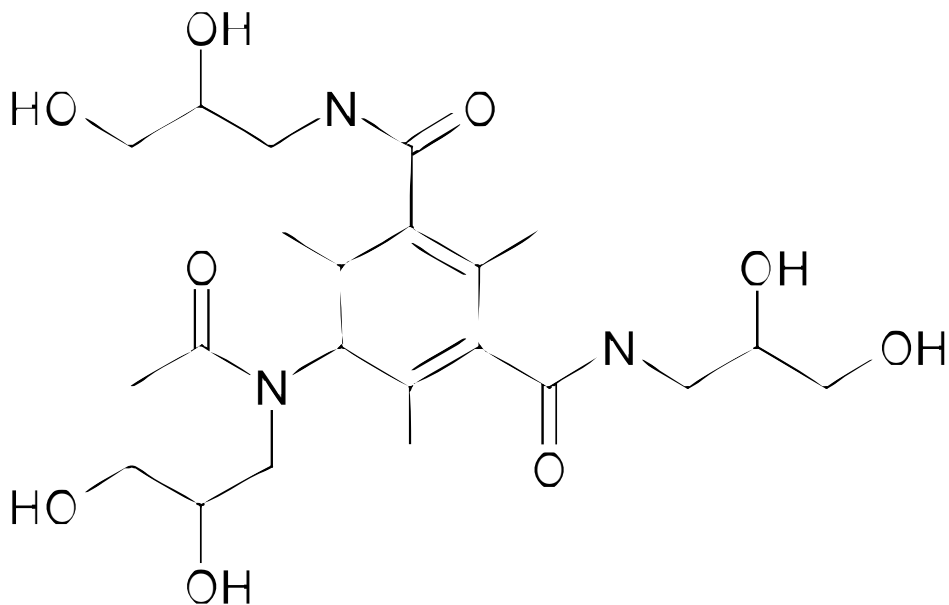


Forsøk med biologisk
nedbrytning av
røntgenkontrastmidlet
Iohexol
i ferskvann og sjøvann.



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 16 51 00
Telefax (47) 22 16 52 00
Internett: www.niva.no

Sorlandsavdelingen

Televøien 3
4879 Grønstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sarav kaveier 4*
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5036 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Akvaplan-niva

9286 Tromsø
Telefon (47) 77 75 03 00
Telefax (47) 77 75 03 01

Tittel Forsøk med biologisk nedbrytning av røntgenkontrastmidlet Iohexol i ferskvann og sjøvann.	Oppnr. (for bestilling) 5236	Dato 14.09.2006
	Prosjektnr. Undernr 0-25400	Sider Pris 46
Forfatter(e) Harry Efraimssen, NIVA Torsten Källqvist, NIVA Marianne Fresvig, GE Healthcare ASA	Fagområde 37 Økotoxikologi- mikrobiologi	Distribusjon
	Geografisk område	Trykkt. NIVA

Oppdragsgiver(e) GE Healthcare ASA	Oppdragsreferanse
--	-------------------

Sammendrag

Røntgenkontrastmidlet Iohexol er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i ferskvanns- og sjøvannsmedium i batch-kulturer med hippursyre som hjelpesubstrat. Mikroorganismer fra aktivt slam og fra avløpssystemet ved Lindesnes Fabrikker ble benyttet som inokulum i ferskvannstesten. Nedbrytningen av Iohexol og dannelse av nedbrytningsprodukter ble undersøkt ved HPLC og LC-MS-TOF. Mineralisering ble bestemt ved analyser av løst organisk karbon (DOC). HPLC analysene viste at det skjedde en rask omdanning av Iohexol i ferskvannsmiljø, slik at produktet etter 22 døgns inkubasjon ikke lenger var detekterbart. Flere nedbrytningsprodukter ble identifisert. Mineraliseringen ble beregnet til 22 % etter 39 døgn. Mikroorganismene fra ferskvannstesten ble gradvis adaptert til sjøvann og benyttet til en nedbrytbarhetstest i sjøvannsmedium. I denne gikk nedbrytningen av Iohexol mye langsommere, men noen av de samme nedbrytningsproduktene som i ferskvannstesten ble detektert. Ingen mineralisering av Iohexol ble målt i løpet av 28 døgn. Toksistetester med alger og krepsdyr viste at nedbrytningsproduktene av Iohexol var noe mer toksiske enn morstoffet. Fritt iod var trolig årsak til toksisiteten. P.g.a. lav nedbrytningshastighet, spesielt i sjøvann ventes ikke dannelse av nedbrytningsprodukter å kunne føre til toksiske effekter i resipienten.

Fire norske emneord 1. Industriutslipp 2. Røntgenkontrastmidler 3. Bionedbrytning	Fire engelske emneord 1. Industrial effluent 2. X-ray contrast media 3. Biodegradation
---	--


 Harry Efraimssen
 Prosjektleder


 Kevin Thomas
 Forskningsleder


 Jarle Nygaard
 Fag- og markedsdirektør

O-25400

Forsøk med biologisk nedbrytning av
røntgenkontrastmidlet Iohexol i ferskvann og sjøvann

Forord

Denne rapporten omhandler tester som er en oppfølging av det arbeid som ble gjort på sommeren og høsten 2003 for å undersøke potensial for biologisk nedbrytning av iohexol. Det ble benyttet adapterte mikroorganismer (bakterier) som er i stand til å omdanne røntgenkontrastmidlet iohexol både i ferskvann og sjøvann.

Siri Tønnesen ved fabrikken i Lindesnes var behjelpelig med å skaffe potensielt adaptert begroingslam ved oppstart av undersøkelsen. Marianne Fresvig og Arne Aabye har vært faglige kontakter ved GE Healthcare ASA.

Harry Efraimsen har hatt ansvaret for gjennomføringen av testene og rapporteringen. Marianne Fresvig, GE Healthcare ASA har hatt ansvaret for HPLC analysene, og NIVA-lab. ved Roy Beba har utført TOC analysene.

Seniorforsker Torsten Källqvist har hatt det overordnede faglige ansvaret og kvalitetssikringen av testarbeidet.

Oslo, 14.09.2006

Harry R. 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 Næringsløsning i ferskvannstest	8
2.3.2 Næringsløsning i sjøvann	9
2.4 Preparering av podemateriale (inokulum)	9
2.4.1 ferskvann	9
2.4.2 Sjøvann	10
2.5 Preparering av testløsninger	10
2.6 Inkubasjon	11
2.7 Analysemetoder	11
2.7.1 Bestemmelse av iohexol i testløsningene.	11
2.7.2 Bestemmelse av løst organisk stoff (DOC)	12
2.7.3 Analyser av fritt iod	12
2.7.4 Toksisitest med krepsdyr	12
2.7.5 Toksitetstester med alger	13
3. Resultater	13
3.1 Utviklingen i ferskvann mht DOC reduksjon	13
3.2 Utviklingen i sjøvann mht DOC reduksjon	14
3.2.1 Fritt iod.	15
3.3 Resultater fra HPLC analysene	16
3.3.1 Ferskvann	16
3.3.2 Sjøvann	18
3.4 Toksitet etter nedbrytningsforsøk	19
3.4.1 Ferskvann	19
3.4.2 Sjøvann	19
4. Diskusjon	20
5. Konklusjoner	22
Vedlegg A.	24
Vedlegg B	34

Sammendrag

Røntgenkontrastmidlet Iohexol er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i ferskvanns- og sjøvannsmiljø i batch-kulturer. Utslippet av prosessvann fra produksjon av iohexol ved Lindesnes fabrikk er til marint miljø. Det er derfor lagt vekt på å belyse nedbrytning og dannelse av eventuelle stabile nedbrytningsprodukter også i den marine testen.

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.

Under omsetningen av hippursyre ble det påvist en forsurening av testløsningene som trolig skyldtes dannelse av sure nedbrytningsprodukter eller frigivelse av H^+ -ioner som innvirket på CO_2 -bikarbonat balansen i testløsningene.

Omdanningen av iohexol til en rekke nedbrytningsprodukter skjer forholdsvis raskt i ferskvann når den mikrobielle nedbrytningsprosessen er kommet i gang. Adaptering av bakterier og indusering av enzymer synes å være nødvendig for at nedbrytningen kan skje. HPLC analysene viste at det skjedde en rask omdanning av iohexol, slik at produktet etter 22 døgn inkubasjon ikke lenger var detekterbart. LC-MS-TOF ble benyttet til identifisering av nedbrytnings produktene. Degradering ser ut til å først gå via oksidering av primær og sekundær alkoholene, for deretter å miste sidekjeder. Når sidekjedene er mistet, mistes også jod. Utviklingen i løst organisk karbon (DOC) viste en signifikant jevn eliminering på totalt ca. 22 % av karbon fra iohexol under en testperiode på 39 døgn.

I en test med sjøvann ble det benyttet en suspensjon av mikroorganismer (inokulum) tatt fra testen utført i ferskvann (som hadde vist nedbrytning av iohexol) og som gradvis var blitt akklimatisert til 32 promille sjøvann. HPLC analyser viste at iohexol degraderes sakte i sjøvann. En begynnende omdanning ble observert og var signifikant etter 28 dager. Det ble, etter 14 dager, påvist en forbindelse som tilsvarende en oksidert primæralkohol og etter 19 dager, en forbindelse som er iohexol minus en sidekjede. Dette er samme forbindelsene som ble påvist i de tidlige ferskvannsprøvene. Denne utviklingen antas å ha fortsatt om testen hadde vært forlenget, men det var ikke inkludert i undersøkelsen. Det ble ikke påvist fjerning av DOC som kan relateres til fullstendig nedbrytning av iohexol i denne testen. Etter at hjelpesubstratet, hippursyre var omsatt, stabiliserte DOC-konsentrasjon seg på et konstant nivå.

Undersøkelse av toksisitet av iohexol-løsningene etter nedbrytningsforsøkene viste toksiske effekter på krepsdyr. Sammenligning med tidligere toksisitetstester av iohexol med ferskvannsorganismer viser at nedbrytningen førte til dannelse av nedbrytningsprodukter som er mer toksiske enn iohexol. Fri jod, dannet ved avspalting fra iohexol, er den mest sannsynlige årsaken til toksisiteten.

Summary

The X-ray contrast substance Iohexol has been tested for potential for biodegradation by adapted microbial communities in batch cultures. The wastewater from the production site at Lindesnes, S. Norway is discharged to seawater and therefore degradation trials were performed in both freshwater and seawater media. The degradation tests were carried out at an initial concentration of 1g/l of iohexol and with hippuric acid as supporting substrate.

A mixed inoculum of microorganisms from an activated sludge sewage treatment plant, biofilm from the wastewater system at the production site and a laboratory activated sludge culture was used for the degradation test in freshwater medium.

Microorganisms adapted to iohexol in the freshwater test were adapted to seawater by gradually increasing the salinity to 32.

The hippuric acid was rapidly degraded both in the freshwater and seawater media. In this phase acidification of the solution was observed, indicating liberation of acidic degradation products. Adjustment of pH was necessary to avoid inactivation of the microorganisms.

Primary degradation of iohexol and formation of degradation products was studied by HPLC and LC-MS-TOF analysis of subsamples. Ultimate degradation (mineralisation) was measured as removal of dissolved organic carbon (DOC).

Transformation of iohexol to a number of degradation products occurred fairly rapidly in freshwater after an adaptation phase. After 22 days the parent compound iohexol was no longer detectable. Degradation appears to start with an oxidation of primary and secondary alcohols. After that side-chains are removed and free iodine is released. The DOC analysis showed a gradual elimination which had reached 22 % of the organic carbon from iohexol after 39 days incubation.

In the seawater test a much slower degradation of Iohexol was observed. After 14 days, a component identified as an oxidised primary alcohol, and after 19 days a component corresponding to iohexol minus one side-arm were detected. These are the same substances as were observed in the early phase of the freshwater test. The seawater test was stopped after 28 days, and it is not known, if further degradation would have followed the same path as in the freshwater test. The DOC analyses did not indicate any mineralisation of iohexol within 28 days.

Toxicity tests with algae and crustacean were performed in the test solutions after the degradation experiments in order to investigate if toxic degradation products had been formed. The crustacean *Daphnia magna* and *Acartia tonsa* were more sensitive to the test solutions than freshwater and marine algae. The freshwater solution was more toxic than the seawater solution and the toxicity to *D. magna* was higher than what can be explained by the initial concentration of iohexol. The increase in toxicity in the degraded iohexol solutions was probably caused by free iodine species.

Formation of toxic degradation products by degradation of iohexol in the receiving water are not expected to constitute any hazard because of the rapid dissipation and slow degradation in seawater.

Title: Experimental studies of biological degradation of the X-ray contrast agent Iohexol.

Year: 2006

Author: Harry Efraimsson & Torsten Källqvist, NIVA. Marianne Fresvig, GE Healthcare ASA.

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-4959-1

1. Innledning

GE Healthcare ASA produserer røntgenkontrastmidler ved Lindesnes fabrikker. 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 (2005: 0,18 kg/m³). Av dette utgjør Iohexol 31%, Iodixanol 6%, Iopentol 2%, cpd 540+derivater 33% og cpd 541+derivater 28%. (2005: Iohexol 35 %, iodixanol 13 %, cpd 540+derivater 29 % og cpd 541+derivater 23% - Iopentol ikke lenger aktuelt)

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

Økotoksikologiske undersøkelser av røntgenkontrastmidler og av avløpsvannet har vist 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.

Nedbrytbarhetstester utført i 2003 viste at biologisk nedbryting (DOC-reduksjon) av iohexol skjer langsomt i ferskvann under gunstige betingelsene, med adapterte mikroorganismene tilstede i testmiljøet (Källqvist et al. 2004). HPLC analyser viste at iohexol ble omdannet til metabolitter som det sannsynligvis tar lang tid før de mineraliseres fullstendig. Adaptering av bakteriestammer førte ikke frem til en velegnet stamme som var i stand til å omsette iohexol raskere. En periode med lav pH i testløsningen under inkubasjonsperioden kan ha ført til inaktivering av tilstedeværende bakterier.

I sjøvann ble det ikke påvist noen form for nedbrytning etter 80 dager testperiode.

Målsetningen med undersøkelsen var å ytterligere belyse potensial for biologisk nedbrytning og identifisere nedbrytningsprodukter i ferskvann og sjøvann, samt vurdere risiko for langsiktige innvirkninger av disse stoffene i resipient og nærområder.

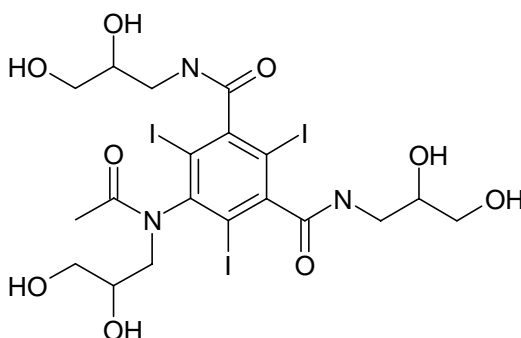
I denne undersøkelsen ble pH-verdien nøye overvåket og justert, for å være sikker på at bakteriekulturen ble holdt i live. Videre ble det tatt ut prøver til HPLC og HPLC-MS-TOF analyse hyppig (opptil 3ganger per uke) for å følge utviklingen. Testløsningene med iohexol (i ferskvann og sjøvann) ble tilsatt hippursyre som hjelpesubstrat. I tillegg ble en blank prøve (inokulert næringssaltløsning) og kontroll-løsninger med hippursyre, både i ferskvann og sjøvann utført parallelt med testen i ferskvann. Blank og kontroll prøver ble laget for å kunne bekrefte om detekterte forbindelser kom fra nedbrytningen av iohexol.

2. Forsøksbetingelser

2.1 Teststoffet, Iohexol

Røntgenkontrastmidlet, Iohexol, levert av GE Healthcare ASA som ett ferdig fremstilt produkt. Produktet har kjemisk formel, $C_{19}H_{26}O_9N_3I_3$, med en molekylvekt på 820,7, og har høy løselighet i vann. Strukturformel er vist Figur 1.

Benyttet testkonsentrasjon i forsøkene var ett gram per liter (0,1%). Den anvendte mengde iohexol i testmediene gir et teoretisk karboninnhold på 278,1 mg/l.



Figur 1. Strukturformel for iohexol

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 langsomt løselig i vann ved forholdsvis lav temperatur. Hippursyren ble oppløst i vann ved romtemperatur og ved kontinuerlig omrøring over 2-3 timer. Stoffet ble veid direkte i testløsningen og holdt under omrøring til alt synlig materiale var løst i vannet. Hippursyre inneholder 60,3 % karbon, d.v.s. at det ble tilsatt 120,5 mg/l organisk karbon som hjelpesubstrat.

2.3 Næringsalter

2.3.1 Næringsløsning i ferskvannstest

Næringsløsningen var den samme som beskrevet av S. Ramstad og K. Eimhjellen (1985) og som vist i følgende oversikt;

Næringsalter		Sporstoffer	
Per liter medium	gram/L	Kjemikalium	mg/L
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2,05	H_3BO_3	286 mg
KH_2PO_4	0,79	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	123,5
NH_4Cl	1,0	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,5
		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	219,5

+ 2 ml sporløsning		NaCl	1000
		CaCl ₂	250
		FeCl ₃ *	500
		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	16,8

* FeCl₃ er erstattet med FeCl₃ · 6H₂O /ekv-mengde 833 mg) Av FeCl₃-6 hydrat tilsettes 1,665 mg/l ferdig medium.

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

Fosfatkonsentrasjonen i testløsningen tilsvarer 14,8 mmol PO₄ (458 mg P per liter) og ga pH 7,0 i flytende ferdig preparert testløsning.

2.3.2 Næringsløsning i sjøvann

For å hindre utfelling av tungt løselige fosfater i sjøvannsmediet under pH justeringen var det nødvendig å benytte en vesentlig svakere bufning enn i testløsningen for ferskvann. Det ble valgt en bufferløsning som beskrevet i "OECD Guideline for testing of chemicals", 301, løsning (a), uten tilsetning av N-kilde. Det ble tilsatt 7,5 ml bufferløsning per liter som tilsvarer 87 mg P/ liter medium og 1,0 g/l NH₄Cl som tilsvarer 0,26 g nitrogen. Tilsetningen av sporelementer var den samme som for ferskvann.

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 (inokulum)

2.4.1 ferskvann

Det ble lagt vekt på å få etablert et allsidig sammensatt podemateriale ved starten av nedbrytningstesten i ferskvann.

Følgende kilder ble benyttet;

1. Laboratorieprodusert biologisk slam, dyrket på syntetisk avløpsvann (syntho) i kombinasjon med kommunalt avløpsvann (aktiv biomasse) i løpet av 8 døgn før testen ble startet.
2. Slamprøve fra celle 12 (sjøvannshus) tatt den 5.12.05. ved Lindesnes fabrikk. Slam, samlet etter sentrifugering ved 3000 G i 10 minutter, ble podet til preparert ferskvannsmedium som inneholdt 0,5 g iohexol og 0,1 g hippursyre per liter. Denne anrikningen ble startet den 6.12. 2005. og kulturen ble inkubert i 2 døgn.
3. Den 7.12.05 ble en ny avløpsprøve tatt fra celle 14 ved fabrikk, og mottatt samme dag som nedbrytbarhetstesten ble startet. Denne prøven ble sentrifugert og inkludert i ferdigblandet inokulum.

Prepareringen av inokulum ble gjennomført ved at biologisk aktivt slam fra simuleringsenheten ble sentrifugert ved 3000 G i 10 minutter og resuspendert (vasket) i bufret testløsning. Denne behandlingen ble utført 2 ganger for å få fjernet mest mulig av løst organisk materiale. Slammet fra celle 12, som var anrikt over to døgn, ble også behandlet etter samme behandlingsprosedyre. Avløpsprøven som ble mottatt den 8.12 (samme dag som testen ble startet) ble kun sentrifugert en gang som beskrevet foran, og det partikulære materialet ble blandet sammen med det forbehandlede

podeslammet. Slamkonsentrasjonen i det ferdig preparerte podematerialet ble bestemt til 4,1 g/l ved tørrstoffanalyse.

2.4.2 Sjøvann

Parallelt med start av nedbrytningstesten i ferskvann ble det startet en anrikningskultur i 15 ‰ sjøvann (brakkvann) for å utvikle salttolerante bakterier, enten fra tilstedeværende bakterier i det ferske sjøvann som ble benyttet, eller fra podematerialet som var preparert for ferskvannstesten. Det ble benyttet 0,5 g/l iohexol og 0,1 g/l hippursyre i denne anrikningskulturen.

Etter 8 dager ble saliniteten økt til 20 ‰, og etter 13 dager ble den økt ytterligere ved tilsetning av nytt medium til 25‰. Etter 20 dager ble det preparert nytt medium med 32 ‰ sjøvann med konsentrasjon av iohexol og hippursyre på henholdsvis 0,5 g og 0,2 g/l. Sentrifugert og resuspendert biomasse fra forutgående kultur (25 ‰) ble brukt til poding av det nypreparerte kulturmediet.

Kulturen med 32 ‰ ble holdt i ytterligere 10 døgn for å observere utviklingen med hensyn til pH og vekst av mikroorganismer. Hydrogenionekonsentrasjon (pH) i kulturen forble uforandret. Tilstedeværelsen av mikroorganismer ble observert med mikroskopi og ved utsåing på fast agarmedium. Undersøkelsene viste at det var rikelig med bakterier i vannfasen, sammen med små flagellater. Bakteriene vokste godt på fast substrat.

HPLC-analyse av iohexol ble utført på filtrert delprøve for å avklare om mikroorganismene var i stand til å omdanne stoffet. Resultatet viste ingen påviselig nedbryting. Det ble besluttet at arbeidet med denne kulturen skulle avsluttes.

En ny kultur, som var tolerant mot sjøvann ble laget ved at adaptert og anrikt slam fra ferskvannstesten ble tilsatt nytt ferskvannsmedium med 0,5 g iohexol og 0,1 g hippursyre per liter, og i tillegg tilført sjøvann for å oppnå 10 ‰ salinitet i mediet. Etter 4 døgn ble halvparten av mediet skiftet ut med nytt sjøvannsmedium og saliniteten økt til 20 ‰. Ved denne saltholdigheten ble det observert, ved hjelp av mikroskop, en stadig økende forekomst av sopphyfer i testmediet. Etter ytterligere 4 døgn inkubasjon ble halvparten av mediet byttet ut med nytt sjøvannsmedium som inneholdt 0,5 g iohexol og 0,1 g hippursyre per liter. Saliniteten ble ved denne utskiftningen økt til 26 ‰. Etter 11 døgn adaptasjon til sjøvann ble det foretatt en full utskiftning av sjøvannsmediet med 32 ‰ saltholdighet som beskrevet for marint miljø under kap. 2.5. Det ferske sjøvannsmediet ble podet med 100 ml konsentrert slamsuspensjon fra adapteringskulturen med 26 ‰ salinitet. Denne siste ompodningen av marin kultur ble holdt under kontinuerlig omrøring ved 20 °C i 7 døgn og slamsuspensjonen fra denne kulturen ble benyttet i den marine testen.

Under adapteringsperioden ble den registrerte forsuren daglig nøytralisert med en løsning av 4M NaOH. pH varierte mellom 5,9 til 6,7. Observasjon ved hjelp av mikroskop viste stor utbredelse av frittstående små stav-bakterier i vannfasen. Det ble også observert stor forekomst av sopphyfer og ansamlinger av hyfer og sfæriske partikler som lignet soppsporer. Adapteringskulturen ble sentrifugert ved 4500 rpm for anrikning av suspendert materiale. Slamkakene som ble samlet i sentrifugeglassene ble resuspendert i sjøvann tilsatt hippursyre.

En utsåing av podesuspensjonen på marin agar 2216, DIFCO viste $4,3 \cdot 10^7$ levedyktige kim per ml. Inokulert marint miljø testløsning inneholdt ved start $6,5 \cdot 10^8$ levedyktige kim per ml.

2.5 Preparering av testløsninger

Testløsningen i ferskvann ble preparert i 3 liter volum porsjon i 5 liter Erlenmeyers flaske. Iohexol ble tilsatt direkte i konsentrasjonen 0.1%. Hjelpesubstratet hippursyre ble først tilsatt i en liter av

testløsningen og holdt under omrøring til alle krystallene var oppløst (se pkt. 2.2). Løsningen ble så blandet med delporsjonen som var tilsatt næringssalter 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.

Oversikt over de forskjellige anvendte testløsninger:

<u>Medium:</u>	<u>Innhold:</u>
Ferskvann	Iohexol (1 g/l), hippursyre (200 mg/l), ionkulum og næringssalter i ferskvann.
Sjøvann	Iohexol (1 g/l), hippursyre (200 mg/l), inokulum og næringssalter i sjøvann.

Kontroll-løsninger:

Hippursyre i ferskvann:	Hippursyre (200 mg/l) i næringssaltløsning i ferskvann
Hippursyre i sjøvann:	Hippursyre (200 mg/l) i næringssaltløsning i sjøvann.
Blank inokulum:	Inokulum og næringssalter i ferskvann.

2.6 Inkubasjon

Testløsningene ble holdt under kontinuerlig omrøring av magnetrørverk. Temperaturen ble holdt ved 20 ± 1 °C under inkubasjonen.

Omdanningen kom forholdsvis raskt i gang både i ferskvann- og sjøvannsmediene, men det skyldtes nedbrytingen av hippursyren. Etter 20 døgn ble det påvist forsuring i testløsningen i ferskvann, som ble nøytralisert med sterk NaOH-løsning (7 M). Denne forsuringen stagnerte ved slutten av testperioden.

Den lave bufringen i sjøvannmediet gjorde det nødvendig å justere pH ofte i denne kulturen. Det ble brukt en NaOH-løsning (4 M) til justeringen. Under den mest aktive nedbrytningsfasen var det nødvendig å foreta kontroll og justering av pH opptil 3-4 ganger per uke for testen i ferskvann og hver dag for testen i sjøvann.

Del-prøver ble tatt ut for å følge utviklingen over tid. Volum fra 15-20 ml og opptil 60 ml ble tatt ut og filtrert gjennom 0,45 µm membranfilter (Sartorius, Minisart) Ca. 15 ml ble frosset for analyse av iohexol (HPLC). En delprøve ble fortynnet og konserveret for analyse av løst organisk karbon (DOC).

2.7 Analysemetoder

2.7.1 Bestemmelse av iohexol i testløsningene.

HPLC-analyser for bestemmelse av iohexol ble utført ved GE Healthcare av forsker Marianne Fresvig. Følgende instrumentering og konfigurasjon ble benyttet ved detektering av iohexol og de dannede metabolitter.

Analyse Instrument:

- 1) HPLC-DAD, HP-1100 series, Agilent, bestående av pumpe, degasser, auto-injektor, kolonneovn og diode array (DAD).
- 2) HPLC-DAD, HP1100 series med MS-TOF, Agilent

bestående av: pumpe, degasser, auto-injektor, kolonneovn, diode array (DAD) og MS-TOF.

Analytiske betingelser:

Kolonne: Zorbax Extend C18 (4,6 x 50 mm) 1,8 µm partikler
Mobilfaser: MF-A: 0,1 % maursyre i vann
MF-B: 0,1 % maursyre i 80 % acetonitril
Injeksjons volum: 10 µL
Deteksjon: DAD: 254 nm
Flow: 1,5 mL/min
Kolonne ovn temperatur: 40 °C

Gradient:	<u>tid</u>	<u>MF-B %</u>
	0	2
	1	2
	5	40
	6	80
	7,5	80
	7,6	2
	10	2

Prøven ble oppbevart i fryseboks til de ble analysert.

Prøveløsningen ble overført til HPLC-vial uten ytterligere opparbeidelse.

Som standarder ble følgende substanser benyttet:

Iohexol:	MW 821
Iopentol (1metyleret iohexol):	MW 835
"541" Iohexol minus 1 sidekjede (-CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH):	MW 747
5-acetamid-2,4,6-trijodisoftalsyre:	MW 601
5-amino-2,4,6-trijodisoftalsyre:	MW 559
Hippursyre	MW 179

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 for ledningsevne over 100 mS/m. Det ble benyttet er instrument av fabrikat; Tekmar Dohrmann Apollo 9000 HS karbonanalysator.

2.7.3 Analyser av fritt iod

Fritt iod ble analysert med Mettler Toledo DL3 titrator V2.4.

2.7.4 Toksisitet med krepsdyr

Ved nedbryting av iohexol vil substituert jod i benzen-ringene i molekylet bli dissosiert og foreligge i løst form som jodider i forskjellige oksidasjonstrinn. Eventuell toksisk effekt av denne frigivelsen av jod i løsning eller andre nedbrytningsprodukter ble testet etter internasjonale standardiserte testmetoder. For ferskvann ble det benyttet *Daphnia magna* som testorganisme. (ISO 6341, Water Quality - Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)), og for sjøvann ble *Acartia tonsa* benyttet som testorganisme. (ISO/FDIS 14669 Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)).

Testløsningene etter avsluttet inkubasjonsperiode ble filtrert gjennom membranfilter (porestørrelse 0,45 µm) for å fjerne det partikulære materialet. Testvannet ble lagret ved 4-6 °C til testene ble utført. I toksisitetstestene bestemmes dødelighet eller immobilisering av forsøksdyrene i løpet av 48 timers eksponering til ulike konsentrasjoner av prøven. På grunnlag av resultatene ble EC₅₀-verdien for immobilisering av *D. magna* og LC₅₀-verdien for *A. tonsa* beregnet ved probit-analyse. (EC₅₀ er den konsentrasjon som immobiliserer 50% av forsøksdyrene innenfor et gitt tidsrom, for eksempel 48 timer. LC₅₀ er den konsentrasjon som gir 50% dødelighet (letalitet) av *A. tonsa*).

2.7.5 Toksisitetstester med alger

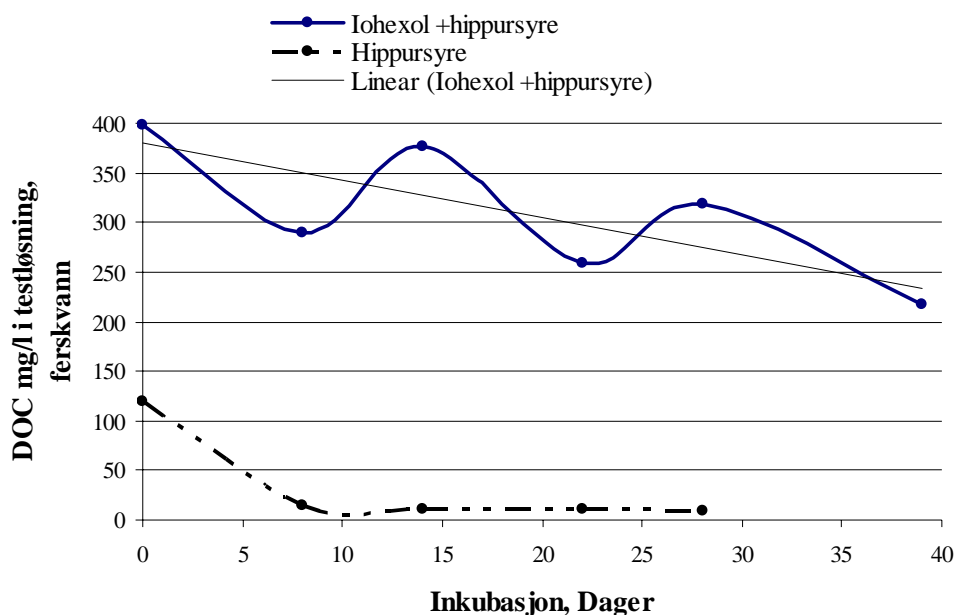
Testløsningene etter nedbrytning ble undersøkt mht. veksthemmende effekter på ferskvannsalgen *Pseudokirschneriella subcapitata* i henhold til ISO 8692 – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae, og på sjøvannsalgen *Skeletonema costatum* i henhold til ISO 10253 – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*. De filtrerte vannprøvene ble tilsatt et vekstmedium-konsentrat og fortynnet til ulike konsentrasjoner i vekstmedium. Prøvene ble podet med alger og inkubert i lys i 72 timer. Algenes vekst ble målt ved telling med en elektronisk partikkelteller (Coulter Multisizer) og veksthastigheten i hver kultur ble beregnet som prosent av veksthastigheten i kontrollkulturer. Dersom det ble påvist en økende veksthemming med konsentrasjon av testløsning, ble effektkonsentrasjonene EC₅₀ og EC₁₀ beregnet ved regresjonsanalyse av responskurven. (EC₅₀ og EC₁₀ er de konsentrasjoner som gir hhv. 10 % og 50 % veksthemming).

3. Resultater

3.1 Utviklingen i ferskvann mht DOC reduksjon

Omsetningen av organisk karbon i testløsningen med iohexol og hippursyre, førte ikke til forandring i løsningens pH under den første delen av inkubasjonen. Heller ikke i kontroll-løsningen med hippursyre ble det påvist forsuring under nedbrytningen før etter 15 til 20 døgn inkubasjon. I denne 5 dagers perioden sank pH fra 7,1 til 6,1 i testløsningen. For å unngå inaktivering av levedyktige mikroorganismer i løsningen var det nødvendig å utføre rutinemessig nøytralisering ved tilsetning av 7M NaOH-løsning. I perioden fram til 28 døgn varierte pH mellom 5,9 og 7,0.

DOC resultatene viste imidlertid at nedbrytningen av hippursyre hovedsakelig fant sted i løpet av de første 8-10 dagene av inkubasjonsperioden, d.v.s. lenge før det ble påvist forsuring i løsningen. Det var antatt at forsuringen skyldtes frigivelse av H⁺-ioner under degraderingen av hippursyren. Derfor var det forventet av forsuringen ville skje parallelt med mineraliseringen av organisk stoff til CO₂ og H₂O. Det ble ikke funnet noen plausibel forklaring på hva som kan være årsaken til den forsinkede forsuringseffekten. Man kan tenke seg at bufferkapasiteten i testløsningen først ble brukt opp før en forandret i pH blir påviselig. Testløsningen for ferskvann var forholdsvis kraftig bufret med fosfat, og har derfor høy kapasitet til å motvirke pH-forandring under den intense delen av nedbrytningsfasen. Når bufferkapasiteten er blitt brukt opp påvirkes bikarbonat-likevekten i testløsningen slik at pH-verdien synker.



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

Den innledende reduksjonen av DOC i testløsningen skyldtes omsetningen av hippursyre. Dette bekreftes med den reduksjonen som ble påvist i kontroll-løsningen med hippursyre som karbonkilde. Restkonsentrasjonen av DOC i kontroll-løsningen var 14 mg TOC/l etter 8 døgn, d.v.s. en DOC-reduksjon på ca. 90 % etter korrigerings for DOC i podematerialet.

Oksidasjon (oppslutningen) under selve analyseringen viste variasjon for de enkelte prøvene. Det kan tyde på at iohexolmolekylet er relativt vanskelig å oppslutte, selv med en temperatur på 680 °C. En inspeksjon av de respektive oksidasjonsdiagrammer for analysene viste ingen unormal utvikling for noen av DOC-prøvene. Det er likevel grunn til å anta at analyseverdiene etter 14 og 28 døgn er før høye, og at analyseverdiene etter 8, 21 og 39 døgn inkubasjon representerer den reelle DOC-konsentrasjonen i testløsningen på de aktuelle tidspunkter.

Ved å korrigere for nedbrytningen av hippursyren og DOC tilført ved podematerialet, ble det beregnet en DOC reduksjon på ca. 22 % som kan direkte relateres til nedbrytning (omdanning) av iohexol under hele inkubasjonsperioden. Den lineære trendkurven for DOC i løsningen med iohexol og hippursyre viser en signifikant reduksjon under hele testperioden, også etter at hippursyren er omsatt.

3.2 Utviklingen i sjøvann mht DOC reduksjon

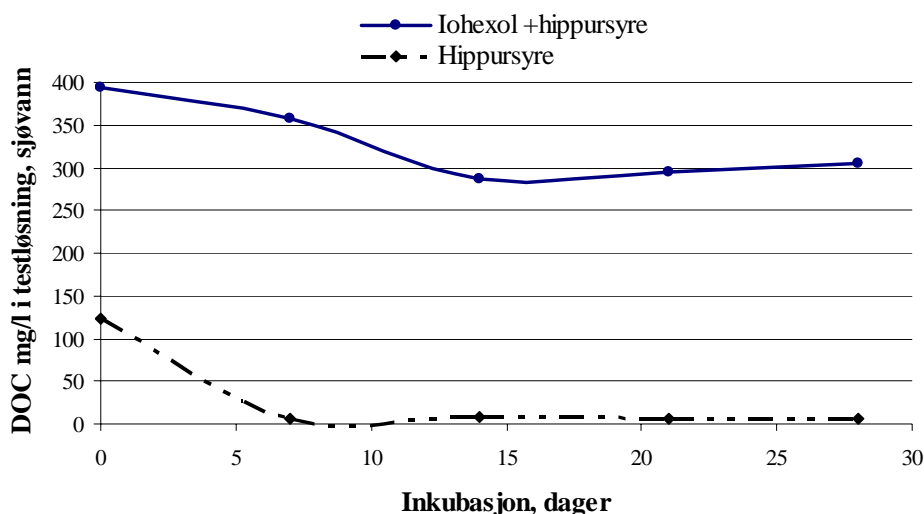
Utviklingen i testen med sjøvann ble fulgt over en periode på 28 dager. Forsuringen i test- og kontroll-løsningene i sjøvann, ble initiert samtidig og allerede etter 4 døgn ble det nødvendig med tilsetning av nøytraliseringsløsning for å holde pH under kontroll. Årsaken til dette var vesentlig lavere bufferkapasitet i sjøvannsmediet enn i ferskvann, pkt 2.3.2.

Nøytralisering med tilsetning av 4M NaOH-løsning ble utført daglig for å minimalisere variasjonen i pH. Den observerte variasjon var mellom pH 5,9 og 6,6 etter at nøytraliseringen ble iverksatt.

Nedbrytningen av hippursyre utviklet seg rask også i sjøvann, med tilnærmet fullstendig eliminering av DOC i løpet av de første 7 døgner. Dette er vist med kurven for kontroll-løsningen, med hippursyre som karbonkilde, og som er den nederste kurven for rest DOC i Figur 3.

I testløsningen, med iohexol og hippursyre, var elimineringen av DOC i samsvar med omsetningen for hippursyre, som vist i utviklingskurven vist i figur 2. DOC resultatene fra 7 til 28 døgner inkubasjon viste ingen ytterligere nedbrytning som kan knyttes til mineralisering av iohexol i sjøvann.

Manglende mineralisering (d.v.s. nedbrytning til CO₂, H₂O og mineralsalter) av iohexol i sjøvannstesten, tyder på at mikroorganismesamfunnets evne til fullstendig nedbrytning av iohexol var betydelig svekket etter adaptasjonen til sjøvann. Dette kan bero på at viktige bakteriestammer for nedbrytningen var blitt fjernet eller at de enzymer som var i stand til å nedbryte iohexol i ferskvann ikke ble induisert i sjøvann.



Figur 3. Nedbrytningen av Iohecol og hippursyre i sjøvann.

Selv om det ble påvist god vekst av bakterier ved utsåing på dyrkningsplater (næringsagar), så var bakterieveksten ikke beviselig basert på at iohexol var karbonkilden.

Den langsomme DOC-reduksjonen som ble observert i ferskvann og mangel på fullstendig nedbrytning i sjøvann i denne undersøkelsen gir en indikasjon på at iohexolmolekylet er vanskelig å bryte ned for de mikroorganismene som relativt lett adapterer seg i marint miljø. Som substrat vil iohexol ikke bli foretrukket som karbonkilde, sannsynligvis heller ikke når det er få alternative karbonkilder tilstede, eller om disse foreligger i lave konsentrasjoner i miljøet.

3.2.1 Fritt iod.

Prøver av vannprøver fra ferskvannstesten ble analysert etter 39 døgns eksponering. I sjøvannstesten ble det tatt ut en prøve for analyse ved start og etter 28 døgner. Resultatene er sammenstilt i Tabell 1.

Tabell 1. Fritt iod i testløsninger

Prøve	Tidspunkt	Fritt iod (mg/l)
Ferskvann testløsning	39 døgn	51.05
Ferskvann blank	39 døgn	0.0
Sjøvann testløsning	28 døgn	1.75
Sjøvann testløsning	Start	0.0

3.3 Resultater fra HPLC analysene

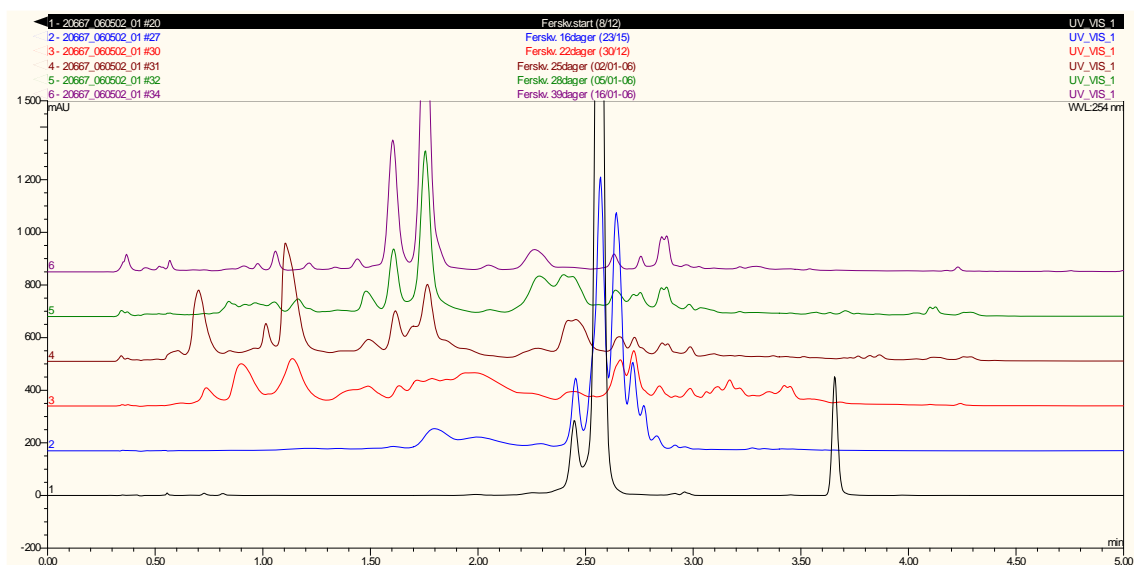
3.3.1 Ferskvann

Oversikt over alle prøvene som ble tatt av test-, kontroll- og blank-løsningene under inkubasjonsperioden og analysert med hhv DOC, HPLC-DAD, HPLC-MS-TOF og toksisitet, er samlet i vedlegg (A). I figur 8 i vedlegg (A) er kromatogram over alle prøvene fra ferskvann sammenstilt. Tilsvarende er kromatogram av alle prøvene fra marint miljø samlet i figur 10 vedlegg (A) og av standarder i figur 9, vedlegg (A)

Noen representative kromatogram er vist i Figur 4. Disse følger utviklingen i testløsningen fra start, nederste kromatogram, og etter 16 dager, 20 dager, 22 dager, 25 dager og 39 dager. Det viser en utvikling hvor iohexol, som er en karakteristisk dobbel-topp ved ca 2,4 og 2,5 minutter i start kromatogrammet, omdannes først til forbindelser med høyere retensjonstid enn iohexol, for deretter å danne forbindelser med lavere retensjonstid enn iohexol. Hippursyren har retensjonstid på ca 3.7 minutter og sees i startprøven. Hippursyres degraderes fort og ble ikke påvist etter 4 dagers inkubasjon.

Standarder av iopentol gir en dobbeltopp med retensjonstid på ca 3,3 og 3,4 minutter. Syrene 5-acetamid-2,4,6-trijodisofthalsyre har retensjonstid på ca 0,7 minutter og 5-amino-2,4,6-trijodisofthalsyre har retensjonstid på ca 1,4 minutter. "541" har retensjonstiden 1,9 minutter. Sammenstilling av standardene er vist i figur 10, vedlegg A. Hverken iopentol eller syrene ble påvist i testløsningene.

LC-MS-TOF instrumentet ble benyttet for å forsøke å identifisere nedbrytningsproduktene. Som det går frem av figur 4, degraderes iohexol til mange nedbrytningsprodukter, hvor noen av toppene går over i hverandre. Dette gjør at for mange av toppene er ikke spekterene entydige. Ved tolkningen er det lagt vekt på de mest entydige spekterene for å prøve å forklare hvordan iohexol degraderes.



Figur 4. Sammenstilling av kromatogram av prøver fra nedbrytning av iohexol i ferskvann, ved start (svart) og etter 16 dager (blå), 20 dager (rød), 22 dager (brun), 25 dager (grønn) og etter 39 dager (lilla).

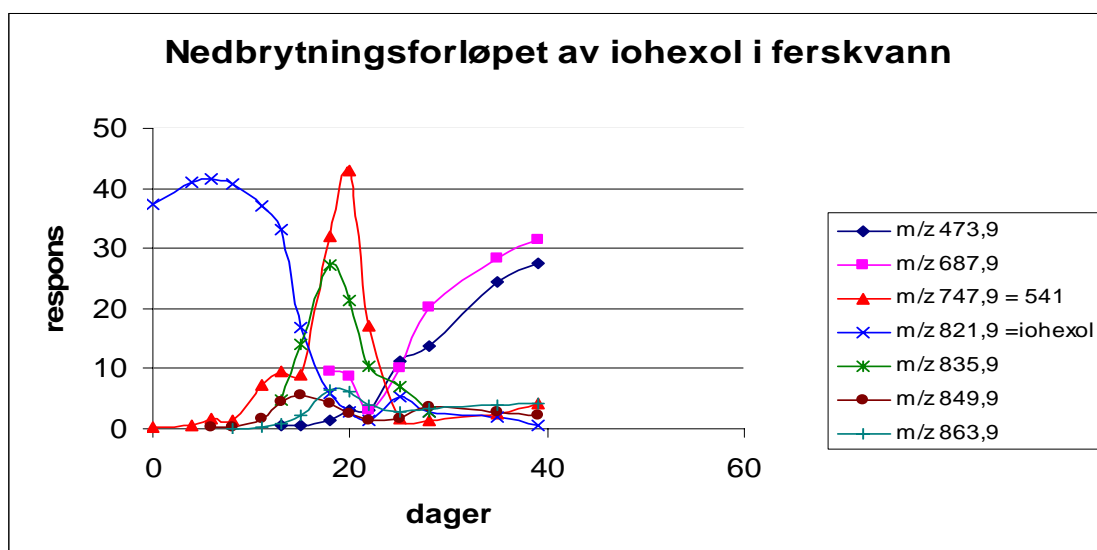
Nedbrytningsproduktene med høyere retensjonstid enn iohexol domineres av massene m/z 835,9, 847,9 og 863,9, som mest sannsynlig er oksidasjon av hhv. 1-, 2- og 3- primæralkoholer. Videre antas det at det foregår en oksidering av sekundær alkoholer til ketoner (minus 2 hydrogen), som observeres f.eks ved m/z 819,9, som er iohexol minus 2 hydrogen, eller m/z 745,9, som er "541" med MW 747 minus 2 hydrogen.

Massen m/z 747,9, som påvises i testløsningene og har retensjonstiden 1,9 minutter er mest sannsynlig "541", hvor standard av "541" har samme retensjonstid og spekter.

Figur 5. viser utvikling av noen av toppene. Toppene har massene m/z 473,9 (svart), m/z 687,9 (rosa), m/z 747 (rød), iohexol m/z 821,9 (blå), m/z 835,9 (grønn), m/z 849,9 (brun) og m/z 863,9 (blågrønn).

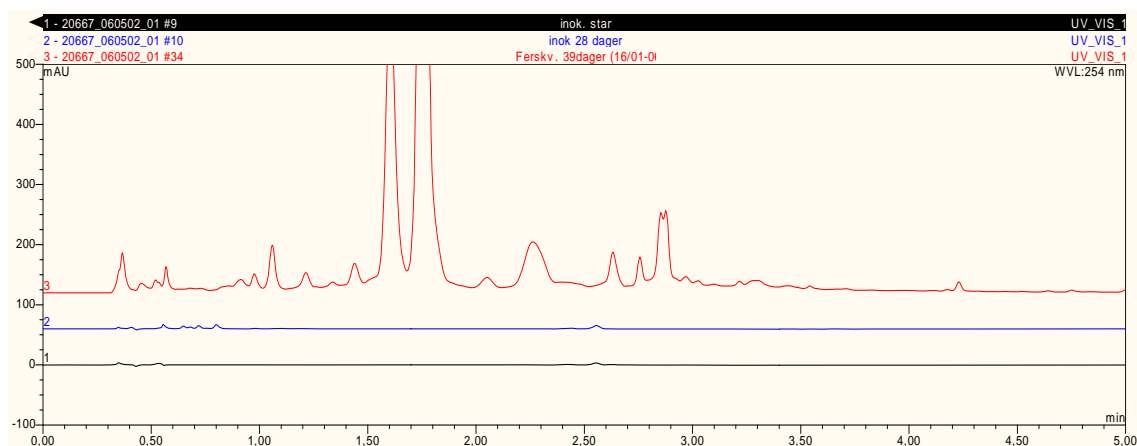
Figuren viser at iohexol er tilnærmet fullstendig fjernet etter 20 dager. Etter ca 10 dager vokser de oksiderte primæralkoholene opp, hvor 1 oksidert alkohol er mest dominerende med et maksimum etter 18 dager. Etter 18 dager reduseres konsentrasjonen av de oksyderte primæralkoholene og forbindelser som har mistet 1-, 2- og 3- sidekjeder vokser opp. Forbindelsen med massen m/z 687,9 (svart) og m/z 473,9 øker utover i forsøket og er det dominerende nedbrytningsproduktene i de siste uttakene.

En røff estimering gir at testløsningen etter 39 dager, inneholder 400 mg/L av m/z 687,9 og 170 mg/L av m/z 473,9, som igjen gir ca 60 % av utgangskonsentrasjonen av iohexol (1 g/L). Tar man hensyn til at ca 22 % av iohexol er fullstendig fjernet gir dette at ca 73 % av restkonsentrasjonen av iohexol er omdannet til disse to dominerende forbindelsene.



Figur 5. Nedbrytningsforløpet av iohexol i ferskvann under inkubasjonsperioden på 39 dager. For å få alle toppene inn i samme figur, er responsen for iohexol dividert med fire og responsen på m/z 687,9 halvert.

Det ble analysert en blank prøve av inokulum/podemateriale ved forsøket start og etter 28 dager. Ved å sammenligne blankene med en prøve fra ferskvann etter 39 dager, viser dette at nedbrytningsproduktene kommer fra iohexol og ikke fra inokulum/podemateriale, se figur 6.



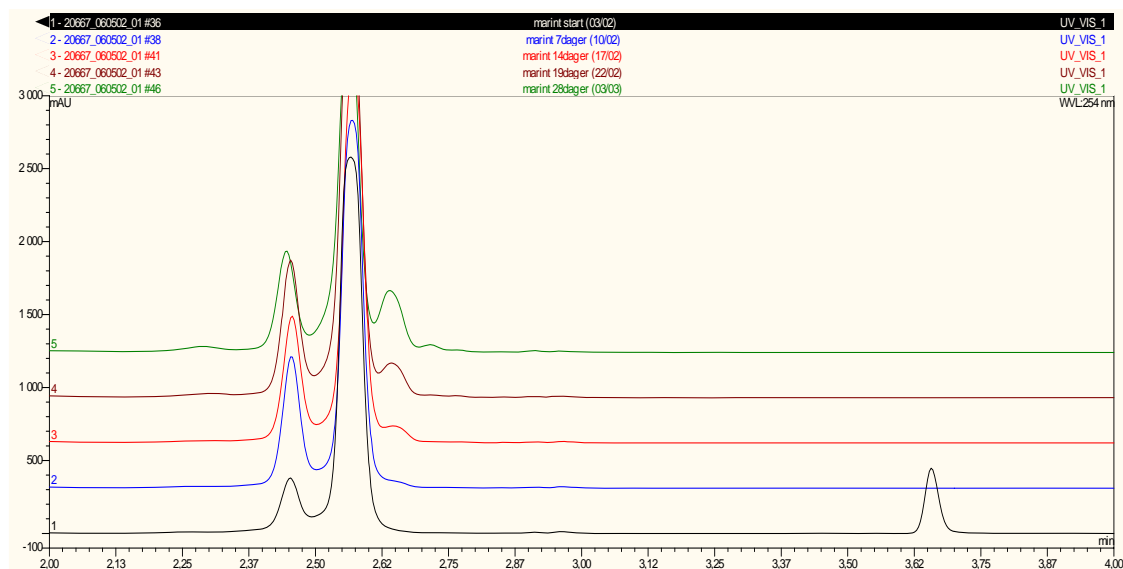
Figur 6. Kromatogram som viser inokulum, blank ved start (svart) og etter 28 dager (blå), og testløsning fra ferskvann etter 39 dager (rød).

3.3.2 Sjøvann

Kromatogrammene av et utvalg av prøvene fra inkubasjon i sjøvann er vist i Figur 7. Det nederste kromatogrammet (svart) er testløsningen ved start. Kromatogrammet viser iohexol-toppen ved ca 2,4 og og 2,5 minutter, og toppen for hippursyre ved ca 3,6 minutter. Deretter er det kromatogram

av prøver tatt ut etter 7 dager (blå), 14 dager (rød), 19 dager (brun) og 28 dager (grøn) under inkubasjonsperioden.

Etter 7 dagers inkubasjon begynner en topp med m/z 835,9, som har høyere retensjonstid enn iohexol å utvikle seg, og etter 19 dager starter dannelse av en topp, med masse m/z 747,9, som har kortere retensjonstid enn iohexol. Massen passer med "541".



Figur 7. Analyser fra testløsningen i sjøvann for påvisning av omdanning av iohexol ved start (nederste kurve), og etter hhv. 7, 14, 19, og 28 dager.

3.4 Toksisitet etter nedbrytningsforsøk

3.4.1 Ferskvann

Testløsningen etter nedbrytning ble testet opp til 56 % konsentrasjon på ferskvannsalgen *P. subcapitata*. En marginell, men statistisk signifikant veksthemming på 5-10 % ble observert ved 56 % konsentrasjon. Lavere konsentrasjoner ga ingen veksthemming. Den høyeste konsentrasjonen uten signifikant effekt (NOEC) var 32 %. EC_{50} -verdien kan ikke beregnes.

Vannloppen *D. magna* var betydelig mer følsom enn ferskvannsalgen for testløsningen etter nedbrytning i 39 dager. Etter 48 timer 6 av 21 dyr immobilisert ved 3.2 % konsentrasjon og alle dyrene var immobilisert i uforynnnet prøve. EC_{50} -verdien ble beregnet til 11 %.

3.4.2 Sjøvann

Det ble påvist en svakt økende veksthemming av den marine algen *S. costatum* ved konsentrasjoner over 5.6 %. Hemmingen var imidlertid mindre enn 50 % i uforynnnet prøve og EC_{50} kan derfor ikke beregnes. EC_{10} ble beregnet til 6.4 %. Det betyr at prøven må fortynnes mer enn en faktor 15 for at veksthemmingen skal bli mindre enn 10 %.

Som i ferskvannsprøven var sjøvannsprøven mer toksisk for krepsdyr enn for alger. 78 % av *A. tonsa* døde i løpet av 48 timer i uforynnnet prøve. LC_{50} ble beregnet til 88 %.

4. Diskusjon

I foreliggende undersøkelse er biologisk nedbrytning av iohexol undersøkt med HPLC analyser og analyser av organisk karbon (DOC). Disse to fremgangsmåtene gir supplerende informasjon om hva som skjer med teststoffet iohexol i testsystemene. HPLC-analysene gjør det mulig å påvise om det skjer strukturelle forandringer i iohexol-molekylet og beskrive forekomst av ulike nedbrytningskomponenter i testemediet over tid, som vil si at man kan fastslå om det skjer en primærnedbrytning¹ av iohexol.

Utviklingen av løst organisk karbon (DOC) over tid i testløsningen gir mulighet til å bestemme om det skjer fullstendig nedbrytning av organiske forbindelser. Med fullstendig nedbrytning menes nedbrytning til karbondioksid, vann og mineralsalter (mineralisering) og produksjon av ny biomasse av mikroorganismer. Fordi testene ble utført med to organiske karbonkilder (iohexol og hippursyre) kan graden av mineralisering av iohexol beregnes fra den reduksjon av DOC i mediet som skjer etter at all hippursyre er omsatt.

I en tidligere undersøkelse av Ramstad & Eimhjellen (1985) konkluderte man med at det mest sannsynlige sluttproduktet ved nedbrytning av iohexol er 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyre. I denne undersøkelsen ble det imidlertid ikke påvist 5-amino-2,4,6-triiodo-isoftalsyren med LC-MS-TOF.

HPLC analysene viser at iohexol omvandles tilnærmet fullstendig til nedbrytningsprodukter etter 20-22 dager i ferskvann. En løpende nedbrytning fortsatte under hele resten av testperioden, mens den registrerte forsureningen fant sted. Ut fra resultatene (pkt 3.3.1) ser det ut til at iohexol først oksideres hovedsaklig på primær alkoholene, men også i mindre grad på sekundær alkoholene og i noen grad at en sidekjede mistes. De første nedgraderingsproduktene har et maksimum når iohexol er tilnærmet fullstendig omdannet. Dette er rimelig, fordi "kilden" er brukt opp. Nedbrytningen forsetter ved at de første degraderingsproduktene mister 1-, 2- og tilslutt 3- sidekjedene. Når alle 3 sidekjedene er mistet, mistes også jod. Ved forsøket slutt, var ca 60 % av opprinnelig konsentrasjon av iohexol påvist som forbindelsene med massene m/z 687,9 og m/z 473,9. Vi kan ikke følge denne utviklingen videre, da forsøket ble stanset, men det er ingen grunn til å tro at degraderingen ikke skulle fortsette. Forbindelsen m/z 473, er en liten forbindelse og antas å være enklere å benytte som energikilde for bakterier enn iohexol.

DOC-reduksjonen i forsøket tyder på at det skjedde en mineralisering av ca. 22 % av iohexolen i løpet av 40 døgn i ferskvann

I sjøvann ble slamsuspensjon fra forsøket i ferskvann gradvis akklimatisert til sjøvann (32 ‰) med hippursyre og iohexol som karbonkilde. Dette adapterte inokulum, som inneholdt en bakterieflora som var i stand til å nedbryte iohexol i ferskvann, viste seg ikke å være i stand til fullstendig nedbrytning av iohexol målt som eliminering av DOC innen en 28 dagers periode som testen omfattet. Det ser ut til at degraderingsprosessen, har samme trend som ved ferskvann, hvor primæralkoholene ble oksidert og deretter tap av sidekjedene. Degraderingsprosessen i sjøvann går vesentlig saktere og det er færre toppe som vokser opp. Det er mulig at videre degradering vil skje over tid, så lenge bakteriekulturen lever.

¹ Primærnedbrytning: Strukturell transformering av et stoff som resulterer i tap av en spesifikk egenskap.

Utsåing av testløsningen ved endt forsøk på marin agar 2216 (DIFCO) viste av store mengder levedyktige kim var tilstede.

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 ved hjelp av spesifikke transport- mekanismer. 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 (1985) 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 Iohecol 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 iohecol. 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.

Test med adapterte bakterier har vist at hjelpesubstratet blir omsatt først, før omdannelse av iohecol vil komme i gang. Iohecol omdannes forholdsvis raskt i forsøk utført i ferskvann og det dannes metabolitter som omdannes videre til andre nedbrytningsprodukter. Hvordan økende konsentrasjon av jod forbindelser (tilstandsformer) påvirker omsetningen og den videre nedbrytningen av nedbrytningsproduktene av iohecol er ikke kjent eller undersøkt. Det er grunn til å anta at også nedbrytende mikroorganismer blir hemmet ved så høye konsentrasjoner av jod som i disse forsøkene.

Toksisitetstestene av prøvene etter nedbrytningsforsøket viste lite effekter på alger, men en viss toksisitet på krepsdyr, særlig i ferskvannsprøven.

Utgangskonsentrasjonen av iohecol i nedbrytningsforsøkene var 1 g/l. Toksisiteten av iohecol er tidligere blitt undersøkt på ferskvannsorganismene *P. subcapitata* (tidligere benevnt *Selenastrum capricornutum*) og *D. magna*. Testene ble utført med eksponering opp til konsentrasjonen 3.2 g/l. Det ble ikke funnet noen toksiske effekter på alger eller krepsdyr ved denne konsentrasjonen (Niva testrapporter B095-1, 1994). Den toksisitet som ble funnet i testen med *D. magna* av prøven etter nedbrytning tyder derfor på at det er dannet nedbrytningsprodukter som er mer toksiske enn iohecol.

Fargeforandringen som ble observert i ferskvannsløsningen løsningen tyder på at fri jod var tilstede etter nedbrytning. Dette ble verifisert ved analysene, som viste et innhold av 51 mg/l av fritt iod. Jod kan opptre i forskjellige tilstandsformer i vann. Jodid (I^-), jodat (IO_3^-) og jodin (I_2) regnes som stabile tilstandsformer. Toksisiteten av disse formene av jod for *D. magna* og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er undersøkt av Laverock et al. (1995). Undersøkelsene ble gjort i ulike vanntyper for å vise betydningen av ulike abiotiske faktorer (hardhet og innhold av klorid og organisk karbon) på toksisiteten. **I Feil! Fant ikke referanse kilden.** er resultatene av undersøkelsen sammenstilt. De viser at I^- og I_2 er meget toksisk for *D. magna* med LC_{50} -verdier ned til 0.17 resp. 0.16 mg/l. Konsentrasjonen av fritt iod i ferskvannsmediet ved EC_{50} for *D. magna* (11 %) var 5.6 mg/l. Dette er altså mer enn nok til å forklare den observerte toksisiteten..

Også i sjøvannstesten ble det registrert en svak toksisk effekt på alger og krepsdyr i løsningen etter 28 døgn nedbrytning. Siden det ikke er gjort tester av ren iohecol på de samme organismene er det ikke grunnlag for å si om toksisiteten skyldes iohecol eller nedbrytningsprodukter av iohecol. Analysen av fritt iod i sjøvannsprøven etter nedbrytning viste 1.75 mg/l, mens fritt iod ikke ble

påvist ved starten av forsøket. Dette tyder på at det ble frigjort noe iod også i sjøvannsmidiet, selv om HPLC-analysene ikke tyder på at omdanningen av iohexol-molekylet har gått så langt at iod ble avspaltet. Konsentrasjonen av fritt iod var høy nok til å forklare den svake toksiske effekten som ble observert i sjøvannsmidiet etter nedbrytning. Uansett må toksisiteten i sjøvannsprøven betegnes som lav, siden mindre enn 50 % effekt (veksthemming av alger og dødelighet av krepsdyr) ble registrert i en løsning hvor utgangskonsentrasjonen av iohexol (før nedbrytning) var 1 g/l.

Toksistetstestene tyder ikke på at nedbrytningsprodukter som følge av nedbrytning av iohexol i resipienten vil være en reell fare. Toksiske effekter på sjøvannsorganismer ble bare observert ved konsentrasjoner (iohexol + nedbrytningsprodukter) i størrelsesområdet 0,1-1 g/l. Nedbrytbarhetstesten viser at nedbrytningen i sjøvann går meget langsomt. Iohexol er meget vannløselig, og dersom det slippes ut i en sjøvannsresipient vil det bli fortennet til meget lave konsentrasjoner før nedbrytningsprodukter blir dannet.

Tabell 2. Akutt toksisitet av ulike tilstandsformer av jod i vann rapportert av Laverock et al. (1995).

Tilstandsform	<i>D. magna</i> LC ₅₀ (mg/l)	<i>O. mykiss</i> LC ₅₀ (mg/l)
I ⁻	0.17 – 0.83	860 - 8230
IO ₃ ⁻	10 - 129	220 - 420
I ₂	0.16 – 1.75	0.53 - >10

5. Konklusjoner

Resultatene av undersøkelsen viser at adapterte mikroorganismer kan bryte ned iohexol-molekylet til flere organiske nedbrytningsprodukter. Reduksjonen av DOC i testen i ferskvann viser at noe av det organiske materialet blir fullstendig nedbrutt (mineralisert). Påvisningen av biologisk nedbrytning i ferskvann indikerer at man vil kunne oppnå en delvis fjerning av iohexol ved biologisk rensing av iohexolholdig avløpsvann.

Potensialet for nedbrytning av iohexol i sjøvann ser ut til å være betydelig lavere enn i ferskvann. Dette er i samsvar med den tidligere undersøkelsen. I sjøvannstesten ble bare mindre endringer av molekylstrukturen påvist og det skjedde ingen målbar mineralisering i løpet av 28 dogn.

Iohexol har lav giftighet for vannlevende organismer. Ved nedbrytning i ferskvann ble det dannet komponenter som var mer giftige. Avspaltning av jod kan være forklaringen på økt giftighet. Testløsningen i sjøvann var mindre giftig og det er ikke kjent om toksisiteten skyldes iohexol eller nedbrytningsprodukter.

På bakgrunn av resultatene av nedbrytbarhetstestene kan man anta at nedbrytningen av iohexol som slippes ut i sjøvann vil skje meget langsomt. I en sjøvannsresipient vil betingelsene for nedbrytning være dårligere enn i laboratorietesten i et næringsrikt sjøvannsmidiet som inneholdt et hjelpesubstrat og ble tilført adapterte bakterier. På grunn av iohexolens høye vannløselighet vil det ikke skje en akkumulering i sediment eller organismer, men en gradvis fortykning i vannmassene. Disse forholdene vil ikke fremme adaptasjon av mikroorganismesamfunn som er spesialiserte på nedbrytning av iohexol.

Dersom det ved nedbrytningen dannes fritt jod eller andre toksiske nedbrytningsprodukter vil dette på grunn av den langsomme nedbrytningen skje over et stort område i resipienten, hvor konsentrasjonene av iohexol og eventuelle nedbrytningsprodukter er så lave at toksiske effekter er lite sannsynlige.

Dersom det er behov for et bedre mål på nedbrytningshastigheten av iohexol ved realistiske konsentrasjoner i sjøvann, kan dette undersøkes i en simuleringstest, hvor iohexol settes til naturlig sjøvann i konsentrasjoner som er så lave at en eventuell omsetning av iohexol ikke kan bidra til signifikant vekst av mikroorganismer. Dette innebærer konsentrasjoner i området µg/l (ppb). Dersom det ikke er mulig å kvantifisere innholdet av iohexol ved så lave konsentrasjoner med analytiske metoder kan det benyttes ¹⁴C merket teststoff. Fjerning av ¹⁴C fra testløsningen indikerer mineralisering til ¹⁴CO₂. (ISO 14592-1).

Litteratur

Källqvist, T. 1991: Økotoksikologisk karakterisering av kontrastmiddelrester fra Nycomed AS Lindesnes Fabrikker.

Källqvist, T., Efraimssen, H. og Sætre, T. 2004: Nedbrytning av røntgenkontrastmidler – tester utført med iohexol. NIVA Rapport 4782.

Källqvist, T. 1997: Karakterisering av avløpsvann fra produksjon av røntgenkontrastmidler ved Nycomed Imaging, Lindesnes. NIVA Rapport 3595.

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

Laverock, M.J., Stephenson, M. And Macdonald, C.R. 1995: Toxicity of iodine, iodide and iodate to *Daphnia magna* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination and Toxicity 29, 344-350.

ISO 14592-1, Water Quality – Determination of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

Vedlegg A.

Prøveuttak og analyseprogram for undersøkelsen

Testløsning i ferskvann						
navn på analyse-vial	prøve-uttak	dager	HPLC-DAD	HPLC-MS-TOF	DOC	Toksisitet
Ferskv. start	08.12.2005	0	x	x	x	
Ferskv. 2 dager	10.des	2	x			
Ferskv. 4 dager	12.des	4	x			
Ferskv. 6 dager	14.des	6	x			
Ferskv. 8 dager	16.des	8	x	x	x	
Ferskv. 11 dager	19.des	11	x			
Ferskv. 13 dager	21.des	13	x			
Ferskv. 15 dager	23.des	15	x		x	
Ferskv. 18 dager	26.des	18	x			
Ferskv. 20 dager	28.des	20	x	x		
Ferskv. 22 dager	30.des	22	x	x	x	
Ferskv. 25 dager	02.jan	25	x	x		
Ferskv. 28 dager	05.jan	28	x	x	x	
Ferskv. 34 dager	11.jan	35	x	x		
Ferskv. 39 dager	16.jan	39	x	x	x	x
Kontroll-løsning i ferskvann						
hipp.syre start	08.12.2005	0	x	x	x	
hipp.syre 8 dager	16.des	8	x		x	
hipp.syre 28 dager	05.jan	28	x		x	
Blank inokulum i ferskvann						
Inok. start	08.12.2005	0	x		x	
Inok. 28 dager	05.jan	28	x		x	
Klargjøring av marint miljø til 32 ‰ saltinnhold:						
26 0/00 saltinnhold	30.jan		x			
32 0/00 saltinnhold	30.jan		x			

Prøveuttak og analyseprogram for undersøkelsen.

Testløsning i sjøvann						
marint start	03.02.2006	0	x	x	x	
marint 4 dager	07.feb	4	x			
marint 7 dager	10.feb	7	x		x	
marint 10 dager	13.feb	10	x			
marint 12 dager	15.feb	12	x			
marint 14 dager	17.feb	14	x	x	x	
marint 17 dager	20.feb	17	x			
marint 19 dager	22.feb	19	x			
marint 21 dager	24.feb	21	x	x	x	
marint 24 dager	27.feb	24	x	x		
marint 28 dager	03.mar	28	x	x	x	x
Kontroll-løsning i sjøvann						
hipp.syre marint start	03.feb	0	x	x		
hipp.syre marint 4 dager	07.feb	4	x			
hipp.syre marint 7 dager	10.feb	7	x			
hipp.syre marint 14 dager	17.feb	14	x	x		

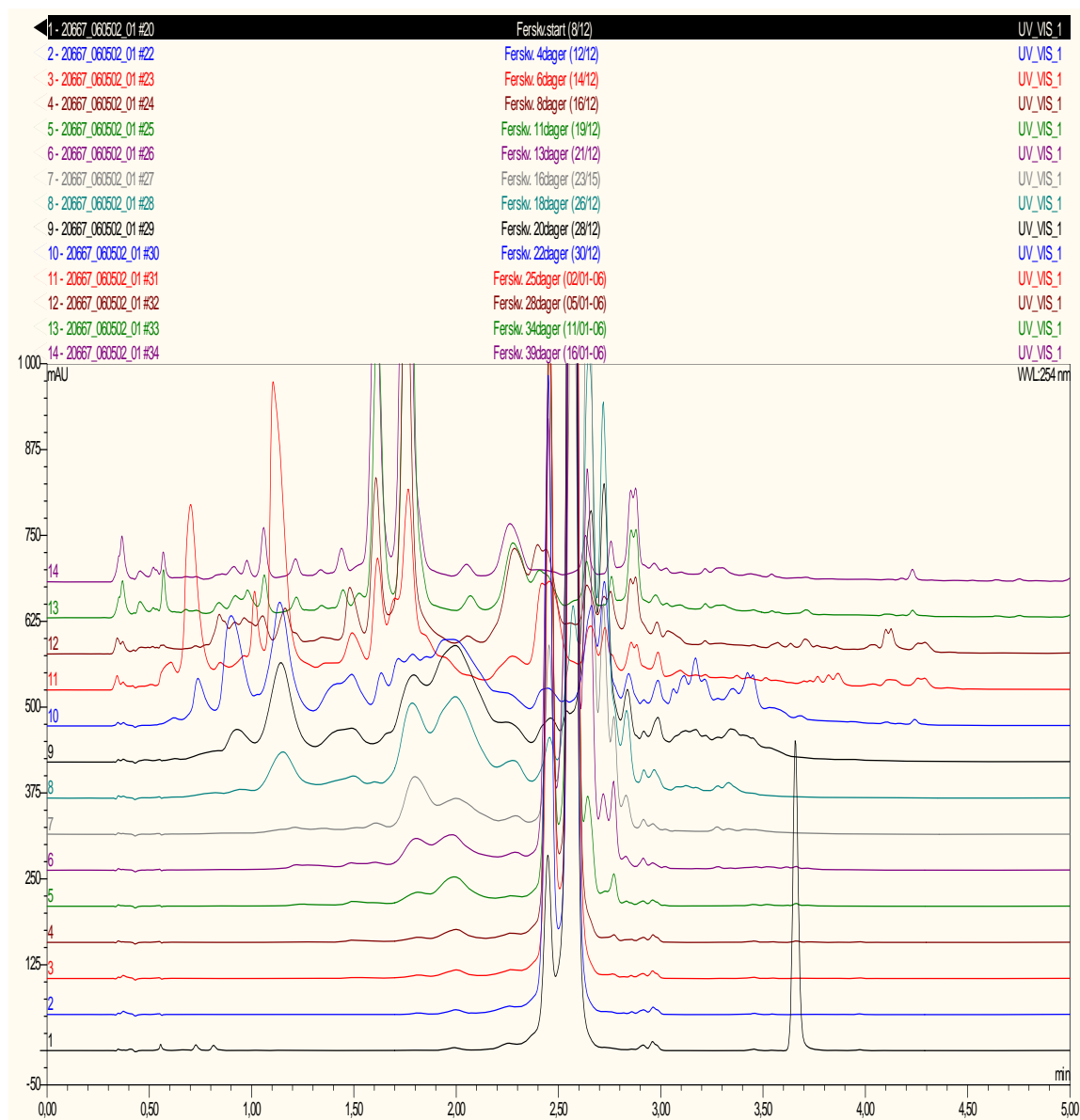
Analyseresultater fra nedbrytbarhetstestene, DOC, løst organisk karbon.

Karbonkilde	iohexol (H) hippursyre (I) DOC mg/l					
	Start	8 (7) dager	14 dager	22 (21) dager	28 dager	39 dager
Ferskvann	398.5	290	377	258	319	217
Hippursyre i ferskvann	120	14	11	10	9	
Inokulum (blank) test	8.7				3.2	
Marint miljø	393	358	286	294	305	
Hippursyre i marint miljø	124	5.8	7.6	7	7	

Tall i parentes henviser til sjøvannstest.

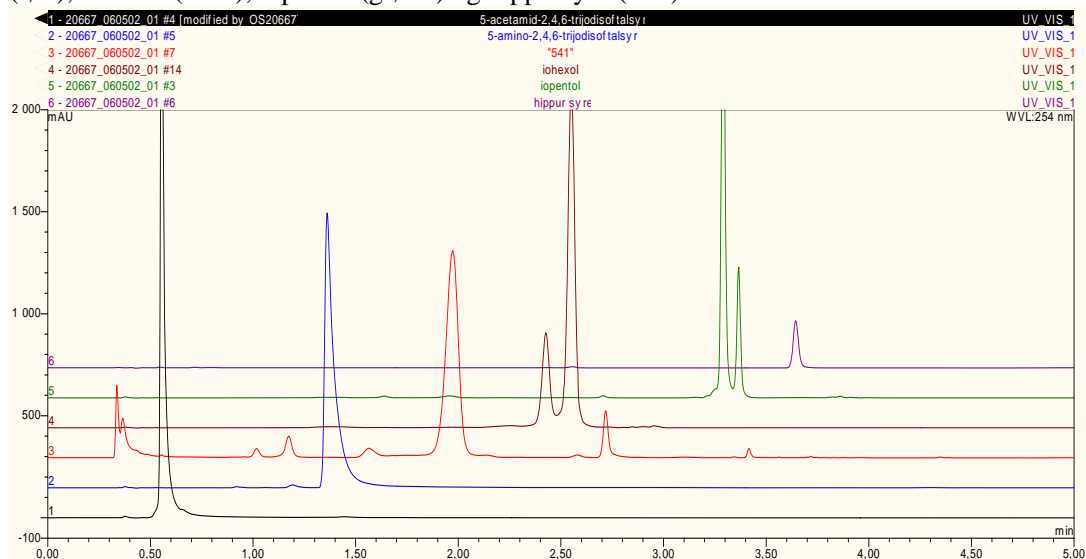
Figur 8. HPLC-kromatogrammer fra analyser av testløsningen i ferskvann

Sammenstilling av kromatogram av alle prøvene fra inkubasjon i ferskvann fra start til og med 39 dager, hvor det nederste kromatogrammet er prøve tatt fra oppstarten, og det øverste kromatogrammet er fra forsøket sine siste dag, etter 39 dager.



Figur 9. Overlay av standardene som ble analysert.

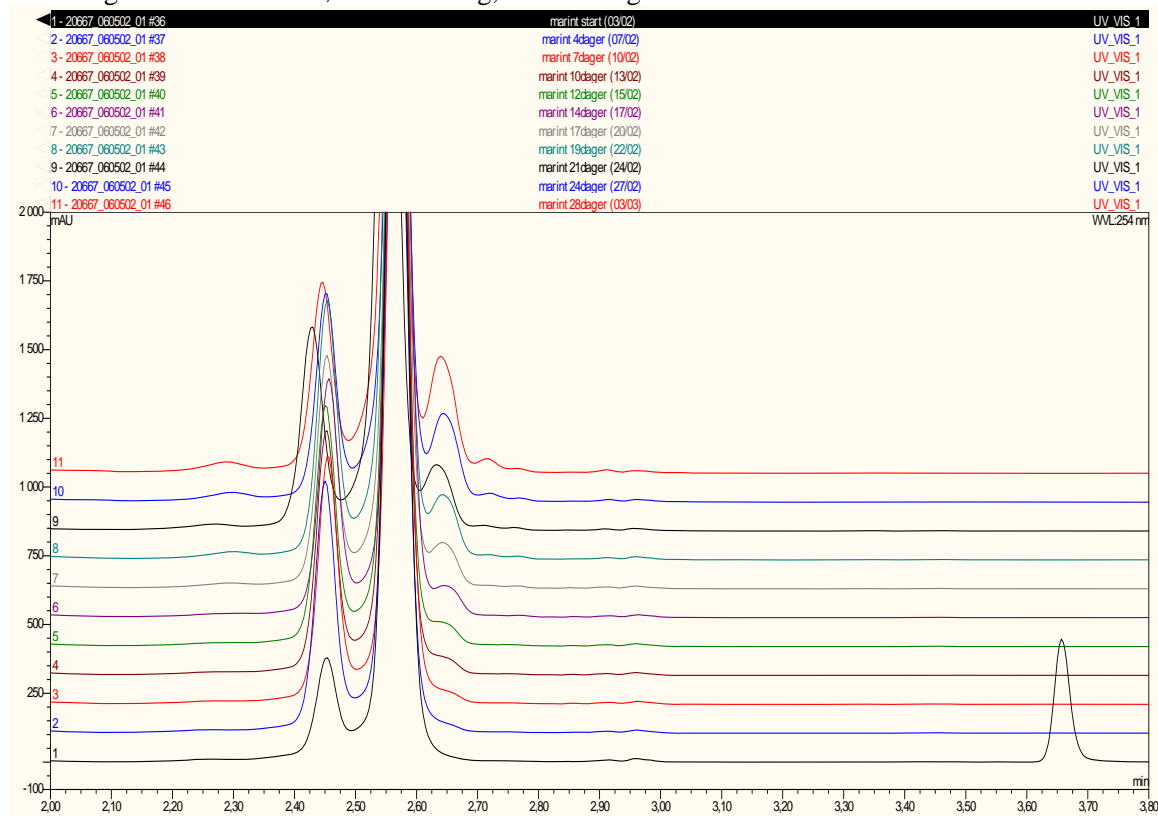
Fra nederst: 5-acetamid-2,4,6-trijodisoftalsyre (svart), 5-amino-2,4,6-trijodisoftalsyre (blå), ”541” (rød), iohexol (brun), iopentol (grønn) og hippursyre (lilla)



<u>Retenjonstidene for standardene:</u>	<u>minutter</u>
Syren 5-acetamid-2,4,6-trijodisoftalsyre	0,533
Syren 5-amino-2,4,6-trijodisoftalsyre	1,360
”541” (iohexol minus en sidekjede)	1,973
iohexol	2,427 og 2,550
iopentol	3,290 og 3,367
hippursyre	3,643

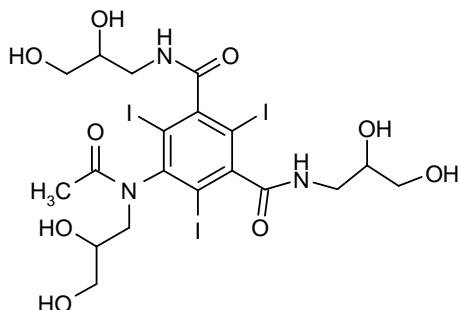
Figur 10. HPLC-kromatogrammer fra analyser av testløsningen i marint miljø

Sammenstilling av kromatogram av alle prøvene fra inkubasjon i marint miljø fra start til og med 28 dager, hvor det nederste kromatogrammet er prøve tatt fra oppstarten, og det øverste kromatogrammet er fra forsøketts siste dag, etter 28 dager.



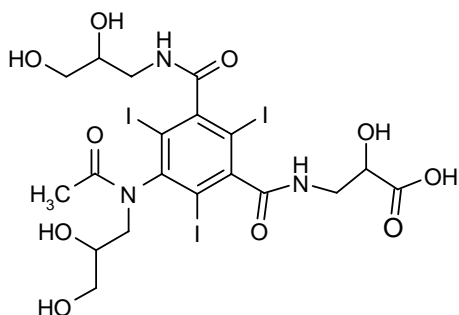
Struktur på iohexol og på noen forslag av degraderingsprodukter:

Iohexol:



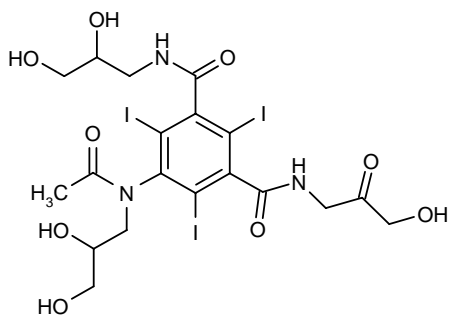
Exact Mass =820.8803
Molecular Formula =C19H26I3N3O9

Oksydering av primær alkohol (3 mulige posisjoner)



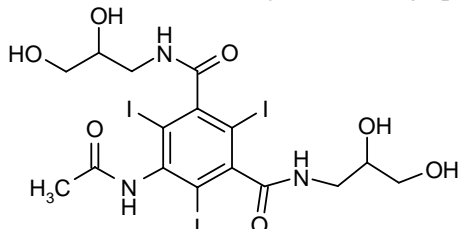
Exact Mass =834.8596
Molecular Formula =C19H24I3N3O10

Oksydering av sekundær alkohol (3 mulige posisjoner)



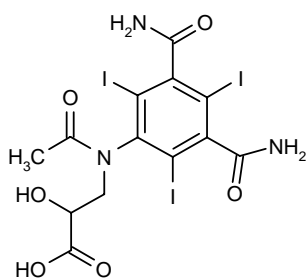
Exact Mass =818.8647
Molecular Formula =C19H24I3N3O9

Iohexol minus en sidekjede (3 mulige posisjoner)



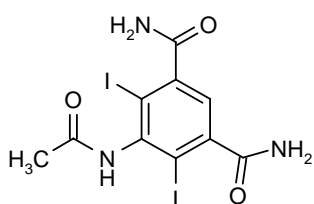
Exact Mass =746.8435
Molecular Formula =C16H20I3N3O7

Iohexol oksidert på 1 primær alkohol og mistet 2 sidekæder



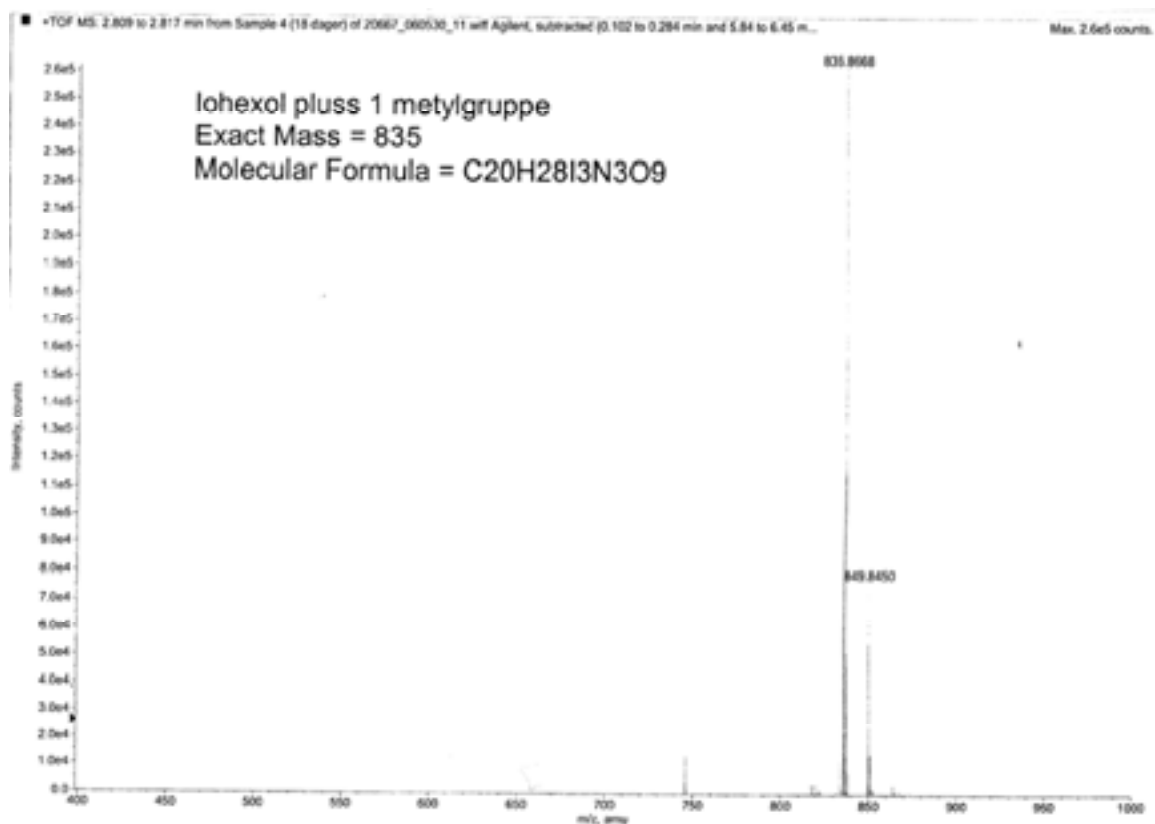
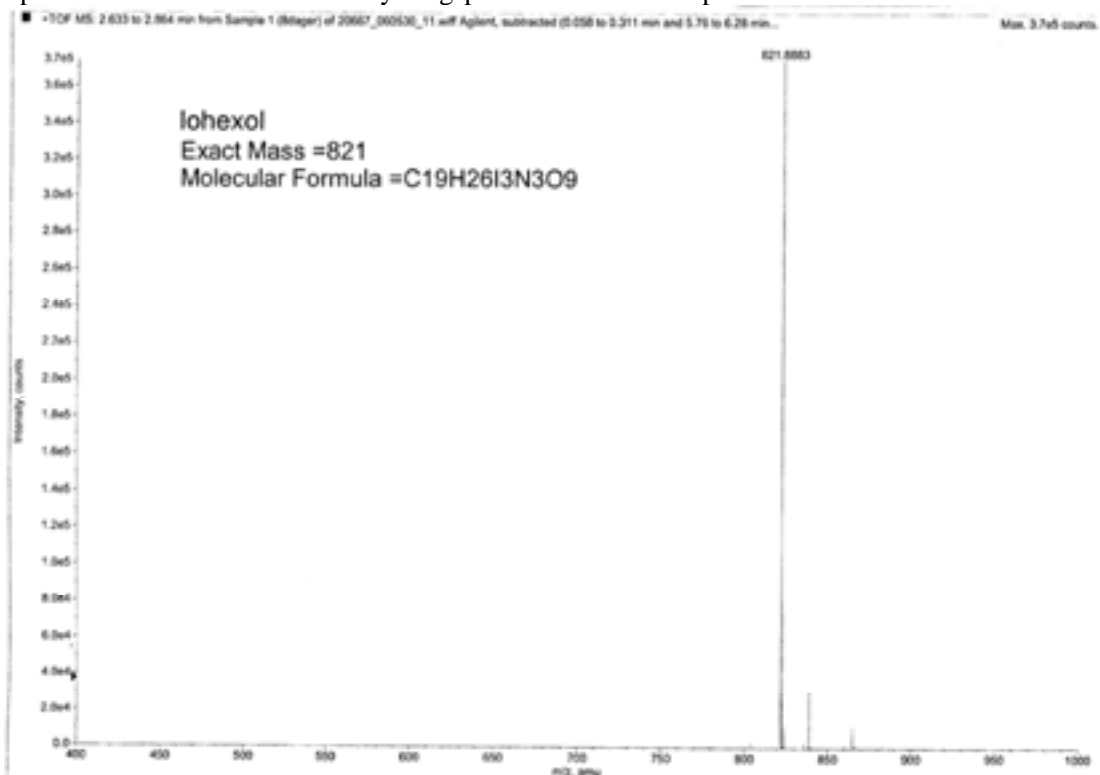
Exact Mass =686.7860
Molecular Formula =C₁₃H₁₂I₃N₃O₆

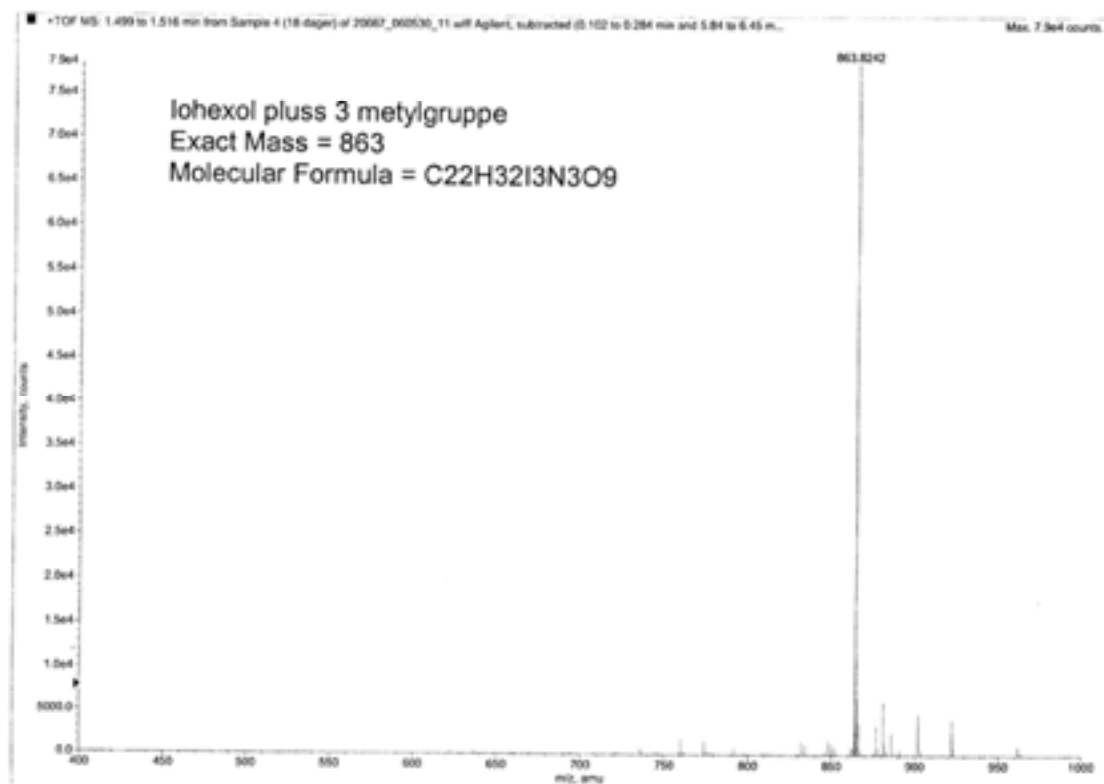
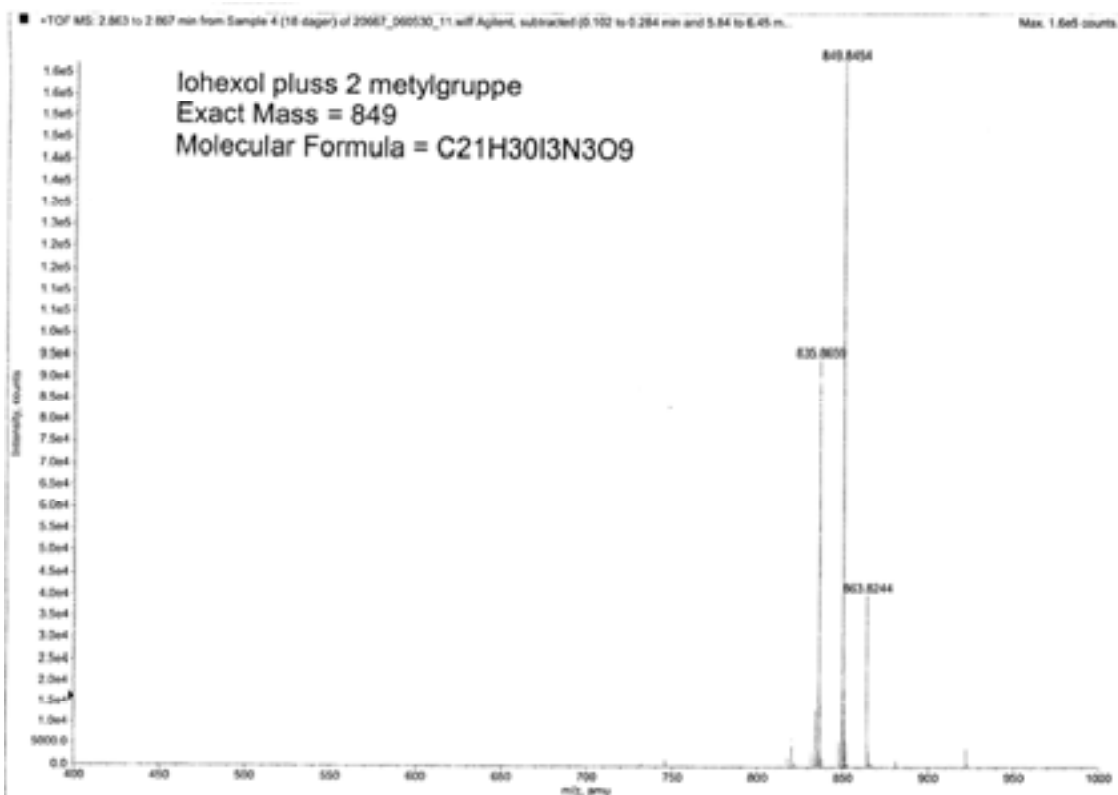
Iohexol minus 3 sidegrupper og minus 1 jod:

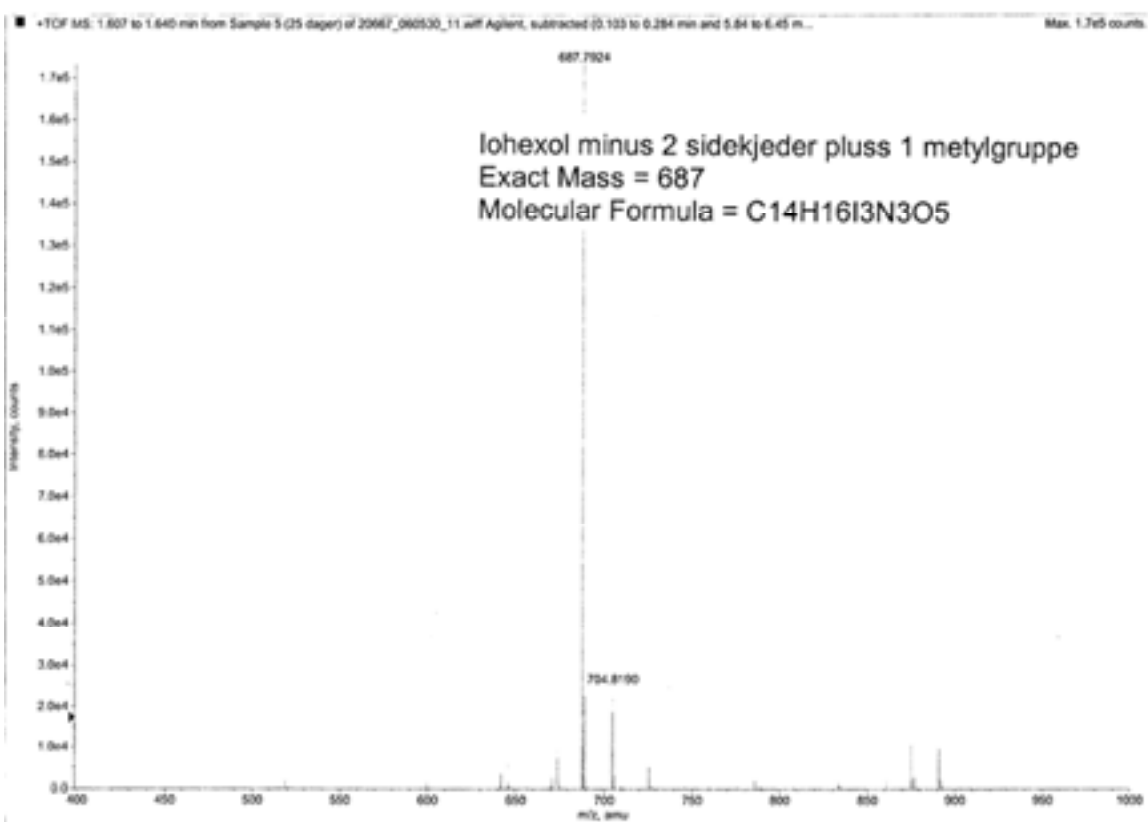
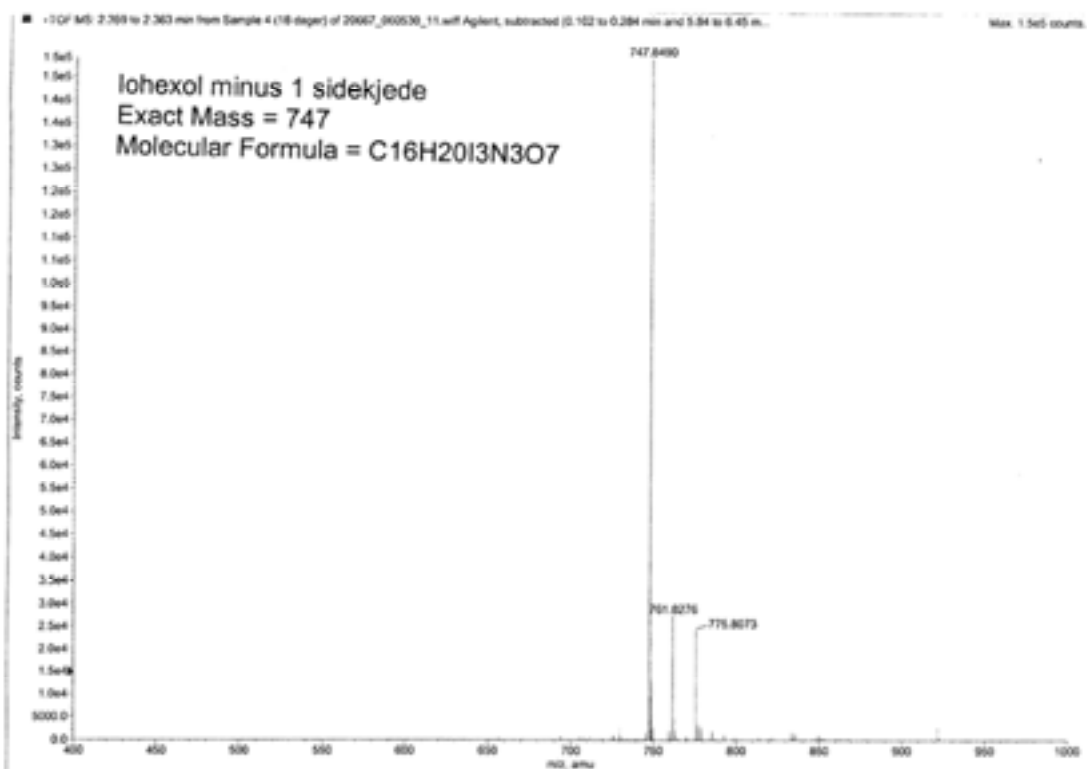


Exact Mass =472.8733
Molecular Formula =C₁₀H₉I₂N₃O₃

Spekter av de dominerende nedbrytningsproduktene / mellomproduktene







Vedlegg B

Testrapporter – toksisitet



Norsk Institutt
for Vannforskning
Postboks 173
Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TESTRAPPORT

Alger, veksthemmingstest

Pseudokirchneriella *subcapitata*

NIVA metode K4



Teststoff: Iohexol-løsning etter nedbrytning
Kunde: GE Healthcare

Testmetode: ISO 8692: Alga growth inhibition test
Organisme: *Pseudokirchneriella subcapitata* NIVA CHL1
Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur: Semi-kontinuerlig i 10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato: 23.01.06
Konsentrasjoner: 1, .8, 3.2, 5.6, 10, 18, 32 og 56 %
Test medium: ISO 8692
Forbehandling av prøve:
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys: 80 mE m⁻² s⁻¹, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffør
Temperatur: 20.4 – 21.3 °C
pH i kontroll Start : 7.8 Slutt: 7,9
pH i høyeste konsentrasjon Start : 7,0 Slutt: 7,0
Vekstmåling: Partikkeltelling med Coulter Multisizer
Beregning av EC_x *
Beregning av NOEC Dunnett's test

Resultater: Celletetthet på hvert målepunkt, det beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middelerverdier for kontroller og ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1.

Parameter	Enhet	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	%	> 56	-	0	-	32

* EC_x = Den konsentrasjon som gir X% reduksjon av veksthastighet i forhold til kontrollkulturer

Kommentar Svak men signifikant veksthemming ble observert ved den høyeste testkonsentrasjonen (56 %)

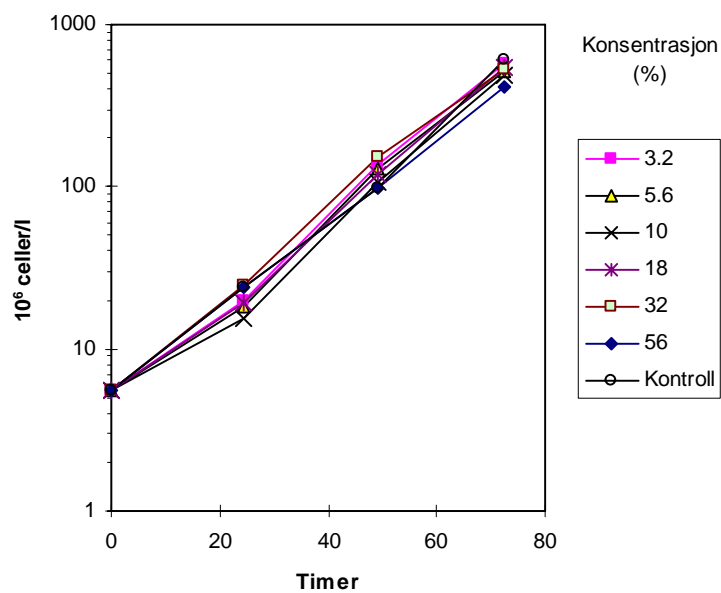


Fig. 1. Vekstkurver for *Pseudokirchneriella subcapitata* i ulike konsentrasjoner (%) av Iohexol-løsning etter nedbrytning

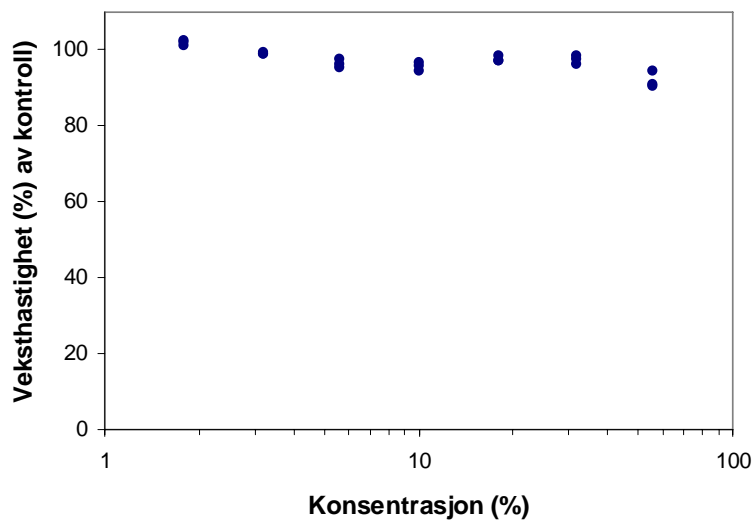


Fig. 2. Effekt av Iohexol-løsning etter nedbrytning på veksthastigheten til *Pseudokirchneriella subcapitata*

Oslo, 26.01.2006

Randi Romstad
Testansvarlig

Referanser:

ISO/DIS 8692 : Water quality - Algal growth inhibition test

OECD 1984: Guidelines for testing of chemicals, no. 201; Alga, growth inhibition test. OECD, Paris

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

Kons. (%)	Timer: %	start	dag 1	dag 2	dag 3	V.hast	V.hast %	pH	
		0 mill/l	24,5 mill/l	49 mill/l	72,5 mill./l			start	slutt
1,8	"	5.5	23,0	144	675	1,59	102	7.79	7.83
1,8	"	5.5	21,0	128	639	1,57	101		
1,8	"	5.5	20,0	140	665	1,59	102		
3,2	"	5.5	17,0	125	573	1,54	99	7.68	7.75
3,2	"	5.5	22,0	145	574	1,54	99		
3,2	"	5.5	20,0	135	585	1,54	99		
5,6	"	5.5	17,0	120	487	1,48	95	7.64	7.62
5,6	"	5.5	22,0	141	544	1,52	98		
5,6	"	5.5	16,0	122	511	1,50	96		
10	"	5.5	14,0	97	468	1,47	94	7.51	7.49
10	"	5.5	16,0	109	496	1,49	96		
10	"	5.5	16,0	116	518	1,50	97		
18	"	5.5	22,0	131	531	1,51	97	7.38	7.31
18	"	5.5	19,0	119	533	1,51	97		
18	"	5.5	17,0	112	567	1,53	99		
32	"	5.5	25,0	128	559	1,53	98	7.23	7.14
32	"	5.5	24,0	120	509	1,50	96		
32	"	5.5	25,0	212	537	1,52	97		
56	"	5.5	23,0	87	384	1,41	90	7.01	7.04
56	"	5.5	25,0	105	469	1,47	95		
56	"	5.5	24,0	99	391	1,41	91		
Kontroll		5.5	27,0	131	782	1,64	105	7.83	7.85
		5.5	25,0	111	648	1,58	101		
		5.5	25,0	121	685	1,60	103		
		5.5	23,0	78	570	1,54	99		
		5.5	21,0	78	504	1,50	96		

Middelverdier

1,8 %	Mv.	5.5	21,33	137,33	659,67	1,58	101,78		
	St. d.		1,53	8,33	18,58	0,01	0,60		
3,2 %	Mv.	5.5	19,67	135,00	577,33	1,54	98,95		
	St. d.		2,52	10,00	6,66	0,00	0,24		
5,6 %	Mv.	5.5	18,33	127,67	514,00	1,50	96,46		
	St. d.		3,21	11,59	28,62	0,02	1,18		
10 %	Mv.	5.5	15,33	107,33	494,00	1,49	95,62		
	St. d.		1,15	9,61	25,06	0,02	1,08		
18 %	Mv.	5.5	19,33	120,67	543,67	1,52	97,67		
	St. d.		2,52	9,61	20,23	0,01	0,78		
32 %	Mv.	5.5	24,67	153,33	535,00	1,52	97,32		
	St. d.		0,58	50,96	25,06	0,02	1,00		
56 %	Mv.	5.5	24,00	97,00	414,67	1,43	91,83		
	St. d.		1,00	9,17	47,18	0,04	2,35		
kontroll	Mv.	5.5	23,67	97,33	614,67	1,56	100,00		
	St. d.		2,42	27,10	111,07	0,06	3,80		
Coefficient of variation in controls (%)						20,37			



Norsk institutt
for vannforskning
Postboks 173
Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TESTRAPPORT

Akutt toksisitet *Daphnia magna*

NIVA metode K9



Teststoff: Iohexol-løsning etter nedbrytning
Kunde: GE Healthcare

Testmetode ISO 6341, "Water Quality - Determination of the inhibition of the motility of *Daphnia magna*" Metoden er i samsvar med OECD Guideline 202; "Daphnia sp. acute immobilization test"

Testorganisme *Daphnia magna*, stamme A. Vedlikeholdt i Elendt M7 og foret med *Pseudokirchneriella subcapitata* som er dyrket i 10% Z8 nærings saltløsning. Alder ved teststart < 24 timer.

Testperiode 17.01.06 – 19.01.06 og 23.01.06 – 26.01.06

Forbehandling av prøve Tilsatt ISO 6341 medium

Fortynningsmedium ISO 6341

Testkonsentrasjoner 3,2, 5,6, 10, 18, 32, 56 og 100%

Antall enheter 4 kar for hver konsentrasjon, med 5-7 dyr pr. kar.

Testbeholdere 50 ml polystyren begere med ca. 40 ml medium

Temperatur 20,3 – 20,4°C

pH i kontroll Start: 7,9 Slutt: 7,9

pH i høyeste kons. Start: 7,7 Slutt: 7,8

Oksygenmetning, 48 t Kontroll: 9,1 mg/l Høyeste konsentrasjon 100%: 9,1 mg/l

Beregning av EC₅₀ * Probit (Statens Naturvårdsverk)

Resultater:

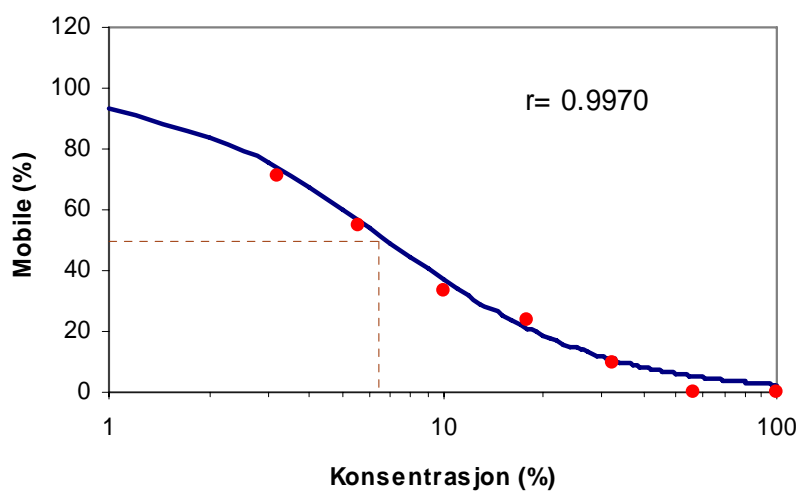
Parameter	Enhet	24 timer			48 timer		
		EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀
Immobilisering	%	33	-	<1	11	5.6 - 19	<1

*EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% immobilisering av forsøksdyrene.

Observerte immobiliserte *Daphnia magna* etter 24 og 48 timer i kontroller og ulike konsentrasjoner av Iohexol etter nedbrytning.

Konsentrasjon	Antall dyr	Immobiliserte 24 tim.	Immobiliserte 48 tim.
3,2 %	21	1	6
5,6 %	20	6	9
10 %	21	10	14
18 %	21	7	16
32 %	20	12	18
56 %	20	15	20
100 %	21	20	21
Kontroll	44	0	2

Fig. 1. Effekt av Iohexol etter nedbrytning, på overlevelse (mobilitet) av *Daphnia magna* etter 48 timer



Oslo, 26.01.06

Utført av: Randi Romstad

Baird, D. J. et al, 1991, *A Comparative Study of Genotype Sensitivity to Acute Toxic Stress Using Clones of Daphnia magna* Strauss, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257 - 265.

Staub, R., 1961, *Ernährungsphysiologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge Oscillatoria rubescens*, D. C., Schweiz, Z., *Hydrol*, 23, 82-198.

Elendt, B.-P. 1990, *Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna* Strauss. *Protoplasma*, 154, 25-33.



Norsk Institutt
for Vannforskning
Postboks 173
Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TESTRAPPORT

Veksthemming marine alger

Skeletonema costatum

NIVA metode K6



Teststoff: Iohexol-løsning etter nedbrytning
Kunde: GE Healthcare

Testbetingelser

Testmetode: ISO 10253: Marine algal growth inhibition test
Organisme: *Skeletonema costatum* NIVA BAC1
Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur: Semi-kontinuerlig i nat. sjøvann +10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato: 14.03.2006
Konsentrasjoner: 3.2, 5.6, 10, 18, 32 56 og 100 %
Test medium: ISO 10253 i naturlig sjøvann fra 60 m dyp, Oslofjorden. S = 35 ‰
Forbehandling av prøve: Prøven ble oppbevart i kjøleskap til teststart og filtrert gjennom GF/C glassfiberfilter
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys: Ca. 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur: 20.3 – 21.3 °C
pH i kontroll: Start : 8.1, Slutt: 9.0
pH i høyeste konsentrasjon: Start : 7.2, Slutt: 7.4
Vekstmåling: Partikkeltelling med Coulter Multisizer
Beregning av EC₅₀ * Ikke lineær regresjon (logistic model)
Beregning av NOEC ** Dunnett's test (p<0.05)

* EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

** NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Resultater Celletetthet på hvert målepunkt, det beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middelerverdier for kontroller og ved ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1. Dose/responskurven for effekt på veksthastighet er vist i fig. 2.

Parameter	Konsentrasjon	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₁₀	NOEC
Veksthastighet	%	>100	22	6.4	5.6

Kommentar Det ble observert svak, økende veksthemming ved konsentrasjoner over 5.6 %. Ved 100 % konsentrasjon var veksthemmingen ca. 35 %.

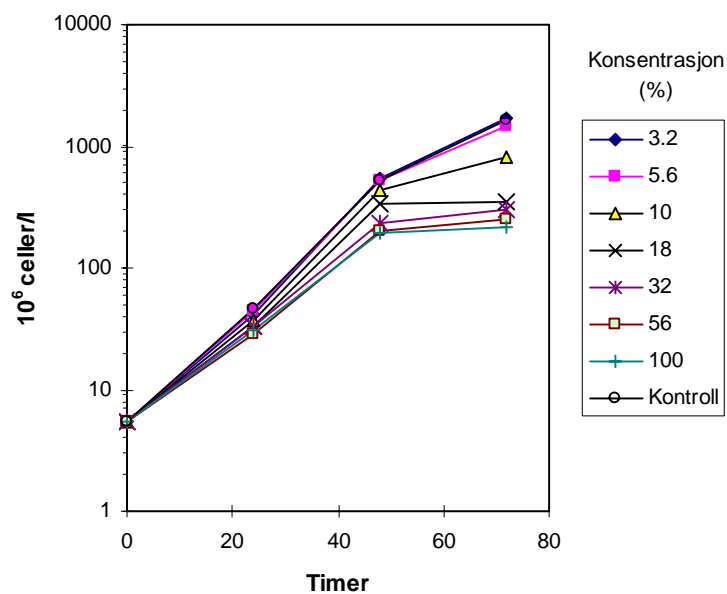


Fig. 1. Vekstkurver for *Skeletonema costatum* ved ulike konsentrasjoner av iohexol-løsning etter nedbrytning.

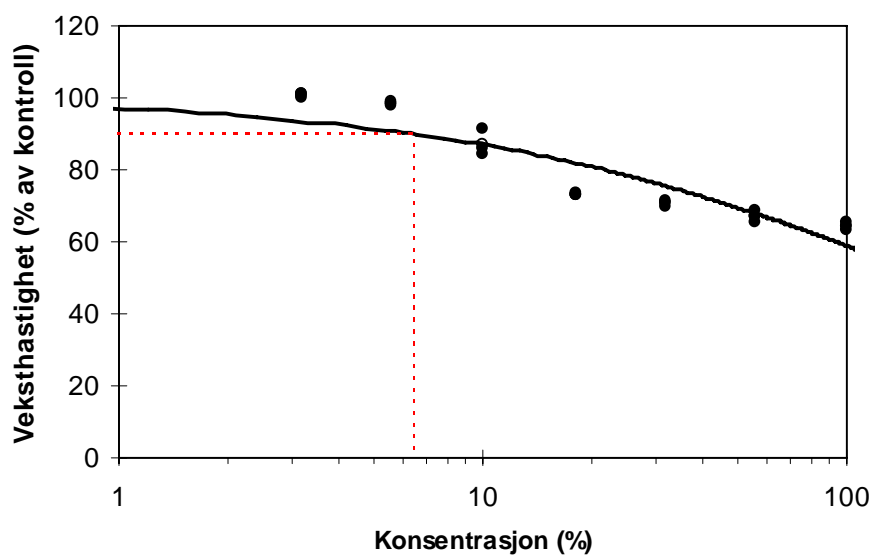


Fig. 2. Effekt av iohexol-løsning etter nedbrytning på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.

Oslo, 03.04.2006

Utført av: Randi Romstad

Kons.	Timer: %	Start	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Veksthast. d ⁻¹	Veksthast. % av kontr.	pH	
		0	24	48	72			Start	Slutt
		mill/l	mill/l	mill/l	mill/l				
3.2	"	5	40	476	1738	1.92	101	8.1	9.0
3.2	"	5	43	587	1713	1.91	101		
3.2	"	5	42	552	1619	1.89	100		
5.6	"	5	46	541	1435	1.85	98	8.1	9.0
5.6	"	5	40	487	1498	1.87	98		
5.6	"	5	48	572	1529	1.88	99		
10	"	5	38	470	744	1.64	86	8.0	8.5
10	"	5	36	423	675	1.60	84		
10	"	5	38	402	990	1.73	91		
18	"	5	32	307	352	1.39	73	8.0	8.1
18	"	5	33	343	358	1.39	73		
18	"	5	35	346	350	1.38	73		
32	"	5	34	225	289	1.32	70	7.8	8.0
32	"	5	32	251	321	1.36	71		
32	"	5	32	230	310	1.34	71		
56	"	5	30	193	253	1.28	67	7.6	7.8
56	"	5	28	199	273	1.30	69		
56	"	5	29	203	225	1.24	65		
100	"	5	31	190	229	1.24	65	7.2	7.4
100	"	5	29	194	200	1.20	63		
100	"	5	32	199	214	1.22	64		
Kontroll		5	41	449	1441	1.86	98	8,1	9.0
		5	44	536	1600	1.89	100		
		5	45	446	1588	1.89	99		
		5	52	533	1890	1.95	103		
		5	44	555	1580	1.89	99		
		5	47	592	1751	1.92	101		

MIDDELVERDIER

3.2 %	Mv.	41.67	538.33	1690.00	1.91	100.57		
	St. av.	1.53	56.75	62.75	0.01	0.66		
5.6 %	Mv.	44.67	533.33	1487.33	1.87	98.33		
	St. av.	4.16	43.02	47.90	0.01	0.57		
10 %	Mv.	37.33	431.67	803.00	1.66	87.27		
	St. av.	1.15	34.82	165.58	0.07	3.50		
18 %	Mv.	33.33	332.00	353.33	1.39	73.09		
	St. av.	1.53	21.70	4.16	0.00	0.21		
32 %	Mv.	32.67	235.33	306.67	1.34	70.59		
	St. av.	1.15	13.80	16.26	0.02	0.94		
56 %	Mv.	29.00	198.33	250.33	1.27	66.99		
	St. av.	1.00	5.03	24.11	0.03	1.71		
100 %	Mv.	30.67	194.33	214.33	1.22	64.29		
	St. av.	1.53	4.51	14.50	0.02	1.19		
Kontroll	Mv.	45.50	518.50	1641.67	1.90	100.00		
	St. av.	3.73	58.89	156.40	0.03	1.65		

Referanser:

ISO/DIS 10253 : Water quality - Marine algal growth inhibition test

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



Norsk institutt
for vannforskning
Postboks 173
Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TESTRAPPORT

Akutt toksisitet

Acartia tonsa

NIVA metode K13



Teststoff: Iohexol-løsning etter nedbrytning i sjøvann
Kunde: GE Healthcare

Test metode ISO 14669 Water-Quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)

Test organisme *Acartia tonsa*, Opprinnelse: DHI, Danmark. Stamkultur i naturlig sjøvann, med *Rhodomonas baltica* som fôr

Utviklingsstadium Copepode, alder 17-30 døgn

Testperiode 28-30.04. 2006

Fortynningsvann Sjøvann fra m dyp i Oslofjorden ved Solbergstrand. Saliniteten justert til 32 ‰

Testkonsentrasjoner 32, 56 og 100 % av vannprøve

Antall enheter 4.kar for hver konsentrasjon med 5-8 dyr pr. kar.

Testbeholdere 50 ml polystyren begere

Temperatur 20° C

pH in kontroll Start: 8.0 End: 8.1

pH at highest conc. Start: 7.7 End: 7.3

Oksygenmetning 48 t Kontroll: 94 % Høyeste konsentrasjon: 89 %

Beregning av LC₅₀* Probit analyse (SNV Probit)

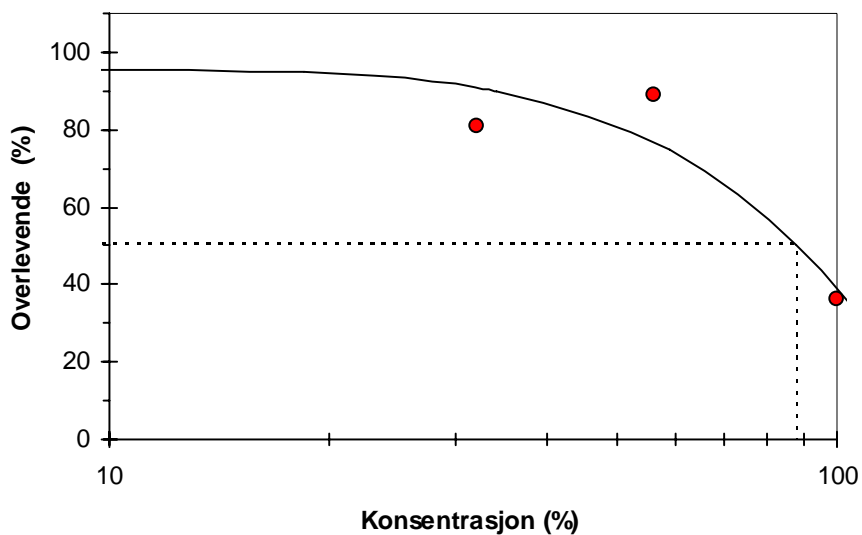
Resultater

Tid	Enhet	LC ₅₀	95% Konf. int.	LC ₁₀	0% Effekt	100% Effekt
48 t	%	88	-	33	>32	>100

* LC₅₀ = Konstruksjonskonsentrasjon som gir 50% dødelighet av testorganismer.

Tabell 1. Observert dødelighet av *Acartia tonsa* etter 24 og 48 timer

Konsentrasjon	Antall dyr	Antall døde 24 timer	Antall døde 48 timer
32 %	26	1	5 (19 %)
56 %	27	0	3 (11 %)
100 %	28	6	16 (78 %)
Kontroll	79	0	1 (<1 %)



Utført av: Åse Bakketun