

AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK MET DE  
OECD-SCREENINGSTEST;

=====

CA-79-11

Reinier van den Berg, Jos Buntsma-  
Hamers en Balte Verboom.

CA 79-11

# RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 — Postbus 68 — IJmuiden — Tel. (02550) 1 91 31

Afdeling: CHEMISCH ONDERZOEK

Rapport: AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK MET DE  
OECD-SCREENINGSTEST;

=====  
CA-79-11

Auteur: Reinier van den Berg, Jos Buntsma-  
Hamers en Balte Verboom.

Project: 2-7124 - Afbreekbaarheidsonderzoek.

Projectleider: Ir. R. van den Berg

Datum van verschijnen: November 1979

Inhoud: I Samenvatting  
II Inleiding  
III Methoden  
IV Analyses  
V Resultaten  
VI Conclusies  
Tabellen  
Figuren

**DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE  
DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.**

2292702

## AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK MET DE OECD-SCREENINGSTEST.

=====

### I. SAMENVATTING

In een ringonderzoek van de gemodificeerde OECD afbreekbaarheids-test is para-chloorfenol als goed afbreekbaar gevonden. Para-nitrofenol en nitrobenzeen zijn in dit onderzoek als persistent beoordeeld. De test die op enkele punten gewijzigd is voldoet goed als "screenings"test, maar kan zeker op een paar punten nog geoptimaliseerd worden. Met name het invoeren van een toxiciteitsproef is essentieel.

### II. INLEIDING.

De Werkgroep "Bacteriën-bioafbreekbaarheid" van de NNI commissie 311 147 05 besloot op haar bijeenkomst van 7 mei 1979 tot een vergelijkend onderzoek tussen diverse laboratoria naar de afbreekbaarheid in water voor een aantal chemicaliën.

Doel van de Werkgroep is te komen tot een voorstel voor een normvoorschrift van een "screening"afbreekbaarheidsmeetmethode. Tijdens de vergadering werd besloten in eerste instantie de gemodificeerde OECD "screenings"methode als testmethode te nemen, mede gezien de ringtesten met deze methode door de OECD en de EEG. Op het testvoorschrift van de OECD werden enkele wijzigingen aangebracht om de test wat beter geschikt te maken:

- de teststofconcentratie wordt verhoogd om de nauwkeurigheid van de DOC analyse te verhogen,
- het N-gehalte van het medium wordt verhoogd om een optimale N-voorziening te krijgen,
- in plaats van Fe-chelaat wordt EDTA toegepast,
- in plaats van de vitamine-oplossing wordt gistextract gebruikt (bij de hier beschreven proeven werd ook nog extra pepton toegevoegd),
- als goed afbreekbare standaard wordt natriumacetaat voorgeschreven; een "harde" standaard wordt niet meegenomen in de eerste testserie,
- in plaats van 1 l. testvolume 100-200 ml testvolume,
- incubatietemperaturen:  $298 \pm 1^{\circ}\text{K}$  en  $281 \pm 2^{\circ}\text{K}$ , waarvan de laatste een meer milieu relevante temperatuur is,
- ent: effluent van een goed werkende huishoudelijk-afvalwaterzuiveringsinstallatie ( $\text{BOD}_{20}^5$  10-20 mg/l),
- er wordt een toxiciteitsproef ingevoerd waarbij een eventuele remming door de teststof van de afbraak van natriumacetaat wordt onderzocht,
- gedurende de 19 dagen looptijd worden in totaal 10 in plaats van minimaal 4 monsters genomen.

Op zich lijken dit erg veel veranderingen, maar wezenlijk zijn alleen de verhoging van de teststofconcentratie, het invoeren van een toxiciteitstest en een tweede lagere temperatuur.

Als teststoffen werden voor de eerste serie para-nitrofenol, para-chloorfenol en nitrobenzeen gekozen.

III. METHODEN

Aan 180 ml gedemineraliseerd water werd 0,2 ml van elk van de volgende oplossingen A t/m D toegevoegd:

A. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,850 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,175 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,34 g
demiwater	100 ml
B. $\text{NH}_4\text{Cl}$	2,5 g
$\text{CaCl}_2$	2,75 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25 mg
EDTA	38,5 mg
demiwater	100 ml
C. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,25 g
demiwater	100 ml
D. $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	57,2 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	34,7 mg
gistextract	100 mg
pepton	100 mg
demiwater	1000 ml

Daarna werden volgens onderstaand schema de volgende oplossingen toegevoegd aan de bovenstaand verkregen oplossingen:

1. p-chloorfenol	86	mg/100 ml demi
2. p-nitrofenol	110	mg/100 ml demi
3. nitrobenzeen	26	mg/100 ml demi
4. natriumacetaat	51	mg/100 ml demi
5. natriumacetaat	510	mg/100 ml demi

Kolf	ml toegevoegd aan 180.8 ml medium						
	opl. 1	opl. 2	opl. 3	opl. 4	opl. 5	demi	ent
1 A/B	4.2					15.8	
2 A/B	4.2					15.8	2.0
3 A/B	4.2				2.0	15.8	2.0
4 A/B		5.3				14.7	
5 A/B		5.3				14.7	2.0
6 A/B		5.3			2.0	14.7	2.0
7 A/B			20				
8 A/B			20				2.0
9 A/B			20		2.0		2.0
10 A/B				20			
11 A/B				20			2.0
12 A/B						20.0	2.0

De aldus verkregen oplossingen werden gesteriliseerd bij  $121^\circ\text{C}$ , 2 atm. gedurende 20 min.

Na het steriliseren werden de erlenmeijers geënt met 2 ml van het effluent van de huishoudelijkafvalwaterzuiveringsinstallatie te Beverwijk, nadat het 1 uur ter bezinking was laten staan.



In het schema staat aangegeven welke kolven geënt werden. De proef werd in duplo uitgevoerd. Van de ent en alle kolven werden t = 0 monsters (ongeveer 5 ml) genomen. Daarna werd op een schudmachine bij een temperatuur van  $298 \pm 1^{\circ}\text{K}$  en een schudsnelheid van 200 rpm in het donker geïncubeerd.

De volgende bemonsteringen werden na 1, 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15 en 19 dagen uitgevoerd. De monsters werden direct ingevroren. Na ontdooien werden de monsters als volgt behandeld, afhankelijk van de uit te voeren analyse:

- 1 ml behandelen met 0.1 ml 0.1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en  $\text{CO}_2$  uitblazen door gedurende 30 sec stikstof door te blazen; centrifugeren bij 15.000 rpm; supernatant analyseren op de hoeveelheid opgelost organisch koolstof (DOC),
- 1 ml behandelen met 0.1 ml 0.1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; centrifugeren bij 15.000 rpm; het supernatant analyseren op p-chloorfenol (monsters van de 1, 2 en 3 serie),
- ruim 1 ml direct centrifugeren bij 15.000 rpm en het supernatant analyseren op p-nitrofenol (monsters van de 4, 5 en 6 serie).

#### IV. ANALYSES

- DOC analyse met behulp van de Beckman Total Organic Carbon analyzer. Gedecarboniseerde monsters worden geanalyseerd via het totaal kanaal. Injectievolume 20  $\mu\text{l}$ .  
Standaardoplossing: 25  $\text{g}/\text{m}^3$  kaliumbiftalaat.  
Nauwkeurigheid: 0,2-0,5  $\text{g}/\text{m}^3$
- p-chloorfenol analyse volgens de aminä antipyrine methode (fotometrisch). Voor grotere volumina beschreven in de Standard Methods. Monstervolume: 0.5 ml  
Standaard: ijkreeks van 0 tot 50  $\text{g}/\text{m}^3$   
Nauwkeurigheid: 0,1-0,2  $\text{g}/\text{m}^3$
- p-nitrofenol analyse: fotometrische analyse van het p-nitrofenolaat ion in alkalisch milieu.  
Monstervolume: 0,5 ml. Standaard: ijkreeks van 0 tot 20  $\text{g}/\text{m}^3$ .  
Nauwkeurigheid: 0,02-0,05  $\text{g}/\text{m}^3$ .

#### V. RESULTATEN

De resultaten van de afbreekbaarheidstesten met p-chloorfenol, p-nitrofenol nitrobenzeen en natriumacetaat zijn weergegeven in de tabellen I, II en III. Gegeven zijn de DOC analyseresultaten en voor p-chloorfenol en p-nitrofenol ook de resultaten van de stofspecifieke analyses. De afbraakpercentages per dag zijn niet gegeven in verband met de variaties in de DOC gehalten.

De figuren 1 t/m 4 geven de voor de blanco gecorrigeerde DOC-afbraakcurves te zien van de verschillende teststoffen. Verder is in figuur 2 ook de stofspecifieke afbraakcurve van p-chloorfenol weergegeven.

Uit de figuren en de tabellen blijkt dat om onbekende reden bij de toxiciteitsproeven niet de normale extra hoeveelheid natriumacetaat van ongeveer 15  $\text{g}/\text{m}^3$  C aanwezig was.

In het algemeen nemen de concentraties aan DOC en de specifieke stof toe in de tijd als er geen afbraak plaatsvindt; dit als gevolg van verdamping van water, waarvoor niet gecompenseerd werd.

= natriumacetaat

Deze stof moet goed afbreekbaar zijn en dient alleen als "zachte" standaard en controle voor de toxiciteitstesten. De afbraak begint direct en is binnen 6 dagen 100 %. Karakteristieken van de afbraak zijn in tabel IV gegeven.

= para-chloorfenol

Deze stof is goed afbreekbaar bij 25°C. De afname in de DOC concentratie is 100 %. Er is geen sprake van remming van de acetaatafbraak en zelfs sprake van een stimulering van de p-chloorfenolafbraak in de aanwezigheid van natriumacetaat. Wellicht een gevolg van cometabolisme. Zowel bij de gewone als de toxiciteitsproef valt de afname in de DOC concentratie samen met de daling in de p-chloorfenolconcentratie. In tabel IV zijn enkele karakteristieken van de afbraak gegeven.

= para-nitrofenol

Behalve in het laatste monster van de proef met natriumacetaat werd geen enkele indicatie voor afbraak gevonden. De acetaatafbraak wordt door para-nitrofenol in de gebruikte concentratie geremd. Dit kan een reden zijn voor de gevonden persistentie. Alleen worden in de laatste monsters van de toxiciteitsproef significante afnames in DOC en para-nitrofenolgehalten gevonden, mogelijk wijzend op een begin van de afbraak. Karakteristieken, zie tabel IV.

= nitrobenzeen

Voor deze stof werd ook in de steriele controle een afname gevonden, die niet wezenlijk verschilt van die in de geënte proef. Uit UV spectra is gebleken dat er geen chemische veranderingen opgetreden zijn en dat de afname dus wijst op verdamping. Ook in de toxiciteitstest wordt hetzelfde teruggevonden, behalve dan dat de acetaatafbraak niet geremd wordt. Een opmerking verdient verder dat de beginconcentraties lager zijn dan verwacht werd, dit waarschijnlijk ten gevolge van de verdamping tijdens het autoklaveren van de media.

Het lijkt er in eerste instantie dus op dat nitrobenzeen niet afbreekbaar is (karakteristieken in tabel IV).

## VI. CONCLUSIES

- Bij de toegepaste concentraties wordt de acetaatafbraak niet geremd door para-chloorfenol en nitrobenzeen, maar wel door para-nitrofenol.
- Para-chloorfenol en natriumacetaat zijn volledig, dus goed afbreekbaar.
- Nitrobenzeen en para-nitrofenol zijn in deze proef als persistent beoordeeld.
- Para-nitrofenol wordt mogelijk als persistent beoordeeld omdat het in een toxische concentratie aanwezig is.
- De aanwezigheid van natriumacetaat afbrekers stimuleert de af-

braak van para-chloorfenol (die sneller begint) en waarschijnlijk ook de afbraak van para-nitrofenol; dit laatste kon pas in het laatst genomen monster geconstateerd worden.

- Nitrobenzeen verdampt naar alle waarschijnlijkheid.
- De test voldoet redelijk maar de betrekkelijke lage DOC concentraties maken de testresultaten niet al te nauwkeurig. Voor zover mogelijk lijken hogere beginconcentraties in deze screeningstest aan te bevelen.
- De duur van de proef zou beter variabel gekozen kunnen worden. Als de proef langer voortgezet was, had de eerste indicatie voor para-nitrofenolafbraak (in de toxiciteitsproef) misschien bevestigd kunnen worden.
- De toxiciteitsproef is een essentiële onderdeel van de methode.
- Natriumacetaat als standaard gaat uitstekend, maar de afbraak gaat erg snel. Misschien is het beter een stof te nemen die een wat langere aanloopfase tot afbraak vertoont? Bijvoorbeeld fenol.
- De totale proef heeft aan inspanning 8-10 mandagen gekost = 2-3 mandagen per stof.

TABEL I - Afbraak van para-chloorfenol bij 298°K.

Tijd (dagen)	p-chloorfenol steriel				p-chloorfenol + ent				p-chloorfenol + NaAc + ent			
	DOC (mg/l)		spec (mg/l)		DOC (mg/l)		spec (mg/l)		DOC (mg/l)		spec (mg/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	8.9	11.6	~18.0	~18.0	11.5	13.9	~18.0	~18.0	14.3	17.5	~18.0	~18.0
1	9.5	13.6	-	-	11.8	8.7	-	-	11.4	14.0	-	-
2	10.5	11.9	-	-	12.4	9.9	-	-	13.9	14.4	-	-
4	-	12.4	-	-	12.4	11.8	-	-	16.3	13.6	-	-
6	12.2	13.0	15.4	15.4	13.3	12.9	15.0	13.5	8.4	8.0	17.6	14.2
8	10.9	11.7	16.8	15.2	12.1	10.3	14.6	15.2	6.1	5.0	0.5	1.4
11	13.4	11.9	17.4	15.6	11.5	9.1	13.0	10.0	5.6	7.5	0.2	0.6
13	13.4	13.2	16.3	16.8	4.6	5.1	0.2	0.2	5.3	5.2	0.3	0.4
15	14.6	14.2	16.7	15.2	3.7	4.7	0.4	0.2	5.5	4.4	0.2	0.2
19	14.4	12.9	17.2	17.8	3.9	6.0	0.8	0.8	4.5	4.4	0.4	0.4



TABEL II - Afbraak van para-nitrofenol bij 298°K.

Tijd (dagen)	p-nitrofenol steriel				p-nitrofenol + ent				p-nitrofenol + NaAc + ent			
	DOC (mg/l)		spec (mg/l)		DOC (mg/l)		spec (mg/l)		DOC (mg/l)		spec (mg/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	19.3	17.4	28.2	22.8	16.1	14.8	20.1	20.0	22.0	20.0	19.7	-
1	17.0	16.8	23.6	21.8	18.0	15.5	23.4	-	22.4	20.7	20.3	-
2	18.8	12.7	20.6	18.6	18.4	22.4	22.3	20.2	21.2	22.1	23.0	17.9
4	17.7	17.7	24.3	23.2	21.7	17.5	21.9	17.9	26.2	20.9	22.8	22.7
6	15.5	17.3	25.6	22.8	17.8	17.7	23.9	25.8	22.5	20.1	24.6	23.2
8	15.7	17.8	25.5	26.2	18.2	17.2	25.0	25.0	17.0	16.3	24.4	25.3
11	17.7	16.4	26.1	25.9	20.4	16.8	23.9	24.9	16.4	16.6	23.7	24.0
13	18.2	17.4	26.2	24.2	16.3	17.2	25.5	26.1	16.9	16.6	25.6	24.0
15	19.5	19.0	25.9	24.3	16.1	17.9	25.1	27.6	15.9	15.7	25.1	24.6
19	18.4	19.3	28.3	25.6	16.8	20.4	25.3	24.0	11.3	13.2	17.1	16.7

TABEL III - Afbraak van nitrobenzeen, natriumacetaat en de blanco proef bij 298°K.

Tijd (dagen)	nitrobenzeen steriel		nitrobenzeen + ent		nitrobenzeen + NaAc		NaAc steriel		NaAc + ent		blanco + ent	
	DOC (mg/l)		DOC (mg/l)		DOC (mg/l)		DOC (mg/l)		DOC (mg/l)		DOC (mg/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	10.0	10.1	12.4	10.5	12.0	12.6	16.3	17.5	16.1	11.0	3.0	3.2
1	12.0	10.4	9.9	-	9.1	12.2	13.0	17.0	10.4	8.4	3.4	3.8
2	10.3	10.7	8.3	11.1	9.3	5.7	11.9	13.8	8.6	9.3	3.5	4.3
4	10.3	10.1	8.2	13.2	9.1	-	17.9	17.2	-	6.2	4.0	5.0
6	10.1	8.4	5.7	8.0	5.3	7.9	16.6	16.1	3.5	5.7	3.8	5.3
8	7.2	5.7	4.7	5.2	7.7	5.1	14.7	14.9	3.3	4.9	3.1	3.6
11	7.6	6.8	6.3	5.0	5.9	6.3	14.9	17.4	3.5	4.8	3.0	3.1
13	7.0	6.3	5.5	5.8	5.9	4.8	-	17.7	-	4.4	3.8	6.0
15	8.2	6.3	6.6	5.3	4.5	4.3	15.8	20.7	5.4	3.2	3.9	4.7
19	8.1	6.3	4.5	5.9	5.7	5.7	15.1	18.0	3.5	5.5	4.6	5.4

TABEL IV - Karakteristieken van de afbraak.

	duur tot begin stofafbr.	duur tot begin Ac.afbr.	stofspect. afbr.- DOC % dag 19	duur volledige afbraak
p-chloorfenol	8-11 d.		100	2- 3 d.
p-chloorfenol + NaAc	4- 6 d.	dir.	100	2- 6 d.
p-nitrofenol	> 19 d.		0	-
p-nitrofenol + NaAc	15 d.	6 d.	0- 50?	?
nitrobenzeen	> 19 d.		0	-
nitrobenzeen + NaAc	> 19 d.	dir.	0	-
natriumacetaat	dir		100	6 d.



