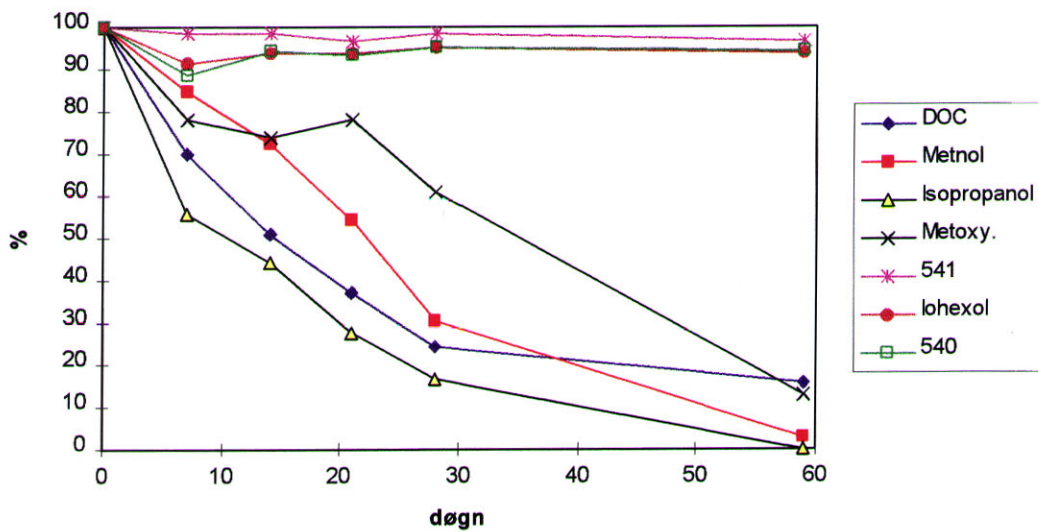


# Karakterisering av avløpsvann fra produksjon av røntgenkontrastmidler ved Nycomed Imaging, Lindesnes



**Hovedkontor**

Postboks 173, Kjelsås  
0411 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 22 18 52 00

**Sørlandsavdelingen**

Televeien 1  
4890 Grimstad  
Telefon (47) 37 29 50 55  
Telefax (47) 37 04 45 13

**Østlandsavdelingen**

Sandvikaveien 41  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 62 57 64 00  
Telefax (47) 62 57 66 53

**Vestlandsavdelingen**

Nordnesboder 5  
5008 Bergen  
Telefon (47) 55 32 56 40  
Telefax (47) 55 32 88 33

**Akvaplan-NIVA A/S**

Søndre Tollbugate 3  
9000 Tromsø  
Telefon (47) 77 68 52 80  
Telefax (47) 77 68 05 09

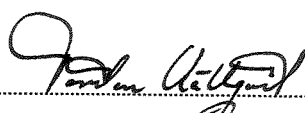
Tittel <b>Karakterisering av avløpsvann fra produksjon av røntgenkontrastmidler ved Nycomed Imaging, Lindesnes</b>	Løpenr. (for bestilling) <b>3595-97</b>	Dato <b>23.12.96</b>
	Prosjektnr. Undernr. <b>96186</b>	Sider Pris <b>35</b>
Forfatter(e) <b>Torsten Källqvist</b>	Fagområde <b>Økotoxikologi</b>	Distribusjon
	Geografisk område <b>Vest Agder</b>	Trykket <b>NIVA</b>

Oppdragsgiver(e) <b>Nycomed Imaging, Lindesnes Fabrikker</b>	Oppdragsreferanse <b>24 juni 1996</b>
---	--

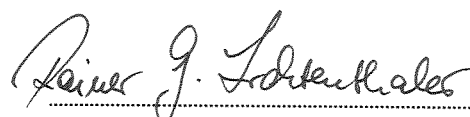
Sammen drag

En prøve av avløpsvann fra Nycomed Imaging, Lindesnes ble tatt i juni 1996. Prøven ble karakterisert m.h.t. innhold av røntgenkontrastmidler, løsningsmidler og reproduksjonstoksiske effekter på marine copepoder (*Nitocra spinipes*) før og etter biologisk nedbrytning i sjøvann. Innholdet av lipofile (potensielt bioakkumulerende) organiske komponenter ble også undersøkt. Undersøkelsen viste at de organiske løsningsmidlene ble brutt ned i naturlig sjøvann, mens det ikke kunne påvises reduksjon av innholdet av røntgenkontrastmidler i løpet av 59 døgn. 50% reduksjon av reproduksjonen til *Nitocra spinipes* ble funnet ved 1.4 % konsentrasjon av avløpsvann. Etter 28 døgn nedbrytning var det ingen signifikant endring av toksisiteten. Resultatet tyder på at toksisiteten skyldes avløpsvannets innhold av persistente røntgenkontrastmidler. Konsentrasjonen av potensielt bioakkumulerbare organiske stoffer i avløpsvannet er lav.

Fire norske emneord 1. <b>Industriavløpsvann</b> 2. <b>Nedbrytbarhet</b> 3. <b>Toksisitet</b> 4. <b>Bioakkumulering</b>	Fire engelske emneord 1. <b>Industrial waste water</b> 2. <b>Biodegradation</b> 3. <b>Toxicity</b> 4. <b>Bioaccumulation</b>
---	--

  
 Prosjektleder

ISBN 82-577-3149-8

  
 Forsknings sjef

**Karakterisering av avløpsvann fra produksjon av  
røntgenkontrastmidler ved Nycomed Imaging,  
Lindesnes**

## Forord

I 1991 gjennomførte NIVA en karakterisering av delavløpsvann fra produksjon av røntgenkontrastmidler ved Nycomed, Lindesnes. Det ble funnet at avløpsvannet hadde lav akutt toksisitet, men hemmet reproduksjonen hos marine krepsdyr.

Statens Forurensningstilsyn har ytret ønske om at Nycomed Imaging foretar en utvidet økotoksikologisk karakterisering med sikte på å klarlegge hvordan toksiske komponenter blir fjernet ved biologisk nedbrytning i resipienten. I et møte i SFT 7.2.96 ble opplegget for en undersøkelse diskutert. På grunnlag av dette ble et forslag til program utarbeidet av NIVA (13.2.96). En prøve av avløpsvannet ble tatt ut av Nycomed i uke 26 og sendt til NIVA for karakterisering

Oslo, 23 desember 1996

*Torsten Källqvist*

---

# Innhold

<b>Sammendrag</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>6</b>
<b>1. Bakgrunn</b>	<b>7</b>
<b>2. Metoder</b>	<b>7</b>
<b>3. Resultat</b>	<b>8</b>
3.1 Kjemisk karakterisering	8
3.2 Nedbrytbarhet	8
3.3 Toksisitet	9
3.4 Bioakkumulerbare komponenter	11
<b>4. Konklusjon</b>	<b>12</b>
<b>5. Ordforklaringer</b>	<b>13</b>

---

## Sammendrag

Tidligere undersøkelser har vist at avløpsvann fra produksjon av røntgenkontrastmidler ved Nycomeds fabrikker i Lindesnes har reproduksjonshemmende effekter på marine copepoder. Den foreliggende undersøkelsen ble foretatt for å klargjøre om disse effektene blir redusert ved biologisk nedbrytning. En nedbrytbarhetstest med 10% avløpsvann i naturlig sjøvann (OECD Guideline 306) viste 84 % reduksjon av løst organisk karbon (DOC), mens det ikke ble påvist signifikant nedbrytning av røntgenkontrastmidler. Reduksjonen av DOC skyldes nedbrytning av organiske løsningsmidler i avløpsvannet. Den reproduksjonstoksiske effekten ble ikke redusert

ved 28 døgns biologisk nedbrytning.  $EC_{50}$ -verdien for reproduksjonshemming på *Nitocra spinipes* var 1.4 % før nedbrytning og 0.94% etter nedbrytning. Økningen i toksisitet ved nedbrytning var ikke signifikant. Resultatene tyder på at avløpsvannets toksisitet skyldes de persistente restene av kontrastmidler.

En tynnsjikt-kromatografisk analyse av potensielt bioakkumulerbare forbindelser viste lave konsentrasjoner av lipofile organiske stoffer med  $\log P_{ow} > 3$ .

## Summary

Title: Characterization of wastewater from production of x-ray contrast agents

Year: 1996

Author: Torsten Källqvist

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3149-8

Wastewater from production of x-ray contrast agents have been found to have an inhibiting effect on the reproduction of marine copepods. The present investigation was performed to examine if biological degradation will reduce the concentration of contrast agents and the reproduction inhibiting effect of the wastewater. A degradation test in seawater (OECD Guideline 306), showed 84% reduction in DOC, but no significant reduction in the concentrations of contrast agents over 59 days at 20 °C. The inhibition of reproduction of the copepod *Nitocra spinipes* was not significantly affected by 28 days biological degradation of the wastewater. It was concluded that the effects on reproduction probably is caused by the residual contrast agents in the wastewater.

A thin-layer chromatography assay showed low concentrations of potentially bioaccumulative substances ( $\log P_{ow} > 3$ ) in the wastewater.

# 1. Bakgrunn

Avløpsvannet fra produksjon av røntgenkontrastmidler inneholder opp til 0.6 g kontrastmiddelrester/L og ca. 1.5 g alkoholer/L. Tidligere undersøkelser har vist at avløpsvannet har reproduksjonshemmende effekter på marine krepsdyr (*Nitocra* og *Tisbe*) ved konsentrasjoner som tilsvarer ca. 10 mg kontrastmidler/L (NIVA rapport 2603, 1991). Videre

er det vist at den biologiske nedbrytbarheten av kontrastmidler er svært lav. For å vurdere fare for økologiske effekter i resipienten ønsker SFT informasjon om hvordan biologisk nedbrytning påvirker avløpsvannets reproduksjonshemmende effekter og hvorvidt utslippet inneholder stoffer med potensiale for bioakkumulering.

# 2. Metoder

For å få kunnskap om persistensen till den (de) komponenter i avløpsvannet som gir reproduksjonshemmende effekter ble en nedbrytbarhetstest, hvor effekten på reproduksjon av *Nitocra spinipes* undersøkes, utført før og etter en 4 ukers nedbrytningsperiode. I tillegg er det foretatt en test for påvisning av stoffer med potensiale for bioakkumulering.

Nedbrytbarhetstesten ble utført i samsvar med OECD Guideline 306, "shake flask method", med avløpsvannet fortynnet i sjøvann og uten tilsetning av bakterier utover de som er tilstede i sjøvannet. Testen foregikk i mørke ved temperaturen 20 °C. Nedbrytningsgraden ble undersøkt ved analyse av løst organisk karbon (DOC). I tillegg ble det tatt ut prøver på forskjellige tidspunkt i løpet av testen for analyser av spesifikke komponenter (løsningsmidler og røntgenkontrastmidler) ved Nycomeds laboratorium. Hovedtesten ble utført med 10% konsentrasjon av avløpsvannet i sjøvann. Parallelt med denne ble det satt opp en test med 50% konsentrasjon som ble brukt til måling av toksisitet og bioakkumuleringspotensiale etter nedbrytning.

Reproduksjonstesten med *Nitocra* ble utført som ved foregående undersøkelse, i samsvar med en dansk metode (Dansk Standard DS-F 88/225). Dyrenes reproduksjon og utvikling ble undersøkt ved ulike konsentrasjoner av avløpsvannet i 14 døgn.

Potensielt bioakkumulerbare forbindelser ble bestemt med en tynnjikt-kromatografisk metode utviklet av Naturvårdsverket i Sverige. Prinsippet for testen er at lipofile (fettløselige) organiske stoffer isoleres og kvantifiseres. Fordelingskoeffisienten okatnol/vann ( $P_{ow}$ ) brukes som mål på lipofilitet. Potensiale for bioakkumulering av organiske stoffer er avhengig av lipofiliteten og man regner med at stoffer med  $\log P_{ow} > 3$  har høyt potensiale for bioakkumulering.

Avløpsvannet ble ekstrahert med heksan og heksan-ekstraktet ble applisert på en tynnsjiktplate. På grunnlag av referankestoffer ble områder på platen med forbindelser med  $\log P_{ow}$  mellom 3 og 6 og  $>6$  lokalisert. Disse fraksjonene ble isolert fra platen og kvantifisert med gasskromatografi (GC).



## 3. Resultat

### 3.1 Kjemisk karakterisering

En delprøve av avløpsvannet ble analysert ved Nycomeds laboratorium. Resultatet fremgår av tabell 1.

### 3.2 Nedbrytbarhet

Avløpsvannets innhold av løst organisk karbon (DOC) var 2.1 g/L. Startkonsentrasjonen av DOC i nedbrytbarhetstesten ved 10% konsentrasjon i sjøvann var altså 211 mg/l. I tabell 2 vises hvordan konsentrasjonen av DOC og 6 ulike organiske komponenter avtok i løpet av 60 døgn i nedbrytbarhetstesten.

Tabell 1. Kjemisk karakterisering av avløpsvann.

Parameter	enhet	verdi
<b>Kontrastmiddelrester</b>		
"541"	mg/l	60
Iohexol	mg/l	105
Iopentol	mg/l	17
"540"	mg/l	103
Isopaque	mg/l	0
Dijod-540	mg/l	36
Fronttop.	mg/l	128
Iodixanol	mg/l	14
Andre UIT	mg/l	13
<b>Løsningsmiddelrester</b>		
Metanol	mg/l	720
Meylacetat	mg/l	5
Isopropanol	mg/l	154
2-Metoxymetanol	mg/l	213
2-Butanol	mg/l	14
Aceton	mg/l	13
Etanol	mg/l	0
Acetonitril	mg/l	0
Pyridin	mg/l	0

Konsentrasjonen av de ulike organiske komponentene som % av utgangskonsentrasjonene er vist i fig. 1. Som det fremgår av figuren gjenspeiler DOC-konsentrasjonen nedbrytningen av metanol og isopropanol som er relativt lett nedbrytbare under de aktuelle betingelsene. Halveringstiden for disse komponentene er ca. 10 døgn for metanol og 21 døgn for isopropanol. 2-Metoxymetanol brytes ned noe langsommere, med en halveringstid på ca. 30 døgn. For kontrastmidlene 541, Iohexol og 540 er det ikke påvist noen signifikant nedbrytning i løpet av 59 døgn. Variasjonene ligger tildels i analysemetodens nøyaktighet. Prøvene ble også analysert for fritt iodid med resultat ca. 20 mg/l. Konsentrasjonen av iodid var imidlertid meget lav i forhold til kloridkonsentrasjonen slik at nøyaktig bestemmelse ble vanskelig. Resultatene tyder på

at eventuell nedbrytning av kontrastmidlene ikke har gitt avspalting av fritt iodid.

### 3.3 Toksisitet

Avløpsvannets effekt på reproduksjonen av krepsdyret *Nitocra spinipes* er vist i figur 2. Plotting av resultatene fra testene før og etter nedbrytning viser at resultatene overlapper. Beregning av EC<sub>50</sub>-verdier (EC<sub>50</sub> = den konsentrasjonen som gir 50% reduksjon av reproduksjonen) viste lavere EC<sub>50</sub>-verdi etter nedbrytning enn før nedbrytning, som tyder på at toksisiteten øket ved nedbrytning. Konfidensintervallene for EC<sub>50</sub>-estimatene overlappet imidlertid og forskjellen kan ikke regnes som signifikant (Se tabell 3).

Tabell 2. Resultat av kjemiske analyser ved nedbrytbarhetstest med avløpsvannet fortynnet i sjøvann. Konsentrasjonen av avløpsvann var 10%. Resultatene er korrigert for fortynningen og representerer konsentrasjonene i ufortynnet prøve.

	enhet	døgn					
		0	7	14	21	28	59
DOC	mg/l	2110	1480	1080	780	510	330
Metanol	mg/l	720	610	520	390	220	20
Isopropanol	mg/l	180	100	80	50	30	<10
2-Metoxymetanol	mg/l	230	180	170	180	140	30
"541"	mg/l	62	62	61	60	61	60
Iohexol	mg/l	84	77	79	79	80	79
"540"	mg/l	107	95	101	100	102	101

Tabell 3. EC<sub>50</sub>-verdier for effekt av avløpsvann før og etter nedbrytning på reproduksjon av *Nitocra spinipes*.

Prøve	EC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall
Før nedbrytning	1.4	0.75 - 2.5
Etter nedbrytning	0.94	0.55 - 1.6

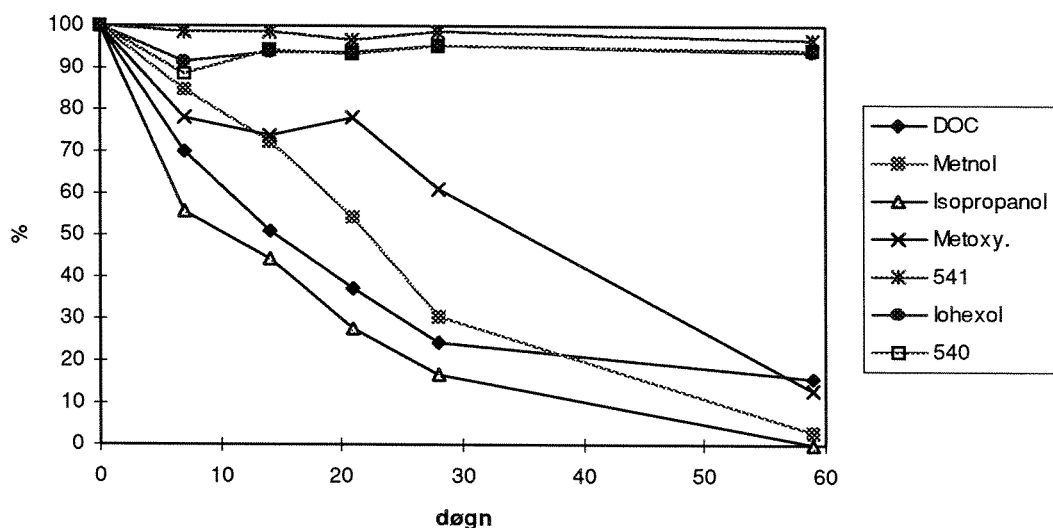


Fig. 1 Nedbrytningsforløp for DOC og spesifikke organiske forbindelser i avløpsvann fortynnet i sjøvann. Utgangskonsentrasjonene av de ulike komponentene er satt til 100%.

Resultatene viser at det ikke er skjedd noen signifikant reduksjon av toksisiteten etter 28 døgns biologisk nedbrytning. Følgelig skyldes den reproduksjonshemmende effekten ikke de lett nedbrytbare komponentene, metanol, isopropanol og 2-metoxymetanol, men trolig de persistente

røntgenkontrastmidlene eller eventuelle andre persistente komponenter. Den samlede konsentrasjonen av de tre analyserte røntgenkontrastkomponentene ved  $EC_{50}$ -verdien for reproduksjon er 1-1.5 % av 250 mg/l, dvs. ca. 2.5 - 4 mg/l. Dette er lavere enn hva som ble funnet ved en tidligere karakterisering av

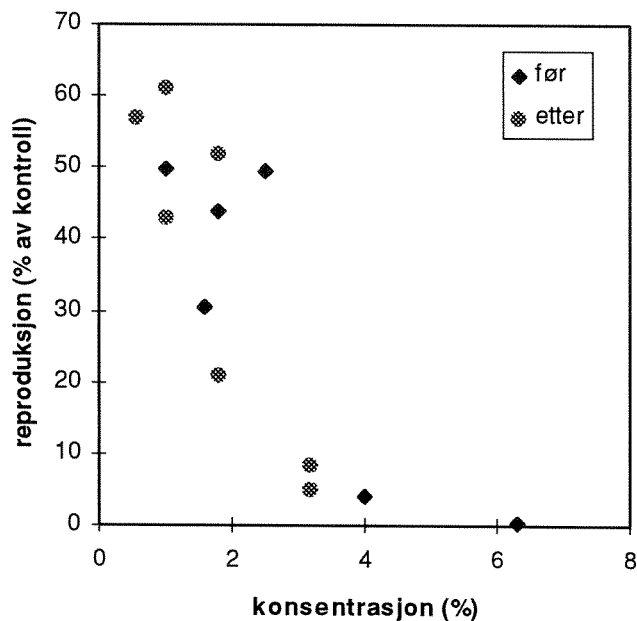


Fig. 2. Effekt av avløpsvann før og etter nedbrytning på reproduksjon av *Nitocra spinipes*

moderluter fra fabrikk (NIVA rapport 2603, 1991). Forskjellen ligger imidlertid trolig innenfor den variasjon man kan vente for den aktuelle testen.

Dersom man sammenligner konsentrasjonen av DOC og de spesifikke komponentene som er analysert, finner man at en betydelig del av den organiske fraksjonen ikke er identifisert. Dersom man regner med at karbon-innholdet i de organiske komponentene er i gjennomsnitt 40 %, utgjør de spesifikke komponentene listet i tabell 1 ca. 670 mg DOC/l i avløpsvannet. Analysene av DOC før nedbrytning viste 2110 mg/l. Det betyr at 68 % av de organiske komponentene ikke er identifisert ved de spesifikke analysene.

Fra Nycomed opplyses det at de organiske forbindelser som ikke er gjort rede for i analysene må skyldes at avløpsvannet også inneholder kloakkvann. Målinger i 1988, viste systematisk, signifikant høyere målte KOF-verdier (Kjemisk oksygenforbruk målt med dikromat-metoden) enn beregnet KOF basert på målte løsningsmidler (kontrastmidler gir ikke signifikante bidrag til KOF fordi de ikke oksyderes av dikromat). Den gangen ble det antatt at forskjellen skyldes at avløpsvannet også tilføres overløp fra slamavskillerne ved rensanlegget. Ved å omregne verdiene fra 1988 til dagens situasjon (dvs. korrigere for antall ansatte og gjennomsnittlig vannforbruk) tilsvarer, ifølge Nycomed, denne KOF-andelen som ikke skyldes løsningsmidler ca. 2600 mg O<sub>2</sub>/l, eller ca. 1000 mg karbon/l (DOC). I tillegg vil også acetat (som natriumacetat) bidra til den delen av DOC som det i denne undersøkelsen ikke er gjort rede for gjennom analyser. Utover de omtalte finnes, i

følge Nycomed, ikke andre kilder for tilførsel av karbon til avløpsvannet ved anlegget.

### 3.4 Bioakkumulerbare komponenter

Screening-testen av bioakkumulerbare komponenter ble utført på avløpsvannet før nedbrytning og på en prøve etter 28 døgns nedbrytning ved fortykning til 50% i sjøvann (samme prøve som ble brukt i toksisitetstesten). Resultatene er sammenstilt i tabell 3.

GC-analysen viste lave konsentrasjoner av organiske forbindelser i heksanekstraktet både før og etter nedbrytning. Konsentrasjonen var imidlertid høyere etter nedbrytning enn før. Andelen potensielt bioakkumulerbare forbindelser med  $P_{ow} > 5.7$  var også høyere etter nedbrytning enn før. Fraksjonen med  $P_{ow}$  mellom 3.2 og 5.7 inneholdt meget lite i begge prøvene. Resultatet kan tolkes som at det ved biologisk nedbrytning av organisk stoff i avløpsvannet, dannes noen mer lipofile nedbrytningsprodukter. Dette er imidlertid lite sannsynlig. Forskjellene eventuelt skyldes usikkerheter i testmetoden ved disse lave konsentrasjonene. På grunn av begrenset volum av prøven etter nedbrytning ble et mindre volum ekstrahert av denne prøven, som også var fortyknet ved nedbrytbarhetstesten. Dette øker usikkerheten, bl.a. ved at eventuelle forurensninger i forbindelse med ekstraksjon og oppkonsentrering får større betydning. På grunn av at usikkerheten i analyseresultatene ikke er kjent, er det ikke mulig å avgjøre om forskjellene på de to prøvene er signifikante.

Tabell 3. Resultat av tynnsjikt-kromatografisk test av potensielt bioakkumulerbare komponenter i avløpsvann før og etter nedbrytning. Resultaten er korrigert for fortynningsfaktoren ved nedbrytbarhetstesten og representerer konsentrasjonene i uforynnnet prøve. GC-analysen er semi-kvantitativ fordi responsen på den benyttede FID-detektor kan variere mellom ulike organiske forbindelser. De angitte konsentrasjonene er derfor approksimative.

Surt ekstrakt	Kons. før TLC fraksjonering (µg/l)	Kons. fraksjon 1 ved applikasjons- sone TLC (µg/l)	Kons. i fraksjon 2, $\log P_{ow} > 5.7$ (µg/l)	Kons. i fraksjon 3, $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$ (µg/l)
Prøve før nedbrytning	157	1	24	5
Prøve etter nedbrytning	321	1	55	3

## 4. Konklusjon

Undersøkelsen har vist at restene av røntgenkontrastmidler i avløpsvannet kan regnes som persistente i det marine miljø. Avløpsvannets reproduksjonshemmende effekter på marine krepsdyr reduseres ikke signifikant ved biologisk nedbrytning. Dette kan tyde på at disse effektene skyldes kontrastmidler. Innholdet av potensielt bioakkumulerbare (lipofile) organiske forbindelser i avløpsvannet er lavt og det er vanskelig å

vurdere betydningen av disse. Konsentrasjonen er lavere enn den aksjonsgrense som praktiseres av Naturvårdsverket i Sverige for vurdering av utslippsbegrensninger (500 µg/l).

Den organiske fraksjon som ikke er identifisert ved spesifikke analyser stammer trolig fra kloakkvann som tilføres avløpsvannet som overløp fra slamavskiller.

## 5. Ordforklaringer

DOC	Løst organisk karbon (Dissolved Organic Carbon)
EC <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50% effekt i en toksisitetstest, f. eks 50% veksthemming i forhold til en kontroll. Ved testing av avløpsvann angis EC <sub>50</sub> ofte som volum% avløpsvann. Jo lavere EC <sub>50</sub> , desto høyere toksisitet.
FID	Flammeionisasjonsdetektor. Brukes ved GC-analyse
GC	Gasskromatografi - analyseteknikk for organiske kjemikalier
KOF	Kjemisk oksygenforbruk. Angir forbruk av oksydasjonsmiddel (kalium dikromat) for å oksydere organisk materiale i en prøve.
P <sub>ow</sub>	Fordelingskoeffisient oktanol/vann. Angir hvordan et stoff fordeler seg mellom to faser av hhv. vann og oktanol. Lipofile (fettløselige) stoffer har høy Pow. Pow > 1000 (log Pow >3) indikerer at stoffet har potensiale for bioakkumulering.
TLC	Tynnsjiktskromatografi (Thin Layer Chromatography)

## **Vedlegg**

**1. Testrapport - Nedbyttbarhet**

**2. Testrapport - Reproduksjon, Nitocra spinipes**

**3. Testrapport - Bioakkumulering**

# TEST RAPPORT



Norsk  
Institutt  
for  
Vannforskning

P.boks 173 Kjelsås  
N- 0411 Oslo  
Tel: (47) 22 18 51 00  
Fax: (47) 22 18 52 00

## Nedbrytbarhet i sjøvann OECD 306 Shake Flask Test NIVA metode L6

**Test produkt:** Avløpsvann **Lab. kode:** B238/1  
**Kunde:** Nycomed Imaging  
**Prøve mottatt:** 25.06. **Lagringsbetingelser:** 2-4 °C.  
**Test periode:** 26.juni til 23. august 1995

### Testbetingelser:

**Apparatur:** 2 L Erlenmeyerflasker med magnetstav - røring.  
**Sjøvanns-medium:** Vann med salinitet 31,1 ‰, tatt fra 20 m dyp, den 23.06. og lagret ved 20 °C i 3 døgn før bruk. For å minimalisere innholdet av partikler i anvendt sjøvann ble 3/4-del av vannet i transportbeholderen sifonert over i en 10 L glassflaske, og tilsatt standard saltløsninger.  
**Nærings-løsning:** OECD 301 Standard saltløsninger, 1 mL/L. Ammonium: 1,3 mg N/L testmedium.  
**Inokulum:** Mikroorganismer som var naturlig tilstede i sjøvannet.  
Kimtall (20 °C) bestemt ved start i Marine Agar 2216 (Difco):  $5 \cdot 10^5$  pr. mL  
**Inkubasjon:** Temperatur:  $20 \pm 1$  °C. Varighet: 59 dager.  
**pH:** Start 7,6 Slutt: 8,4  
**Referense:** Anilin, 20 mg C/l i 10 og 20 % prosessvann.  
**Giftighets-kontroll:** Anilin, 20 mg C/l ved 10 og 20 % prosessvann i testmedium. Ingen toksisitet påvist.

### Preparering av prøve:

Avløpsvannet ble fortynnet i sjøvanns-medium og tilsatt 3 M NaOH til pH 7.6.

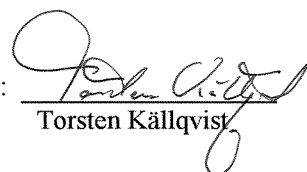
### Resultater:

Teststoff	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>59</sub>	Nedbrytningsgrad DOC-reduksjon:
Avløpsvann	2110 mg/l	329 mg/l	84 %

Oslo, den 14. desember 1995

Testet av: Harry Efraimsen

Forskningsleder:

  
Torsten Källqvist

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.  
Testresultatet gjelder kun for den prøve som er testet.



Analysar og resultatlar:

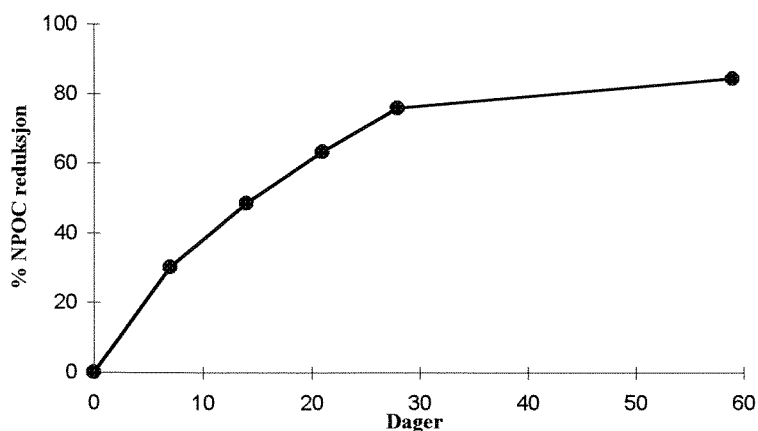
Test sroff: Avløpsvann

Lab. kode: B 238/1

ANALYSER OG RESULTATER:

	Flask	Prøve kode:	Verdier, NPOC mg/l					
			Dag	Dag	Dag	Dag	Dag	Dag
			0	7	14	21	28	59
BLANK (Inokulum)	I	F <sub>BI1</sub>	2.3	2.9	2.3	2.4	2.1	1.7
		F <sub>BI2</sub>						
		F <sub>BI</sub> snitt	2.3				2.1	1.7
	II	F <sub>BII1</sub>	2.6	2.1	2.9	2	2.2	2.2
		F <sub>BII2</sub>						
		F <sub>B</sub> snitt	2.6				2.2	2.2
		Blank snitt	2.45	2.5	2.6	2.2	2.15	1.95
TEST Stoff	I	F <sub>TI1</sub>	210	150	119	91.8	66.3	42.6
		F <sub>TI2</sub>						
		F <sub>TI</sub> snitt	210	150	119	91.8	66.3	42.6
	II	F <sub>TII1</sub>	217	150	103	67.6	39.5	27
		F <sub>TII2</sub>						
		F <sub>TI</sub> snitt	217	150	103	67.6	39.5	27
	I+II	F <sub>T</sub> snitt	213.5	150.0	111.0	79.7	52.9	34.8
Blank substraksjon		F <sub>T</sub> - F <sub>B</sub> (snitt)	211.1	147.5	108.4	77.5	50.8	32.9
Bionedbrytning %			0	30.1	48.6	63.3	76.0	84.4

Utvikling i karbon-reduksjon



REFERENSE:

1. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 306 "Shake flask," Biodegradability in Seawater. Adopted: 1992.
2. Nedbrytning av organiske stoffer i sjøvann. Ryste flaske metode. NIVA metode L6. Utg. 1. 1994.

# TEST RAPPORT

1/2

Norsk  
Institutt  
for  
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås  
0411 Oslo  
Tel: 22 18 51 00  
Fax: 22 18 52 00

## Reproduksjonstest *Nitocra spinipes*

**Testprøve:** Avløpsvann før nedbrytning **Lab kode:** B238/1  
**Oppdragsgiver:** Nycomed, Lindesnes **Mottatt dato:**

**Test metode:** Forslag til Dansk standard: Økotoksikologisk undersøgelse med krepsdyret *Nitocra spinipes*. Reproduksjonsmetode  
**Test organisme:** *Nitocra spinipes*, Opprinnelse: Göteborgs Universitet, Zoofysiologiska Institutionen  
**Test prinsipp:** Voksne hunner med eggsekk overføres fra stamkultur til testmediet. Etter ca. 14 døgn telles antall avkom.  
**Test start dato:** 8.8.96, 9.9.96, 30.10.96  
**Fortynningsvann:** Sjøvann fra Oslofjorden (Solbergstrand 60 m), GF/C-filtrert og fortynnet med destillert vann til 15 ‰ salinitet.  
**Forbehandling av testprøve:** Prøven ble oppbevart frosset (ca. -20 °C)  
**Testkonsentrasjoner:** 1.0, 1.6, 1.8, 2.5, 4, 6.3 ‰  
**Testoppsett:** 4 paralleller med 5 dyr for hver konsentrasjon  
**Temperatur:** 20 °C

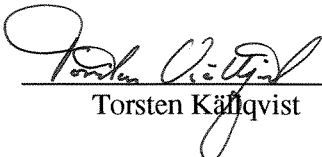
### Resultat:

Testen ble utført i tre omganger med ulike konsentrasjoner i området 1 - 6.3 ‰. Antall avkom er angitt i tabell 1. Konsentrasjon/respons-diagram er vist i fig. 1. Probitanalyse av data ga følgende resultat:

	EC <sub>50</sub>	95% konfidensintervall
Reproduksjon	1.4	0.75 - 2.5

Testen utført av: Åse Bakketun

Testansvarlig:

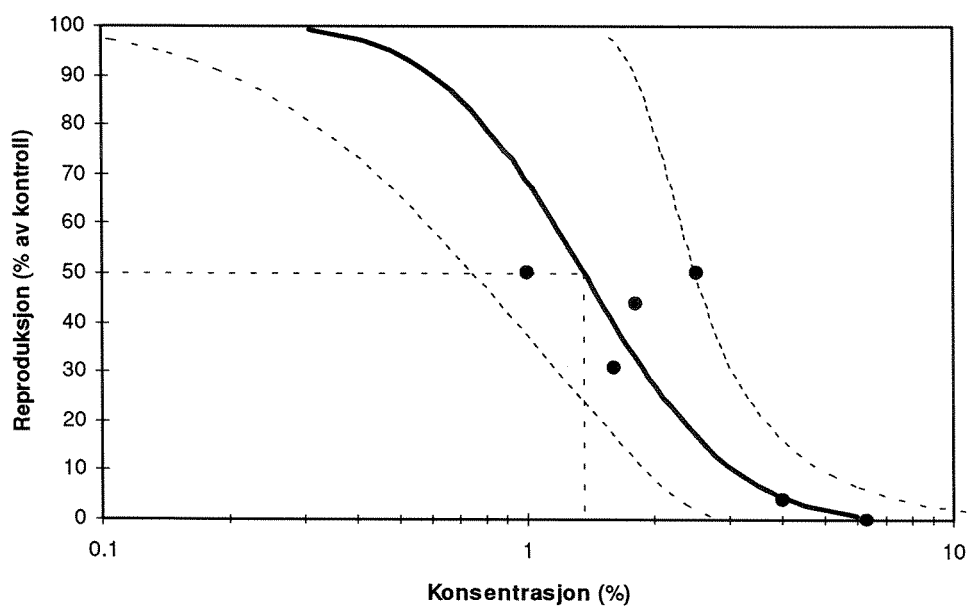
  
Torsten Kälfqvist

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer  
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet

## Norsk institutt for vannforskning

Tabell 1. Observasjoner ved reproduksjonstest med *Nitocra spinipes* av avløpsvann fra Nycomed.

Dato	Konsentrasjon (%)	Sum avkom	% av kontroll	pH start	pH slutt	O <sub>2</sub> slutt
08.08.96	Kontroll	293		7.8		8.0
	2.5	145	50	8.1		8.0
	4	12	4.1	8.1		8.0
09.09.96	Kontroll	442		7.9		
	1.6	135	31	7.9		
	6.3	1	0.2	7.9		
30.10.96	Kontroll	169		7.9		
	1.0	84	50	8.2		
	1.8	74	44	8.0		

Fig. 1. Effekt av avløpsvann fra Nycomed på reproduksjon av *Nitocra spinipes*.

# TEST RAPPORT

1/1

Norsk  
Institutt  
for  
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås  
0411 Oslo  
Tel: 22 18 51 00  
Fax: 22 18 52 00

## Reproduksjonstest *Nitocra spinipes*

**Testprøve:** Avløpsvann etter nedbrytning      **Lab kode:** B238/1b  
**Oppdragsgiver:** Nycomed, Lindesnes      **Mottatt dato:** 25.06.96

**Test metode:** Forslag til Dansk standard: Økotoksikologisk undersøgelse med krepsdyret *Nitocra spinipes*. Reproduksjonsmetode

**Test organisme** *Nitocra spinipes*, Opprinnelse: Göteborgs Universitet, Zoofysiologiska Institutionen

**Test prinsipp:** Voksne hunner med eggsekk overføres fra stamkultur til testmediet. Etter ca. 14 døgn telles antall avkom.

**Test start dato:** 28.8.96, 9.9.96, 30.10.96

**Fortynningsvann** Sjøvann fra Oslofjorden (Solbergstrand 60 m), GF/C-filtrert og fortynnet med destillert vann til 15 ‰ salinitet.

**Forbehandling av testprøve** Avløpsvannet gjennomgikk 28 døgns nedbrytbarhetstest (OECD 306) ved 50% konsentrasjon i sjøvann. Deretter oppbevart frosset (ca. -20 °C). Filtrert gjennom glassfiberfilter Whatman GF/C.

**Testkonsentrasjoner** 0.56, 1.0, 1.8, 3.2 ‰ (korrigert for fortynningen ved nedbrytbarhetstesten)

**Testoppsett** 4 paralleller med 5 dyr for hver konsentrasjon

**Temperatur** 20 °C


### Resultat:

Testen ble utført i to omganger med ulike konsentrasjoner i området 0.56 - 3.2 ‰. Antall avkom er vist i tabell 1. Konsentrasjon/respons diagram er vist i fig. 1. Probitanalyse av observasjonene ga følgende resultat.

	EC <sub>50</sub>	95% konfidensintervall
Reproduksjon	0.94	0.55 - 1.6

Testen utført av: Åse Bakketun

Testansvarlig:

  
Torsten Källqvist

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer  
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet

## Norsk institutt for vannforskning

Tabell 1. Observasjoner ved reproduksjonstest med *Nitocra spinipes* av avløpsvann fra Nycomed, etter nedbrytning.

Dato	Konsentrasjon (%)	Sum avkom	% av kontroll	pH start	pH slutt	O <sub>2</sub> slutt
09.09.96	Kontroll		442	7.9		
	0.56	254	57	8.0		
	1.0	192	43	8.1	8.1	
	1.8	230	52	8.2	8.1	
	3.2	22	5	8.2	8.3	
30.10.96	Kontroll	169		7.9		
	1.0	103	61	8.1		
	1.8	35	21	8.1		
	3.2	14	8	8.1		

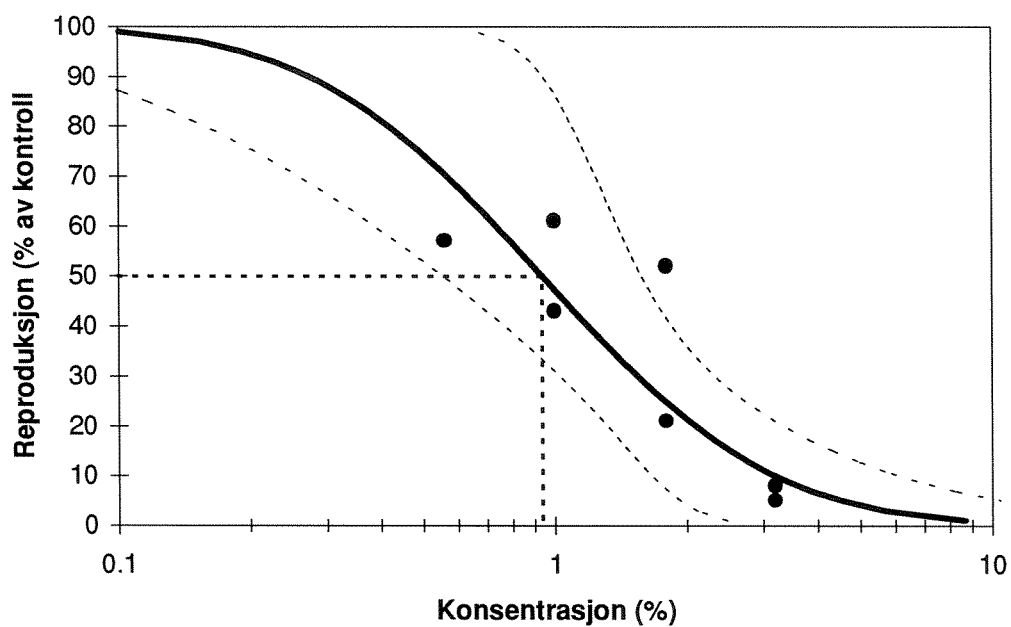


Fig. 1. Effekt av avløpsvann fra Nycomed etter nedbrytning på reproduksjon av *Nitocra spinipes*

# TEST RAPPORT

Norsk  
Institutt  
for  
Vannforskning

P. Boks 173, Kjelsås  
0411 Oslo  
Tel: 22 18 51 00  
Fax: 22 18 52 00

## Bioakkumulering TLC-GC/FID metode

### Bestemmelse av potensielt bioakkumulerbart materiale i vannprøve før og etter nedbrytbarhetstest.

Potensielt bioakkumulerbart materiale skulle bestemmes i vannprøver før og etter nedbrytbarhetstest i surt ekstrakt (tynnsjikt-skromtografi og fingerprint på gaskromatograf med flamme ionisasjonsdetektor).

Analysemetode:

Prøvene er ekstrahert ved pH 2 og TLC fraksjonert i tre fraksjoner, applikasjons sonen,  $P_{ow} > 10^{5.7}$  og  $10^{3.2} < P_{ow} < 10^{5.7}$ . Resultatene er gjengitt i tabell 1.

I prøven før nedbrytning viser GC-kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 25 µg/l for  $\log P_{ow} > 5.7$  (fraksjon 1 + fraksjon 2) og 5 µg/l for  $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$ , (fraksjon 3).

I prøven etter nedbrytning viser GC kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 56 µg/l for  $\log P_{ow} > 5.7$  (fraksjon 1 og fraksjon 2) og 3 µg/l for  $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$  (fraksjon 3).

Surt ekstrakt	Kons. før TLC fraksjonering (µg/l)	Kons. fraksjon 1 ved applikasjonsone TLC (µg/l)	Kons i fraksjon 2, $\log P_{ow} > 5.7$ (µg/l)	Kons i fraksjon 3, $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$ (µg/l)
Prøve før nedbrytning	157	1	24	5
Prøve etter nedbrytning	321	1	55	3

Topper i kromatogrammet fra injeksjon til 16 min og fra 37.5 - 55 min er ikke tatt med i beregningene. De tidlig eluerte komponentene forekommer også i blind prøven og de detekterte komponentne med en retensjonstid over 37.5 min skyldes etter all sansynlighet plast flaskene vannet har vært lagret på. Disse komponentene var ikke synlige ved et tidligere forsøk.

NIVA 070197

  
Torgunn Sætre

Vedlegg

## **METODE FOR BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER.**

pH på vannprøven ble justert til ca 2 med svovelsyre og deretter ekstrahert med 2 x 10 ml heksan. Emulsjon ble fjernet ved utsalting med natrium klorid. Ekstraktene ble kombinert og volumet justert til 2.0 ml. Ekstraktet ble analysert gasskromatografisk og videre fraksjonert på tynnsjikt i tre fraksjoner:

I Fraksjon: Applikasjons sone  
II Fraksjon:  $P_{ow} > 10^5$   
III Fraksjon:  $10^3 < P_{ow} < 10^5$

Lipofile eller potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser ble bestemt ved tynnsjiktskromatografi av heksan ekstrakt av en vannprøve. Substanser med en fordelingskoeffisient oktanol/ vann  $> 10^3$  blir regnet som potensielt bioakkumulerbare.

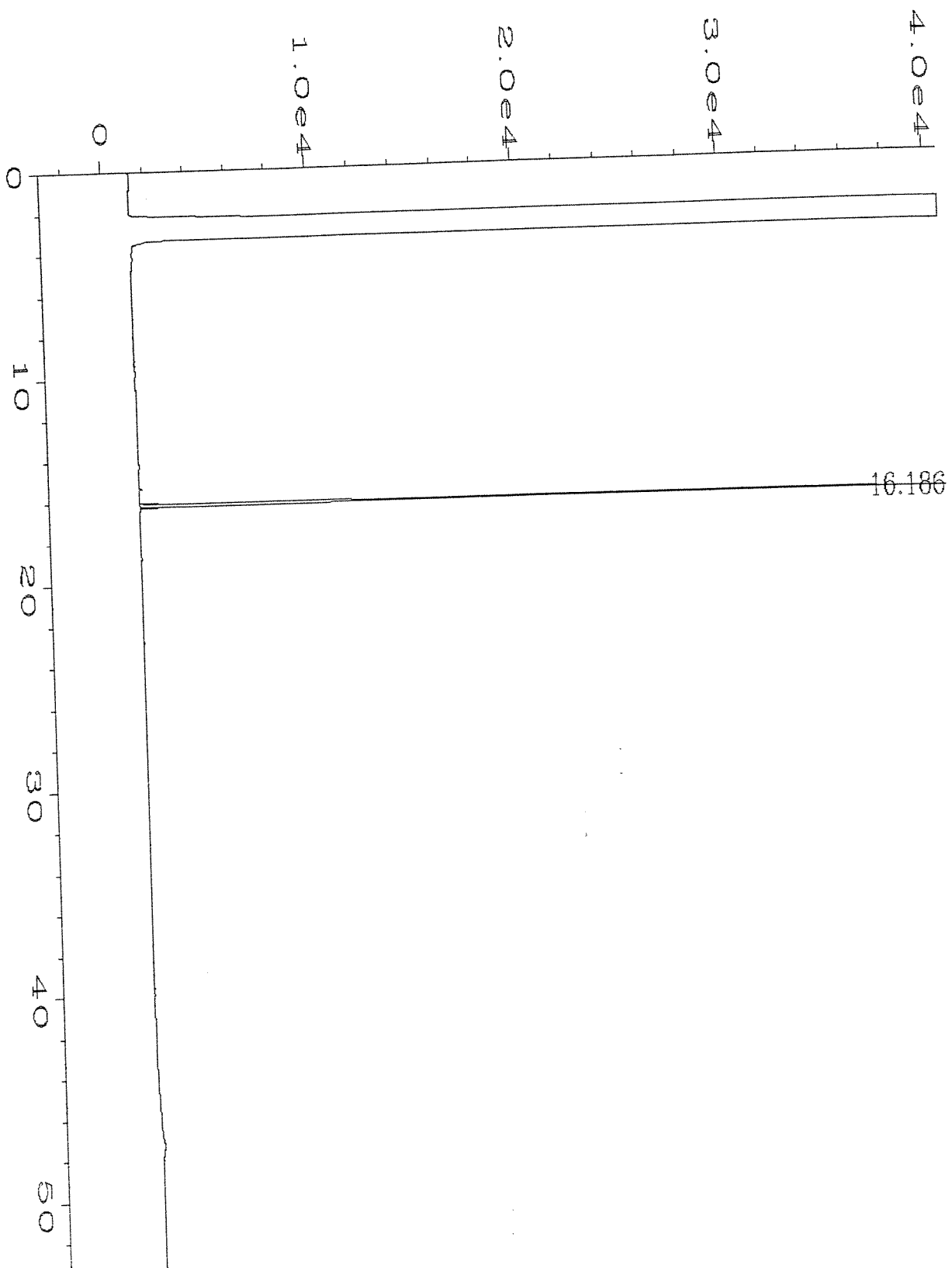
Fraksjonene ble skrapet av tynnsjiktsplaten, tilsatt indre standard og ekstrahert med heksan 2 ganger. Hvert av ekstraktene ble analysert med gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor, GC/FID. Arealet til de enkelte toppene ble relatert til en ytre eller indre standard  $C_{14}H_{30}$ , som ga et mål for mengden organiske kromatograferbare forbindelse. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfellet organiske substanser med en molekylvekt opp til ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk. Ved beregning ble det antatt at de detekterte forbindelsene har samme respons som den indre standarden. Dette er en grov tilnærming, da erfaring har vist at responsen på en FID detektor for ulike organiske forbindelser kan variere med opptil 50 %. Dette betyr at metoden må betraktes som semi kvantitativ. Blindprøve er kjørt parallelt med prøvene.

Testbetingelser ved GC analysen:

Kappilærkolonne, Rtx 5  
l = 30 m, i.d. = 0.25 mm

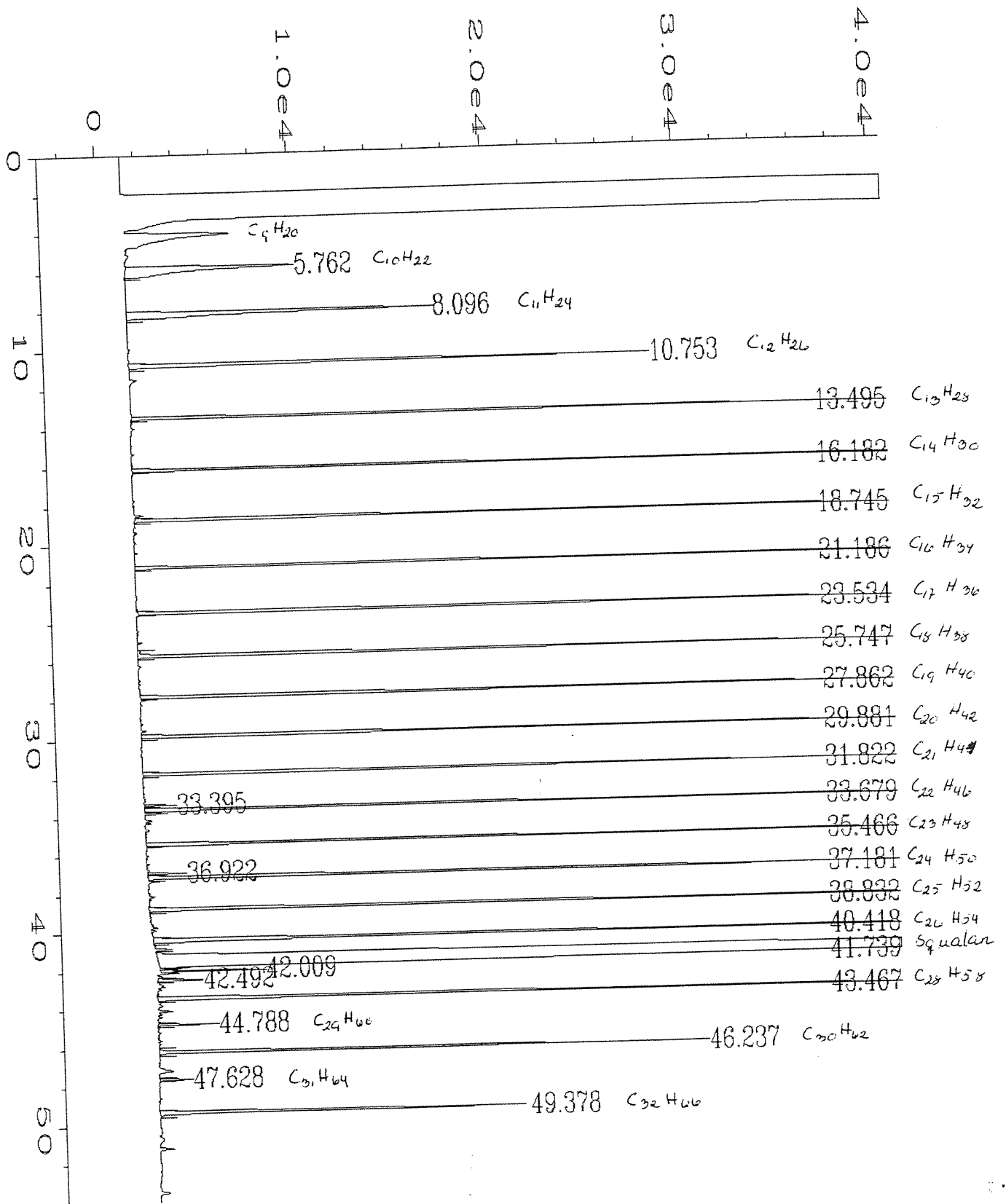
Program:  
Starttemp. 60 °C, henstand 2 min  
Oppvarmingshastighet 5 °C/min  
Sluttemp. 280 °C, henstand 8 min.  
Ytre standard n- $C_{14}H_{30}$   
Indre standard n- $C_{14}H_{30}$

Referanse: Bengtsson, B-E., Björklund, I og Wahlberg C.; "Effluents from the Chemical Industry - Program for Characterization of Persistence and Effects (The Stork Project)", Ver. 3 1989.

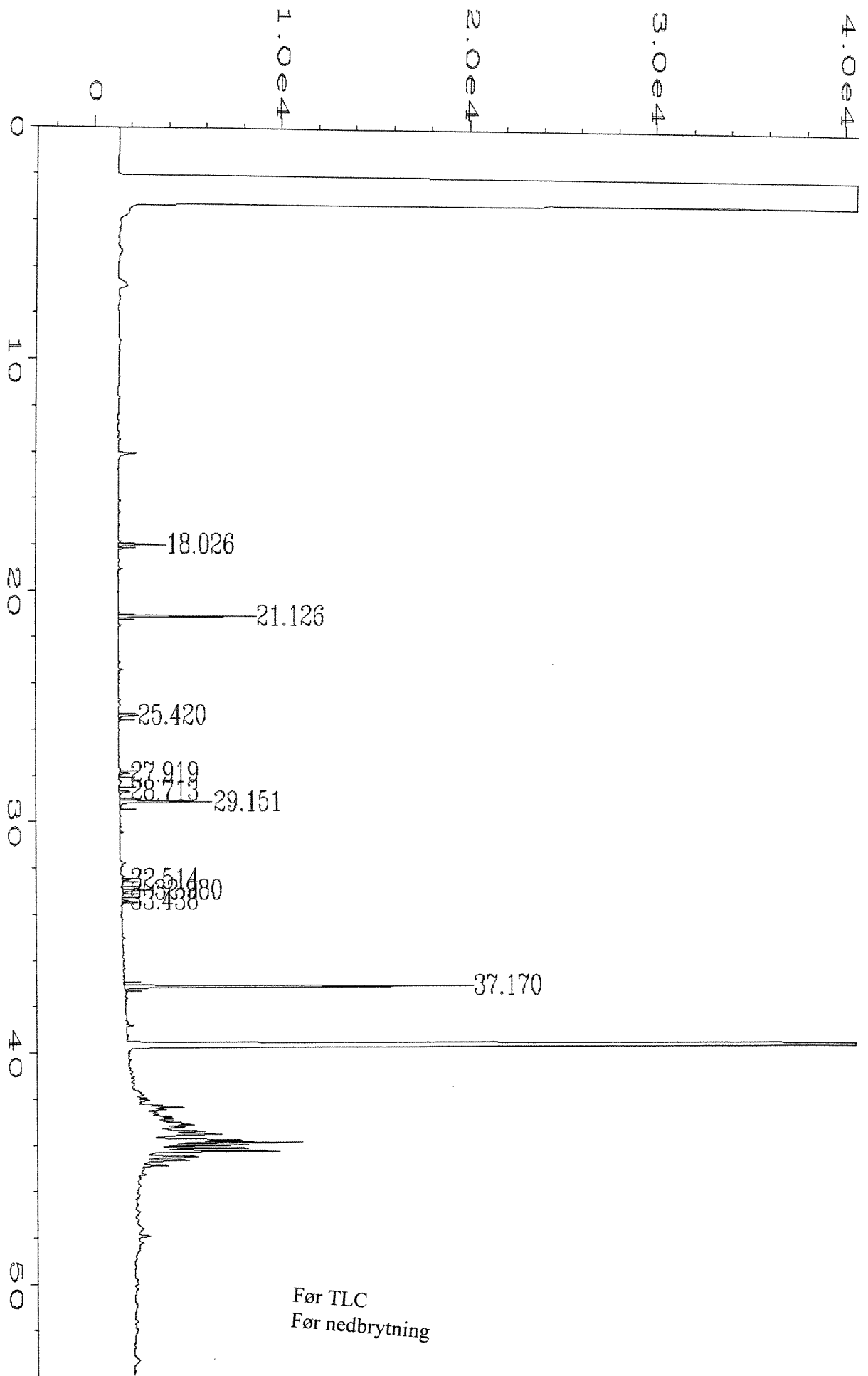


Standard, C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>

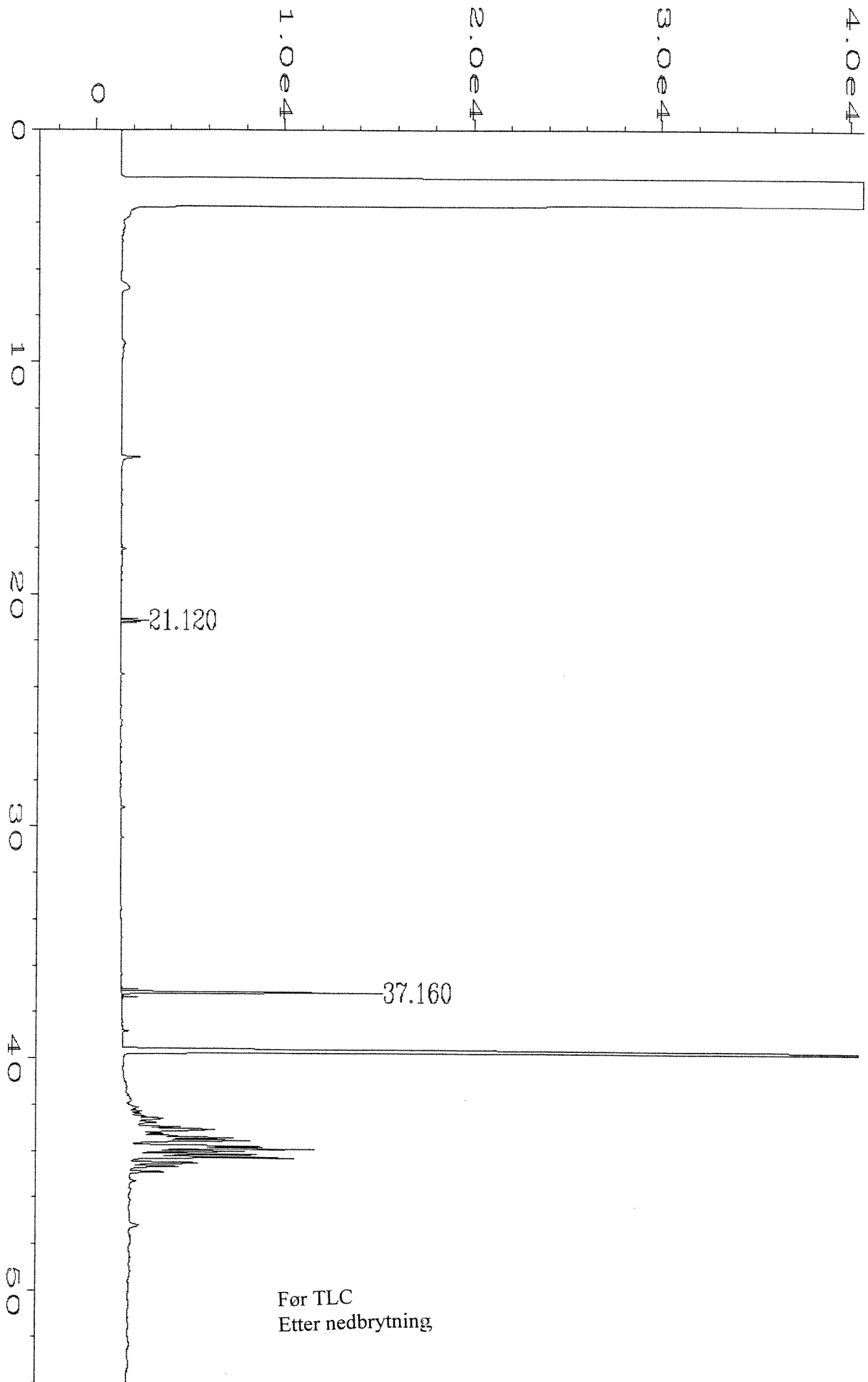




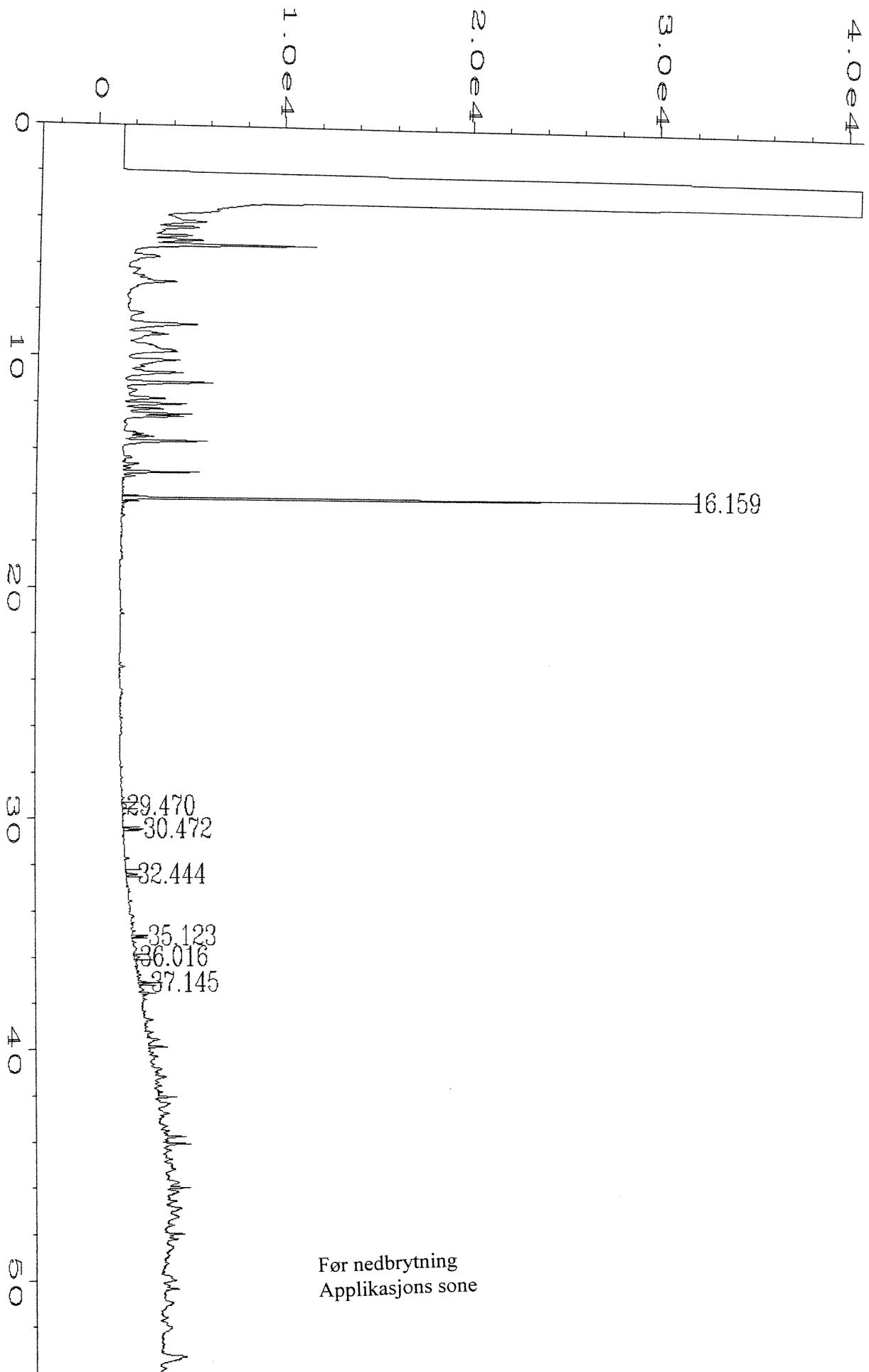
Standard  $C_8H_{18}$  -  $C_{32}H_{66}$



Sig. 1 in A:\T961127F\003F0201.D



Sig. 1 in A:\T961127F\004F0201.D



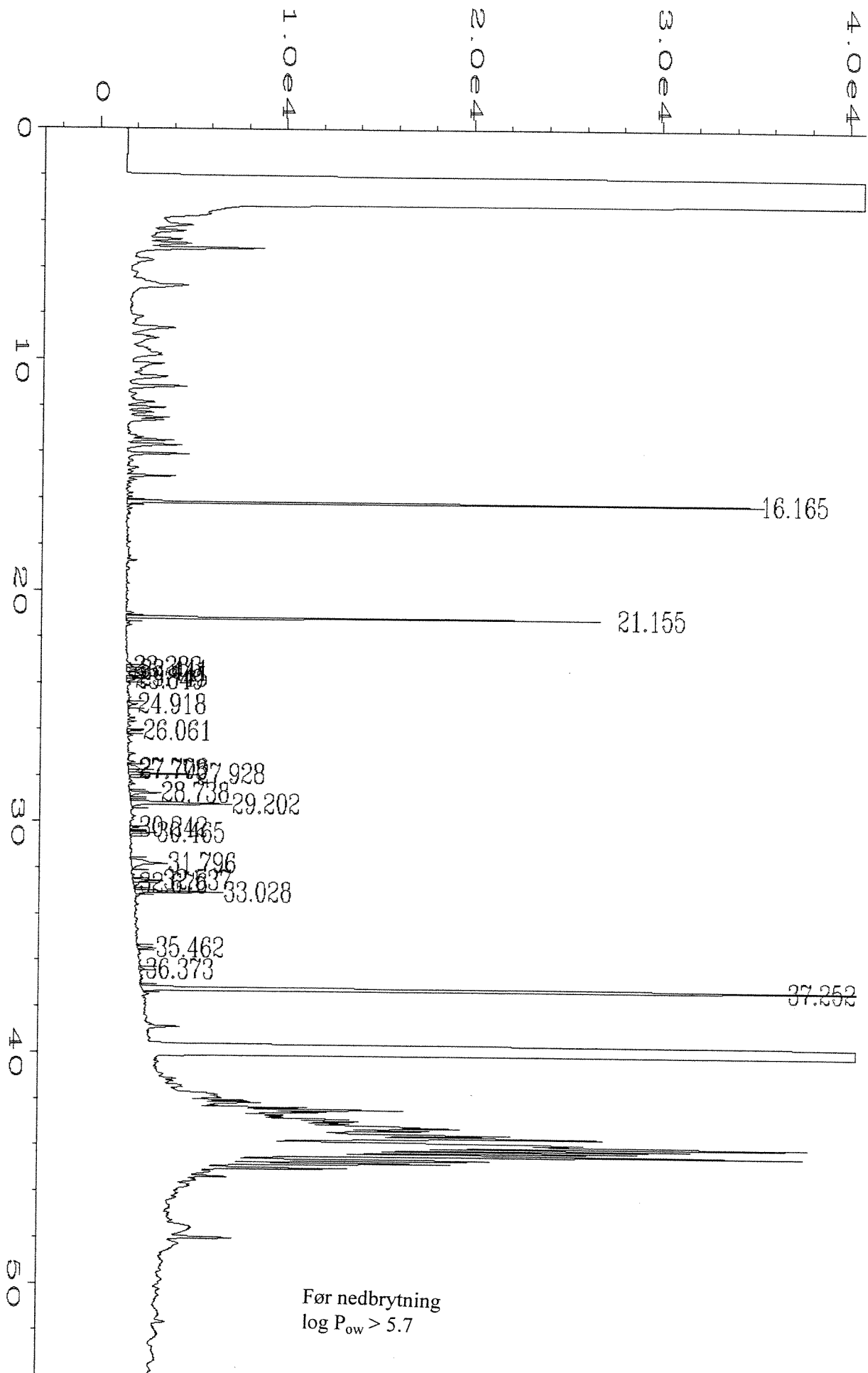
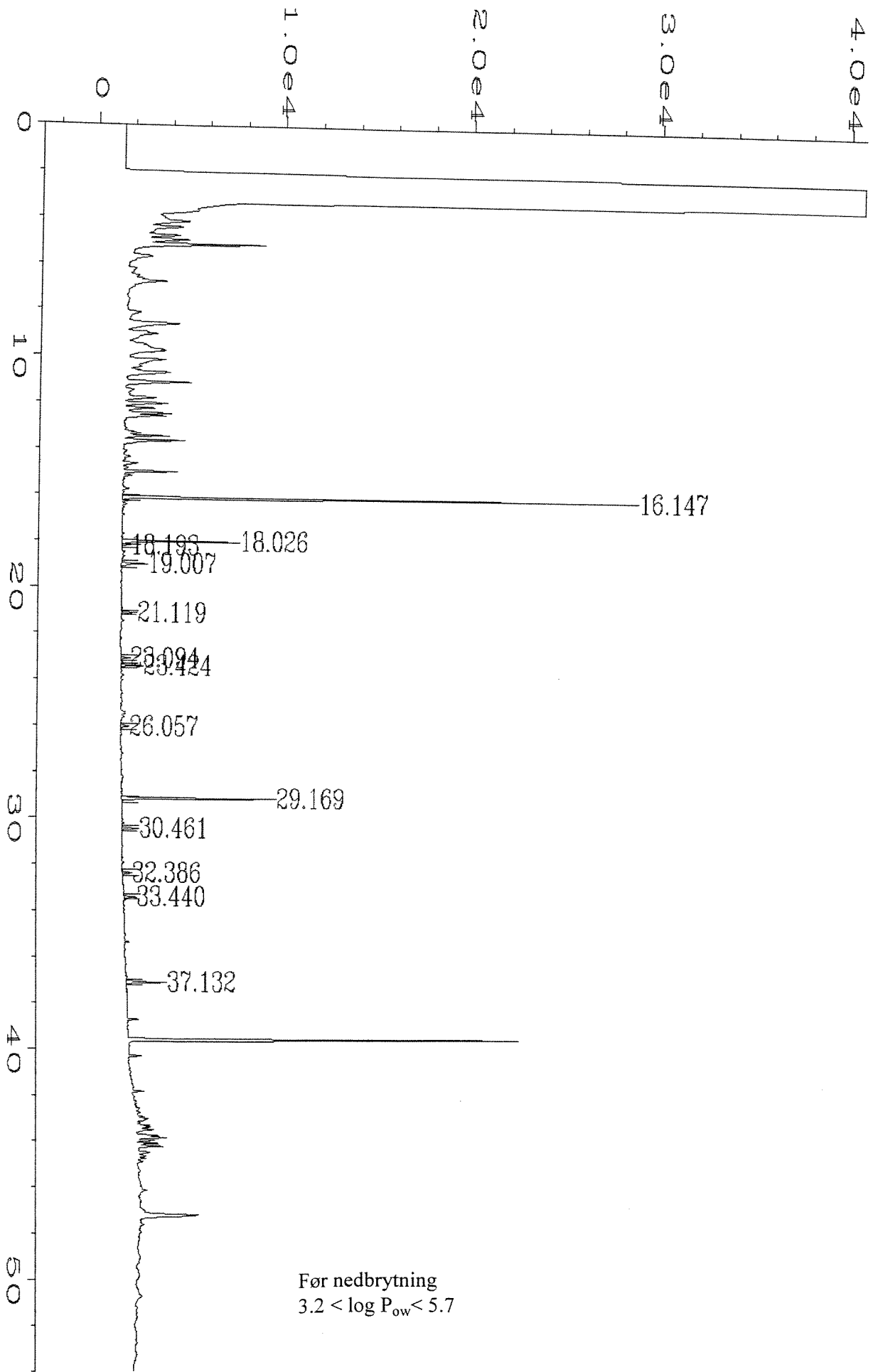
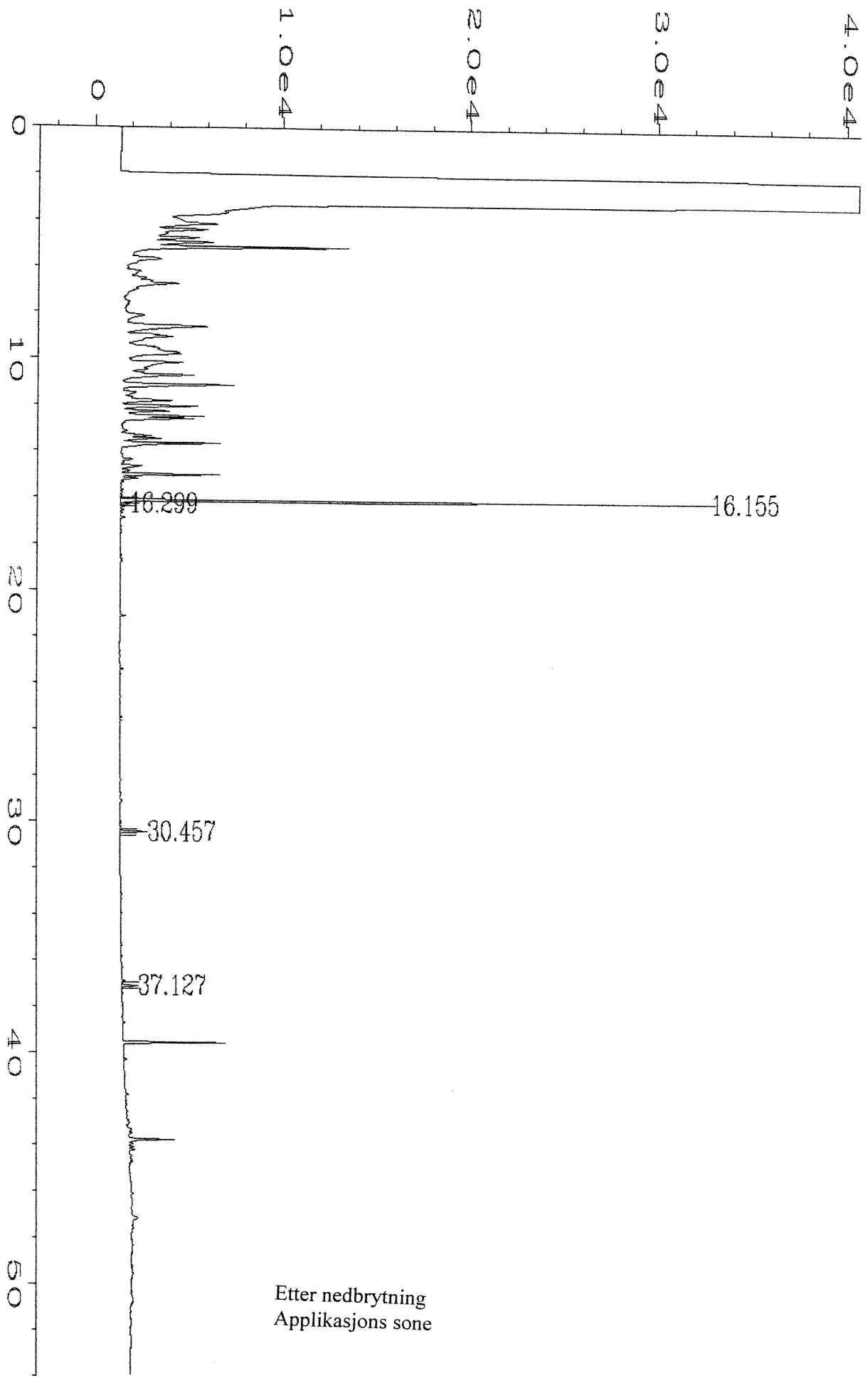


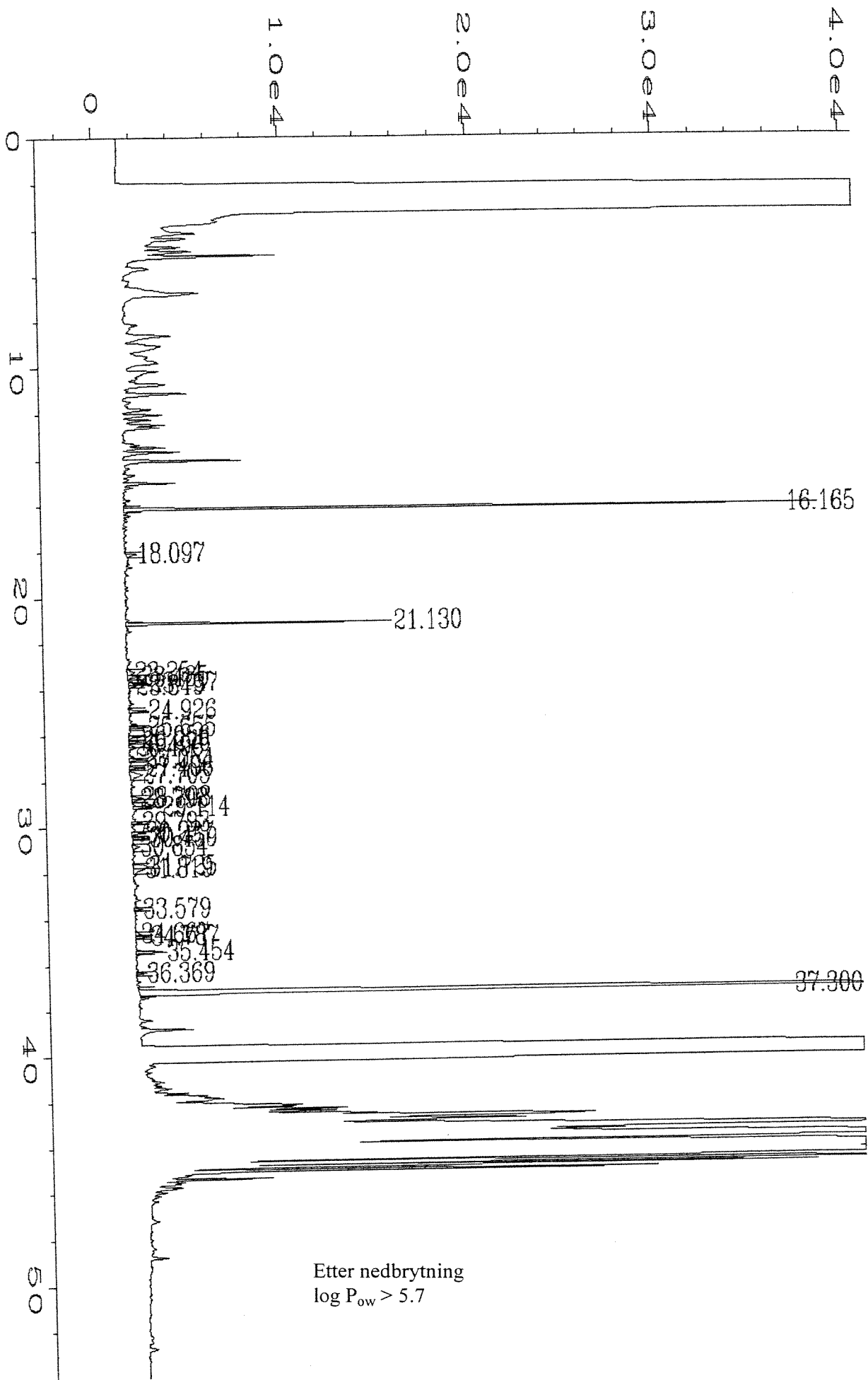
Fig. 1 in A:\T961127F\009F0201.D



Sig. 1 in A:\T961127F\010F0201.D

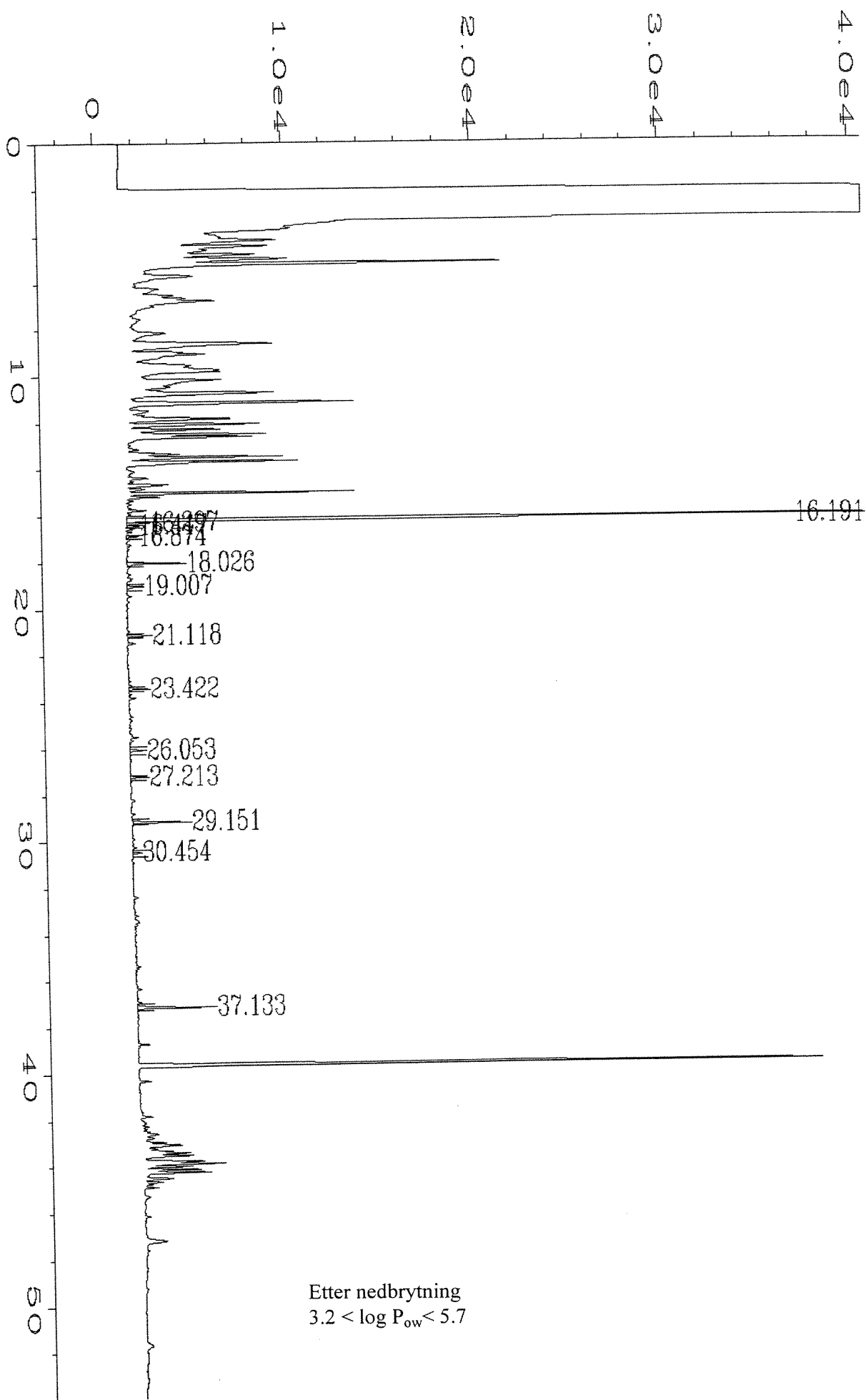


Sig. 1 in A:\T961127\F011F0201.D



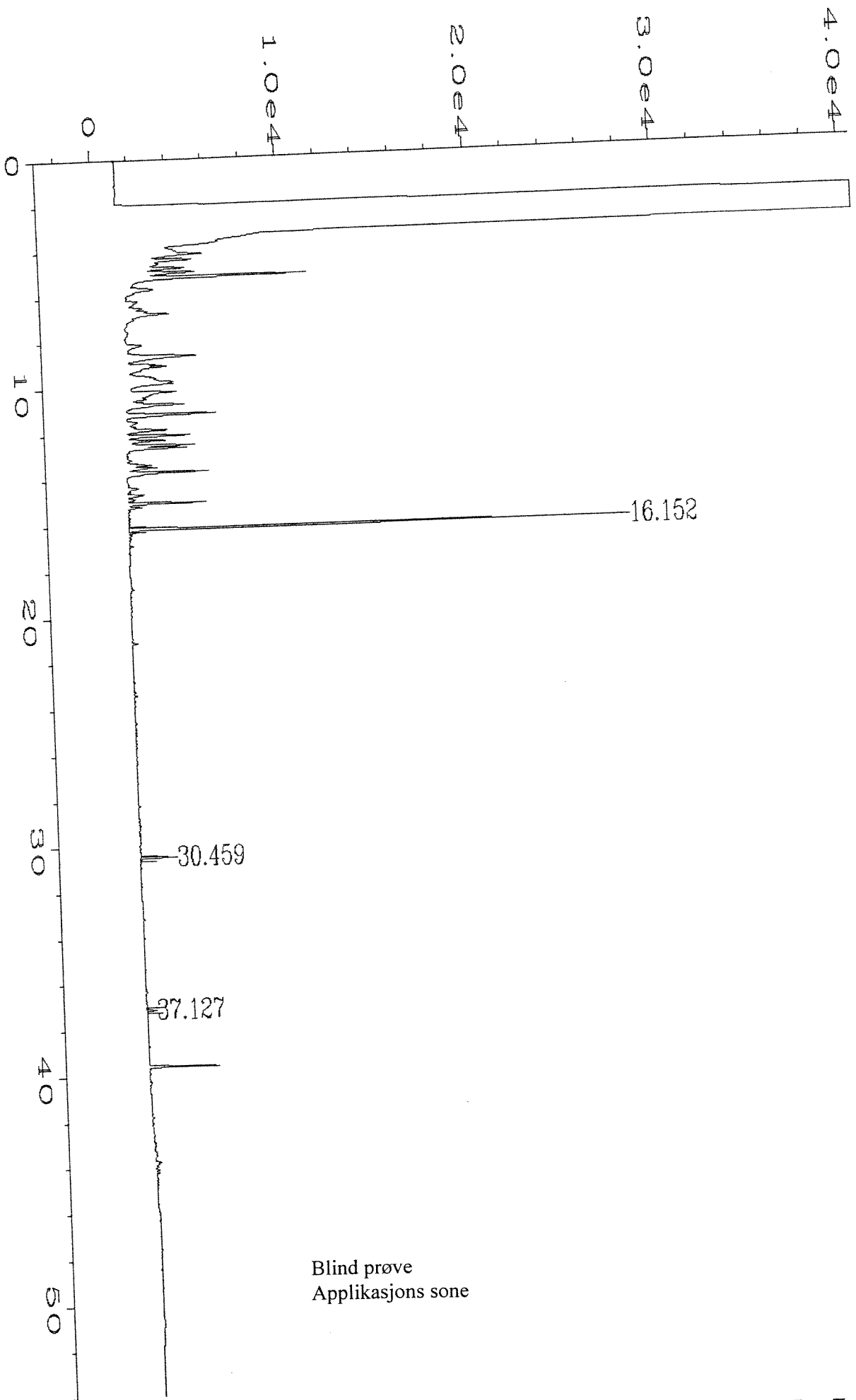
Sig. 1 in A:\T961127F\012F0201.D





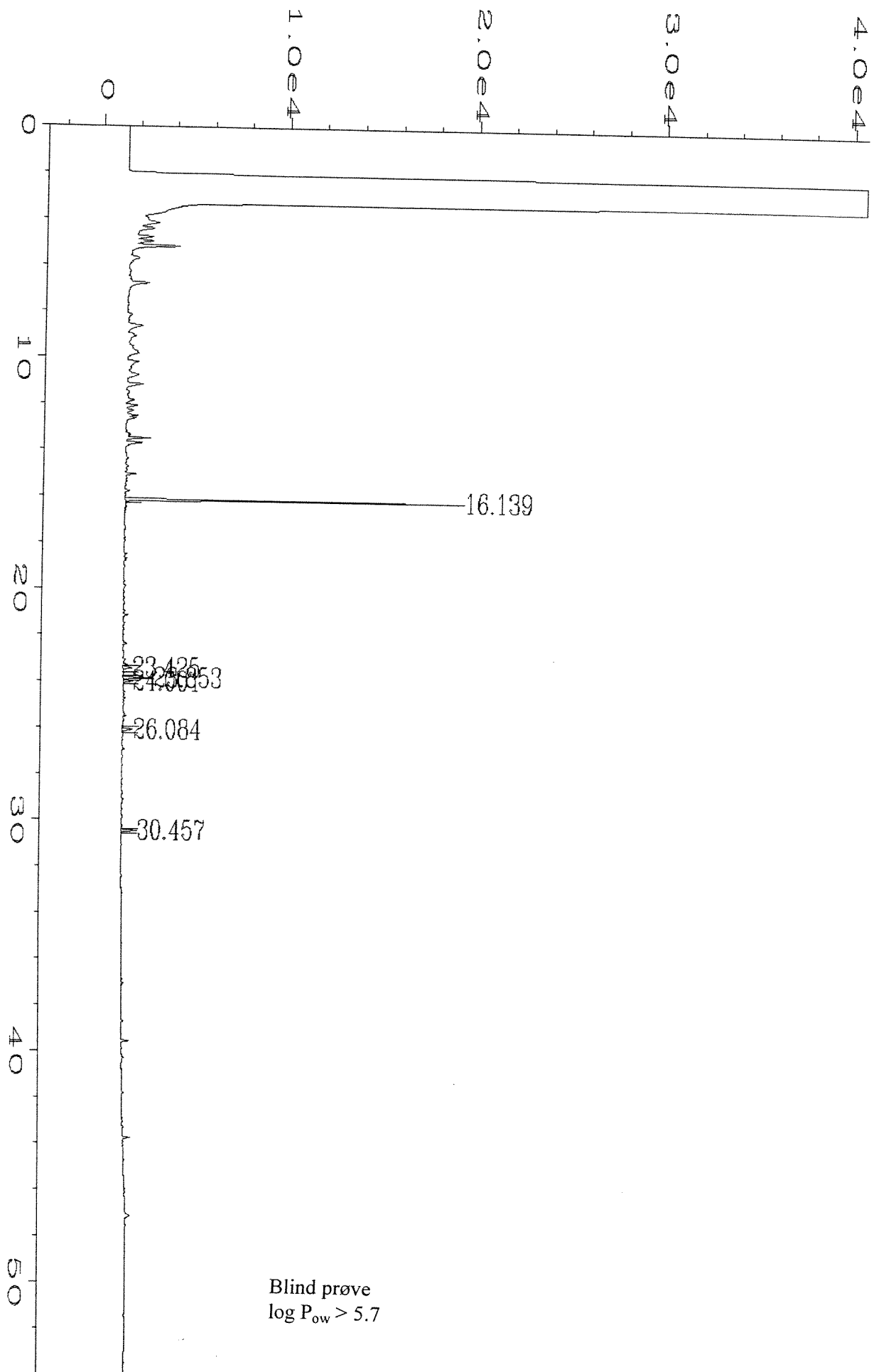
Etter nedbrytning  
 $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$

Fig. 1 in A:\T961127F\013F0201.D



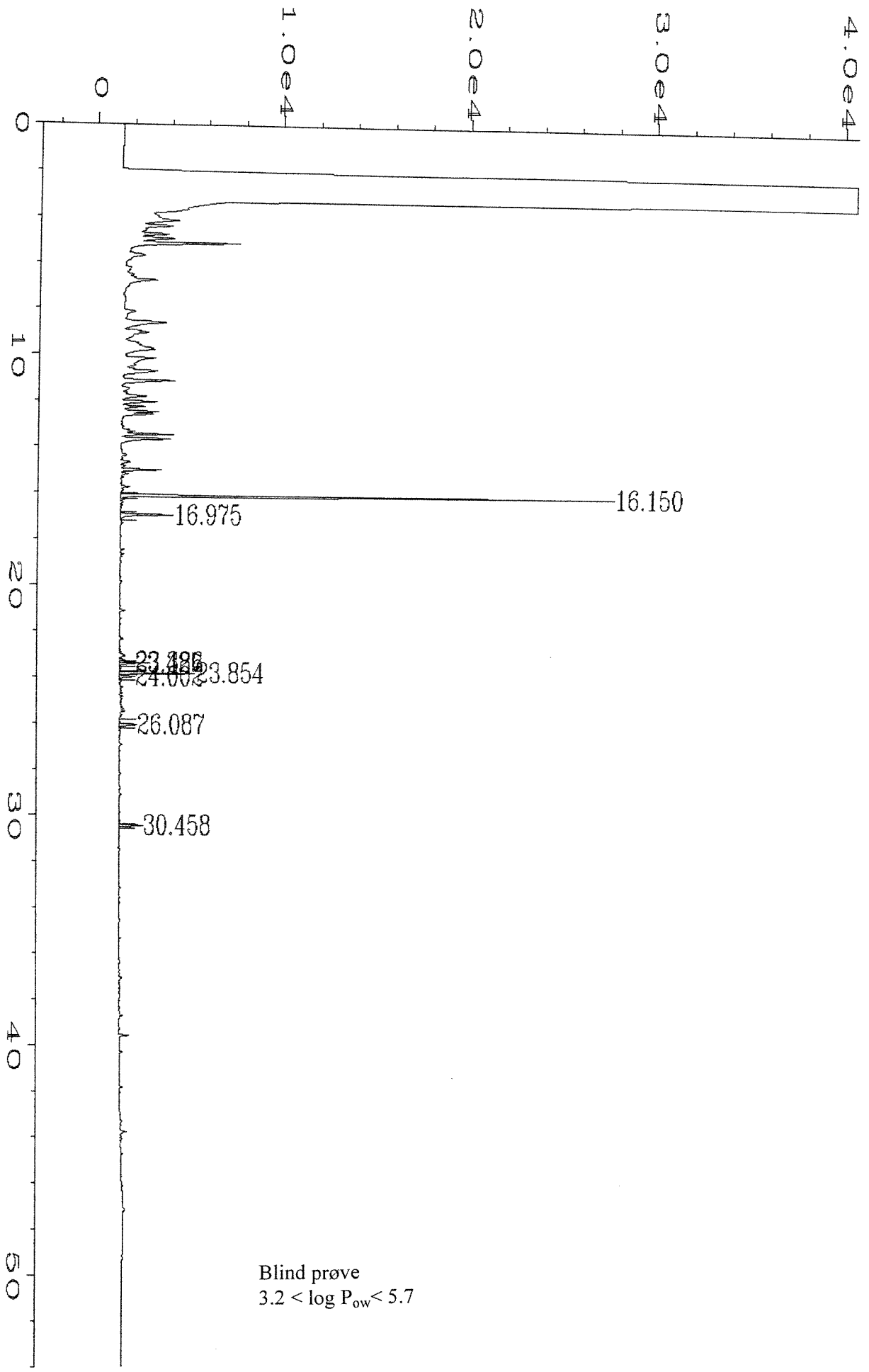
Blind prøve  
 Applikasjons sone

Sig. 1 in A:\T961127F\005F0201.D



Blind prøve  
 $\log P_{ow} > 5.7$

Sig. 1 in A:\T961127F\006F0201.D



Blind prøve  
 $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$

## **Norsk institutt for vannforskning**

Postboks 173 Kjelsås  
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00  
Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,  
oppgi løpenummer 3595-97

ISBN 82-577-3149-8