

0 - 76148

NORD-TEXTIL-VA

76 - 79

TEXTILINDUSTRINS VATTENVÅRDSPROBLEM NORDFORSK

RAPPORT nr. 43 fra TOTALPROSJEKTET

Delrapport 2

"Anvendte testmetoder ved karakterisering av tensider,  
carriers og farge-etterbehandlingsmidler"

Oslo, desember 1980

Saksbehandler: Egil Gjessing

Instituttetsjef: Kjell Baalsrud

# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Forskningsråd

Postadresse: Brekke 23 52 80  
Postboks 333, Blindern Gaustadalleen 46 69 60  
Oslo 3 Kjeller 71 47 59

Rapportnummer:	0-76148
Undernummer:	II
Løpenummer:	1255
Begrenset distribusjon:	

Rapportens tittel: Anvendte testmetoder ved karakterisering av tensider, carriers og farge-etterbehandlingsmidler. (Nr. 43 fra totalprosjektet).	Dato: desember 1980
Forfatter(e): Harry Efraimsen, Egil Gjessing, Magne Grande Torstein Källqvist, Johan Mannheimer <sup>x)</sup>  x) Institut för vatten- och luftvårdsforskning, Stockholm.	Prosjektnummer: 0-76148
	Faggruppe: Kjemi/biologi
	Geografisk område:
	Antall sider (inkl. bilag): 15

Oppdragsgiver: NORDFORSK NTNF	Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.):
-------------------------------------	----------------------------------

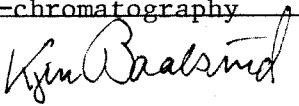
Ekstrakt: Rapporten summerer de kjemiske og biologiske analyse-/testmetodene som NORDFORSK's Tekstilavløpsvanns-prosjekt har anvendt. De viktigste biologiske metodene er beskrevet forholdsvis detaljert.
---

4 emneord, norske:
1. Testmetoder
2. Mikrobiologi
3. Hydrobiologi
4. Bioakkumulering
Tynnsjikt-kromatografi

4 emneord, engelske:
1. Testmethods
2. Microbiology
3. Nydrobiology
4. Bioaccumulation
Thinlayer-chromatography

  
Egil Gjessing  
Prosjektleders sign.:

  
Arild Schanke Eikum  
Seksjonsleders sign.:

  
Kjell Baalsrud  
Instituttsefs sign.:

ISBN 82-577-0337-0

## 1. Innledning

Ved kjemisk og biologisk karakterisering av tekstilt avløpsvann og tekstilkjemikalier er det anvendt en rekke forskjellige metoder, og det er bestemt:

pH	Biokjemisk oksygenforbruk (BOD)
Ledningsevne	- BOD <sub>7</sub>
Alkalitet	- BOD <sub>21</sub>
Aciditet	- OECD-test
Total organisk karbon	Bakterie-toksisitet
Kobber	- TTC-test
Krom	- Toxiguard
Fettløselige organiske forbindelser	Alge toksisitet
Kjemisk oksygenforbruk (COD)	Fiske toksisitet
Fordelingskoeffisient (TLC)	

De fleste av disse metodene er beskrevet i "Rapport nr. 18 fra totalprosjektet". I det følgende er gitt en beskrivelse av de øvrige metodene, foruten noen supplerende opplysninger som er nyttige ved vurdering av karakteriserings-resultatene for de ulike tekstilkjemikaliene.

## 2. Biokjemisk oksygenforbruk (BOD<sub>7</sub>) og kjemisk oksygenforbruk (COD)

BOD<sub>7</sub> - biokjemisk oksygenforbruk er bestemt etter en fellesnordisk standard (NS 4749, SFS 3019 og SS 3019).

Inkubasjonstiden var sju døgn (BOD<sub>7</sub>), kjemikaliene ble løst i vann og analysert etter den standardiserte fortynningsmetode. For alle prøvevarianter ble det utført parallelle analyser. Forsøkene ble utført med adapterte organismekulturer som ble preparert på følgende måte:

En liter slam fra kommunalt renseanlegg tilsettes ett g sukker og 10 mg av testkjemikaliet. Blandingen luftes i ca. 14 dager (fordampet vann erstattes) og tilsettes i løpet av denne perioden økende mengder av testkjemikalium:

dag 0	10 mg/l
" 2	15 "
" 4	20 "
" 6	30 "
" 8	40 "
" 10	40 "
" 12	40 "
" 14	40 " .

De adapterte mikroorganismene anvendes til bestemmelse av BOD<sub>7</sub>.

Nitrifikasjonshemmende midler er ikke brukt. Oksygeninnholdet ble bestemt elektrometrisk.

Kjemikaliene kan virke toksisk på bakteriene og derved redusere den biokjemiske oksydasjon. BOD-analysene ble derfor bestemt etter fortynningsmetoden. Dette innebærer BOD-bestemmelse på en serie med økende fortynning. Så lenge det er en bakterietoksisk effekt, vil man ha økende BOD med økende fortynning. Den mest korrekte BOD vil man ha når en fortynning ikke øker BOD. En forutsetning er at oksygenforbruket er over en viss grense (> 2 mg O/l). Det er forøvrig også en forutsetning at BOD ikke er så høy at rest-oksygen er mindre enn 2 mg O/l ved inkubasjonens slutt. Den minste anvendbare konsentrasjon av kjemikaliene ble bestemt ved COD-analysen (se nedenfor). De høyeste BOD-verdier skulle være maksimalt 5 prosent av COD-verdien. Dette vil si at 2 mg kjemikalium pr. liter skulle gi den lavest akseptable BOD: 2 mg O/l.

COD - kjemisk oksygenforbruk ble bestemt etter felles nordisk standard (DS 217, NS 4748, SFS 3020 SS 02 81 42).

Kjemikaliene ble løst i vann (1-2 g/l), og det ble utført parallell-analyser for hvert stoff. Kvikksølv-sulfat ble brukt for å redusere effekten av eventuell klorid o.l.

Resultatene er oppgitt som oksygenforbruk pr. vektenhet kjemikalium (kg O/kg kjemikalium).

### 3. MITI-test

Denne testen er utviklet av MITI i Japan innenfor rammen av den japanske produktkontrollen: "Test Guidelines for Biodegradability Test of Chemical Substances by Microorganisms". Testen utføres på vannløsninger med 50 eller 150 mg/l av prøvesubstansen. Som podemateriale benyttes 30 mg/l (tørrsubstans) returslam fra kommunalt renseanlegg. Dessuten tilsettes næringssalter. Anilin anvendes som kontrollsubstans. Nedbrytbarheten bestemmes i sapromat hvorved BOD kan relateres til det totale oksygenforbruket.

Mengden av mikroorganismer som aktiveres i MITI-testen, er av størrelsesorden  $10^9 - 10^{10}$ /l, mens i en vanlig BOD<sub>7</sub>-test er antallet  $10^4$ . Til sammenlikning kan nevnes at et aktivslamanlegg har størrelsesorden  $10^{12}$  mikroorganismer pr. liter.

### 4. OECD-test

Hensikten med denne metoden er å måle bionedbryting av vannløselige, ikke-flyktige kjemikalier i et aerobt system i konsentrasjonsområdet 5-40 mg DOC/l. En bestemt mengde av stoffet løses i et medium som inneholder en variert blanding av næringsstoffer og viktige vitaminer. Blandingen inkuberes med et lite antall mikroorganismer fra en blandings-populasjon og luftes ved 20-25 °C i mørke (eller i difust lys). Nedbrytingen følges ved DOC analyser over en 28 døgns periode.

### 5. COD-reduksjon - biologisk nedbryting

Prinsippet for metoden er å bestemme mengden av organisk stoff (COD) før og etter en nedbrytingsprosess med mikroorganismer.

En fortennet testløsning tilsettes forsedimentert kommunalt avløpsvann som er adaptert i løpet av 15-30 døgn til en ikke-bakterietoksisk konsentrasjon av testsubstansen. Dessuten tilsettes NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (20 mg N/l). Blandingen inkuberes ved 20 °C i 14 eller 21 døgn (14 døgn for tensider og carriers og 21 døgn for farge-etterbehandlingmiddel) i HACH apparatur med manometrisk avlesning av oksygenforbruket. COD bestemmes på supernatanten.

6. Bioakkumulering, bestemmelse av stoffers bioakkumulerbarhet ved hjelp av væskekromatografi (ref. 4)

Kvantifisering av biokonsentreringspotensial

Den mest alminnelige måte å karakterisere biokonsentreringspotensialet for et kjemikalium har vært å eksponere en akvatisk organisme, som oftest fisk, for vann med en konstant konsentrasjon av stoffet ( $C_w$ ) inntil stabil konsentrasjon er oppnådd i organismen ( $C_{org}$ ).

Biokonsentreringsfaktoren (BCF) er definert som

$$BCF = \frac{C_{org}}{C_w} \quad (1).$$

Helt analogt definerer man fordelingskoeffisienten i et tofase-system

$$P = \frac{C_{upolar\ fase}}{C_{polar\ fase}} \quad (2)$$

En alternativ måte å definere biokonsentrasjonsfaktoren på er å bestemme opptakshastighetskonstanten av kjemikaliet ( $K_1$ ), og elimineringshastighetskonstanten ( $K_2$ ).

På basis av følgende forutsetninger:

$$\text{at opptaksprosessen er } C_{opp} = C_o (1 - e^{-K_1 t}) \quad (3)$$

$$\text{og at elimineringsprosessen er } C_{el} = C_o \cdot e^{-K_2 t} \quad (4)$$

dvs.

$$BCF = \frac{K_1}{K_2} \quad (5)$$

Denne måten å beregne BCF på har de fordeler at man ikke må vente på "steady state" som for sterkt lipofile stoffer, kan ta meget lang tid. På den annen side er ligning 3 og 4 ofte bare tilnærmet riktige fordi det sannsynligvis er flere hastighetskonstanter som trengs for å beregne transporten fra vann til gjeller, blod, lever osv.

### Sammenheng mellom fordelingskoeffisient og biokonsentrering

Dersom de viktigste mekanismer for biokonsentrering er en fordeling mellom vann og fett, så vil en kjemisk bestemmelse av fordelingskoeffisienten (P) mellom en lipofil og en hydrofil fase kunne være et brukbart anslag for bioakkumulerbarhet.

Det er vist at fordelingskoeffisienten i oktanol/vann tofasesystem er godt korrelert med bioakkumuleringspotensialet. Det er funnet en god lineær sammenheng ( $r = 0,95$ ) mellom

$$\log BCF = 0,542 \log P + 0,124 \quad (6) \quad (\text{Neely et al. (1)}).$$

Selv om oktanol/vann er en metode som er godt innarbeidet, er det en del innvendinger mot denne, bl.a. at den ikke er basert på definerte pH-nivåer.

### Bestemmelse av fordelingskoeffisient ved væskekromatografi

Et viktig fremskritt ved oktanol/vann-prosedyren har vært at man nu benytter kromatografiske teknikker for å bestemme fordelingskoeffisienten. Væskekromatografi med kolonne impregnert med oktanol og kolonner med kjemisk bundet  $C_{18}$ -kjeder er brukt for å anslå organiske stoffers bioakkumuleringsgrad. I slike kolonnesystemer kan fordelingskoeffisienten P bestemmes ved å bruke følgende sammenheng:

$$V_e = V_o + P_{LC} V_s$$

$V_e$  = elueringsvolumet

$V_o$  = volumet som ikke er opptatt av kolonnematerialet

$V_s$  = stasjonære volum

$P_{LC}$  = fordelingskoeffisient væskekromatografi

Ettersom denne teknikk har vist seg å ha mange fordeler var det nærliggende å benytte tyynnsjikt-kromatografi (TLC) istedenfor kolonnekromatografi.

Ifølge Martin & Singe (2)

$$P_{TLC} = \frac{1}{R_F} - 1$$

og  $R_M$  definert som

$$R_M = \log P_{TLC} = \log \left( \frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad (7)$$

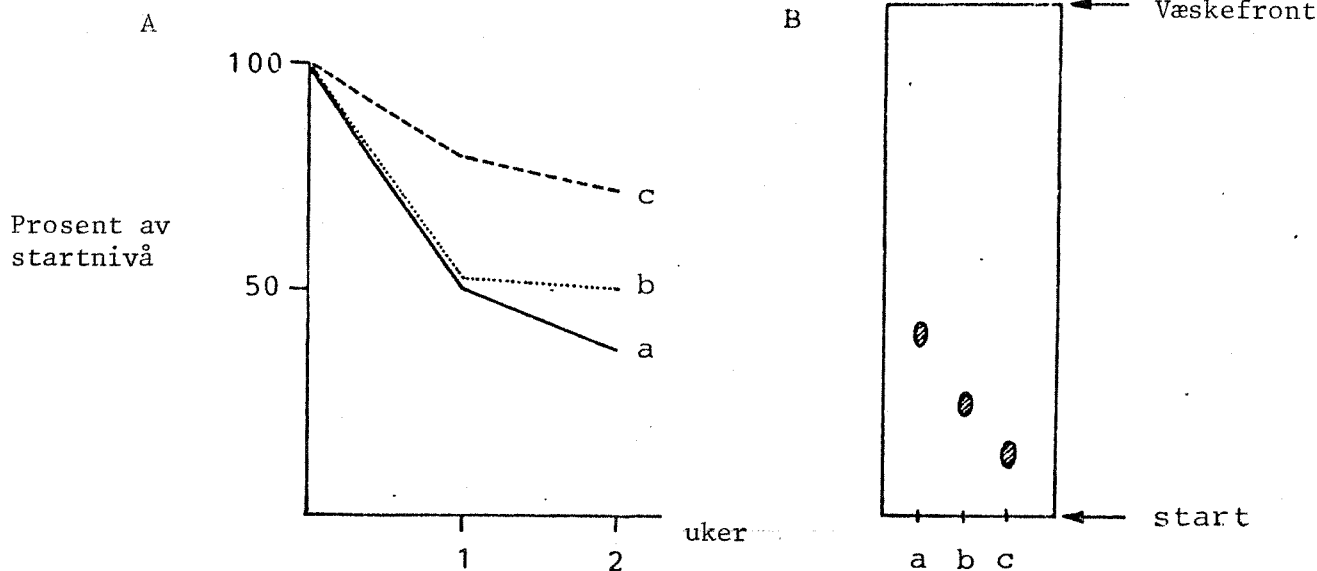
Det har vist seg at TLC virker tilfredsstillende og har mange fordeler sammenliknet med LC. Sammenhengen mellom  $P_{LC}$  og  $P_M$  er ved forsøk funnet å være:

$$R_M = 1,20 \log P_{LC} - 0,035 \quad (r = 0,989) \quad (8)$$

( $C_{18}$  HPTLC og  $C_{18}$  HPLC, Metanol:vann = 90:10).

Bestemmelse av fordelingskoeffisient ved bruk av TLC og dets anvendelse for bestemmelse av biokonsentrasjonsfaktor

Nedenfor er vist en del resultater fra forsøk som illustrerer sammenhengen mellom bioakkumulerbarhet og fordelingskoeffisienten ved bruk av TLC.



A Kurver for "desorbsjon" av p, p'-DDT (a), 2, 3, 4', 5 - tetrachlorobiphenyl (b), og 2, 2', 4, 4', 5, 5' tetrachlorobiphenyl fra abbor (perch) etter akkumuleringsforsøk.

B TLC av stoffene a, b og c ved bruk av torskeleverolje - impregnerte silicagel plater, Mobil fase; metanol:vann (95:5) (Edgren & al.(3)).

Som det fremgår av ovenstående figurer, er det ved bruk av TLC med torskelleverimpregnerte plater en god sammenheng mellom bioakkumulerbarhet (egentlig desorbsjon) og  $R_F$ -verdier. Metoden er imidlertid mindre attraktiv fordi man ikke har kvaliteten av torskelleveroljen tilstrekkelig definert.



Metode anvendt i Tekstilprosjektet

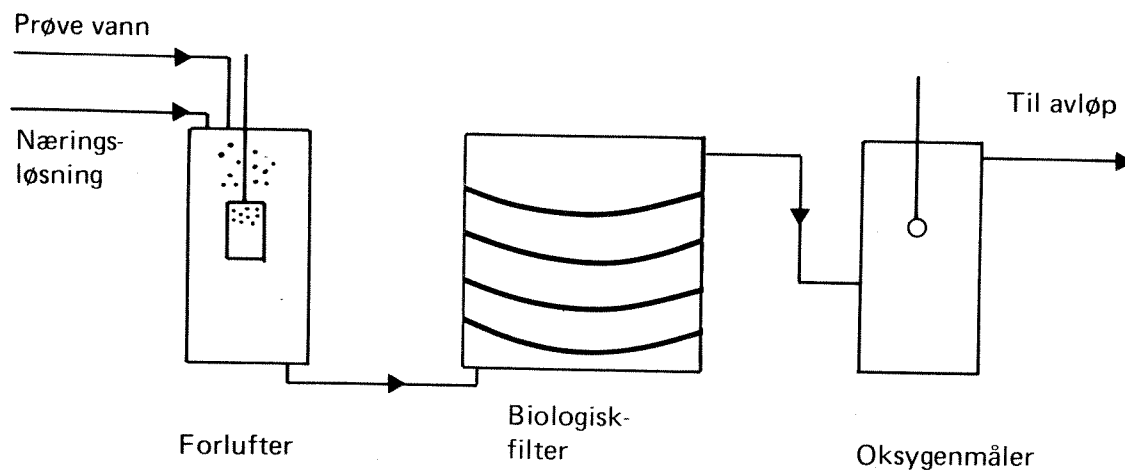
I dette prosjektet er anvendt C<sub>18</sub> HPTLC plater (C<sub>18</sub> impregnerte High Performance Tinlayer Chromatography-Plates) og mobil fase, Aceton:methanol:vann 70:20:10. Vannet har dels vært destillert vann, dels TRIS-buffer (pH 7,5). "Flekkene" er dels påvist på lysbord umiddelbart etter avsluttet eluering, dels med ultrafiolett lys, og dels ved dusjing med konsentrert H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

REFERANSER

1. Neely, W.B., Branson, D.R., Blau, G.E., Environ. Sci. Technol. 8 (1974) 1113.
2. Martin, A.J.P., Synge, R.L.M., Biochem. J. 35 (1941) 1358.
3. Edgren, M., Olsson, M., Renberg, L., Submitted to Ambio.
4. Renberg, L. og Sundström, G.: (1979): Chemosphere No. 7, 449.

## 7. "Toxiguard"

"Toxiguarden" er slik konstruert at den skal virke på samme måte som den biologiske delen i et renseanlegg, og reagere på tilførsel av giftstoffer. Det avløpsvannet som skal prøves, blandes med næringsløsning som skal tilsvare den øvrige del av avløpsvannet i et renseanlegg.



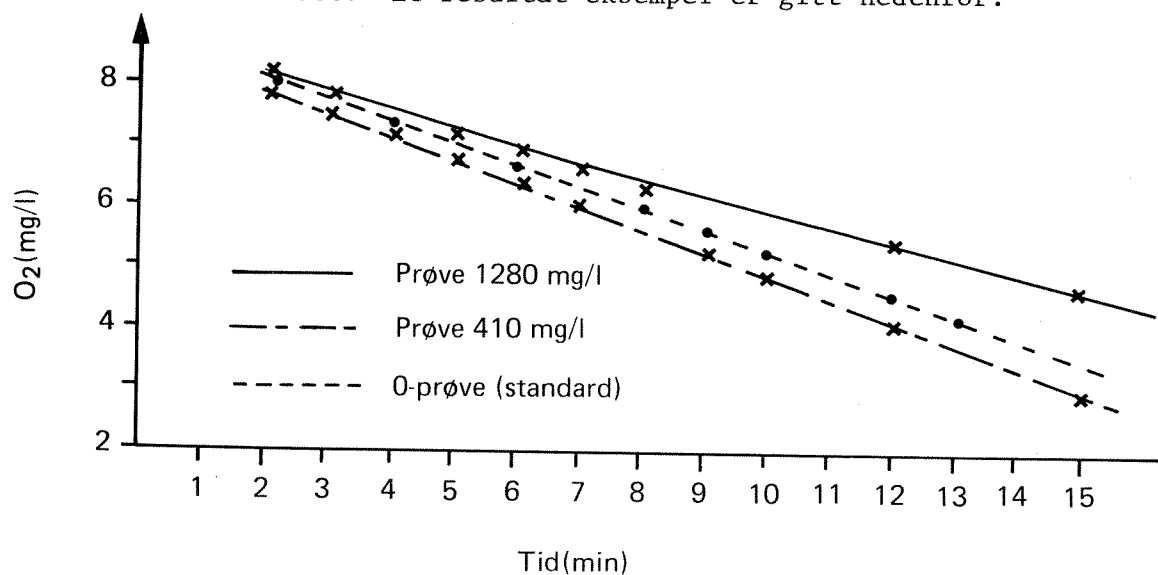
Prøvevannet pumpes inn i et luftekar sammen med næringsløsningen. Mengdeforholdet kan variere, men totalt skal det pumpes 40 ml/min gjennom apparaturen. Luftingen skal gi et oksygeninnhold på 5-7 mg O<sub>2</sub>/l. Etter luftingen passerer blandingen et biologisk filter med mikroorganismene fra et renseanleggs luftebasseng. Normalt forbruker mikroorganismene i dette filteret alt det oppløste oksygen som blandingen har. Ved forgiftning, dvs. ved hemming av den mikrobiologiske aktivitet, vil imidlertid oksygenforbruket bli redusert, og man kan registrere en oksygenøkning i den utløpende vannstrøm med oksygenelektrode tilkoblet en skriver. Vannstrømmens oppholdstid i systemet er ca. 10 min.

## 8. IVL-screen

Prinsippet for metoden er å sammenlikne oksygenforbruket pr. tidsenhet ved bakteriell nedbryting av en pepton løsning med og uten test substans.

Testen utføres i 300 ml E-kolbe, og det anvendes returslam (3 g suspendert stoff pr. liter) fra kommunalt renseanlegg. Det tilsettes pepton (0,2 g/l) og pH 7-buffer (0,5 ml buffer-konsentrat). Det fylles til slutt opp med destillert vann eller en vannløsning av prøvesubstansen. Det anvendte returslammet oppbevares ved romtemperatur under konstant lufting.

Forsøket starter idet returslammet helles på, og en oksygenelektrode plasseres i E-kolben. Kolben dekkes til på en slik måte at tilførsel av luft utenfra hindres. Forsøket varer i 15 minutter, og i denne perioden avleses oksygeninnholdet hvert minutt. Et resultat eksempel er gitt nedenfor:

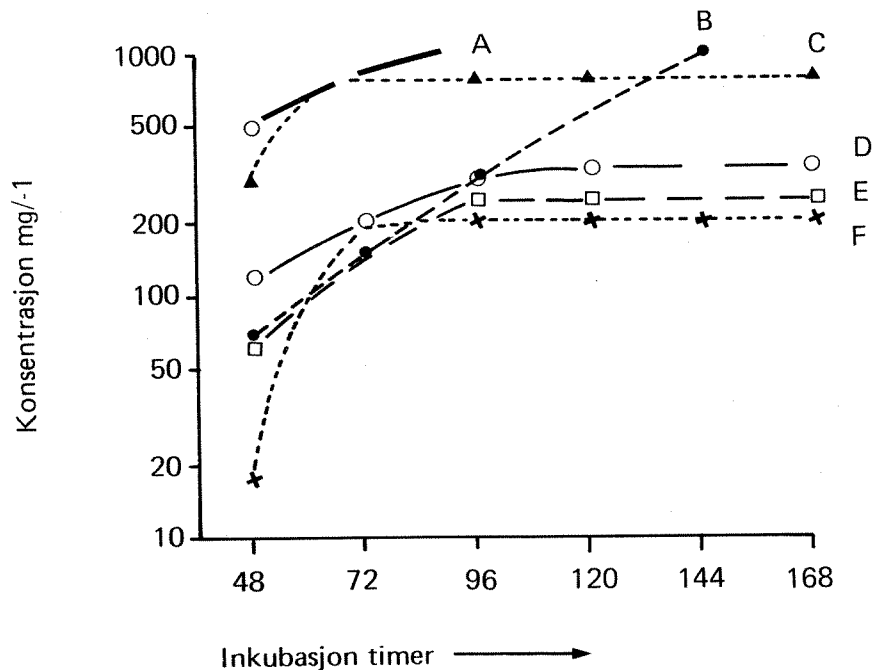


Man har altså en inhiberende effekt av prøvesubstansen ved den konsentrasjon hvor det er en reduksjon i kurvens helning, dvs. kurve 1 på figuren ovenfor.

## 9. NIVA EC<sub>50</sub> (EC<sub>10</sub>)

Prinsippet for metoden er at man manometrisk måler oksygenforbruket ved mikrobiologisk nedbryting av en standard glukose-glutaminsyre løsning med og uten testsubstans. Antallet konsentrasjoner av testløsningen avhenger av mulighetene for å få en så stor forskjell i oksygenforbruk i forhold til kontrollprøver at man kan beregne EC<sub>50</sub>-verdien.

Det inokuleres med 0,2% spesialbehandlet forsedimentert slam fra kommunalt renseanlegg (Norsk (nordisk) Standard for BOD). Temperaturen er 20 °C og tiden 7 døgn. Kjemikaliene ble, med noen få unntak, testet i konsentrasjonsområdet 10-1000 mg/l.



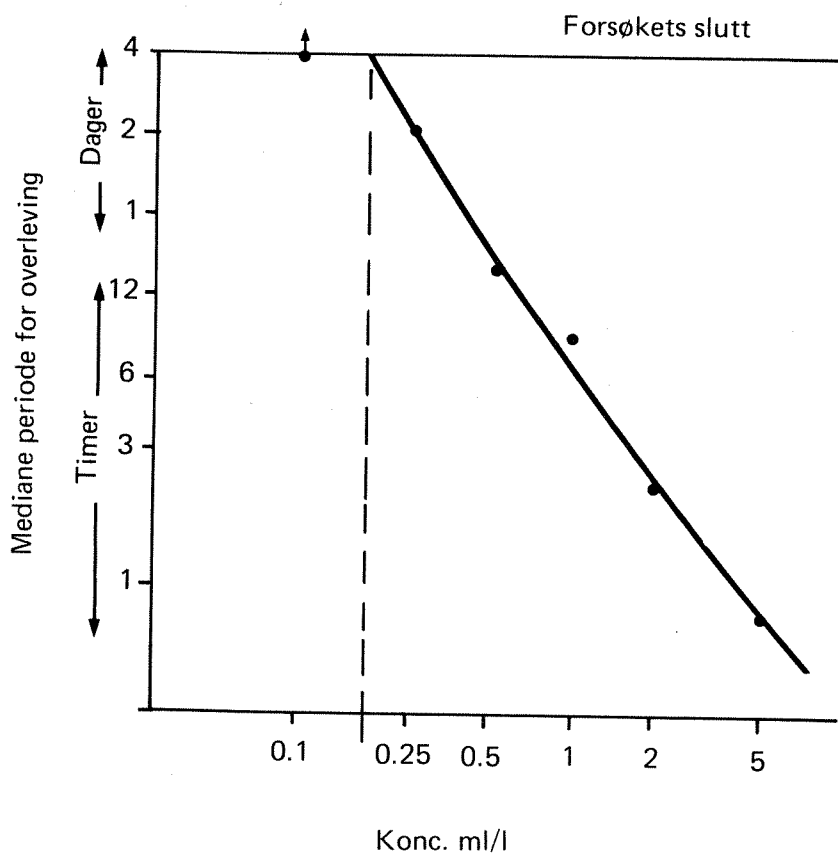
EC<sub>50</sub>-kurvene på figuren ovenfor viser i hvilken grad mikroorganismene kan adapteres til høye kjemikalie-konsentrasjoner. Kjemikalier som gir kurver med stor (vid) vinkel med x-aksen, f.eks. produkt B, tyder på at mikroorganismene har stor adaptasjonsevne overfor dette kjemikalium. På den annen side er kjemikalium C et eksempel på at adaptasjon ikke skjer ved konsentrasjon over 800 mg/l.

#### 10. Fiske toksisitetstest - 4 døgns LC<sub>50</sub>

Prinsippet for metoden er å finne den konsentrasjon av kjemikaliet som dreper 50 prosent av individene i løpet av en viss periode, her 4 døgn. Det benyttes inntil ett-år gammel laks (Atlantic salmon) med en middelvekt på 0,5 gram (0-1 år, 3-5 cm, 0,2-1,0 gram) i et antall av 10, og i 10 liters glassakvarier. Enkelte ganger er det nødvendig med orienterende tester for å peile inn konsentrasjons-området. I slike tilfeller anvendes et mindre antall fisk (2 stk.) og mindre prøvevolum (2 liter).

Forsøkene varer 4 døgn. Prøvevannet i akvariet luftes forsiktig og skiftes daglig. (Semistatistisk metode.) Fiskene føres ikke i forsøksperioden. Fiskens adferd noteres under forsøket, og særlig viktig er tidspunktet for død.

Resultatene rapporteres ved å avmerke den mediane overlevelsesperiode ved hver konsentrasjon i et dobbel-logaritme-kordinat system.



Skjæringspunktet mellom den kurven man kan trekke mellom punktene og linjen "Forsøkets slutt" (4 døgn linjen) angir den konsentrasjon som dreper 50% av fisken i løpet av 4 døgn. I tilfellet som er illustrert ovenfor, har man altså en 4 døgn  $LC_{50} = 0,17$  ml/l. Dersom kurven har et tilnærmet vertikalt forløp nær 4 døgn aksens, vil en være nær terskelverdien for akutt toksisitet.

#### 11. Alge toksisitet $EC_{50}$

Prinsippet for denne metoden er å studere vekstforløpet, dvs. antallet av alger som funksjon av tiden, med uten test kjemikalium.

Testene ble utført med en grønnalge Selenastrum capricornutum som test-organisme i et artifiisielt vekstmedium 10% Z8 (Staub 1961, Källqvist 1973).

En eksponensielt voksende kultur av Selenastrum ble fortynnet i vekstmediet til en tetthet av  $10^4$  celler/ml. Den fortyndede kulturen ble fordelt på 100 ml ståkolber, 50 ml i hver. Test-kjemikaliene ble tilsatt etter en logaritmisk serie av konsentrasjoner: 1, 3, 10, 30 ... osv. mg/l, med tre parallelle kulturer for hver konsentrasjon og tre kontroll kulturer uten tilsetning av teststoff.

Algekulturene ble inkubert på gyngebord ved 20 °C og med kontinuerlig belysning fra lysstoffrør (Osram hvit), ca. 6000 lux. Algecellene ble tallet etter en, to, tre og fire dager med en Coulter Counter ZB partikkelteller.

På grunnlag av telleresultatene (middelverdier av parallellene) ble gjennomsnittlig veksthastighet for perioden 0-1, 0-2 og 0-3 dager etter inkuberingsbegynnelse beregnet etter formelen:

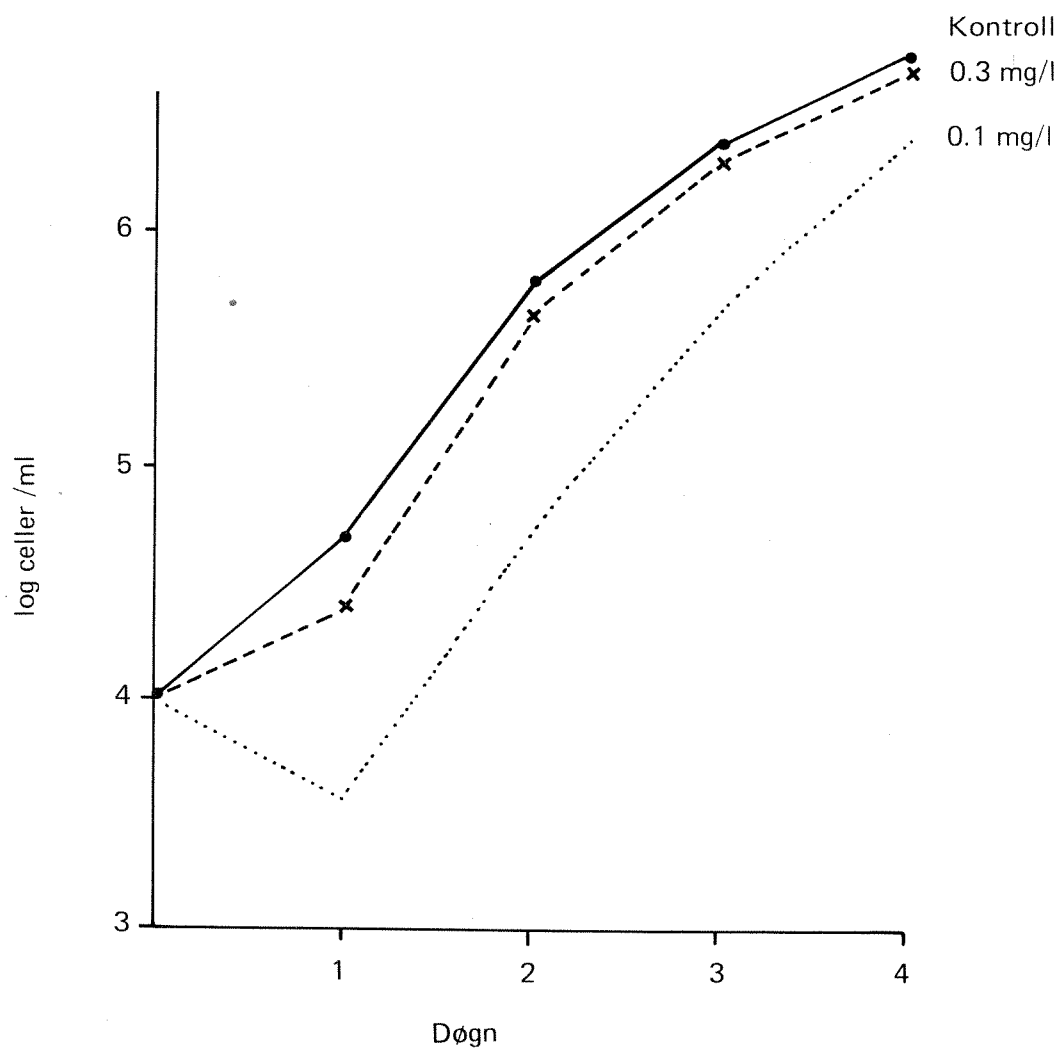
$$\mu_{0-x} = \frac{2 \log_{n_x} - 2 \log_{n_0}}{x} \text{ d\o{g}n}^{-1}$$

hvor  $n_0$  er celletall ved starten  
 $n_x$  " celletall etter x dager, og  
 $\mu_{0-x}$  " gjennomsnittlig veksthastighet i perioden 0-x dager (dobliger/døgn).

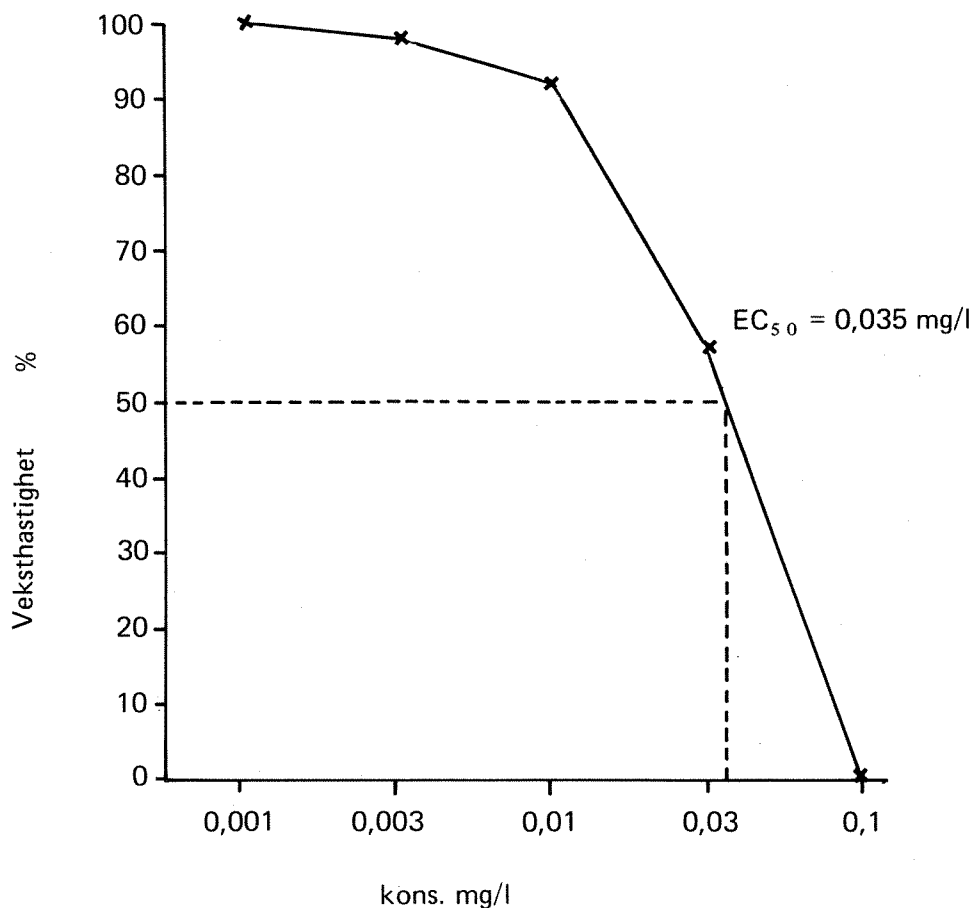
Veksthastigheten ved de forskjellige konsentrasjonene av testkjemikalier ble deretter omregnet til prosent av veksthastigheten i kontrollkulturen i det samme tidsrom. Verdiene ble plottet i et dose/respons-diagram hvor  $EC_{50}$ -verdiene ble funnet. ( $EC_{50}$  = den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av veksthastigheten.)

Den laveste  $EC_{50}$ -verdien for veksthastighet av de tre ( $u_{0-1}$ ,  $u_{0-2}$  og  $u_{0-3}$ ) ble valgt som resultat.

De fleste kjemikalier hadde en sterk umiddelbar virkning på algene. Etter en tids eksponering avtok imidlertid giftvirkningen. Selv ved konsentrasjoner som drepte en stor del av algene i løpet av ett døgn, begynte de celler som overlevde, etter hvert å vokse med normal hastighet. Et eksempel på dette er vist i figuren nedenfor, vekstkurver for kulturer tilsatt 0,1 og 0,3 mg/l av kjemikaliet.



Dose/respons-diagrammet er vist på følgende figur:



Som det fremgår av figuren, har dette kjemikalium en algetoksisitet (Selenastrum capricornutum),  $EC_{50} = 0,035$  mg/l.

#### REFERANSER

Källqvist, T., 1973: Algal assay procedure (bottle test) at the Norwegian Institute for Water Research. In: Algal assays in water pollution research. Proc. Nord. Symp. Oslo, Oct. 1972. NORDFORSK Publ. 1973:2, 5-17.

Staub, R., 1961: Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge Oscillatoria rubescens D.C. Schweiz. Z. Hydrol. 23: 82-198.