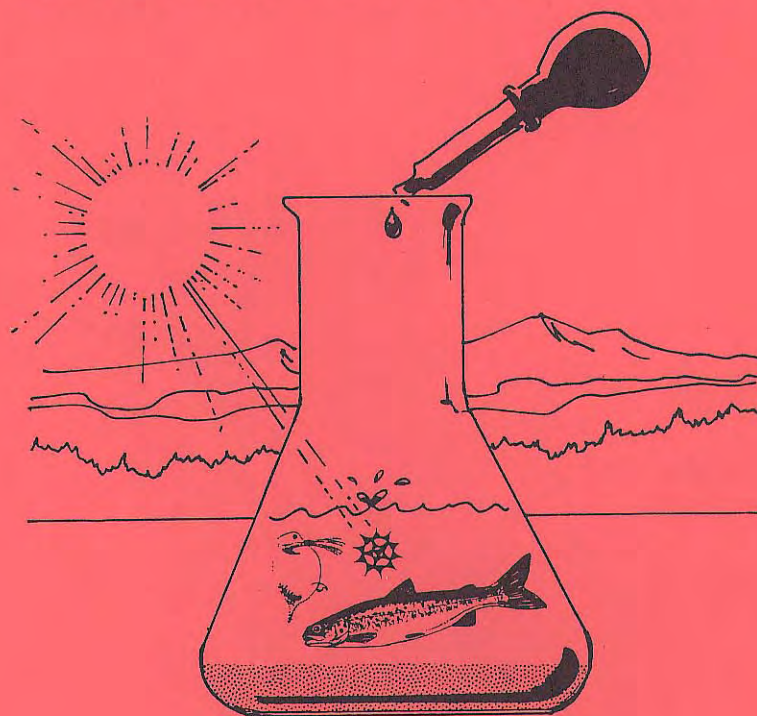




O-91059

Økotoksikologisk karakterisering  
av kontrastmiddelrester fra  
**Nycomed as,  
Lindesnes fabrikker**



# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning



NIVA

<b>Hovedkontor</b> Postboks 69, Korsvoll 0808 Oslo 8 Telefon (47 2) 23 52 80 Telefax (47 2) 39 41 89	<b>Sørlandseavdelingen</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) 78 402	<b>Vestlandseavdelingen</b> Breiviken 5 5035 Bergen - Sandviken Telefon (47 5) 95 17 00 Telefax (47 5) 25 78 90
--	--	--	---

Prosjektnr.: O-91059
Undernummer:
Løpenummer: 2603
Begrenset distribusjon:

<b>Rapportens tittel:</b> Økotoksikologisk karakterisering av kontrastmiddelrester fra Nycomed AS Lindesnes Fabrikker	<b>Dato:</b> 11 juli 1991
	<b>Faggruppe:</b> Analyse
<b>Forfatter (e):</b> Torsten Källqvist	<b>Geografisk område:</b> Vest-Agder
	<b>Antall sider:</b> 21 <b>Opplag:</b> 70

<b>Oppdragsgiver:</b> Nycomed Imaging	<b>Oppdragsg. ref. (evt. NTNf-nr.):</b> Odd E. Ingvoldstad
--	---

<b>Ekstrakt:</b> En blandprøve av moderluter fra produksjonen av røntgenkontrastmiddel ved Nycomed Lindesnes fabrikker er blitt karakterisert m.h.t. mutagene og toksiske effekter. Prøven innholdt 30.7 g kontrastmidler/l. Det ble funnet svak mutagen virkning på bakteriestammen TA98 i Ames test. Akutt toksisitet på stingsild ble registrert ned til 10% konsentrasjon (4d.-LC <sub>50</sub> = 10.2%). Effekten på reproduksjon ble testet med to marine krepsdyr, <i>Nitocra spinipes</i> og <i>Tisbe furcata</i> . <i>Tisbe</i> var mest følsom, med EC <sub>50</sub> -verdien 0.037%. Veksten av kiselalgen <i>Skeletonema costatum</i> ble redusert ved konsentrasjoner ned til 1%. EC <sub>50</sub> for effekter på veksthastighet var 7%.
---


4 emneord, norske

1. Industriavløpsvann
2. Toksisitet
3. Mutagenitet
4. Økotoksikologi

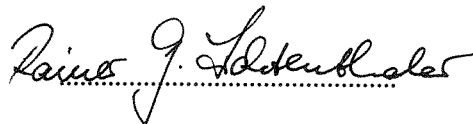
4 emneord, engelske

1. Industrial wastewater
2. Toxicity
3. Mutagenicity
4. Ecotoxicology

Prosjektleder

  
.....

For administrasjonen

  
.....

ISBN 82-577 -1927-7

Norsk Institutt for Vannforskning

O-91059

ØKOTOKSIKOLOGISK KARAKTERISERING AV  
KONTRASTMIDDELRESTER  
FRA  
NYCOMED AS, LINDESNES FABRIKKER

**Prosjektleder: Torsten Källqvist, NIVA**

**Medarbeidere:**

NIVA

Harry Efraimsen

Magne Grande

Randi Romstad

Renée Bechmann

Sigbjørn Andersen

SI

Berit Holestøl

## FORORD

*NIVA har mottatt en forespørsel fra Nycomed AS Imaging om program for økotoksikologisk testing av kontrastmiddelrester fra Nycomed Lindesnes Fabrikker. Et programforslag ble oversendt 29 juni 1990. Etter godkjenning fra Statens Forurensningstilsyn ble avtale om utførelse inngått 4 april 1991.*

*Den økotoksikologiske karakteriseringen, som omfattet biologiske tester av en kontrastmiddel prøveblanding, tillaget i april 1991 ble utført ved NIVAs laboratorier. Test av mutagene effekter er utført ved Senter for Industrieforskning (SI) av Berit Holestøl.*

*Oslo 12 juni 1991*

*Torsten Källqvist*

## INNEHOLDSFORTEGNELSE

1. Bakgrunn	4
2. Program for karakteriseringen	4
3. Resultat	6
3.1. Mutagenitet	6
3.2. Toksisitet	6
4. Kommentarer	8

## VEDLEGG

Ames´test

Toksisitetstest, fisk (stingsild)

Reproduksjonstest, *Nitocra spinipes*

Reproduksjonstest, *Tisbe furcata*

Toksisitetstest, alger (*Skeletonema costatum*)

## 1. Bakgrunn

I utslippstillatelse for Nycomed AS Lindesnes Fabrikker gitt av Statens Forurensningstilsyn (SFT), er Nycomed pålagt å utføre økotoksikologisk testing av kontrastmiddelrester i utslipp fra produksjon av røntgenkontrastmidler, for å undersøke eventuelle effekter av disse.

I produksjonen av røntgenkontrastmiddelet Iohexol (den aktive bestanddelen i Omnipaque) vil en del av produktet tapes gjennom avfallende sidestrømmer i prosessen. Dette skjer gjennom separasjon av fast stoff (produkt eller mellomprodukt) og moderluter fra krystalliseringer i prosessens syntese- og rensetrinn.

I disse moderlutene foreligger de aktuelle kontrastmiddelrestene, hovedsakelig selve produktet eller mellomproduktet, samt beslektede biprodukter i mindre konsentrasjoner.

Svært mye av disse moderlutene dampes inn (isoleres) hvorpå de jodholdige konsentratene sendes til Japan for gjenvinning av jod.

Imidlertid går en viss andel av disse moderlutene som utslipp i avløpsvannet, som også inneholder andre komponenter (alkoholer og salter). I avløpsvannet ligger kontrastmiddelkonsentrasjonen i området 0.3-0.6 gram/l. Mengden av avløpsvann pr. år utgjør 100 000 - 200 000 m<sup>3</sup>.

Kontrastmiddelrestene stammer fra tre forskjellige moderluter. En prøve av de tre moderlutene, blandet i forhold til prosentandelen de utgjør i avløpet ble laget av Nycomed og sendt til NIVA for testing.

Tabell 1. Sammensetning av den testede prøven i følge analyser utført av Nycomed AS

Kontrastmidler, totalt	30.7 g/l
Natriumklorid	94 g/l
Natriumacetat	20 g/l
Metanol	2.7 g/l

## 2. Program for karakteriseringen

Karakteriseringen av vannprøven omfattet undersøkelse av mutagene effekter og toksiske effekter på vannlevende organismer.

Mutagene effekter undersøktes med Ames´ test på to stammer av Salmonella-bakterier (TA98 og TA100) med og uten metabolsk aktivering (S9). Denne standardtest for punktmutasjoner gir en grov indikasjon på om prøven inneholder forbindelser som kan ventes å fremkalle kreft hos pattedyr. Informasjonen har betydning bl. a. for vurdering av effekter på toppkonsumenter (også mennesker ved konsumsjon av fisk). De bakteriestammer som benyttes ved testen, mangler evnen til å formere seg uten aminosyren histidin. For å vokse og danne kolonier på et histidin-fritt medium må bakteriene gjennomgå en mutasjon. Et mutagent stoff vil føre til at et økt antall kolonier vokser opp.

Mange stoffer virker som aktive mutagener eller karsinogener først etter omvandling i kroppen (indirekte mutagener). Bakterier, som har et meget enklere enzymsystem enn pattedyr, vil normalt ikke metabolisere indirekte mutagener. For å simulere betingelsene i pattedyr, aktiveres testsubstansen ved tilsetning av et leverenzympreparat (S9) fra rotter til testsystemet.

De to bakteriestammene har forskjellig følsomhet overfor forskjellige typer forbindelser. TA98 er mest følsom overfor mutagener som inducerer leserammeforskyvning. TA100 er mest følsom for mutagener som inducerer baseparsubstitusjon. For en mer utførlig beskrivelse av Ames' test vises til vedlegg.

Toksiske effekter undersøktes på tre organismegrupper; alger, krepsdyr og fisk, etter de samme prinsipper som i OECD Guidelines for testing of chemicals (OECD 1981). Fordi resipienten i dette tilfelle er marin, ble imidlertid marine testorganismer valgt.

Algene representerer plantene eller havets primærprodusenter. Mikroalger har en generasjonstid under et døgn, slik at en test av kroniske effekter (vekst og reproduksjon) kan gjennomføres i løpet av få døgn. Algenes veksthastighet ble målt i en konsentrasjonsserie av teststoffet i et marint algevekstmedium, etter en standard prosedyre (ISO DP 10253). Som testorganisme ble kiselalgen *Skeletonema costatum*, som er en av de viktigste planktonalgene i norske kystområdene, benyttet.

Krepsdyr er en viktig organismegruppe i marine økosystemer. Mange er herbivore, d.v.s. de lever av planter (alger) og representerer dermed annet ledd i næringskjeden. Langtidseffekter på krepsdyr kan undersøkes ved å studere reproduksjonssyklusen. En standardprosedyre for slike tester er utarbeidet for brakkvannskrepsdyret *Nitocra spinipes*. (Dansk Standard DS-F 88/225). Dyrenes reproduksjon og utvikling undersøkes i en konsentrasjonsserie av prøven i 14 døgn.

En tilsvarende metode som den med *Nitocra* er utviklet for en mer marin copepode-art, *Tisbe furcata*. Da denne test for tiden blir innarbeidet ved NIVA ble den også tatt med i undersøkelsen.

Undersøkelsen av toksiske effekter på fisk var begrenset til akutte effekter (dødelighet i løpet av 4 døgn) på stingsild (*Gasterosteus aculeatus*). Testen ble utført i overensstemmelse med Norsk Standard (NS 4717) for undersøkelse av kjemiske produkters og avløpsvanns akutte toksisitet for saltvannsfisk.

Ved toksisitetstestene undersøkes testorganismenes respons (f. eks. dødelighet, vekst eller reproduksjon) i en konsentrasjonsserie av prøveløsningen. På grunnlag av målingene konstrueres et konsentrasjon/respons-kurve som beskriver hvor sterk effekt forskjellige konsentrasjoner av avløpsvannet gir. Fra responskurven kan utleses hvilken konsentrasjon som gir f. eks. 50 eller 10 % effekt på den målte responsen.  $LC_{50}$ -verdien er den konsentrasjon som gir 50% dødelighet (letalitet). Når andre responser enn dødelighet blir registrert brukes betegnelsen  $EC_{50}$  for den konsentrasjon som gir 50% effekt på f. eks. veksthastighet eller reproduksjon. Analogt med dette betegner  $LC_{10}$  og  $EC_{10}$  konsentrasjoner som gir 10% effekt.

I de fleste testene blir konsentrasjon/responskurven beregnet etter probit-transformering av responsen i forhold til kontrollen og lineær regresjon av probit-verdiene mot logaritmen for konsentrasjon. Ved den lineære regresjonen blir også 95% konfidensintervall for responskurven beregnet. Fra regresjonsligningen blir LC- eller EC-verdiene med konfidensintervall beregnet. Når responskurven plottes med en lineær akse for respons (% av kontroll) mot logaritmen for konsentrasjon får den en sigmoid form (se figur 2-4).

### 3. Resultat

Detaljerte rapporter fra de ulike testene er sammenstilt i vedlegg.

#### 3.1. Mutagenitet

Mutagen aktivitet er påvist i prøveløsningen med Salmonella-stammen TA98, både med og uten ensymatisk aktivering (S9). Antallet revertanter var henholdsvis 5.3 og 4.2/ml. Til sammenligning kan oppgis at mutagen aktivitet i utslipp fra klorblekeri kan ligge omkring 60 rev./ml.

Testen med TA100 stammen viste ikke noe dose/respons sammenheng, og indikerte således ikke mutagen aktivitet. Dette kan skyldes viss toksisk virkning på bakteriene siden antallet bakteriekolonier på prøveplatene ved enkelte doser var lavere enn i kontrollene.

#### 3.2 Toksitet

Resultatene av toksisitetstestene er sammenstilt i tabell 2. Dødelighet av stingsild ble observert ned til 10% konsentrasjon av prøveløsningen, men alle testfiskene overlevde i 4 døgn ved 7.5% konsentrasjon (se fig. 1). LC<sub>50</sub>-verdien (50% dødelighet) ble beregnet til ca. 10% konsentrasjon.

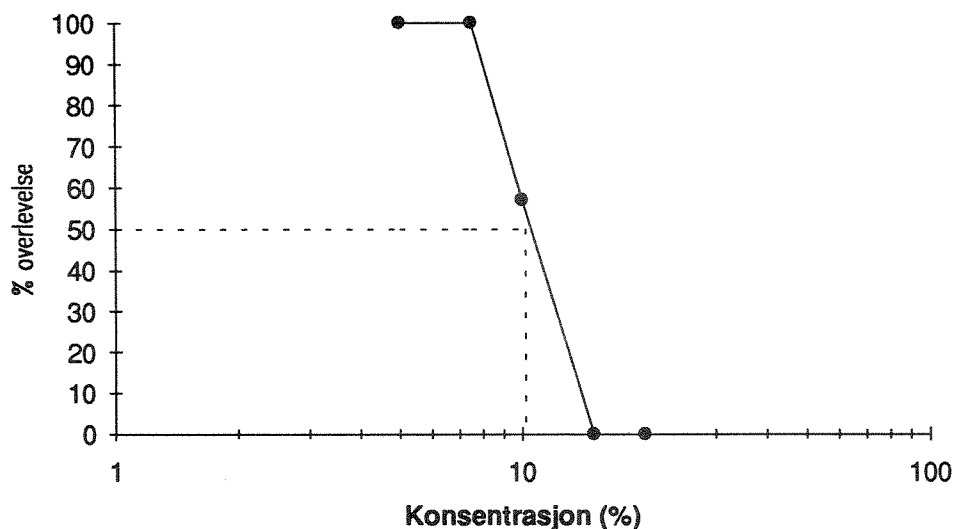


Fig. 1. Effekt av prøveløsning på overlevelse av stingsild ved 4 døgns eksponering. LC<sub>50</sub>-verdien er markert med stiplet linie.

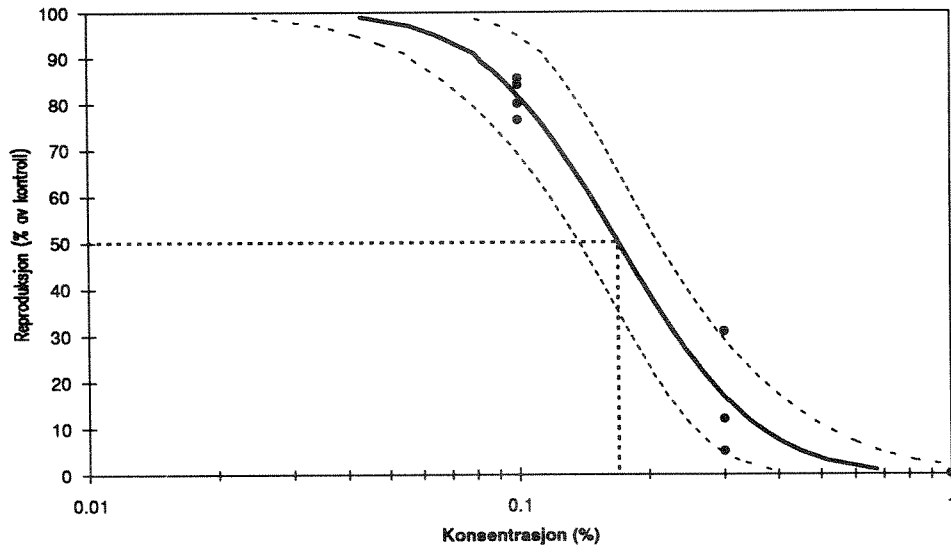
En innledende test med *Nitocra spinipes* indikerte at LC<sub>50</sub>-verdien ved 4 døgns eksponering var ca. 3.2%. Reproduksjonstesten ble utført i konsentrasjonsområdet 0.1 - 1 %. Det ble registrert en viss dødelighet i samtlige konsentrasjoner og også i kontrollen i løpet av reproduksjonstesten. Resultatet viser likevel klart at reproduksjonen hemmes med økende konsentrasjon av prøveløsning i det undersøkte området (se fig. 2). EC<sub>50</sub>-verdien ble beregnet til 0.17% og EC<sub>10</sub> til 0.08% konsentrasjon.

Krepsdyret *Tisbe furcata* var mer følsom enn *Nitocra*. LC<sub>50</sub>-verdien for nauplier var ca. 0.3%, d.v.s. ca. 10 ganger lavere enn for voksne *Nitocra*. Reproduksjonstesten ble utført i konsentrasjonsområdet 0.03-0.3 %. Også i testen med *Tisbe* døde noen av de voksne dyrene i løpet av forsøket i alle konsentrasjonene inklusive kontrollen. En klar effekt på reproduksjonen kunne

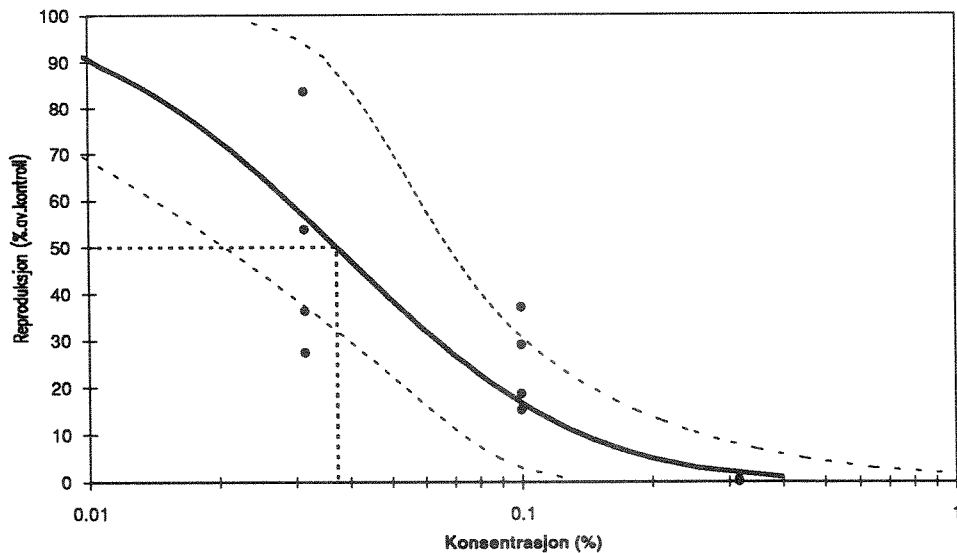


likevel observeres (se fig. 3). Ved den høyeste konsentrasjonen ble kun et avkom produsert mot 900 i kontrollen av tilsammen 19 hunner.  $EC_{50}$ -verdien ble beregnet til 0.037% og  $EC_{10}$  til 0.01%.

Algen *Skeletonema costatum* var mindre følsom enn krepsdyrene. Veksten var noe hemmet ved konsentrasjonen 1%, men  $EC_{10}$ -verdien (10% hemming) ble beregnet til 4.5% konsentrasjon (se fig. 4).  $EC_{50}$  var vid 7%. Veksthemmingen var fullstendig ved konsentrasjonen 16%.



Figur 2. Effekt av prøveløsning på reproduksjonen av krepsdyret *Nitocra spinipes*.



Figur 3. Effekt av prøveløsning på reproduksjonen av krepsdyret *Tisbe furcata*.

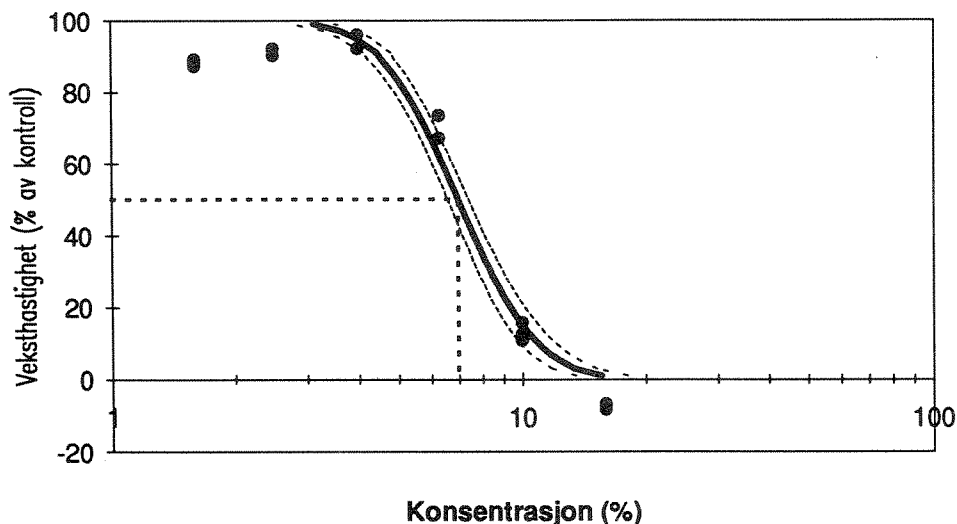


Fig. 4. Effekt av prøveløsning på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.

Tabell 2. Resultat av toksisitetstestene angitt som EC- og LC verdier (% konsentrasjon).

Organisme	Parameter	Enhet		95% konf. int.
Stingsild	4d LC <sub>50</sub>	%	<b>10.2</b>	-
Nitocra	14d EC <sub>50</sub> reproduksjon	%	<b>0.17</b>	0.14 - 0.21
Nitocra	14d EC <sub>10</sub> reproduksjon	%	<b>0.08</b>	0.056 - 0.115
Tisbe	19d EC <sub>50</sub> reproduksjon	%	<b>0.037</b>	0.021 - 0.068
Tisbe	19d EC <sub>10</sub> reproduksjon	%	<b>0.010</b>	0.003 - 0.0036
Skeletonema	3d. EC <sub>50</sub> vekst	%	<b>7</b>	06.6 - 7.4
Skeletonema	3d. EC <sub>10</sub> vekst	%	<b>4.5</b>	4.2 - 4.8

#### 4. Kommentarer

Den store forskjellen i følsomhet mellom de ulike testene skyldes til stor del de ulike responsene som blir registrert. Ved testen med stingsild undersøkes akutte effekter på overlevelse, mens det ved testene av krepsdyr blir registrert kroniske, subletale effekter på reproduksjon. Det er vanlig at subletale effekter kan registreres ved konsentrasjoner som er 10-100 ganger lavere enn LC<sub>50</sub>-verdien. De orienterende akutt-testene med *Nitocra* og *Tisbe* indikerte også at LC<sub>50</sub> var ca. 10-20 ganger høyere enn EC<sub>50</sub> for reproduksjon.

Likevel viser resultatene arts-spesifikke forskjeller i følsomhet for den undersøkte prøven. Krepsdyrene, og især *Tisbe furcata*, var klart mer følsomme enn alger og fisk. Algetesten kan betraktes som en kronisk, subletal test til tross for den korte testperioden, fordi algene har en "generasjonstid" som er mindre enn et døgn, og fordi det er effekten på veksthastigheten som måles. Testen med *Skeletonema* er derfor ofte mer følsom enn akutt-tester med fisk og krepsdyr. I dette tilfelle var imidlertid forskjellen i EC<sub>50</sub>-verdien for *Skeletonema* og LC<sub>50</sub>-verdien for stingsild liten (7 resp. 10 % konsentrasjon). Det tyder på at prøveløsningen ikke er spesielt giftig for denne algen.

Ut fra den dokumentasjon som foreligger om avløpsvannsprøvens sammensetningen er det grunn til å misstenke at noen av de observerte gifteffektene skyldes innhold av salter i prøven. Det totale saltinnholdet var i følge analysene 114 g/l, d.v.s. 3.3 ganger høyere enn i oseanisk sjøvann. Osmotiske effekter på testorganismene kan derfor forekomme ved høye konsentrasjoner av prøveløsningen, og det er ikke utenkelig at dette kan ha hatt betydning for gifteffekten på fisk, som ble observert ved konsentrasjoner over 7.5 %. Ved LC<sub>50</sub>-verdien for stingsild var saltbidraget fra avløpsvannet 12 g/l og det totale saltinnholdet 44 g/l, som er 26% høyere enn i sjøvann. Stingsild har en meget god evne til å tilpasse seg forskjeller i saltholdighet, og vandrer naturlig fra sjøvann til ferskvann, men det er usikkert om denne evnen strekker seg til saltholdigheter høyere enn naturlig sjøvann.

Også for algen *Skeletonema costatum* kan effekter av salter i avløpsvannet ha bidratt til veksthemmingen. Ved EC<sub>50</sub>-verdien for algen var saltholdigheten ca. 41 g/l eller ca. 19% høyere enn i naturlig sjøvann.

Ved testene med krepsdyrene *Nitocra* og *Tisbe* ble saltholdigheten justert til 15 resp. 34 g/l ved tilsetning av destillert vann og gifteffektene kan derfor kan ikke forklares av avløpsvannets saltinnhold. *Nitocra* er en brakkevannsorganisme, som kan leve i et meget stort saltholdighetsintervall. Salttilskuddet ved de konsentrasjoner som ble brukt ved reproduksjonstestene var også ubetydelig. Ved EC<sub>50</sub> for *Nitocra* var salttilskuddet fra avløpsvannet 0.19 g/l. I testen med *Tisbe* hadde salttilskuddet enda mindre betydning.

Oversikten over prøveløsningens kjemiske sammensetning i tabell 1, viser at den inneholder 2.7 g metanol/l d.v.s. ca. 0.34 vol.%. Ut fra hva som er kjent om effekter av metanol på akvatiske organismer, er det ikke sannsynlig at metanolinnholdet har bidratt til de observerte gifteffektene av prøveløsningen.

Konsentrasjonen av kontrastmidler ved LC<sub>50</sub> for stingsild var 10.2% av 30.7 g/l, d.v.s. 3.1 g/l. Dette innebærer at kontrastmiddelrestene har en lav akutt toksisk effekt. Ved EC<sub>50</sub> for *Tisbe furcata* var konsentrasjonene av kontrastmidler ca. 11 mg/l.

Med utgangspunkt i den mest følsomme subletale responsen som er funnet ved testene, effekter på reproduksjon av krepsdyret *Tisbe furcata*, kan fortynningsbehovet for å unngå toksiske effekter av avløpsvannet i resipienten anslås til 10000 ganger. I følge opplysninger fra Nycomed AS foreligger kontrastmiddelrestene i avløpsvannet 50-100 ganger fortennet i forhold til konsentrasjonen i den undersøkte prøveløsningen. Det innebærer at fortynningsbehovet for avløpsvannet er tilsvarende lavere.

Vedlegg  
**TESTRAPPORTER**

NIVA  
Postboks 69  
Korsvoll  
0808 Oslo 8  
Att: T.Källqvist

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING	
J. nr.:	3133/91
Sak nr.:	
Mottatt:	3.7

Saksbehandler  
Berit Holestøl

Dato  
1.07-91

MUTAGENITETSTESTING AV 1 PRØVE AVLØPSVANN \*

Oppdragnr.  
114401-071

1-91055

#### SAMMENDRAG

Ett ekstrakt av avløpsvann\* ( fra røntgenkontrastmidler) er testet for mutagen aktivitet med Ames Salmonella test. Prøven ble mottatt 2.05.91.

Mutagen aktivitet er påvist i avløpsvannet\* med TA 98-stammen beregnet til 5,3 revertanter/ml med ensymatisk aktivering (S9) og til 4,2 revertanter uten aktivering. TA 100-stammen har ikke gitt utslag.

#### INNLEDNING

Den 2.05.91 ble det mottatt en prøve avløpsvann\* av røntgenkontrastmidler som skulle eter-ekstraheres og testes for mutagen aktivitet med Salmonellastammene TA 98 og TA 100 med og uten leverenzym (S9)

#### SALMONELLA/MIKROSOMTESTEN

Salmonella/mikrosomtesten er en gentoksisk korttidstest. En beskrivelse av testen er presentert i vedlegg 1. I disse forsøkene er bakteriestammene TA98 og TA100 blitt benyttet. Disse har forskjellig følsomhet overfor forskjellige typer forbindelser. TA98 er mest følsom overfor mutagener som induserer leserammeforskyvning. TA100 er mest følsom for mutagener som induserer baseparsubstitusjon.

\*Prøveløsning av kontrastmiddelrester (se sid. 4).

En del forbindelser er mutagene bare etter omvandling (metabolisering) i kroppen. For å simulere denne metaboliseringen, testes prøvene både med og uten tilsats av et leverenzympreparat (S9).

Et vanlig krav til positivt utslag i Salmonella/mikrosomttesten er en dobling av antall mutantkolonier i forhold til bakgrunnen (spontanmutasjoner) og/eller en klar lineær doserespons sammenheng.

#### ETEREKSTRAKSJON

En prøvemengde på 800 ml ble surgjort med kons.HCL til pH ca.2, ekstrahert med 150 ml eter i en E-kolbe med magnetrører 1t.(2 ganger) og 100 ml eter 1 gang.Ved denne sure ekstraksjonen var det vesenlig eddiksyre som ble ekstrahert ut.Prøven ble derfor ekstrahert på nytt uten justering av pH (pH i prøven var ca.6) Ekstraktet ble forsiktig inndampet til nesten tørrhet og løst i 2 ml dimetylsulfoxyd (DMSO)

#### MUTAGENITETSTESING

Ekstraktene er testet med Ames Salmonella-test med stammene TA98 og TA100 med og uten leverensymer(S9). 1-nitropyren (NP) og benzo(a)-pyren (BaP) er benyttet som positive kontroller.

#### RESULTATER

Resultater fra testingen er presentert i tabell 1 og 2. Tabell 2 viser mutagen aktivitet med TA 98-stammen både med og uten enzymatisk aktivering (S9). Aktiviteten er beregnet til henholdsvis 5,3 rev./ml og 4,2 rev./ml.

Til sammenligning kan oppgis at mutagen aktivitet i utslipp fra klorblekeri kan ligge omkring 60 rev./ml.

TA 100-stammen har ikke gitt dose-respons.Dette kan skyldes at prøven har toksisk virkning på bakteriene.I noen doser gir dette seg utslag i at antall kolonier på prøveplatene er lavere enn kontrollene (blindprøvene).

Med vennlig hilsen  
SENER FOR INDUSTRIFORSKNING

*Arne L. Kvernheim*  
Arne L.Kvernheim

*Berit Holestøl*  
Berit Holestøl

Tabell 1. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikrosomttesten av et ekstrakt av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 3 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller)

Prøve	Prøvevol µl	Bakteriestamme			
		TA 100-S9		TA 100+S9	
		Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 1	Forsøk 2
Ekstrakt	5		139		98
	10	115	142	118	104
	15		137		145
	20	115		123	
	50	119		tox	
Spontan (Kontroller)		128	125	130	125
5µg BaP 2µg NP		1115	1491	892	611

Tabell 2. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikromosomtesten av et ekstrakt av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 3 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller.)

Prøve	Prøvevol µl	Bakteriestamme			
		TA 98-S9		TA 98+S9	
		Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 1	Forsøk 2
ekstrakt	5		29		27
	10	43	41	50	54
	15		51		65
	20	43		31	
	50	67		tox	
Spontan Kontroller		24	22	32	22
5µg BaP				300	272
0,2µg NP		1023	685		





## HVA ER AMES' TEST?

Ames' test (Salmonella-testen) benyttes til orienterende undersøkelser av stoffers mutagene (arvestoffskadende), eventuelt kreftfremkallende virkning. Ved forsøk er det funnet at 80-90% av de stoffer som er kreftfremkallende i dyreforsøk, også er mutagene i Ames' test. Metoden er en korttidstest med Salmonella-bakterier, utviklet av Bruce Ames, Berkeley, California.

Det anvendes spesielle Salmonella-bakterier, som mangler evnen til å gro uten aminosyren histidin, dvs bakteriene formerer seg ikke i fravær av histidin. For å vokse og danne kolonier på et histidin-fritt medium, må bakteriene gjennomgå en mutasjon. Et mutagent stoff vil føre til at et økt antall kolonier vokser opp.

Mange stoffer virker som aktive mutagener eller karsinogener først etter omdanning (metabolisering) i kroppen (indirekte mutagener). Bakterier, som har et meget enklere enzymesystem enn pattedyr, vil normalt ikke metabolisere indirekte mutagener. For å simulere betingelsene i pattedyr, aktiveres testsubstansen ved tilsetning av et leverenzympreparat fra rotter til testsystemet.

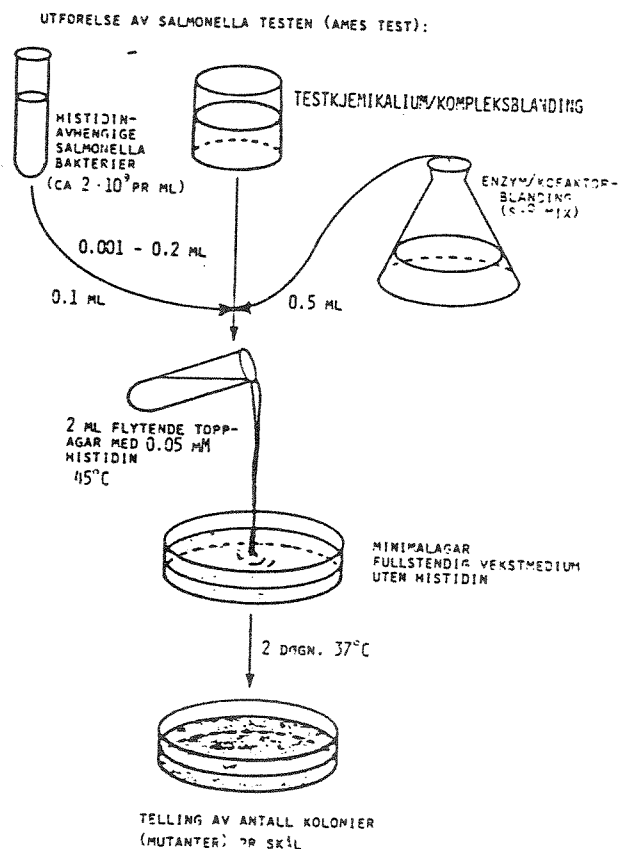
## HVORDAN TESTES PRØVER I PRAKSIS?

Metoden utføres som beskrevet av Ames et al. (Mutation Research 31, 1975, 347).

Rent eksperimentelt gjøres følgende:

Til et reagensrør med 2 ml smeltet toppagar ( $45^{\circ}\text{C}$ ) tilsettes 0.1 ml bakteriekultur (ca  $10^8$  celler) og testsubstans. Det hele blandes raskt og helles over på vekstplater. (Minimalplater kun tilsatt spor av histidin for igangsettelse av vekst.) Til halvparten av skålene tilsettes leverenzymblanding (S9-mix), 25 mg protein/plate. Platene inkuberes ved  $37^{\circ}\text{C}$ , og etter 2 døgn telles antall kolonier (mutanter) på platene. Et vanlig krav til positivt resultat er en fordobling av antall revertanter i forhold til bakgrunnen, eller en lineær doseavhengighet. Prøvene testes i 3-5 doser, med to paralleller pr dose.

For å kontrollere antall spontanmutasjoner, inkluderes plater uten tilsatt av testsubstans. Som positive kontroller blir benzo(a)pyren (BaP) og 1-nitropyren (1NP) benyttet.



## Norsk Institutt for Vannforskning NIVA

## Testrapport

## Toksitetstest med fisk

## Testmetode

Testen er utført i overensstemmelse med "OECD Guidelines for testing of Chemicals" No. 203; "Fish, acute toxicity test," og en noe modifisert Norsk Standard, NS 4717; "Bestemmelse av kjemiske produkters og avløpsvanns akutte toksisitet for saltvannsfisk".

## Testorganisme

Som testfisk ble benyttet trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) som var hentet i Sandebukta, Oslofjorden og tilvendt forholdene i laboratoriet i 8 dager før forsøkene startet. Fisken hadde en middelvekt på 0.49 g og -lengde 4.5 cm.

## Utførelse

Forsøkene ble utført i glassakvarier med 10 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon av prøveløsningen. Avløpsvannet ble fortennet direkte i testkarene til de aktuelle konsentrasjoner med sjøvann fra 40 m dyp i Oslofjorden ved Solbergstrand utenfor Drøbak (saltholdighet 34 promille). Testfiskene ble overført til ny løsning hvert døgn (semistatisk metode) og forsøket pågikk i 4 døgn. Fisken ble observert flere ganger daglig og døde fisk ble notert og fjernet. Temperaturen under forsøket var 9.1+- 0.7 °C.

## Resultater

I tabell 1 og fig. 1, er oppført dødeligheten i hver konsentrasjon av prøveløsningen. På figuren er 4d LC<sub>50</sub>-verdien avsatt (Den konsentrasjon som dreper 50% av forsøksfisken i løpet av 4 døgn). I 10% løsning døde 43% av fiskene etter 4 døgn. 4d LC<sub>50</sub>-verdien ble beregnet til 10.2%, d.v.s. 102 ml avløpsvann/l.

Tabell 2. Kumulativt antall (%) døde fisk ved forskjellig eksponeringstid.

Fortynning	Eksponeringstid, timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
5	0	0	0	0
7.5	0	0	0	0
10	0	1 (14)	2 (29)	3 (43)
15	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)
20	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)

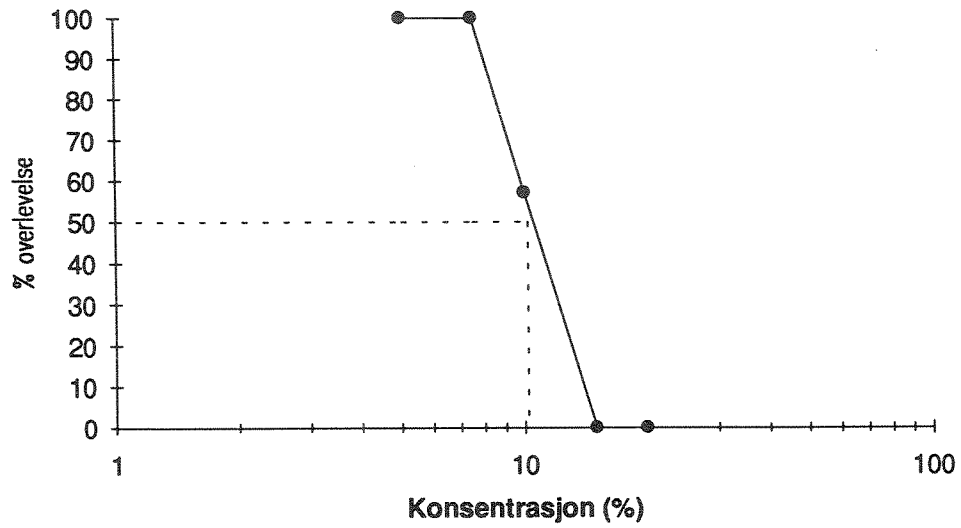


Fig. 1. Overlevelse av laks (%) som funksjon av konsentrasjon (%) prøveløsning.

Ansvarlig for testen: Magne Grande

Norsk Institutt for Vannforskning NIVA

## Reproduksjonstest med *Nitocra spinipes*

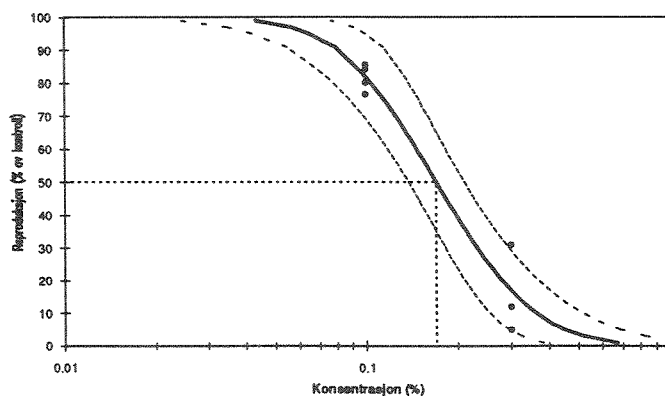
Metode:	Forslag til Dansk standard: Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret <i>Nitocra spinipes</i> . Reproduksjonsmetode.
Teststoff:	Prøveløsning med kontrastmiddelrester fra Nycomed Lindesnes
Testperiode:	27/5 - 10/6 1991
Testorganisme:	<i>Nitocra spinipes</i> , stamme fra Vandkvalitetsinstituttet, Danmark
Dyrkingsbetingelser:	Dyrket etter metodeforslag fra VKI, Danmark
Testbetingelser:	Saltholdighet 15 promille, justert til pH 8.0
Antall enheter:	4 pr. konsentrasjon, med 5 individer (tot. 20 individer pr. konsentrasjon)
Testkonsentrasjoner:	0.1, 0.32 og 1% av avløpsvann
Temperatur:	20 ± 0.5 °C
pH, oksygen:	Ved start pH 8.0 og oksygen > 90% i alle konsentrasjoner
	Ved slutt:
	Kons.      pH      oksygen
	Kontroll    8.1      98%
	0.1 %      8.2      98%
	0.3 %      8.4      97%
	1.0 %      8.7      83%

### RESULTAT

Antall hunner, samt produsert avkom i løpet av testen er vist i tabellen under. Nauplier og copepoditter er to utviklingsstadier av larvene. (Nauplier er det første).

Kons.	Foreldre		Antall avkom		Copepoditter(%)	Nauplier (%)
	Start	Slutt	Totalt	Snitt/hunn		
Kontr.	20	17	713	36	66	34
0.1 %	20	14	465	23	36	64
0.32 %	20	15	112	5.6	38	63
1.0 %	20	15	0	0	-	-

Parameter	Enhet	EC <sub>50</sub>	95% konf. int	EC <sub>10</sub>	95% konf. int.
Reproduksjon	kons. %	0.17	0.14 - 0.21	0.08	0.056 - 0.115



Effekt av prøveløsning på reproduksjon av *Nitocra spinipes*. Den heltrukne linien viser konsentrasjon/respons-kurven med 95% konfidensintervall (strekede linier) bestemt ved probit-analyse.

Ansvarlig for testen: Harry Efraimsen

## Norsk Institutt for Vannforskning NIVA

Reproduksjonstest med *Tisbe furcata*

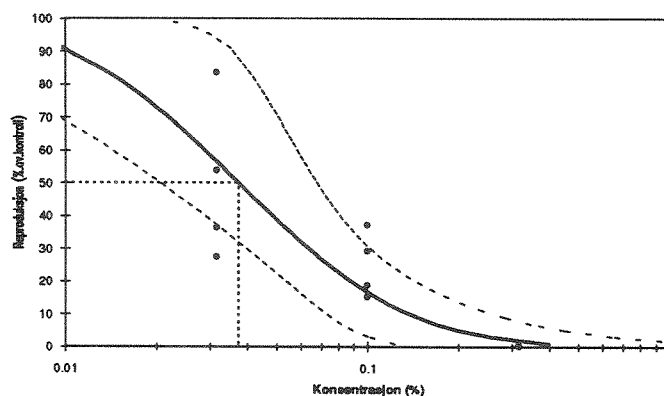
Metode:	Modifisert etter: Forslag til Dansk standard: Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret <i>Nitocra spinipes</i> . Reproduksjonsmetode. Foring med <i>Ulva</i> sp.
Teststoff:	Prøveløsning med kontrastmiddelrester fra Nycomed Lindesnes
Testperiode:	15/5 - 3/6 1991
Testorganisme:	<i>Tisbe furcata</i> (NIVA) fra Solbergstrand, Oslofjord, januar 1991
Dyrkingsbetingelser:	Dyrket etter metode beskrevet av Battaglia (1970)
Antall enheter:	4 pr. konsentrasjon, med 4-5 individer (tot. 20 individer pr. konsentrasjon)
Testkonsentrasjoner:	0.0316%, 0.1 %, 0.316 %
Temperatur:	15 +/- 0.5 °C
Saltholdighet	34 promille
pH	8.0 +/- 0.2
Oksygen	>=90 %

## RESULTAT

Antall hunner, samt produsert avkom i løpet av testen er vist i tabellen under. Nauplier og copepoditter er to utviklingsstadier av larvene. (Nauplier er det første).

Kons.	Foreldre		Antall avkom		Copepoditter(%)	Nauplier (%)
	Start	Slutt	Totalt	Snitt/hunn		
Kontr.	19	11	900	47.4	79	21
0.0316 %	18	7	438	24.3	92	8
0.10 %	19	12	228	12	99	0.9
0.316 %	19	12	1	0.05	100	0

Parameter	Enhet	EC <sub>50</sub>	95% konf. int	EC <sub>10</sub>	95% konf. int.
Reproduksjon	kons. %	0.037	0.021 - 0.068	0.010	0.003-0.036



Effekt av prøveløsning på reproduksjon av *Tisbe furcata*. Den heltrukne linien viser konsentrasjon/responskurven med 95% konfidensintervall (strekede linier), bestemt ved probit-analyse.

Ref.: Battaglia, B. (1970). Cultivation of marine copepodes for genetic and evolutionary research. Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen 20: 385-392.

Ansvarlig for testen: Renée Bechmann

Norsk institutt for vannforskning NIVA

## Testrapport

### Toksisitetstest med marine alger, ISO DP10253

**Teststoff:** Prøveløsning med kontrastmiddelrester fra Nycomed Lindesnes Fabrikker

#### Test data

Organisme:	<i>Skeletonema costatum</i> NIVA BAC1
Testparameter:	Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur:	Semi-kontinuerlig i nat. sjøvann +10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato:	30.04.91
Konsentrasjoner:	1, 1.6, 2.5, 4, 6.3, 10 og 16 %
Test medium:	ISO DP 10253
Inkuberingsutstyr:	Gyngebord
Dyrkingsflasker:	100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys:	70 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ , kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør (180 $\pi$ sensor)
Temperatur:	20 °C
pH	Kontroll: 8.2-8.9, Ved kons. 16%: 6.4-6.9
Vekstmåling:	Partikkel telling med Coulter Multisizer
Beregning av $\text{EC}_{50}$ *	Probit transformering og lineær regression av probit verdier mot log konsentrasjon.
Beregning av NOEC *	t-test

#### Resultater

Celltetthet på hvert målepunkt, den beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middelveidier for kontroller og ved ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på å skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1. Konsentrasjon/responskurven er vist i figur 2.

Parameter	Enhet	$\text{EC}_{50}$	95% konf. int.	$\text{EC}_{10}$	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	kons. %	7.0	6.6 - 7.4	4.5	4.2 - 4.8	<1.0

#### Kommentarer

Svak, men konstant veksthemming ved konsentrasjonene 1-4% gir en unormal responskurve. Beregningen av EC-verdier er basert på konsentrasjonene fra 4-10%.

Ansvarlig for testen: Torsten Källqvist

\*  $\text{EC}_{50}$  = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

\* NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Ref: Staub (1961): Ernährungsphysiologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* D.C. Schweiz. Z. Hydrol. 23: 82-198.

## Norsk institutt for vannforskning NIVA

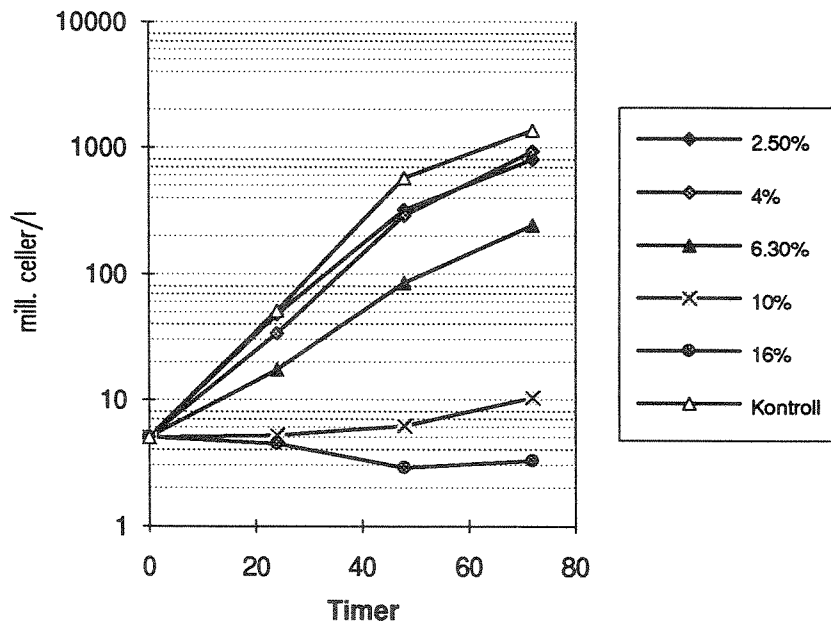


Fig. 1. Vekstkurver for *Skeletonema costatum* i ulike konsentrasjoner av prøveløsning

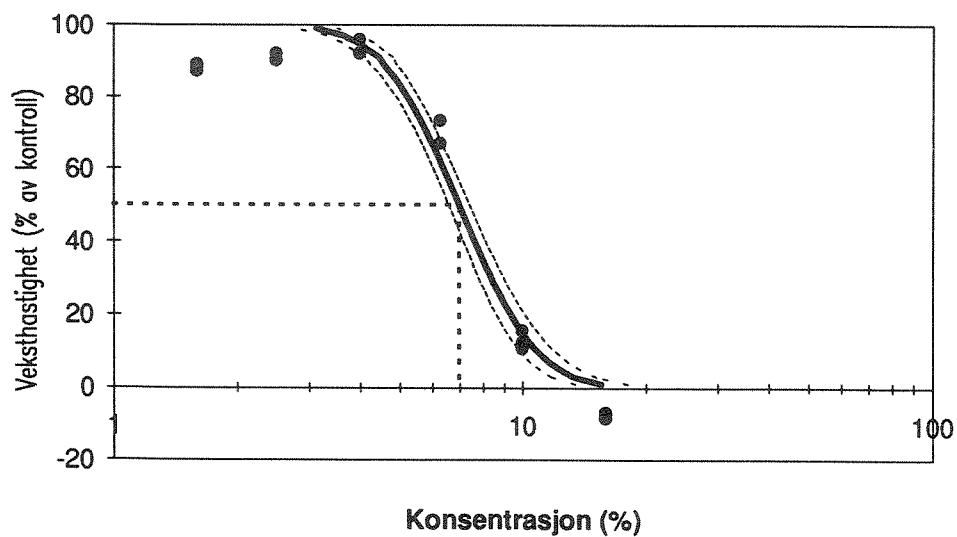


Fig. 2. Effekt av prøveløsning på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*. Den heltrukne linien viser konsentrasjon/responskurven med 95% konfidensintervall (strekede linier).