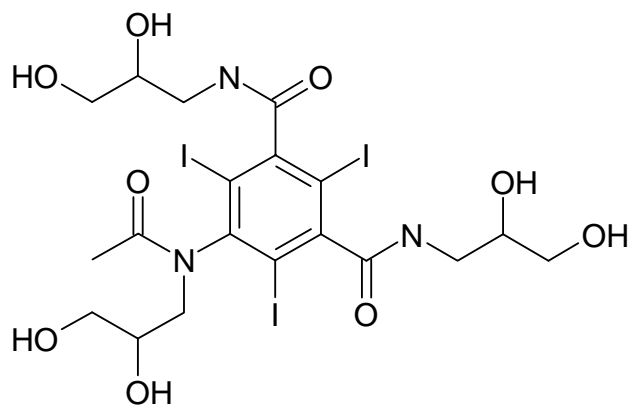




RAPPORT LNR 4782-2004

Nedbrytning av røntgenkontrastmidler

Tester utført med Iohexol



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internet: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 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
5005 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Akvaplan-niva

9296 Tromsø
Telefon (47) 77 75 03 00
Telefax (47) 77 75 03 01

Tittel Nedbrytning av røntgenkontrastmidler Tester utført med Iohexol	Løpenr. (for bestilling) 4782-2004	Dato 05.01.2004
	Prosjektnr. Undernr. O-23224	Sider Pris 21 .
Forfatter(e) Torsten Källqvist Harry Efraimsen Torgunn Sætre	Fagområde 37 Økotoksikologi- mikrobiologi	Distribusjon
	Geografisk område Sørlandet	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Amersham Health AS	Oppdragsreferanse
--	-------------------

<p>Sammendrag</p> <p>Det er utført forsøk med kontrastmidlet Iohexol i ferskvann og sjøvann for å påvise omfang av biologisk nedbrytning. Nedbrytingen av Iohexol skjer i begrenset grad i ferskvann, hvor det først og fremst er sidekjedene i molekylstrukturen som spaltes av og til en viss grad omsettes. Det synes nødvendig å bruke ett eller flere hjelpesubstrat for å få induisert enzymer slik at de biokjemiske prosessene kan bli aktivert. I marint miljø er det ikke påvist at omsetningen av Iohexol i det hele tatt kom igang etter at hjelpesubstratet hippursyre var omsatt. Testperiode på opptil 80 døgn varighet viste ingen signifikant endring i konsentrasjonen av DOC i testmediene. Adaptering av bakterier til Iohexol over lengre tid synes å føre til at omdanning vil finne sted. Imidlertid har resultatene som er oppnådd ikke vist at metabolisert karbon fra Iohexol inngår aktivt i vekst av nye bakterier. Et antatt stabilt nedbrytningsprodukt av Iohexol er 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyre.</p>
--

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Industriutslipp 2. Røntgenkontrastmidler 3. Bionedbrytning av xenobiotika 4. 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Industrial effluent 2. X-ray contrast media 3. Biodegradation of xenobiotics 4.
---	--

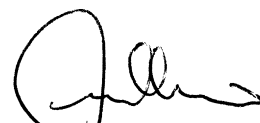


Prosjektleder



Forskningsleder

ISBN 82-577-4458-1



Forskningsdirektør

O-23224

Nedbrytning av røntgenkontrastmidler

Tester utført med Iohexol

Forord

Denne rapporten omhandler det arbeid som er gjort for å adaptere bakterier som er i stand til å nedbryte røntgenkontrastmidlet Iohexol i ferskvann og sjøvann. På grunnlag av det grunnleggende arbeidet som ble utført av Svein Ramstad og Kjell Eimhjellen i 1985, er det gjennomført lange testperioder med adapteringskulturer utover sommer og høsten 2003.

Kristian Lødal ved Amersham, Lindesnes hjalp til å skaffe potensielt adaptert begroingslam ved oppstart av undersøkelsen. Arne Aabye har vært faglig kontakten ved Amersham Health AS.

Ved NIVA har Harry Efraimsen vært ansvarlig for gjennomføringen av forsøkene og rapporteringen. Torgunn Sætre har hatt det analytiske ansvaret for HPLC analysene, og NIVA-lab. ved Roy Beba utførte TOC analysene.

Forskningsleder Torsten Källqvist har hatt det overordnet faglige ansvaret for arbeidet. Merete Grung var ansvarlig for kvalitetssikringen.

Oslo, 05.01.2004

Harry Efraimsen

Innhold

Sammendrag	5
Summary	5
1. Innledning	7
2. Forsøksbetingelser	8
2.1 Teststoffet, Iohexol	8
2.2 Hjelpesubstrat, hippursyre	8
2.3 Næringsalter	8
2.3.1 Ferskvann	8
2.3.2 Sjøvann	9
2.4 Preparering av podemateriale (inokulant)	9
2.5 Preparering av testløsninger	10
2.6 Inkubasjon	10
2.7 Analysemetoder	10
2.7.1 Bestemmelse av Iohexol i testløsninger.	10
2.7.2 Bestemmelse av løst organisk stoff (DOC)	11
3. Resultater	11
3.1 Utviklingen i sjøvann mht DOC reduksjon	11
3.2 Utviklingen i ferskvann mht DOC reduksjon	12
3.3 Videre studier av adapterte kulturer	13
3.4 Isolering av bakteriestammer.	15
4. Diskusjon	15
Vedlegg A.	18
Vedlegg B.	19
Vedlegg C.	20
Vedlegg D.	21

Sammendrag

Røntgenkontrastmidlet Iohexol er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i ferskvanns- og sjøvannsmedium i batch-kulturer. Utslippet av prosessvann fra fabrikk er til marint miljø. Det er derfor fokusert på å belyse nedbrytning og dannelse av eventuelle stabile nedbrytningsprodukter i de marine testene.

Konsentrasjonen av Iohexol i testmediene var ett gram per liter. For å få etablert rikelig med bakteriebiomasse i kulturene var det nødvendig å bruke hippursyre som hjelpesubstrat.

HPLC-analyser viste at Iohexol ble svært lite nedbrutt i sjøvann. Etter at hjelpesubstratet, hippursyre, var omsatt ble en liten reduksjon av Iohexol detektert, med tilhørende topper for dannede nedbrytningsprodukter. DOC-konsentrasjonene i testmediene var stabile etter at hjelpesubstratet var omsatt. Det ble konkludert med at selv om en liten omdannelse har funnet sted, så var nedbrytningen minimal i marint testmiljø. Vi kan allikevel ikke utelukke at en optimalisering av vilkårene for bakterievekst og utvikling av bakteriestammer kan selekere mikroorganismer som kan nedbryte Iohexol under optimale betingelser.

Omsetningen av Iohexol i ferskvann var noe forskjellig fra utviklingen som ble oppnådd i sjøvann. HPLC analysene viste at det skjedde en rask omdanning av Iohexol, slik at produktet etter 7 døgn inkubasjon ikke var detekterbart. Heller ikke nedbrytningsprodukter ble detektert ved den benyttede HPLC-metoden. DOC bestemmelsen viste imidlertid at mesteparten av det organiske materialet som var tilsatt som substrat ikke var fullstendig mineralisert, og at mengden organisk karbon holdt seg stabilt under resten av inkubasjonsperioden på 28 døgn.

Etter at hjelpesubstratet var omsatt ble det dannet sure komponenter ved avspalting av sidekjedene i Iohexolmolekylet. Når denne omdannelsen var gjennomført stagnerte den videre omdannelsen, trolig etter at benzenringen var splittet, men videre nedbrytning ble hindret. Dette kan kanskje skyldes jodsubstitusjonene i molekylet. Fra tidligere undersøkelser av Ramstad & Eimhjellen (1) er det angitt at nedbrytningsproduktet er 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyre.

Iohexol bidrar i liten grad som karbonkilde til utvikling av ny bakterievekst, som kan understøtte en biologisk omsetning. Etter at forsøringsfasen er over synes kulturen å ha en bakterieflora som mangler induserte enzymer for videre omsetning. Bakterier med evne til partiell nedbrytning av iohexol utviklet seg raskt fra den blandingen av ulike inokulumskilder som ble benyttet. Forsøkene med adaptasjon av bakteriene ved gjentatte overføringer til nytt medium med iohexol førte ikke til en raskere nedbrytning. I stedet synes det som nedbrytningshastigheten avtok over tid i laboratoriekulturene.

Summary

The X-ray contrast medium Iohexol has been tested in freshwater and seawater culture media for biodegradability, focusing on the catabolic formation of by-products in the wastewater from the factory to the seawater recipient.

The concentration of Iohexol in the test media was one gram per litre. Hippuric acid was used as a co-substrate to support the bacterial growth in the cultures.

Iohexol, detected by HPLC, was resistant against biodegradation in seawater.

In combination with the degradation of the co-substrate only a minor reduction of Iohexol was observed. The concentration of dissolved organic carbon (DOC) in the test solution was unchanged after the degradation the co-substrate. It was concluded that no significant biodegradation occurred in the seawater experiments. The transformation of Iohexol in freshwater tests differed from the seawater tests by rapid change in the target molecule. No change in the DOC content in the test medium over time indicated formation of a persistent metabolite. During the transformation of Iohexol an acidification occurred similar to the experienced pattern in the seawater tests. The Iohexol transformation seems to terminate after the splitting of the aromatic part of the molecule. The Iodine substitution in the benzene ring seems to prevent any further degradation of the metabolic products. An earlier investigation conducted by Ramstad & Eimhjellen (1) have concluded that the end product most likely is 5-amino-2,4,6-triiodo-isophthalic acid.

Iohexol appears to be a very poor substrate for bacterial growth. After a primary degradation step that is associated with acidification, the bacteria present seem to lack the ability to induce enzymes for further degradation of the molecule.

Bacteria with a possible potential for biodegradation of Iohexol showed to be present in the initial inoculum mixture. The attempt to adapt and isolate the bacteria by transferring to new media, did not result in an increased degradation of Iohexol.

Title: Biodegradation of X-ray Contrast Products. Experiment with Iohexol

Year: 2003

Author: Torsten Källqvist, Harry Efraimsen, Torgunn Sætre.

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-xxxx-x

1. Innledning

Amersham Health produserer røntgenkontrastmidler i en fabrikk ved Lindesnes. Avløpsvann fra virksomheten inneholder rester av røntgenkontrastmidler, samt intrermediære forbindelser fra produksjonsprosessen. I tillegg slippes det ut salter (hovedsakelig NaCl) og organiske løsemidler (alkoholer).

I følge opplysninger fra bedriften har utslippet av røntgenkontrastmidler variert mellom 40 - 71 tonn/år de siste 5 årene. (gjennomsnitt 100-200 kg/døgn). Konsentrasjonen av midlene i avløpsvannet er 0.3-0.4 kg/m³. Av dette utgjør Iohexol 31%, Iodixanol 6%, Iopentol 2%, cpd 540+derivater 33% og cpd 541+derivater 28%.

Tidligere undersøkelser av avløpsvannet tyder på at nedbrytningen av røntgenkontrastmidlene i miljøet skjer meget langsomt (NIVA 1996). Dog kan nedbrytning skje med hjelp av adapterte mikroorganismesamfunn under optimale betingelser Ramstad & Eimhjellen 1985 (1).

Økotoxikologiske undersøkelser av røntgenkontrastmidler og av avløpsvannet viser at kontrastmidlene har lav akutt toksisitet for fisk og krepsdyr. Det er imidlertid påvist hemming av reproduksjon av krepsdyr (copepodene *Nitocra spinipes* og *Tisbe furcata*) i avløpsvann (NIVA 1991, 1996). Effekten på *Nitocra* ble ikke redusert etter 60 døgns biologisk stabilisering av avløpsvannet. Det tyder på at det er de persistente røntgenkontrastmidlene i avløpsvannet som er årsaken til reproduksjonshemmingen.

Røntgenkontrastmidlene har høy vannløselighet og forventes ikke å ha potensiale for akkumulering i organismer eller sediment. I resipienten vil det derfor skje en passiv spredning ved fortykning, slik at konsentrasjonen avtar raskt med avstanden fra utslippspunktet. Ut fra tilgjengelig kunnskap om stoffenes egenskaper og effekter kan man derfor ikke vente at negative miljøeffekter vil oppstå utenfor det område i resipienten, hvor konsentrasjonen er høy nok til å kunne påvirke reproduksjonen til krepsdyr. Det knytter seg imidlertid alltid en usikkerhet til organiske komponenter som er såpass lite nedbrytbare som tilfellet er for røntgenkontrastmidlene. Selv om nedbrytningen er langsom må man forvente at stoffene over tid blir omsatt, og at nedbrytningsprodukter med andre egenskaper kan bli dannet.

2. Forsøksbetingelser

2.1 Teststoffet, Iohexol

Røntgenkontrastmidlet, Iohexol, levert av Amersham Health ASA som ett ferdig fremstilt produkt. Produktet har kjemisk formel, $C_{19}H_{25}O_9I_3$, med en molekylvekt på 807,7, og har høy løselighet i vann.

Benyttet testkonsentrasjon i forsøkene var ett gram per liter (0,1%). Den anvendte mengde Iohexol i testmediene gir et teoretisk karboninnhold på 282,3 mg/l.

2.2 Hjelpesubstrat, hippursyre

Hippursyre, $C_9H_9NO_3$, (H-6375, SIGMA) CAS nr. 495-69-2, ble valgt som hjelpesubstrat p.g.a. sin kjemiske molekylstruktur. Hippursyre består av en benzoyl-gruppe og en glycin-gruppe som fra tidligere undersøkelser har vist seg å være rask nedbrytbar av bakterier som også er i stand til å omsette Iohexol. (1) Hippursyre, som er ett krystallinsk stoff, er langsom løselig i vann ved forholdsvis lav temperatur. Imidlertid er hippursyren rask løselig i vann ved temperatur over 80 °C. Derfor ble stoffet løst i oppvarmet vann i dobbelt anvendt konsentrasjon. Løsningen ble så avkjølt og blandet med Iohexol og tilsatt nærings-salter før justering til riktig konsentrasjon (200 mg/l). Hippursyre inneholder 60.3 % karbon, d.v.s. at det ble tilsatt 120,5 mg/l organisk karbon som hjelpesubstrat.

2.3 Nærings-salter

2.3.1 Ferskvann

Næringsløsningen var den samme som beskrevet av S. Ramstad og K. Eimhjellen (1) og som vist i følgende oversikt;

Stamløsning		Spor-løsning	
Per liter medium	gram/L	Kjemikalium	mg/L
KH_2PO_4	2	H_3BO_3	286 mg
NH_4Cl	1	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	123,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9,8
+ 2 ml sporløsning		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,5
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	219,5
		NaCl	1000
		$CaCl_2$	250
		$FeCl_3$ *	500
		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	16,8

* $FeCl_3$ er erstattet med $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ /ekv-mengde 833 mg) Av $FeCl_3$ -6 hydrat tilsettes 1,665 mg/l ferdig medium.

(Ikke tilsatt Fe fordi det førte vil til utfelling i sporløsningen ved henstand.)

I ferdig preparerte medier i ferskvann som var justert til pH 7,0 med NaOH-løsning oppstod det utfelling (blakking) under lagring ved 4-6 °C. For å unngå denne utfellingen ble følgende blanding av basiske og sure fosfat-salter gjennomført;

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2,05 g/l (K_2HPO_4 1,22 g)

KH_2PO_4 0,79 g/l (totalt gir dette en mol PO_4 (95 mg))

Denne fosfatbuffer gir pH 7,0 i flytende testmedium.

2.3.2 Sjøvann

For å unngå utfelling av tungt løselige fosfater i sjøvannsmediet var det nødvendig å benytte en betydelig svakere bufring. Det ble valgt å bruke en bufferløsning i henhold til OECD Guideline for testing of chemicals, 301, løsning (a).

Det ble tilsatt 7,5 ml bufferløsning per liter som tilsvarer 87 mg P/ liter medium. Nitrogen ble tilsatt som beskrevet for ferskvann, nemlig 1,0 g per liter som NH_4Cl . Det ble også benyttet tilsvarende tilsetning av sporelementløsning.

For å unngå utfelling av mineralfosfater i sjøvannsmediet ble det ikke foretatt tilsetning (justering) av lut etter at bufferløsningen var tilsatt. (Det ble gjort forsøk med litt tilsetning av en svak lut-løsning, men det førte til øyeblikkelig blakking av mediet). I ferdig preparert medium av sjøvann var surhetsgraden tilnærmet pH 7.0.

Sjøvann tatt fra 60 m dyp utenfor forsøksstasjonen ved Solbergstrand ble anvendt til forsøkene. Det ble tilsatt destillert vann for å justere sjøvannets saltholdighet til ca. 32 ‰, (bestemt med refraktometer).

2.4 Preparering av podemateriale (inokulant)

Det ble lagt vekt på å få tilgang til et allsidig sammensatt podemateriale helt fra starten av nedbrytingsforsøkene.

Følgende kilder ble benyttet;

1. Laboratorieprodusert biologisk slam, dyrket på syntetisk avløpsvann (syntho) i kombinasjon med kommunalt avløpsvann (aktiv biomasse).
2. Biologisk aktivt slam fra Bekkelaget renseanlegg i Oslo.
3. Prøve "avskrap/vannuttak tank" "celle 14" tatt 5.5.03 ved fabrikk på Lindesnes.

(Anmerkninger til prøveuttaket ved Amersham 05.05.03. av Kristian Lødal.

Vanntemperatur ved uttak ca. 30 °C.

Avskrap fra tankvegg (trolig glassfiber)

Ingen synlig tegn til "slim" grønske/bakterievekst i prøveuttaket.

Årsaken til sort bunnfall var aktiv kull.

Eventuelle bakterier i denne vannprøven er antatt å ha vært i kontakt med de fleste kontrastmidlene (produkter), men er i hovedsak mest påvirket av Iohexol).

De 3 variantene ble sentrifugert ved 2500 G i 10 min. Supernatanten ble fjernet og slamkonsentratet ble resuspendert i BOD fortynningsvann (NS-EN 1899-1).

Bruksferdig podemateriale slik det ble brukt per 2 liter ferdigblandet testmedium (både i sjøvann- og ferskvannsmedium);

15 ml laboratorieprodusert biologisk slam (lab.skala anlegget)

12 ml "pellets" slam fra tank celle 14

25 ml Biologisk aktivt slam fra Bekkelaget renseanlegg.

Tørrestoff i konsentrert slam fra Bekkelaget renseanlegg ble bestemt til 2,46 % (w/w)

Dette representerer ca. 310 mg TS/ liter medium.

Det ble utført kimtallsanalyser som viste følgende resultater;
For "pellets" slam fra tank; Fortynnet 1:100, resultat, sterkt overgrodd plate
Bestemt i supernatant (kun info.) 1:10 fort. Resultat, >500 = > 5000 kim/ml
Biologisk aktivt slam fra Bekkelaget; resultat, $6,8 \cdot 10^6$ kim/ml $\approx 2,8 \cdot 10^8$ kim/g TS.

2.5 Preparering av testløsninger

Innledningsvis ble hver porsjon preparert i 2 liter volum i 5 liter Erlenmeyers flaske. Iohexol ble tilsatt ved direkte tilsetning i 0.1% konsentrasjon. Hjelpesubstratet hippursyre ble først løst i vann og varmet opp til ca. 80 °C til alle krystallene var oppløst. Løsningen ble avkjølt i isvann og så blandet med delporsjonen som var tilsatt næringsssalter og oppløst Iohexol. Blanding av podematerialet (52 ml) ble så tilsatt og volum innstilt til 2 liter. Konsentrasjonen av hippursyre i testløsningen var 200 mg/l.

Navnforkortelser for de anvendte substratløsningene;

Medium	Innhold
IH	Iohexol (1 g/l), hippursyre (200 mg/l) og næringsssalter i ferskvann.
IH-MAR	Iohexol (1 g/l), hippursyre (200 mg/l) og næringsssalter i sjøvann.
Ioh	Iohexol (1 g/l) og næringsssalter i ferskvann.

2.6 Inkubasjon

Flaskene ble plassert på ristebord og holdt under kontinuerlig omrøring av væskefasen. Temperaturen ble holdt ved 20 ± 1 °C under inkubasjonen.

Nedbrytningen kom raskt i gang både i ferskvann- og sjøvannsmediene. Dette ble observert ved at surheten i mediene økte forholdsvis raskt. Den lave bufringen i sjøvannmediet gjorde det nødvendig å justere pH hyppig i denne kulturen. Det ble brukt en sterk NaOH-løsning (10 M) til justeringen. Under den mest aktive nedbrytningsfasen var det nødvendig å foreta kontroll og justering av pH opptil 3-4 ganger per uke.

Del-prøver ble tatt ut for å følge utviklingen over tid. Det ble tatt ut delprøver på 10-15 ml, som ble filtrert gjennom 0,45 µm membranfilter (Sartorius, Minisart) Ca. 5 ml ble frosset for analyse av Iohexol (HPLC) og resten fortynnet for analyse av restmengde DOC. Frosne delprøver ble oppbevart for senere spesifikke analyser hos Amersham Health ASA. Denne delen som omfattet spesifikke analyser var ikke inkludert i vårt analyseprogram og vil bli fulgt opp etter behov ved en senere anledning.

2.7 Analysemetoder

2.7.1 Bestemmelse av Iohexol i testløsninger.

Mengde Iohexol i testløsningene ble bestemt med HPLC. Det ble benyttet ekstern kalibrering, hvor Iohexol fra samme batch som ble benyttet i nedbrytningsforsøkene ble brukt som utgangsstoff til standardløsningene.

Det ble laget en stamløsning på ca 1,4 mg/ml. Kalibreringsstandarder ble laget ved fortyntninger av stamløsningen. Det ble kalibrert over et område på ca. 0,003-1,4 mg/ml.

Ved de tidligste forsøkene ble det benyttet en gradient som gikk inntil Iohexol var eluert ut fra kolonna. For å se på om det var mulig å detektere nedbrytningsprodukter som var mer upolare enn Iohexol, ble det ved senere forsøk kjørt en lengre gradient for å sikre eluering av mer upolare komponenter.

Prøvene ble filtrert gjennom membranfilter som nevnt tidligere, før analyse.

Kolonne: Betasil C18 150x2,1mm, 3 μ

Injeksjons volum 5 μ l

Flow: 0,2 ml/min

Eluent A: vann

Eluent B: acetonitril

Romtemperatur

Gradient tidlige forsøk:

Tid [min]	%A	%B
0	99	1
25	94	6
26	99	1

Gradient senere forsøk:

Tid [min]	%A	%B
0	99	1
25	94	6
40	0	100

Deteksjon: Diodearray, ekstrahert kromatogram ved 254nm.

2.7.2 Bestemmelse av løst organisk stoff (DOC)

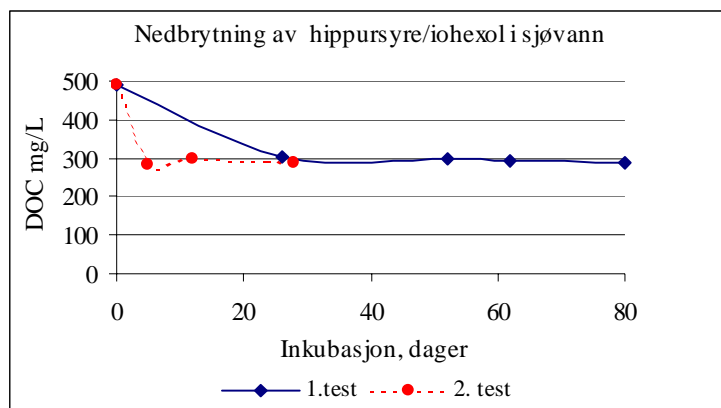
DOC ble analysert på konserverte prøver etter NIVA metode G5-3, Denne metoden omfatter bestemmelse av ikke flyktig organisk bundet karbon (NPOC/DC) i sjøvann eller ferskvann med ledningsevne over 100 mS/m. Det ble benyttet er instrument av fabrikat; Tekmar Dohrmann Apollo 9000 HS karbonanalysator.

3. Resultater

3.1 Utviklingen i sjøvann mht DOC reduksjon

Utviklingen i sjøvannsmediet (IH-MAR) ble fulgt over en periode på 80 dager. Nedbrytningen i de første 4 ukene er antatt å være relatert til omsetningen av hippursyre. I den etterfølgende perioden ble det påvist minimal forandring i DOC-konsentrasjonen i testløsningen. HPLC-kromatogrammene viser at det har foregått en liten omdanning av Iohexol, og at nedbrytningsprodukter som er dannet synes å være meget stabile. Derfor ble det konkludert med at omsetningen av Iohexol var meget begrenset, selv om det over en lang periode ble tilsatt lut for

å nøytralisere forsuringen som fant sted i testmediet. Denne surgjøringen av testmediene ble oppfattet som et resultat av omdannelsen av Iohexolmolekylet. Oksidasjonen av karboksylgrupper gir overskudd av H^+ -ioner som forsurer mediet.



Figur 1. Utviklingen i nedbrytningsforløp i blanding av Iohexol og hippursyre i sjøvann.

Den første testkulturen med anriking i sjøvann viste at bakteriene i det preparerte podematerialet hadde behov for en lengre adaptasjonsperiode. Denne adaptasjonen var nødvendig for å indusere enzymer slik at substratet kunne utnyttes.

Først etter 29 døgn inkubasjon ble det påvist en betydelig forandring i surhetsgraden i mediet fra å ha vært stabilt på pH 7,4 til en rask senkning til pH 5,4. I den etterfølgende perioden fra 29 til 72 døgn ble det regelmessig (2-3 ganger per uke) tilsatt lut for å nøytralisere syreproduksjonen i testmediet.

En delprøve av 1. anrikingskultur ble sentrifugert og partikulært materiale ble brukt som podemateriale i nytt IH-MAR medium. Resultatene fra DOC i 2. testmedium viste ingen påviselig lag-periode. Dette indikerer at mikroorganismene omdannet hippursyren meget raskt. Imidlertid stoppet omsetningen av karbon på samme nivå som i 1. anrikingskultur. Det betyr at de utviklede bakteriestammer i kulturen ikke syntes å være i stand til å omsette gjenværende karbonkilde som i hovedsak var Iohexol, med eventuell rester av nedbrytningsprodukter fra hippursyren og lyserte bakterier i kulturen.

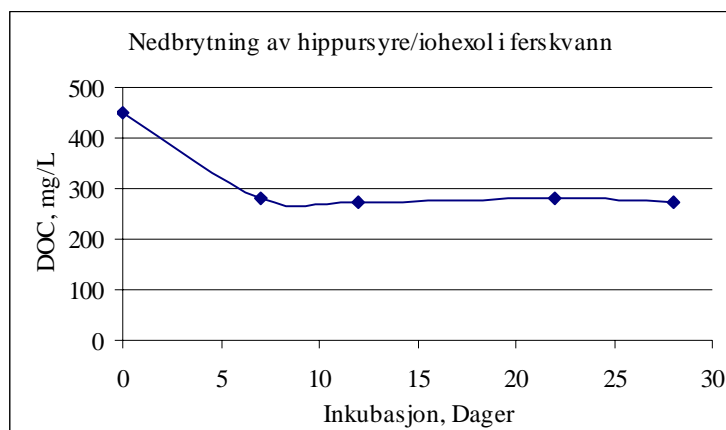
Ser vi på konsentrasjonen av Iohexol bestemt med HPLC analyse, kan det bare i svært liten grad påvises omsetning av dette stoffet. (Se vedlegg A). Repeterte tester har gjentatt samme utvikling. Da omsetningen av Iohexol i IH-MAR mediet var minimal ble det ikke utført etterfølgende tester med Iohexol som eneste karbonkilde. Ved lengre tid eksponering med IH-substrat kan man ha forhåpninger om at det utvikles bakteriestammer som induserer enzymer som er i stand til å omsette Iohexol i sjøvann i lab-forsøk.

3.2 Utviklingen i ferskvann mht DOC reduksjon

Utviklingen i IH-medium (ferskvann) kom raskt i gang. Allerede etter 3 døgn inkubasjon var pH 5,2 i testmediet, og nøytralisering med lut var nødvendig for å unngå svært lav pH i testmediet.

Regelmessig pH justering ble foretatt frem til 15 døgn inkubasjon, da dannelsen av syre raskt opphørte. I denne perioden varierte pH mellom 4,25 til 7,0.

Nedbrytningen av karbonkildene kom raskt igang, hvor det antas at hovedsakelig hippursyre først ble omsatt. Ved første uttak etter 7 døgn ble DOC-konsentrasjonen analysert til 280 mg/l. Denne konsentrasjonen holdt seg stabil under resten av testperioden (totalt 28 døgn).



Figur 2. Utviklingen i nedbrytningsforløp i blanding av Iohexol og hippursyre i ferskvann.

Nytt testmedium ble reinokulert med omsatt suspendert materiale fra pH-stabilisert kultur. Den nye testkulturen utviklet seg på samme måte som innledende test. DOC analysert etter 18 døgn viste 280 mg/l. Resultatet bekreftet at det oppstod en stagnasjon i omsetningen etter at hippursyren var omsatt og en del av Iohexolmolekylet var blitt omdannet til sterkt polare katabolitter, slik at det ikke lenger var detekterbart ved anvendt HPLC- metode.

Resultatene fra HPLC i ferskvann er vist med kromatogrammene i vedlegg A.

Del-prøver tatt etter 7 og 22 døgn eksponering viste ingen rester av Iohexol eller nedbrytningsprodukter (katabolitter). Det var forventet at rester av katabolitter med benzenring ville være påvisbare på HPLC- kromatogrammene, iallefall etter 7 døgn inkubasjon. Men det var ikke tilfelle, og det indikerer at omsetningen har vært såpass omfattende at de sannsynligvis må forligge som ikke konjugerte dobbelbindinger (aromatringsen er spaltet) eller enda mer oksidert. Den forholdsvis store mengde DOC som er igjen i løsningen indikerer at nedbrytningen ikke er kommet særlig langt. Det er derfor overraskende at det ikke finnes spor i kromatogrammene. En nærmere undersøkelse av dette bør være mulig, med bedre identifikasjon av prøvematerialet.

3.3 Videre studier av adapterte kulturer

Eksponering over lang tid med iohexol som eneste karbonkilde vil forhåpentligvis selektere bakterier som er i stand til å omsette denne karbonkilden raskere. Dette ble undersøkt ved gjentatt re-inokulering av bakteriekulturene i nytt medium (hhv. IH og IH-MAR). Kulturene ble reinokulert til nytt testmedium når omdannelsen stagnerte, tilkjennegitt ved stagnasjon i utviklingen av sure avspaltningssprodukter. I tillegg ble det igangsatt en kultur i ferskvannsmedium med iohexol som eneste karbonkilde, og inokulert med sedimentsuspensjon

av bakterier som hadde vokst på iohexol som eneste C-kilde over en periode på 47 dager. I denneperioden var det utført 3 reinokuleringer til nytt medium for å oppnå god seleksjon av bakterier. Etter minimum 47 døgns (iohexol-isolat) adaptering ble det av de tre kulturene i hhv. IH, IH-MAR og Ioh-medium utført analyser av DOC og iohexol over én uke etter overføring til nytt medium. Resultatene er vist i tabell 1. I tabellen er også analyseresultater fra tidligere overførte kulturer, analysert etter 15-17 døgn inkludert.

De to kulturene som helt fra starten av undersøkelsen var holdt på henholdsvis IH-medium i ferskvann og IH-MAR i sjøvann, hadde vist god aktivitet, indikert ved pH-forandring. Uttak av prøver til analyse ble gjort flere ganger i en ukeseperiode og resultatene er vist i tabell 1.

Iohexol mg/ ml (HPLC)					
Karbonkilde	Start	2 dager	4 dager	7 dager	17 dager
IH		1,05	1,04	1,02	0,61*
IH-MAR	0,99	0,96	1,08	0,93	
Iohexol		1,04	0,98	0,83	0,14**

DOC mg/l					
	Start	2 dager	4 dager	7 dager	17 dager
IH.	289	396	356	294	
IH-MAR	290	288	288	286	
Iohexol	290	296	298	290	292**

Tabell 1. Omsetning av Iohexol med adaptert bakterieslam som inokulum.

Resultater etter 15* og 17** døgn er fra en annen (tidligere utført) testkultur.

Iohexolen i IH-mediet ble ikke omdannet i løpet av 7 døgn eksponering. Kulturen ble umiddelbart kraftig turbid som var forårsaket av omsetning av hippursyren i mediet. Både HPLC- og DOC-resultatene viste ingen omdannelse eller mineralisering. En tidligere kultur som ble analysert etter 17 døgn inkubasjon viste en omdanning på ca. 40%. Kromatogrammet fra denne testen viser at Iohexol blir omdannet til svært polare nedbrytningsprodukter (to topper). (Se vedlegg D).

Den overraskende lave start-verdien for DOC i IH-mediet kan sannsynligvis forklares med at hippursyren enten har krystallisert etter oppvarmingen, eller ikke vært fullstendig oppløst ved varmebehandlingen. Hippursyren har derfor blitt fjernet under filtreringen gjennom 0,45 µm membranfilter. Hensikten med denne filtreringen var å fjerne partikulær biomasse. De etterfølgende målinger, etter 2 og 4 dager inkubasjon, viste at hippursyre igjen var tilstede i oppløst form i testmediet.

I etterhånd er det utført kontrollanalyser av hippursyre, Iohexol og blanding av disse i destillert vann ved anvendt testkonsentrasjon. Løsningen av hippursyre viste 124 mg/l TOC, (teoretisk beregnet til 120,5 mg/l karbon) og separat løsning av Iohexol 282 mg/l TOC, (teoretisk beregnet til 282,3 mg/l karbon). Blandingsløsningen viste en konsentrasjon på 408 TOC mg/l som er tilnærmet likeverdig med teoretisk beregnet konsentrasjon. Ved denne verifikasjon ble ikke løsningene membranfiltrert.

Resultatene fra IH-MAR varierte noe, og viste ingen sikker omdannelse av Iohexolen i løpet av 7-dagers perioden, selv om siste verdi var ca. 6% lavere enn startverdien. DOC-verdiene synes å representere oppløst Iohexol, mens hippursyren sannsynligvis ikke var oppløst og ble fjernet ved filtrering av delprøven. Hippursyren har sannsynligvis blitt omsatt etter hvert som den ble oppløst og bidro derfor ikke i de analyserte DOC-verdier i IH-MAR mediet. Den svake nedadgående utviklingen i DOC, tydet at en omsetning var kommet i gang som også turbiditeten i kulturen indikerte.

I testmediet med bare Iohexol som karbonkilde ble det påvist en signifikant omdanning forholdsvis raskt, og allerede etter 7 døgn var reduksjon på omtrent 20%. Denne reduksjonen av Iohexol ga imidlertid ingen forandring i konsentrasjonen av DOC i testmediet.

Fra en tilsvarende test med en inkubasjonsperiode på 17 dager ble det påvist en kraftig reduksjon av Iohexol (86%), mens konsentrasjonen av DOC ikke ble redusert. Resultatene er inkludert i tabell 1.

Alle HPLC-kromatogrammene er samlet som vedlegg i slutten av rapporten.

3.4 Isolering av bakteriestammer.

Bakterier som utviklet seg i kulturene ble isolert og reindyrket på IH-agar og Ioh-agar. Innledningsvis ble det registrert tilfredsstillende bakterievekst på fast agar-medium både i fersk- og sjøvann, men bakteriene døde ut på Ioh-agar etter noen overføringer. Senere ble det isolert bakteriestammer fra den flytende kulturen med Ioh-medium. Fra disse er det etablert stammer som vokser på fast agarsubstrat både i ferskvann og sjøvann. Disse rene bakteriestammer er ikke testet på nytt på flytende substrat.

4. Diskusjon

Ramstad & Eimhjellen (1) konkluderte med at det mest sannsynlige sluttproduktet er 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyre. Dette er en forbindelse som har en molekylvekt på 588,7. Dette vil gi en teoretisk konsentrasjon av DOC i testmediet på 163,1 mg/l ved en startkonsentrasjon av Iohexol i testmediet på 1000 mg/l.

Karbonkonsentrasjon av Iohexol og hippursyre i testmediene er beregnet til 404 mg/l. I praksis vil det også være et bidrag av karbon fra suspensjonen av podematerialet. Derfor vil konsentrasjon av DOC være noe høyere enn den teoretisk beregnede konsentrasjonen ved start av en test. DOC konsentrasjonen i testmediene etter at nedbrytningen hadde stagnert indikerer at det er andre "stabile" metabolitter enn 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyre tilstede.

Det synes som om iohexolmolekylet blir omdannet til katabolitter som ikke er lett å identifisere. Omsetningen av Iohexol antas å foregå langsomt ved den konsentrasjonen som er benyttet i disse forsøkene. Det ble observert lav turbiditet i væskefasen under hele inkubasjonsperioden. IH-mediet ble imidlertid raskt turbid p.g.a. hurtig tilvekst av bakterier under omsetningen av hippursyren. Under etterfølgende periode, med antatt langsom omsetning av Iohexol, ble kulturen gradvis mindre turbid fordi planktoniske bakterier agglomererte til sedimenterbare fnokker.

Induserte enzymer som dannes av mikroorganismene er avgjørende for omsetningen av forskjellige karbonkilder til ny biomasse og energi. Hvordan Iohexol blir tatt opp gjennom celleveggen hos bakteriene er ikke kjent, men det må foregå under spesifikke transportmekanismer. Exoenzymer kan tenkes å være aktive for å gjøre molekylet tilgjengelig for transport gjennom celleveggen. Det er trolig at en form for nedbrytning (omdanning) av iohexolmolekylet vil foregå exocellulært.

I undersøkelsene av Ramstad & Eimhjellen (1) er det påvist at iohexol-omsetningen må settes under et selektivt press før den kan komme igang. Alt hjelpe-substrat må antakelig være omsatt først, før nedbrytningen av Iohexol i det hele tatt kan komme i gang. De bakteriellstammer som raskt utvikler seg med hippursyre som substrat, kan trolig indusere enzymer som også omsetter Iohexol. I et podemateriale med forskjellige arter bakterier kan det være tilstede saktevoksende stammer som holder seg i en hvile-fase under nedbrytningen av hjelpesubstratet og som først er i stand til å blomstre opp etter at hippursyren er fullstendig omsatt.

Det er også blitt demonstrert at Iohexol ikke lett lar seg utnytte som energi- og karbonkilde til dannelse av ny biomasse. Det er påvist at høy bakteriebiomasse har stor betydning for å kunne oppnå rask omsetning av Iohexol, men da har biomassen først blitt etablert ved vekst på lett omsettbar substrat, med f. eks. hippursyre som karbonkilde. Slike betingelser vil være urealistiske under naturlige forhold, men kan være mulig å etablere i tekniske installasjoner som biologiske renseanlegg.

For å kunne holde bakteriellstammene under aktiv vekst over lengre tid ble testkulturer regelmessig fornyet med nytt vekstmedium. Etter flere overføringer på IH-medium ble det startet en testkultur med bare Ioh-medium i ferskvann. Denne ble inokulert med sediment fra omsatt IH-kultur. Etter flere overføringer ble det utviklet en bakteriekultur som synes å være i stand til å omdanne Iohexol uten tilsetning av hjelpesubstrat. (Ikke fulgt opp med DOC-analyser). Syreutviklingen var intensiv etter hvert bytte til nytt medium, som indikerer at katabolitter dannes. Det ble påvist rikelig tilstedeværelse av saktevoksende bakterier (dyrket på IH-agar) i kulturen. Spesifikke analyser som eventuelt kan bekrefte nedbrytning og dannelse av ny biomasse er i gang.

Test med adapterte bakterier har vist at hjelpesubstratet blir omsatt først, før omdannelse av Iohexol kan komme i gang. Iohexol synes å omdannes langsomt, uten at det resulterte i nedgang i oppløst organisk stoff p.g.a. syntese av biomasse eller fullstendig nedbrytning.

Flere DOC analyser utført på testmedier som var blitt pH stabiliserte (eksponert over minst 14 døgn) viste ingen sikker forandring i konsentrasjonen av DOC.

Det som antakelig har skjedd under dyrkningsprosessen er en seleksjon av det organisme-samfunn som var tilstede i opprinnelige podemateriale. Etter adaptasjon av bakterier og induksjon av enzymer ser det ut til at det er funnet isolater som er i stand til å utnytte Iohexol til en viss grad som karbonkilde. En oppfølging med noen flere tester som gir svar på om det nyeste isolatene er i stand til å vokse på Ioh-medium vil være interessant. Spesielt at man undersøker de stammene som er isolerte om de er i stand til en mer aktiv omsetning av Iohexol etter at de først er anrikket på hippursyre.

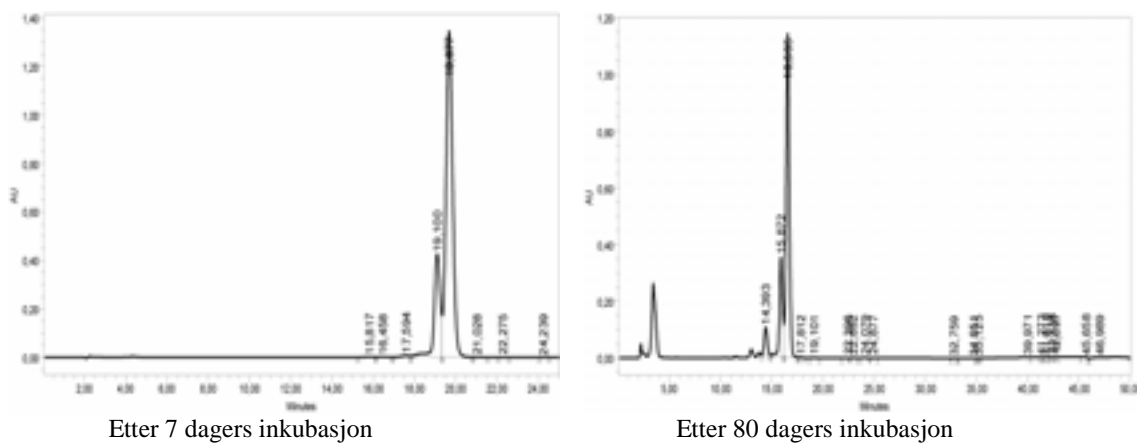
Det videre analysearbeidet som er nødvendig for å avsløre nedbrytningsprodukter fra Iohexol må i denne sammenheng tas hånd om av Amersham Health AS.

Litteratur

(1) Ramstad S, og Eimhjellen, K. 1985: Nedbrytning av industrikjemikalier. Delprosjekt; Nedbrytning av Iohexol og andre aromatiske jod-forbindelser.. NTNf prosjektkomité FK nr. 1552.7468. Trondheim-NTH, mai 1985.

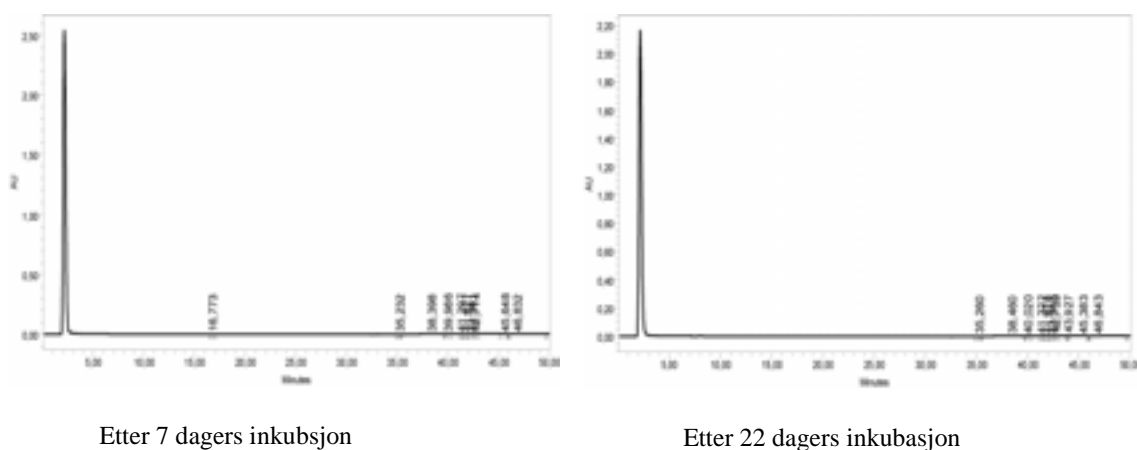
Vedlegg A.

Kromatogrammer fra omsetningen av Iohexol i IH-MAR medium (første forsøk).



Inkubasjon over lang tid, med justering av pH fra 29. døgn til 72. døgn. for å nøytralisere forsurening i testmediet. DOC-konsentrasjon uforandret i perioden.

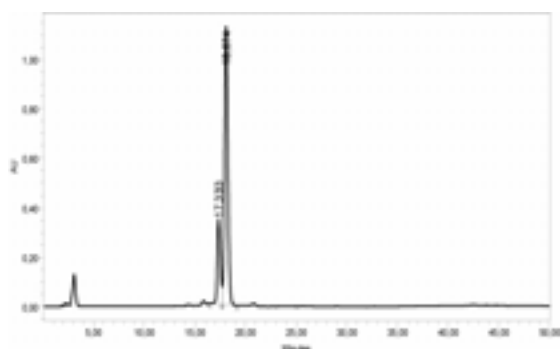
Kromatogrammer fra omsetningen av Iohexol i IH- ferskvannsmedium (første forsøk).



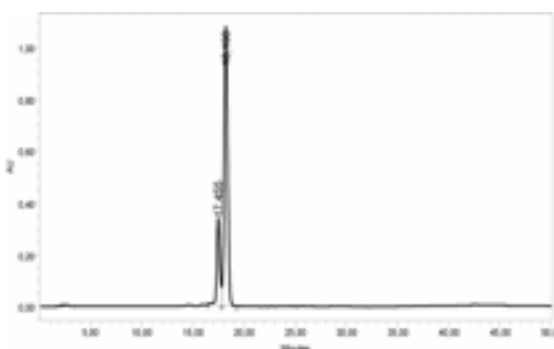
Rask omdanning av Iohexol. Iohexol-topp ikke påvisbar allerede etter 7 dagers inkubasjon.

Vedlegg B.

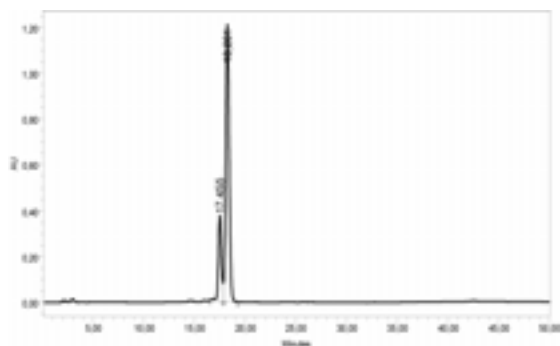
Kromatogrammer fra tester med langtids adaptert slam
i IH-MAR medium



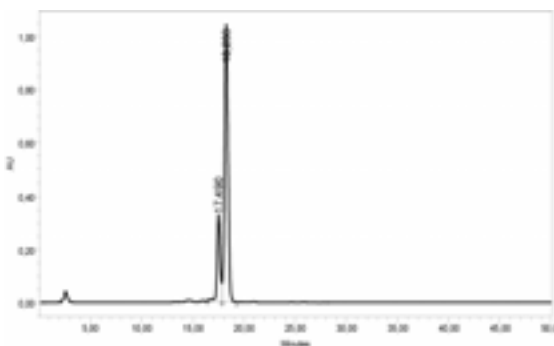
Kromatogram før inkubasjon (start).



Kromatogram etter 2 dagers inkubasjon



Kromatogram etter 4 dagers inkubasjon

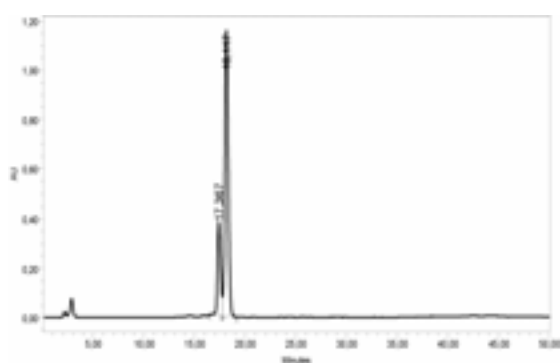


Kromatogram etter 7 dagers inkubasjon

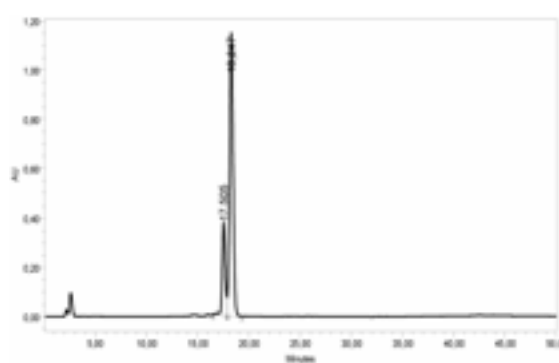
Kromatogrammene viser analyttisk variasjon, med et påviselig omdanning av Iohexol etter 7 døgn inkubasjon. Svak forsurening ble påvist. Nøytralisering med 10 M NaOH til pH ca. 7,0 ble utført.

Vedlegg C.

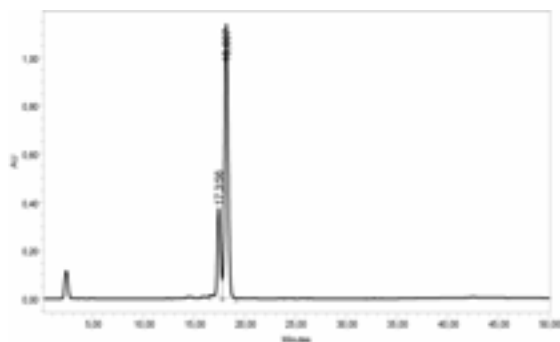
Kromatogrammer fra tester med langtids adaptert slam
i IH-ferskvanns-medium



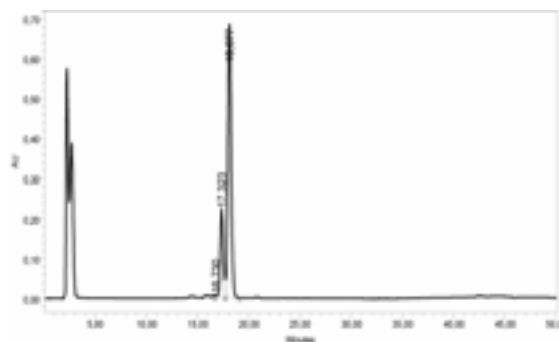
Etter 2 dagers inkubasjon



Etter 4 dagers inkubasjon



Etter 7 dagers inkubasjon



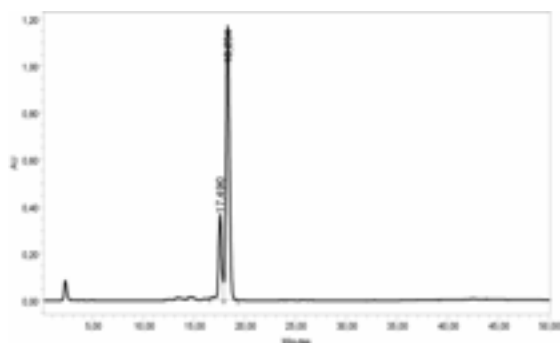
Etter 15 dagers inkubasjon*

Kromatogrammene viser ingen omdanning av Iohexol etter 7 døgn inkubasjon. Turbid kultur som resultat av bakterievekst. Ingen forsurening ble påvist under de første 7 døgn.

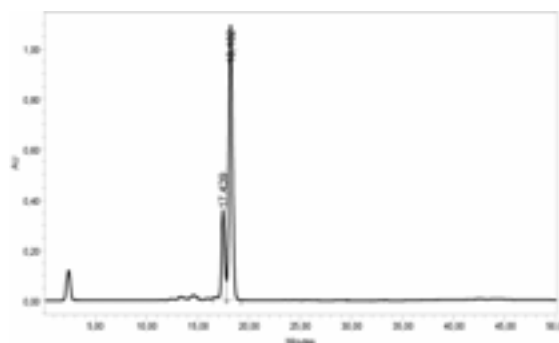
Kromatogram etter 15 dagers inkubasjon er fra tilsvarende forutgående kultur som viser en makert omdanning av Iohexol, med nedbrytningsprodukter bestående av to nærliggende topper.

Vedlegg D.

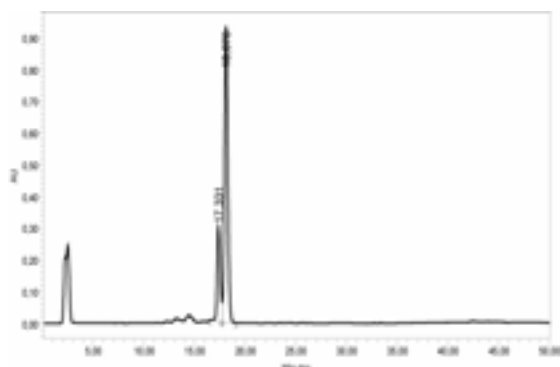
Kromatogrammer fra tester med langtids adaptert slam
i Iohexol ferskvanns-medium



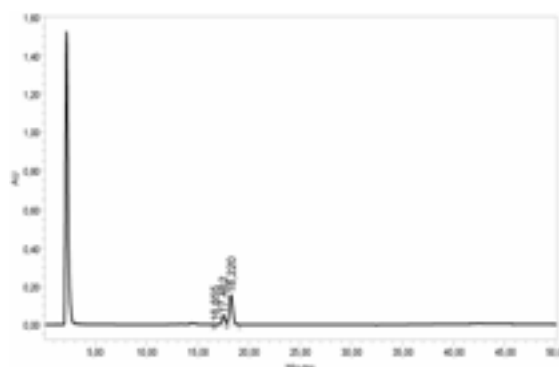
Etter 2 dagers inkubasjon



Etter 4 dagers inkubasjon



Etter 7 dagers inkubasjon



Etter 17 dagers inkubasjon*

Kromatogrammene viser at det raskt ble påviselig en omdanning av Iohexol som var moderat, men signifikant etter 7 døgn inkubasjon. En umiddelbar forsuring ble registrert, som ble nøytralisert med 10 M NaOH-løsning hver annen dag. Kromatogram etter 17 dagers inkubasjon er fra en forutgående kultur som viser tilnærmet fullstendig omdanning av Iohexol, med et sterkt polart nedbrytningsprodukt.