INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH MILJÖVETENSKAP

TROFISK ÖVERFÖRING OCH TOXISKA EFFEKTER AV (NANO-)PARTIKLAR FRÅN ELEKTRONISKT AVFALL

Elvira Hagman

Uppsats för avläggande av naturvetenskaplig kandidatexamen med huvudområdet miljövetenskap

Kurs:	ES1510, Examensarbete i miljövetenskap I, 15 hp
Akademisk nivå:	Grundnivå
Termin/år:	Vår 2023
Handledare:	Joachim Sturve, Institutionen för biologi och miljövetenskap
Examinator:	Adil Yousif, Institutionen för biologi och miljövetenskap

Bild på framsida:

Stukel, S. (2020). *Yellow perch (Perca flavescens) photographed at Gavins Point National Fish Hatchery* [Fotografi]. https://www.flickr.com/photos/usfwsmtnprairie/49724454007 Public domain-märke 1.0

Tack

Jag vill först och främst tacka min handledare Joachim Sturve för att ha introducerat mig till detta intressanta forskningsområde. Det har varit en riktigt lärorik och inspirerande period. Ett hjärtligt tack till Britt Wassmur som varit som en extra handledare för mig och på ett pedagogiskt sätt väglett mig genom olika spännande laborationsmetoder. Tack även för pepp, förslag på justeringar och tydliga svar på mina frågor. Stort tack till Adil Yousif som i sista stund kunde hoppa in som examinator när originalplanen fallerade. Tack till kursledare Annemieke Reurslag Gärdenäs och Lennart Bornmalm för vägledning genom arbetet och för hjälpen med att hitta en ny examinator. Slutligen ett varmt tack till mina klasskamrater för stöttning under detta arbete och för tre fina år tillsammans.

Elvira
28 maj 2023

Abstract

Today, nanoparticles (NPs) are being included in an increasing number of products, and with that comes the dispersion of NPs in the environment. However, the ecological impact of NPs remains largely unexplored, particularly in regards to real emissions with complex compositions of NPs and other pollutants. Furthermore, the extent to which different NPs can be transferred through the food chain and the specific parts of the food chain that may be affected by NPs is mostly unknown. Further research in this field is necessary to ensure human health and maintain a high level of environmental protection.

The aim of this study was to investigate the ecological effects of NPs emitted from a real emission source. Specifically, it aimed to examine trophic transfer and potential toxic effects on fish resulting from exposure to particles originating from the recycling of *Waste from Electrical and Electronic Equipment* (WEEE) in Sweden. The particle mixture primarily consisted of NPs. The goal was to assess whether the particles could be transferred to fish through benthic organisms and induce toxic effects in the fish. Two groups of perch (*Perca fluviatilis*) were exposed to the particles: one group was solely exposed through water, while the other group was exposed through both water and food (mosquito larvae, *Chironomus riparius*). Two control groups were also included: one exposed to pure water and another exposed to pure water with mosquito larvae.

Following the exposure, liver, intestine, and gill samples were collected from the perch. The expression of genes coding for cytochrome P450 1A (CYP1A), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), and metallothionein (MT) was analyzed using quantitative PCR (qPCR). Changed activity in transcription of these genes may indicate uptake of chemicals causing toxic effects. One-way analyses of variance (ANOVAs) revealed no statistically significant difference in gene expression between the groups. Thus, uptake, trophic transfer or toxic effects resulting from the exposure could not be concluded. Overall, this study underscores the need for further research to enhance our understanding of the ecological implications of NPs in the environment.

Sammanfattning

Idag inkluderas nanopartiklar (NP) i allt fler produkter och med det följer spridning av NP till miljön. Ekologiska effekter av NP är dock ett relativt outforskat område, särskilt när det gäller verkliga utsläpp med komplexa sammansättningar av NP och andra föroreningar. Det är också okänt till vilken grad olika NP kan tas upp via föda och vilka delar av näringskedjan som exponeras för och påverkas av NP. Ytterligare forskning inom detta område är nödvändigt för att säkerställa människors hälsa och miljön.

Syftet med denna studie var att utforska ekologiska effekter av NP som sprids från en verklig utsläppskälla. Specifikt undersöktes trofisk spridning samt potentiella toxiska effekter hos fiskar, till följd av exponering för partiklar från en svensk återvinningscentral för *elektriskt och elektroniskt avfall* (WEEE). Partikelblandningen bestod främst av NP. Målet var att bedöma om partiklarna kunde spridas till fisk via bentiska organismer och ge toxiska effekter hos fiskarna. Två grupper av abborre (*Perca fluviatilis*) exponerades för partiklarna: en grupp exponerades endast via vatten, medan den andra gruppen exponerades via vatten och föda (mygglarver, *Chironomus riparius*). Dessutom inkluderades två kontrollgrupper: en grupp i rent vatten och en grupp i rent vatten med mygglarver.

Efter exponeringen provtogs lever, tarm och gälar från abborrarna. Med hjälp av kvantitativ PCR (qPCR) analyserades genuttryck för cytokrom P450 1A (CYP1A), superoxiddismutas (SOD), katalas (CAT), glutationreduktas (GR) och metallotionein (MT) eftersom förändrad aktivitet i transkriptionen av dessa gener kan indikera upptag av toxiska kemikalier. Envägs-variansanalyser (ANOVA) visade att det inte var någon statistiskt signifikant skillnad i genuttryck mellan grupperna. Upptag eller toxiska effekter till följd av exponeringen kunde alltså inte påvisas. Sammantaget understryker denna studie behovet av ytterligare forskning för att öka vår förståelse för ekologiska konsekvenser av NP i miljön.

1. Förkortningar 1
2. Introduktion 2
2.1 Nanopartiklar i elektronik 2
2.2 Nanopartiklars spridning och beteende i miljön 3
2.3 Fiskars upptag, spridning och utsöndring av NP samt toxiska effekter 4
2.4 Biomarkörer 6
2.4.1 Cytokrom P450 1A 6
2.4.2 Superoxiddismutas, katalas och glutationreduktas 7
2.4.3 Metallotionein 7
2.5 qPCR 7
2.6 Syfte 8
2.7 Frågeställning 8
3. Metoder 8
3.1 Modellorganismer och djurhållning 8
3.2 Exponering 8
3.3 Provtagning 9
3.4 Kemisk analys 9
3.5 Genuttrycksanalys 9
4. Resultat 10
4.1 Genuttryck 10
4.1.1 Lever 11
4.1.2 Tarm 13
4.1.3 Gäle 15
5. Diskussion 17
5.1 Slutord och förslag till framtida studier 18
5.2. Uppföljning till denna studie 19
6. Slutsats 19
7. Referenser 20
8. Bilagor 23
A. PCR-platta, mall 23
B. Ursprungliga resultat från qPCR (medelvärden av duplikat) 23

1. Förkortningar

Al = aluminium
As = arsenik
Ba = baryt
Br = brom
C = kol
Ca = kalcium
CAT = katalas
Cd = kadmium
Cl = klor
Co = kobolt
Cr = krom
Ct = cykelvärde
Cu = koppar
CYP1A = cytokrom P450 1A
DDT = diklordifenyltrikloretan
EEE = elektriska och elektroniska produkter
EF-1 = förlängningsfaktor 1
Fe = järn
Ga = gallium
Ge = germanium
GR = glutationreduktas
HAH = halogenerade aromatiska kolväten
Hg = kvicksilver
K = kalium
Mn = mangan
Mo = molybden
MP = mikropartiklar
mRNA = budbärar-RNA
MT = metallotionein
Na = natrium
Nb = niob
Ni = nickel
NP = nanopartiklar
O = syre
PAH = polycykliska aromatiska kolväten
Pb = bly
PBDE = polybromerade difenyletrar
qPCR = kvantitativ polymeraskedjereaktion
Rb = rubidium
S = svavel
Sb = antimon
Se = selen
Si = kisel
Sn = tenn
SOD = superoxiddismutas
Sr = strontium
Ta = tantal
Ti = titan
Ub = ubikvitin
V = vanadin
W = volfram
WEEE = avfall från elektriska och elektroniska produkter
Y = yttrium
Zn = zink
Zr = zirkonium

2. Introduktion

Elektriska och elektroniska produkter (EEE) är oumbärliga i dagens samhälle och enligt Forti m.fl. (2020) ökar konsumtionen av EEE årligen med 2,5 miljoner ton. Av detta följer naturligtvis en stor mängd elektroniskt avfall (Waste of Electrical and Electronic Equipment, WEEE), innehållande värdefulla material men även potentiellt toxiska och skadliga ämnen. År 2019 genererades totalt 53,6 miljoner ton WEEE, motsvarande 7,3 kg per person, och till år 2030 uppskattas avfallsmängden öka till hela 74,7 miljoner ton (Forti m.fl., 2020). I EU:s direktiv om WEEE specificeras att särskild behandling är nödvändig för att undvika spridning av förorenande ämnen i avfallsflödet. Dessutom ska bästa tillgängliga tekniker för återvinning användas, under förutsättning att de säkerställer människors hälsa och en hög miljöskyddsnivå (Direktiv 2012/19). Nyligen påvisades utsläpp av partiklar i nano- och mikrostorlek till miljön från en återvinningsanläggning för EEE i Spanien (López m.fl., 2022). Vidare visades nanopartiklar (NP) i utsläppen inducera oxidativ stress i mänskliga lungceller, och ett behov av fortsatta studier av utsläpp från fler europeiska WEEE-anläggningar konstaterades. Dagens brist på data av partikelutsläpp från europeiska anläggningar, samt brist på bedömningar av toxiciteten av utsläppen (López m.fl., 2022) medför att direktivets efterlevnad inte kan säkerställas.

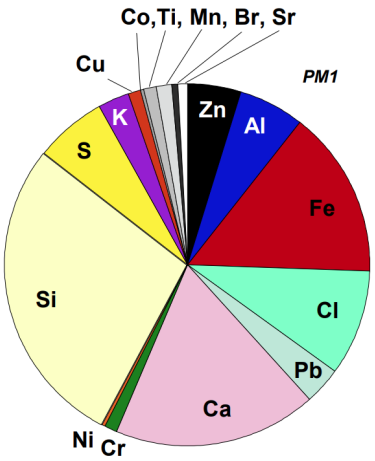
Avsikten med denna studie var att undersöka ekotoxikologiska effekter till följd av partikelutsläpp från en återvinningsanläggning för EEE i Sverige. Partiklarna som användes i denna studie har tidigare samlats in av Odnevall m.fl. (2023) och det konstaterades att de flesta av dessa partiklar (77%) var i nanostorlek. Den teoretiska delen av denna uppsats fokuseras därför på NP. Det bör dock poängteras att blandningen inkluderar både NP och mikropartiklar (MP) <1 µm.

I akvatisk miljö hamnar de flesta NP i sediment (Lammel m.fl., 2019). Om WEEE-partiklar sprids till den akvatiska miljön förmodas alltså en stor andel av dessa så småningom hamna i sedimentet. De flesta studier under tidigare år har dock fokuserat på direkt upptag från vatten till organismer, snarare än upptag från sediment och via föda (Lammel m.fl., 2019). Därför är det i denna studie specifikt av intresse huruvida partiklarna kan återupptas från sediment av bentiska organismer och sedan spridas och ge toxiska effekter för andra organismer i näringskedjan.

2.1 Nanopartiklar i elektronik

Nanopartiklar (NP) är ett brett begrepp som innefattar alla material med en dimension mellan 1-100 nm (Khan m.fl., 2019). Detta kan sättas i relation till en atoms radie som är i storleksordningen 0,1 nm (Nationalencyklopedin, u.å.). Egenskaperna för NP kan inte antas motsvara dem hos större partiklar av samma ämne. NP besitter oftast unika optiska, magnetiska, mekaniska, kemiska, termiska, strukturella och elektriska egenskaper (Khan m.fl., 2019). De unika fysiska och kemiska egenskaperna kan enligt Khan m.fl. (2019) förklaras av partiklarnas stora yta i förhållande till volymen. Idag finns allt större möjlighet att syntetisera specifika typer av NP och inom olika industrier finns ett stort intresse att använda NP i olika processer och produkter. Inom elektronik ersätts allt fler traditionella tekniker med nanoteknologiska alternativ (Malik m.fl., 2023). Nanoteknologin öppnar upp fler möjligheter, till exempel för flexibla displayer med stor area, mer lättviktiga enheter och stor elektrisk konduktivitet till lägre kostnad (Khan m.fl., 2019; Malik m.fl., 2023). Exempel på typer av NP som kan användas för elektronik är nanometaller, keramiska NP, halvledar-NP och kolbaserade NP (Khan m.fl., 2019).

Partikelblandningen som använts i denna studie har tidigare samlats in av Odnevall m.fl. (2023) med hjälp av luftfilter från en svensk återvinningscentral för WEEE. Partiklar mindre än 1µm urskiljdes och har använts för denna studie. Metoden för insamling, urskiljning och karaktärisering av partiklarna beskrivs mer utförligt i den ännu ej publicerade artikeln *Characterization and toxic potency of airborne particles formed upon WEEE waste recycling – a case study* av Odnevall m.fl. (2023). Partiklarna har stor variation gällande storlek, form, sammansättning och grad av aggregering. Blandningen visas innehålla O, Na och C. De grundämnen som förekommer i störst mängd utöver O, Na och C visas i *Figur 1*. Dessa är Si, Ca, Fe, Cl, S, Al, Zn, Pb, K, Cu, Ti, Mn, Br, Sr, Ni och Cr. Det finns även spår av Co, V, Ga, Ge, As, Se, Rb, Y, Zr, Nb, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Ta, och W. Anledningen till att O, Na och C inte visas i *Figur 1* är att dessa ämnen har för låg massa för analysmetoden. En annan analys visar dock att andelen C är 14%, varav 5% är elementärt. Alla metaller och halvmetaller förekommer i oxiderat tillstånd. Då påverkan på fisk är centralt i den här studien kan påpekas att partiklarna innehåller för fisk essentiella metaller (Ca, Fe, Zn, K, Cu, Mn, Cr, Co, Mo, Na) men även icke-essentiella metaller (Al, Pb, Ti, Sr, Ni, V, Ga, Rb, Y, Zr, Nb, Cd, Sn, Ba, Ta, W) samt i övrigt halvmetaller (Si, Ge, As, Se, Sb) och icke-metaller (O, C, Cl, S, Br).



Figur 1. Från Odnevall, I., Sturve, J., Ekvall, M., Isaxon, C., Herting, G., Bermeo Vargas, M., Messing, L., Hansson, A., & Rissler, J. (2023). *Characterization and toxic potency of airborne particles formed upon WEEE waste recycling – a case study*. [Manuskript under arbete]

2.2 Nanopartiklars spridning och beteende i miljön

Globalt har 1,5% av NP uppskattats hamna i luft, 7% i vatten, 8-28% i jordar och 63-91% på deponier (Bundschuh m.fl., 2018). NP står för en relativt liten del av den totala malmbrytningen och föreslås ha försumbara effekter på global skala då det sprids i miljön. På lokal nivå kan dock punktutsläpp och yrkesmässig exponering leda till toxiska effekter (Janković & Plata, 2019). Att mäta koncentrationer av mänskligt producerade NP i miljön är inte lätt. Det kan vara svårt att skilja dessa från naturliga NP (Bundschuh m.fl., 2018). Metoder för detta behöver fortsatt utvecklas för att kunna ge mer korrekta mätresultat.

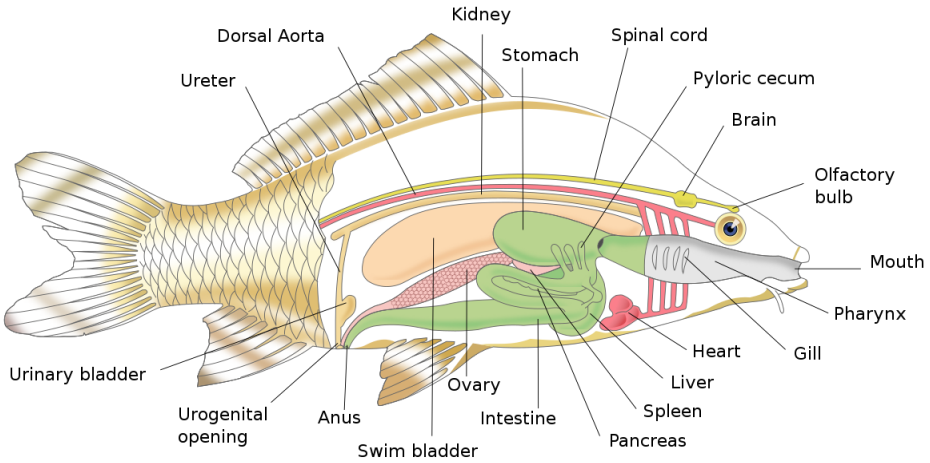
Nowack & Bucheli (2007) har utförligt beskrivit NPs beteende i miljön. I miljön kan NP interagera med andra små och stora partiklar och bilda aggregat. I detta förlopp spelar ytladdning en stor roll. NP är ofta inbäddade i ett kluster av olika material i produkterna och släpps därmed sällan ut som “rena” och enskilda NP. NP kan också vara funktionaliserade vilket innebär att andra ämnen adderats till ytan av NP, detta för att uppnå speciella egenskaper. Funktionalisering kan även ske spontant i miljön, genom kemiska och biologiska processer. Allt detta, samt exempelvis pH och ljus, påverkar NPs

beteende och spridning i miljön. NP avsätts allmänt effektivt till ytor, men huruvida de fäster och stannar i ett visst medium varierar mycket mellan olika typer av NP med olika sammansättning och olika funktionaliserade ytor. Vidare kan olika föroreningar adsorberas till ytan av NP. Till exempel är kolnanorör en stark adsorbent för många metaller och föroreningar såsom dioxiner, PAH, DDT, PBDE, bisfenoler, ftalater, olika pesticider och herbicider (Nowack & Bucheli, 2007). Vissa nanometaller har en benägenhet att frisätta metalljoner från sin yta (Bundschuh m.fl., 2018). För att förtydliga är metalljoner och nanometaller skilda saker. Metalljoner kan både frisättas från vissa nanometaller och från större metaller.

Enligt Handy m.fl. (2008) beter sig NP olika beroende på om det hamnar i söt- eller saltvatten. Partiklarna tenderar att aggregera mer i saltvatten på grund av den höga jonstyrkan. Därför exponeras marina organismer framförallt för NP i sediment snarare än för NP i vattenfasen. I vissa sötvattenmiljöer, med mycket organisk materia, kan en större andel NP förbli suspenderade i vattnet. Organisk materia har nämligen visats stabilisera NP i vattenfasen.

2.3 Fiskars upptag, spridning och utsöndring av NP samt toxiska effekter

NP kan interagera med akvatiska och terrestra organismer på flera sätt. I denna studie utfördes tester på abborre (*Perca fluviatilis*). Som bakgrundsfakta beskrivs därför upptag, spridning, exkretion och toxiska effekter av NP i fisk. Figur 2, som visar fiskars uppbyggnad och organ, är tänkt som ett stöd vid läsningen av dessa processer.



Figur 2. Från Wikimedia Commons (2013). *Internal organs of a fish* [Illustration]. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Internal_organs_of_a_fish.svg CC BY SA 3.0

Upptag och spridning

Handy m.fl. (2008) beskriver utförligt troliga vägar för upptag av NP. Från ytan av nanometaller kan metalljoner avges och lösas i vatten. Generellt kan dock inte själva NP lösas men kan ändå förekomma i vattenfasen som suspenderade partiklar. NP i vattnet kan nå ytskiktet av gälarna samt eventuellt tarmslemhinnan om så kallat stressinducerat drickande sker. Att NP når dessa ytor innebär dock inte nödvändigtvis att upptag till kroppen sker. Allmänt sker upptag av ett ämne till kroppen genom att det först tar sig in i, eller förbi, epitelcellerna i gälar och tarm. Metalljoner tar sig vanligtvis in i epitelceller via jonkanaler. Små lipofila organiska kemikalier, eventuellt även lipofila NP, kan

diffundera direkt över cellmembranet eller transporteras in mellan cellerna via tight junctions. Allmänt är dock NP för stora för att upptas via dessa processer. NP tas mest sannolikt upp genom vesikeltransport, framförallt i tarmarna där endocytos kan ske. Eventuellt kan även upptag ske direkt till blodet vid skadad vävnad. Efter upptag transporteras NP vidare till blodet och till olika målorgan. De huvudsakliga målorganen är troligtvis gälar, tarmar, lever och i vissa fall hjärnan.

Som nämndes tidigare hamnar en stor del av NP så småningom i sediment och det kan inte uteslutas att aggregerade och sedimenterade NP kan återupptas till näringskedjan via födointag (Handy m.fl., 2008). Just återupptag till näringskedjan via födointag är av centralt intresse i denna studie. Kunskap om hur effektivt olika NP tas upp från föda är begränsad men som exempel kan nämnas att upptaget av TiO_2 verkar vara några procent av den totala dosen (Shaw & Handy, 2011).

Lagring och utsöndring

Enligt Handy m.fl. (2008) behöver ämnen vara några nanometer eller mindre för att kunna filtreras ut från blodet i njurarna. Därmed är de flesta NP troligen för stora för att kunna renas bort via njurarna. Utsöndring av ämnen från gälar kan ske, men endast om koncentrationen av ämnet är lägre utanför gälarna, det vill säga om fisken är omgiven av renare vatten. Därmed har troligen inte heller gälarna någon stor roll för exkretion av NP. NP kan dock troligen renas ut från blodet via levern, till gallblåsan och vidare till tarmen. Det är oklart om NP sedan kan återupptas till kroppen från tarmarna. Huruvida återupptag kan ske eller ej beror på om NP har modifierats på något sätt i kroppen för att hindra återupptag. Ett möjligt alternativ till exkretion är lagring av NP i olika organ, till exempel i levern.

Toxicitet

Då olika NP har olika egenskaper kan inga toxiska mekanismer sägas gälla för alla NP. Några exempel på toxiska effekter som kunnat påvisas hos fisk är dock oxidativ stress, tumörbildning i levern, respiratoriska störningar som exempelvis svullnad i gälarna, störningar i osmoregleringen, skador på blodkärl och negativ påverkan på utveckling och överlevnad för fisk-embryon (Handy m.fl., 2008). Som ett mer specifikt exempel har exponering av järnoxid-NP (Fe_2O_3-NP) visats orsaka ökad dödlighet, fördröjning av kläckning av ägg och missbildning för zebrafisk (Zhu m.fl., 2012). Alla NP är dock inte toxiska. Det kan till och med finnas skäl att avsiktligt släppa ut vissa typer av NP som kan skydda organismer mot föroreningar. Detta verkar exempelvis vara fallet för en viss typ av tillverkade Si-NP som kan minska biotillgängligheten av skadliga PAH och i sig inte är toxiskt för fisken knölskallelöja (Kurita-Oyamada m.fl., 2020).

I vissa studier har olika grad av toxiska effekter av nanometaller, till exempel Ag och Cu associerats med graden av de lösta metalljoner av ämnena (Jo m.fl., 2012). Metallinnehållande NP har troligen i sig ganska låg akut toxicitet, medan vissa nanometaller med stor frisättning av metalljoner har hög akut toxicitet (Shaw & Handy, 2011). Frisättning av metalljoner är dock inte den enda förklaringen till nanometallers toxicitet. Ag-NP har, oberoende av frisättningen av joner, visats störa både jonregleringen i zebrafiskars gälar samt deras neuroreglering (Katuli m.fl., 2014).

En annan toxisk mekanism för NP är så kallad biologisk ytbeläggning. Det som då sker är att NP adsorberas till ytan av en organism. TiO_2 har till exempel visats adsorberas till ytan av vattenloppor (*Daphnia magna*), vilket har minskat deras simhastighet (Noss m.fl., 2013). Ännu ett fenomen, som tas upp av Bundschuh m.fl. (2018), är att NP kan agera som “bärare” för andra föroreningar och föra med sig föroreningarna in i organismer. Förekomsten av kolbaserade NP har till exempel visats öka

toxiciteten för herbiciden diuron samt för metalljoner. Metalliska NP, till exempel TiO_2, kan också påverka upptaget av andra ämnen. TiO_2 har både visats medföra ett ökat respektive minskat upptag beroende på vilka andra kemikalier det handlar om. Egenskaper hos den omgivande miljön påverkar potentialen för ämnen att fungera som bärare (Bundschuh m.fl., 2018).

Fiskar exponeras huvudsakligen för metaller i miljön via föda. Denna exponering är inte akut toxisk men kan ge långsiktiga effekter som exempelvis nedsatt tillväxt, oxidativ stress och störningar i levern (Shaw & Handy, 2011). Effekter av födointag av nanometaller är mindre utforskat men ett exempel på en identifierad effekt är ackumulering av Ti i gälar, tarm, lever, hjärna och mjälte samt inhibering av Na^+K^+-ATPas i hjärnan hos regnbågsfisk till följd av exponering för TiO_2-NP (Ramsden m.fl., 2009). Shaw och Handy (2011) föreslår att mat eller organisk materia i tarmen kan utgöra ett skydd så att upptaget/toxiciteten av NP minskar. De såg nämligen att stressinducerat drickande av NP-innehållande vatten kan ge skador på tarmepitelet medan intag av NP via föda inte gett samma effekt.

2.4 Biomarkörer

En biomarkör är en förändring i biologisk respons som kan indikera ackumulering, exponering för eller effekt av kemikalier. Biomarkörer kan ses som tidiga varningssignaler för konsekvenser på populations-, samhälls-, eller ekosystemnivå (Kroon m.fl., 2017). För denna studie har fem olika biomarkörer i form av mRNA-sekvenser valts ut som indikatorer för upptag och toxiska effekter av NP. mRNA-sekvenserna som har undersökts kodar för enzymerna/proteinerna cytokrom P450 1A (CYP1A), superoxiddismutas (SOD), katalas (CAT), glutationreduktas (GR) och metallotionein (MT). Notera att enzymernas/proteinernas faktiska aktivitet, och nivåerna av mRNA som kodar för dessa enzym/proteiner, är skilda saker.

2.4.1 Cytokrom P450 1A

Enligt Sarasquete och Segner (2000) är CYP1A en familj enzymer som spelar en viktig roll i avgiftning av många typer av xenobiotika, det vill säga ämnen som är främmande för organismen eller som intagits i onormalt stora mängder. CYP1A konverterar lipofila ämnen till mer vattenlösliga ämnen så att de lättare kan utsöndras. CYP1A uttrycks framförallt i levern hos fisk men även i till exempel tarmar, gallblåsa, njure, gälar, gonader och nervvävnad (Sarasquete & Segner, 2000). Enligt Kroon m.fl. (2017) är CYP1A till exempel inblandat i biotransformering av PAHer, HAHer, PCBer och dioxiner. Aktiviteten för CYP1A följer olika mönster beroende på vilka ämnen en organism exponeras för. Kroon m.fl. (2017) beskriver att organiska föroreningar, exempelvis PAH, är kända för att öka aktiviteten hos CYP1A, men för metallföroreningar finns inte lika tydliga mönster. I flera studier har man inte kunnat påvisa någon signifikant ökad aktivitet hos CYP1A efter exponering för metallföroreningar. I en studie där fisk exponerades för metallförorenat sediment upptäcktes dock en ökad aktivitet för CYP1A. Det kan dock inte uteslutas att denna förhöjda aktivitet orsakades av att sedimentet även innehöll organiska föroreningar. Vidare påverkas aktiviteten för CYP1A av säsong, vävnadstyp, livsstadie, kön och salinitet vilket komplicerar analyserna av enzymaktiviteten (Kroon m.fl., 2017). NP kan exempelvis verka genom att minska aktiviteten hos CYP1A och alltså störa cellers skyddsmekanism mot andra föroreningar. Detta visades i en studie av Christen och Fent (2012) som såg att exponering för silverdopade SiO_2-NP minskade aktiviteten för CYP1A, och därmed minskade skyddet mot efterföljande behandling av benso(a)pyren, i mänskliga leverceller.

2.4.2 Superoxiddismutas, katalas och glutationreduktas

SOD, CAT och GR är exempel på enzymatiska antioxidanter (Chowdhury & Saikia, 2020). De är alltså en del av olika organismers försvar mot oxidativ skada orsakad av reaktiva syreradikaler (ROS). En obalans mellan bildning av ROS och neutralisering av antioxidanter kallas oxidativ stress. Oxidativ stress kan ha flera olika skadliga effekter på celler. Det kan till exempel orsaka strukturella förändringar av lipider, proteiner och nukleinsyror vilket i sin tur kan leda till exempelvis nedsatt immunförsvar, DNA-skada och cellapoptos. Vissa NP, till exempel i form av silver, kopparoxid samt fullerener har visats inducera oxidativ stress hos fiskar (Chowdhury & Saikia, 2020). I en studie av Canli och Canli (2020) undersöktes effekterna av Al_2O_3, CuO och TiO_2 NP på bland annat SOD, CAT och GR hos fisken niltilapia. Studien visade att partiklarna orsakade oxidativ stress hos fisken. Aktiviteten för SOD och CAT minskade medan ingen förändring i GR kunde påvisas. I en annan studie av Benavides m.fl. (2016) exponerades guldfisk för Al_2O_3 och ZnO NP vilket först gav ökad aktivitet hos SOD och CAT men vid längre exponeringstid, upp till 21 dagar, minskade enzymernas aktivitet. Enligt författarna kan ökad aktivitet hos enzymerna tyda på att cellerna försöker bekämpa oxidativ stress medan en minskad aktivitet kan tyda på utmattning hos cellerna att upprätthålla dessa försvarsmekanismer.

2.4.3 Metallotionein

MT är enligt Sevcikova m.fl. (2011) en grupp metallbindande proteiner involverade i avgiftning av icke-essentiella metaller samt homeostas av vissa essentiella metaller. Enligt Kroon m.fl. (2017) verkar MT genom att binda in metalljoner samt genom att avlägsna metaller. MT är till exempel inblandat i avgiftning av Cu, Zn, Cd och Hg och aktiviteten för MT är stor i gälar, lever och tarmar hos fiskar, det vill säga i organ som spelar stor roll för upptag, lagring och exkretion (Kroon m.fl., 2017). Uttrycket för MT har i en studie visats öka respektive minska i olika organ hos niltilapia vid exponering för Ag-NP. Uttrycket minskade i levern men ökade i huvudnjuren (Thummabancha m.fl., 2016). Akut eller kronisk exponering för metaller kan inducera oxidativ stress (Sevcikova m.fl., 2011). Därmed utgör cellens bildning av MT ett indirekt försvar mot oxidativ stress. Under labb-förhållanden verkar MT vara en bra biomarkör för metallexponering. Vid fältstudier är MT troligen mindre lämpligt som biomarkör. Vid flera fältstudier har man exempelvis inte sett någon signifikant korrelation mellan MT-aktivitet och Cd eller Hg (Sevcikova m.fl., 2011).

2.5 qPCR

I denna studie genomfördes kvantitativ polymeraskedjereaktion (qPCR) för att jämföra exponerade abborrar med kontrollgrupper gällande genaktiviteten för CYP1A, MT, SOD, CAT och GR i lever, tarm och gälar. I en handbok av Applied Biosystems (2014) beskrivs qPCR genomgående och en sammanfattning av metoden återges här.

qPCR är en laborativ metod som används för att indirekt mäta aktiviteten hos olika gener. Först isoleras genetiskt material från en organism. I qPCR amplifieras sedan DNA exponentiellt i cykler. För varje cykel sker en fördubbling av den tidigare mängden DNA. Inför qPCR tillsätts bland annat fluorescerande ämnen, DNA-polymeras, primers och nukleinsyror till samtliga prover. Syftet med primrarna är att definiera regionen av DNAt som ska amplifieras. Mängden DNA i provet kan indirekt mätas med hjälp av de fluorescerande ämnena. De fluorescerar nämligen när de binder in till dubbelsträngat DNA och den fluorescerande signalen ökar därmed direkt proportionellt mot mängden DNA som replikerats. Resultatet som redovisas från qPCR är antalet cykler (Ct) som gått till dess att

fluorescensen för provet nått upp till ett visst förutbestämt tröskelvärde. Tröskelvärdet är detsamma för alla prover. I och med det kan provernas cykelvärde (Ct) jämföras med varandra. Ju lägre Ct, desto färre cykler har krävts för att nå upp till tröskelvärdet och desto mer genomiskt material innehöll alltså provet från början.

2.6 Syfte

Syftet med denna studie var att utforska biologiska effekter till följd av exponering för verkliga utsläpp av nanopartiklar. Specifikt var syftet att undersöka trofisk spridning samt potentiella toxiska effekter hos fiskar, till följd av exponering för partiklar insamlade från luften i en svensk återvinningsanläggning för elektronik.

2.7 Frågeställning

Genuttrycken för fem olika enzymer/proteiner användes som indikatorer för upptag och toxiska effekter. Frågan som ställdes var:

- Är genuttrycken för CYP1A, SOD, CAT, GR eller MT förändrade i lever, tarm eller gälar hos abborrar, vars föda varit mygglarver som levt i sediment innehållande nanopartiklar?

3. Metoder

3.1 Modellorganismer och djurhållning

Som modellorganismer för försöket användes mygglarv (*Chironomus riparius)* och odlad abborre (*Perca fluviatilis*). Mygglarver erhölls från en kultur som finns på *Institutionen för biologi och miljövetenskap (BioEnv)* på *Göteborgs universitet*. Abborrar köptes in från Vadstena fisk AB och de var ett år gamla. Före försöket acklimatiserades fiskarna till system i djurförsöksanläggningen vid *BioEnv*. Fiskarna hölls i stora PVC-kar med genomflödande filtrerat och syresatt sötvatten, med pH 7 och en temperatur på ca 12 °C. Ljusförhållanden var 12:12 h mörker och dagsljus.

All djurhållning samt experiment utfördes enligt det etiska tillståndet 15986-2018.

3.2 Exponering

Fyra olika behandlingar genomfördes med fem abborrar i varje behandling. Totalt inkluderades alltså tjugo abborrar i testet. Följande testförhållanden gällde för de olika grupperna:

- *"Kontroll"* = Rent sediment + abborre
- *"NP"* = Sediment förorenat med NP + abborre
- *"Larver"* = Rent sediment + mygglarver + abborre
- *"Larver + NP"* = Sediment förorenat med NP + mygglarver + abborre

Varje abborre i en viss behandling tilldelades randomiserat ett visst akvarium. Abborrar i samma behandling var alltså inte placerade bredvid varandra utan spridda i rummet. Testet inleddes genom att 2 cm sediment spreds i botten av tjugo olika akvarium med en volym på ca 5 liter. För behandlingarna

NP och *Larver + NP*, tillsattes 3,5 mg partiklar per akvarium. Sedan fylldes samtliga akvarier med vatten. För de behandlingar där mygglarver ingick spreds 200 larver i vardera akvarium. 17 dagar senare släpptes en abborre i varje akvarium.

Exponering pågick under 7 dagar. Samtliga fiskar, i alla testgrupper, fick rent foder (*Chironomus riparius)* vid ett tillfälle.

3.3 Provtagning

Efter exponeringstiden fångades en abborre i taget in med håv, lindades i papper och avlivades med ett hårt slag mot huvudet samt avskärning av ryggmärgen. Tre organ skars ut; lever, tarm och gälar. Samtliga organ delades upp i två delar. En av dessa delar, avsett för genuttrycksanalys, lades i ett kryorör och frystes snabbt i flytande kväve. Den andra delen, avsedd för kemisk analys, lades i ett provrör med snäpplock och placerades i en frigolitlåda fylld med is. Efter att samma förfarande genomförts för samtliga fiskar förvarades proverna i -80 °C fram till analys.

3.4 Kemisk analys

Upptag av metaller kommer att undersökas med hjälp av metallanalys av tarm, gäle och lever från de exponerade fiskarna. Analysen kommer ske under hösten 2023 och utföras med hjälp av ICP-MS vid KTH i Stockholm.

3.5 Genuttrycksanalys

Budbärar-RNA (mRNA) extraherades från lever, tarmar och gälar med hjälp av *RNeasy Plus Mini Ki*t enligt *RNeasy Plus Mini Handbook 09/2020* från QIAGEN. Processen gick ut ut på att lysera och homogenisera små vävnadsbitar (20-30 mg) genom att tillsätta en denaturerande buffer, en liten metallkula och vävnadsbiten till ett provrör och sedan låta en så kallad *tissue lyser* skaka proverna med hög hastighet. Sedan avskiljdes genomiskt DNA från RNAt genom att låta lysatet passera genom ett centrifugfilter. Provet fick sedan passera genom ett annat centrifugfilter där mRNAt kunde bindas in till membranet. Slutligen eluerades mRNAt från membranet med 50µl vatten. Med hjälp av instrumentet *NanoDrop* mättes provets renhet samt koncentrationen mRNA. Proverna frystes sedan åter till -80°C för att minimera risken att mRNAt skulle brytas ner under lagring.

Eftersom RNA inte kan användas direkt till qPCR konverterades det först till komplementärt DNA (cDNA) med hjälp av *iScript cDNA Synthesis Kit* av Bio-Rad. De frysta proverna med mRNA tinades och en viss mängd från varje prov som beräknats innehålla 1000 ng mRNA överfördes till ett nytt provrör. Det späddes sedan med vatten till en total mängd på 15 µl. Genom att samtliga nya lösningar fått samma koncentration blir resultaten från qPCR jämförbara. Till de nya lösningarna tillsattes även 1 µl lösning innehållande enzymet *omvänt transkriptas* samt 4 µl av en buffert som bland annat innehöll primrar för att initiera DNA-syntesen. Dessutom förbereddes tre kontroller (no reverse transcriptase control, NRT) för varje organ genom att randomiserat välja ut tre av de ursprungliga mRNA-proverna, överföra mängder innehållande 1000 ng mRNA till tre nya provrör och även späda dessa med vatten till volymen 15 µl. Till dessa tillsattes 1 µl vatten istället för *omvänt transkriptas*. Syftet med kontrollerna var att upptäcka eventuell kontaminering av genomiskt DNA (gDNA). Samtliga nya lösningar inklusive kontroller placerades i en termocykler och ett förinställt program

startades för att genomföra transkriptionen från mRNA till cDNA. De färdiga cDNA-proverna förvarades i kyl (<7 dagar) tills dess att de användes för qPCR.

Inför qPCR späddes varje prov cDNA med nukleasfritt vatten till ration 1:20. 4 µl cDNA från proverna för ett organ i taget tillsattes i brunnarna på en PCR-platta enligt en förbestämd mall (Bilaga A) med ett replikat av varje prov. Till brunnarna tillsattes även 5 µl *SSO Advanced Universal SYBR Green Supermix* från Bio-Rad. Denna mix innehöll polymeras, grönt fluorescerande färgämne, nukleotider samt andra ämnen som behövs för att amplifiera DNA. Till varje brunn i en viss serie tillsattes 0,5 + 0,5 µl "forward and reverse primers" för en viss utvald gen. För varje organ och utvald gen utfördes qPCR med 60°C som bindningstemperatur. De gener som amplifierades genom qPCR kodar för följande enzym/proteiner: CYP1A, SOD, CAT, GR, MT, GAPDH, samt referensgenerna Ubikvitin (Ub) och Förlängningsfaktor 1 (EF-1). Referensgenerna användes för att senare kunna normalisera datan för generna av intresse. Att normalisera data innebär att relatera generna av intresse till gener vars uttryck hålls konstant under alla förhållanden och under alla tidpunkter av experimentet. I detta fall för att genuttrycken hos de olika abborrarna ska bli jämförbara.

Resultaten från qPCR i form av Ct-värden importerades till Excel. För varje prov och replikat beräknades ett medelvärde. Om det var stor skillnad mellan duplikaten (> 0,2) markerades detta i excelbladet. I programmet SPSS utfördes *Levene's test of homogeneity* för referensgenerna för att säkerställa att variansen var tillräckligt stabil för parametriska test. Sedan användes referensgenerna för att normalisera datan. Datan normaliserades genom att medelvärden för referensgenerna för vart och ett av proverna subtraherades från Ct-värdet för genen av intresse, detta gav ett "delta-värde" (ΔCt), det vill säga ett relativt mått på genuttrycket i förhållande till referensgenerna. Även för delta-värdena utfördes Levene's test och sedan användes delta-värdena för ANOVA i SPSS. Envägs-ANOVA med 95% konfidensintervall utfördes för att undersöka effekten av de olika behandlingarna (*Kontroll*, *NP*, *Larver* respektive *Larver + NP)* på genuttrycken.

4. Resultat

Fyra abborrar från olika behandlingar avled av okänd anledning under exponeringstiden; två abborrar från gruppen "*W + NP*", en från gruppen "*NP*" och en från gruppen "*kontroll*". Vidare hade vissa duplikat från qPCR hade större skillnad i Ct-värde än vad som är önskvärt (> 0,2). Dessa värden användes ändå i de statistiska analyserna, men finns presenterade med färgkoder i *Bilaga B*.

4.1 Genuttryck

I diagram 1-15 nedan visas medelvärden för genuttryck samt standardavvikelser. Det ursprungliga resultatet från qPCR är inte nödvändigtvis lätt att ta till sig då ett lägre Ct-värde motsvarar en mer uttryckt gen. För att göra diagrammen mer logiska att följa har resultaten omvandlats så att ett högt värde på y-axeln motsvarar en mer uttryckt gen. Detta gjordes genom att använda formeln $2^{-\Delta Ct}$ för vart och ett av värdena. Resultaten från envägs-ANOVAN redovisas under varje diagram. $p < 0,05$ motsvarar ett statistiskt signifikant resultat. Sammanfattningsvis var inte resultatet från envägs-ANOVAN statistiskt signifikant i något fall, och det är allmänt en brist på tydliga och återkommande mönster. Exponering för WEEE-partiklarna, direkt via vattnet eller via föda, gav alltså ingen konstaterad effekt på genuttrycken hos abborrarna. Något som kan konstateras är att nästan alla gener uttrycktes mest i levern. Undantaget är GR som hade ungefär lika hög nivå mRNA i levern som i tarm och gälar.

Trots ej signifikanta effekter kan vissa förändringar i genuttryck försöka utläsas. **Notera att följande resultat som presenteras gäller mönster som kan anas men som inte har konstaterats i statistiska test.**

4.1.1 Lever

I levern verkar genuttrycken i grupperna *"NP"* och *"Larver + NP"* generellt hålla sig på ungefär samma nivå som någon av kontrollgrupperna *"Kontroll"* och *"Larver"*. Ett undantag är genuttrycket för antioxidanten GR. För GR är det stor skillnad mellan "*larver + NP*" och "*kontroll*" samt lite skillnad mellan "*larver + NP*" och "*larver*".

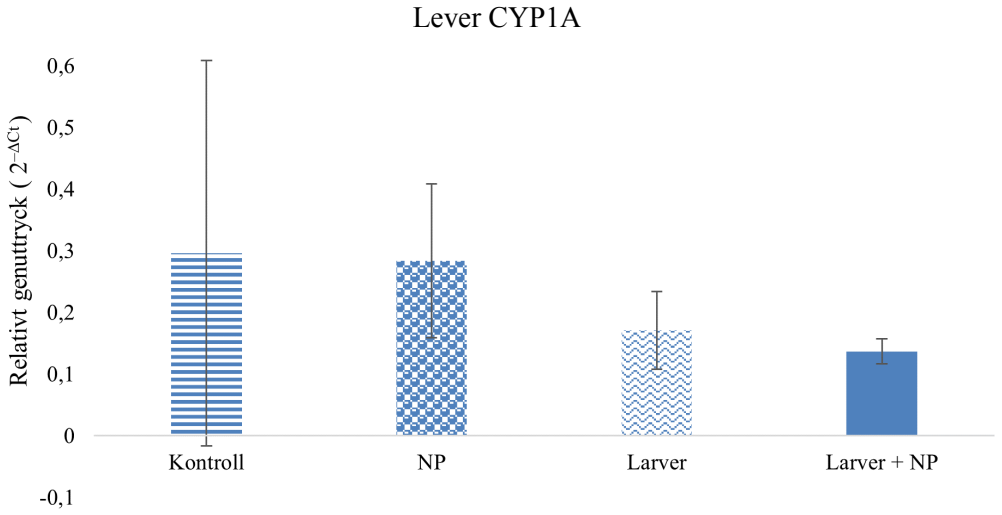


Diagram 1. Relativt genuttryck för CYP1A i lever hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [1,13], p = [0,38].

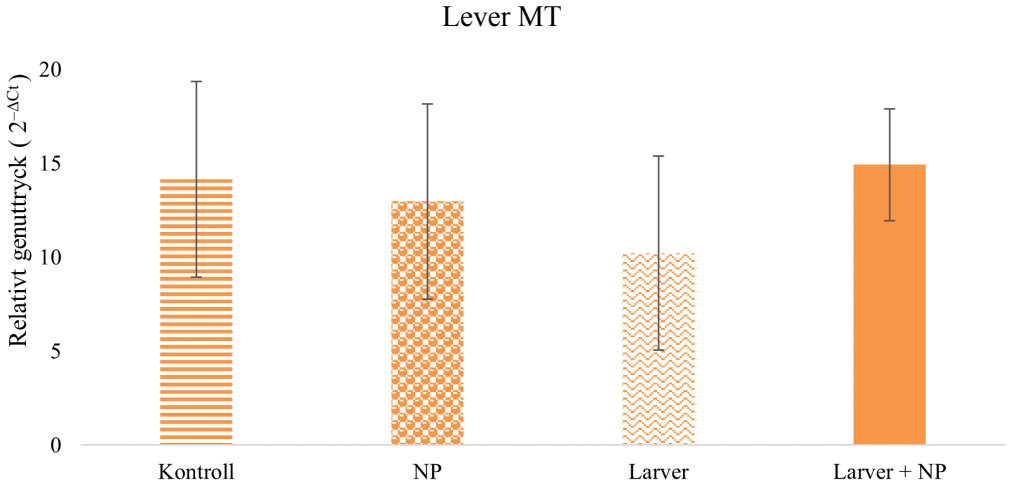


Diagram 2. Relativt genuttryck för MT i lever hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,83], p = [0,50].

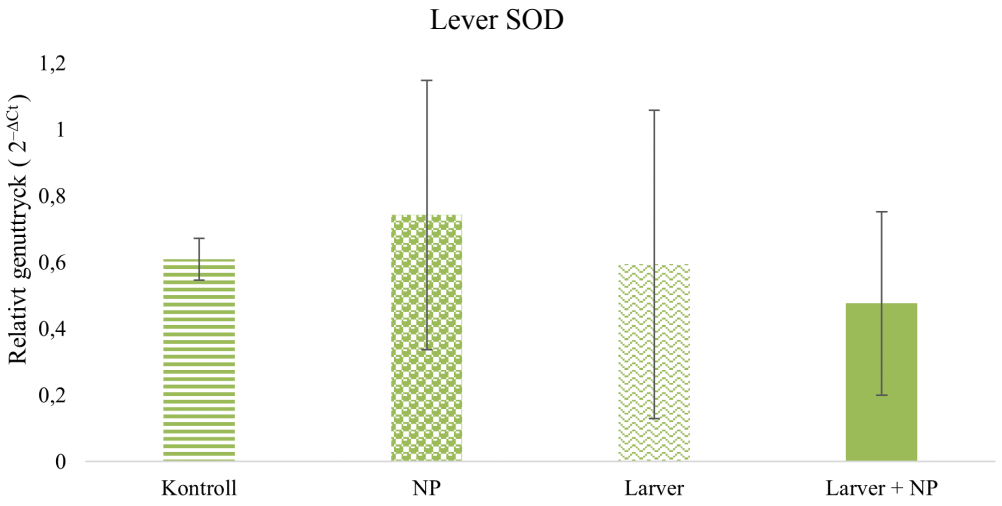


Diagram 3. Relativt genuttryck för SOD i lever hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,43], p = [0,73].

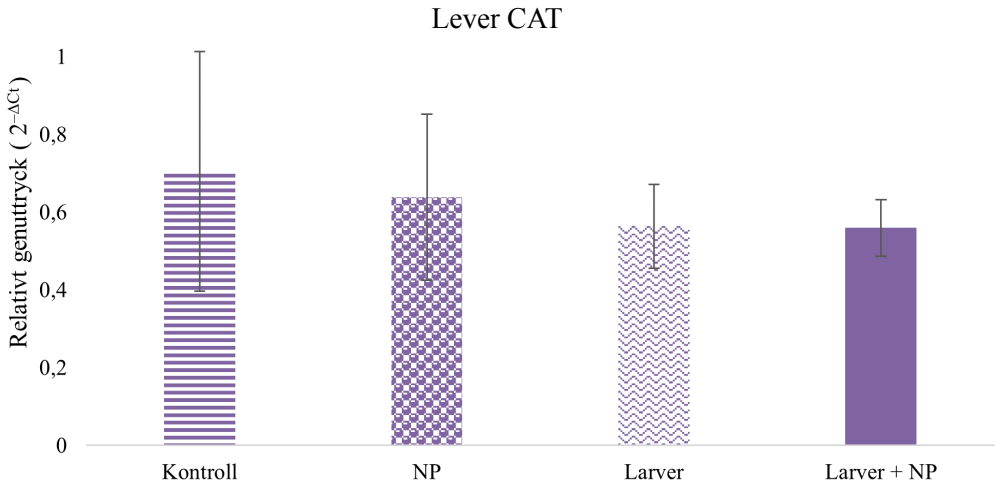


Diagram 4. Relativt genuttryck för CAT i lever hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,39], p = [0,76].

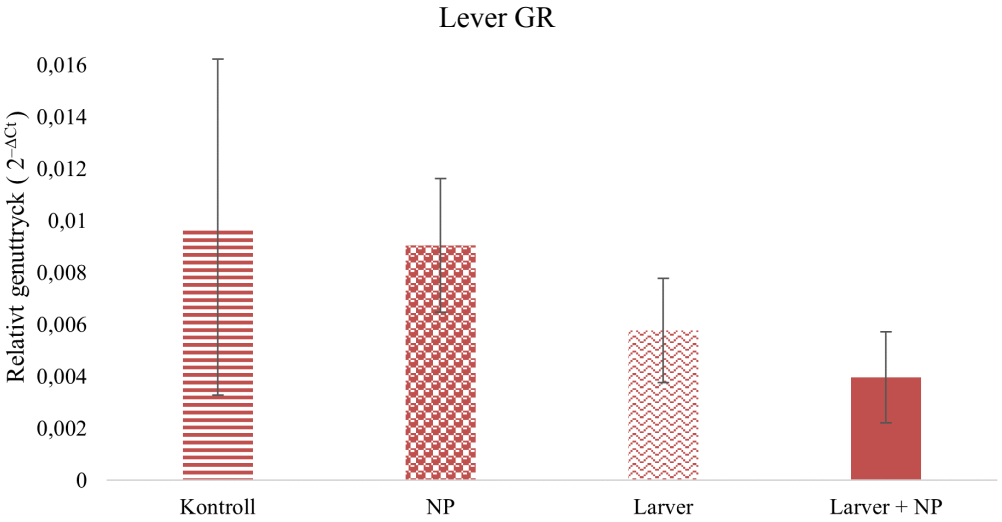


Diagram 5. Relativt genuttryck för GR i lever hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [2,50], p = [0,11].

4.1.2 Tarm

För tarmarna står ett resultat ut i mängden, nämligen genuttrycket för MT som hos gruppen "*larver + NP*" är ganska tydligt lägre än för resterande grupper. För övriga genuttryck i tarmarna kan inget tydligt mönster anas.

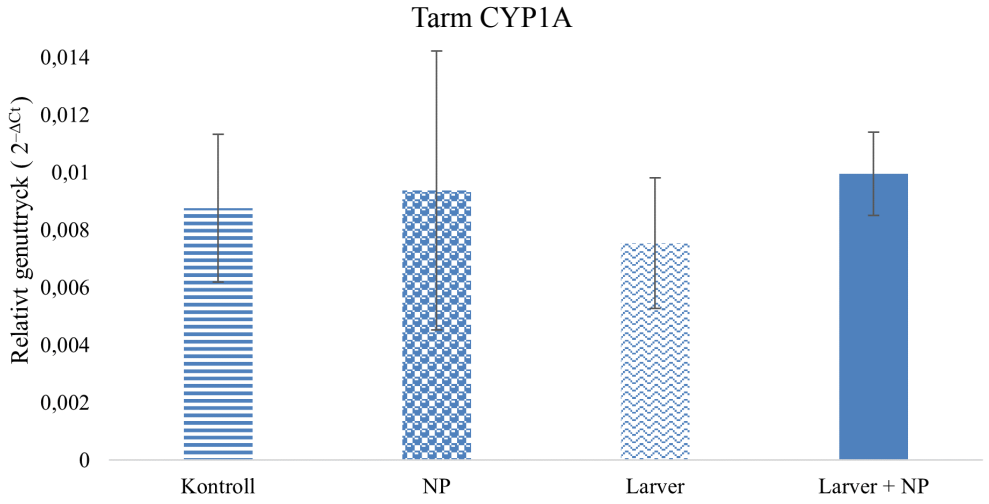


Diagram 6. Relativt genuttryck för CYP1A i tarm hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,52], p = [0,68].

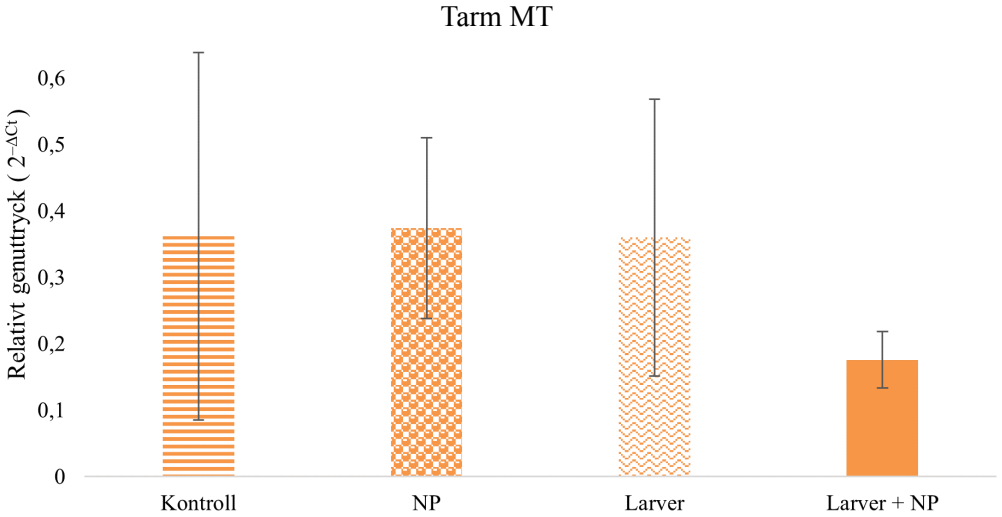


Diagram 7. Relativt genuttryck för MT i tarm hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [1,00], p = [0,43].

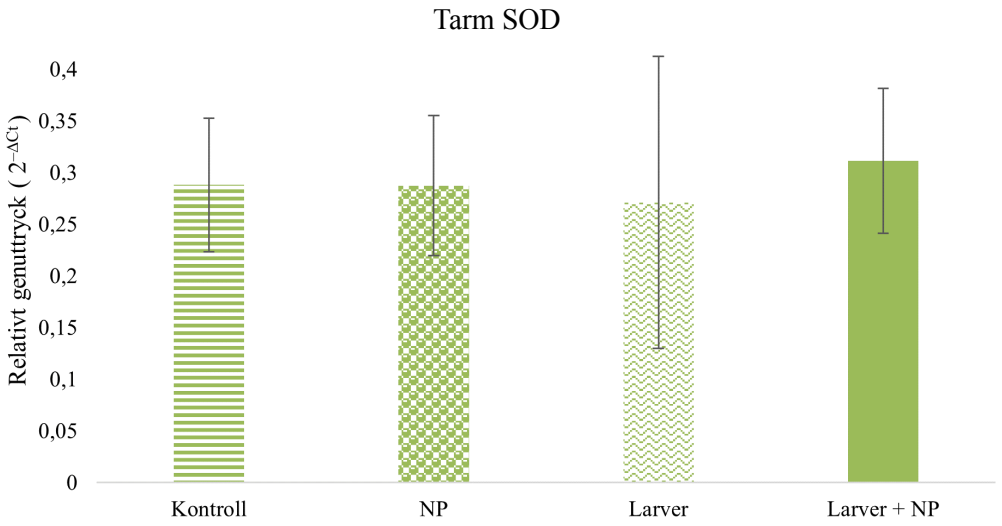


Diagram 8. Relativt genuttryck för SOD i tarm hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,31], p = [0,82].

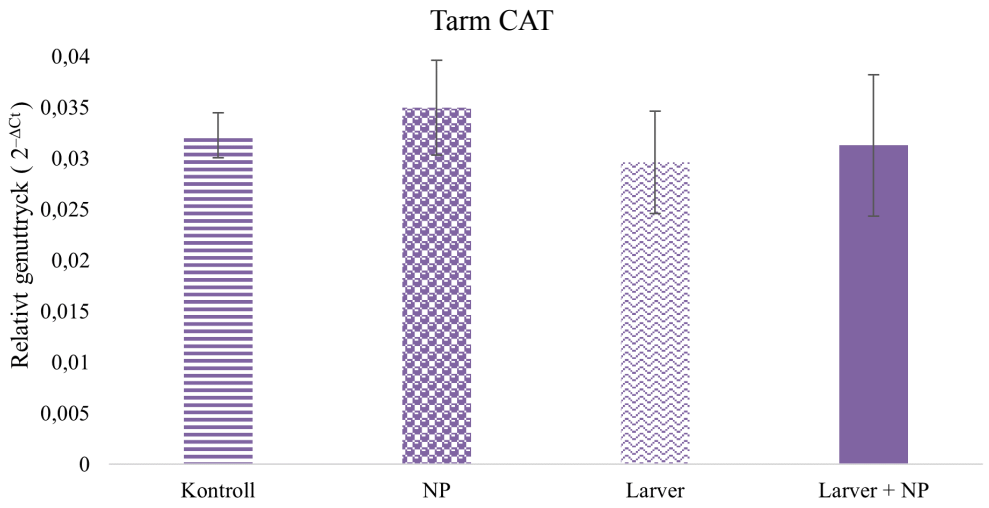


Diagram 9. Relativt genuttryck för CAT i tarm hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [1,06], p = [0,40].

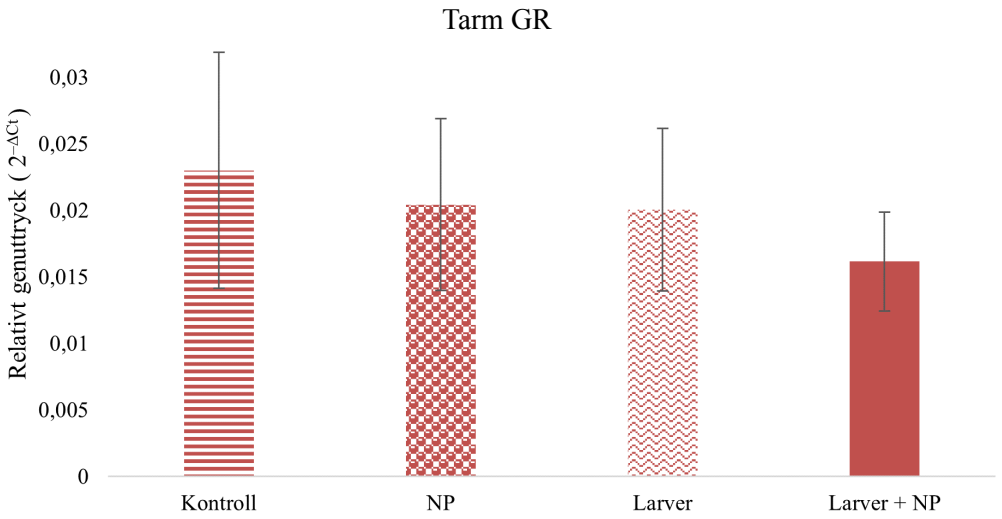


Diagram 10. Relativt genuttryck för GR i tarm hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,43], p = [0,73].

4.1.3 Gäle

För gälar kan inget tydligt mönster anas. Genuttrycken i grupperna *"NP"* och *"Larver + NP"* håller sig på ungefär samma nivå som någon av kontrollgrupperna *"Kontroll"* eller *"Larver"*.

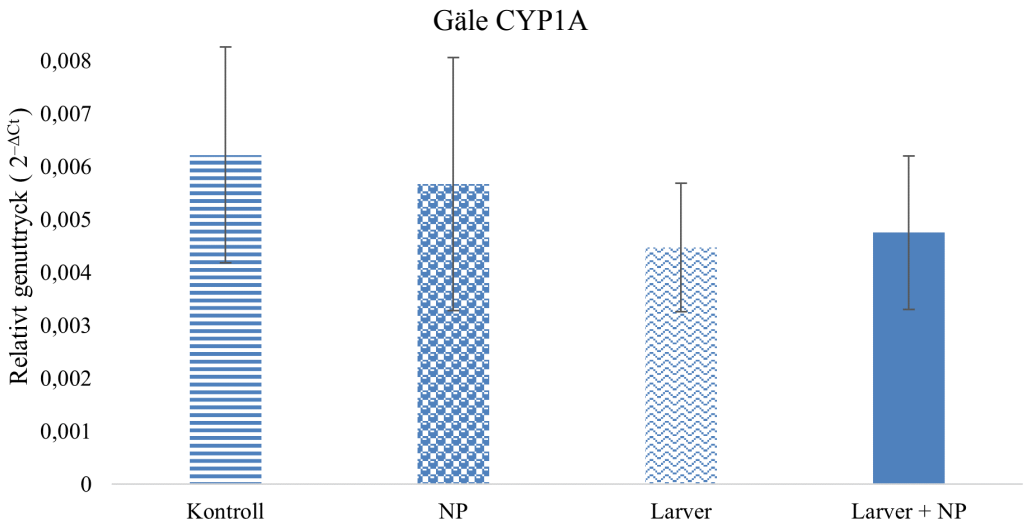


Diagram 11. Relativt genuttryck för CYP1A i gäle hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,72], p = [0,56].

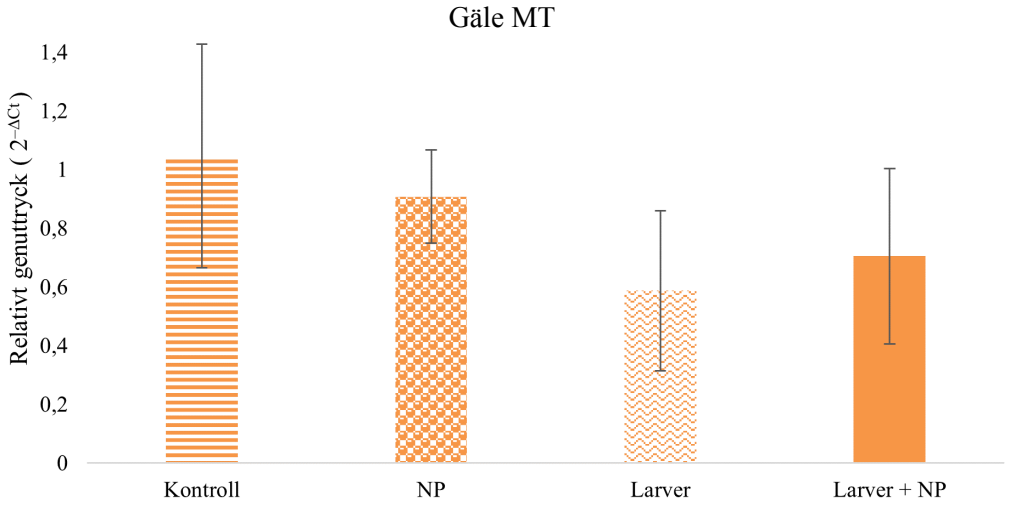


Diagram 12. Relativt genuttryck för MT i gäle hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: *F(3, 12) = [2,14], p = [0,15].*

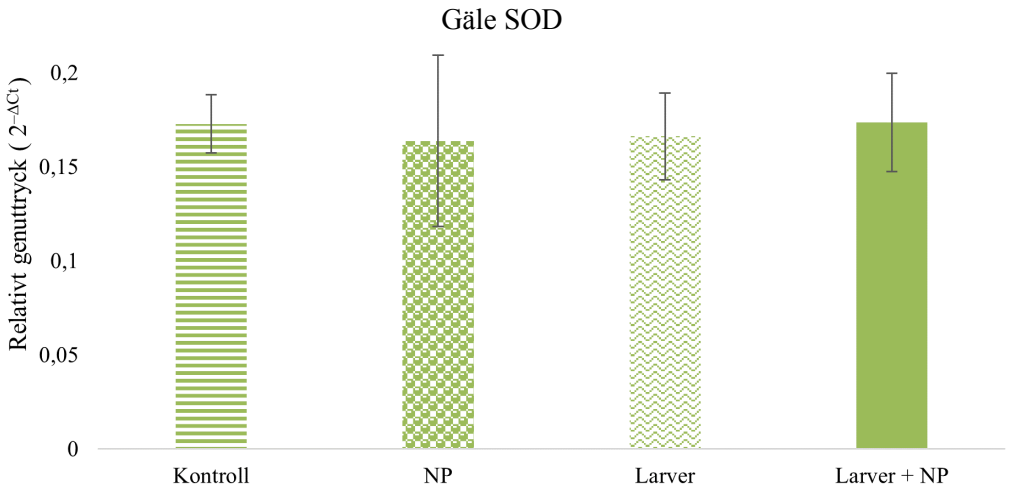


Diagram 13. Relativt genuttryck för SOD i gäle hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,18], p = [0,91].

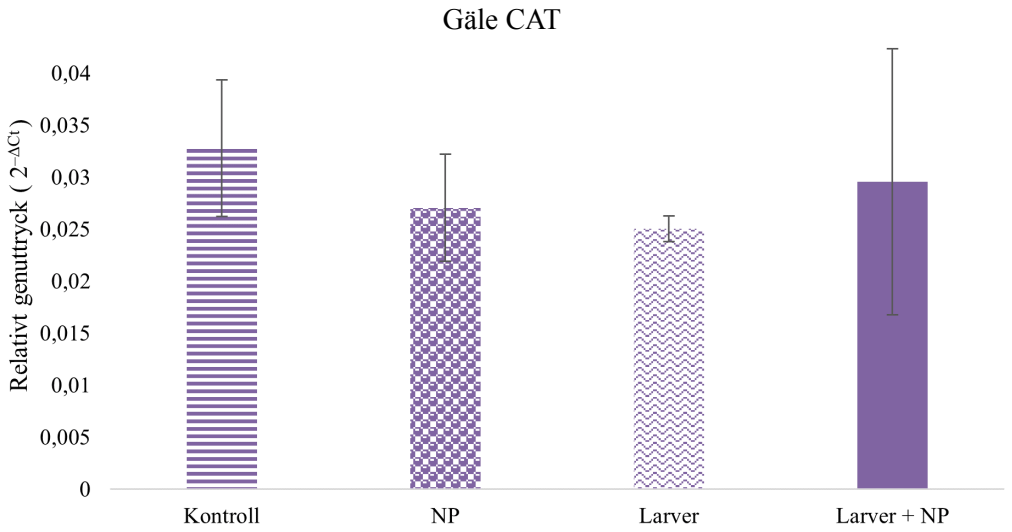


Diagram 14. Relativt genuttryck för CAT i gäle hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [1,07], p = [0,40].

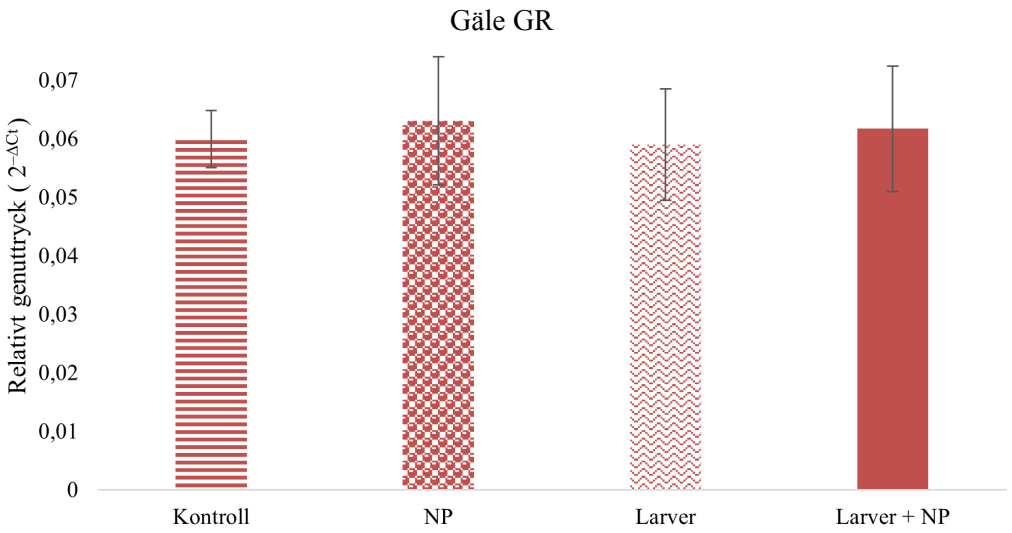


Diagram 15. Relativt genuttryck för GR i gäle hos abborrar efter 7 dagar i respektive behandling. Resultat från ANOVA: F(3, 12) = [0,16], p = [0,92].

5. Diskussion

Att generna var mest uttryckta i levern är inte förvånande då levern troligen är det huvudsakliga organet för rening av NP, samt eftersom NP eventuellt kan lagras i levern (Handy m.fl., 2008).

Avsaknaden av signifikanta skillnader i genuttryck mellan testgrupperna kan ha flera förklaringar. En förklaring kan vara att partikelblandningen i sig inte var toxisk. Detta kan inte uteslutas men är osannolikt då blandningen exempelvis innehöll metallerna Fe, Al, Pb och Ti som ensamma eller i föreningar med andra ämnen är toxiska. Mängden partiklar kan dock ha varit för liten för att ge toxiska effekter på den korta tid som exponeringen varade. Att fyra abborrar avled i förväg kan också ha påverkat resultatens signifikans. Varför de dog i förväg är oklart. Det kan inte tydligt kopplas till exponering för toxiska ämnen eftersom en av de avlidna abborrarna kom från en kontrollgrupp med rent sediment och vatten. Ytterligare en förklaring kan vara att upptag av partiklarna inte skedde i någon stor utsträckning. Upptag av partiklarna var en av de saker som var tänkt att undersökas med hjälp av studien men frågan blev obesvarad. En teori som presenterades tidigare i uppsatsen är att mat och organisk materia i tarmen kan utgöra ett skydd så att upptaget eller toxiciteten för NP minskar (Shaw och Handy, 2011). Detta kan möjligtvis vara en förklaring till avsaknaden av effekt vid exponering via föda.

Avsaknaden av effekt på genuttrycken innebär inte nödvändigtvis att partikelblandningen inte var toxisk. Utifrån den fakta som presenterats i avsnitt *2.4 Biomarkörer* konstateras att biomarkörerna följer komplexa och dynamiska mönster. Oxidativ stress kan exempelvis både leda till förändrad aktivitet för några antioxidanter medan aktiviteten hos andra antioxidanter hos samma organism förblir konstanta. Flera genuttryck kan alltså behöva undersökas för att upptäcka förändringar i de cellulära processerna. Dessutom kan genuttryck variera med olika faktorer såsom exponeringstid, organ, andra skyddsmekanismer, livsstadie, säsong och kön. Sammanfattningsvis är förändringar i genuttryck värdefulla indikatorer för skadliga effekter, men oförändrade genuttryck innebär inte nödvändigtvis att organismen är oskadd.

Notera återigen att följande diskussion om genuttryck förs kring mönster som kan anas men som inte har konstaterats i statistiska test.

Genuttryck i lever

Den ganska stora skillnaden i genuttryck för antioxidanten GR mellan gruppen "*larver + NP*" och kontrollgrupperna "*kontroll*" och *"Larver"* kan tyda på trofisk spridning och oxidativ stress. Att det inte är lika stora skillnader i genuttryck för SOD och CAT är intressant då de också är antioxidanter. Tidigare i uppsatsen har det konstaterats att oxidativ stress inte nödvändigtvis gör att samtliga försvar mot oxidativ stress aktiveras. Vissa typer av antioxidanter kan prioriteras över andra. En spekulation är därför att försvaren i form av SOD och CAT inte behöver aktiveras, om den oxidativa stressen redan motverkas av GR.

Genuttryck i tarmar

Genuttrycket för MT är särskilt intressant i denna studie då partikelblandningen till stor del bestod av metaller. Att genuttrycket för MT var lägre för gruppen *"Larver + NP"* än för resterande grupper kan tyda på att upptag av nanometaller framförallt har skett via föda. Detta är i linje med att exponering för metaller allmänt främst sker via föda (Shaw & Handy, 2011). Det är intressant att MT ser ut att ha

nedreglerats i tarmarna snarare än förhöjts. En nedreglering kan dock precis som en förhöjd aktivitet tyda på exponering för toxiska metaller. Exempelvis visades ju uttrycket för MT minska i levern hos niltilapia efter exponering för Ag-NP (Thummabancha m.fl., 2016). Vidare är MT i sig ett försvar mot oxidativ stress eftersom det hjälper till att utsöndra metaller som kan orsaka oxidativ stress. Detta kan möjligtvis vara en förklaring till att inga tydliga förändringar i genuttryck för antioxidanterna SOD, CAT och GR i tarm kan anas.

Genuttryck i gälar

Att inga mönster för genuttrycken kunde anas i gälarna kan exempelvis förklaras av att upptag av NP till gälarna inte skedde i någon stor utsträckning. Detta stämmer överens med den teori som presenterades tidigare i uppsatsen, att upptag troligen främst sker i tarmarna via endocytos (Handy m.fl., 2008). Å andra sidan kan som sagt metalljoner tas upp via gälarna. Dessutom kan NP som sagt transporteras till gälarna via blodet så även om NP inte tas upp i gälarna kan de nå dit så småningom. Det är alltså oklart varför genuttrycken i gälarna inte förändrats. Som presenterades i början av diskussionen kan avsaknaden av effekt på genutrycken ha många olika förklaringar.

5.1 Slutord och förslag till framtida studier

Spridning av NP till miljön och påverkan på levande organismer är ett komplext ämne. Partiklarnas öde och toxicitet påverkas av diverse abiotiska och biotiska faktorer. Det är inte heller säkert att utsläppta partiklar bibehåller sina ursprungliga egenskaper eftersom aggregering, modifiering och metabolisering av partiklarna kan ske. Det är dock ett faktum att exponering för vissa NP ger toxiska effekter. Eventuella konsekvenser av de ökade utsläppen bör därför fortsatt redas ut, för att i tid kunna förhindra skadliga effekter för människa och miljö.

Fortsatta studier med både enskilda NP och partikelblandningar föreslås. Att undersöka effekter av riktiga utsläpp har fördelen att det direkt visar vad utsläppen kan få för konsekvenser. Vid eventuella negativa effekter kan argument föras kring att utsläpp bör minimeras. För att kunna ge råd kring användningen av specifika NP krävs dock tester med enskilda NP.

En vidareutveckling av denna studie kan vara att utföra samma test men med större koncentration partiklar, alternativt låta exponeringen pågå under längre tid. Detta för att se om det resulterar i samma avsaknad av effekt eller signifikanta skillnader mellan de olika testgrupperna. Förslagsvis bör studier av genuttryck kompletteras med ytterligare former av toxicitetsbedömningar. Genuttryck tycks i vissa fall vara svåra att tyda. En viss typ av försvar kanske prioriteras medan ett annat nedprioriteras och det kan vara svårt att sätta en förändring i kontext till kroppens alla processer. Redan vid exponering av enstaka ämnen kan genuttryck vara något svårtydda. Något som komplicerar tolkningen ytterligare är när en blandning av många olika ämnen används. För att komma ifrån komplexiteten skulle mer direkta och tydliga konsekvenser kunna undersökas, såsom beteendeförändringar, dödlighet eller reproduktionsframgång i form av exempelvis äggproduktion. Sådana studier tar dock längre tid att genomföra. För- och nackdelar får alltså vägas mot varandra. En specifik idé för en fortsatt studie är att utsätta abborrar för partikelblandningen som i denna studie, men sedan även utsätta fiskarna för någon typ av stressor och se hur väl fiskarna hanterar det. Detta skulle troligen vara mindre tid- och arbetskrävande än att till exempel undersöka reproduktionsframgång.

Miljöövervakning kan vara ett relevant alternativ till studier i labb då det kan visa på eventuella konsekvenser av riktiga utsläpp. Det bör ske parallellt med utveckling av metoder för att kunna identifiera och skilja mänskligt tillverkade NP i miljön från naturliga NP.

5.2. Uppföljning till denna studie

Signifikanta förändringar i genuttryck i denna studie skulle indirekt även ha visat på upptag och trofisk spridning av NP. På grund av avsaknaden av signifikanta resultat kunde dock inte upptag och trofisk spridning konstateras. Huruvida upptag av metaller har skett kommer dock kunna besvaras efter att svaren från metallanalysen av KTH har inkommit, alltså under hösten 2023.

6. Slutsats

Ingen signifikant förändring i genuttryck för CYP1A, SOD, CAT, GR eller MT kunde påvisas i organen hos de abborrar som exponerats för partiklar från återvinningsanläggningen för elektronik. Därmed kunde varken upptag, trofisk överföring eller toxiska effekter till följd av exponeringen konstateras.

7. Referenser

Applied Biosystems (2014). Real-time PCR handbook. https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf

Benavides, M., Fernández-Lodeiro, J., Coelho, P., Lodeiro, C., & Diniz, M. S. (2016). *Single and combined effects of aluminum (Al2O3) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, Carassius auratus*. Environmental Science and Pollution Research, 23, 24578–24591. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7915-3

Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., & Wagner, S. (2018). *Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?*. Environmental Sciences Europe, 30(6). https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6

Chowdhury, S., & Saikia, S. K. (2020). *Oxidative Stress in Fish: A Review*. Journal of Scientific Research, 12(1), 145–160. https://doi.org/10.3329/jsr.v12i1.41716

Christen, V., & Fent, K. (2012). *Silica nanoparticles and silver-doped silica nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response and alter cytochrome P4501A activity*. Chemosphere, 87(4), 423-434. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.046

Direktiv 2012/19. *Europaparlamentets och rådets direktiv 2012/19/EU av den 4 juli 2012 om avfall som utgörs av eller innehåller elektrisk och elektronisk utrustning (WEEE) (omarbetning) Text av betydelse för EES*. http://data.europa.eu/eli/dir/2012/19/oj

Forti, V., Baldé, C.P., Kuehr, R., & Bel, G. (2020) *The Global E-waste Monitor 2020: Quantities, flows and the circular economy potential*. United Nations University (UNU)/United Nations Institute for Training and Research (UNITAR) – co-hosted SCYCLE Programme, International Telecommunication Union (ITU) och International Solid Waste Association (ISWA).

Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., & Tyler, C. R. (2008). *Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis*. Ecotoxicology, 17, 396-409. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1

Janković, N. Z., & Plata, D. L. (2019). *Engineered nanomaterials in the context of global element cycles*. Environmental Science: Nano, 9, 2697-2711. https://doi.org/10.1039/C9EN00322C

Jo, H. J., Choi, J. W., Lee, S. H., & Hong, S. W. (2012). *Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against Daphnia magna: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods*. Journal of Hazardous Materials, 227-228, 301-308. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.066

Katuli, K. K., Massarsky, A., Hadadi, A., & Pourmehran, Z. (2014). *Silver nanoparticles inhibit the gill Na^+/K^+-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (Danio rerio)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 106, 173-180. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.001

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908-931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

Kroon, F., Streten, C., & Harries, S. (2017). *A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review*. PLoS ONE 12(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762

Kurita-Oyamada, H., Brown, C. L., Kroll, K. J., Walley, S. E., Keller, C., Ejaz, M., Kozuch, M., Reed, W., Grayson, S., Savin, D. A., & Denslow, N. D (2020). *Toxicity assessment of a novel oil dispersant based on silica nanoparticles using Fathead minnow*. Aquatic Toxicology, 229, 105653. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105653

Lammel, T., Thit, A., Mouneyrac, C., Baun, A., Sturve, J., & Selck, H. (2019). *Trophic transfer of CuO NPs and dissolved Cu from sediment to worms to fish – a proof-of-concept study*. Environmental Science: Nano, 4, 995-1270. https://doi.org/10.1039/c9en00093c

López, M., Reche, C., Pérez-Albaladejo, E., Porte, C., Balasch, A., Monfort, E., Eljarrat, E., & Viana, M. (2022). *E-waste dismantling as a source of personal exposure and environmental release of fine and ultrafine particles*. Science of The Total Environment, 833(154871). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154871

Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). *Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry*. Molecules, 28(2). https://doi.org/10.3390/molecules28020661

Nationalencyklopedin. (u.å.). atomkärna. I *Nationalencyklopedin*. Hämtad 2023, 25 maj från https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/atomk%C3%A4rna

Noss, C., Dabrunz, A., Rosenfeldt, R. R., Lorke, A., & Schulz, R. (2013). *Three-Dimensional Analysis of the Swimming Behavior of Daphnia magna Exposed to Nanosized Titanium Dioxide*. PLoS ONE, 8(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080960

Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). *Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment*. Environmental Pollution, 150(1), 5-22. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006

Odnevall, I., Sturve, J., Ekvall, M., Isaxon, C., Herting, G., Bermeo Vargas, M., Messing, L., Hansson, A., & Rissler, J. (2023). *Characterization and toxic potency of airborne particles formed upon WEEE waste recycling – a case study*. [Manuskript under arbete]

Ramsden, C. S., Smith, T. J., Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2009). *Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (Oncorhynchus mykiss): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain*. Ecotoxicology, 18, 939-951. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0357-7

Sarasquete, C., & Segner, H. (2000). *Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies*. Science of The Total Environment, 247(2–3), 313-332. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00500-8

Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., & Svobodova, Z. (2011). *Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review*. Vet Med - Czech, 56(11), 537-546. https://doi.org/10.17221/4272-VETMED

Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2011). *Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions*. Environment International, 37(6), 1083-1097. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.009

Thummabancha, K., Onparn, N., & Srisapoome, P. (2016). *Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to silver nanoparticles*. Journal of Immunotoxicology, 13(6), 909-917. https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1242673

Wikimedia Commons (2013). *Internal organs of a fish* [Illustration]. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Internal_organs_of_a_fish.svg CC BY SA 3.0

Zhu, X., Tian, S., & Cai, Z. (2012). *Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (Danio rerio) Early Life Stages*. PLoS ONE, 7(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046286

8. Bilagor

A. PCR-platta, mall

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Prov 5	Prov 6	Prov 7	Prov 8	Prov 9	Prov 10	Prov 11	Prov 12
B	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat
C	Prov 13	Prov 14	Prov 15	Prov 16	NTC	NRT 1	NRT 2	NRT 3				
D	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat				
E	Prov 1	Prov 2	Prov 3	Prov 4	Prov 5	Prov 6	Prov 7	Prov 8	Prov 9	Prov 10	Prov 11	Prov 12
F	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat
G	Prov 13	Prov 14	Prov 15	Prov 16	NTC	NRT 1	NRT 2	NRT 3				
H	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat	Replikat				

På varje platta amplifierades två olika gener genom qPCR; gen 1 från brunn A1 till och med D8 samt gen 2 från E1 till och med H8.

B. Ursprungliga resultat från qPCR (medelvärden av duplikat)

ID, förklaring:

- “F” = främre raden av akvarier
- “B” = bakre raden av akvarier

Färgkoder:

- Ingen färg = < 0,2 skillnad mellan duplikaten
- Orange = 0,2-0,3 skillnad mellan duplikaten
- Röd = 0,3-0,35 skillnad mellan duplikaten
- Blå = endast ett av duplikaten användes pga fel hos det andra

Abborre ID	Testgrupp	Lever CYP Cq medelvärde	Lever MT Cq medelvärde	Lever SOD Cq medelvärde	Lever CAT Cq medelvärde	Lever GR Cq medelvärde	Lever Ubiq Cq medelvärde	Lever EF Cq medelvärde
18 C F	C	22,69	15,41	20,06	20,09	27,22	20,56	18,03
32 C (F)	C	22,32	15,31	20,51	20,62	26,16	21,03	18,30
35 C (F)	C	20,24	16,87	20,36	19,63	25,62	21,93	17,76
18 C (B)	C	22,10	15,78	20,28	20,34	27,03	20,56	18,47

17 NP (F)	NP	20,50	15,16	20,29	19,44	25,92	19,06	17,61
20 NP (F)	NP	21,39	14,81	19,72	19,66	25,61	20,05	17,99
33 NP (F)	NP	21,18	17,07	19,80	21,06	26,72	22,16	18,01
33 NP (B)	NP	23,02	17,00	21,21	21,11	27,59	22,47	19,57
21 W (F)	W	21,97	15,39	20,23	19,53	26,79	20,02	17,71
30 W (F)	W	22,76	19,69	20,34	22,21	27,75	23,25	18,45
34 W (F)	W	20,57	14,61	20,34	19,57	25,78	19,26	18,10
21 W (B)	W	21,95	15,68	20,24	19,60	27,11	20,24	17,80
34 W (B)	W	21,95	15,64	20,36	19,86	26,62	20,03	18,17
29 W + NP (F)	W+NP	22,14	15,26	20,92	20,17	27,36	20,75	17,48
31 W + NP (F)	W+NP	22,44	15,85	20,98	20,13	28,02	21,23	17,69
31 W + NP (B)	W+NP	22,78	15,96	20,47	20,95	27,53	21,33	18,95

Abborre ID	Testgrupp	Tarm CYP Cq medelvärde	Tarm MT Cq medelvärde	Tarm SOD Cq medelvärde	Tarm CAT Cq medelvärde	Tarm GR Cq medelvärde	Tarm Ubiq Cq medelvärde	Tarm EF Cq medelvärde
18 C (F)	C	26,72	22,62	21,79	24,96	25,26	21,36	18,60
32 C (F)	C	26,85	21,32	21,78	24,62	25,24	21,36	18,19
35 C (F)	C	28,13	21,19	22,19	25,71	25,74	22,14	19,45
18 C (B)	C	25,40	21,44	21,09	24,11	25,49	20,52	17,53
17 NP (F)	NP	27,43	21,93	21,91	25,57	25,76	21,80	19,28
20 NP (F)	NP	25,83	21,73	21,94	24,69	25,91	21,69	18,07
33 NP (F)	NP	27,13	21,30	21,39	24,39	25,55	21,25	17,62
33 NP (B)	NP	27,53	21,40	22,50	25,18	25,89	22,37	18,78
21 W (F)	W	26,50	22,76	21,71	24,52	25,32	20,96	17,96
30 W (F)	W	27,87	21,99	21,15	24,91	25,53	21,84	18,54
34 W (F)	W	27,45	20,98	23,03	25,59	25,51	21,71	18,90
21 W (B)	W	26,54	21,26	21,43	24,52	25,81	20,94	17,83
34 W (B)	W	26,48	20,96	22,07	25,26	25,66	21,45	18,54
29 W + NP (F)	W+NP	26,63	22,12	21,20	24,39	25,36	21,27	18,17

31 W + NP (F)	W+NP	26,86	23,29	22,44	25,53	26,30	22,14	18,51
31 W + NP (B)	W+NP	26,45	22,17	21,44	25,10	26,23	21,68	18,14

Abborre ID	Testgrupp	Gälar CYP Cq medelvärde	Gälar MT Cq medelvärde	Gälar SOD Cq medelvärde	Gälar CAT Cq medelvärde	Gälar GR Cq medelvärde	Gälar Ubiq Cq medelvärde	Gälar EF Cq medelvärde
18 C (F)	C	26,12	18,80	21,92	23,96	23,24	20,60	17,92
32 C (F)	C	26,99	19,12	21,60	24,41	23,16	20,53	17,90
35 C (F)	C	27,37	20,55	22,20	24,27	23,75	21,02	18,11
18 C (B)	C	25,88	18,47	21,24	23,97	22,91	19,98	17,55
17 NP (F)	NP	26,88	19,38	22,20	24,72	23,10	20,56	17,67
20 NP (F)	NP	26,15	18,82	21,05	24,18	22,57	20,48	17,31
33 NP (F)	NP	25,85	19,45	21,77	24,06	23,16	20,12	17,84
33 NP (B)	NP	27,83	19,42	22,01	24,39	23,61	21,17	17,72
21 W (F)	W	26,13	19,53	21,43	23,99	22,89	19,81	17,39
30 W (F)	W	27,33	21,31	22,26	25,15	24,29	21,76	18,13
34 W (F)	W	26,67	18,34	20,95	23,71	22,21	19,60	17,13
21 W (B)	W	26,75	20,18	21,32	23,91	22,76	19,92	17,29
34 W (B)	W	26,06	18,76	20,76	23,54	22,06	19,50	16,89
29 W + NP (F)	W+NP	27,12	18,87	21,22	24,43	23,23	20,21	17,64
31 W + NP (F)	W+NP	26,38	19,74	21,24	24,09	22,41	20,07	17,15
31 W + NP (B)	W+NP	25,92	19,29	21,29	23,10	22,60	19,85	17,36