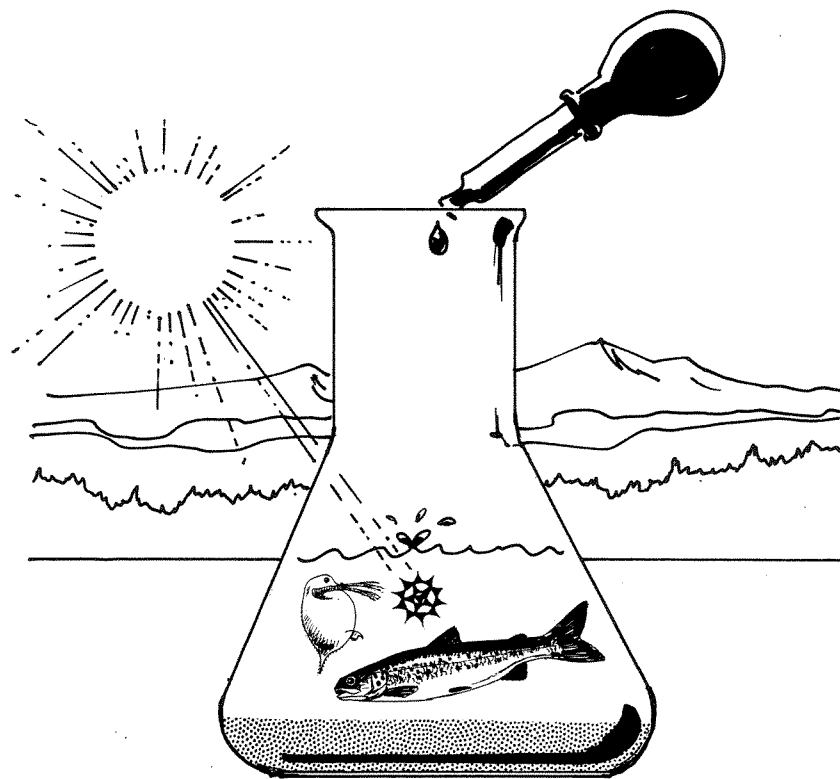


O-92170

Økotoksikologisk karakterisering av avløpsvann fra  
**Apothekernes Laboratorium**



# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Prosjektnr.:	Undernr.:
O-92170	
Løpenr.:	Begr. distrib.:
2832	

<b>Hovedkontor</b> Postboks 69, Korsvoll 0808 Oslo 8 Telefon (47 2) 18 51 00 Telefax (47 2) 18 52 00	<b>Sørlandsavdelingen</b> Televeien 1 4890 Grimstad Telefon (47 41) 43 033 Telefax (47 41) 44 513	<b>Østlandsavdelingen</b> Rute 866 2312 Ottestad Telefon (47 65) 76 752 Telefax (47 65) 76 653	<b>Vestlandsavdelingen</b> Thormøhlensgt 55 5008 Bergen Telefon (47 5) 32 56 40 Telefax (47 5) 32 88 33	<b>Akvaplan-NIVA A/S</b> Søndre Tollbugate 3 9000 Tromsø Telefon (47 83) 85 280 Telefax (47 83) 80 509
--	---	--	---	--

Rapportens tittel: Økotoksikologisk karakterisering av avløpsvann fra Apothekernes Laboratorium A.S.	Dato:	Trykket:
	19.12.92	NIVA 1993
Forfatter(e): Torsten Källqvist Berit Holestøl (SI)	Faggruppe:	Geografisk område:
	Miljøtoksikologi	
	Antall sider:	Opplag:
	35	25

Oppdragsgiver: Apothekernes Laboratorium A.S.	Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.): E.M. Haram 15/9-92
--	--

Ekstrakt:  
Avløpsvann fra produksjon av 4 ulike produkter ved Apothekernes Laboratorium er blitt karakterisert med hensyn til giftighet, biologisk nedbrytbarhet og potensiale for bioakkumulering. Karakteriseringen viser at de organiske hovedkomponentene i samtlige avløpsvann er lett nedbrytbare. Toksisiteten målt med Microtox var lav for tre av avløpsvannene. Det fjerde inneholdt en toksisk komponent som var lite stabil. Alle avløpsvannene inneholder en mindre fraksjon av potensielt bioakkumulerbare, lipofile organiske forbindelser.

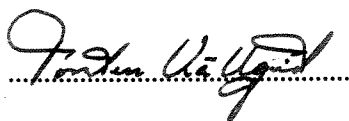
4 emneord, norske

1. Farmasøytisk industri
2. Toksisitet
3. Nedbrytbarhet
4. Bioakkumulering

4 emneord, engelske

1. Pharmaceutical Industry
2. Toxicity
3. Biodegradation
4. Bioaccumulation

Prosjektleder



For administrasjonen



ISBN 82-577-2205-7

**Norsk Institutt for Vannforskning NIVA**

**O-92170**

**Økotoksikologisk testing av avløpsvann**

**fra Apothekernes Laboratorium A.S.**

Prosjektleder:	Torsten Källqvist	NIVA
Medarbeidere:	Harry Efraimsen	NIVA
	Berit Holestøl	SI

## INNHOLDSFORTEGNELSE

	side
1. Bakgrunn	3
2. Beskrivelse av avløpsvann	3
3. Testprogram	4
4. Resultat	5
4.1. Giftighet	5
4.2. Potensiell bioakkumulering	6
4.3. Biologisk nedbrytbarhet	6
5. Kommentarer	7
Vedlegg 1 Testrapporter: Microtox og potensiell bioakkumulering	
Vedlegg 2. Testrapporter: Nedbrytbarhet	

## 1. BAKGRUNN

Apothekernes Laboratorium (A.L.) henvendte seg i desember 1991 til NIVA for å få foretatt en økotoksikologisk karakterisering av delavløpsvann fra produksjon av ulike produkter. Etter forslag fra Statens Forurensningstilsyn (SFT) skulle karakteriseringen omfatte en screening-toksisitetstest (Microtox), test av biologisk nedbrytbarhet og bioakkumuleringspotensiale. Undersøkelsen ble bestilt av A.L. i brev av 15 september 1992 og arbeidet ble startet samme måned.

Karakteriseringen er utført ved Senter for Industriforskning (SI) og NIVA

## 2. BESKRIVELSE AV AVLØPSVANN

Prøvetakingen ble utført av A.L. etter et program som var godkjent av SFT (Se vedlegg 1).

Prøvene omfattet avløpsvann tatt ut ved produksjon av følgende produkter

Nr	Produkt	Prøvetakingstidspunkt
1	Flux/fludent tabletter	11/9 kl. 15.00
2	Pinex tabletter	04/9 kl. 15.00
3	Antineuralica tabletter	24/8 kl. 19.00
4	Apocillin tabletter	10/9 kl. 15.00

Prøvene ble tatt med en mengdeproporsjonal prøvetaker innstilt slik at 0.25 l prøve ble tatt ut for hver m<sup>3</sup> avløpsvann. Prøvene ble samlet i en 25 l plastbeholder, som ble tømt om morgenen de dager prøver skulle tas ut. Ved slutten av dagen ble 2 l av prøvevolumet som var samlet opp den samme dagen tatt ut på en polyetenflaske som ble plassert i fryser intill alle prøvene var tatt.

Prøve 3 (Antineuralica) ble ved en feiltagelse tatt kl. 15.00. Da det etter kl 15.00 og frem til kl. 19.00 ble foretatt vask av produksjonsutstyret, ble det i den tiden samlet opp en ny prøve som ble blandet sammen med prøven fra kl. 15.00.

Prøvene ankom nedfrosne til NIVA 15. september. De ble satt til langsom tining i kjølerom og oppbevart ved 3-4 °C til testene ble startet. Nedbrytbarhetstesten ble startet 16. september og

delprøver levert til SI for Microtokstest og bioakkumulerbarhetstest 17. september.

### 3. TESTPROGRAM

Karakteriseringen av de tre prøvene omfattet undersøkelse av gifteffekter med en screening-metode (Microtox) som er basert på hemming av lysproduksjonen i luminiserende bakterier (*Photobacterium phosphoreum*).

Toksisitetstesten utføres ved at bakteriene eksponeres for en konsentrasjonsserie av avløpsvannet fortynnet i et sjøvannsmidium. Testorganismenes respons (lysutsendelse) blir så målt etter 5 og 15 min. eksponering med et spesielt fotometer. Resultatene kan tegnes opp i et konsentrasjon/responsdiagram, som viser hvordan gifteffekten endres med konsentrasjonen av teststoffet. Fra responsdiagrammet kan den konsentrasjon som gir 50% effekt på den målte responsen utleses. Denne konsentrasjon betegnes  $EC_{50}$ . EC står her for "effect concentration".

For avløpsvann hvor toksisiteten var for lav til at  $EC_{50}$  verdien kunne bestemmes ble det benyttet en annen prosedyre (100% metoden) for å bestemme graden av lyshemming i ufortynnet avløpsvann.

Microtox-testen er utført av SI

Nedbrytbarheten av organiske forbindelser i avløpsvannet ble undersøkt i henhold til ISO/DIS 9408 (respirometrisk nedbrytbarhetstest). Ved testen måles forbruket av oksygen ved aerob nedbrytning fortløpende i 4 uker. Det biokjemiske oksygenforbruket (BOD) blir sammenlignet med det kjemiske oksygenforbruket ved oksydering med dikromat ( $COD_{Cr}$ ). Dessuten måles reduksjonen av innholdet av DOC ved analyser ved start og slutt.

Prøven ble fortynnet til 15-60 mg løst organisk karbon (DOC) pr l, i destillert vann tilsatt uorganiske salter. Et inokulum av mikroorganismer fra aktivslam ble tilsatt. Prøvene ble inkubert i lukkede, mørke flasker som var tilkoblet manometre. Karbondioksyd, produsert ved nedbrytningen ble absorbert i lut i en beholder inne i flasken. Oksygenforbruket ble avlest fortløpende på manometrene. DOC-analysene ble utført med en Dohrmann DC-190 karbonanalysator.

Organiske forbindelsers potensiale for akkumulering i biologisk materiale er hovedsakelig bestemt av lipofiliteten som kan måles med fysisk/kjemiske tester, f. eks. ved undersøkelse av

fordelingskoeffisienten oktanol/vann. Undersøkelsen av avløpsvannene ble gjort med en tynnsjikt-kromatografisk metode hvor fraksjoner med log  $P_{ow}$ -verdier fra  $10^3$ - $10^6$  og  $>10^6$  blir separert for kvantifisering med gasskromatografi.

Undersøkelse av fordelingskoeffisienten ( $P_{ow}$ ) er utført av SI.

## 4. RESULTAT

Resultater av toksisitetstester med Microtox, og tester av bioakkumuleringspotensiale er sammenstilt i vedlegg 1. Nedbrytbarhetstestene er rapportert i vedlegg 2.

### 4.1 Giftighet

Avløpsvannet fra flux/fludent var den eneste av prøvene som var toksisk i Microtox-testen, målt med normalmetoden og  $EC_{50}$ -verdien ble beregnet til 8.2 vol%. For å få en innbyrdes gradering av de lavtoksiske prøvene, ble 100% screeningtesten utført 2 dager senere. Resultatene er presentert i tabell 1, og indikerer at det er forskjeller i giftighet mellom prøvene. Verdiene er oppgitt som % lysminsking i ufortynnede prøver. Hemmingen var minst i Antineuralica og noe høyere i Pinex og Apocillin. Prøven av Flux/fludent ble tatt med også i denne testen. Toksisiteten hos Flux/fludent var da sunket slik at den var målbar også i screeningtesten. Dette indikerer at toksisiteten synker raskt med tiden (prøven var oppbevart i kjøleskap). Test av en helt fersk prøve ville derfor kanskje vist noe høyere giftighet.

Tabell 1. Lysminsking i %, målt etter 100% screeningmetoden med Microtox.

Avløpsvann	Lysminking (%)	
	5 min. eksponeringstid	15 min. eksponeringstid
Flux/fludent	71	68
Pinex	33	24
Antineuralica	7.3	23
Apocillin	53	48

## 4.2 Potensiell bioakkumulerbarhet

GC-kromatogrammene etter tynnsjikt-kromatografi viser at prøvene inneholder potensielt bioakkumulerbare stoffer med  $P_{ow}$ -verdier  $>10^3$ . Beregnede mengder i forhold til en indre standard er presentert i tabell 2. Tallene i parentes viser den bioakkumulerbare fraksjonen av ekstraherbart organisk stoff, bestemt som areal av GC-kromatogrammer.

Tabell 2. Ekstraherbart organisk stoff og fraksjoner av dette med  $P_{ow}$   $10^3$ - $10^6$  og  $>10^6$

Prøve	Fraksjon før tynnsjikt	Log $P_{ow}>10^6$ Fraksjon 1	Log $P_{ow}$ $10^3$ - $10^6$ Fraksjon 2
Flux/fludent	1.3 mg/l	0.84 mg/l (64.6%)	$\geq 0.08$ mg/l ( $\geq 6.1\%$ )
Pinex	1.5 mg/l	1.3 mg/l (86.7%)	0.3 mg/l (20%)
Antineuralica	5.2 mg/l	5.2 mg/l (100%)	ikke påvist
Apocillin	1.3 mg/l	1.1 mg/l (84.6%)	ikke påvist

## 4.3 Biologisk nedbrytbarhet

Oksygenforbruket ved aerob nedbrytning og reduksjonen av løst organisk stoff ved nedbrytbarhetstestene vist at samtlige avløpsvann i hovedsak inneholdt lett nedbrytbart organisk stoff. I tabell 3. er verdier for kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ), biokjemisk oksygenforbruk i løpet av 28 døgn ( $BOD_{28}$ ), løst organisk karbon ved start ( $DOC_0$ ) og etter 28 døgn ( $DOC_{28}$ ) samt reduksjonen av DOC presentert.

Den høye nedbrytningsgraden vises av forholdet BOD/COD og av DOC reduksjonen. BOD/COD er over 70% med unntak for Apocillin-avløpet hvor det er 59%. DOC-reduksjonen er også lavest i Apocillin-avløpet (70%) og ellers 77-97%. Forløpet av oksygenforbruket som fremgår av figurer i vedlegg 2 viser at nedbrytningen skjer raskt uten lag-fase i starten og at mesteparten er omsatt i løpet av den første uken.

Ved karakterisering av enkelt-kjemikalier er det vanlig å bruke minst 70% reduksjon i DOC i løpet av en 28-døgnstest som grenseverdi for klassifisering som "lett nedbrytbar". Ved testing av



avløpsvann har en slik grenseverdi begrenset verdi fordi avløpsvann kan inneholde flere organiske stoffer med ulik nedbrytbarhet. Selv om >70% av DOC blir omsatt ved testen kan restfraksjonen bestå av tungt nedbrytbare forbindelser. Likevel viser testene av avløpsvannene fra Apothekernes Laboratorium at mesteparten av de organiske forbindelsene er lett nedbrytbare.

Tabell 3. Resultat fra nedbrytbarhetstester. Verdiene er angitt som mg/l ufortynnet prøve.

Avløpsvann	COD <sub>Cr</sub>	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	DOC-red
Flux/fludent	1250	1075	355	10.5	97 %
Pinex	900	647	246	56	77 %
Antineuralica	1355	1010	407	52	87 %
Apocillin	590	350	155	46	70 %

## 5. KOMMENTARER

Karakteriseringen av avløpsvann fra 4 ulike produksjoner ved Apothekernes Laboratorium har vist at disse inneholder organiske forbindelser som til største delen er lett nedbrytbare. Microtox-testene viser at giftigheten av hovedkomponentene er lav. Kun avløpsvannet fra Flux/fludent-produksjon viste >50% hemming av bakterienes lysutvikling. Den reduserte giftvirkningen ved gjentatt testing tyder på at det var en kjemisk ustabil eller lett nedbrytbar komponent som var årsak til giftvirkningen.

En liten andel av de organiske komponentene (anslagsvis 0.2-1%) i avløpsvannene ble ekstraherbart i sykloheksan. De ekstraherbare fraksjonene var til største delen lipofile organiske forbindelser med  $\log P_{ow} > 10^3$  som kan være bioakkumulerbare.

Undersøkelsen viser ikke hvorvidt de potensielt akkumulerbare forbindelsene inngår i den mindre fraksjonen av organisk stoff som ikke er lett nedbrytbar.

## VEDLEGG 1

Testrapporter:

**Microtox**

**Potensiell bioakkumulering**

NIVA  
Postboks 69 Korsvoll  
0808 Oslo 8

Att: T.Källqvist

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING	
J.nr.:	3723/92
Sak nr.:	92170
Mottatt:	25.11

## Rapport

Deres ref.  
T.K.

Vår ref.  
BHO

Direkte innvalg  
02 452824

Dato  
20.november 1992

Oppdragets tittel  
**Bestemmelse av akutt toksisitet ( Microtox ) og potensielt  
bioakkumulerbart materiale i 4 avløpsvann fra Apothekernes  
Laboratorium (AL)**

Oppdrag nr  
114404 - 012  
1 - 92- 234

### SAMMENDRAG

Microtox-bestemmelse viser at 3 av prøvene er lavtoksiske. I prøve merket "Flux" er det målt høy toksisitet men den avtar med lagringstiden.  
Ved tynnsjikt-kromatografi kombinert med GC-analyse er det påvist potensielt bioakkumulerbare substanser i alle fire prøvene.

### INNLEDNING

Den 17.09.92 ble det mottatt 4 prøver med avløpsvann fra NIVA for bestemmelse av akutt toksisitet (Microtox) og potensielt bioakkumulerbart materiale ( tynnsjikt-kromatografi og fingerprint på gaskromatografi med flammejonisasjonsdetektor, FID ).

Prøvene var merket:

- " Flux "
- " Pinex "
- " Antineuralica "
- " Apocillin "

Prøvene var ikke frosset ved mottak på SI. Det anbefales at prøvene holdes nedfrosset før analyse.

### EKSPERIMENTELT

#### Microtox

Microtox-testen ble benyttet for å undersøke om prøvene hadde toksiske effekter på bakterier. Ved metoden benyttes Photobacterium Phosphoreum, en bakterie som sender ut lys. Redusert luminescens (lysutsendelse) ved tilsetning av prøven blir målt i et spesielt fotometer etter 5 min., og 15 min. eksponering ved 15°C. Testen utføres i et sjøvannsmedium.

Bakteriene er ømfintlige for pH-variasjoner. Optimal effekt har bakteriene ved pH 6,8-7,5. Prøvene justeres derfor alltid innenfor dette området før toksisitetmålinger blir utført. For å kontrollere at bakteriene fungerer som de skal, testes de på en kontrollsubstans med kjent toksisitet ( f.eks. zinksulfat ).

Ved denne undersøkelsen ble to forskjellige microtox-metoder benyttet, henholdsvis Normalmetoden ( for toksiske prøver ) og 100%-Screening-metoden ( for lite toksiske prøver der EC<sub>50</sub>-verdien ikke kan måles ).

Bare en av prøvene var så toksisk at den var målbar med Normalmetoden. De øvrige var lavtoksiske og 100%- Screening-metoden ble benyttet.

#### Microtox-normalmetoden (se vedlegg)

Normalt benyttes normalmetoden for toksiske prøver ( Microtox TM System Operating Manual Beckman 1982). Metoden går ut på eksponere de luminescerende bakteriene ved forskjellige prøvekonsentrasjoner. (Høyeste prøvekonsentrasjon er 45 vol. % ). EC<sub>50</sub>-verdien ( den konsentrasjon som gir 50% av lysproduksjonen) blir bestemt etter plotting av målt respons mot konsentrasjonen av prøven. Data er beregnet etter Microtox manual okt.1989 " How to run the microtox calculating program on IBM PC computer ".

#### Microtox-screening-metoden. (se vedlegg)

En 100%-screening-metode blir benyttet i de tilfeller der prøvene er spesielt lavtoksiske slik at en dose/respons-kurve ikke kan oppnås. Dette betyr at målinger utført etter denne metoden bare angir % lysreduksjon i en ufortynnet prøve, ikke EC<sub>50</sub>-verdien.

#### Potensiell bioakkumulerbarhet. (se vedlegg)

Prøvene ble ekstrahert med sykloheksan ved pH ca.2. Ekstraktet ble oppkonsentrert til lite volum og analysert med gasskromatograf / fingerprint og fraksjonert ved hjelp av tyngsjiktskromatografi (TLC). TLC-fraksjonene  $P_{ow} > 10^6$  og  $P_{ow} 10^3-10^6$  ble utskrapet og ekstrahert med sykloheksan/isopropanol 1:1. Etter tilsetning av indre standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>, ble potensielt bioakkumulerbare substanser analysert på gasskromatograf med flammejonisasjonsdetektor (GC/FID).

## RESULTATER

### Toksisitet

Prøve merket "Flux" var den eneste av prøvene som var toksisk i Microtox-testen målt med Normalmetoden, (tabell 1) og EC<sub>50</sub>- verdien ble beregnet til 8,2 vol%.

For å få en innbyrdes gradering av de lavtoksiske prøvene, ble 100% Screeningtesten utført 2 dager senere. Resultatene er presentert i tabell 2. og indikerer at det er forskjeller mellom prøvene. Verdiene er oppgitt i % lysminskning i ufortynnette prøver, ikke EC<sub>50</sub>- verdier. 1

Prøve"Flux" ble også tatt med i denne testen. Toksisiteten hos "Flux" var da sunket slik at den var målbar i Screening-testen.

Dette indikerer at toksisiteten synker med tiden ( prøven var oppbevart i kjøleskap)

Det anbefales at microtox-testen tas på nytt på samtlige prøver, at de fryses umiddelbart etter prøvetaking og oppbevares frosset til microtox-testen kan utføres.

Tabell 1

Toksisitetsmåling målt etter Normalmetoden

Prøve	EC <sub>50</sub> 5 min.	EC <sub>50</sub> 15 min.
" Flux"	8,2 vol% (5,7 - 11,6)	8,4 vol% ( 5,5 - 12,9 )

Tallene i parentes angir 95% konfidensintervall.

Kontrollsubstans: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O EC<sub>50</sub>= 12,8 mg/l (11,0-15,0)

Tabell 2.

Lysminskning i (%) målt etter 100% Screening-metoden. ( Prøvene er rangert etter "giftigsgrad", mest betenkelig er "Flux" og minst "Antineuralica")

Prøve	Lysminskning(%) 5 min. eksponeringstid	Lysminskning (%) 15 min. eksponeringstid
"Antineuralica"	7,3	22,8
"Pinex"	33,0	24,3
"Apocillin"	53,0	47,9
"Flux"	71,0	67,9

Potensiell bioakkumulerbarhet

GC-kromatogrammene etter tynnsjikt-kromatografi viser at prøvene inneholder potensielt bioakkumulerbare stoffer med  $P_{ow}$ -verdier  $> 10^3$ . Beregnede mengder i forhold til en indre standard  $n-C_{18}H_{38}$  er presentert i tabell 3. Tallene i parentes viser den prosentuelle bioakkumulerbare delen ( GC-areale av TLC-fraksjonene ) som er beregnet av den ekstraherbare mengden (GC-areale av utgangsekstraktet).

Tabell 3.

Prøver	Fraksjon før tynnsjikt	Log $P_{ow} > 10^6$ Fraksjon 1	Log $P_{ow} 10^3-10^6$ Fraksjon 2
"Flux"	1,3 mg/l	0,84 mg/l(64,6%)	$\geq 0,08$ mg/l ( $\leq 6,1\%$ )
"Pinex"	1,5 mg/l	1,3 mg/l(86,7%)	0,3 mg/l(20%)
"Antineuralica"	5,2 mg/l	5,2 mg/l(100%)	ikke påvist
"Apocillin"	1,3 mg/l	1,1 mg/l(84,6%)	ikke påvist

Deteksjonsgrense før TLC = 0,03 mg/l

Deteksjonsgrense etter TLC, 1 fraksj.=0,2 mg/L

Deteksjonsgrense etter TLC, 2 fraksj. = 0,08 mg/l

Med hilsen  
Senter for Industrieforskning

*Arne Lund Kvernheim*  
Arne Lund Kvernheim

*Berit Hølestøl*  
Berit Hølestøl

Prosjektmedarbeider:Alfhild Kringstad

Vedlegg :14



## TESTRAPPORT

## Bioakkumuleringspotensial i vannprøver (grad av fettløselighet)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Flux" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode: 1 - 92 - 234 - 1  
 Oppdragsnr: 114404 - 12  
 Anm: Prøvene var ikke frosset  
 Dato: 20.11.92

**Test data:**

**Bioakkumulering:** Substanser med fordelingskonstant oktanol/vann  $\log P_{ow} > 10^3$   
**definisjon** regnes som bioakkumulerbare.

**Metode:** Utarbeidet av Lars Renberg et al\*, Statens Naturvårdsverk, Stockholm.

**Analyse:** Ekstraksjon av lipofilt materiale fra prøven med sykloheksan ved pH ca.2.  
Separasjon av ekstraktet med tynnsjikt-kromatografi (TLC) i en eller to fraksjoner med  $\log P_{ow}$ -verdier  $10^3$  og  $10^3 - 10^6$ . Standarder med kjente  $\log P_{ow}$ -verdier analyseres parallelt.  
Kvantifisering av ekstraherbare organiske komponenter i ekstraktet med gasskromatografi (GC). før og etter TLC-fraksjonering.  
 (Kvantifisering gjøres i forhold til intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>).

**Testbetingelser :** Kapillærkolonne, fused silica DB5, lengde 30m, indre diam. 0,24mm  
 for GC Starttemp. 60°C, henstand 2 min., oppvarmingstemp. 5 °C/min., sluttemp.300°C, henstand 8 min., intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>.

**Testbetingelser :** TLC-plater RP-18 F<sub>254</sub> S art. 15490, 10 X 20 cm. med  
 for TLC konsentreringszone, mobilfase aceton / vann 4:1, elueringsmiddel isopropanol / sykloheksan 1:1.  
 Standarder : dimetylfталat  $\log P_{ow}=2,11$ , benzofenon  $\log P_{ow}=3,18$ , 2,5 di(bensoxazol-2-yl) tiofen  $\log P_{ow}=6,19$ .

**Resultater:**

Prøve	Fraksjon før tynnsjikt	$\log P_{ow} > 10^6$ Fraksj.1	$\log P_{ow} 10^3-10^6$ Fraksj.2
"Flux"	1,3 mg/l	0,84 mg/l	≤0,08 mg/l

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl



## TESTRAPPORT

## Bioakkumuleringspotensial i vannprøver (grad av fettløselighet)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Pinex" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode:1-92-234-2  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI  
 Dato:20.11.92

**Test data:**

- Bioakkumulering:** Substanser med fordelingskonstant oktanol/vann  $\log P_{ow} > 10^3$   
**definisjon** regnes som bioakkumulerbare.
- Metode:** Utarbeidet av Lars Renberg et al\*, Statens Naturvårdsverk, Stockholm.
- Analyse:** Ekstraksjon av lipofilt materiale fra prøven med sykloheksan ved pH ca.2.  
Separasjon av ekstraktet med tynnsjikt-kromatografi (TLC) i en eller to fraksjoner med  $\log P_{ow}$ -verdier  $10^3$  og  $10^3 - 10^6$ . Standarder med kjente  $\log P_{ow}$ -verdier analyseres parallelt.  
Kvantifisering av ekstraherbare organiske komponenter i ekstraktet med gasskromatografi (GC). før og etter TLC-fraksjonering. (Kvantifisering gjøres i forhold til intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>).
- Testbetingelser :** Kapillærkolonne, fused silica DB5, lengde 30m , indre diam. 0,24mm  
 for GC Starttemp. 60°C, henstand 2 min., oppvarmingstemp. 5 °C/min., sluttemp.300°C, henstand 8 min., intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>.
- Testbetingelser :** TLC-plater RP-18 F<sub>254</sub> S art. 15490, 10 X 20 cm. med  
 for TLC konsentreringssone, mobilfase aceton / vann 4:1, elueringsmiddel isopropanol / sykloheksan 1:1.  
 Standarder : dimetylfталat  $\log P_{ow}=2,11$ , benzofenon  $\log P_{ow}=3,18$ , 2,5 di(bensoxazol-2-yl) tiofen  $\log P_{ow}=6,19$ .

**Resultater:**

Prøve	Fraksjon før tynnsjikt	$\log P_{ow} > 10^6$ Fraksj.1	$\log P_{ow} 10^3-10^6$ Fraksj.2
"Pinex"	1,5 mg./l	1,3 mg./l	0,3 mg./l

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl



## TESTRAPPORT

## Bioakkumuleringspotensial i vannprøver (grad av fettløselighet)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Antineuralica" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode:1-92-234 -3  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset  
 Dato:20.11.92

---

**Test data:**

**Bioakkumulering:** Substanser med fordelingskonstant oktanol/vann  $\log P_{ow} > 10^3$   
**definisjon** regnes som bioakkumulerbare.

**Metode:** Utarbeidet av Lars Renberg et al\*, Statens Naturvårdsverk, Stockholm.

**Analyse:** Ekstraksjon av lipofilt materiale fra prøven med sykloheksan ved pH ca.2.  
Separasjon av ekstraktet med tynnsjikt-kromatografi (TLC) i en eller to fraksjoner med  $\log P_{ow}$ -verdier  $10^3$  og  $10^3 - 10^6$ . Standarder med kjente  $\log P_{ow}$ -verdier analyseres parallelt.  
Kvantifisering av ekstraherbare organiske komponenter i ekstraktet med gasskromatografi (GC). før og etter TLC-fraksjonering. (Kvantifisering gjøres i forhold til intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>).

**Testbetingelser :** Kapillærkolonne, fused silica DB5, lengde 30m , indre diam. 0,24mm  
**for GC** Starttemp. 60°C, henstand 2 min., oppvarmingstemp. 5 °C/min., sluttemp.300°C, henstand 8 min., intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>.

**Testbetingelser :** TLC-plater RP-18 F<sub>254</sub> S art. 15490, 10 X 20 cm. med  
**for TLC** konsentreringssone, mobilfase aceton / vann 4:1, elueringsmiddel isopropanol / sykloheksan 1:1.  
 Standarder : dimetylfталat  $\log P_{ow}=2,11$ , benzofenon  $\log P_{ow}=3,18$ , 2,5 di(bensoxazol-2-yl) tiofen  $\log P_{ow}=6,19$ .

---

**Resultater:**

Prøve	Fraksjon før tynnsjikt	$\log P_{ow} > 10^6$ Fraksj.1	$\log P_{ow} 10^3-10^6$ Fraksj.2
"Antineuralica"	5,2 mg/l	5,2 mg/l	ikke påvist

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl





## TESTRAPPORT

## Bioakkumuleringspotensial i vannprøver (grad av fettløselighet)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Apocillin" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode:1-92-234-4  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI  
 Dato:20.11.92

---

**Test data:**

**Bioakkumulering:** Substanser med fordelingskonstant oktanol/vann  $\log P_{ow} > 10^3$   
**definisjon** regnes som bioakkumulerbare.

**Metode:** Utarbeidet av Lars Renberg et al\*, Statens Naturvårdsverk, Stockholm.

**Analyse:** Ekstraksjon av lipofilt materiale fra prøven med sykloheksan ved pH ca.2.  
Separasjon av ekstraktet med tynnsjikt-kromatografi (TLC) i en eller to fraksjoner med  $\log P_{ow}$ -verdier  $10^3$  og  $10^3 - 10^6$ . Standarder med kjente  $\log P_{ow}$ -verdier analyseres parallelt.  
Kvantifisering av ekstraherbare organiske komponenter i ekstraktet med gasskromatografi (GC). før og etter TLC-fraksjonering.  
 (Kvantifisering gjøres i forhold til intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>).

**Testbetingelser :** Kapillærkolonne, fused silica DB5, lengde 30m , indre diam. 0,24mm  
 for GC Starttemp. 60°C, henstand 2 min., oppvarmingstemp. 5 °C/min., sluttemp.300°C, henstand 8 min., intern standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>.

**Testbetingelser :** TLC-plater RP-18 F<sub>254</sub> S art. 15490, 10 X 20 cm. med  
 for TLC konsentreringssone, mobilfase aceton / vann 4:1, elueringsmiddel isopropanol / sykloheksan 1:1.  
 Standarder : dimetylfталat  $\log P_{ow}=2,11$ , benzofenon  $\log P_{ow}=3,18$ , 2,5 di(bensoxazol-2-yl) tiofen  $\log P_{ow}=6,19$ .

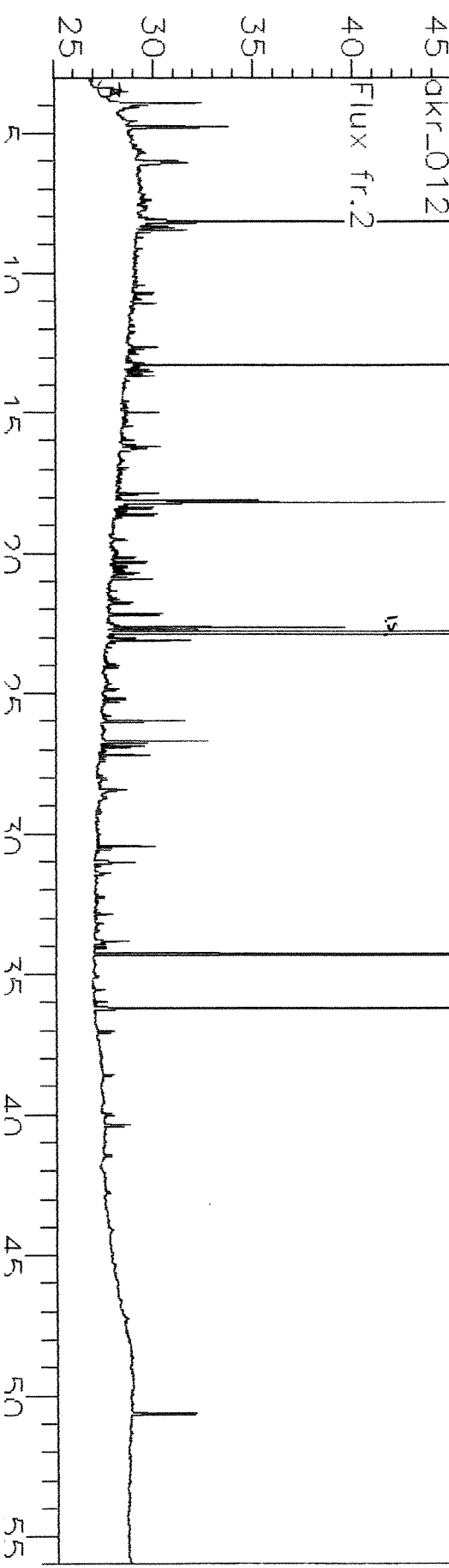
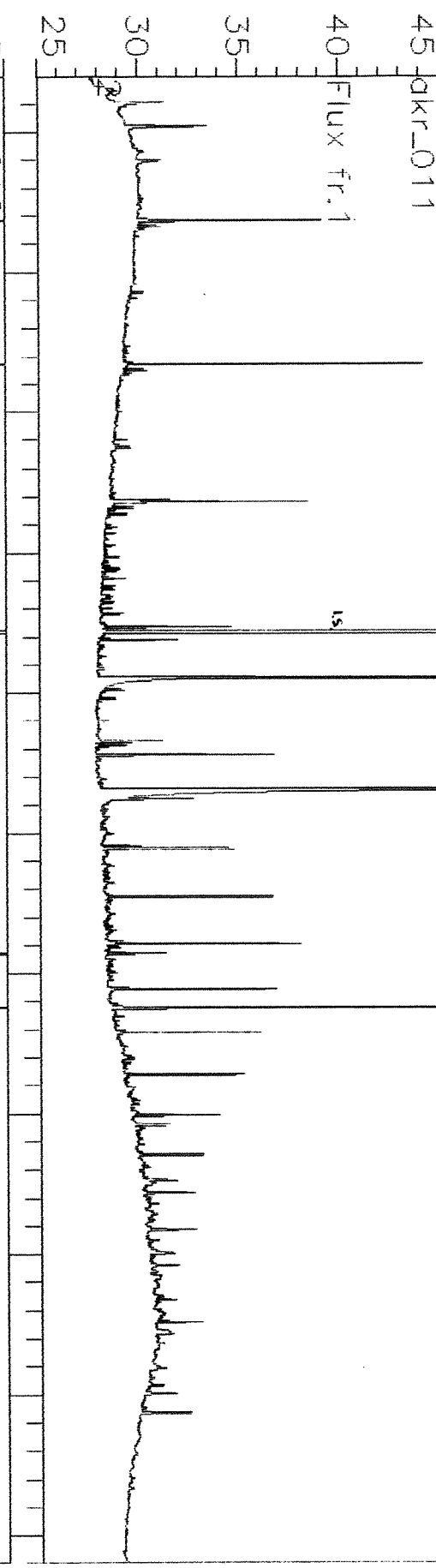
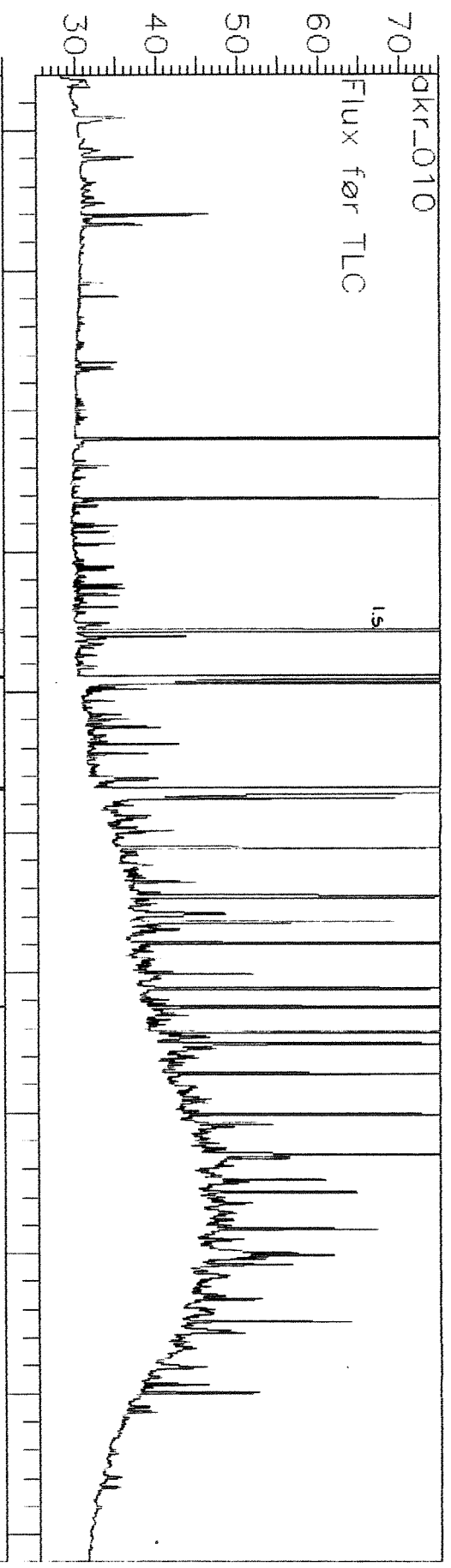
---

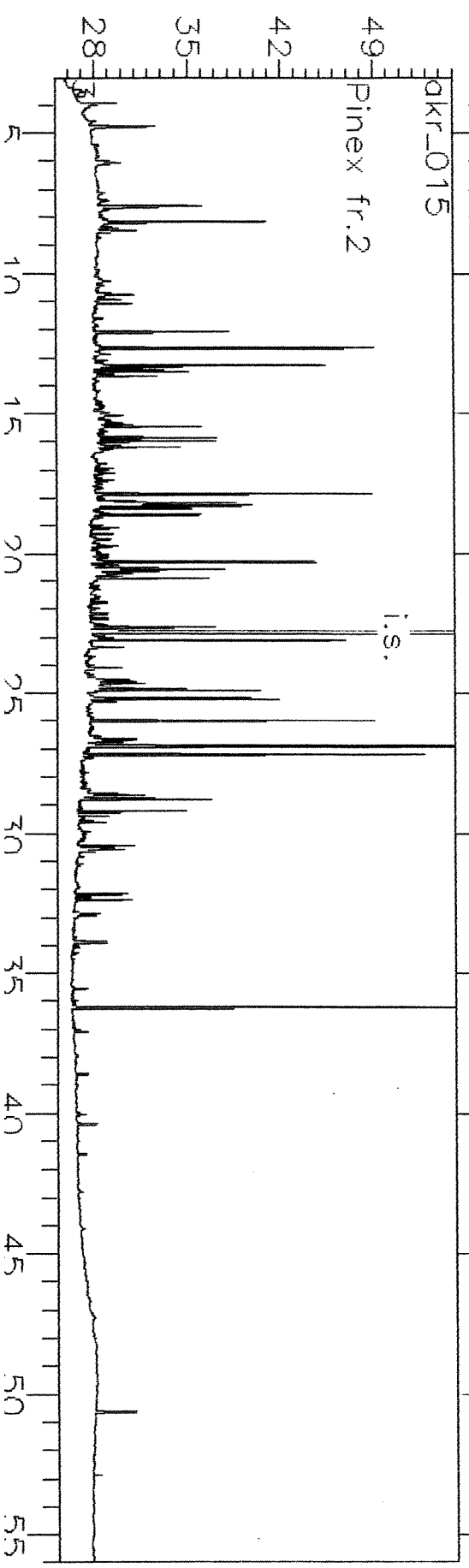
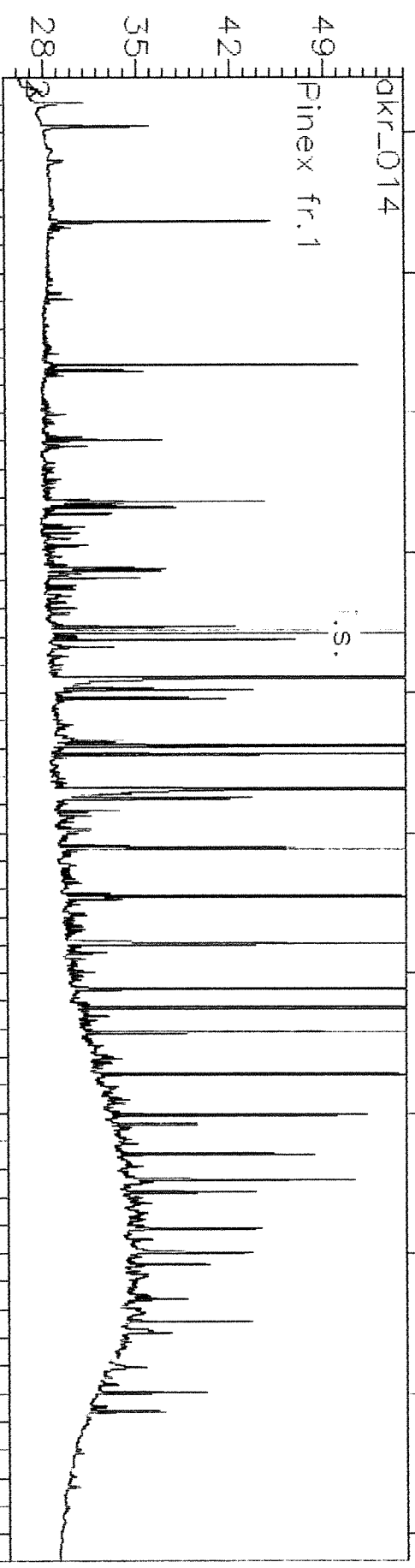
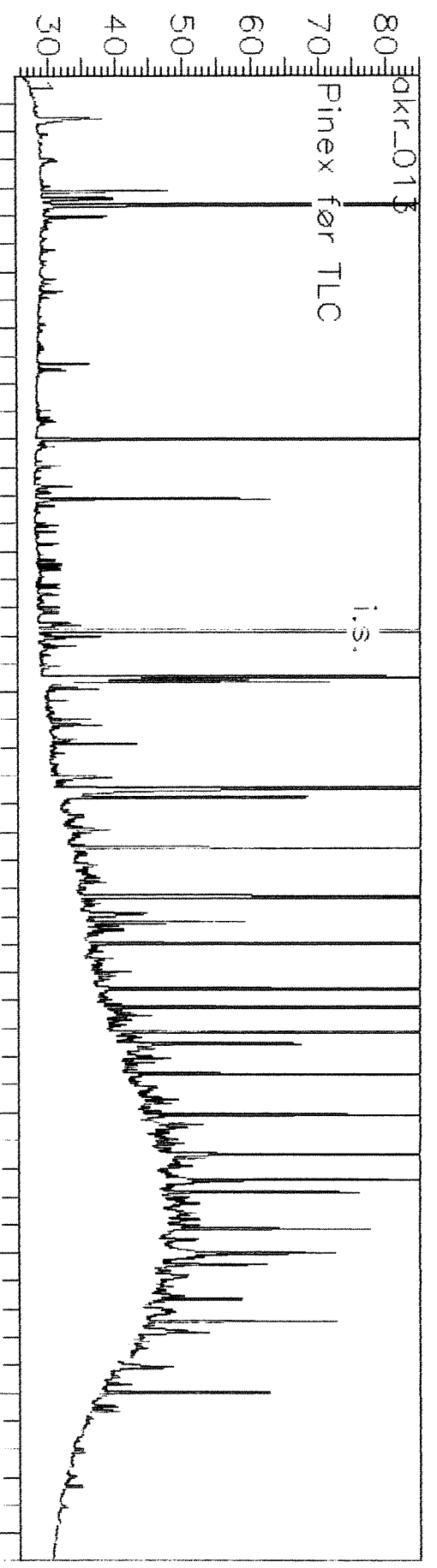
**Resultater:**

Prøve	Fraksjon før tynnsjikt	$\log P_{ow} > 10^6$	$\log P_{ow} 10^3-10^6$
		Fraksj.1	Fraksj.2
"Apolicillin"	1,3 mg/l	1,1 mg/l	ikke påvist

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

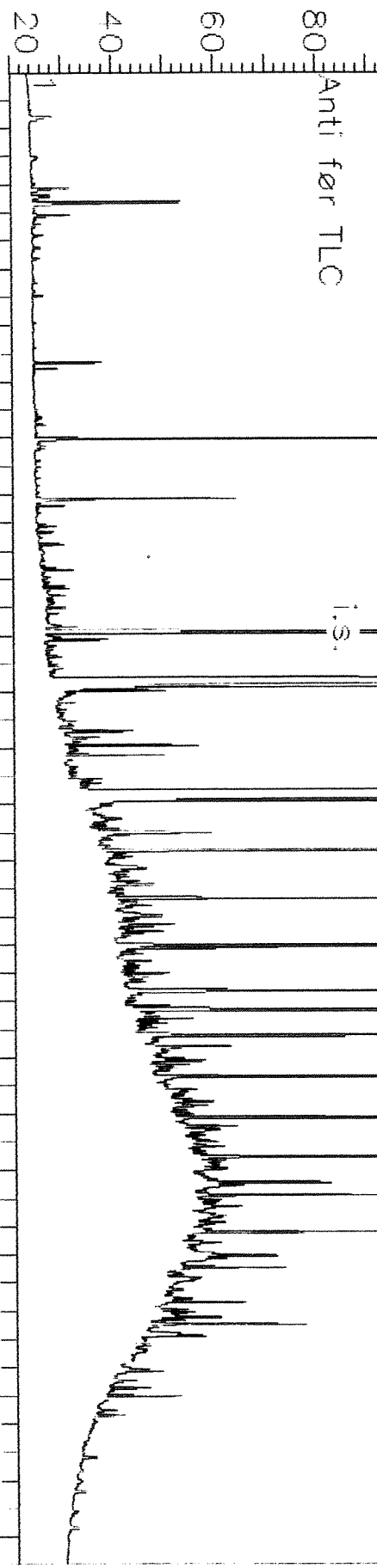
Testansvarlig: *Berit Hølestøl*  
 Berit Hølestøl





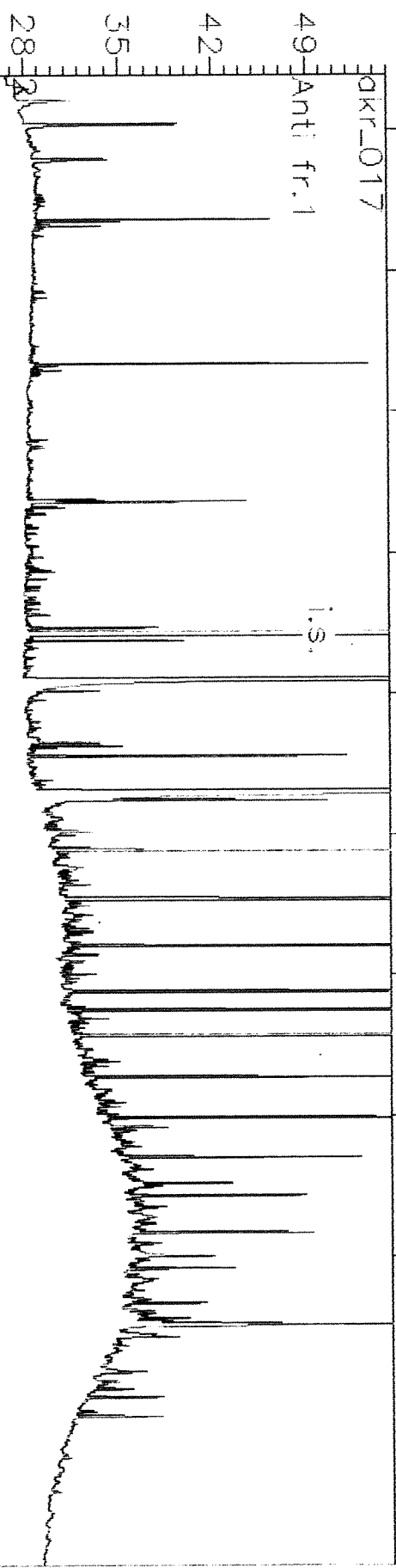
100 qkr\_016

Anti før TLC



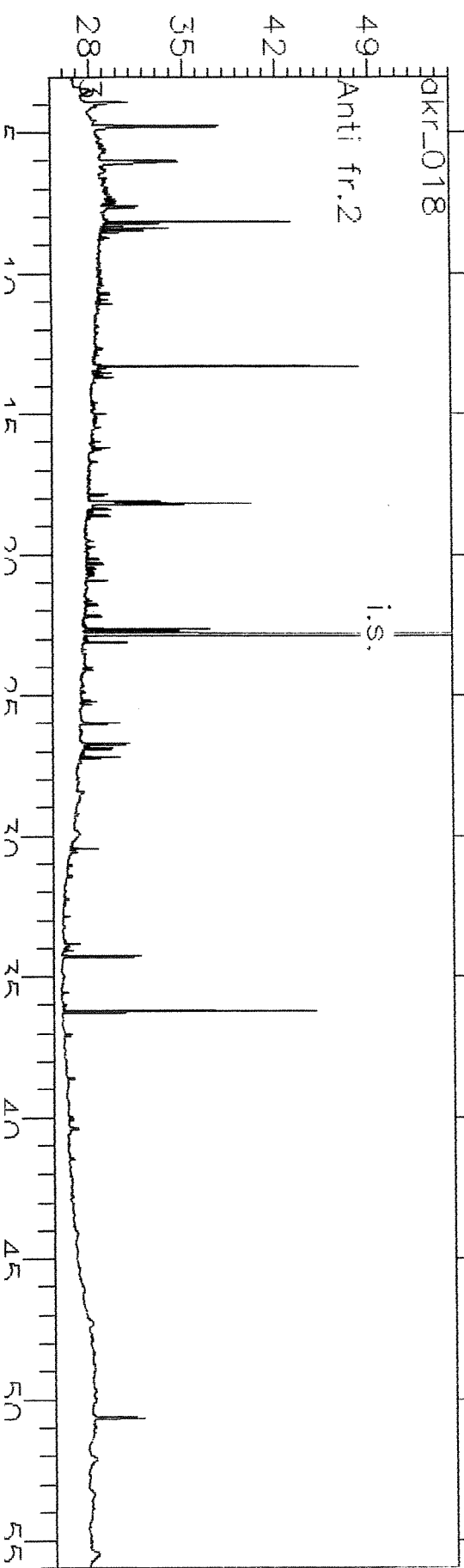
qkr\_017

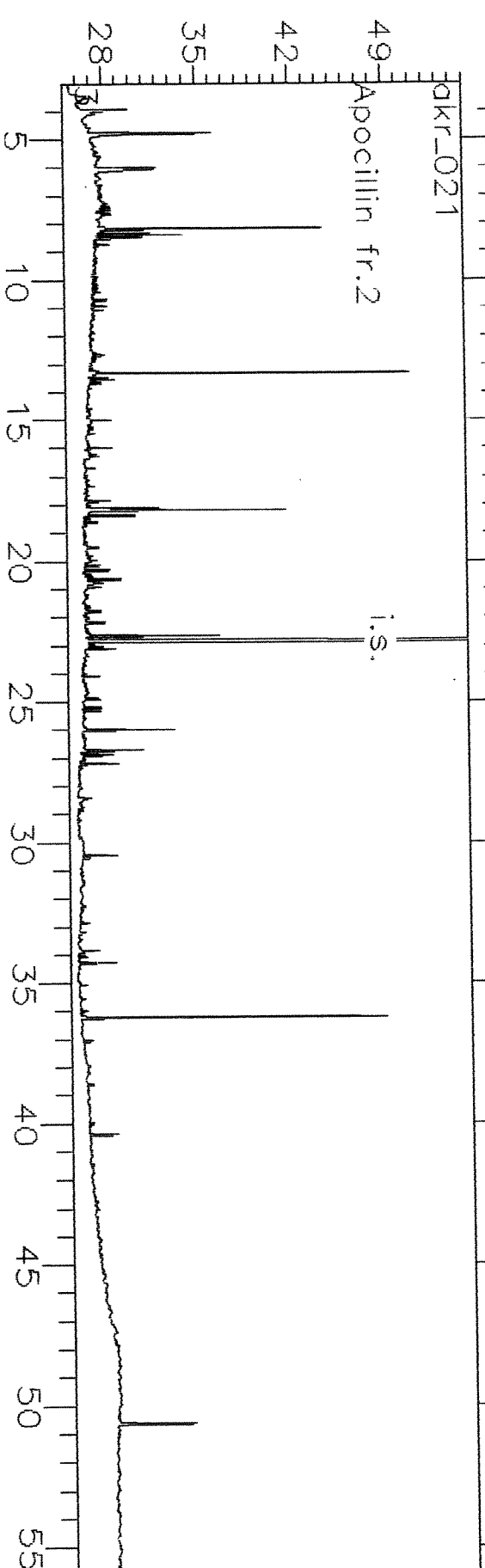
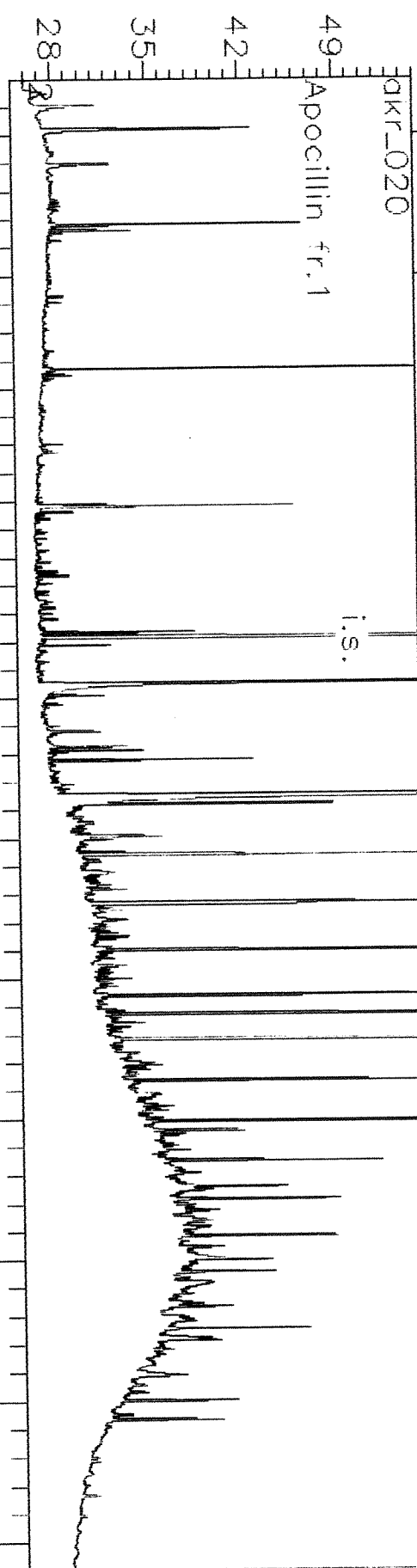
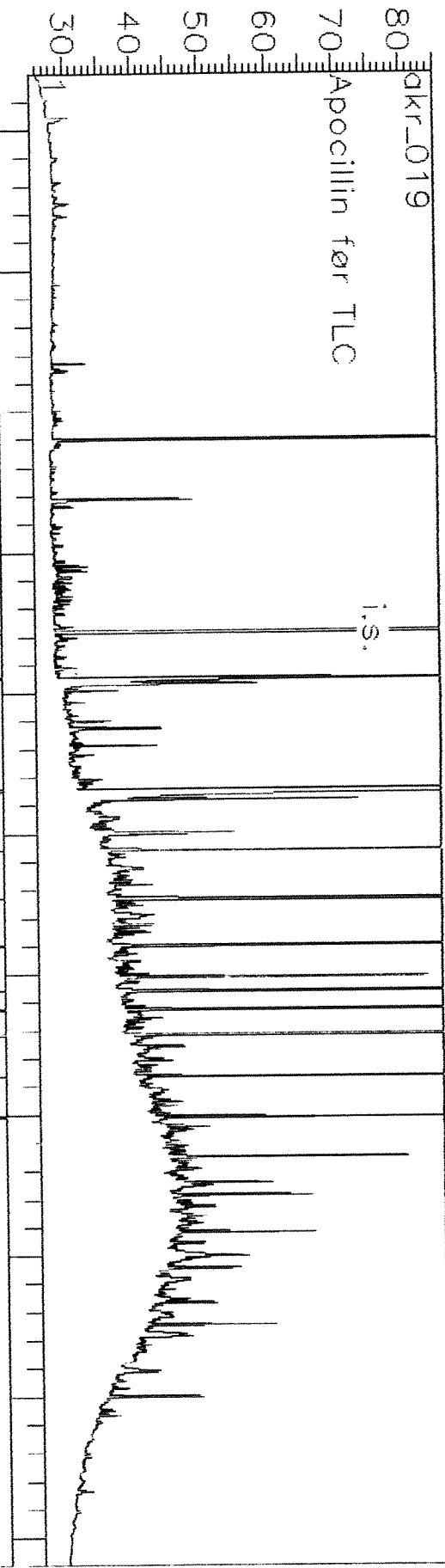
Anti fr.1

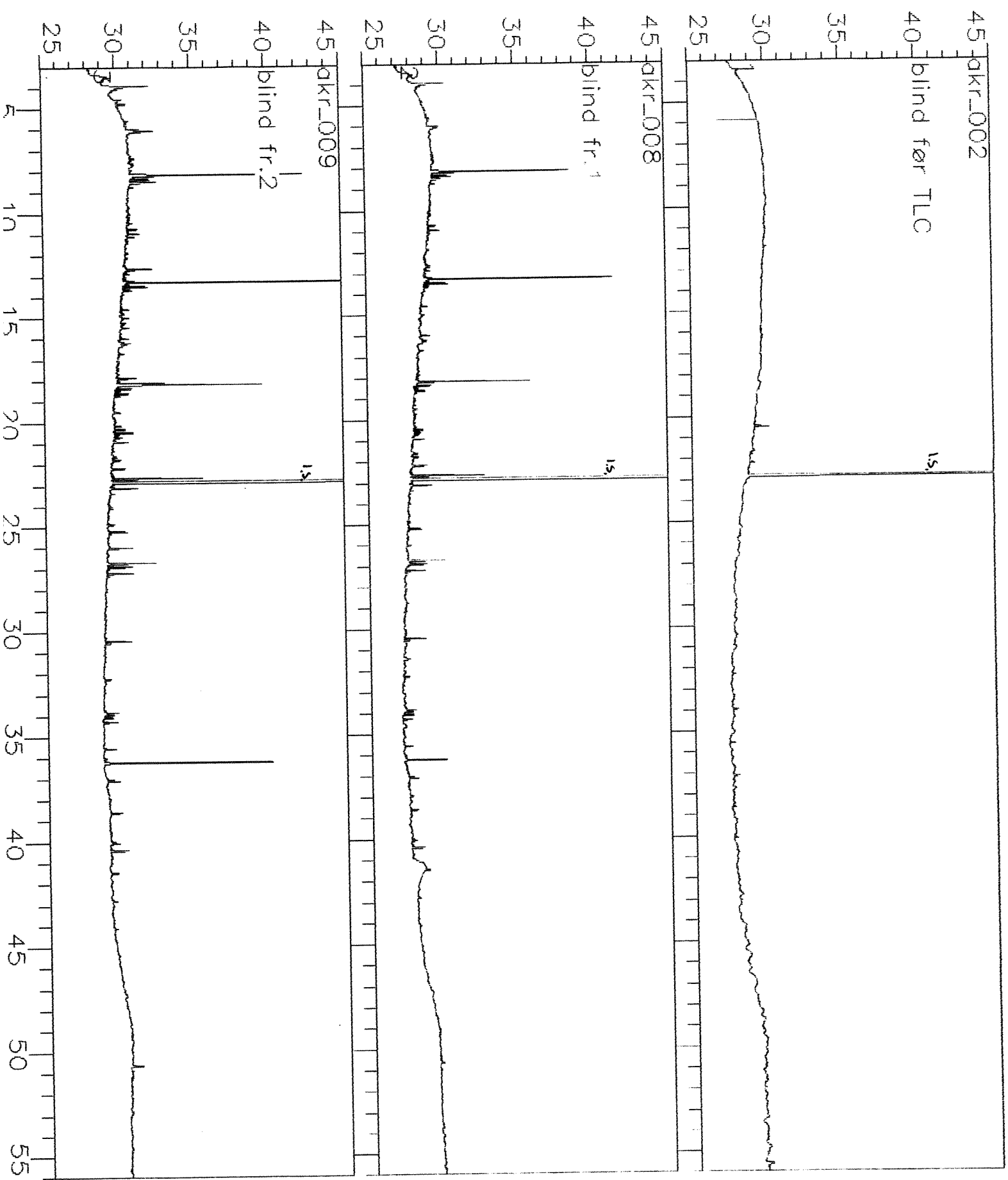


qkr\_018

Anti fr.2









TESTRAPPORT

**Microtox, 100% screening - test**  
**med luminescerende (lysutsendene) bakterier**  
(for lavtoksiske stoffer)

**Prøve:** Avløpsvann merket:"Flux" fra Apothekernes Laboratorium  
SI - kode: 1-92-234-1  
Oppdragsnr:114404-12  
Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI.  
Dato:20.11.92

---

**Testdata:**

**Apparatur:** Testen ble utført på Microtox modell 2055, Beckman Instruments (fotometer og termostatstyrte inkubasjonskamre )

**Metode:** Microtox Application Note M-111, Microtox Corp.1989.  
Metoden ble benyttet fordi prøven var spesielt lavtoksisk slik en dose/respons kurve ikke kunne oppnås.  
Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en uforynnnet prøve, ikke EC<sub>50</sub>-verdien.

**Testorganisme:** Photobacterium Phosphoreum ( bakteriebatch nr.innkjøpt frysetørret fra Microbics Corp. USA.) Bakteriene ble suspendert i dejonisert vann like før bruk.

**Testmedium / Temperatur:** Natriumklorid, 2% løsning / 15°C

**pH-justering:** 6,8-7,2

**Utførelse:** Luminescensen fra bakteriene ble målt med fotometer.i en 99% saltjustert prøve (3 paralleller av prøven, 3 paralleller av blind dvs.bakteriekulturen i 2% natriumkloridløsning.) Eksponeringstiden var henholdsvis 5 min. og 15 min.

**Beregninger:** 
$$\text{Lysminskning (\%)} = \frac{X_{\text{blind}} - X_{\text{prøve}}}{X_{\text{blind}}} \times 100$$

---

**Resultater:**

**Lysminskning**

Prøve	5 min. eksponering	15 min.eksponering
"Flux"	71,0%	67,9%

Kontrollstoff: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O=12,8 mg./l (11,0-15,0)

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Hølestøl*  
Berit Hølestøl



## TESTRAPPORT

**Microtox, 100% screening - test**  
**med luminescerende (lysutsendene) bakterier**  
 (for lavtoksiske stoffer)

**Prøve:** Avløpsvann merket:"Pinex" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode: 1-92-234-2  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI.  
 Dato:20.11.92

**Testdata:**

**Apparatur:** Testen ble utført på Microtox modell 2055, Beckman Instruments (fotometer og termostatstyrte inkubasjonskamre )

**Metode:** Microtox Application Note M-111, Microtox Corp.1989.  
 Metoden ble benyttet fordi prøven var spesielt lavtoksisk slik en dose/respons kurve ikke kunne oppnås.  
 Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en uforynnnet prøve, ikke EC<sub>50</sub>-verdien.

**Testorganisme:** Photobacterium Phosphoreum ( bakteriebatch nr.innkjøpt frysetørret fra Microbics Corp. USA.) Bakteriene ble suspendert i dejonisert vann like før bruk.

**Testmedium / Temperatur:** Natriumklorid, 2% løsning / 15°C

**pH-justering:** 6,8-7,2

**Utførelse:** Luminescensen fra bakteriene ble målt med fotometer i en 99% saltjustert prøve (3 paralleller av prøven, 3 paralleller av blind dvs.bakteriekulturen i 2% natriumkloridløsning.) Eksponeringstiden var henholdsvis 5 min. og 15 min.

**Beregninger:** 
$$\text{Lysminskning (\%)} = \frac{X_{\text{blind}} - X_{\text{prøve}}}{X_{\text{blind}}} \times 100$$

**Resultater:****Lysminskning**

Prøve	5 min. eksponering	15 min eksponering
"Pinex"	33%	24,3%

Kontrollstoff: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O=12,8 mg./l (11,0-15,0)

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl





## TESTRAPPORT

**Microtox, 100% screening - test**  
**med luminescerende (lysutsendene) bakterier**  
 (for lavtoksiske stoffer)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Antineuralica" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode:1-92-234-3  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI.  
 Dato:20.11.92

**Testdata:**

**Apparatur:** Testen ble utført på Microtox modell 2055, Beckman Instruments (fotometer og termostatstyrte inkubasjonskamre )

**Metode:** Microtox Application Note M-111, Microtox Corp.1989.  
 Metoden ble benyttet fordi prøven var spesielt lavtoksisk slik en dose/respons kurve ikke kunne oppnås.  
 Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en uforynnnet prøve, ikke EC<sub>50</sub>-verdien.

**Testorganisme:** Photobacterium Phosphoreum ( bakteriebatch nr.innkjøpt frysetørret fra Microbics Corp. USA.) Bakteriene ble suspendert i dejonisert vann like før bruk.

**Testmedium / Temperatur:** Natriumklorid, 2% løsning / 15°C

**pH-justering:** 6,8-7,2

**Utførelse:** Luminescensen fra bakteriene ble målt med fotometer.i en 99% saltjustert prøve (3 paralleller av prøven, 3 paralleller av blind dvs.bakteriekulturen i 2%natriumløsning.)Eksponeringstiden var henholdsvis 5 min. og 15 min.

**Beregninger:** 
$$\text{Lysminskning (\%)} = \frac{X_{\text{blind}} - X_{\text{prøve}}}{X_{\text{blind}}} \times 100$$

**Resultater:****Lysminskning**

Prøve	5 min. eksponering	15 min eksponering
"Antineuralica"	7,3%	22,8%

Kontrollstoff: ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O=12,8 mg./l (11,0-15,0)

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl



## TESTRAPPORT

**Microtox, 100% screening - test**  
**med luminescerende (lysutsendene) bakterier**  
 (for lavtoksiske stoffer)

**Prøve:** Avløpsvann merket: "Apocillin" fra Apothekernes Laboratorium  
 SI - kode:1-92-234-4  
 Oppdragsnr:114404-12  
 Anm: Prøven var ikke frosset ved mottak på SI.  
 Dato:20.11.92

**Testdata:**

**Apparatur:** Testen ble utført på Microtox modell 2055, Beckman Instruments (fotometer og termostatstyrte inkubasjonskamre )

**Metode:** Microtox Application Note M-111, Microtox Corp.1989.  
 Metoden ble benyttet fordi prøven var spesielt lavtoksisk slik en dose/respons kurve ikke kunne oppnås.  
 Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en uforynnet prøve, ikke EC<sub>50</sub>-verdien.

**Testorganisme:** Photobacterium Phosphoreum ( bakteriebatch nr.innkjøpt frysetørret fra Microbics Corp. USA.) Bakteriene ble suspendert i dejonisert vann like før bruk.

**Testmedium / Temperatur:** Natriumklorid, 2% løsning / 15°C

**pH-justering:** 6,8-7,2

**Utførelse:** Luminescensen fra bakteriene ble målt med fotometer i en 99% saltjustert prøve (3 paralleller av prøven, 3 paralleller av blind dvs.bakteriekulturen i en 2% natriumløsning.) Eksponeringstiden var henholdsvis 5 min. og 15 min.

**Beregninger:** 
$$\text{Lysminskning (\%)} = \frac{X_{\text{blind}} - X_{\text{prøve}}}{X_{\text{blind}}} \times 100$$

**Resultater:****Lysminskning**

Prøve	5 min. eksponering	15 min eksponering
"Apocillin"	53%	47,9%

Kontrollstoff: ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O=12,8 mg./l (11,0 - 15,0)

Godkjent av: *Arne Lund Kvernheim*  
 Arne Lund Kvernheim

Testansvarlig: *Berit Holestøl*  
 Berit Holestøl

## MICROTOX, STANDARD METODE

Testen er utført etter standardmetoden ( Microtox TM System Operating manual Beckman 1982.)

Microtox-apparatet ble startet 2 timer før forsøk ble satt i gang for at temperaturen i inkubasjonskamrene skulle stabiliseres. Temperaturen i bakterie-oppbevaringskammeret ble justert til 3°C og i de andre kamrene til 15°C.

De frysetørrede bakteriene ble suspendert i 1 ml. destillert, dejonisert vann og plassert i bakterieoppbevaringskammeret.

Før en normal toksitetstesting settes i gang, må det kjøres en "screening-test for nye prøver, for å finne ut hvilke konsentrasjoner som skal velges for å komme inn på kurven hvor den ønskete EC-verdien kan avleses.

Ved en standard toksisitetstesting ble 15 kuvetter plassert i inkubasjonskamrene. Til 10 av disse (reaksjonskuvetter) ble 0,5 ml. 2% NaCl-løsning pipettert. I fire av de resterende fem kuvetter ble det gjort en fortykningsserie av testprøven, basert på resultatene fra forforsøket. Den siste kuvetten var beregnet for blindprøve, og denne ble tilsatt 1ml. 2% NaCl-løsning.

Til de 10 reaksjonskuvettene ble 10 µl bakteriesuspensjon tilsatt, og etter 10 min. akklimatisering ble den initiale luminescensen ( $I_0$ ) målt i de respektive kuvetter. Deretter ble det med jevne tidsintervaller tilsatt 0,5 ml. av de respektive prøvekonsentrasjoner i reaksjonskuvettene. Luminescensen  $I_t$  ble målt etter 5 og 15 min. eksponeringstid. Det ble målt på to paralleller av hver testkonsentrasjon.

Som kontrollsubstans for bakteriene ble benyttet  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Før måling ble pH justert til ca. 6,8-7,2 i prøven.

Data av resultatene ble beregnet etter Microtox manual okt.89 "How to run the microtox calculation program on an IBM PC-computer."

## MICROTOX, 100%-SCREENING METODE

Metoden er beskrevet i Microtox Applicatin Note M-111. Microtox Corp. 1987.

Metoden ble benyttet i de tilfeller der prøven var spesielt lav-toksisk slik at en dose-respons kurve ikke kunne oppnås. Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en ufortynnet prøve, ikke EC50-verdien.

I motsetning til Standard-metoden, som går ut på å eksponere de luminescerende bakterier for forskjellige prøvekonsentrasjoner (høyeste prøvekonsentrasjon 45 %) omfatter 100% screeningtesten kun måling av prøven i en konsentrasjon ( 99% saltjustert prøve )  
Målingene ble utført i 3 paralleller av prøven, samtidig med 3 paralleller av blindprøven av 2% natriumkloridløsning.  
Eksponeringstid for bakteriene med prøveløsning ble holdt til 5 min. eventuelt 15 min.  
Prøvene ble justert til pH ca. 6.8-7,2 før måling.  
Som kontrollsubstans for bakteriene ble benyttet  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Følgende formel ble benyttet ved utregningen:

Lysreduksjon i %:

$$A = \frac{\bar{X}_{\text{blind}} - \bar{X}_{\text{prøve}}}{\bar{X}_{\text{blind}}}$$

13.10.89  
BHO/ras

VEDLEGG

#### METODE FOR BESTEMMELSE AV BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER

Vannprøven ble ekstrahert med cyklohexan ved pH#2. Emulsjon ble fjernet ved gjentatt nedfrysing og tining. Ekstraktene ble kombinert, vasket med vann (pH#2) og tørket med  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ekstraktet ble oppkonsentrert til lite volum, analysert gasskromatografisk og videre fraksjonert på TLC i to fraksjoner  $\text{Pow} > 10^6$  og  $10^6 > \text{Pow} > 10^3$ .

Lipofile eller bioakkumulerbare organiske forbindelser bestemmes ved tynnsjikt-kromatografi av cyklohexanekstrakter av vannprøvene. Metoden som er anvendt, er en tillempning av en metode utarbeidet av Lars Renberg, Statens Naturvårdsverk, Stockholm. Substanser med en fordelingskonstant oktanol/vann  $\text{Pow} > 10^3$  blir regnet som bioakkumulerbare. Fraksjonen blir utskrapet og ekstrahert med cyklohexan/isopropanol (1:1). De samlede cyclohexan/-isopropanol-ekstrakter ristes med vann (pH#2) og vann/isopropanolfasen skilles fra. Cyklohexanekstraktet vaskes med vann (pH#2) og tørkes med  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ekstraktene dampes inn med nitrogentilføring på varmeblokk.

Den bioakkumulerbare mengden i hvert ekstrakt bestemmes ved gasskromatografisk analyse hvor den generelle flammeionisasjonsdetektoren (FID) benyttes. Arealet av de enkelte toppene relatert til en ytre standard  $\text{C}_{18}$  gir et mål for mengden organiske kromatograferbare forbindelser. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfelle organiske substanser med en molekylvekt opptil ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk. Det tas forbehold om at vi ved beregningen antar at de bioakkumulerbare forbindelsene har lik repons med den utvalgte ytre standarden. Vår erfaring er at responsen med FID-detektor for ulike organiske forbindelser kan variere endel, opptil 50%. Blindprøve opparbeides og kjøres parallelt med prøveekstraktet.

Forsøksbetingelser ved GC analysen: Kapillærkolonne, fused silica, DB5,  
l. 30 m indre diam. = 0,24 mm

program: Starttemp. 60°C, henstand 2 min  
oppv.hast 5°C/min  
sluttemp. 280°C, henstand 8 min,  
attn. 2<sup>3</sup>

standard: n- $\text{C}_{18}$   $\text{H}_{38}$

## VEDLEGG 2

Testrapporter:

**Nedbrytbarhetstester**

**TEST RAPPORT**
**BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART  
ORGANISK STOFF  
ISO/DIS 9408**

Prosjekt nr.: 92170

Lab. kode: B022/1

**Test stoff: Flux/fludent, spesialprøve tatt 11.9. 92**
**Test betingelser:**

**Apparatur:** Manometrisk respirometer, WTW 2001  
**Nærings-  
løsning:** ISO/DIS 9408 Saltløs. A, 10 ml/L ( 1,3 mg N/L)  
**Inokulum:** Blanding av mikroorganismer fra lab. produsert biologisk aktivt slam (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk, og kommunalt avløpsvann (luftet i 1 døgn, NS 4849). Suspensjonen ble sentrifugert (3000 g) 2 ganger og resuspendert i BOD-næringssaltløsning, for "utvasking" av løste stoffer.  
 STS: 20 mg/L i testløsningen.  
**Inkubasjon:** Temperatur:  $20 \pm 0.5$  °C . Varighet: 28 dager.  
**pH:** Start 7,6 Slutt: 7,55  
**Referense:** 20 mg C/L Lag-fase: 4 døgn  
**Anilin** Nedbrytningsgrad: DOC-reduksjon, 99 % etter 28 døgn.  
**Toxisitet -  
kontroll:** Ingen hemning ble observert i en blandprøve av teststoffet og anilin, sammenlignet med anilinkontrollen.  
**Test periode:** 16.9 - 14.10. 1992

**Preparering av testprøven:**

Avløpsvannet ble testet i fortykning 1:15 (6,67 %) og 1:25 (4 %) i standard fortykningsvann.

**RESULTATER:**

 (Middelverdi av duplikater for DOC og BOD<sub>28</sub>). Verdiene repr. ufort. prøve; mg/L.

Avløpsvann mrk.	Test kons.	COD <sub>Cr</sub>	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	DOC-red.
Flux/fludent	4 %	1250	1075	355	10,5	97 %

**Konklusjon:**

Organiske stoffer i avløpsvannet nedbrytes raskt og tilnæmet fullstendig i løpet av 3-4 uker under de testede betingelser. Ca. 83 % av BOD ble omsatt i løpet av de 10 første døgn. Dette er illustrert i figuren på neste side i testrapporten.

Testet av:

  
 Harry Eftaimesen

Forskningsleder:

  
 Torsten Källevist

OPPDRAG nr.: 92170

DATA SKJEMA

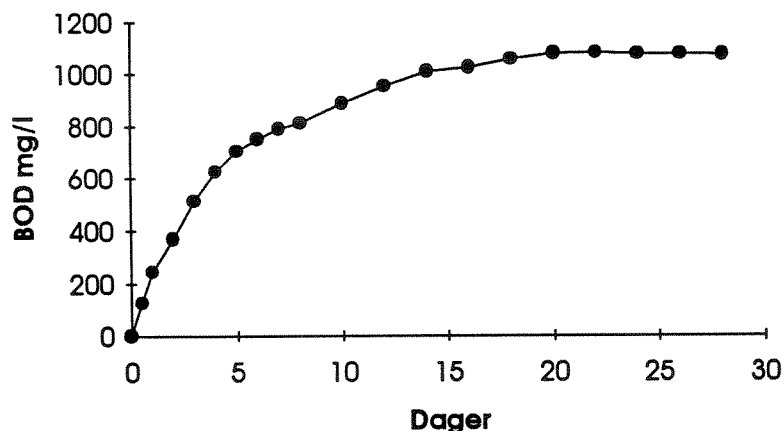
Testperiode: 16.9 - 14.10. 1992  
 Teststoff: Flux/fludent, spesialprøve tatt 11.9. 92  
 Fortynningsgrad: 1:25 (4 %)

## Analyseresultater i testprøven:

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
		0	28
Inokulum	C1	1,03	1,11
"	C2	0,89	0,93
"	Cmv.	<b>0,96</b>	<b>1,02</b>
Teststoff.	A1	15,1	1,41
"	A2	15,2	1,46
"	Amv.	<b>15,15</b>	<b>1,44</b>
Korrigerte verdier		14,19	0,42
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning			<b>97 %</b>

Kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ) 1250 mg/l

## BOD- kurve:



## Kommentarer:

BOD viste rask utvikling og var helt stagnert etter ca. 20 døgn som er karakteristisk for lett nedbrytbart organisk materiale. Det ble oppnådd en meget høy nedbrytningdgrad som er underbygget både med en høy DOC reduksjon og BOD som funksjon av kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ).

BOD-verdien er korrigert for oksygenforbruk forårsaket av nitrifikasjon, som ble målt til 140 mg/l.

## Analytiske betingelser:

Biokjemisk oksygenforbruk i testløsningen er bestemt med oksygen probe, (WTW OXI 2000) målt ved start og slutt. Utviklingen er så beregnet på basis av manometeravlesning under inkubasjonstiden. DOC ble analysert på Dohrmann DC-190, med høy temperatur (680 °C) og platina som katalysator.

Kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ) ble bestemt etter NS 4748, dikromat oksidasjon.  $NO_3-N$  ble analysert etter NS 4745 (Modifisert for Auto-Analyser).

## REFERENSE:

- ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds- Method by determining the oxygen demand in closed respiromerter.
- OECD Guideline for testing of chemicals, 301F Manometric respirometry. "Ready biodegradability".



**TEST RAPPORT**
**BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART  
ORGANISK STOFF  
ISO/DIS 9408**

Prosjekt nr.: 92170

Lab. kode: B022/2

Test stoff: PINEX 4.9. 92 kl. 07.00-15.00

**Test betingelser:**

**Apparatur:** Manometrisk respirometer, WTW 2001  
**Nærings-  
løsning:** ISO/DIS 9408 Saltløsn. A, 10 ml/L ( 1,3 mg N/L)  
**Inokulum:** Blanding av mikroorganismer fra lab. produsert biologisk aktivt slam (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk, og kommunalt avløpsvann (luftet i 1 døgn, NS 4849). Suspensjonen ble sentrifugert (3000 g) 2 ganger og resuspendert i BOD-næringssaltløsning, for "utvasking" av løste stoffer.  
 STS: 20 mg/L i testløsningen.  
**Inkubasjon:** Temperatur:  $20 \pm 0.5$  °C . Varighet: 28 dager.  
**pH:** Start 7,7 Slutt: 7,3  
**Referense:** 20 mg C/L Lag-fase: 4 døgn  
**Anilin** Nedbrytningsgrad: DOC-reduksjon, 99 % etter 28 døgn.  
**Toxitet -  
kontroll:** Ingen hemning ble observert i en blandprøve av teststoffet og anilin, sammenlignet med anilinkontrollen.  
**Test periode:** 16.9 - 14.10. 1992

**Preparering av testprøven:**

Avløpsvannet ble testet i fortykning 1:4 (25 %) i standard fortykningsvann.

**RESULTATER:**(Middelverdi av duplikater for DOC og BOD<sub>28</sub>). Verdiene repr. ufort. prøve; mg/L.

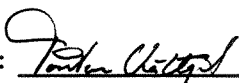
Avløpsvann mrk.	Test kons.	COD <sub>Cr</sub>	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	DOC-red.
PINEX	25 %	900	647	246	56	77 %

**Konklusjon:**

Mesteparten av de organiske stoffer i prøven er meget lett biologisk nedbrytbare. Ca. en firedel er imidlertid tyngre biologisk nedbrytbart under de testede betingelser.

 Testet av:   
 Harry Efraimssen

Forskningsleder:

  
 Torsten Källevist

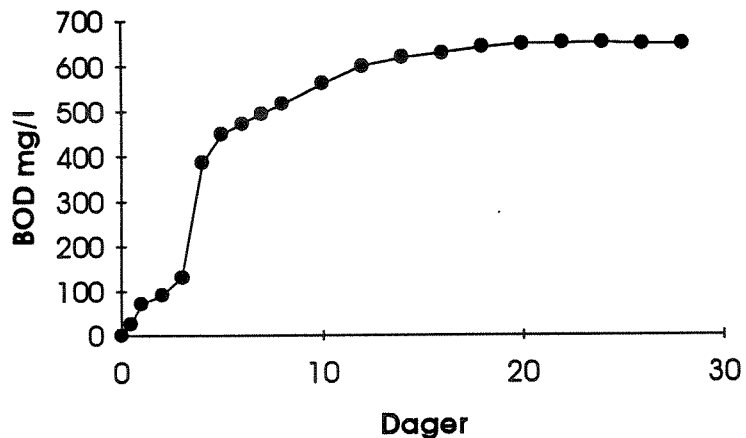
OPPDRAG nr.: 92170

DATA SKJEMA

**Testperiode:** 16.9 - 14.10. 1992  
**Teststoff:** PINEX 4.9. 92 kl. 07.00-15.00  
**Fortynningsgrad:** 1:4 (25 %)

**Analyseresultater i testprøven:**

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
		0	28
Inokulum	C1	1,03	1,11
"	C2	0,89	0,93
"	Cmv.	<b>0,96</b>	<b>1,02</b>
Teststoff.	A1	62,9	15,5
"	A2	61,8	15,3
"	Amv.	<b>62,35</b>	<b>15,40</b>
Korrigerte verdier		61,39	14,38
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning			<b>77 %</b>

Kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ): 900 mg/l**BOD- kurve:****Kommentarer:**

BOD viste meget rask utvikling i løpet av de 7 første døgn, hvor 76 % av  $BOD_{28}$  ble omsatt. Reduksjon i DOC og analysen av kjemisk oksygenforbruk viser at en mindre fraksjon av organisk stoff er tyngre biologisk nedbrytbart. Figuren ovenfor viser at BOD stagnerte helt etter 18-20 døgn.  $BOD_{28}$  representerer 72 % av kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ) i prøven.

BOD-verdien er korrigert for oksygenforbruk forårsaket av nitrifikasjon, som ble målt til 96 mg/l.

**Analytiske betingelser:**

Biokjemisk oksygenforbruk i testløsningen er bestemt med oksygen probe, (WTW OXI 2000) målt ved start og slutt. Utviklingen er så beregnet på basis av manometeravlesning under inkubasjonstiden. DOC ble analysert på Dohrmann DC-190, med høy temperatur (680 °C) og platina som katalysator.

Kjemisk oksygenforbruk ( $COD_{Cr}$ ) ble bestemt etter NS 4748, dikromat oksidasjon.  $NO_3-N$  ble analysert etter NS 4745 (Modifisert for Auto-Analyser).

**REFERENSE:**

- ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds- Method by determining the oxygen demand in closed respiromerter.
- OECD Guideline for testing of chemicals, 301F Manometric respirometry. "Ready biodegradability"

**TEST RAPPORT**
**BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART  
ORGANISK STOFF  
ISO/DIS 9408**

Prosjekt nr.: 92170

Lab. kode: B022/3

Test stoff: Antineuralica, 28.8. 92 kl. 07.00- 19.00

**Test betingelser:**

**Apparatur:** Manometrisk respirometer, WTW 2001  
**Nærings-  
løsning:** ISO/DIS 9408 Saltløn. A, 10 ml/L ( 1,3 mg N/L)  
**Inokulum:** Blanding av mikroorganismer fra lab. produsert biologisk aktivt slam (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk, og kommunalt avløpsvann (luftet i 1 døgn, NS 4849). Suspensjonen ble sentrifugert (3000 g) 2 ganger og resuspendert i BOD-næringssaltløsning, for "utvasking" av løste stoffer.  
 STS: 20 mg/L i testløsningen.  
**Inkubasjon:** Temperatur:  $20 \pm 0.5$  °C. Varighet: 28 dager.  
**pH:** Start 7,5 Slutt: 7,6  
**Referense:** 20 mg C/L Lag-fase: 4 døgn  
**Anilin** Nedbrytningsgrad: DOC-reduksjon, 99 % etter 28 døgn.  
**Toxisit -  
kontroll:** Ingen hemning ble observert i en blandprøve av teststoffet og anilin, sammenlignet med anilinkontrollen.  
**Test periode:** 16.9 - 14.10. 1992

**Preparering av testprøven:**

Avløpsvannet ble testet i fortykning 1:10 og 1:20 i standard fortykningsvann.

**RESULTATER:**

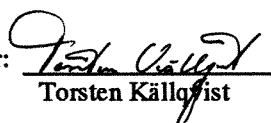
(Middelverdi av duplikater for DOC og BOD<sub>28</sub>). Verdiene repr. ufort. prøve; mg/L.

Avløpsvann mrk.	Test kons.	COD <sub>Cr</sub>	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	DOC-red.
Antineuralica	10 %	1355	1010	407	52	87 %

**Konklusjon:**

Mesteparten av de organiske stoffer i prøven er meget lett biologisk nedbrytbare. En mindre del er imidlertid tungt biologisk nedbrytbart under de testede betingelser.

Testet av:   
 Harry Efrainsen

Forskningsleder:   
 Torsten Källqvist

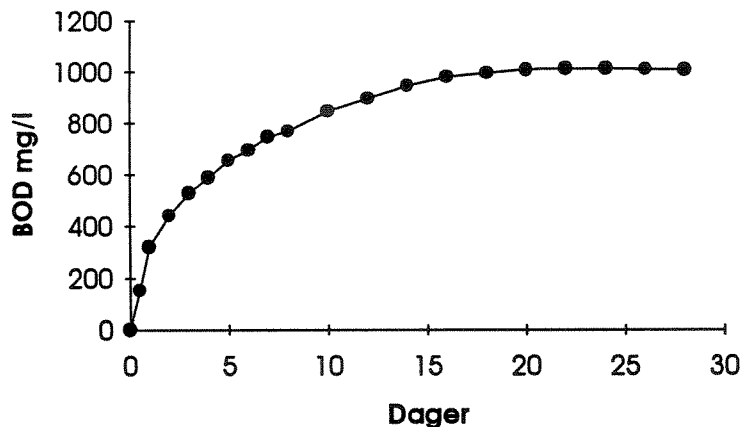
OPPDRAG nr.: 92170

DATA SKJEMA

**Testperiode:** 16.9 - 14.10. 1992  
**Teststoff:** Antineuralica, 28.8. 92 kl. 07.00- 19.00  
**Fortynningsgrad:** 1:10 (10 %)

**Analyseresultater i testprøven:**

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
		0	28
Inokulum	C1	1,03	1,11
"	C2	0,89	0,93
"	Cmv.	<b>0,96</b>	<b>1,02</b>
Teststoff.	A1	41	6,17
"	A2	42,4	6,3
"	Amv.	<b>41,70</b>	<b>6,24</b>
Korrigerede verdier		40,74	5,22
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning			<b>87 %</b>

Kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>): 1355 mg/l**BOD- kurve:****Kommentarer:**

BOD viste meget rask utvikling i løpet av de 7 første døgn, hvor 74 % av BOD<sub>28</sub> ble omsatt. Reduksjon i DOC og analysen av kjemisk oksygenforbruk viser at en mindre fraksjon av organisk stoff er tyngre biologisk nedbrytbart. Figuren ovenfor viser at BOD stagnerte helt etter 16-18 døgn. BOD<sub>28</sub> representerer 75 % av kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>) i prøven. Det ble ikke påvist nitrifikasjon i denne prøven.

**Analytiske betingelser:**

Biokjemisk oksygenforbruk i testløsningen er bestemt med oksygen probe, (WTW OXI 2000) målt ved start og slutt. Utviklingen er så beregnet på basis av manometeravlesning under inkubasjonstiden. DOC ble analysert på Dohrmann DC-190, med høy temperatur (680 °C) og platina som katalysator.

Kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>) ble bestemt etter NS 4748, dikromat oksidasjon. NO<sub>3</sub>-N ble analysert etter NS 4745 (Modifisert for Auto-Analyser).

**REFERENSE:**

1. ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds- Method by determining the oxygen demand in closed respiromerter.
2. OECD Guideline for testing of chemicals, 301F Manometric respirometry. "Ready biodegradability"

**TEST RAPPORT**
**BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART  
ORGANISK STOFF  
ISO/DIS 9408**

Prosjekt nr.: 92170

Lab. kode: B022/4

Test stoff: Apocillin, samletank 10.9. 92 kl. 15.00

**Test betingelser:**

**Apparatur:** Manometrisk respirometer, WTW 2001  
**Nærings-  
løsning:** ISO/DIS 9408 Saltløsn. A, 10 ml/L ( 1,3 mg N/L)  
**Inokulum:** Blanding av mikroorganismer fra lab. produsert biologisk aktivt slam (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk, og kommunalt avløpsvann (luftet i 1 døgn, NS 4849). Suspensjonen ble sentrifugert (3000 g) 2 ganger og resuspendert i BOD-næringssaltløsning, for "utvasking" av løste stoffer.  
 STS: 20 mg/L i testløsningen.  
**Inkubasjon:** Temperatur:  $20 \pm 0.5$  °C. Varighet: 28 dager.  
**pH:** Start 7,5 Slutt: 7,48  
**Referense:** 20 mg C/L Lag-fase: 4 døgn  
**Anilin** Nedbrytningsgrad: DOC-reduksjon, 99 % etter 28 døgn.  
**Toxisitet -  
kontroll:** Ingen hemning ble observert i en blandprøve av teststoffet og anilin, sammenlignet med anilinkontrollen.  
**Test periode:** 16.9 - 14.10. 1992

**Preparering av testprøven:**

Avløpsvannet ble testet i fortynning 1:10 og 1:15 i standard fortynningsvann.

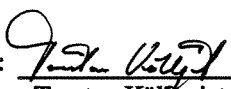
**RESULTATER:**(Middelverdi av duplikater for DOC og BOD<sub>28</sub>). Verdiene repr. ufort. prøve; mg/L.

Avløpsvann mrk.	Test kons.	COD <sub>Cr</sub>	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	DOC-red.
Apocillin	10 %	590	350	155	46	70 %

**Konklusjon:**

Størstedelen av de organiske stoffer i prøven er meget lett biologisk nedbrytbare. En tredel er imidlertid tungt biologisk omsettbart under de testede betingelser.

 Testet av:   
 Harry Efraimssen

 Forskningsleder:   
 Torsten Kälqvist

OPPDRAG nr.: 92170

DATA SKJEMA

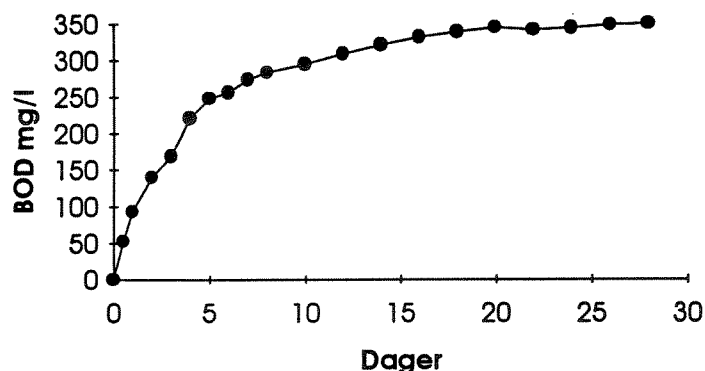
Testperiode: 16.9 - 14.10. 1992  
 Teststoff: Apocillin, samletank 10.9. 92 kl. 15.00  
 Fortynningsgrad: 1:10 (10 %)

## Analyseresultater i testprøven:

Medium	Flaske	28 døgn	
		Startverdi	28
		0	28
Inokulum	C1	1,03	1,11
"	C2	0,89	0,93
"	Cmv.	0,96	1,02
Teststoff.	A1	15,9	5,59
"	A2	17	5,71
"	Amv.	16,45	5,65
Korrigerte verdier		15,49	4,63
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning			70 %

Kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>): 590 mg/l

## BOD- kurve:



## Kommentarer:

BOD viste meget rask utvikling i løpet av de 7 første døgn, hvor 77 % av BOD<sub>28</sub> ble omsatt. Reduksjon i DOC og analysen av kjemisk oksygenforbruk viser at en betydelig fraksjon av organisk stoff er tyngre biologisk omsettbart. Figuren ovenfor viser at BOD stagnerte helt etter 16-18 døgn. BOD<sub>28</sub> representerer 60 % av kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>) i prøven.

BOD-verdien er korrigert for oksygenforbruk forårsaket av nitrifikasjon, som ble målt til 31 mg/l.

## Analytiske betingelser:

Biokjemisk oksygenforbruk i testløsningen er bestemt med oksygen probe, (WTW OXI 2000) målt ved start og slutt. Utviklingen er så beregnet på basis av manometeravlesning under inkubasjonstiden. DOC ble analysert på Dohrmann DC-190, med høy temperatur (680 °C) og platina som katalysator.

Kjemisk oksygenforbruk (COD<sub>Cr</sub>) ble bestemt etter NS 4748, dikromat oksidasjon. NO<sub>3</sub>-N ble analysert etter NS 4745 (Modifisert for Auto-Analyser).

## REFERENSE:

- ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds- Method by determining the oxygen demand in closed respiromerter.
- OECD Guideline for testing of chemicals, 301F Manometric respirometry. "Ready biodegradability"

---

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Postboks 69 Korsvoll, 0808 Oslo  
ISBN 82-577-2205-7