en indirekte påvirkning ved at foreldrene er svekket. NOEC for dette forsøket var 150 mg/kg (nominell konsentrasjon). Det ble imidlertid også fastsatt en EC<sub>10</sub> for totalvekt av juvenile på 21 mg/kg (analysert konsentrasjon). Fordi EC<sub>10</sub> er lavere enn NOEC og en statistisk sett mer robust verdi anbefales det heller å legge vekt på EC<sub>10</sub> enn NOEC for dette forsøket.

Ved å følge den videre veksten hos avkommet oppnås flere fordeler. Eksponering helt fra klekking er et mer realistisk scenario og eksponeringstiden mangedobles. Eventuelle alvorlige skader på avkom som skyldes eksponering av foreldregenerasjonen kan også komme til syne. Det ble imidlertid avdekket lite statistisk signifikante langtidseffekter på avkom som både hadde klekket og blitt kjønnsmodne i 6:2 FTS kontaminert jord. Til tross for dette kunne det observeres en tendens til forsinkelse, både i vekst og kjønnsmodning ved de høyeste konsentrasjonene selv 18-22 uker etter at kokongene ble lagt og klekket. Dette indikerer at effekter på veksthemming som avdekkes i et forsøk hvor eksponeringstiden kun er 4 uker, kan vedvare over lang tid, og vil kunne ha en effekt på populasjonsutviklingen på sikt. I ettertid, når resultatene er vurdert, kan man mene at kanskje F1-generasjonen fra PFOA-forsøket heller burde vært fulgt videre, da det forsøket indikerte de tydeligste effektene på forsinket eller hemmet klekking av kokonger.

Analysene av jord og meitemark (foreldre og avkom) viste tydelig at 6:2 FTS var biotilgjengelig for meitemark. Konsentrasjonen av 6:2 FTS var 3 ganger høyere i organismene enn i jorda både hos voksne og avkom. Det at BCF ikke øker med eksponeringstiden (4 og 18-22 uker) tyder på at BCF har nådd et stabilt nivå.

### Biokonsentrasjon fra jord til meitemark.

Ved beregning av biokonsentrasjon av organiske forbindelser fra jord til meitemark, blir det ofte justert for fettinnholdet i meitemarken og det organiske materialet i jorda (Jager et al. 2003; Matscheko et al. 2002a). Dette vil ikke være hensiktsmessig for PFOS, PFOA eller 6:2 FTS da disse ikke følger det ”klassiske” mønsteret for fordeling i fettvev. Isteden indikerer studier at PFAS bindes til proteiner i plasma som albumin og beta-lipoproteiner (Kerstner-Wood et al. 2003). I høyere organismer er det også sett at PFOS og PFOA bindes til lever, og leverfetttsyrebindingprotein (L-FABP) ((Kerstner-Wood et al. 2003; Luebker et al. 2002; Miljøstyrelsen 2005). I dette prosjektet ble derfor hele meitemarken analysert, men uten tarminnhold. Innholdet av stoff i jord ble heller ikke justert i forhold til organisk materiale da dette ikke nødvendigvis representerer bindingen mellom jord og PFOS, PFOA eller 6:2 FTS.

For å sammenligne resultatene fra dette prosjektet med andre kjente bioakkumulerende stoffer kan det nevnes at BSAF (Biota-Soil Accumulation Factor) for ulike PAH-forbindelser i

meitemark (*E. andrei*) er vist å variere fra 2,4 til 8,2 (justert for lipidinnhold og organisk materiale) (Jager et al. 2000). BSAF for ulike bromerte flammehemmere og orto-PCB i meitemark (justert for lipidinnhold og organisk materiale) viste at for bromerte flammehemmere varierte BSAF fra 1 til 34 og for orto-PCB var gjennomsnittets BSAF lik 5 (Matscheko et al. 2002b).

I forsøkene med PFOS og 6:2 FTS ble BCF beregnet til å være mellom 2 og 3, altså noe lavere, men i samme størrelsesorden som det som er funnet for PAH og PCB. Verdiene for bromerte flammehemmere varierte mye, men en del verdier lå i samme området som PFOS og 6:2 FTS. BCF-verdier mellom 2 og 3 er ikke spesielt høyt, men det tyder på en viss oppkonsentrering av forbindelsene ved et lavt nivå i næringskjeden.

## 5. Forkortelser

BCF	Biokonsentrasjonsfaktor. Konsentrasjonen av et stoff i en organisme, dividert med konsentrasjonen av samme stoff i de omliggende omgivelsene.
BSAF	Biota-Soil Accumulation Factor. Konsentrasjonene av et stoff i en organisme, dividert med konsentrasjonen av samme stoff i omliggende omgivelser og matkilden.
EC <sub>x</sub>	“Effect Concentration” En konsentrasjon av et stoff som fører til x% respons sammenlignet med en kontroll.
6:2 FTS	6:2 fluortelomersulfonat
K <sub>d</sub>	Jord-vann partisjonskoeffisienten. Forholdet mellom konsentrasjonene av et stoff i den faste jordfasen og konsentrasjonen i jordvannfasen.
Konf. Int	Konfidensintervall
LC <sub>50</sub>	“Lethal Concentration”. Samme som EC bare at effekten er fast definert som dødlighet. LC <sub>50</sub> er den konsentrasjonen som i gjentatte forsøk fører til at halvparten av testorganismene dør.
LD50	“Lethal dose”. Samme som LC50 bortsett fra at stoffet er gitt som en fast dose og ikke er en konsentrasjon i omgivelsene.
LOEC	“Lowest observed effect concentration”. Laveste konsentrasjon som fører til en statistisk signifikant endring sammenlignet med en kontroll.
NMR	Nordisk MinisterRåd
NOEC	“No observed effect concentration”. Høyeste konsentrasjon av et stoff som <u>ikke</u> fører til statistisk signifikante forskjeller fra en kontroll.
NOEL	“No observed effect level”. Samme som NOEC men brukes ofte stoffet er gitt i doser heller enn som konsentrasjoner.
OECD	Organisation for economic co-operation and development
orto-PCB	orto-Polyklorete bifenyl
PAH	Polyaromatiske hydrokarboner
PFAS	Perfluorerte alkylforbindelser
PFOS	Perfluoroktylsulfonat
PFOA	Perfluorinert oktansyre
t.v	tørrvekt
v.v	våtvekt

## 6. Kilder

- 3M. 2002. Acute toxicity to the earthworm (*Eisenia fetida*). Test substance: PFOS. (RS-II-33).
- 3M. 2003. Toxicity to terrestrial plants. Test substance - PFOS. 3M Technical report.
- Ellefson ME. 2002. Soil adsorption/desorption study of Potassium Perfluorooctanesulfonate (PFOS). 3M Technical report. Project number E00-1311.
- EU. 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II. European Commission Joint Research Centre EUR 20418 EN/2.
- Fjeld E, Sclabach M, Berge JA, Green N, Eggen T, Snilsberg P, Vogelsang C, Rognerud S, Kjellberg G, Enge EK and others. 2005. Kartlegging av utvalgte nye organiske miljøgifter 2004. Brommerte flammehemmere, perfluoralkylstoffer, irgarol, diurol, BHT og dicofol. SFT-rapport 927/2005.
- Giesy JP, Kannan K. 2001. Global distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife. *Environmental Science & Technology* 35:4.
- Hekster FM, Laane RWPM, de Voogt P. 2003. Environmental and Toxicity Effects of Perfluoroalkylated Substances. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 179:23.
- Holmstrom KE, Jarnberg U, Bignert A. 2005. Temporal trends of PFOS and PFOA in guillemot eggs from the Baltic Sea, 1968-2003. *Environmental Science & Technology* 39(1):80-84.
- Jager T, Fleuren R, Hogendoorn E, de Korte G. 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental Science & Technology* 37:6.
- Jager T, Scanchez F, Muijs B, van der Velde E, Posthuma L. 2000. Toxicokinetics of polyaromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (oligochaeta) using spiked soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(4):9.
- Kallenborn B, Järnberg. 2004. Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the Nordic environment. *TemaNord* 552:107.
- Kannan K, Newsted J, Halbrook RS, Giesy JP. 2002. Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in mink and river otters from the United States. *Environmental Science & Technology* 36:2566-2571.
- Kerstner-Wood C, Coward L, Gorman G. 2003. Protein Binding of perfluorbutane sulfonate, perfluorhexanesulfonate, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate to plasma (human, rat, monkey), and various human derived plasma protein fractions. . Southern Research Corporation, Study 9921.7. USEPA Administrative Record AR-226.
- Key B, Howell R, Cs C. 1998. Defluorination of organofluorine sulfur compounds by *Pseudomonas* Sp. Strain D2. *Environmental Science & Technology* 32:5.
- Luebker D, Case M, York R, Moore J, Hansen K, Butenhoff JL. 2005. Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 215(1-2):22.
- Luebker DJ, Hansen KJ, Bass NM, Butenhoff JL, Seacat AM. 2002. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 176(3):175-185.
- Matscheko N, Lundstedt S, Svensson L, Harju M, Tysklind M. 2002a. Accumulation and elimination of 16 polycyclic aromatic compounds in the earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(8):6.
- Matscheko N, Tysklind M, de Witt C, Bergek S, Andersson R, Selleström U. 2002b. Application of sewage sludge to arable land-soil concentrations of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofurans, and biphenyls, and their accumulation in earthworms *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(12):2515-2525.
- Miljøstyrelsen. 2005. More environmental friendly alternatives to PFOS-compounds and PFOA. Miljøstyrelsen rapport 1013.
- OECD. 2002. Co-operation on existing chemicals Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts. ENV/JM/RD(2002)17/Final.
- Schultz MM, Barofsky DF, Field JA. 2003. Fluorinated Alkyl Surfactants. *Environmental Engineering Science* 20(5):15.
- SFT. 2004. Bruken av PerfluorAlkylStoffer (PFAS) i produkter i Norge. Materialstrømsanalyse. SFT-rapport.
- SFT. 2005. PerFluorAlkylStoffer (PFAS) og PerFluorOktanylSulfonat (PFOS) - relaterte forbindelser. Handlingsplan. SFT-rapport:17.
- Sohlenius AK, Eriksson AM, Hogstrom C, Kimland M, Depierre JW. 1993. Perfluorooctane Sulfonic-Acid Is a Potent Inducer of Peroxisomal Fatty-Acid Beta-Oxidation and Other Activities Known to Be Affected by Peroxisome Proliferators in Mouse-Liver. *Pharmacology & Toxicology* 72(2):90-93.
- Stock NL, Lau FK, Ellis DA, Martin JW, Muir DCG, Mabury SA. 2004. Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the north American troposphere. *Environmental Science & Technology* 38(4):991-996.
- Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, Arizono K. 2004. Effects of perfluoro organic compound toxicity on nematode *Caenorhabditis elegans* fecundity. *Journal of Health Science* 50(5):5.

- Upham BL, Deocampo ND, Wurl B, Trosko JE. 1998. Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail. *International Journal of Cancer* 78(4):491-495.
- Wilkins P. 2001a. Perfluorooctanesulfonate, Potassium salt (PFOS): An acute contact toxicity study with the honey bee. 3M Technical report.(Study number HT5601).
- Wilkins P. 2001b. Perfluorooctanesulfonate, potassium salt (PFOS): An acute oral toxicity study with honey bee. 3M Technical report.