

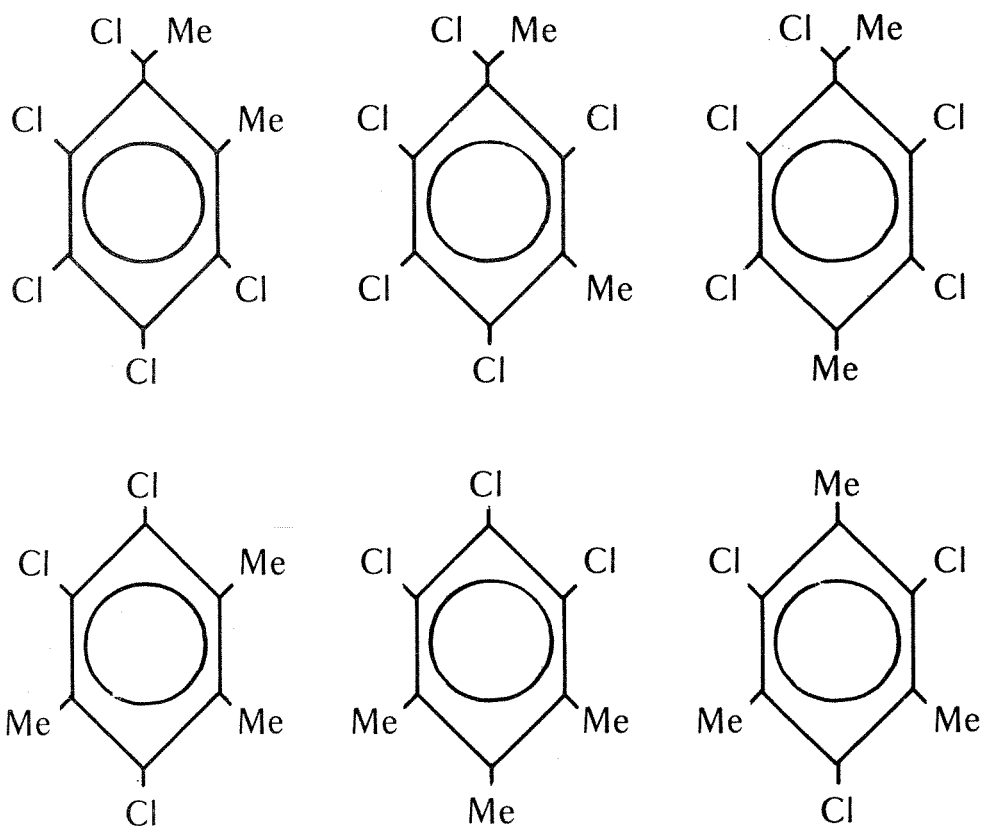
NIVA, O-84035

SI, 840308

Økotoksikologisk testing av miljøgifter

Fagrapport 2/87

Klorerte alkylbensener
(Utslippskomponenter til Kristiansandsfjorden)



NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning



NIVA

Hovedkontor
Postboks 333
0314 Oslo 3
Telefon (02) 23 52 80

Sørlandsavdelingen
Grooseveien 36
4890 Grimstad
Telefon (041) 43 033

Østlandsavdelingen
Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (065) 76 752

Vestlandsavdelingen
Breiviken 2
5035 Bergen - Sandviken
Telefon (05) 25 97 00

Prosjektnr.: O-84035
Undernummer:
Løpenummer: 2047
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel: Økotoksikologisk testing av miljøgifter.- Klorerte alkylbensener. (Utslippskomponenter til Kristiansandsfjorden)	Dato: 28.09.87
Forfatter (e): Torsten Källqvist Kari Martinsen (SI)	Prosjektnummer: O-84035
	Faggruppe: Analyse
	Geografisk område: Vest-Agder
	Antall sider (inkl. bilag): 74

Oppdragsgiver: Norges Teknisk Naturvitenskapelige Forskningsråd Statens Forurensningstilsyn	Oppdragsg. ref. (evt. NTNf-nr.): NTNF nr. 50 11594
---	--

Ekstrakt:

Klorerte alkylbensener, ekstrahert fra et slamdeponi ved Falconbridge nikkilverk i Kristiansand er blitt karakterisert ved kjemiske og biologiske analyser og tester. Ekstraktet inneholdt mer enn 40 forskjellige KAB-forbindelser. Blandningen har sterk toksisk virkning, særlig på alger. Stoffene kan brytes ned av adapterte bakterier, men nedbrytningen er ubetydelig under naturlige betingelser. Stoffene har høy lipofilitet og akkumuleres i biologisk materiale. Testing av fraksjoner av ekstraktet og enkeltforbindelser har vist at de høyklorerte forbindelsene er mest toksiske.

4 emneord, norske:

1. Miljøgifter
2. Kjemisk karakterisering
3. Biotester
4. Økotoksikologi

4 emneord, engelske:

1. Micropollutants
2. Chemical characterization
3. Biological tests
4. Ecotoxicology

Prosjektleder:

Torsten Källqvist

For administrasjonen:

R. F. Wright

ISBN - 82-577-1303-1

RAPPORT nr : 84 03 08 - 2

Denne rapport : Åpen
Denne side : Åpen

**ØKOTOKSIKOLOGISK TESTING AV MILJØGIFTER.
FAGRAPPORT 2/87: KLORETE ALKYLSENSNER (UTSLIPPSKOMPO-
NENTER TIL KRISTIANSANDSFJORDEN)**

av Torsten Källqvist (NIVA) og Kari Martinsen (SI)

PROSJEKT : Økotoksikologisk testing av
miljøgifter

OPPDRAGSGIVER : NTNf, Utvalg for miljøgifter
(tlf)

OPPDRAGSGIVERS REF : NTNf nr. 50 11594
Nina Gjøs

Avdeling : Analyse og miljøkjemi

SIs prosjektleder : Kari Martinsen
SIs prosjektansvarlige: Georg E. Carlberg

Godkjent den :

(sign)

ISBN :

4 emneord: Norsk	Engelsk
Klorerte alkylbensener	Chlorinated alkylbenzens
Kristiansandsfjorden	Kristiansandsfjord
Toksisitet	Toxicity
Økotoksikologi	Ecotoxicology

Antall sider:

NIVA 0-84035
SI 840308

ØKOTOKSIKOLOGISK TESTING AV MILJØGIFTER

Fagrapport 2/87:

KLORERTE ALKYLBESENER

(Utslippskomponenter til Kristiansandsfjorden)

FORFATTERE:

Torsten Källqvist, NIVA
Kari Martinsen, SI

Medarbeidere:

Åse Bakketun, NIVA
Georg Carlberg, SI
Magne Grande, NIVA
Harry Efraimsen, NIVA
Inger Hagen, SI
Henry Hovde, UiO
Svein Johansen, SI
Lars Kirkerud, NIVA
Vesla Landmark, SI

INNHOLDSFORTEGNELSE

	Side
FORORD	4
SAMMENDRAG	4
1. INNLEDNING	6
2. KJEMISK KARAKTERISERING	8
2.1 Fremstilling	8
2.2 Karakterisering	8
2.3 Karakterisering ved gaskromatografi	9
2.4 Karakterisering av evt. andre forbindelser	15
2.5 Karakterisering ved tynnsjiktmetode	15
2.6 Karakterisering av fraksjoner fra preparative tynnsjikt- kromatografi (TLC) for toksisitetstesting på alger (5.4.2)	16
2.6.1 Fraksjonering med TLC	16
2.6.2 Karaktersiering av fraksjonene	19
2.7 Øvrig karakterisering	20
2.7.1 Vannløslighet	20
2.7.2 Damptrykk	21
3. TILSETNING AV KAB-EKSTRAKT TIL BIOLOGISKE TESTER	22
4. GENTOKSISITET.	23
4.1 Mutagenitet	23
5. TOKSISITETSTESTER	26
5.1 Fisk	26
5.1.1 Akutt toksisitet, laks	26
5.1.2 Reproduksjon, sebrafisk	27
5.2 Rur (<u>Balanus improvisus</u>)	30
5.2.1 Metodikk	30
5.2.2 Resultater	30
5.3 Blåskjell - test av effekt på filtreringsrate	31

5.3.1	Metodikk	21
5.3.2	Eksponering	32
5.3.3	Analyse av akvarievannet	33
5.3.4	Resultater	34
5.4	Alger	36
5.4.1	Test av KAB-ekstrakt ved direkte tilsetning til kulturene	36
5.4.2	Test av fraksjoner av KAB-ekstraktet	37
5.4.3	Test av syntetiserte KAB-isomerer	39
5.5	Sammenfatning av toksisitetstester med KAB-ekstrakt . .	40
6.	KONTAMINERT SEDIMENT FRA KRISTIANSANDSFJORDEN - AKKUMULERING BLÅSKJELL	46
6.1	Metode	46
6.2	Resultat	47
6.3	Foreløpig konklusjon	49
7.	FISK - AKKUMULERING	54
7.1	Metode	54
7.2	Resultater	55
7.3	Massebalanse	55
7.4	Sammenligning med andre forbindelser	59
8.	NEDBRYTNING MED ADAPTERTE BAKTERIER	61
8.1	Metode	61
8.2	Resultater	62
8.2.1	Doseringsteknikker (innledende forsøk)	62
8.2.2	Bakteriell nedbrytning over tid	62
8.3	Konklusjon	67
9.	NEDBRYTNING I KONTAMINERT SEDIMENT	68
9.1	Metode	68
9.2	Resultater	69
9.3	Konklusjon	70
10	REFERENSER	73
	VEDLEGG	76

FORORD

Prosjektutvalget for økotoksikologisk forskning ble etablert i 1983 for å fremme utviklingen av kompetanse og metoder for økotoksikologisk karakterisering av miljøgifter. Utvalgets sammensetning var fra starten Morten Laake, Georg E. Carlberg og Torsten Källqvist.

I perioden 1986-1987 har utvalget bestått av Torsten Källqvist og Georg E. Carlberg.

Et program for økotoksikologisk testing ble startet i 1984 med finansiering fra NTNFs Miljøgiftutvalg. Virksomheten drives som et samarbeidsprosjekt mellom institusjonene Senter for industriforskning, Norsk Institutt for Vannforskning, Norges Veterinærhøgskole og Universitetet i Oslo.

Innenfor programmet er det utført en økotoksikologisk karakterisering av klorerte alkylbensener, forurensningskomponenter i utslipp til Kristiansandsfjorden. Resultatene av de innledende undersøkelsene av denne stoffgruppen er rapportert i Fagrapport 1/84: "Klorerte alkylbensener". Resultatene av de fortsatte undersøkelsene i 1984-1986 er samlet i Fagrapport 1/85: "Klorerte alkylbensener". Den foreliggende rapporten omfatter en revidert versjon av Fagrapport 1/85 og i tillegg inneholder rapporten resultatene frem til avslutning sommeren 1987.

Vurdering av de fremkomne data er sammenfattet i egen rapport: "OECD's Chemical Testing Programme anvendt på klorerte alkylbensener", SI-rapport 840308-4, 1987.

SAMMENDRAG

Fra et slam fra Falconbridge Nikkelverk er det fremstilt et ekstrakt som består av en blanding av kloralkylbensen-forbindelser (KAB). Ekstraktkromatogrammet er identisk med kromatogrammet av blåskjell tatt i Kristiansandsfjorden rett utenfor fabrikken.

Ekstraktet inneholder mutagene forbindelser og de mutagene komponentene er påvist i den fraksjonen som inneholder de mest høyklorerte komponentene.

Undersøkelser av toksisitet er utført med heterotrofe mikroorganismer, alger, evertebrater og fisk. For lakseyngel ble konsentrasjonen for 50 % dødelighet etter 4 døgn funnet å være 600 µg/l. Den laveste effektkonsentrasjonen for overlevingstid for yngel av sebrafisk var 310 µg/l. De høyeste følsomheten blant testene ble påvist for sjøvannsalgen

Skeletonema (kiselalge) og naturlig fytoplankton (ferskvann), med EC_{50} -verdier på 25 og 48 $\mu\text{g/l}$. De heterotrofe mikroorganismene var minst følsomme med LC_{50} -verdier fra 5.3 - 90 mg/l .

Det ble videre påvist at 50-110 $\mu\text{g/l}$ KAB ga 80-90 % hemming av blåskjells filtreringsrate i en 4-døgnstest.

Det er syntetisert seks enkeltforbindelser av klorerte alkylbensener Disse er testet for toksisitet og mutagenitet. Foreløpig er hverken de mest toksiske eller mutagene forbindelser identifisert.

I bioakkumuleringsforsøk med lakseyngel i konsentrasjoner på 23 $\mu\text{g/l}$ KAB ble det i løpet av ca 13 dager oppnådd likevekt med en gjennomsnittlig konsentrasjon i fisken på 51 $\mu\text{g/g}$ på våtvektsbasis. Dette gir en bioakkumuleringsfaktor på ca 2.2×10^3 som er sammenlignbart med det vi tidligere har funnet for 2,4',5-triklorbifenyl (4.6×10^3).

I et eksperiment er utlekkingen av KAB og andre klorerte miljøgifter som heksaklorbensen fra kontaminert sediment fra Kristiansandfjorden og opptak av disse forbindelsene i blåskjell studert. Resultatene har vist at de persistente klorerte miljøgiftene lekker ut fra sedimentene til vannet og kan påvises i blåskjell over sedimentene. Dette viser at allerede sedimenterte miljøgifter kan være en av hovedkildene til disse forbindelsene i biologisk materiale i fjorden.

Det er påvist at mikroorganismer som er adaptert til KAB er i stand til å bryte ned disse forbindelsene. Mens laboratorieforsøk med kontaminert sediment samlet fra indre fjordbasseng har vist at det under naturlige forhold nær sagt ikke foregår noen nedbryting av KAB.

1 INNLEDNING

Stoffgruppen klorerte alkylbensener (KAB) er påvist som hovedkomponenter i utslippsvann og slamdeponier ved Falconbridge Nikkelverk i Kristiansand. Et acetonekstrakt av slam fra et deponi er testet med en rekke kjemiske/biologiske, økotoksikologiske metoder.

I fagrapport 1/84 "Klorerte alkylbensener" er prosjektets mål og innhold samt arbeidet utført i 1983/84 beskrevet. I den foreliggende rapporten behandles resultater fremkommet fra september 1984 og frem til sommeren 1987.

I den foreliggende fagrapport er karakteriseringsarbeidet av acetonekstraktet supplert og oppdatert. Hele tørrstoffmengden 8.0 g i acetonekstraktet (11) er ulike forbindelser av klor/bromalkylbensener.

- En rekke enkeltforbindelser av KAB er syntetisert.
- Fraksjoner av KAB, fremstilt med tynnsjikkromatografi og enkeltforbindelser samt hele KAB-ekstraktet, er testet for mutagenitet med Ames test.
- Toksisitet er testet med KAB-ekstraktet overfor lakseyngel.
- Reproduksjon av sebrafisk er testet med KAB-ekstraktet.
- Toksisitet overfor div. alger, mikroorganismer, evertebrater, rur og fisk er testet med KAB-ekstraktet.
- Toksisitet overfor algen Skeletonema costatum er testet både med hele KAB-ekstraktet, enkeltforbindelser av KAB samt med fraksjoner av ekstraktet fremstilt med tynnsjikkromatografi.
- Med sediment fra Kristiansandsfjorden, kontaminert med KAB og andre klorerte miljøgifter, er det foretatt akkumuleringsforsøk med blåskjell.
- I akvarieforsøk (semi-statisk test) er det gjort akkumuleringsforsøk av KAB til lakseyngel.
- Det er undersøkt om KAB påvirker blåskjells filtreringsrate.
- Med adapterte bakterier er det gjort forsøk for å undersøke om KAB-komponentene kan brytes ned bakterielt.

- Det er videre undersøkt om KAB-komponentene brytes ned i naturlig, kontaminert sediment.

Den foreliggende rapporten må anses som en sluttrapport. Prosjektutvalget har likevel ønske om å fortsette testing av KAB-komponentene. Det er mulig professor Kolsaker ved Universitetet i Oslo, som hittil har syntetisert 6 enkeltforbindelser, vil kunne syntetisere flere enkeltforbindelser. Dette for om mulig å finne frem til de komponentene som er hovedansvarlig for mutagenitet og toksisitet. Videre ønsker utvalget å utføre flere økotoksikologiske tester som:

- Test for bioakkumulering i regnbueørret.
- Teste toksisitet og mutagenitet for flere enkeltforbindelser.
- Evt. utvide programmet med flere gentoksiske tester.

Forøvrig henvises til Fagrapport 1/84: "Klorerte alkylbensener".

2 KJEMISK KARAKTERISERING

2.1 Fremstilling

En prøve på 2 kg av "blyulfatslam" fra Falconbridge Nikkelverk, april 1984, ble ekstrahert med n-heksan/metanol (1:1). n-heksan-fasen ble separert ved tilsetning av vann, og uorganisk klorid ble fjernet ved flere gangers vasking med vann. Alle ikke-persistente forbindelser ble nedbrutt ved hjelp av konsentrert svovelsyre. Før konsentrering av ekstraktet ved ca 80 °C ble det for å forhindre avdampning av de mest flyktige forbindelsene tilsatt 250 µl dodekan. Inndampningsresten ble overført til 1 L aceton og fordelt i kodede glassampuler à 5, 10 og 50 ml. Ampullene oppbevares i kjøleskap, + 4 °C.

2.2 Karakterisering

Tørrstoff er bestemt ved veiing av en aliquot av ekstraktet. Ekstraherbart persistent organisk klor og brom (EPOCl og EPOBr) ble analysert ved nøytronaktivering (Martinsen et al. (in prep.)). De analyser som hittil er utført viser at 1 liter aceton-ekstrakt inneholder:

	gram	%-tørrstoff
Tørrstoff	8.0	100
EPOCl	4.9	61
EPOBr	0.1	1

Videre er en elementsammensetningsanalyse av tørrstoffet i ekstraktet utført ved Ilse Beetz Miroanalytisches Laboratorium i Tyskland.

Resultat:	50.54 % (EPOCl + EPOBr) organisk bundet Cl + Br
	43.00 % C
	3.60 % H
	1.74 % O

Summen av klor og brom er bestemt i tørrstoffet etter avdampning av aceton over P_2O_5 . Til sammenligning ble det funnet noe høyere konsentrasjoner av klor og brom i ekstraktet ved nøytronaktivering. Dette kan skyldes at de mest lettflyktige forbindelsene muligens gikk tapt ved avdampningen av aceton.

2.3 Karakterisering ved gasskromatografi

Ekstraktet ble karakterisert gasskromatografisk med halogenfølsom detektor (GC/ECD), og massespektrometrisk (GC/MS), både med "electron-impact" (EI) og negativ ionisering (NICI).

Det er påvist at hele tørrstoffmengden i ekstraktet lar seg kromatografere og separere ved de kromatografiske betingelsene. Denne mengden består av en rekke forbindelser av kloralkylbensener, med (2-6)klor og (2-4)C i alkylgruppene ($\text{Cl}_{2-6}-\text{C}_{2-4}$ -alkylbensener) samt noen bromerte alkylbensener. Hovedtyngden av KAB er $\text{Cl}_{3-5}-\text{C}_3$ -alkylbensener. I tillegg er det påvist Cl_2-Br_1 -alkylbensener.

Med GC-MS-analyse er ca. 40 enkelt forbindelser av klor(brom)-alkylbensener identifisert. Den prosentvise fordelingen av enkeltkomponentene er bestemt. Professor Per Kolsaker ved Universitetet i Oslo har syntetisert 6 ulike forbindelser, 3 trikloralkylbensener og 3 pentaklorbensener. Trikloralkylbensenerne, angitt som 4,5, og 10 i fig.1, er blant hovedkomponentene i ekstraktet. En av pentaklorbensenisomerene er dekket av topp 31 i fig.1. De to andre syntetiserte pentaklorisomerene er påvist i svært små mengder i ekstraktet v.h.a. GC-MS-analyse.

Vi håper ved en senere anledning å få syntetisert flere enkeltforbindelser for å bestemme hvordan komponentene som inngår i ekstraktet er bygget opp, foreta en sikrere kvantifisering og utføre tester med flere enkeltkomponenter. Beregnet kromatograferbart stoff i ekstraktet er basert på sammenligning med 3 renfremstilte kloralkylbensener hvor prosentfordelingen av de enkelte i blandingen er kjent. Denne beregningen ga et noe høyere innhold enn den beregnede tørrstoffmengden i ekstraktet. Dette viser at prosentfordelingen for hver forbindelse er angitt litt for høyt. Prosentfordelingen av identifiserte forbindelser med GC-MS-analyse i en kompleks blanding vil alltid bli noe for høy fordi forbindelser, som finnes i svært lave konsentrasjoner, ikke innkluderes i beregningen. Konklusjonen på disse undersøkelsene er at tilnærmet hele tørrstoffmengden 8 mg pr. ml består av klor(brom)-alkylbensener.

Kromatogrammet fra GC/ECD-analysen viser et sammensatt mønster av alle enkeltforbindelsene, Fig. 1. På totalionestrømskromatogrammet, GC/MS-(NICI) er klor- og brom-forbindelsene angitt, Fig. 2. Tilsvarende totalionestrømskromatogram av blåskjellektrakt (fra Silokai, Kristiansandsfjorden vår 1984) gir identisk mønster, Fig. 3. En nærmere identifisering av de enkelte KAB-forbindelsene er gjort med GC/MS-analyse og sammenligning med de syntetiserte KAB-forbindelsene, kfr. tabell 1. De identifiserte forbindelsene er avmerket på Fig. 1.

I Fig. 4 er fordelingen av forbindelsene samt de syntetiserte KAB-forbindelsene som er funnet i ekstraktet gjengitt.

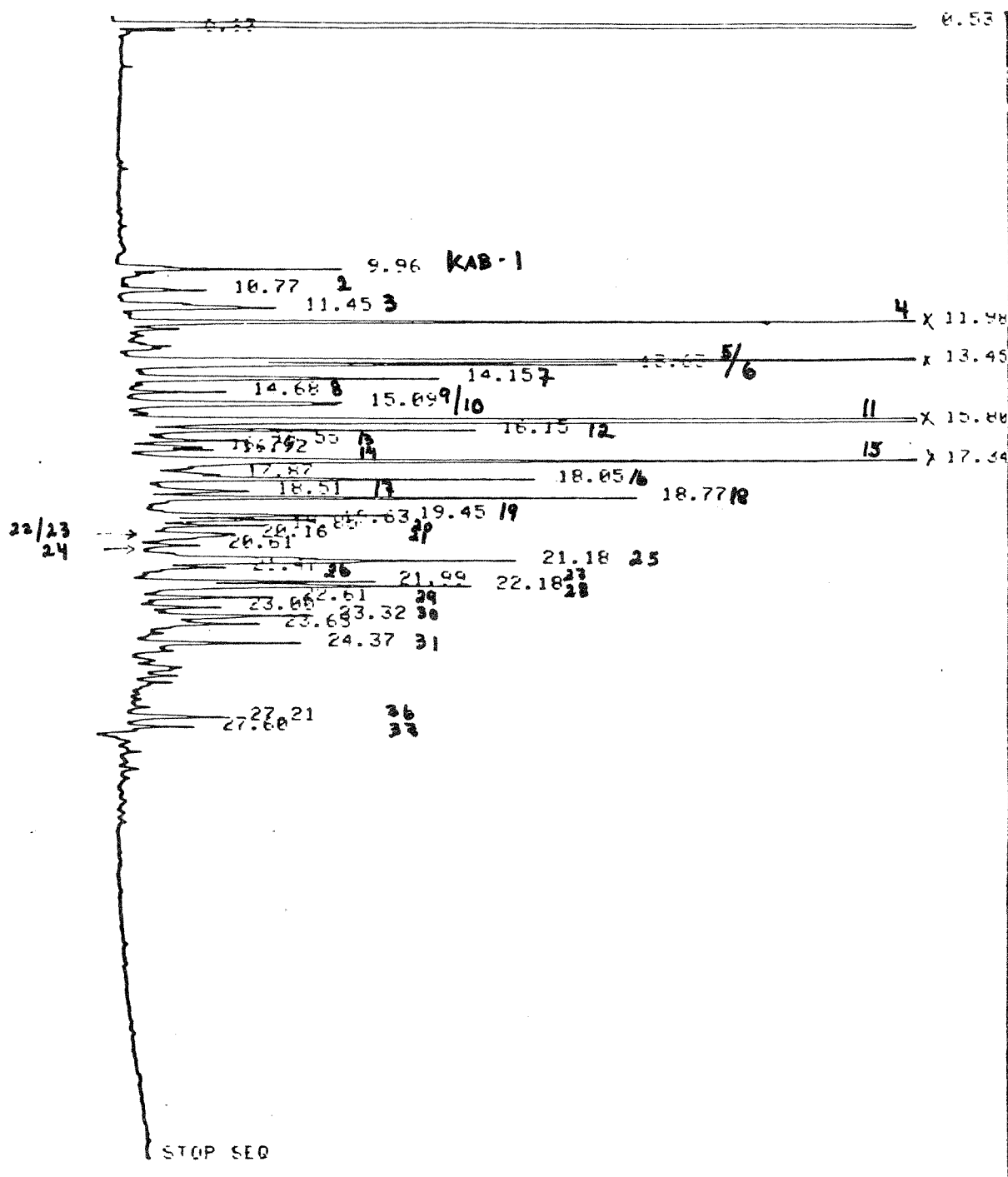


Fig. 1 Gasskromatogram fra slamekstrakt, klor(brom)-alkylbensener (KAB). Enkelt-forbindelsene avmerket, konf. tabell 1.

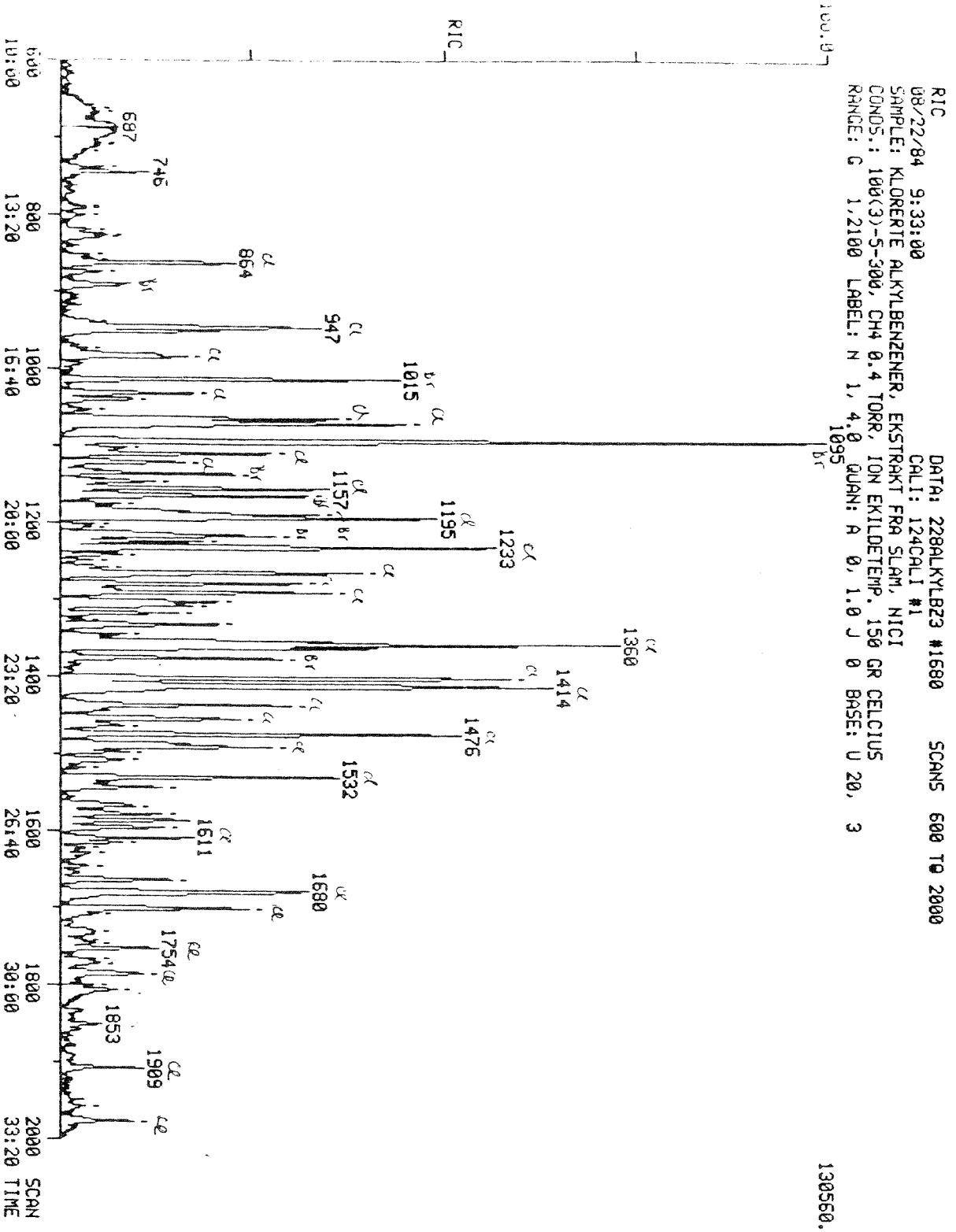


Fig. 2 Gasskromatogram (GC/MS), negative ioner.

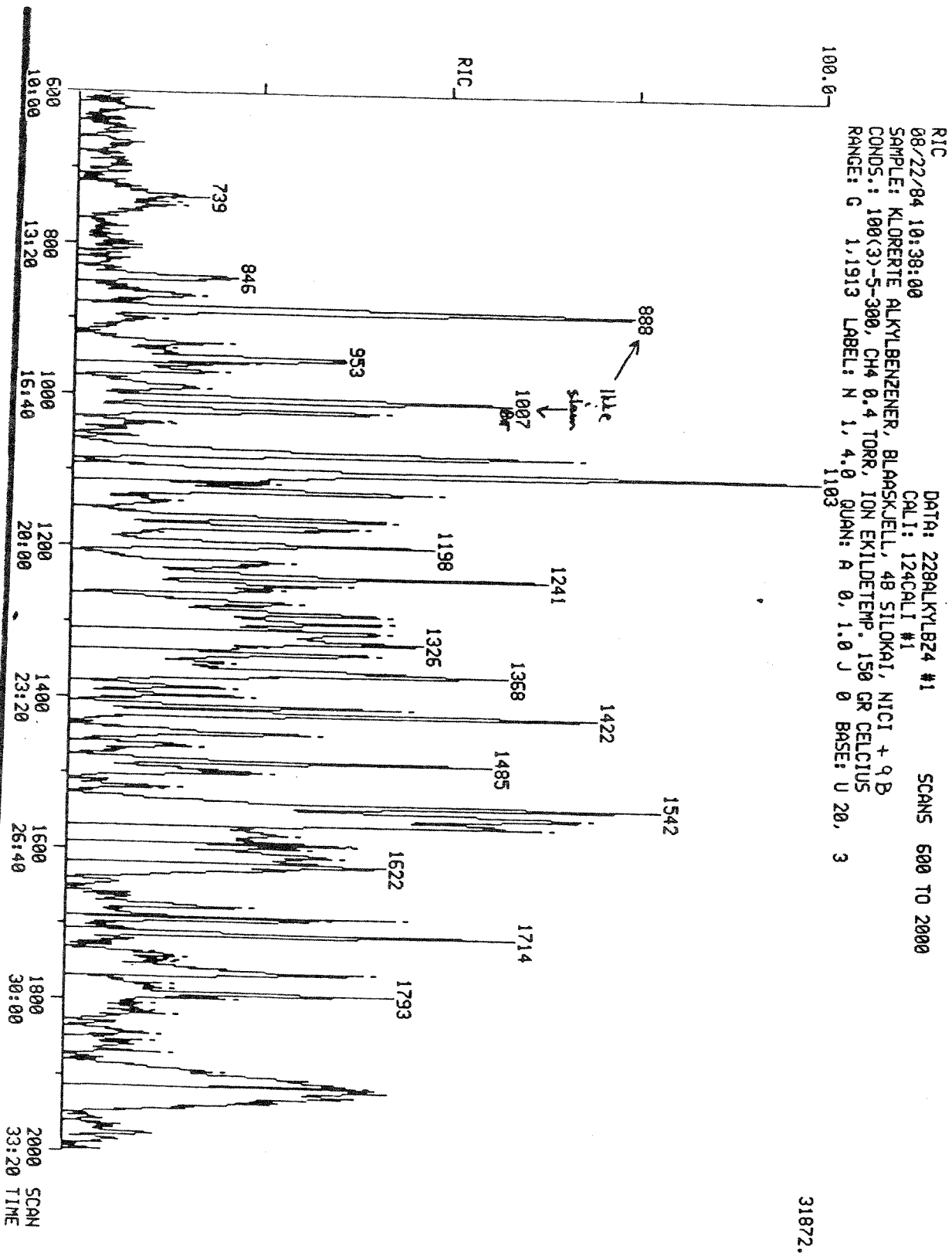


Fig. 3 Gasskromatogram (GC/MS) av blåskjell fra Kristiansandsfjorden 1984

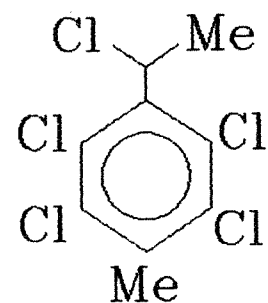
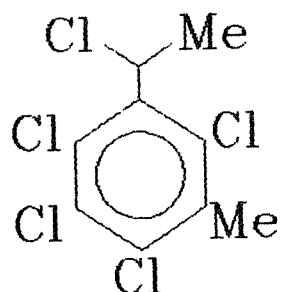
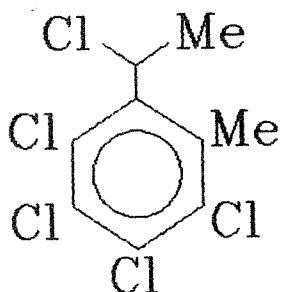
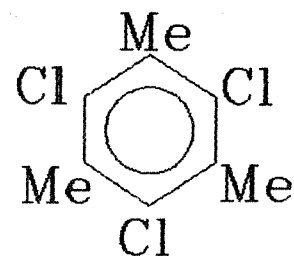
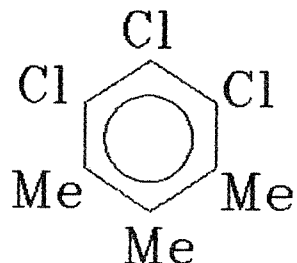
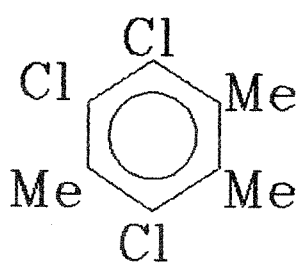
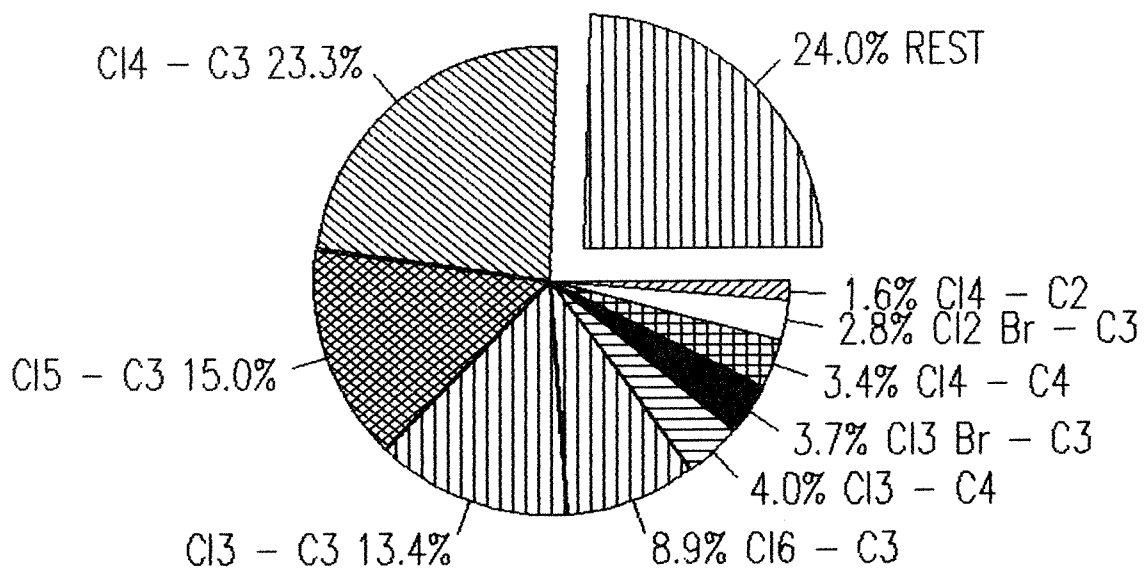


Fig. 4 %-fordeling av komponenter og syntetiserte komponenter funnet i KAB-ekstrakt

TABELL 1

Prosentvis fordeling av klor (brom)-alkylbensener (KAB)
i acetonekstraktet

KAB-nr	Isomer	%-fordeling	
1	C1-C ₃	0.52	
2	"	0.43	
3	"	1.35	
4	"	4.14	
5	"	7.4	
6	C1-C ₃	2.5	
7	C1 ³ -C ⁴	1.53	
8	C1 ⁴ Br ² -C ₃	0.52	
9	C1 ² -C ₃	1.4	
10	C1 ³ -C ⁴	1.3	
11	C1 ³ -C ³	8.6	
12	C1 ⁴ Br ³ -C ₃	2.2	
13	C1 ² -C ₃	0.61	
14	"	0.44	
15	"	3.6	
16	C1 Br-C ₃	3.6	
17	C1 ³ -C ⁴	1.5	
18	C1 ⁴ -C ⁴	3.5	
19	C1 ⁴ -C ³	1.83	
20	C1 ⁴ -C ⁴	1.65	
21	"	1.10	
22	"	1.66	
23	"	0.69	
24	"	1.05	
25	C1-C ₃	2.89	
26	"]
27	"	1.68	
28	"	3.18	
29	"	2.41	
30	"	1.61	
31	"	2.98	
32	C1-C ₃	0.96	
33	"	0.88	
34	"	0.89	
35	"	1.04	
36	C1-C ₃	2.15	
37	"	2.77	(gram)
		<u>76.4</u>	6.1
Andre klorerte/bromerte KAB		23.4	1.9
		<u>100.00</u>	<u>8.0</u>

2.4 Karakterisering av evt. andre forbindelser

Det ble undersøkt om det finnes klorparafiner i ekstraktet. Med en spesiell MS-metode ble det funnet at KAB-ekstraktet inneholder mindre enn 0.2 % klorparafiner av tørrstoffet i ekstraktet.

Ved bruk av gel-partisjonering (GPC) ble ekstraktet fraksjonert i høy- og lavmolekylære fraksjoner. EPOCl ble bestemt i de enkelte fraksjonene. Resultatene viste at bare ca 3 % av de persistente klororganiske forbindelsene har molekylvekt større enn 300-500. Dette viser at tilnærmet alle de persistente klororganiske forbindelsene er kromatograferbare. GPC-metoden er under utvikling og vi ønsker å karakterisere ekstraktet m.h.p. molekylvektsfordeling noe nærmere.

2.5 Karakterisering ved tynnsjiktmetode

Ved hjelp av tynnsjiktskromatografi er forbindelsenes fettløselighet bestemt. Fettløseligheten er uttrykt som fordelingskonstanten n-oktanol/vann. Dette systemet er valgt som mål på lipofilitet i OECDs "Chemical Testing Programme" (OECD 1981). Vi har valgt et alternativ som er basert på såkalt "reversed phase partition" ved hjelp av tynnsjiktskromatografi. Fordelingskonstanten n-oktanol/vann ($\log K_{ow}$) beregnes ut fra måling av R_f av

de ukjente forbindelser og av standard forbindelser med kjente fordelingskonstanter. (Martinsen et al. in prep.). $\log K_{ow}$ for KAB-komponentene ligger i området 5-8.

Et volum på 10 μ l acetonekstrakt ble satt på tynnsjiktplaten som en stripe. Som antydning i Fig. 5, ble 5 fraksjoner utskrapt, samlet i sentrifugeglass og eluert to ganger med sykloheksan. Fraksjons-eluatene ble analysert med GC/ECD.

Forsøkene med fraksjonering av acetonekstraktet av slamprøven har fortsatt. Det er forsøkt to-veis fraksjonering og Ames test direkte på platen (TLC/AMES). På en parallell plate ble fraksjoner utskrapt og det ble tatt GC-analyse på ekstraktene av fraksjonene.

Også ved en-veis utvikling er det tatt både Ames test og GC-analyse av fraksjonene.

I systemene med både to-veis og en-veis utvikling var det antydning til mutagene komponenter i den fraksjonen hvor det var mest av de høyest klorerte komponenter ved GC-analyse. Om det er disse forbindelser eller andre med nærliggende polaritet som er mutagene er ikke påvist.

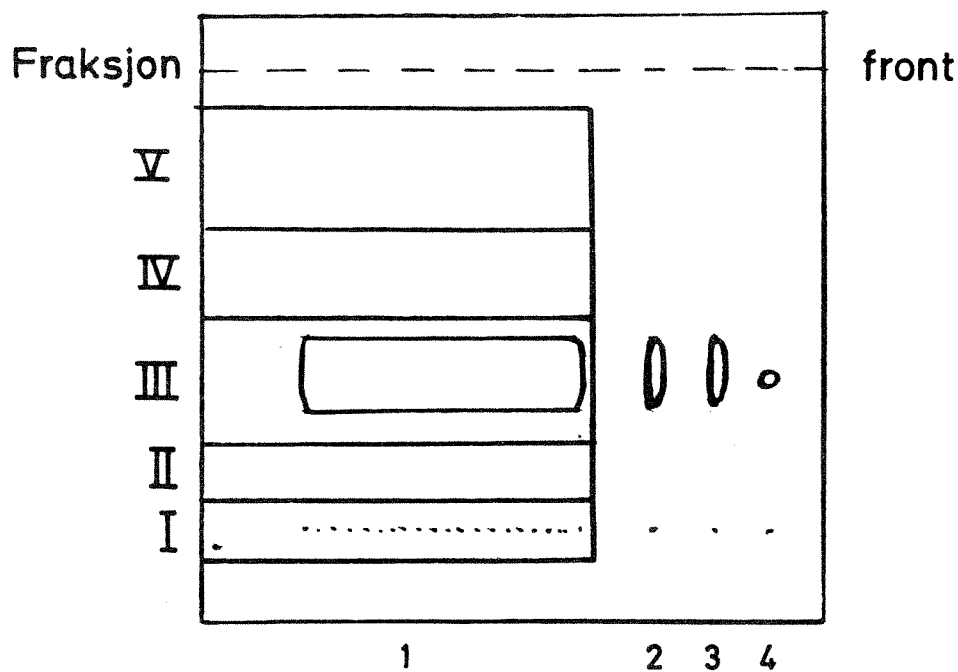
Fig. 6 viser to-veis utvikling og Fig. 7 viser en-veis utvikling av KAB.

2.6 Karakterisering av fraksjoner fra preparativ tynnsjikkromatografi (TLC) for toksisitetstesting på alger (5.4.2)

2.6.1 Fraksjonering med TLC

Fem fraksjoner av KAB-ekstraktet ble isolert ved TLC.

Et volum på 3.0 ml KAB-ekstrakt (totalt 24.0 mg KAB) ble ansatt på ialt 6 plater. Platene var 10 x 20 cm HPTLC-plater RP-18 F₂₅₄ med konsentreringszone (Merck). Utvikler var aceton/vann (80:20). Etter utvikling, ble fem fraksjoner utskrapet og ekstrahert med pentan og aceton. En liten del av fraksjonene ble karakterisert v.h.a. gasskromatografi (GC) og resten av prøvene i acetonløsning ble brukt for tilsetning ved algetester. (5.4.2).



Ansatt 1 Slamekstrakt 10 μ l

2 — " — 1 "

3 — " — 1 "

4 — " — 2 μ l DDT

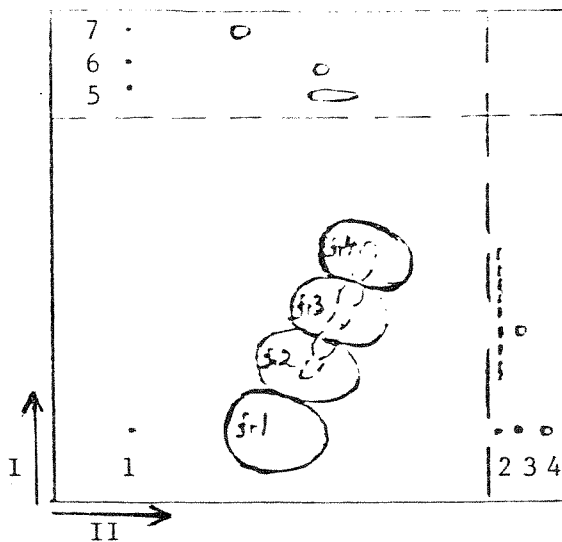
Sjikt 10 cm x 10 cm HPTLC plate RP 8F 254

Utvikler Aceton/vann(16:4)

Framkalling UV_{254m μ}

Fig. 5 Tynnsjikt-kromatogram av slamekstrakt

Fig. 6 To-veis TLC av KAB-ekstrakt



TLC/AMES-test er tatt på en parallell plate. Det ble funnet antydning til mutagene forbindelser i fraksjon 2.

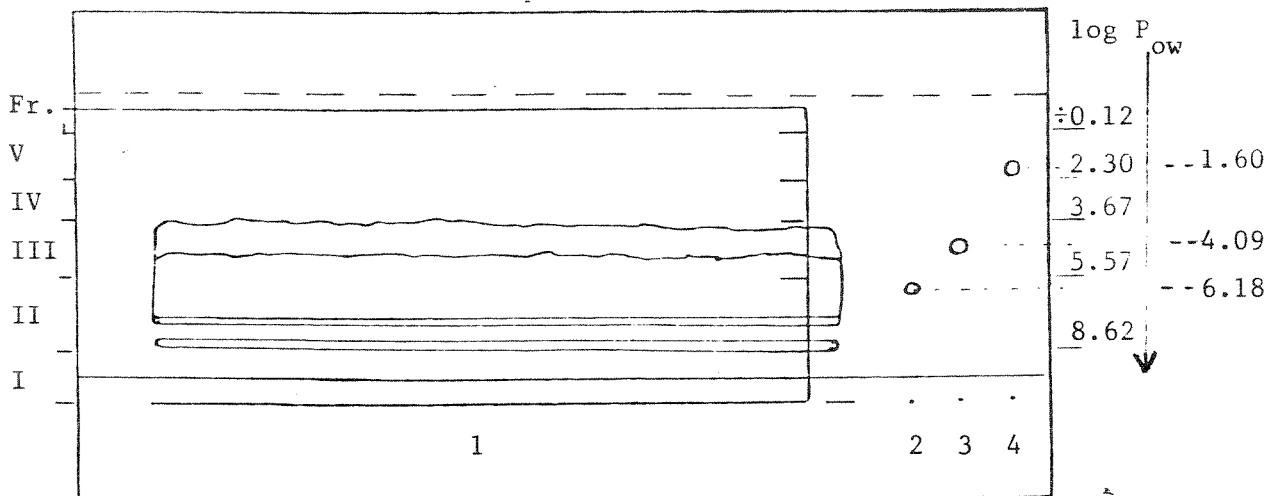
Ansatt: 1 og 2: slamekstrakt, 3: DDT, 4: Uvitex
5: " 6: DDT, 7: "

Utvikler: I Cykloheksan, II Cykloheksan/acetone (9:1)

Sjikt: 10 x 10 cm HPTLC Silica F₂₅₄ (Merck)

Framkalling: UV₂₅₄ mμ

Fig. 7 En-veis TLC av KAB-ekstrakt



Ansatt: 1: Slamekstrakt 0.5 ml, 2: DDT, 3: Bifenyl, 4: Dimetylftalat

Utvikler: Aceton/vann (80:20)

Sjikt: 10 x 20 cm HPTLC-plate RP-18 F₂₅₄ med konsentreringsone (Merck)

Framkalling: UV₂₅₄ mμ

Ames test ga utslag på mutagene komponenter i fraksjon 3 som inneholder de mest høyklorerte alkylbenzener.

KAB i TLC-fraksjoner

	(μg)
Fr. 1	~ 2.8
Fr. 2	~19.
Fr. 3	~ 1.8
Fr. 4	~ 0.1
Fr. 5	~ 0.05

Fordeling av enkelt-forbindelser:

	KAB-31 (Cl ₅ -C ₃) μg^3	KAB-36 (Cl ₆ -C ₃) μg^3	KAB-37 (Cl ₇ -C ₃) μg^3
Fr. 1	-	-	-
Fr. 2	78	300	48
Fr. 3	306	35	280
Fr. 4	5	5	5
Fr. 5	1	0.5	0.7

Ved tidligere forsøk har fr. 3 vist seg å være mutagen. Derfor valgte vi å beregne fordelingen for noen av forbindelsene KAB-31 og -37. Disse utgjør hovedtyngden av de påviste forbindelsene i denne fraksjonen. Forøvrig er syntese av enkeltforbindelser igang. Lykkes det å fremstille mutagene/evt toksiske enkeltforbindelser vil fordelingen av disse i de enkelte fraksjonene bli beregnet.

I Fig. 8 er TLC-platen med de fem fraksjonene angitt.

Hovedmengden av forbindelsene fremkom i UV-lys i fraksjon III. Log K_{ow} for KAB-komponentene ligger i området 5-8. Til sammenligning er tilsvarende verdi for DDT funnet å være 6.18. GC-analyser viste at fraksjon III inneholdt 95 % av KAB-forbindelsene, fraksjon IV 3 %, og fraksjon V 0.4 %.

2.7 Øvrig karakterisering

For å kunne vurdere hvordan komponenter fordeler seg i miljøet benyttes div. spredningsmodeller. Inputdata til modellene er bl.a. stoffenes fordelingskonstant, oktanol/vann (K_{ow}) og komponentenes vannløslighet og damptrykk. Log K_{ow} for KAB-komponentene, gitt i det foregående avsnittet, ligger i området 5-8.

2.7.1 Vannløselighet

Vannløseligheten for KAB-komponentene er bestemt ved å benytte formelen 2-3: $\log S = - 0.922 \log K_{ow} + 4.184$. (Kenaga and Goring, 1980)

Vannløseligheten for KAB-komponentene ligger i områder (1-360) $\mu\text{g/l}$.

2.7.2 Damptrykk

Bestemmelse av damptrykk for en rekke enkeltforbindelser av KAB er basert på gaskromatografiske målinger (GC). Retensjonstid (volum) RT (RV) er omvendt proporsjonal med damptrykket (P)

$$P = \frac{k}{Rv}$$

LogP til KAB-komponentene er bestemt ved å sammenligne med en kalibreringskurve som består av 13 PCB-isomerer med kjente damptrykk (P) hvor $\log P \cdot 100$ er gitt som funksjon av retensjonstiden. GC-kjøringene justeres ved tilsetning av 2 indre standarder 2,5,2',6'-PCB og 2,3,4,5,2',3',4'-PCB. Kalibreringskurven er tilpasset lineær regresjon ved minste kvadraters metode. (Kirkegaard et al. in prep.).

Tabell 2.

Damptrykk (P, pascal) for enkeltforbindelser i KAB-ekstraktet

KAB-nr	-log P	P (pascal)
1	-0.44	2.75
2	-0.30	2.00
3	-0.18	1.51
4	-0.04	1.10
5	0.20	0.60
6	0.26	0.55
7	0.32	0.48
8	0.44	0.36
9	0.48	0.33
10		
11	0.62	0.24
12	0.66	0.22
13	0.72	0.19
14	0.82	0.15
15	0.88	0.13
16	0.96	0.11

17	1.02	0.10
18	1.08	0.08
19	1.20	0.06
20	1.28	0.05
21	1.34	0.05
22	i.b.	
23	i.b.	
25	1.52	0.03
26	1.58	0.03
27	1.64	0.02
28	1.68	0.02
29	1.74	0.02
30	1.86	0.01
31	1.98	0.01
36	2.50	0.003
37	2.54	0.003

i.b. = ikke bestemt

3 TILSETNING AV KAB-EKSTRAKT TIL BIOLOGISKE TESTER

Fordi KAB-ekstraktet inneholder fettløselige forbindelser, kan det oppstå metodiske problemer ved tilsetning av forbindelsene til testløsningene i de ulike biologiske testene.

Når testløsningene til de biologiske testene tillages, er det den mest vannløselige delen av teststoffet som forblir i vannet og resten adsorberes til veggene i tilberedningskarene og testkarene. En orienterende undersøkelse av dette problem ble foretatt med testkar fra alle de hittil utførte tester. Resultatene er gitt i vedlegg, bare et resultat tas med her: For den undersøkte testløsningen fra test 3.1, Fagrapport 1/84 "Klorerte alkylbensener", inhibering av oksygenopptak, var de fem hovedkomponentene i vannet, kfr. Fig. 1.

Topp nr.

- 4 Triklor-C₃-alkylbensen
- 5/6 Triklor-C₃-alkylbensen/Tetraklor-C₃-alkylbensen
- 11 Tetraklor-C₂-alkylbensen
- 15 Tetraklor-C₃-alkylbensen

De mere fettløselige forbindelsene fantes i forholdsvis mindre mengder sammenlignet med KAB-ekstraktet.

4 GENTOKSISITET

4.1 Mutagenitet

Alle de tre syntetiserte pentaklorisomererne av klorerte alkylbensener og tre forskjellige syntetiserte triklortrimetyl isomerer er testet for mutagen aktivitet i Salmonella/mikrosomtesten (Ames' test). Salmonella/mikrosomtesten er en genotoksisk screening-test. Modifiserte bakteriestammer av Salmonella typhimurium brukes som testorganisme. Villstammer av Salmonella typhimurium kan vokse uten histidin i vekstmediet, mens de modifiserte stammene trenger histidin. Etter eksponering for mutagener vil de modifiserte stammene mutere tilbake (revertere) til histidinuavhengighet, og antall revertantkolonier blir således et mål for stoffets mutagene potensiale. En del forbindelser er mutagene først etter omvandling i kroppen. For å simulere denne prosessen, tilsettes et leverenzymhomogenat (S9). Testen utføres også med stammer av S. typhimurium som har forskjellig følsomhet overfor ulike typer av mutagener.

I denne undersøkelsen er prøvene testet med bakteriestammene TA98 og TA100 med og uten metabolsk aktivering (S9). I tillegg er en av pentaklorisomerene testet i bakteriestammen TA104. Prøvene er testet i 3 doser med 2 paralleller, og forsøket er repetert én gang. Resultatene er vist i tabell 2 og 3.

Et vanlig krav til positivt resultat i testen er en fordobling av antall mutanter (revertanter) på skålen i forhold til bakgrunn, eller en tydelig lineær doseavhengighet.

Ingen av de testede klorerte alkylbensener forbindelsene viste mutagen aktivitet under disse betingelser.

Aceton-ekstraktet av klorerte alkylbensener (KAB) er tidligere testet for mutagen aktivitet i Salmonella/mikrosomtesten, fagrapport 1/84 "Klorerte alkylbensener". Prøven viste da tydelig mutagen aktivitet, og høyest i TA100 med leverenzymaktivering. Verdiene er gitt i tabell 4.

TABELL 2

Testing av en pentaklorisomer av klorerte alkylbensener for mutagen aktivitet i Salmonella/mikrosomttesten (Ames' test)

	TA98				TA100				TA104	
	+ S9		- S9		+ S9		- S9		+ S9	- S9
	Forsøk		Forsøk		Forsøk		Forsøk		Forsøk 1	Forsøk 2
	1	2	1	2	1	2	1	2		
50 µg	0	3	3		44		37		0	0
100 µg	0	0	0	1	22	10	33	3	0	0
250µg	0	0	2	4	38	18	58	11	0	106
500 µg		0		1		2		0		
Spontan- muta- sjoner	37	37	31	35	133	160	126	169	888	660
BaP	237	333			853	101			1314	
1NP			364	210			852	532		
Metyl- glyoxal										383

I TA104 -S9 i tabellen synes det som det er en økning i antall revertanter, men dette er ikke mer enn hva spontanmutasjonene varierer. Prøven viser også en økning i TA100 både med og uten aktivering i forsøk 1, men det ble ikke repetert i forsøk 2. Denne økningen kan stadfestes ved ytterligere testing.

TABELL 3

Testing av tre forskjellige triklorisomerer av klorerte alkylbensener for mutagen aktivitet i Salmonella/mikrosomtesten (Ames' test)

	Dose µg	TA98				TA100			
		+S9		-S9		+S9		-S9	
		For søk 1	For søk 2	For søk 1	For søk 2	For søk 1	For søk 2	For søk 1	For søk 2
1,2,3-triklor- 4,5,6-trimetyl- bensen	50 100 250	0 21 0	0 4 0	11 0 0	0 0 20	0 0 0	20 27 11	0 0 0	0 25 2
1,3,5-triklor- 2,4,6-trimetyl- bensen	40 80 200	6 26 0	0 24 0	27 7 31	0 0 0	0 0 0	29 13 0	0 0 0	0 0 0
1,2,5-triklor- 3,4,6-trimetyl- bensen	50 100 250	0 0 1	0 0 0	0 42 0	4 5 1	0 8 29	13 43 31	0 0 0	0 0 1
Spontanmutasjoner		52	31	32	22	181	119	212	138
1NP 100 ng				1149	885				
1NP 1 µg								1065	1127
BaP 5 µg		1065	781			2006	1534		

TABELL 4

Testing av aceton ekstraktet av klorerte alkylbensener for mutagen aktivitet i Salmonella/mikrosomtesten (Ames' test)

Bakteriestamme	Antall revertante kolonier pr mg KAB	
	Uten leverenzym - S9	Med leverenzym + S9
<u>S. typhimurium</u> TA98	390	490
<u>S. typhimurium</u> TA100	2320	2780

5 TOKSISITETSTESTER

5.1 Fisk

5.1.1 Akutt toksisitet, laks

Forsøkene ble utført med årsyngel av laks (Salmo salar), middelvekt 1.7 g, som var akklimatisert til testvannet i 8 måneder. Det ble benyttet semi-statisk system, dvs. at løsning ble skiftet hvert døgn i løpet av forsøksperioden som var 7 døgn. Testakvariene var av glass, og det ble benyttet 5 L løsning med 5 fisk i hver testkonsentrasjon. Temperaturen under forsøkene var 9 ± 1 °C. Vannet, som ble brukt ved forsøket, var overflatevann pumpet inn fra en nærliggende innsjø (Maridalsvannet). Vannkvaliteten fremgår av tabell 5.

TABELL 5

Kjemiske data for testvannet (Maridalsvann). Middelerverdier

Parameter		Parameter	
pH	6.3	Ca mg/l	3.7
Konduktivitet mS/m 25 °C	3.2	Mg "	0.41
Farge, mg Pt/l	21	Na "	1.1
KOF (perm. tall) mg O/l	4.0	K "	0.35
Total nitrogen, µg N/l	300	Cd µg/l	0.3
Nitrat, µg N/l	180	Cu "	2.0
Total fosfor, µg P/l	4.5	Zn "	<10
Cl, mg/l	1.3	Pb "	1.0
Hardhet, mg CaCO ₃ /l	11	Al	110

En stamløsning av 8.0 g/l KAB fortynnet i aceton ble dosert til akvariene umiddelbart før fisken ble sluppet i akvariene. Det ble foretatt observasjoner av fisken flere ganger daglig og tidspunkt for eventuell dødelighet notert. Den mediane overlevingstid (median period of survival) i hver testkonsentrasjon er beregnet etter en grafisk metode, og 4d LC₅₀ (den konsentrasjon som dreper 50 % av fiskene i løpet av 4 døgn) er angitt. I sin helhet er metoden en noe modifisert utgave, tilpasset laksefisk, av den standardiserte metode for sebrafisk (Brachydanio rerio) (ISO/DIS 7346/1,2,3 November 1982).

Forsøksresultatene fremgår av Fig. 9, hvor den mediane overlevingstid er plottet inn mot konsentrasjon. Resultatene viser en markert akutt giftighet ned i konsentrasjoner på 575 $\mu\text{g/l}$ KAB. I en konsentrasjon på 1000 $\mu\text{g/l}$ døde samtlige fisker i løpet av 18 timer. I 575 $\mu\text{g/l}$ var 80 % av fiskene døde etter vel 6 døgn. I konsentrasjonen 290 $\mu\text{g/l}$ var det en svak effekt, som ikke resulterte i dødelighet. Fiskene lot til å tilpasse seg og tok etter hvert før. I 145 $\mu\text{g/l}$ ble ingen effekt observert. $4d\text{LC}_{50}$ verdien kan settes til 590 $\mu\text{g/l}$ KAB.

Fiskene i de høyeste konsentrasjonene var i startfasen urolige, fikk ujevn pigmentering (lyse og mørke partier), og ble etter hvert hengende sløve i overflaten og døde etter noen tids rolig sideleie på bunnen.

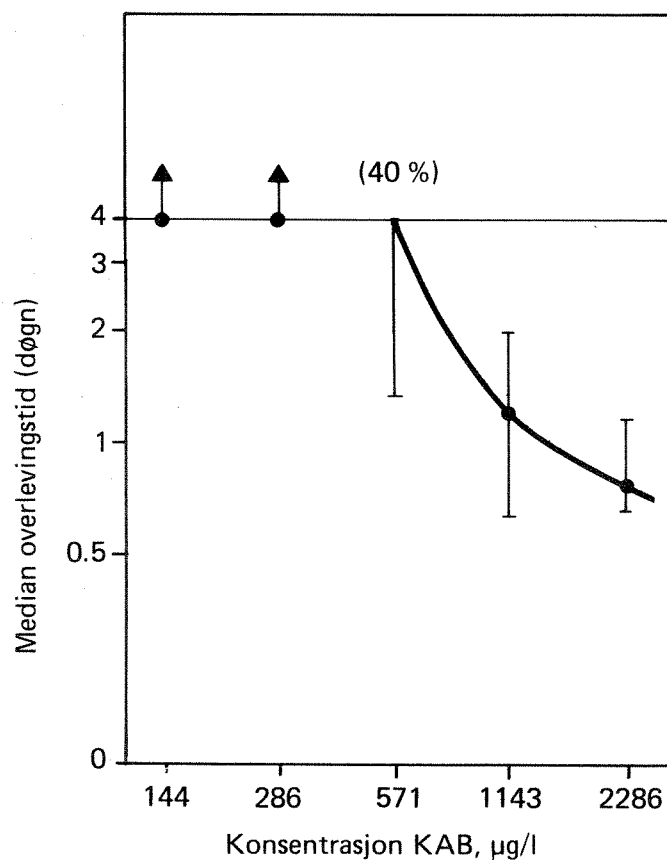


Fig. 9 Overleving av laks (0+) i forskjellige konsentrasjoner av kloralkylbensener. I = Spredning i overlevingstid.

5.1.2 Reproduksjon, sebrafisk

Reproduksjonstesten med sebrafisk ble utført ifølge forslag til Svensk standard, SS 02 81 XX, utgave 1 1983-08-11, (Dave et al. 1987). KAB-ekstrakt inneholdende maksimum 0.1 % aceton ble testet med hensyn til

giftighet ovenfor egg-(embryo) yngel fra sebrafisk i ferskvann. Prinsippet for testen er å sammenligne ulike konsentrasjoner av teststoffet mot en kontroll, for å bestemme klekkingstid av egg og overleving av yngel.

Testen har en varighet på 14-16 døgn. Under inkubasjon foretas det daglige observasjoner inntil minst 90 % av egg eller yngel er døde i samtlige testløsninger. Testløsningene fornyes hver dag (semistatisk metode). Parallelt med ferskvannskontrollene, ble det kjørt kontroller (duplikat) med 0.1 % aceton, for eventuelt å avsløre aceton-effekt.

Resultatene av testen med sebrafisk er vist i Fig. 10 og 11. Fig. 10, viser median klekkesetid for embryo/yngel av sebrafisk, ved de testede konsentrasjonsnivåer av KAB.

Den prikkede linjen markerer median-tid for kontrollene (inkludert acetonkontroller). Median klekkesetid for egg/yngel var 5 til 6 døgn i testkonsentrasjoner opptil 400 µg/l. Ved 1600 µg/l var alle eggene døde etter 4 døgn. Ved 800 µg/l var alle eggene døde etter 7 døgn. Innledningsvis utviklet embryoet seg tilsynelatende normalt, men det klarte ikke å knuse eggshinnen og komme seg ut. Etter hvert som dagene gikk ble det begroing (kontaminering av bakterier og sopp) inne i egget og embryoet døde. Teststoffet syntes å virke inn på eggshinnen, slik at den ble hard (uelastisk).

Fig. 11, viser median overlevingstid for yngel av sebrafisk. Den horisontale prikkede linjen er middel for kontrollene, og den vertikale er minste effektkonsentrasjon, som ble bestemt til 310 µg/l KAB.

Den påviste effekt for konsentrasjonsnivåene ned til 50 µg/l er tillagt liten vekt, da det må tilskrives variasjon i metoden. I henhold til resultatfortolkningen for metoden skal disse verdier ikke tas med.

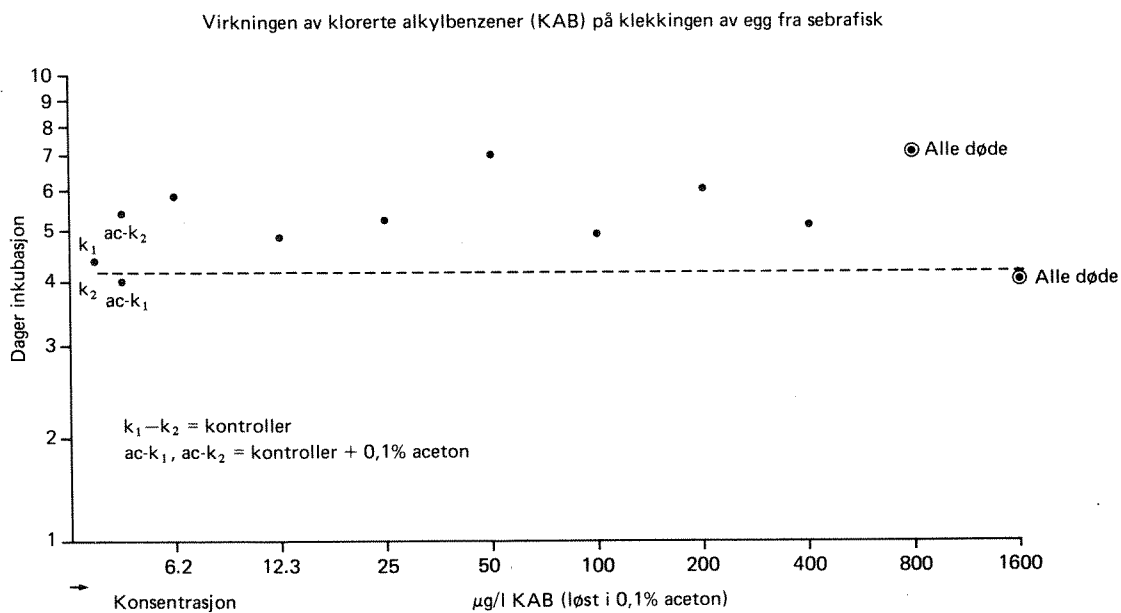


Fig. 10 Median klekkingstid for embryo/ynge av sebrafisk

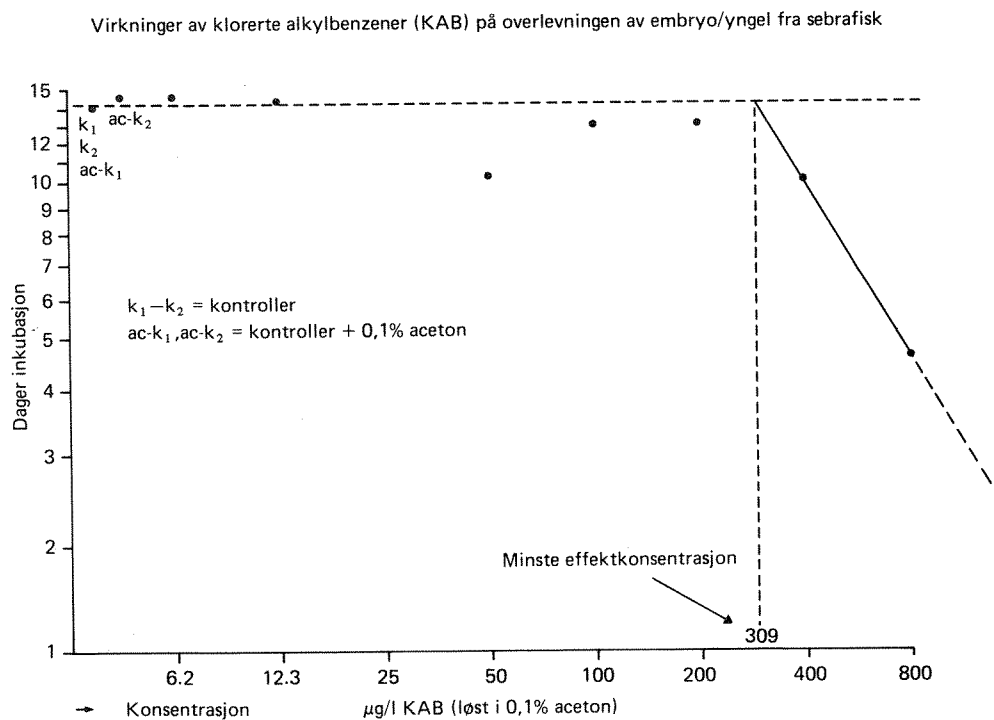


Fig. 11 Median overlevingstid for embryo/ynge av sebrafisk

5.2 Rur (Balanus improvisus)

5.2.1 Metodikk

Rur er marine dyr som tilbringer sitt voksne liv fastsegmentert til et fast substrat. Dyrene er hermafroditter med indre befruktning og utvikling av eggmassene. De utklekte larvene lever planktonisk og gjennomløper først 6 nauplie-stadier før det siste larvestadium, cypris. Cypris-larvene har som oppgave å finne egnet substrat for bunnslåing og metamorfosering til den voksne fastsegmenterte form. Denne bunnslåing og metamorfose er en kritisk fase i dyrenes utvikling, og toksisitetstesten tar sikte på å måle effekter av tilsetning av kjemikalier på denne prosess.

5.2.2 Resultater

Rur-testen er utført to ganger. Resultatet av den første testen er rapportert i fagrapport 1/84. På grunn av lav gjenvinningsgrad av KAB i testkarene ble det utført en ny test, hvor det ble brukt færre overføringer av KAB fra aceton-ekstraktet til testkaret for å unngå tap av KAB. Dose/responsforløpet, tilpasset etter probit-omregning og med konfidensintervall er vist i figur 12. EC_{50} , EC_{20} , og EC_{80} er markert på dose/responskurven og angitt i tabell 6, sammen med tilsvarende verdier ved den tidligere testen. Resultatene viser at det var liten forskjell i effekt ved de to testene. EC_{50} -verdiene var 260 resp. 296 $\mu\text{g/L}$. Analyser av KAB i testkaret med en nominell konsentrasjon av $\mu\text{g/L}$ viste imidlertid en gjenvinning på bare ca.60 %, til tross for at mulige årsaker til tap ved overføringer var blitt redusert mest mulig.

TABELL 6

Resultat av to toksisitetstester av KAB-ekstraktet med rur (Balanus improvisus)

Test	EC_{20} $\mu\text{g/L}$	EC_{50} $\mu\text{g/L}$	EC_{80} $\mu\text{g/L}$
Test 1 (1984)	105	258	336
Test 2 (1986)	153	296	574

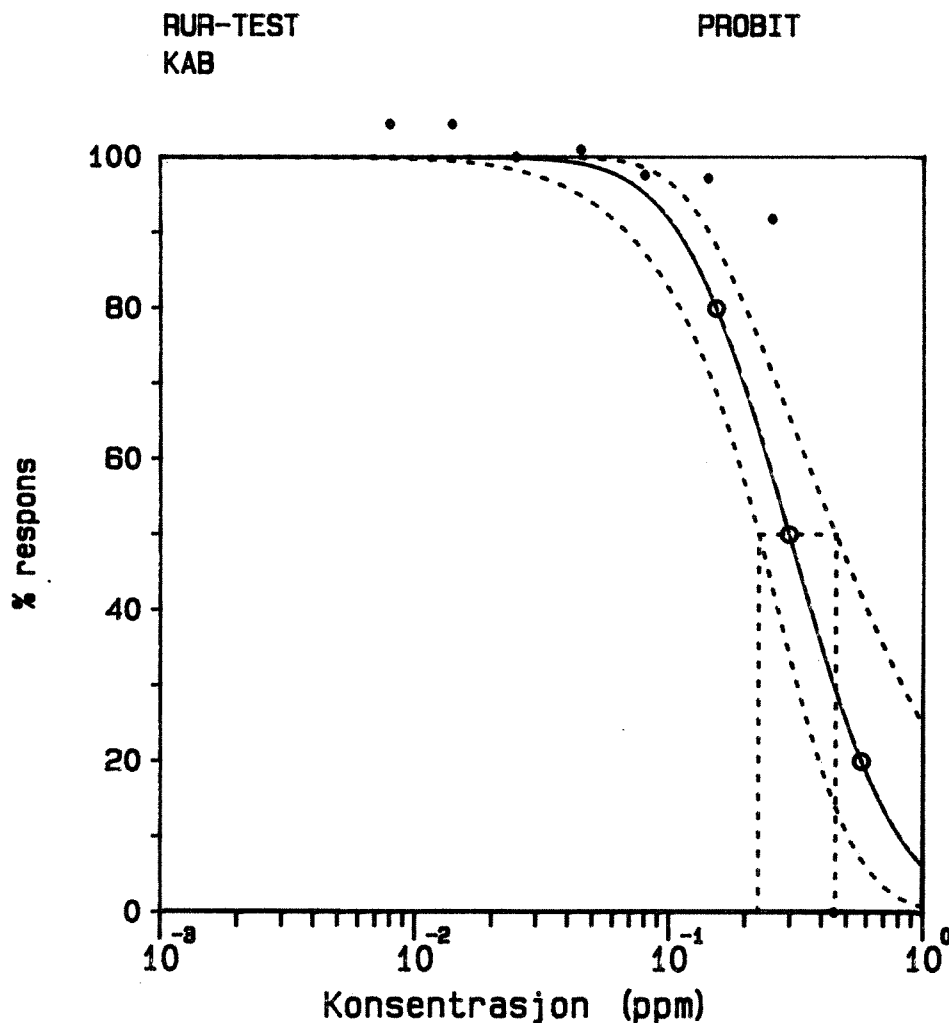


Fig. 12. Effekt av KAB på bunnslåing og metarmofose hos rur (Balanus improvisus)

5.3 Blåskjell - test av effekt på filtreringsrate

5.3.1 Metodikk

Reduksjon i filtreringsrate hos blåskjellene ble brukt som mål for vannets giftighet. Filtreringsratene ved ulike konsentrasjoner + kontroll ble målt ved å tilsette en algesuspensjon (Phaeodactylum tricornutum) til testakvariene og bestemme reduksjonen i algetetthet over en viss tid vha. "Coulter Counter". Filtreringsraten er gitt ved

$$FR = \frac{V}{t} \ln \left(\frac{m_1}{m_2} \right)$$

der V = vol. av akvarievannet (2 l)

t = tid mellom tellingene

m_1 og m_2 er algetettheten ved to på hverandre følgende tellinger

Som testakvarier ble brukt 3 l begerglass innredet som vist på Fig. 13 med 2 l testløsning. I hvert akvarium ble det brukt 5 muslinger à 2-3 cm lengde.

5.3.2 Eksponering

KAB-dosering til akvariene har ikke vært helt under kontroll. Konsentrasjonene i akvariene ved 0 tid ga økende verdier, muligvis p.g.a. adsorpsjon til glass og plexiglass i akvariene. Det viste seg også at det ble tilsatt omtrent dobbelt mengde KAB i akvariene i forhold til tilsiktede mengde fordi KAB-standarden ble oppkonsentrert på laboratoriet innen tilsetning.

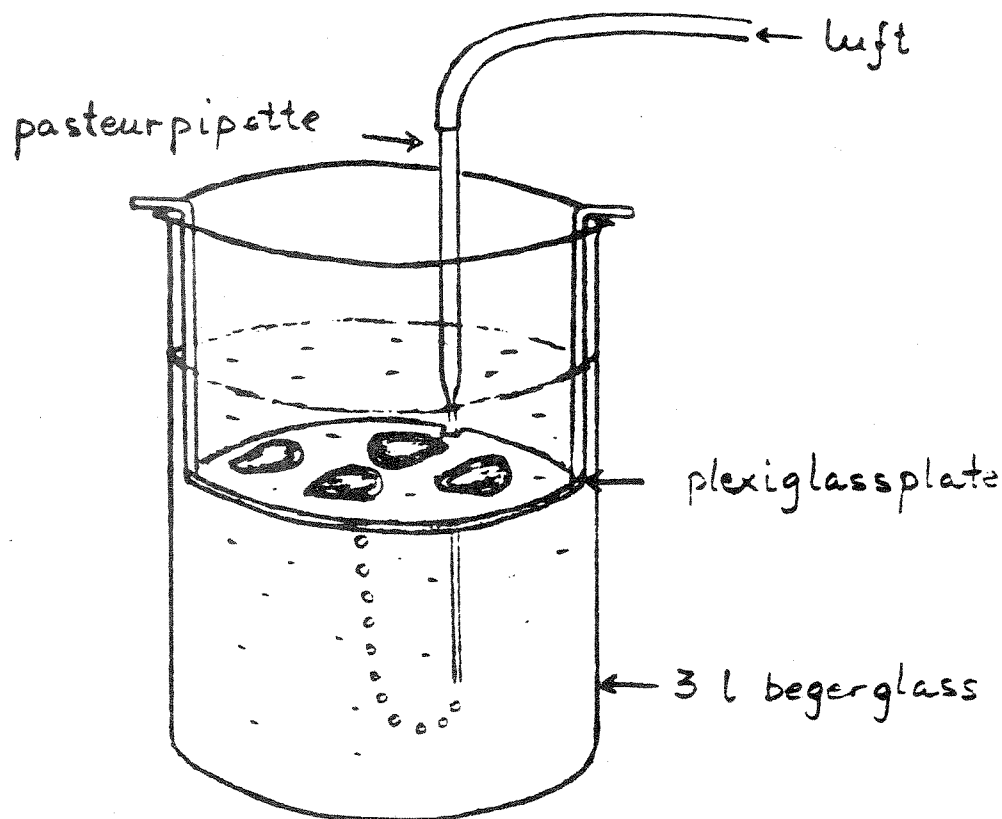


Fig. 13 Test av effekt på filtreringsrate - blåskjell. Akvariene som benyttes ved semistatiske forsøk

Det er likevel mulig å benytte resultatene fra vannprøvene tatt fra et og

samme akvarium, ved 0 tid og etter 24 timer. De relative forskjeller blir riktige.

5.3.3 Analyse av akvarievannet

Bestemmelse av KAB-konsentrasjonen i vannet ble foretatt ved ekstraksjon og gaskromatografisk analyse med en spesiell halogenfølsom detektor. De enkelte komponenter er bestemt hver for seg. I fig. 14 er %-gjenvinning for de enkelte komponenter angitt som streker på x-aksen ved 0 tid og etter 24 timer etter hhv. 1 døgn og 2 døgns eksponeringstid. Absolutt verdiene for %-gjenvinning kan ikke oppgis fordi skalaen på y-aksen ikke er kjent.

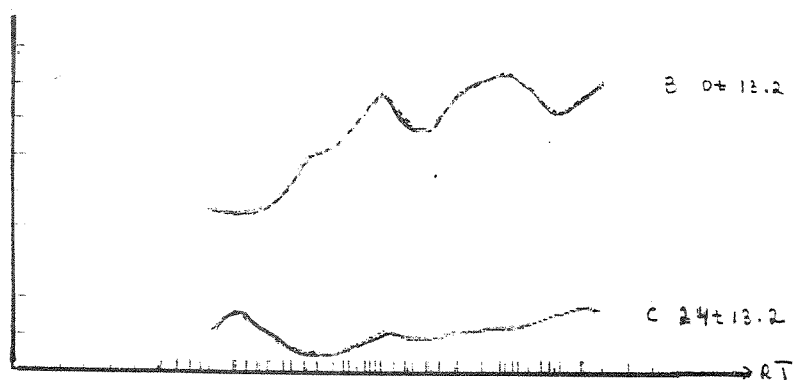
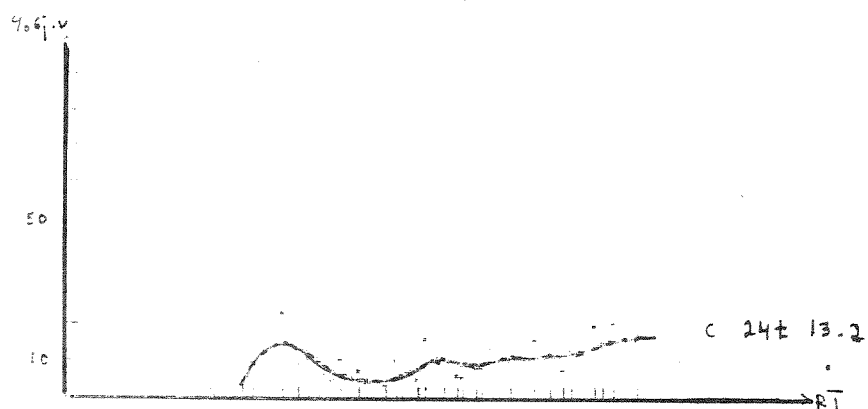
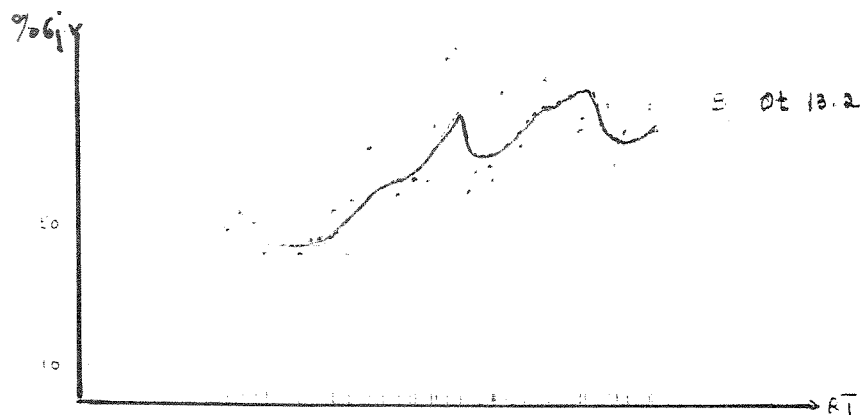
Nedgangen i konsentrasjonen i vannet for de enkelte komponenter varierte fra 60-90 % etter 1 døgn og 50-70 % etter 2 døgn. De virkelige konsentrasjoner under eksponeringen var derfor betydelig lavere enn de nominelle p.g.a. adsorpsjon til glassvegger osv., spesielt i starten av forsøket.

5.3.4 Resultater

Resultatene er uttrykt som % av filtreringsraten før start av dosering hos samme gruppe skjell. Med bare 5 individer pr. kar, er resultatene gjenstand for betydelig tilfeldig variasjon. 3 kontroller - i alt 15 enkeltresultater over 5 døgn - ga således et standardavvik på $s = 29\%$. Filtreringsraten må derfor være redusert til 40 % eller mindre for å gjenspeile en signifikant effekt av KAB-dosering. Usikkerheten ved selve målingen av filtreringsrate kan her regnes å bidra med $s = 5-10\%$. Det er derfor rimelig å sette en deteksjonsgrense for måling av filtreringsrate på 15 %.

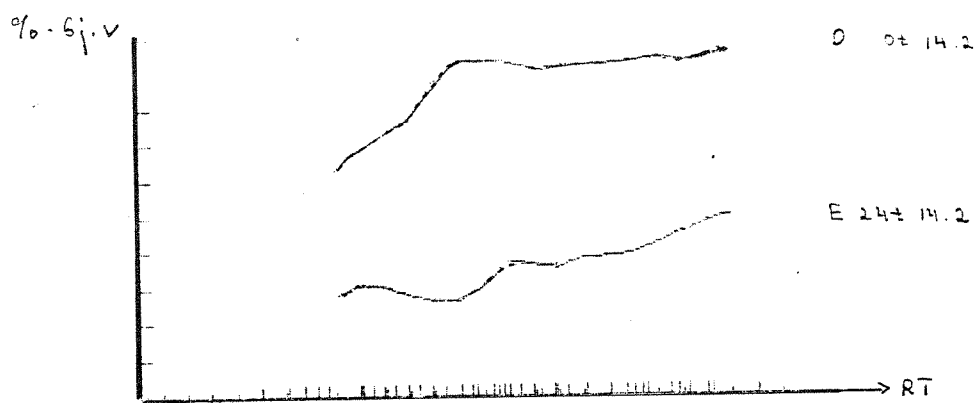
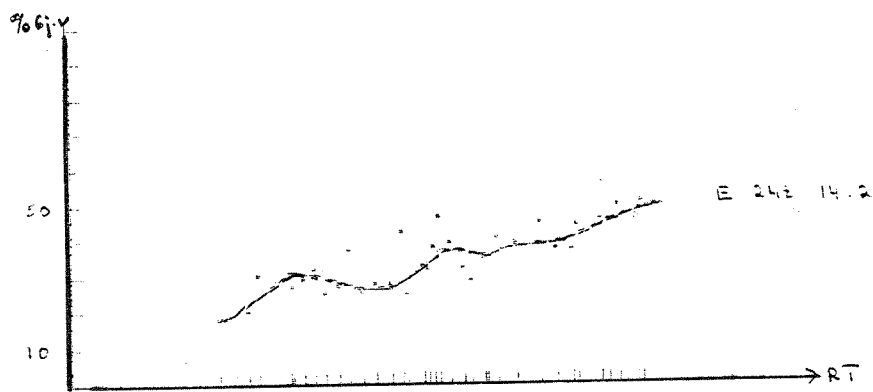
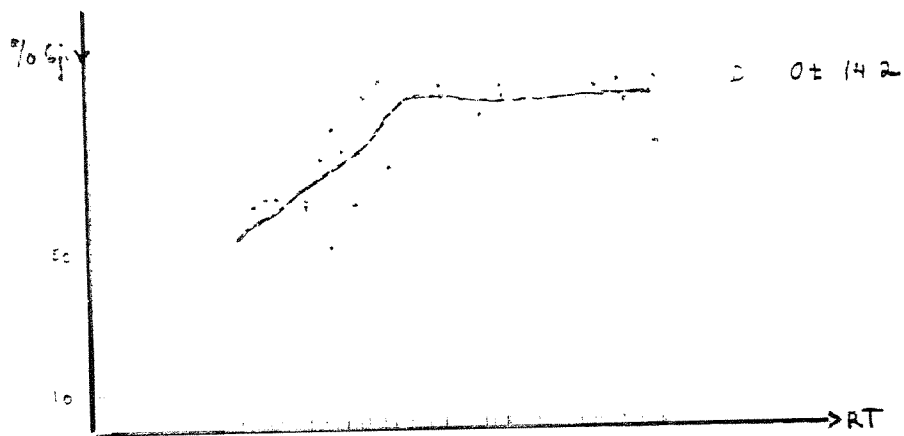
1 døgn eksponering

Opprørs 2.10-5.12.



KAB. isomerer med økende MW

Fig. 14 Gjenvinning av KAB-komponenter i vannet etter 1. og 2. døgn eksponeringstid for test på blåskjells filtreringsrate.



KAB-isomerer med økende HW.

Fig. 14 (forts.)

TABELL 7

Filtreringsrate hos blåskjell eksponert for KAB som % av filtreringsrate for eksponering

Fase	Dager fra start av fase	Nominelle konsentrasjoner, $\mu\text{g/l}^*$				
		114	229	457	914	1828
Eksponering	1	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
	2	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
	3	16	< 15	< 15	< 15	< 15
	4	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
	5	< 15	< 15	< 15	20	< 15
Overført til rent sjøvann	4	17	31	22	26	43
	10	< 15	31	52	45	-
	17	60	25	79	74	80

*Det er tatt hensyn til at ekstraktet var oppkonsentrert til det dobbelte p.g.a. inndampning

Resultatene i tabell 7 viser at de gitte eksponeringsgrader alle virket hemmende på filtreringen i løpet av 1. døgn. Ved den laveste eksponeringen steg raten til rundt 15 % ved 2-4 døgns eksponeringstid. Vi kan etter dette si at 45-115 $\mu\text{g/l}$ KAB ga 80-90 % hemming i en 4-døgnstest.

Videre er det klart at det skjedde en viss restaurering av filtreringsaktiviteten etter 4 døgn i rent sjøvann, og etter 17 døgn i rent sjøvann lot filtreringsaktiviteten seg ikke lenger skille fra full aktivitet i 4 av de 5 test-akvariene.

Analysene av akvarievannet viste en betydelig nedgang i KAB-konsentrasjoner i vannet i løpet av 1 og 2 døgn. Dette kan skyldes det generelle problemet med gjenfinning av tilsatt mengde ved analyse av testmediene som er diskutert i vedlegg, men opptak i blåskjellene er også en sannsynlig forklaring.

5.4 Alger

5.4.1 Test av KAB-ekstrakt ved direkte tilsetning til kulturene

Kjemiske analyser av innhold av KAB i mediet i de innledende testene viste at konsentrasjonene var lavere enn de nominelle. Løsningene ble den gangen laget i glasskolber og derfra fordelt til de kolber som testen ble utført

i. Årsaken til den reduserte gjennfinningsgraden kan ha vært adsorpsjon av KAB til glassveggene i kolben. For å unngå dette problemet ble testen med Skeletonema costatum, som var den mest følsomme organismen av de som ble undersøkt, gjentatt med direkte tilsetning av KAB fra aceton-ekstrakt med mikropipette til testkolbene. Metodikken var ellers som beskrevet tidligere. (Fagrapport 1/84).

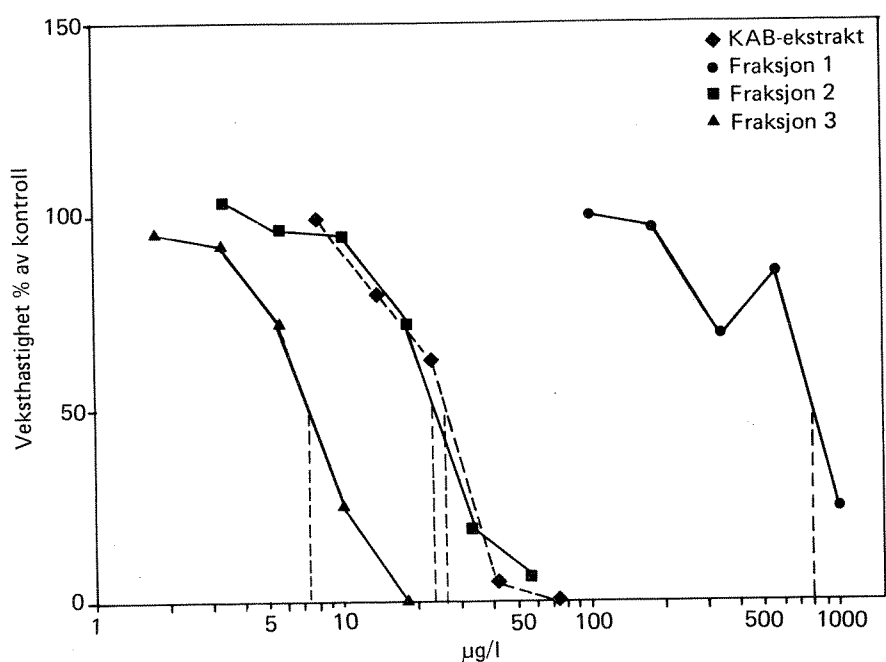


Fig. 15 Effekt av KAB-ekstrakt og tre fraksjoner av ekstraktet på veksthastigheten til Skeletonema costatum

Resultatene av testen med direktetilsetning er vist i Fig. 15. Det ble funnet en klar hemming av veksthastigheten ved konsentrasjonen 13 µg/l og en EC₅₀-verdi på 25 µg/l. Veksten var meget sterkt redusert ved 41 µg/l. Ved 73 µg/l KAB ble det ikke registrert noe vekst i løpet av 3 døgn. Effekten var således sterkere enn hva som ble funnet ved det tidligere forsøket. EC₅₀-verdien var da 41 µg/l. Resultatet tyder på at adsorpsjon av teststoffet til glassveggene sannsynligvis ga en lavere virkelig eksponering enn den nominelle ved det tidligere forsøket.

5.4.2 Test av fraksjoner av KAB-ekstraktet

KAB-ekstraktet ble fraksjonert ved tynnsjikt-kromatografi i 5 forskjellige fraksjoner som beskrevet i avsnitt 2.6. Effekten av 3 av fraksjonene på

veksten av Skeletonema costatum ble undersøkt med samme metodikk som ved de tidligere testene. Tilsetningen skjedde direkte ved mikropipettering av konsentrerte løsninger i aceton.

Den toksiske effekten av fraksjonene var klart forskjellig. Resultatene er sammenstilt i Fig. 15, som viser at fraksjon 1 var minst giftig, med en EC_{50} -verdi på ca. 780 $\mu\text{g/l}$. Forløpet av konsentrasjon/responskurven er usikkert i området mellom 180 og 560 $\mu\text{g/l}$, men siden denne fraksjonen åpenbart er lite giftig i forhold til hele ekstraktet, er det ikke gjort noen videre undersøkelser for å klarlegge forløpet sikrere.

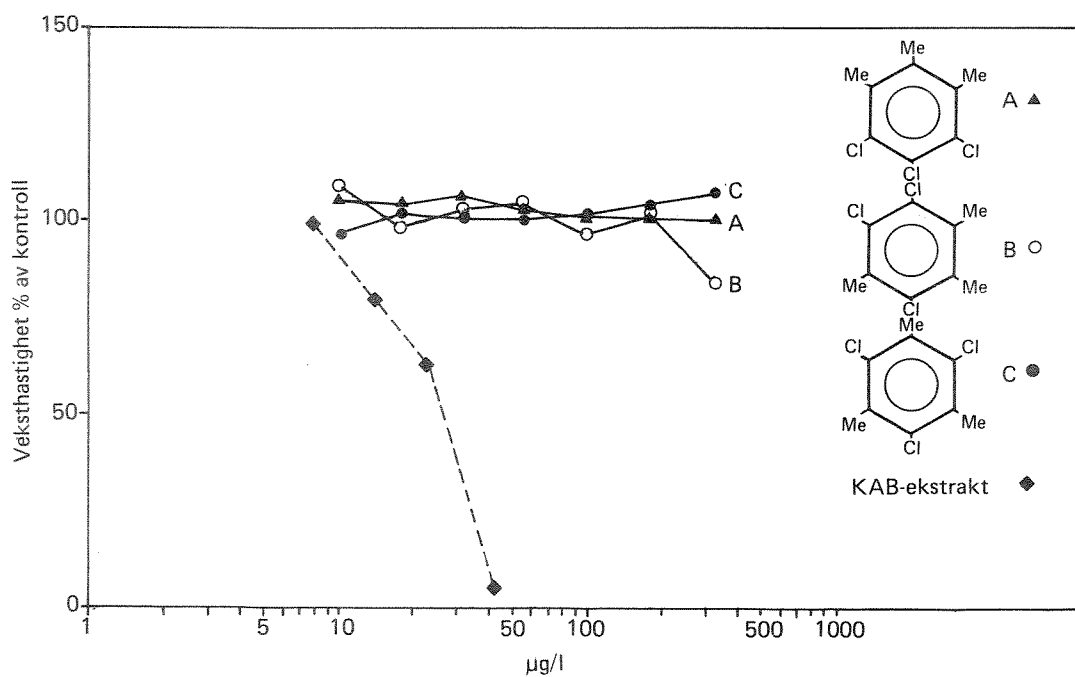


Fig. 16 Effekt av Syntetiserte Cl_3 -KAB forbindelser på veksthastigheten til Skeletonema costatum

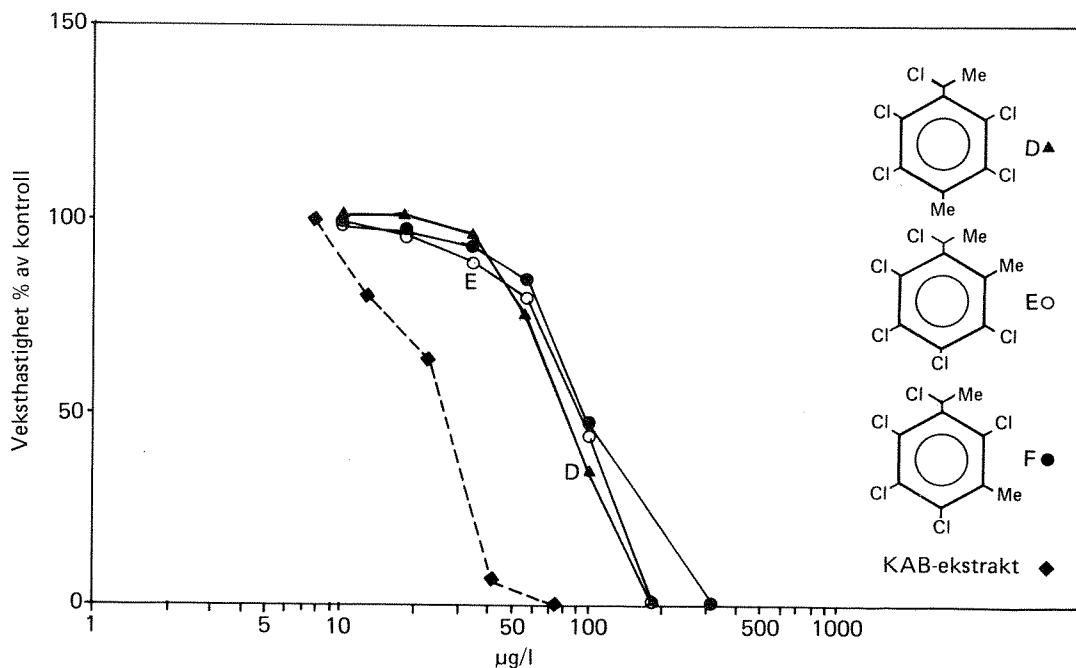


Fig. 17 Effekt av syntetiserte Cl₅-KAB forbindelser på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*

Fraksjon 2 var mer giftig enn fraksjon 1. EC₅₀-verdien var 23 µg/l, dvs. hele ekstraktet hadde en EC₅₀-verdi på 7 µg/l. Veksthastigheten var lavere enn i kontrollen ved alle testede konsentrasjoner ned til 1.8 µg/l, men de registrerte veksthemmingene ved konsentrasjoner under 5.6 µg/l er usikre. Ved 18 µg/l og høyere konsentrasjoner var veksthemmingen fullstendig i 3 døgn.

5.4.3 Test av syntetiserte KAB-forbindelser

Seks enkeltforbindelser er testet m.h.t. giftvirkning på algen *Skeletonema costatum* etter samme metode som for testen av KAB-ekstraktet og fraksjonene. De syntetiserte KAB-forbindelser er beskrevet i avsnitt 2.2.

Resultatene av testene er sammenstilt i Fig. 16 og 17 samt tabell 8. Av de undersøkte forbindelsene var tre med tre kloratomer i bensenringen. Disse var alle lite giftige i forhold til KAB-ekstraktet. Ved den høyeste konsentrasjonen som ble testet, 320 µg/l var reduksjonen av veksthastighet signifikant kun for isomer B (se Fig. 16), KAB-isomerene hadde altså EC₅₀-

verdier godt over 320 µg/l.

KAB-isomerene D,E og F, med 5 kloratomer var klart giftigere enn de med 3 klor. Effekter på veksthastigheten ble funnet mellom 32 og 56 µg/l og EC₅₀-verdiene var 80-95 µg/l. Men også disse KAB-isomerene var mindre giftige enn KAB-ekstraktet og to av de undersøkte fraksjonene av KAB-ekstraktet. I KAB-ekstraktet må det altså finnes forbindelser som er betydelig mer giftige enn de komponenter som er syntetisert.

TABELL 8

EC₅₀-verdier for effekten av KAB på veksthastigheten til Skeletonema costatum. Enkeltforbindelsene er beskrevet i avsnitt 2.3. Fraksjonene 1-3 av KAB-ekstraktet er beskrevet i avsnitt 2.6.

Prøve	EC ₅₀ (µg/L)
KAB-ekstrakt	25
Fraksjon 1	780
Fraksjon 2	23
Fraksjon 3	7
A (3 Cl)	>320
B (3 Cl)	>320
C (3 Cl)	>320
D (5 Cl)	81
E (5 Cl)	91
F (5 Cl)	95

5.5 Sammenfatning av toksisitetstester med KAB-ekstrakt

Undersøkelser av toksisitet er utført med flere organismer innenfor forskjellige grupper fra bakterier til fisk. Resultatene er sammenfattet i tabell 9. Sensitiviteten varierer nokså mye mellom noen av de undersøkte organismene. De heterotrofe mikroorganismene (bakterier, sopp, ciliater) var minst følsomme med EC₅₀-verdier fra 5.2 til 89 mg/l (2 tester). Effekter på fisk og evertebrater ble funnet ved konsentrasjoner fra ca 100 µg/l. EC- eller LC₅₀-verdier for disse gruppene var 250-800 µg/l.

TABELL 9

Toksisitet av KAB-ekstrakt. Sammenfatning av testresultatene, rapportert i Fagrapport 1/84 og 2/87 "Klorerte alkylbensener". Alle konsentrasjoner er nominelle.

Organisme	Undersøkt parameter	Kriterium	Konsentrasjon $\mu\text{g/l}$
<u>Heterotrofe mikroorganismer</u>			
Photobacterium (Mikrotox)	luminiscens	EC_{50}^*	5270
Aktiv slam	O_2 -forbruk	EC_{50}	89000
<u>Alger</u>			
Selenastrum capricornutum	vekst (3 d)	EC_{50}	750
Naturlig fytoplankton (ferskvann)	fotosyntese (1 d)	EC_{50}	48
Skeletonema costatum	vekst (3 d)	EC_{50}	25
<u>Evertebrater</u>			
Daphnia magna (vannloppe)	letalitet (2 d)	LC_{50}^{**}	640
Balanus balanus (rur)	bunnslåing, utvikling	EC_{50}	260
Mytilus edulis (blåskjell)	filtreringsrate	EC_{80}	> 46
<u>Fisk</u>			
Salmo salar (laks)	letalitet (4 d)	LC_{50}	590
Brachydanio rerio (sebrafisk)	median klekkesetid	> 5 d	400-800
Brachydanio rerio	median overlevningstid	minste effekt-kons.	310

* EC_{50} Den konsentrasjon som gir 50 % effekt

** LC_{50} Den konsentrasjon som gir 50 % dødelighet

En av algetestene, (grønnalgen Selenastrum viste en EC_{50} -verdi på 330 $\mu\text{g/l}$, men to andre tester med naturlig fytoplankton (ferskvann) og sjøvannsalgen Skeletonema (kiselalge) viste høyest følsomhet blant testene, med EC_{50} -verdiene 48 resp. 25 $\mu\text{g/l}$. For Skeletonema ble effekter påvist ned til konsentrasjonen 12 $\mu\text{g/l}$.

I figurene 18,19 og 20 er toksisiteten av KAB-ekstraktet sammenlignet med forskjellige klorbensener og klorfenoler for henholdsvis fisk, dafnier og alger. Toksisitetsdata for fisk er fra Heitmüller et al. (1981) som oppgir LC_{50} -verdier for Cyprinodon variegatus for en rekke klorerte bensener. Data for klorerte fenoler er tatt fra Hattula et al. (1981), som har brukt ørret som testorganisme. LC_{50} -verdiene er omregnet til $\mu\text{Mol/L}$ og plottet på log-skala mot logaritmen for oktanol/vann -fordelingskoeffisienten. Figuren viser en klar tendens til at toksisiteten øker med lipofiliteten. KAB-komponentene faller i et område med lave LC_{50} -verdier og med $\log P > 5$ som er markert med skravering i figuren. KAB-blandningen i ekstraktet er altså mer toksisk for fisk enn alle klorerte fenoler og bensener med mindre enn fem kloratomer, med unntak for 2,3,4,6 tetraklorfenol. Pentaklorfenol er imidlertid betydelig mer giftig enn KAB-blandningen. (LC_{50} -verdien 3-4 ganger lavere).

En tilsvarende sammenstilling av toksisitetsdata for *Daphnia magna*, basert på data fra Devillers & Chambon (1986) og Abernethy et al. (1986) er vist i figur 19. Også for dafnier er det en klar sammenheng mellom toksisitet og lipofilitet, og KAB-ekstraktets toksisitet er i samsvar med denne sammenheng. Av de rapporterte verdiene er alle klorerte fenoler og bensener med mindre enn 5 kloratomer mindre akutt giftige for dafnier enn KAB-ekstraktet.

Ved sammenlikning av toksisitetsdata for alger er det brukt data for bare en art, Selenastrum capricornutum, fordi følsomheten kan variere mye mellom ulike arter. Galassi og Vighi (1981) har undersøkt effekten av klorerte bensener på veksten av Selenastrum med en liknende metode som ble benyttet ved testen av KAB. Sammenlikningen av EC_{50} -verdiene viser at KAB-blandningen er mer giftig enn samtlige undersøkte bensener med 2 og 3 kloratomer. (Fig. 20).

Ved undersøkelsen av KAB ble sjøvannsalgen Skeletonema costatum funnet å være betydelig mer følsom enn Selenastrum. Det foreligger ikke så mye data for effekten av beslektede forbindelser på Skeletonema at en tilsvarende sammenlikning som er gjort for fisk og Selenastrum kan gjennomføres. EC_{50} -verdien for KAB er imidlertid av samme størrelsesorden (10-100 $\mu\text{g/L}$) som er funnet for PCB (Mosser et al. 1972) og DDT (Wurster 1968, Menzel et al. 1970).

Sammenligningen av toksisiten av KAB med tilsvarende data for andre klorerte hydrokarboner tyder på at den forholdsvis høye toksisiteten har sammenheng med stoffgruppens høye lipofilitet og lave vannløselighet. Sammenhengen mellom disse fysisk/kjemiske egenskapene og toksisiteten er vist av bl. a. Calamari (1983), Devillers and Chambon (1986), Abernethy et al. (1986) og Moulton and Schultz (1986).

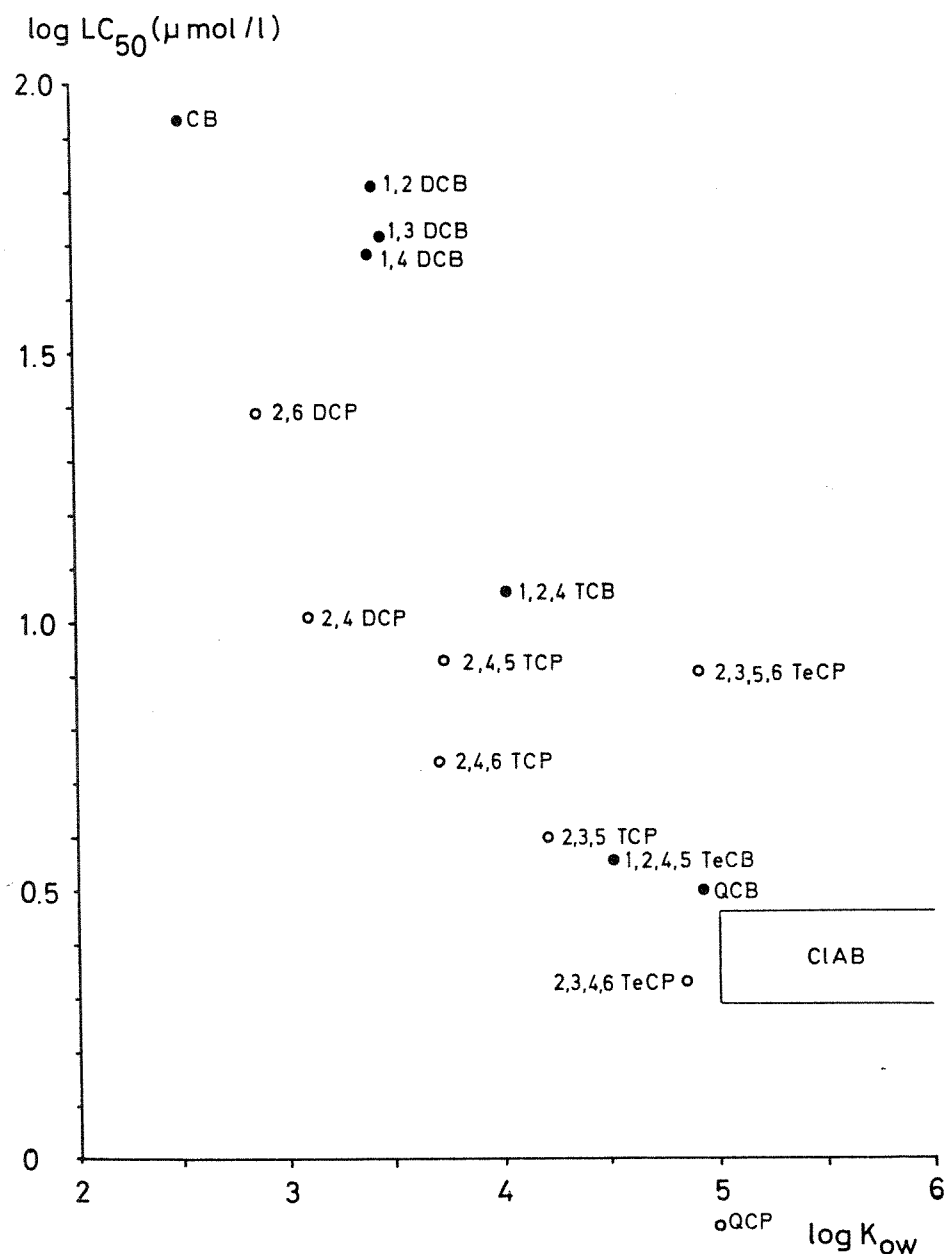


Fig. 18. Sammenheng mellom akutt toksisitet for fisk (LC₅₀) og log K_{ow} for KAB-ekstraktet og for klorerte fenoler og bensener. Data fra Heitmüller et al. (1981), Hattula et al. (1981), Oliver and Niimi (1983) og Ribo and Kaiser (1983).

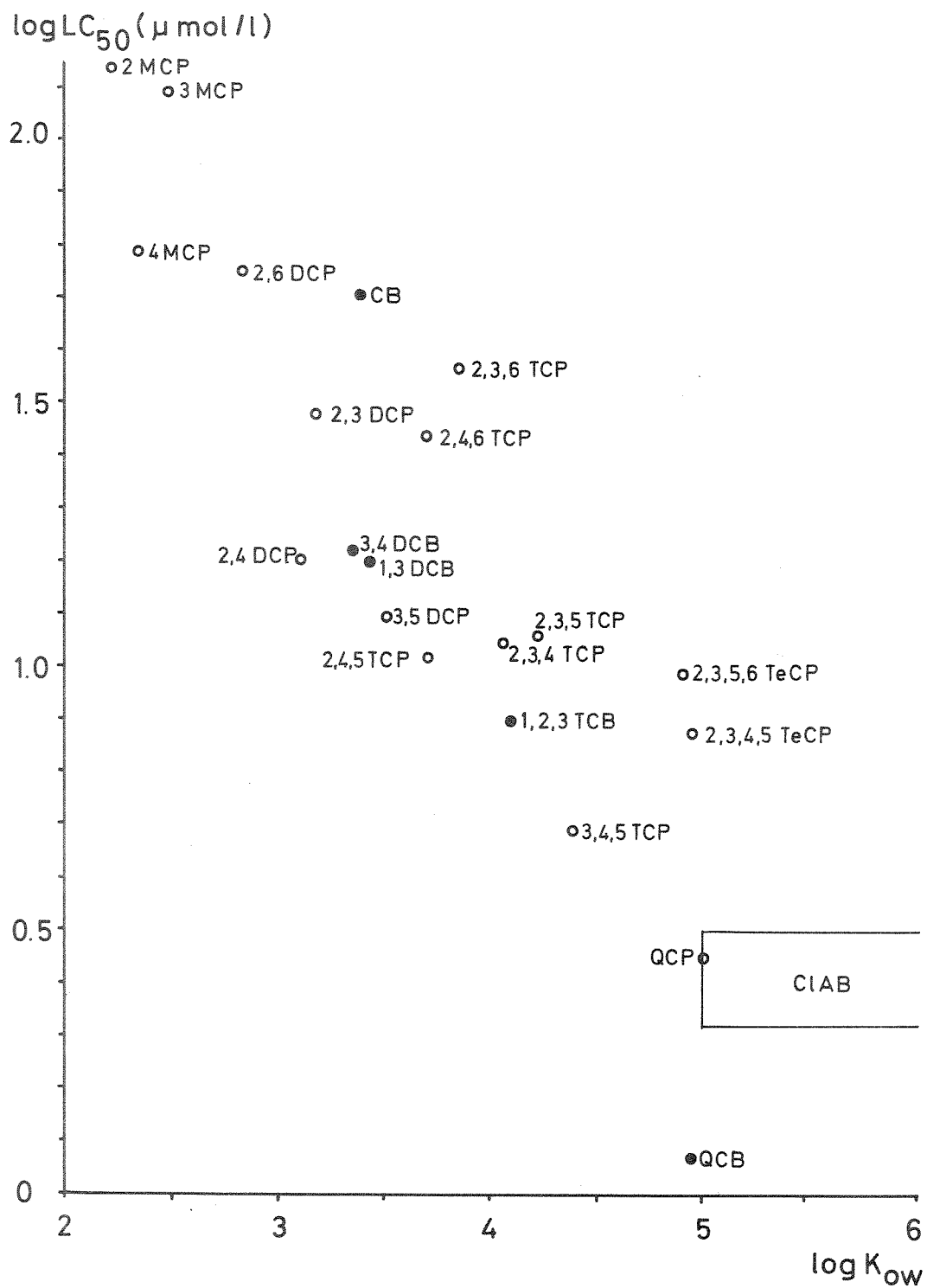


Fig. 19. Sammenheng mellom akutt toksisitet for dafnier (LC_{50}) og $\log K_{ow}$ for KAB-ekstraktet og for klorerte fenoler og bensener. Data fra Devillers and Chambon (1986), Abernethy et al. (1986), Oliver and Niimi (1983) og Ribo and Kaiser (1983)

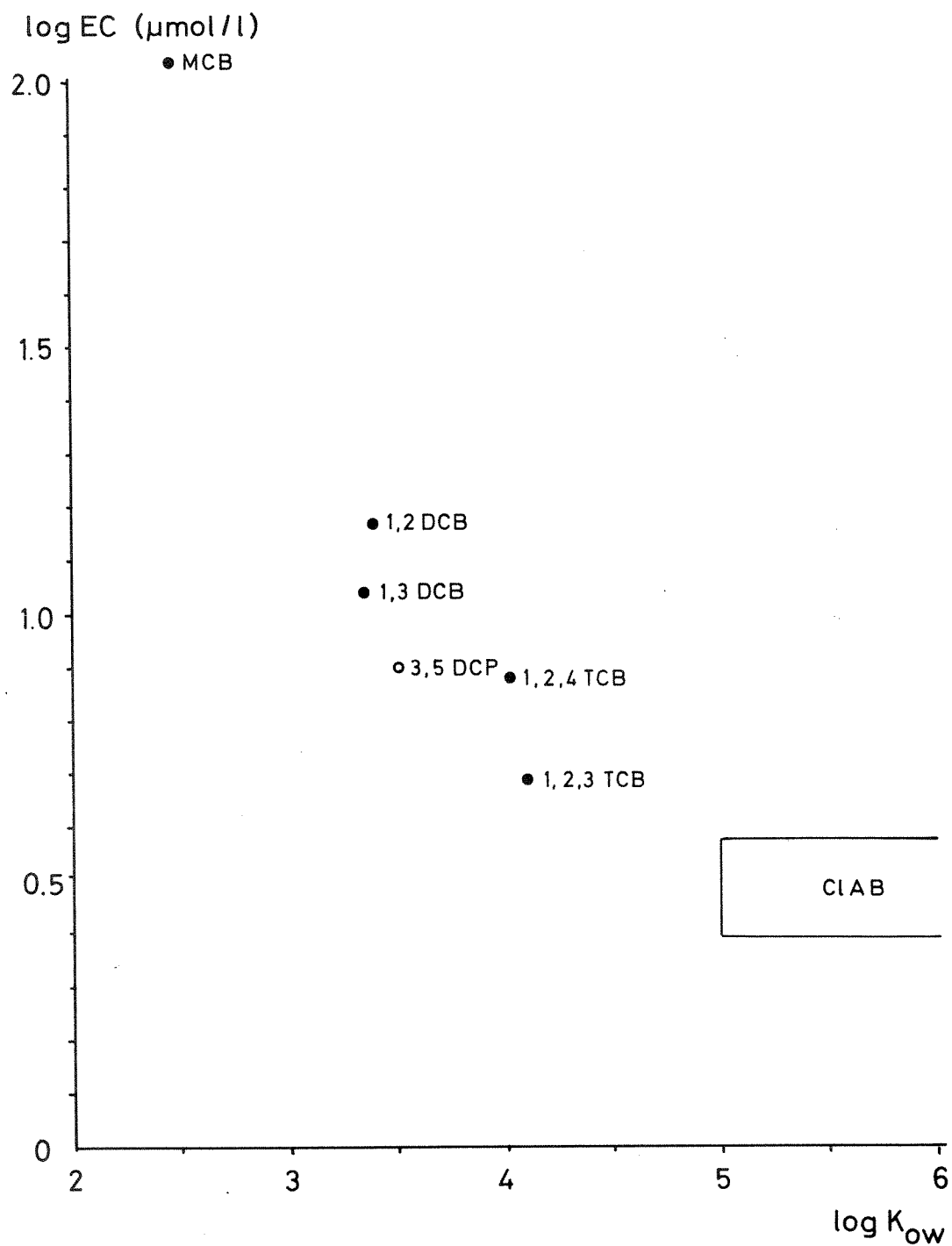


Fig. 20. Sammenligning av toksisitet for grønnalger (Selenastrum capricornutum) (EC_{50} for vekst) og $\log K_{ow}$ for KAB-ekstraktet og for klorete bensener og 1,3 diklorfenol. Data fra Calassi and Vighi (1981) og fra egne tester (diklorfenol)

6 KONTAMINERT SEDIMENT FRA KRISTIANSANDSFJORDEN - AKKUMULERING - BLÅSKJELL

6.1 Metode

Et eksperiment ble utført for å studere utlekkingen av KAB fra kontaminert sediment fra Kristiansandsfjorden, og opptak av disse forbindelsene i blåskjell. Eksperimentet ble utført i glassakvarier som vist i skjematisk skisse i Fig. 21.

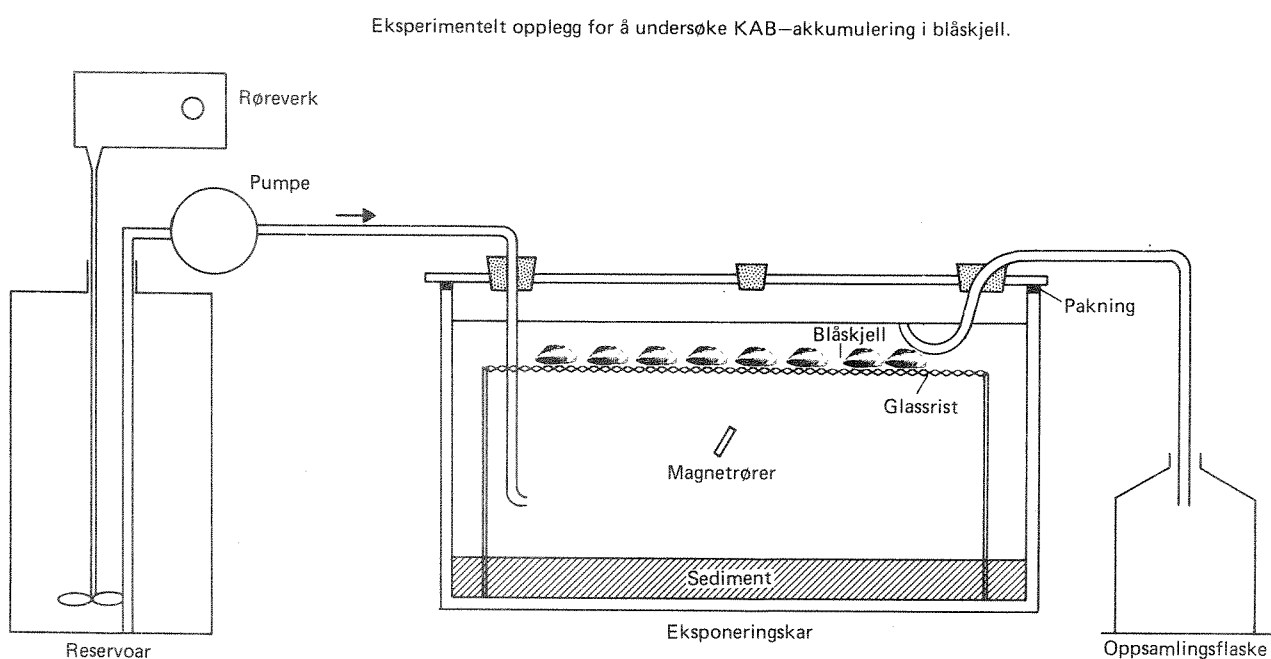


Fig. 21 Eksperimentelt opplegg for å undersøke KAB-akkumulering i blåskjell

Parallelt med eksponeringskaret ble det kjørt et referansekar uten blåskjell og uten tilførsel av alger.

Sjøvann fra Oslofjorden (Solbergstrand), fra 40 m dyp ble kontinuerlig pumpet gjennom akvariene, med en oppholdstid på et døgn. Akvariernes vanninnhold var 15 liter. Hvert akvarium ble forsynt med 4 cm tykt sediment, som på forhånd var godt blandet. Samtidig ble det tatt sedimentprøve til analyse for stoffinnhold ved start.

I eksponeringskaret ble det ved start satt inn 30 blåskjell (3.2 til 3.9 cm lange) på en glassrist over sedimentet. I tilførselsbeholderen ble det tilsatt alger (*Phaeodactylum tricornutum*) som føde for blåskjellene. Ved start ble det tilsatt 200 mill. celler/l, som ble redusert proporsjonalt med uttak av blåskjell. Algene ble dyrket i 10 % Z8-løsning (Källqvist 1984) i sjøvann. Forsøket ble utført ved 10 °C, og total eksponeringstid var 78 døgn.

Ved start ble 10 blåskjell høstet og analysert som referanse. Under eksponeringen ble det foretatt 6 høstinger, og 8 vannoppsamlinger over et døgn fra eksponeringskar og referansekar for analyse. Hvert 3-4 døgn ble det blåst oksygen inn i gassrommet over vannivå i eksponeringskaret. Oksygenmålinger viste at det var god oksygenmetning under hele eksponeringen.

Analysene av de klorerte miljøgiftene var basert på ekstraksjon, fjerning av uorganisk klorid og opprensing med konsentrert svovelsyre før den gasskromatografiske analysen med en spesifikk halogenfølsom detektor. Totalmengden ekstraherbart organisk klor (EPOC1) ble bestemt med nøytronaktiveringsanalyse (NAA).

Mengden KAB i Fig. 22 og tabell 10 er angitt som summen av de enkelte forbindelsene. Kvantifiseringen er foretatt med KAB-ekstraktet hvor beregningen er basert på %-fordelingen av forbindelsene i ekstraktet.

6.2 Resultat

Det ble påvist tri-, tetra-, penta- og heksaklorbensener (HCB), oktaklorstyren (OCS) og klorerte alkylbensener (KAB) i sedimentet benyttet i forsøket. Innholdet av klorerte bensener og totalmengde ekstraherbart persistent organisk klor (EPOC1) og KAB lå på samme nivå som de mest kontaminerte sedimentprøvene fra 1983 analysert innen SFT's overvåkningsprogram av Kristiansandsfjorden. De identifiserte klorforbindelsene i slammet forklarte ca 30 % av den totale mengde persistent organisk klor (EPOC1). Dette er også sammenlignbart med det som ble funnet innen overvåkningsprogrammet.

I løpet av forsøket ble i alt 16 vannprøver à 15 l, 8 fra referanseakvariet og 8 fra akvariet med blåskjell, analysert for de samme miljøgiftene som ble funnet i slammet. Videre ble det tatt ut blåskjell (fra 3 til 5 ved hvert uttak) som ble homogenisert og analysert som vannprøvene. Siste uttak var etter 78 dager.

Enkeltresultatene for sediment angitt i µg/g på tørrvektsbasis, for vann i µg/l og for blåskjell i µg/g våtvektsbasis finnes i tabell 10. I Fig. 22 er

konsentrasjonene av Σ KAB og HCB i vann og blåskjell gjengitt.

Fordelingen av KAB-komponentene i vann og blåskjellprøvene og tildels i sedimentprøven var ganske lik det som tidligere er funnet i felten, dvs. overvekt av de mest vannløselige forbindelsene i forhold til totalekstraktet. Dette tyder på at det er de mest vannløselige KAB-forbindelsene som påvirker resipienten (vannmassene), mens de minst vannløselige blir holdt tilbake i sedimentet.

Referansevannet inneholdt for alle uttak den første eksponeringsmåned høyere konsentrasjoner av de enkelte miljøgiftene enn vannet fra akvariet med blåskjell. Etter 45 dagers eksponeringstid ble bare vann fra blåskjellakvariet analysert. Ved de siste uttakene, hvor det var få blåskjell igjen, var nivået i referanse- og blåskjellakvariene tilnærmet likt. Dette tyder på at det ved starten av forsøket var tilstrekkelig mange blåskjell i akvariet til at opptaket i blåskjellene forårsaket en reduksjon av nivået i vannet i forhold til det som ble funnet i referansevannet.

Når det gjelder opptaket i blåskjell, ble det funnet ca 0.2 $\mu\text{g/g}$ Σ KAB og 0.01 $\mu\text{g/g}$ HCB (våttvektsbasis) for alle uttakene bortsett fra blåskjellene tatt ut etter bare 2-3 dager hvor forbindelsene ikke ble påvist.

Til sammenligning ble det i blåskjell fra Silokai, Kristiansand 1983 funnet 0.004 $\mu\text{g/g}$ HCB på våttvektsbasis. I denne prøven ble det også påvist en del KAB-forbindelser, men de ble ikke den gang kvantifisert.

Kromatogrammene fra en blåskjellprøve og vann fra samme akvarium etter 60 dagers eksponeringstid er sammenlignet i Fig. 23. Enkeltkomponenter avmerket i figuren viser at flere av hovedkomponentene som klorbensener og enkelte KAB-forbindelser i vannet ble tatt opp i blåskjellene.

Fig. 24 viser kromatogrammet av en blåskjellprøve fra Kristiansandsfjorden, Dybingen sommer -83, analysert innen overvåkingsprogrammet av resipienten. Denne inneholder flere av de samme forbindelsene funnet i eksponerte blåskjellprøver i dette forsøket.

Et blåskjell (prøve 8, tabell 8) eksponert i 78 dager var ved et uhell falt ned i sedimentet. Resultatet for denne prøven viser et forhøyet nivå av både KAB og EPOC1 i forhold til de øvrige skjellene.

De beregnede biokonsentrasjonsfaktorer (BCF) for enkelte av forbindelsene fra vann til blåskjell, ble for HCB og KAB etter 78 dagers eksponeringstid:

$$\text{BCF}_{\text{HCB}} = 1 \times 10^4 \quad \text{og}$$

$$BCF_{KAB} = 1.1 \times 10^4 \quad \text{hvor } BCF = \frac{C_M}{C_W}$$

C_M = konsentrasjon i blåskjell ($\mu\text{g/g}$)

C_W = konsentrasjon i vann ($\mu\text{g/ml} = \mu\text{g/g}$)

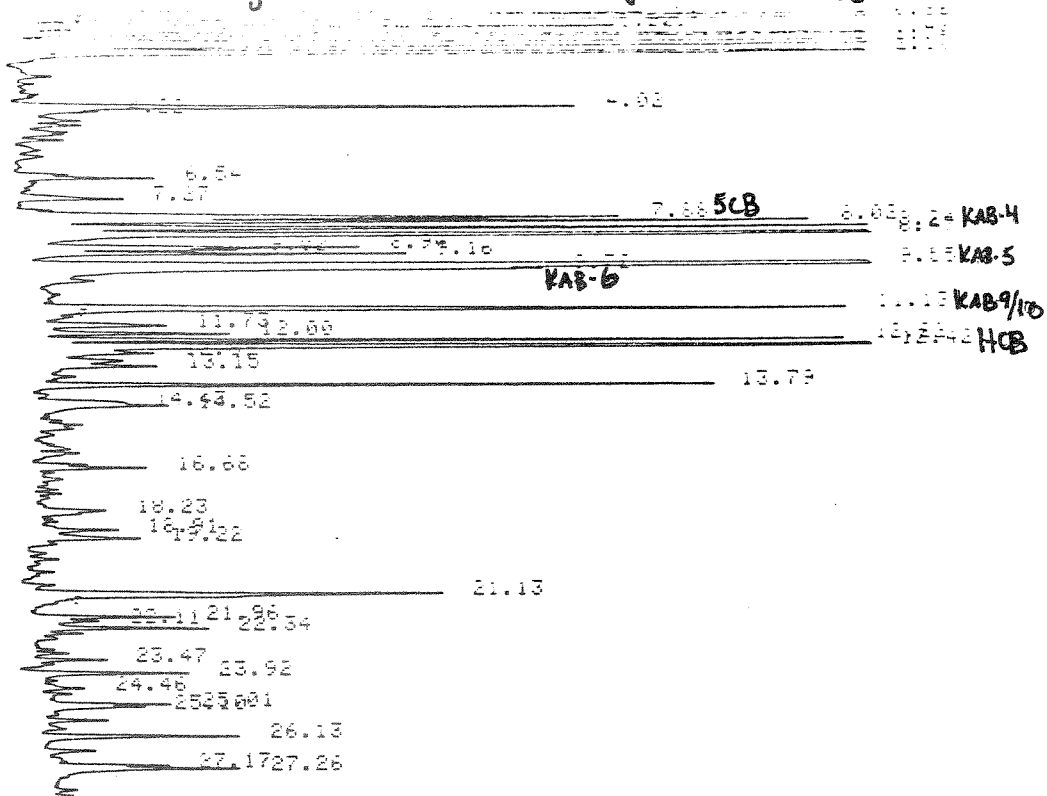
Konsentrasjonen av de enkelte forbindelsene er ganske like i alle blåskjellprøvene, noe som tyder på at det ble oppnådd likevekt. Likevekten for en komponent nås når konsentrasjonen av forbindelsen i organismen holder seg konstant.

Vi ønsket videre å analysere slammet benyttet i akvarieforsøket etter ferdig eksponeringstid for å undersøke om det foregår en naturlig nedbrytning evt. omdanning av de klorerte miljøgiftene. Fordi slammet var oppbevart dypfrosset (-20°C) kunne muligens slammet ha endret karakter. Vi valgte isteden å vurdere langtidsnedbrytning i slammet med forsøk med naturlig, kontaminert sediment, konf. kapittel 9 i den foreliggende rapporten.

6.3 Konklusjon

Sedimentene i Kristiansandsfjorden må være en av hovedkildene til de klorerte miljøgiftene i biologisk materiale i fjorden. Akkumuleringsforsøk med naturlig kontaminert slam fra fjorden viser at persistente klorerte miljøgifter lutes ut fra sedimentene til vannet og kan påvises i blåskjell. For Σ KAB, som inkluderer i hovedsak triklortrimetylalkylbensener, og HCB er BCF fra vann til blåskjell antatt å være $\sim 1 \times 10^4$. Semistatiske tester med blåskjell utført innen Ekotoxikologiske metoder før akvatisk miljø, Nordforsk, (K. Martinsen, L. Kirkerud 1980) ble det funnet BCF for 1,2,4-triklorbensen på $\sim 1 \times 10^3$ og $\sim 2-3 \times 10^4$ for triklorbifenylen. Disse verdiene er sammenlignbare med resultater oppnådd i denne undersøkelsen.

Akkumulering BLÅSKJELL 60 dager eksponering



VANN - 60 dager eksponering

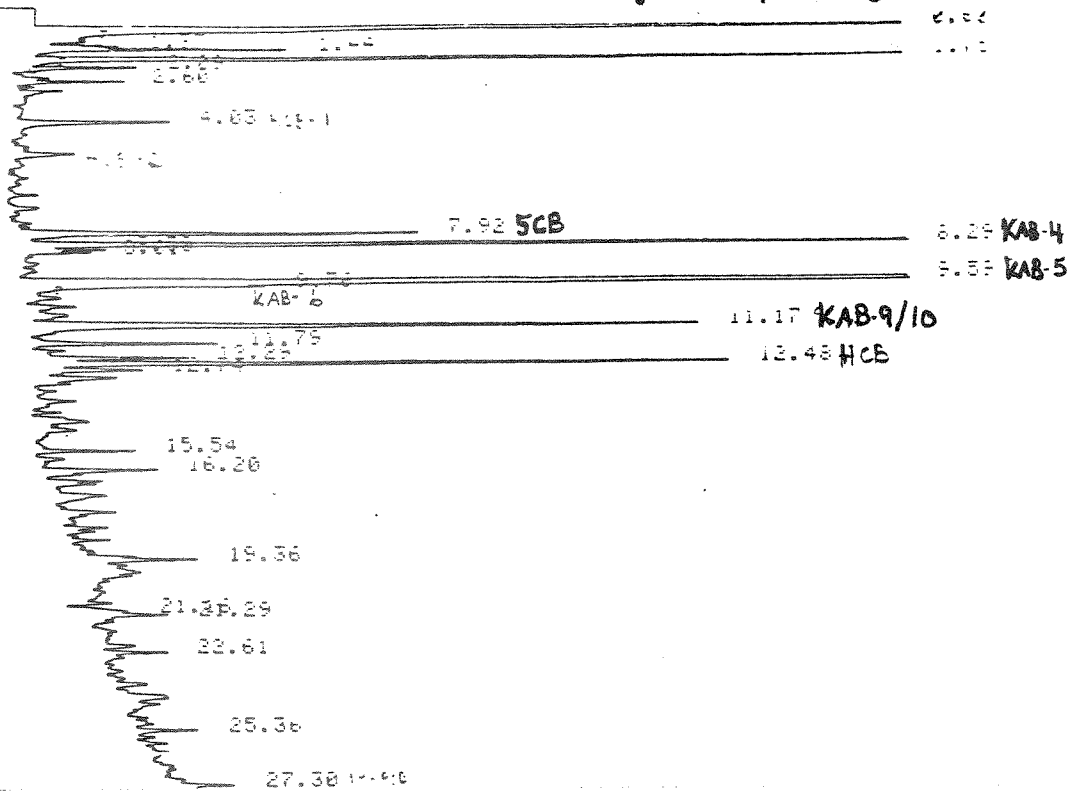


Fig. 22 Kromatogram for blåskjell og vann i akkumuleringseksperiment.

TABELL 10

Konsentrasjon av klorerte miljøgifter i sediment, vann og blåskjell. Enkeltresultater fra akkumuleringstest med kontaminert sediment ($\mu\text{g/g}$ t.v.b.), blåskjell ($\mu\text{g/g}$ v.v.b.) og gjennomstrømmende vann ($\mu\text{g/l}$)

		Σ 3CB	Σ 4CB	5CB	HCB	OCS	Σ KAB	EPOC1	%-identifisert av EPOC1	Anmerkninger
Utgangssediment	i.a.	0.2	0.9	2.3	1.8	7.8	28	30		
<u>Høstet</u>										
Blåskjell-/Ref. 26.6.85	-	-	-	-	-	-	i.a.	-		
Blåskjell-/Eks 3.7.85	-	-	-	0.003	-	0.05	i.a.	-		
Blåskjell Blind 7.8.85	-	-	-	-	-	-	i.a.	-		
Blåskjell-3 17.7.85	0.01	0.01	-	0.01	-	0.12	1.0	10		
Blåskjell-4 31.7.85	-	0.01	-	0.01	0.001	0.12	0.8	10		
Blåskjell-6 26.8.85	0.01	0.003	0.003	0.003	-	0.07	1.8	3		
Blåskjell-7 12.9.85	0.1	0.01	0.01	0.01	-	0.18	0.9	21		
Blåskjell-8 12.9.85	-	0.01	-	0.01	-	0.9	4.0	18		Falt ned i sediment
Vann-ref. 26.6.85	i.a.	0.03	0.001	0.0005	-	0.018				
Vann-blå "	i.a.	0.02	0.0002	0.001	-	0.005				
Vann-ref. 2.7.85	i.a.	0.02	0.002	0.001	-	0.023				
Vann-blå "	i.a.	0.005	0.0003	0.0003	-	0.005				
Vann-ref. 29-30/6.85	i.a.	-	0.002	0.001	-	0.016				
Vann-blå "	i.a.	-	0.001	0.0006	-	0.002				
Vann-ref. 10-11/7.85	i.a.	-	0.002	0.001	-	0.012				
Vann-blå "	i.a.	-	0.001	0.0006	-	0.005				
Vann-ref. 24.7.85	i.a.	-	0.003	0.002	-	0.021				
Vann-blå "	i.a.	-	0.002	0.001	-	0.005				
Vann-blå 7-8/8.85	i.a.	-	0.006	0.003	-	0.046				
Vann-ref. 25-26/8.85	0.04	0.003	0.002	0.002	-	0.023				
Vann-blå "	0.06	0.006	0.002	0.002	-	0.014				
Vann-ref. 11-12/9.85	0.02	0.001	0.0006	0.001	-	0.012				
Vann-blå "	0.02	0.002	0.001	0.001	-	0.016				

i.a. = ikke analysert

- = ikke påvist

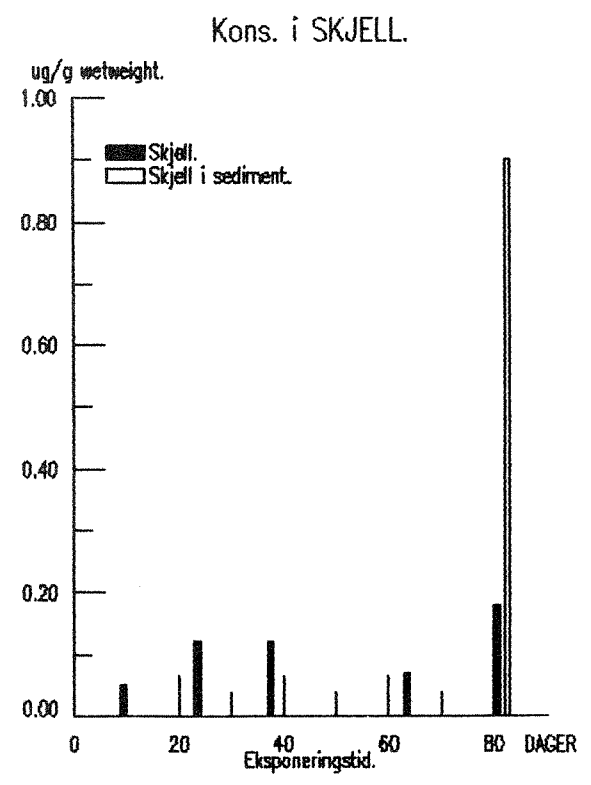
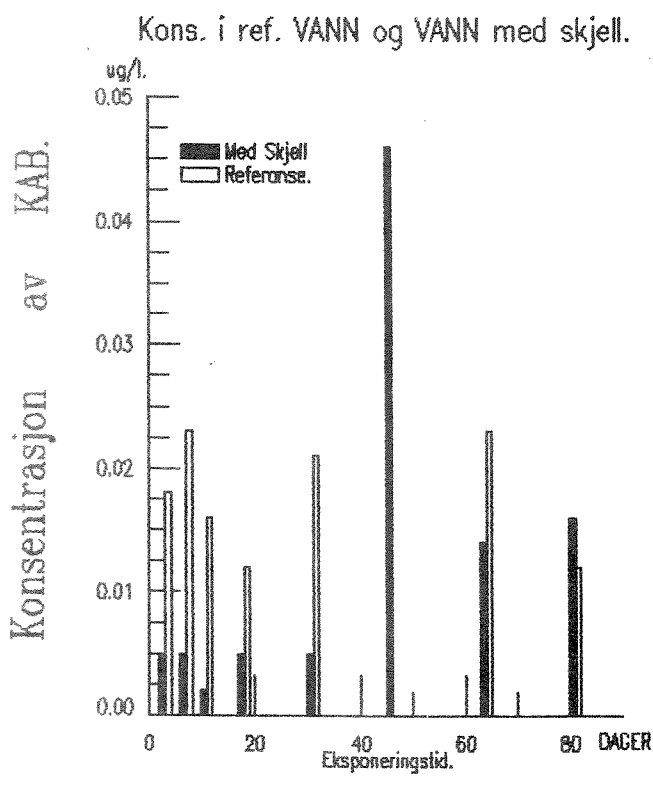
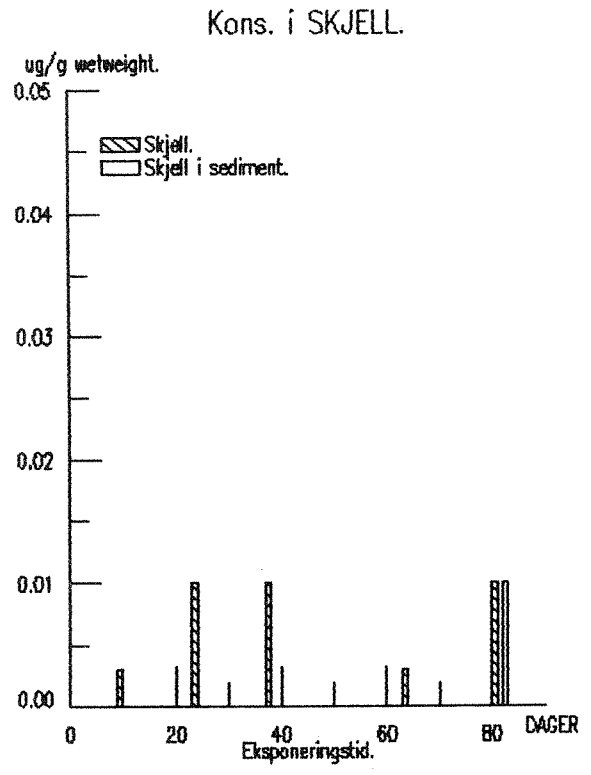
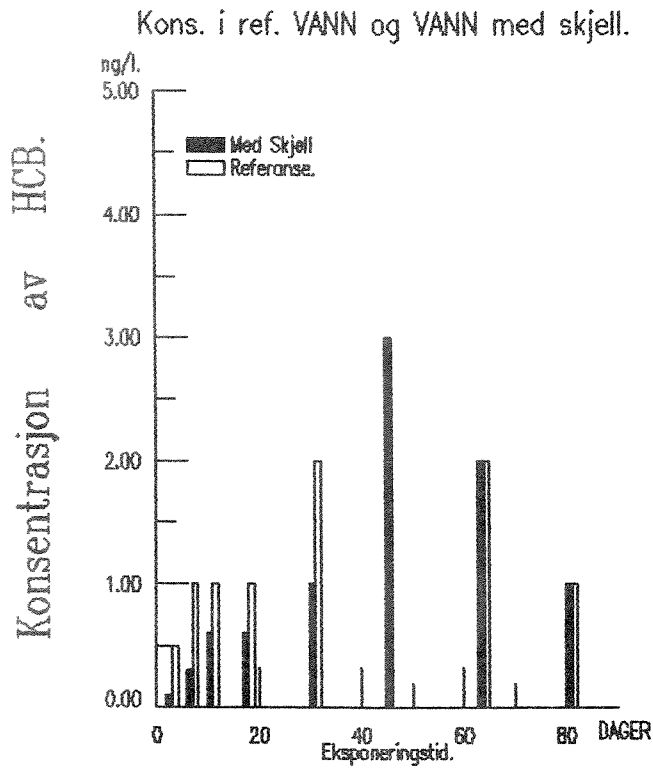


Fig. 23 HCB og KAB i vann og blåskjell ved eksperimentet med kontaminert sediment.

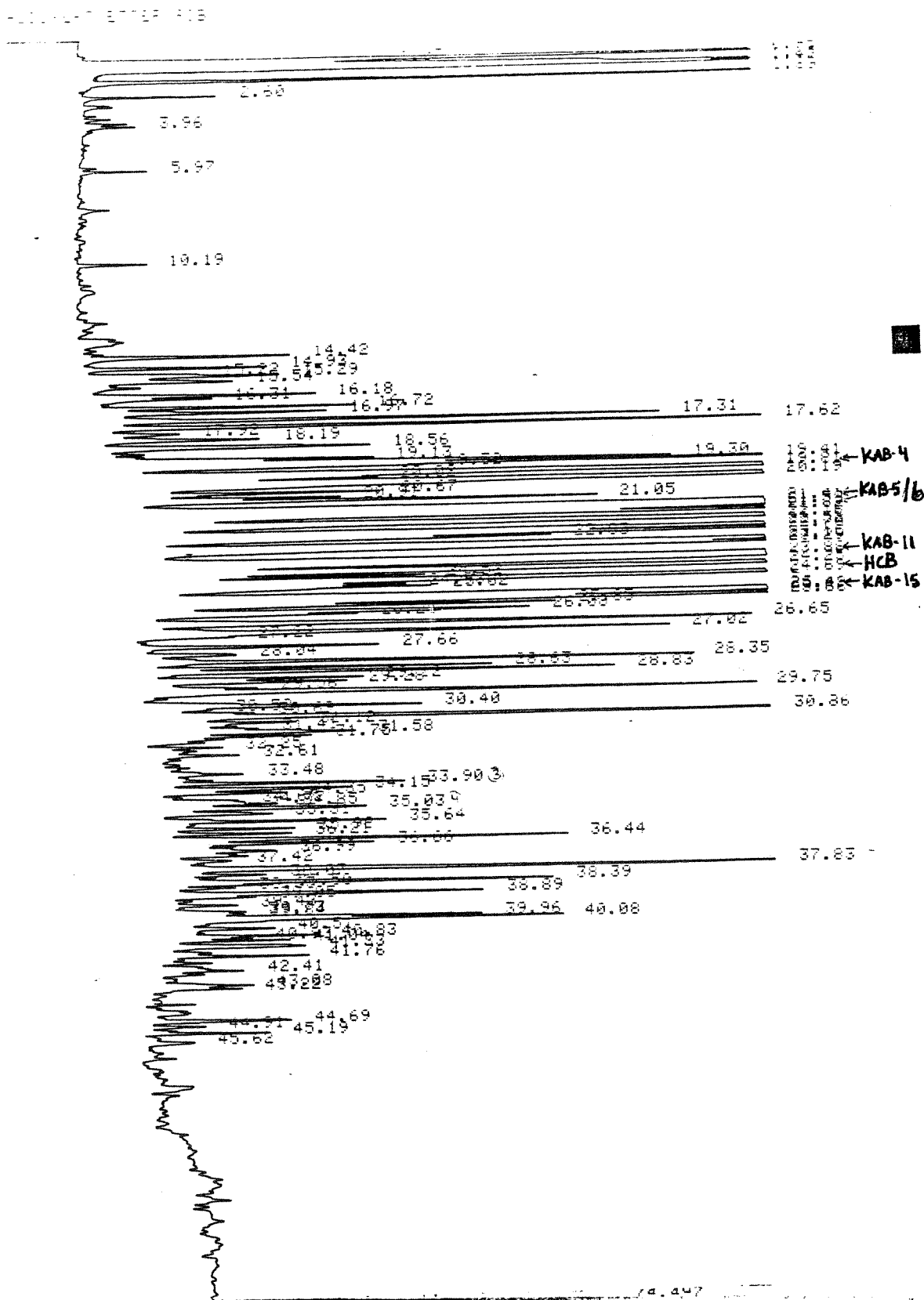


Fig. 24 Blåskjell Dybingen Kristiansandsfjorden juni -83.
GC-kromatogram/EC-detektor

7 FISK - AKKUMULERING

7.1 Metode

For å undersøke akkumulering av KAB i fisk ble det utført forsøk med ettårig yngel av laks (middelvekt 2.3 g). Det ble benyttet 2 serier à tre glassakvarier, hver med 20 l vann fra Maridalsvannet, som fisken var akklimatisert til gjennom lengre tid.

Vannet ble justert til pH 7.0 med NaOH. Det ble benyttet 18 fisk i to av karene og det tredje karet var uten fisk. I det ene karet med fisk og karet uten fisk ble det dosert KAB i nytt vann hvert 3. døgn tilsvarende 23 µg/l KAB. Fisken ble flyttet over til den andre karserien med nye løsninger fra 6-24 timer etter dosering. 3 fisk samt vannprøver ble tatt ut fra hvert akvarium hvert 3. døgn for analyser. Etter 15 døgn var 15 fisk uttatt til analyse av KAB og de 3 gjenværende ble uttatt til undersøkelse av enzymaktivitet i lever.

Under forsøket oppstod etterhvert relativt høy dødelighet (11 fisk) i akvariet med KAB og også noe i kontrollakvariet (3 fisk). Ved uttaket var derfor noen av fiskene døde. Ingen hadde imidlertid vært døde mer enn maksimalt noen få timer før uttak. Dødeligheten har derfor forhåpentligvis ikke påvirket opptaket vesentlig, noe som også synes å fremgå av resultatene.

Analysen av fisk og vann ble foretatt som beskrevet under avsnittet karakterisering og akkumulering i blåskjell fra kontaminert sediment (6.1).

7.2 Resultat

Det ble oppnådd likevekt etter ca 13 dager med en gj.sn. konsentrasjon i fisken på 50 µg/g våtvektsbasis med en biokonsentrasjonsfaktor (BCF) på $\sim 2.2 \times 10^3$ (gjennomsnitt for 15-19 komponenter). Likevekt og BCF er definert under avsnittet akkumulering i blåskjell fra kontaminert sediment 6.2.

Komponentene fra ekstraktet ble gjenfunnet i fisken i omtrent samme forhold som i opprinnelig ekstrakt bortsett fra de mest fettløselige komponentene med 5 hhv. 6 klor i molekylene. Konsentrasjonen i vann hvor ny løsning ble analysert for hvert nytt akvarie innen fisken ble overført, holdt seg på ~ 23 µg/l. Etter 3 dager var det bare mulig å påvise fra 2-3 av komponentene fra ekstraktet i vannprøvene.

Forsøkene ble utført med 23 µg/l som er en størrelsesorden lavere enn LC_{50} som er bestemt til ca. 600 µg/l. Likevel var det stor dødelighet under forsøket. Fettprosenten på våtvektsbasis lå på litt over 6 % for alle fiskeprøvene.

Det ble bare analysert en ny løsning for referanseakvariet, vann uten fisk. Nivået her lå litt under 23 µg/l. Opptaksmønsteret for fisk er sammenlignet med mønstre fra KAB-ekstraktet, kromatogrammene er gjengitt i fig. 25.

I Fig. 26 er konsentrasjonen i vann og opptaket av KAB i fisk angitt som funksjon av eksponeringstiden.

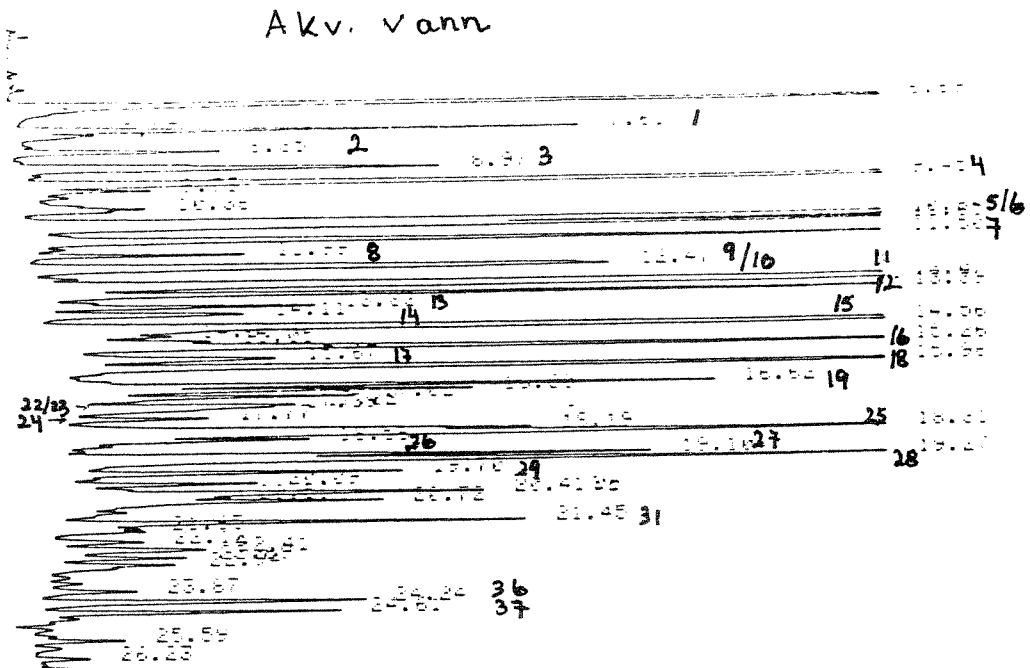
Til sammenligning har vi i tilsvarende semistatiske tester funnet BCF for Lindan (γ -BHC) fra 600-700 og 2,4',5-triklorbifenyli lik 4.6×10^3 (Carlberg et al. 1986).

7.3 Massebalanse

Summen av KAB tilsatt akvariet og KAB-mengden tilført nytt akvarium via fisken (akkumulert i foregående akvarier) er beregnet ved hvert uttak.

Ved uttaket etter 9 dager ble det funnet langt over 100 %. Dette må bety at gjennomsnittverdien for konsentrasjonen i fisk etter 9 dager må ligge for høyt. Forklaringen kan være at vi ikke hadde full kontroll over forsøket blant annet p.g.a. høy fiskedødelighet. Likefullt har forsøket gitt nyttig informasjon. KAB akkumuleres i stor grad i fisk, etter 14 dager akkumuleres ~ 70 % av tilgjengelig mengde i fisken.

Ekspone- ringstid (dager)	Σ KAB i fisk (μg)	Σ KAB tilsatt akv. + bidrag via fisk (μg)	KAB (%) av til- gjengelig mengde tatt opp i fisk
3	55	460	12
6	330	510	65
9	1040	670	155
12	840	1360	62
13	600	860	70
16	560	1030	54



ITR. PRIF = 12:140.00
 ITR. PRIF = 1

FISK Eksponent 13 dager

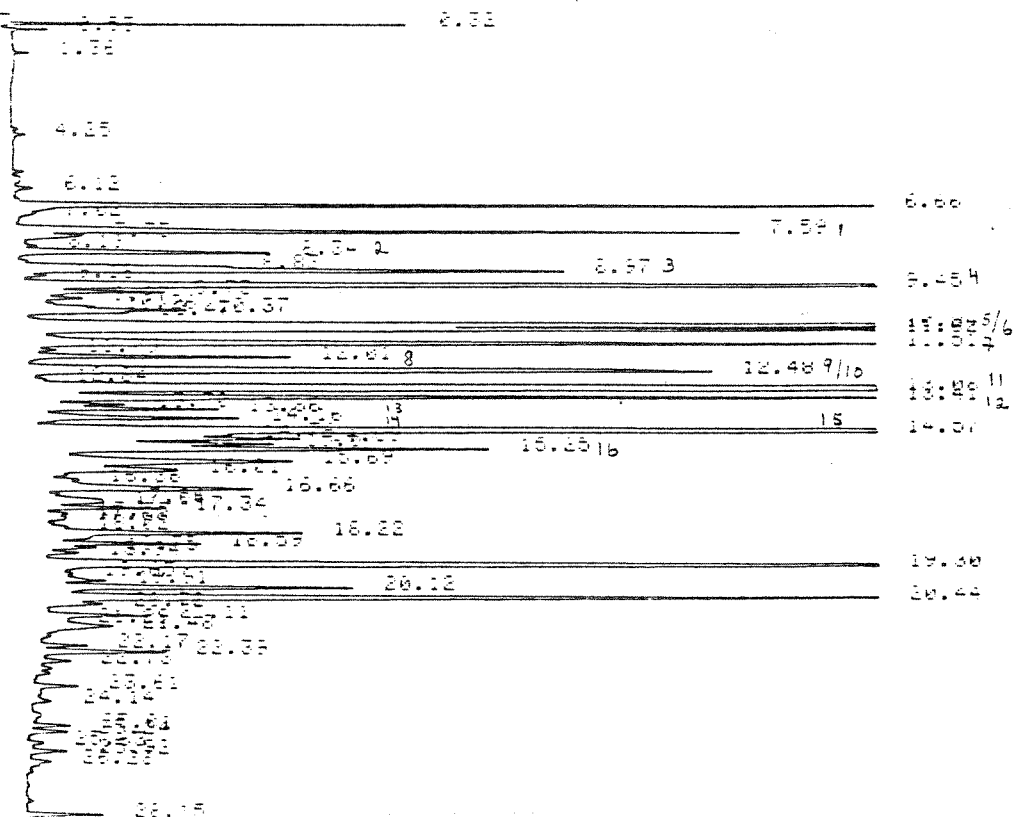


Fig. 25 Akkumulering-fisk/KAB-semistatisk test KAB-ekstrakt, KAB-komponentene som er brukt i utregningen er avmerket.

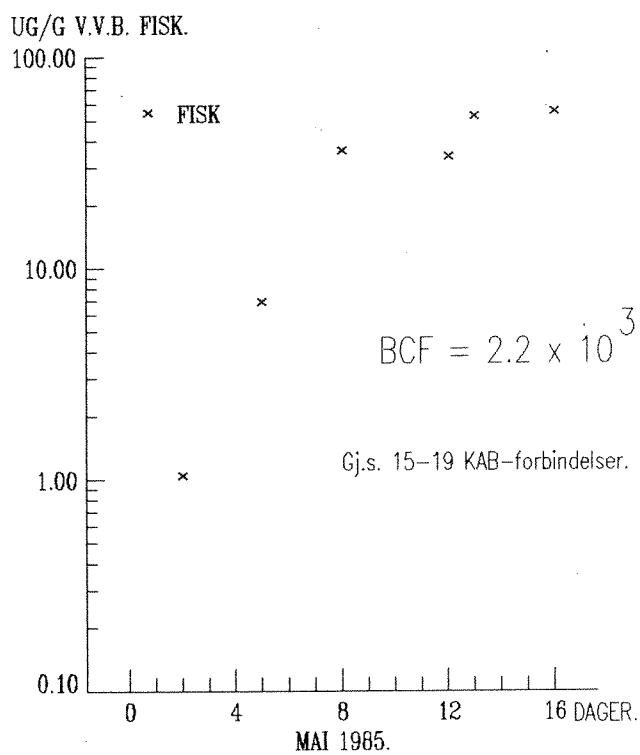
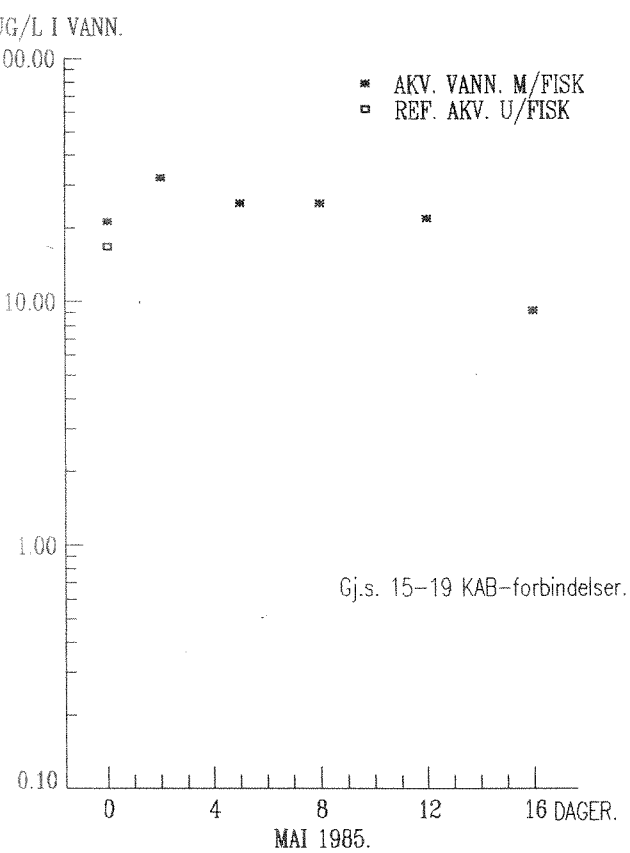


Fig. 26 Akkumuleringsforsøk. Konsentrasjonen i vann og optak i fisk som funksjon av eksponeringstiden.

7.4 Sammenligning med andre forbindelser

Det er påvist en klar sammenheng mellom tendens til bioakkumulering og lipofilitet hos organiske miljøgifter. Fordelingskoeffisienten vann/oktanol brukes derfor som et mål for bioakkumuleringspotensiale. $\log K_{OW}$ for KAB-forbindelsene ble ved tynnsjiktskromatografi funnet å ligge i området 5-8 (se avsnitt 2.5). Man burde derfor vente en høy grad av biokonsentrering av KAB.

Fig 27 viser en sammenstilling av data for biokonsentrering i fisk plottet mot $\log K_{OW}$ for klorerte bensener og DDT. I figuren er også tegnet inn regresjonslinjer for sammenhengen BCF/ $\log K_{OW}$ funnet av Oliver and Niimi (1983), (1984) og Veith et al. (1979). KAB-forbindelsenes plassering i figuren tyder på at disse ikke følger det generelle mønsteret. BCF for KAB er betydelig lavere enn man kan forvente for forbindelser med $\log K$ over 5. Årsaker til dette kan være at opptaket av KAB hindres av molekylens størrelse eller form, eller at fisken har evnen til å metabolisere KAB. Av disse mulige forklaringer er den siste mest sannsynlig. Den høye toksisitet tyder på at KAB lett kan passere gjennom cellemembraner. Alkylgruppene på bensenringen kan bidra til at KAB metaboliseres lettere enn klorbensener.

(1) $\log BCF = -1,02 + (0,99 \pm 0,63) \cdot \log K_{ow}$ (Oliver and Niimi 1983)

(2) $\log BCF = -0,87 + (1,00 \pm 0,06) \cdot \log K_{ow}$ (Oliver and Niimi 1984)

(3) $\log BCF = -0,70 + 0,85 \cdot \log K_{ow}$ (Veith et al. 1979)

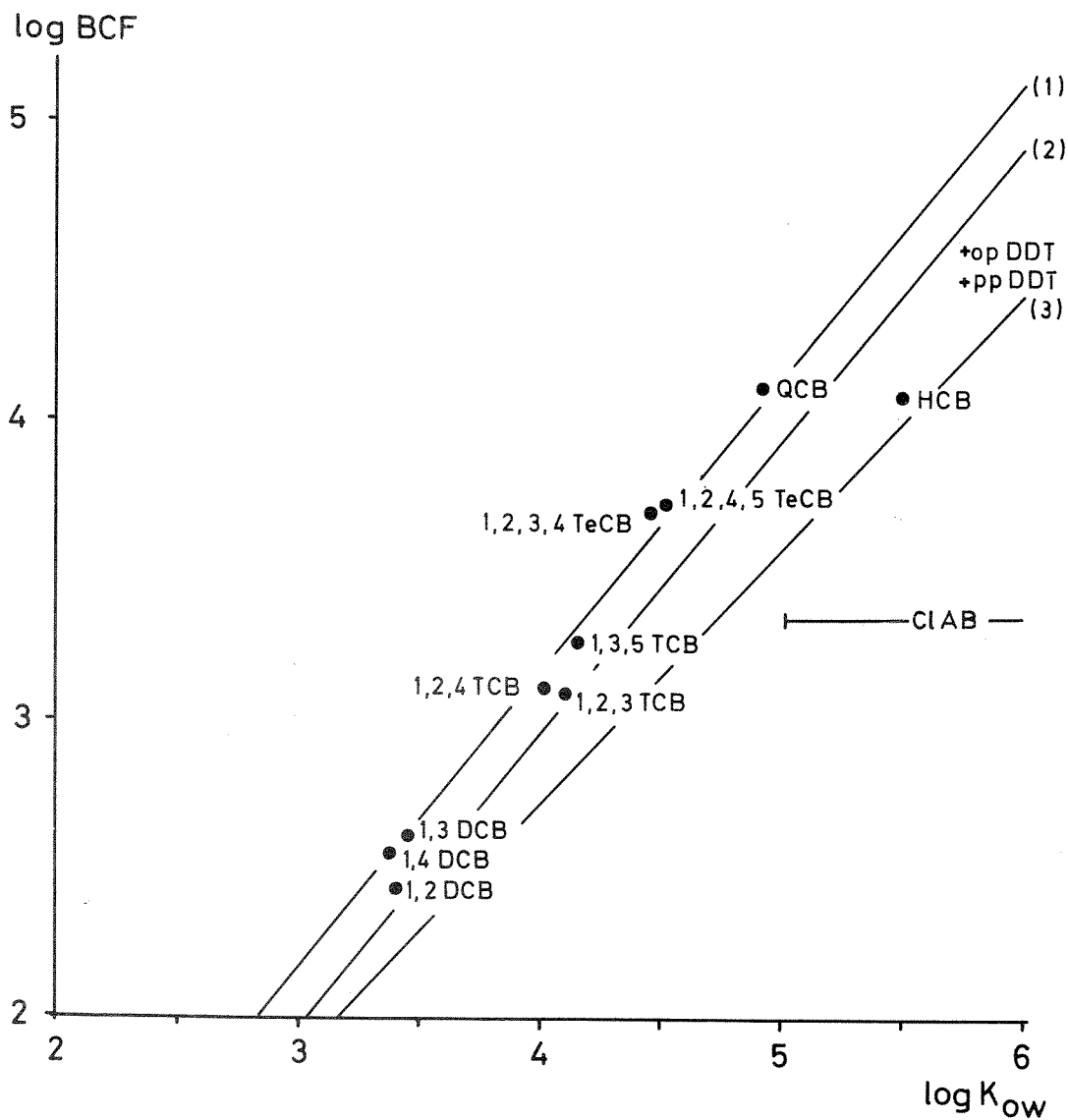


Fig. 27 Sammenheng mellom BCF og $\log K_{ow}$ for KAB sammenlignet med klorerte bensener (Oliver and Niimi 1983) og DDT (Veith et al. 1979). Regresjonsligninger fra de refererte arbeidene og fra Oliver and Niimi (1984) er tegnet inn.

8 NEDBRYTNING MED ADAPTERTE BAKTERIER

Hensikten med denne undersøkelsen var å finne ut om mikroorganismer som er adaptert til KAB, er i stand til å bryte ned KAB.

8.1 Metode

Inokulum: Vann fra Akerselva og Frognerkilen, avrenningsvann fra Falconbridge og et jordfiltrat ble blandet sammen. Blandingen ble sentrifugert ned, pelletten inneholdende mikroorganismer ble slemmet opp i fysiologisk vann og brukt som adaptasjonskultur.

Adaptasjon: Rystekolber ble tilsatt 150 ml næringsmedium bestående av salter + gjærekstrakt (Medium A), bakterier og KAB ekstrakt (~4.6 mg). Hver uke ble 50 ml av adaptasjonskulturen overført til nye rystekolber med næringsmedium og KAB (~4.6 mg).

Test-

betingelser: KAB-ekstraktet ble satt på glassperler og filtrérpapir. Ved tilsetning på glassperler, ble ca 5 g glassperler à 1 mm i diameter overført til rystekolbe. KAB ekstraktet ble så dryppet direkte på glassperlene i rystekolbene. Løsningsmidlet ble dampet bort før tilsetning av næringsmediet og bakterier. Ved tilsetning på filtrérpapir ble KAB ekstraktet tilsatt på Gelman glassfiberfilter (25 mm prod. no 61630). Løsningsmidlet ble så dampet bort før filteret ble overført til rystekolber. Næringsmediet og bakterier (1×10^4 - 1×10^5 bakt/ml) ble tilsatt. Forsøket ble utført over 0-6 uker, med varierende næringsmengde i mediet. Noen av prøvene ble repetert én gang, for å sjekke reproduserbarheten av forsøket. Ikke nedbrutt KAB ble ekstrahert ut direkte i rystekolbene med cykloheksan/isopropanol (2 ganger). Forsøket ble utført mørkt ved romtemperatur i rystekolber. Tabell 11 viser en oversikt over de ulike forsøksbetingelsene.

TABELL 11

Oversikt over nedbrytningsforsøkene som er utført.

	NEDBRYTNINGSTID					
	uke 0	uke 1	uke 2	uke 3	uke 4	uke 6
4.0 mg KAB Filterpapir Medium A	1	1	1	1	1	
4.0 mg KAB* Filterpapir Med. A + Na acetat	1	1	1	1	1	
4.0 mg KAB Glassperler Medium A	2				2	1**
4.0 mg KAB Glassperler Medium B	1	1	1	1	1	1
4.0 mg KAB Glassperler Medium C	1			1	1	1**

Hvert forsøk er utført med to paralleller, unntatt **, kun én parallell.

Medium A : Næringssalter + gjærekstrakt.

Medium B : Medium A, uten gjærekstrakt.

Medium C : Medium A, med 10x gjærmengde.

8.2 Resultater

8.2.1 Doseringsteknikker (innledende forsøk)

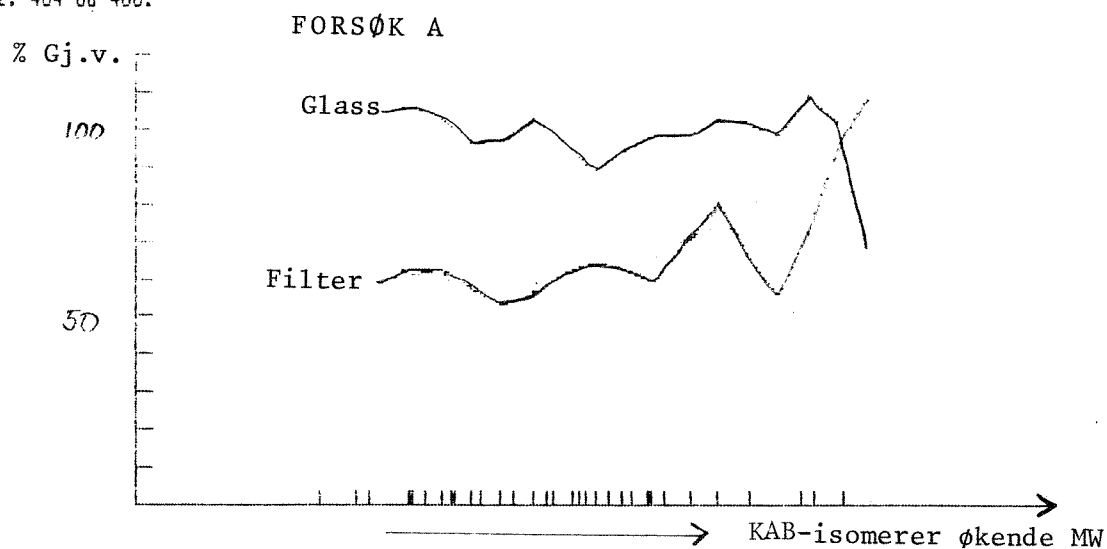
KAB-ekstraktet, 4.0 mg KAB, ble tilsatt hver rystekolbe via glassperler eller filter.

I Fig. 28 er %-gjenvinning av de enkelte forbindelser fra de to tilsetningsmetodene angitt. Hver strek avmerket på X-aksen representerer en forbindelse med økende molekylvekt utover aksene. Ut fra disse forsøkene, som ga høyest utbytte for glassperler, ble det i hovedforsøket valgt å tilsette KAB-løsningen via glassperler til testkolbene. Fig. 29 viser % gjenvinning av KAB-forbindelser dosert via glassperler etter 0 og 4 uker (parallelle

forsøk) i rystekolber med adapterte bakterier. Dette innledende forsøket antyder en bakteriell nedbrytning, i noe varierende grad for de enkelte komponentene.

Sammenligning av null prøver for Filter, Filter-acetat og Glassperler 1.75 mg. KAB.

Prøve 482, 484 og 486.



Sammenligning av null prøver for Filter, Filter-acetat og Glassperler 1.75 mg. KAB. Parallel serie.

Prøve 483, 485 og 487

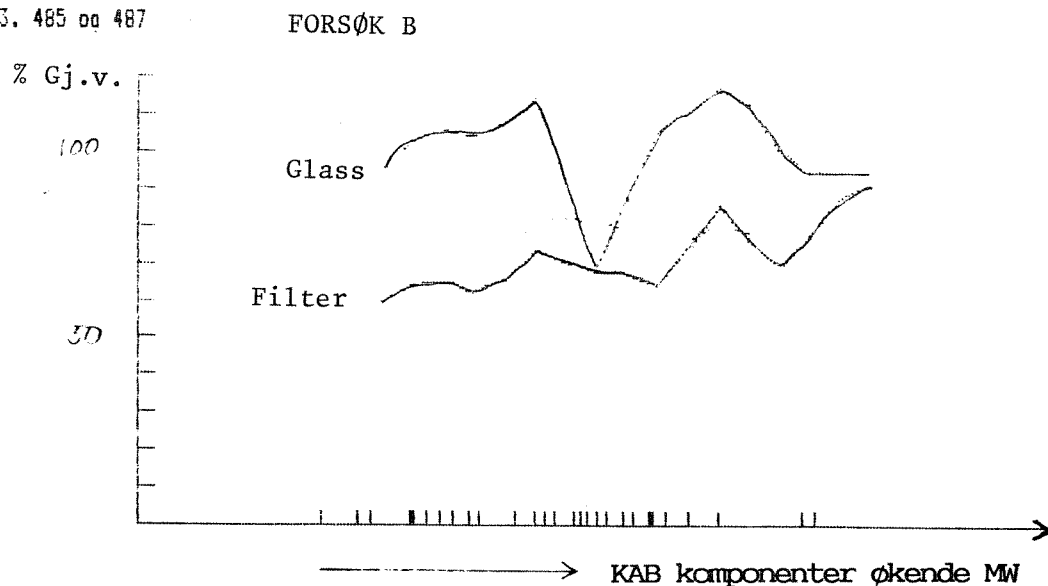


Fig. 28 Gjenvinning av KAB-komponenter (1.75 mg) via glassperler og filter filter ved tid 0. A og B viser resultatene fra to identiske forsøk

8.2.2 Bakteriell nedbrytning over tid

I de videre studiene ble det benyttet glassperler ved dosering. Konsentrasjonen ved forsøkene ble satt 10 ganger lavere enn i de innledende forsøkene, 0.40 mg til hver kolbe. I tillegg ble det kjørt en serie 0,4 og 6 uker med samme konsentrasjon som i innledende forsøk. Dette forsøket viste at reproduserbarheten var tilfredsstillende.

Fig. 30 viser gjenvinning av KAB-komponenter etter 0, 1, 2, 3, 4 og 6 uker i rystekultur med adapterte bakterier og næringsmedium A. Etter 6 uker var mindre enn 5 % igjen av de mest høymolekylære forbindelsene. De øvrige komponentene var nedbrutt evt omdannet.

Det ble også gjort forsøk med medium B som er det samme som medium A uten gjærekstrakt. Dette ble gjort for å utelukke andre karbonkilder enn KAB.

Glassperler, 0 og 4 uker, prøve 400, 421, 514 og 55

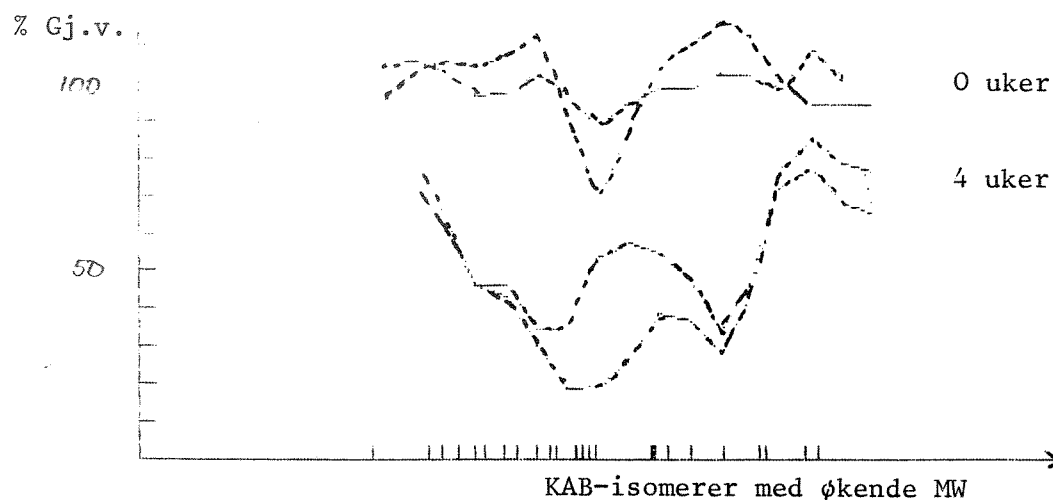


Fig. 29 Gjenvinning av KAB-komponenter (4.0 mg) dosert via glassperler ved tid 0 og etter 4 uker i rystekultur med adapterte bakterier. De to kurvene viser resultatet fra to parallelle analyseserier.

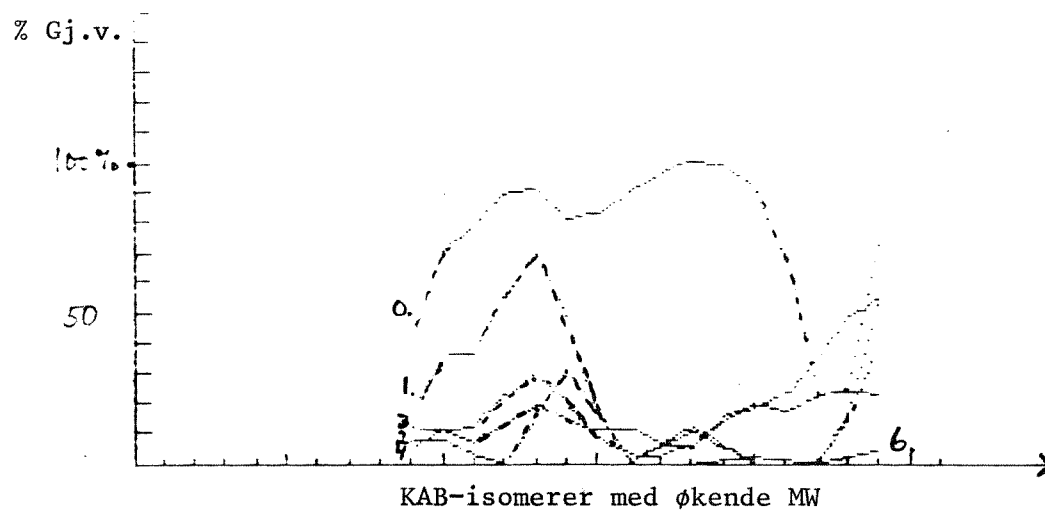


Fig. 30 Gjenvinning av KAB-komponenter i rystekultur med adapterte bakterier i næringsmedium A etter 0, 1, 2, 3, 4 og 6 uker. Næringsmedium A inneholder salter og gjærekstrakt.

Fig. 31 viser nedbrytning etter 3, 4 og 6 uker. Etter 6 uker var så godt som alle KAB-forbindelser nedbrutt evt. omdannet.

Medie B. 0, 3, 4 og 6 uker. Prøve 601, 611, 619 og 626. Paralell serier.

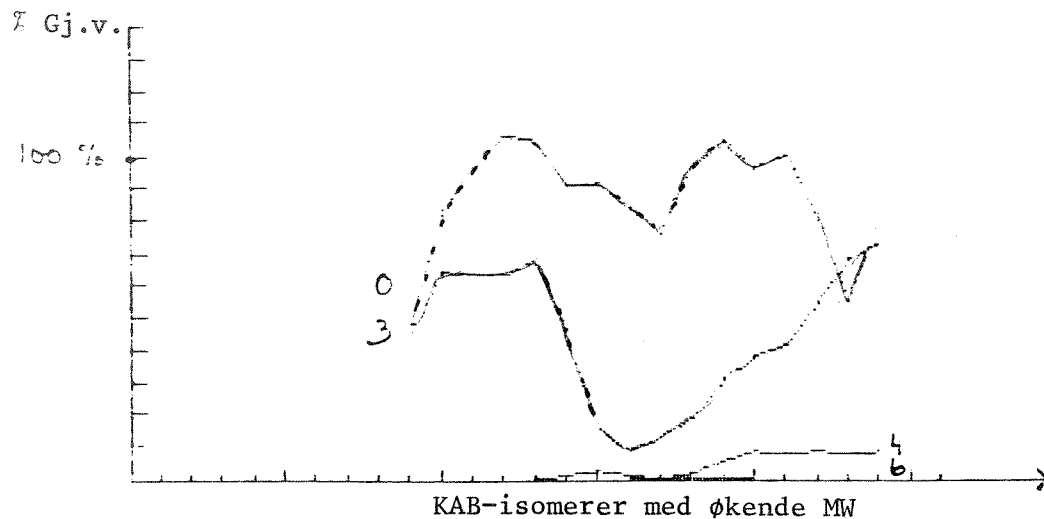


Fig. 31 Gjenvinning av KAB-forbindelser i rystekultur med adapterte bakterier i næringsmedium B etter 0, 3, 4 og 6 uker. Næringsmedium B inneholder kun salter.

Medie C. 0, 3, 4 og 6 uker. Prøve 602, 612, 620 og 627.

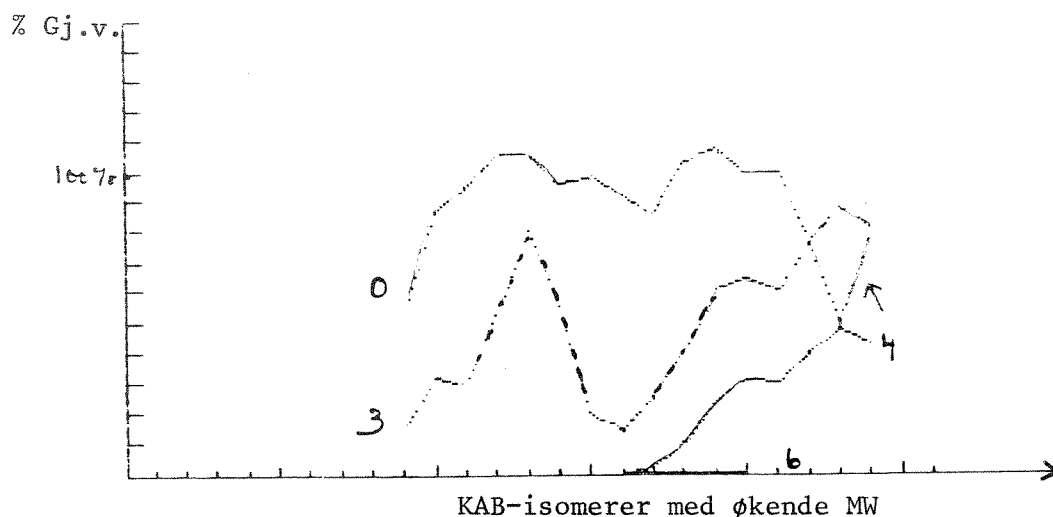


Fig. 32 Gjenvinning av KAB-komponenter i rystekultur med adapterte bakterier i næringsmedium C etter 0, 3, 4 og 6 uker. Næringsmedium C inneholder 10x mer gjærekstrakt enn medium A.

Forsøk med medium C, dvs. medium A med 10 ganger høyere konsentrasjon av gjærekstrakt, viser stort sett det samme forløpet som for de øvrige mediene.

For å undersøke eventuell naturlig nedbrytning av KAB ble det gjort et blindforsøk hvor alle betingelsene var identiske (medium A, 0.4 mg KAB), bortsett fra at bakteriene ble drept med 0.08 % Na-azid.

Fig. 33 viser at KAB-komponentene ikke brytes ned eller omdannes i løpet av 8 uker og at de enkelte forbindelsene lar seg ekstrahere ut fra 80 til 100%.

8.3 Konklusjon

Resultatene viser at KAB blir praktisk talt fullstendig nedbrutt/omdannet av adapterte bakterier i løpet av 6 uker og kontrollforsøket viste at det virkelig hadde foregått en reell nedbrytning, fordi når bakteriene var drept med Na-azid var fra 80-100% av KAB-forbindelsene fremdeles igjen etter 8 uker.

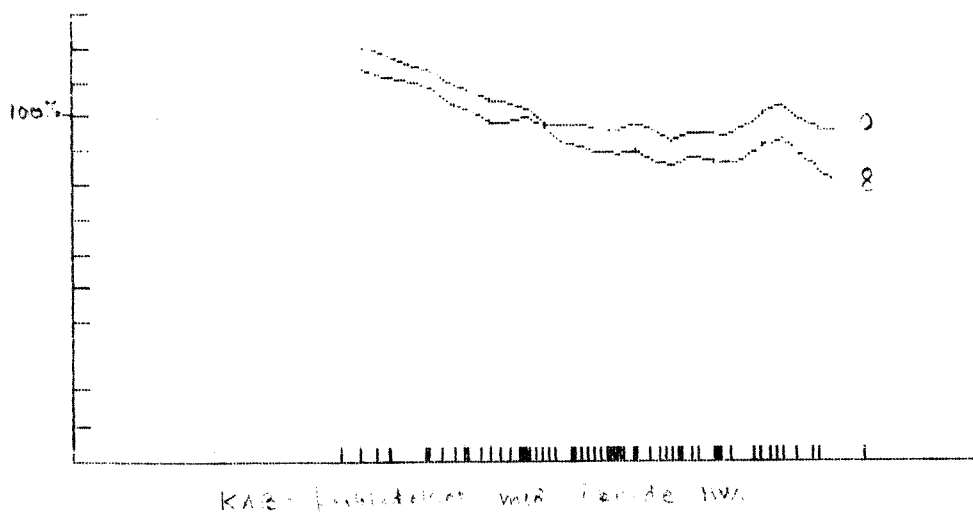


Fig. 33 Gjenvinning av KAB-komponenter i rystekultur med adapterte bakterier drept med 0.04% Na-azid. Næringsmedium A. Prøver er analysert etter 0 og 8 uker.

9. NEDBRYTING I KONTAMINERT SEDIMENT

9.1 Metode

Et eksperiment ble utført for å studere nedbryting av KAB-komponenter til stede i naturlig kontaminert sediment under simulerte naturlige betingelser.

Overflatesediment fra havnebassenget utenfor Falconbridge fabrikker i Kristiansandsfjorden ble homogenisert. Ca. 25 ml vått sediment ble tilsatt separate 100 ml sentrifugeglass med teflonbelagte skrukorker, 40 i alt. Litt sjøvann ble tilsatt hver prøve og lagringsbetingelsene var $+10^{\circ}$ C og mørkt. De første uttakene viste at nedbryting av KAB-forbindelsene var svært langsom. Det ble derfor utført et tilsvarende lagringsforsøk hvor sediment fra Solbergstranda i Oslofjorden ble blandet inn i Kristiansandsfjordssediment i forholdet 2.5:1, dette for å studere om bakteriefloraen i Solbergsediment øker nedbrytingsgraden av KAB-forbindelsene.

I tillegg til å studere nedbryting av KAB-forbindelser ble også nedbryting av de øvrige hovedkomponentene av persistente klororganiske forbindelser i sediment vurdert. På et kromatogram av et sedimentekstrakt fra havnebassenget, vist i fig. 1 er klorbensener og oktaklorstyren i tillegg til de påviste KAB-forbindelsene avmerket. Det ble også foretatt en karakterisering av Kristiansandsfjordssedimentet hvor mengden ekstraherbart persistent organisk klor (EPOCl) ble sammenholdt med mengden av de enkelte klororganiske forbindelsene.

Sedimentekstraktene ble fremstilt etter samme retningslinjer som fremstilling av KAB-ekstraktet (2.1). Elementært svovel ble effektivt fjernet med Cu-folie før den gaskromatografiske analysen.

Ekstrakter av start-sediment fra begge forsøksserier ble benyttet som referenser og prosent mengde ikke nedbrutt av enkeltkomponentene ble bestemt i forhold til startløsningene. Aliquoter av startløsningene ble oppbevart i forseglete ampuller ved -20° C. Og ved hvert uttak fra 1 ukes lagringstid frem til noe over 5 mnd for rent Kristiansandsfjordssediment og ca. 2 1/2 mnd. for prøvene innblandet sediment fra Solbergstranda ble ekstraktene, paralleller for hvert uttak, kvantifisert mot parallelle aliquoter av de respektive startløsningene. KAB-komponentene kodet 4,5,6,8,9,10,11 og 12, konf. tabell 1, ble benyttet for kvantifisering.

Bakterieaktivitet i sedimentene ble målt ved fluorescensmikroskopi etter

acridin-farging av sedimentprøver fortynnet i sterilt destillert vann. Det ble tatt ut to prøver av sediment fra Kristiansandsfjorden etter måneders inkubering, og en prøve fra blandet sediment (Solbergstrand/Kristiansandsfjorden) etter måneders inkubering.

9.2 Resultater

Start-sediment fra Kristiansandsfjorden inneholdt 17 µg/g ekstraherbart persistent organisk klor på våtvektsbasis. Klormengden knyttet til identifiserte klorforbindelser utgjorde ca 28% av totalmengden (EPOC1), konf. tabell 12.

TABELL 12

Persistente klororganiske forbindelser i Kristiansandsfjord-sediment ved start av nedbrytningsforsøket.

	Start-sediment (µg/gram)*
EPOC1	17
1.2.3.-triklorbensen	0.4
1.2.4.-triklorbensen	0.1
1.2.3.4-tetraklorbensen	0.1
pentaklorbensen	0.5
heksaklorbensen	1.9
oktaklorstyren	0.1
PCB	<0.2
Decaklorbifenyyl	0.02
Σ KAB forbindelser benyttet i nedbrytningsberegningene	5.2
Klor knyttet til identifiserte forbindelser i % av EPOC1	28%
% - tørrstoff	29.5%

* Våtvektsbasis

Gjennomsnittsverdier for ikke nedbrutt mengde i prosent etter økende lagringstid, for de påviste enkelt-KAB-forbindelsene samt de øvrige klororganiske forbindelsene er gitt i tabell 13. Usikkerheter i analysene medfører at enkelte av analysene viser gjennomgående høye eller lave verdier for alle komponenter. Kontroll av tørrstoffinnhold i prøvene viser at variasjonene ikke skyldes forskjeller i mengden prøvemateriale som er tatt ut til analyse. Til tross for variasjonene viser resultatene at det ikke er noen nedadgående trend i konsentrasjonene av noen av de analyserte komponentene. Etter 23 ukers lagringstid var fra 80 til over 90% for alle de identifiserte komponentene ikke nedbrutt i sedimentet fra Kristiansandsfjorden. Innblanding av sediment fra Solbergstranda (tabell 14) synes ikke å påvirke nedbrytingen nevneverdig.

Bakterietellingene viste et innhold av 720-1440 mill. celler/g tørrstoff i Kristiansandsfjordssedimentet etter 7 måneders inkubering. I en av prøvene med blandet sediment fra Solbergstrand og Kristiansandsfjorden ble det etter 4 måneders inkubering funnet 160-240 mill. celler/g tørrstoff. Resultatene tyder på at bakteriekonsentrasjonen i sediment fra Kristiansandsfjorden er høyt, til tross for høyt innhold av metaller og organiske miljøgifter.

Når det ikke skjer en nedbrytning av KAB i sedimentet under tilnærmet naturlige betingelser til tross for at adapterte bakterier er vist å kunne bryte ned disse forbindelsene, må forholdene i sedimentet være uegnet for nedbrytning. Testen med adapterte bakterier, hvor nedbrytning fant sted, skjedde med god oksygentilførsel, med tilsatt næring og ved forholdsvis høy temperatur.

9.3 Konklusjon

Resultatene av nedbrytningsforsøkene tyder på at nedbrytingen av KAB i bunnsediment er ubetydelig under naturlige betingelser i Kristiansandsfjorden. Den nedbrytning som ble påvist i testen med adapterte bakterier har sannsynligvis liten praktisk betydning i resipienten, men kan gi mulighet for utvikling av en prosess for rensing av KAB-holdig avfall eller avløpsvann.

Tabell 13. Naturlig nedbryting i kontaminert sediment, Kristiansandsfjorden, høst 1
% ikke nedbrutt.

Kode	Lagrings- tid(Uker)	1.2.3- 3CB	1.2.4- 3CB	1.2.3.4- 4CB	5CB	HCB	OCS	KAB-4	KAB-5	KAB-6	KAB-8	KAB-9
K (1-2)	1	i. a.	i. a.	i. a.	i. a	i. a	i. a	111	113	117	115	114
K (3-4)	5	64	63	66	69	66	70	67	69	75	82	82
K (5-6)	9	80	78	81	94	88	84	83	84	83	96	96
K (7-8)	13	94	109	99	94	94	102	83	84	89	98	98
K(9-10)	17	84	78	87	89	87	98	88	88	84	98	88
K(10-11)	23	104	99	103	89	101	100	96	97	98	104	97

i. a. = ikke analysert

Tabell 14. Naturlig nedbryting i kontaminert sediment, Kristiansandsfjorden, innblandet sediment, Solbergstranda, 1986 (1:2.5), % ikke nedbrutt.

Kode	Lagrings- tid(Uker)	1.2.3- 3CB	1.2.4- 3CB	1.2.3.4- 4CB	5CB	HCB	OCS	KAB-4	KAB-5	KAB-6	KAB-8	KAB-9
KS(1-2)	0	74	104	83	95	97	97	100	102	104	111	103
KS(3-4)	1	68	49	66	66	72	68	75	77	79	71	79
KS(5-6)	2	77	77	43	81	96	81	97	100	90	106	94
KS(7-8)	3	73	73	43	75	85	84	86	84	89	78	91
KS(9-10)	10	105	63	102	95	100	102	108	104	114	121	114

10 REFERENSER

Abernethy, s., A.M. Bobra, W.Y. Shiu, P.G. Wells and D. Mackay (1986). Acute lethal toxicity of hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons to two planktonic crustaceans: The key role of organism-water partitioning. *Aquatic Toxicology* Vol. 8, pp. 163-174

Calamari, D., S. Galassi, F. Setti and M. Vighi (1983). Toxicity of selected chlorobenzenes to aquatic organisms. *Chemosphere* Vol. 12, No. 2, pp. 253-262

Carlberg, G. E., K. Martinsen, A. Kringstad, E. Gjessing, M. Grande, T. Källqvist and J.U. Skåre (1986). Influence of aquatic humus on the bioavailability of chlorinated micropollutants in atlantic salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 15, pp. 543-548

Carlberg, G. E., T. Sletten og T. Källqvist (1987). OECD's Cematic Testing Programme anvendt på trikresylfosfat-produktet Pliabrac 521. SI-rapport 840308-4, 20 s.

Dave, G., B. Damgaard, M. Grande, J.E. Martilin, B. Rosander and T. Viktor (1987). Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish. (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 9, pp. 61-71

Devalliers, J. and P. Chambon (1986). Acute toxicity and QSAR of chlorophenols on Daphnia magna. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* Vol 32, pp. 599-605

Galassi, S. and M. Vighi (1981). Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere* Vol. 10, pp. 1123-1126

Hattula, M. L., V.-M. Wasenius, H. Reunanen and A.U. Arstila (1981). Acute toxicity of some chlorinated phenols, catechols and cresols to trout. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, Vol. 26, pp. 295-298

Heitmuller, P.T., T. A. Hollister and P.R. Parrish (1981). Acute toxicity of 54 industrial chemicals to sheephead minnows (Cyprinodon variegatus). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* Vol. 27, pp. 596-604

Kenaga, E.E. and C.A.I. Goring (1980). Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and bioconcentration of chemicals in biota. *Proceedings at American Aquatic Toxicity Symposium*, October 17-18,, New Orleans. ASTM, Philadelphia STP 707.

Kirkegaard and L. Renberg (in prep.) Statens Naturvårdsverk, Solna Sverige.

Källqvist, T (1984). Biotester. I: Vennerød, K. (red.) Vassdragsundersøkelser. En metodebok i limnologi. Universitetsforlaget s. 252-267

Martinsen, K. og L. Kirkerud. Akkumulering av 1,2,4-triklorbensen og 2,4,5-triklorbifenyli i blåskjell ved korttidstest. NORDFORSK. Ekotoksikologiske metoder for akvatisk miljø. Rapport 13, 12 s. 1980

Martinsen, K. A. Kringstad and C.E. Carlberg (in press) Methods for determination of sum parameters and characterization of organochlorine compounds in spent bleach liquors from pulp mills and water, sediment and biological samples from receiving waters. Submitted to Water Science and Technology.

Menzel, D.W., J. Anderson and A. Randtke (1970). Marine phytoplankton vary in their response to chlorinated hydrocarbons. Science vol. 167, pp. 1724-1726

Moulton, M.P. and W. Schultz (1986). Comparisons of several structure-toxicity relationships for chlorophenols. Aquatic Toxicology Vol. 8, pp. 121-122

Oliver, B.G. and A.J. Niimi (1983). Bioconcentration of chlorobenzenes from water by rainbow trout. Correlation with partition coefficients and environmental residues. Environmental Science and Technology Vol. 17, pp. 287-291

Oliver, B.G. and A.J. Niimi (1984). Rainbow trout bioaccumulation of some halogenated aromatics from water at environmental concentrations. Environmental Toxicology and Chemistry Vol. 3, pp. 271-277

Prosjektutvalg for Økotoksikologisk Forskning (1984). Økotoksikologisk testing av miljøgifter. Klorerte alkylbensener. Fagrapport 1/84. 39 s.

Prosjektutvalg for Økotoksikologisk Forskning (1985). Økotoksikologisk testing av miljøgifter. Klorerte alkylbensener. Fagrapport 1/85. 83 s.

Ribo, J.M. and K.L.E. Kaiser (1983). Effects of selected chemicals to photoluminiscent bacteria and their correlation with acute and sublethal

effects on other organisms. Chemosphere Vol. 12, pp. 1421-1442

Veith, G.D., D.L. DeFoe and B.V. Bergstedt (1979). Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. J. Fish. Res. Board Can. Vol. 36, pp. 1040-1048

Wurster, C.F. Jr. (1968). DDT reduces photosynthesis by marine phytoplankton. Science Vol. 159, pp. 1476-1475

KOMPONENTFORDELING VED BIOLOGISKE TESTER

Mengden KAB festet på flaskeveggen og tilstede i testløsningen ved de enkelte testene er bestemt for testflaskene benyttet til:

Inhibering av oksygenopptak, kap. 3.1, Ferskvannsalgetest, kap. 3.2, Rurtest, kap. 3.3.2, og Nedbrytbarhetstest, kap. 4.1. Det er bare fem av hovedkomponentene som er benyttet ved beregningen: Komponent nr 4, triklor-C₃-alkylbensen, komponentene 5/6, triklor-C₃-alkylbensen/triklor-C₄-alkylbensen, og komponentene 11 og 15, tetraklor-C₃-alkylbensener.

RESULTATER:

Inhibering av oksygenopptak; akutt test, ISO.

KAB-løsningen i aceton ble uttatt med glass-pipette, trukket opp og ned i pipetten 3 ganger for eventuelt å mette glassveggene med KAB, før testporsjonen ble tilsatt direkte til flasken. Tilsatsen av KAB til denne flasken var beregnet til å være 53 mg/L. Testtiden er maksimalt 3 timer, og analyse for KAB i flasken skulle startes 3 timer etter tilsetningen.

Flaske kode	Komponent nr	Gjenfunne mengder av komponentene,mg/L	Prosent gjenfunnet	
			Totalt	I testløsningen
FT4	4	2.8	35	35
	5/6	4.6	35	35
	11	10.	36	36
	15	4.6	41	41

Testtiden var her så kort at det ikke var tale om at noe av teststoffet kunne være tapt ved nedbrytning. Likevel fant man igjen bare opp til 41% av de tilsatte komponenter. Alt det gjenfunne materialet befant seg i testløsningen.

Test for lett eller fullstendig nedbrytbarhet

I denne testen var teststoffet i kontakt med mikroorganismer i testløsningen i 49 døgn. Oksygenforbruket i testflaskene nr 11 og 12 (se side 28 i Fagrapport 1/84) indikerte en mulig nedbrytning av KAB, mens det i de øvrige testflaskene ikke var tegn som tydet på at nedbrytning av KAB hadde funnet sted.

KAB ble tilsatt flaskene ved å måle et bestemt volum acetonekstrakt, og så dryppe ekstraktet ned på et stykke glassfiberfilter. Etter avdamping av acetonen under avtrekk i værelsestemperatur, ble glassfiberfilteret lagt ned i testløsningen. Etter noen timers omrøring løste glassfibrene seg opp og ble jevnt dispergert i testløsningen. Det er en teoretisk mulighet for at noe KAB kan ha fordampet sammen med acetonen før filteret ble lagt ned i testflasken, men etter dette kan ikke KAB ha forsvunnet ut av systemet, bortsett fra ved nedbrytning. Beregnet tilsatt mengde KAB var 33 mg/l.

Flaske 7 inneholdt KAB + trimetylbensen (TMB), og podemateriale som tidligere hadde nedbrutt TMB.

Flaske 10 inneholdt KAB + TMB, og vanlig BOD-podemateriale.

Flaskene 11 og 12 inneholdt KAB og vanlig BOD-podemateriale.

Flaske 14 inneholdt KAB og TMB-adaptert podemateriale.

Flaske nr	Komponent nr	Gjenfunne mengder av komponenter,mg/l	Prosent gjenfunnet	
			Totalt	I testløsningen
7	4	1.8	63	7
	5/6	3.0	66	6
	11	6.4	64	4
	15	1.6	70	3
10	4		52	25
	5/6		60	19
	11		34	3
	15		36	1
11	4		39	21
	5/6		39	19
	11		31	3
	15		30	1
12	4		32	15
	5/6		43	14
	11		25	2
	15		28	1
14	4		61	11
	5/6		62	12
	11		51	2
	15		51	0.5

Laveste gjenfinningsgrad hadde de to flaskene som også viste tegn på at nedbrytning hadde funnet sted, flaskene 11 og 12. Den maksimale gjenfunne mengde komponent var 70% av den beregnede, tilsatte mengde. Dette ble funnet for flaske 7, som også var den eneste av de undersøkte flaskene som hadde hovedmengden av alle komponentene adsorbent på testflaskenes vegger.

Konklusjon:

Hensikten med disse forsøkene var å bestemme hvor stor mengde KAB som var tilgjengelig for testorganismene i gifttestene, og hvor mye innholdet av KAB var blitt redusert i løpet av 49 døgn i nedbrytbarhetstesten. Resultatene hittil viser at testsubstansen bør injiseres direkte i testløsningen. På den måten er man i hvert fall sikret at den nominelle

konsentrasjonen virkelig er tilstede i testkaret ved begynnelsen av testen. Det er imidlertid alltid vanskelig å definere den virkelige eksponeringskonsentrasjonen som organismen er utsatt for ved tester av sterkt lipofile forbindelser. Disse vil i høy grad adsorberes til overflater i testsystemet. Konsentrasjonene i vann vil derfor være lavere enn den nominelle. Hvis man ser på fordelingen av teststoffet mellom ulike faser (glassvegger, vann organismer) som en likevekt, vil imidlertid mere av den mengde som er å finne i vannfasen være tilgjengelig for organismen. Det forefaller derfor mere relevant å basere beregningen av toksisitet på nominelle konsentrasjoner enn på analyserte konsentrasjoner i vann.

Andre prosesser, f. eks. mikrobiell eller fotokjemisk nedbrytning, eller fordamping, kan redusere stoffmengden i testsystemet slik at den virkelige eksponeringen blir lavere enn den nominelle. For KAB kan man imidlertid regne med at disse prosessene er av liten betydning i tester av kort varighet.