

RIVO

BIBLIOTHEEK
RIJKSINSTITUUT VOOR
VISSERIJONDERZOEK

CA 80-04

ONTWIKKELING VAN TOETSEN VOOR HET
CRITERIUM AFBREEKBAARHEID.

R. v.d. Berg

CA 80-04

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK
IJMUIDEN

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

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

RIJKSINSTITUUT VOOR
VISSERIJONDERZOEK

Afdeling: CHEMISCH ONDERZOEK

Rapport:

CA 80-04

ONTWIKKELING VAN TOETSEN VOOR HET
CRITERIUM AFBREEKBAARHEID.

Auteur:

R. v.d. Berg

Project:

2-7124 - Afbreekbaarheidsonderzoek

Projectleider:

Ir. R. v.d. Berg

Datum van verschijnen:

augustus 1980.

Inhoud:

- I. Samenvatting.
- II. Inleiding.
- III. Overzicht van bekende testmethoden.
- IV. Vergelijking tussen gesloten en open afbreekbaarheidstesten.
- V. Vertaalbaarheid van de testresultaten.
- VI. Stand van zaken bij de OECD, de EEG en in Nederland.
- VII. R.I.V.O. afbreekbaarheidsonderzoek.
 - A. Opzet van het R.I.V.O. afbreekbaarheidsonderzoek.
 - B. Vertaalbaarheid van het R.I.V.O. chemostaat-onderzoek.
 - C. Experimentele Resultaten.
 - D. Verdere ontwikkelingen.
 - E. Conclusies.
- VIII. Literatuurreferenties.
 - Tabellen.
 - Figuren.

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

2291583

I SAMENVATTING.

Ter bescherming van het milieu is het noodzakelijk dat de gehalten van milieuvreemde verbindingen beneden schadelijke niveau's blijven. Hiertoe dienen geproduceerde milieuvreemde verbindingen redelijk afbreekbaar te zijn. Het bepalen van de afbreekbaarheid van milieuvreemde stoffen is daarom van wezenlijk belang in de 'environmental hazard assessment'. Een overzicht wordt gegeven van de momenteel bekende methoden die ingedeeld zijn naar de verschillende beoordelingscriteria.

De vertaalbaarheid van een test naar het milieu vormt het belangrijkste en tegelijkertijd moeilijkste onderdeel van het afbreekbaarheidsonderzoek.

Wat dit laatste betreft zijn de screeningstesten eigenlijk alleen aanvaardbaar voor goed afbreekbare verbindingen, terwijl voor de continue methoden de resultaten alleen op het in de test gesimuleerde milieucompartiment toepasbaar zijn. De OECD heeft diverse methoden geevalueerd en is tot aanbevelingen gekomen voor testmethoden in het gefaseerde chemicaliën test programma.

Met een continue cultuur volgens het chemostaatprincipe kunnen diverse karakteristieken van het aquatisch milieu in model gebracht worden.

Door de toevoer van een groot aantal organische stoffen wordt de vorming van een sterk gemengde micro-organismen gemeenschap en het optreden van cometabolisme bevorderd.

Op grond van de verkregen resultaten en de literatuurgegevens lijkt dit op het R.I.V.O. toegepaste modelsysteem een redelijke schatting te kunnen leveren over het gedrag van een milieuvreemde verbinding in de diverse aquatische compartimenten.

Uitgaande van een limiet van 10 jaar als maximaal toelaatbare verblijftijd in de open oceaan wordt voor het chemostaatonderzoek nog een praktisch realiseerbare verblijftijd van 20 dagen berekend.

Het onderzoek heeft zich tot nu toe vooral gericht op de afbreekbaarheid van fenol, nitro- en chloorfenolen. Fenol en 4-chloorfenol lijken goed tot redelijk afbreekbaar te zijn, terwijl 4-nitrofenol slecht afbreekbaar lijkt. Tenslotte wordt ingegaan op problemen rond de methode, waarvan de selectie van microorganismen de belangrijkste is, en de verdere ontwikkelingen in het onderzoek.

II INLEIDING.

De ontwikkeling van methoden voor het meten van de biologische afbreekbaarheid van stoffen in waterig milieu kwam in de vijftiger jaren op gang na de introductie van de synthetische detergenten. In de zeventiger jaren groeide het verlangen naar een schoon milieu en daarmee de vraag naar een wettelijke regeling rond de introductie, het gebruik en het lozen van chemische stoffen. Een van de aspecten die hierbij een belangrijke rol speelt is de biologische afbreekbaarheid van chemische stoffen. De vijfdaagse BOD test die via het zuurstofverbruik een maat voor de hoeveelheid afbreekbare stof geeft, werd als eerste test gebruikt bij het afbreekbaarheids-onderzoek en vanuit deze test zijn een groot aantal andere testmethoden ontwikkeld.

Op internationaal niveau houden de OECD en de EEG zich momenteel bezig met testharmonisatie omdat het wederzijds accepteren van testresultaten van uiteenlopende methoden zeer gewenst is.

III OVERZICHT VAN BEKENDE TESTMETHODEN.

Op grond van de aard van de informatie die uit de testen verkregen wordt kunnen ze in twee hoofdgroepen verdeeld worden:

- a. De bioafbreekbaarheid 'potential'testen, die aanwijzingen geven over de mogelijkheid dat een stof door microorganismen wordt afgebroken. Afhankelijk van de opzet kan een verdere onderverdeling aangebracht worden:
 - 'ready'bioafbreekbaarheid - de zogenaamde screeningstesten. Bij deze eenvoudige en strenge testen die een beperkte kans op het optreden van afbraak en acclimatiseren bieden, wijst een positief resultaat op een snelle en volledige afbraak in alle normale aërobe milieucompartimenten. Een positief resultaat op dit niveau moet eenduidig zijn. Toch moet rekening gehouden worden met de vorming van afbraakprodukten die bij een te hoge influx gevaar kunnen opleveren.
 - 'inherent'bioafbreekbaarheid. Testen van de afbreekbaarheid als stof-eigenschap, waarbij alleen beoordeeld wordt of afbraak onder optimale omstandigheden optreedt. Een positief resultaat betekent echter niet dat afbraak in het milieu eveneens zal plaatsvinden. Bij een negatief resultaat moet de stof in het algemeen als niet afbreekbaar beschouwd worden.
- b. De simulatietesten die de diverse milieucompartimenten nabootsen, waardoor onder 'milieurelevante' omstandigheden een indruk over afbraak, afbraakprodukten en afbraaksnelheid verkregen wordt.

Uitgaande van de manier waarop een teststof wordt toegevoegd ontstaat een volgende indeling: bij éénmalige stoftoevoer spreekt men van gesloten of batch systemen en bij een continue toevoer van open systemen.

In de meeste gevallen vinden screeningstesten in gesloten systemen plaats, terwijl de simulatie testen doorgaans in open systemen geschieden.

De gesloten systemen berusten in principe op eenzelfde methode. Aan een micro-organismengemeenschap die verkregen kan worden uit de verschillende milieucompartimenten, laboratoriumopstellingen of reïncultures, al dan niet verrijkt, geadapteerd of gecombineerd wordt éénmalig een hoeveelheid van de teststof, meestal als enige bron van koolstof en energie, toegevoegd. Tijdens een eventueel afbraakproces verandert voortdurend het testmilieu ondermeer door afname van de stofconcentratie (figuur 1).

Een geheel andere methode is die van de microecosystemen, waarbij een deel van het ecosysteem (grond, water, gewas, organismen) wordt nagebootst. Met name het gedrag van pesticiden na één- of meermalige (semi-continue)toepassing is hierin onderzocht (figuur 2).

Door de continue toevoer van de teststof kan in de open testsystemen een stationaire toestand ontstaan waardoor het testmilieu constant blijft en de

concentratie van de teststof in het effluent een constant niveau bereikt (figuur 3). De meeste, bekende continue testsystemen zijn simulaties van actief slibinstallaties (figuur 4). Andere continue systemen zijn de biologische filters, riviermodellen en de chemostaten.

Semicontinue systemen zijn in feite gesloten testsystemen, die vanwege het herhaald toevoegen van de teststof toch onder de open testsystemen gerangschikt moeten worden.

Afhankelijk van de parameter die tijdens het afbraakproces gevolgd wordt, kunnen diverse fasen van de afbraak onderzocht worden:

- de primaire afbraak, waarbij een eerste omzetting van de uitgangsstof gevolgd wordt.
- de afbraak tot milieuvriendelijke stoffen.
- de volledige afbraak tot biomassa, kooldioxyde en water (mineralisatie).

De vier parameters aan de hand waarvan biologische afbreekbaarheid beoordeeld kan worden zijn: de zuurstofopname, de kooldioxyde productie, de groei van de microorganismen en de verandering van de concentraties van de stof en zijn omzettingsprodukten. Bij deze laatste kan een onderscheid gemaakt worden tussen de specifieke stofconcentraties of de concentraties van een bepaalde eigenschap van een stof, waarvan organisch koolstof de meest bekende is.

In tabel 1 zijn de afbreekbaarheidstesten ingedeeld naar de verschillende criteria. Bij de testen is aangegeven op welke parameter de bepaling van de afbraak gebaseerd is.

IV VERGELIJKING TUSSEN GESLOTEN EN OPEN AFBREEKBAARHEIDSTESTEN.

Een belangrijk voordeel van de meeste gesloten testen en in ieder geval van de screeningstesten ('ready' bioafbreekbaarheid) is de mogelijkheid om volledige afbraak (op grond van zuurstofverbruik, kooldioxydeproductie of afname van opgelost organisch koolstof) te beoordelen. De teststof is als enige bron van koolstof en energie aanwezig, in tegenstelling tot bij veel continue testen waar ook andere koolstof- en energiebronnen aanwezig zijn. Dit nadeel bij continue testen kan opgeheven worden door met gemerkte verbindingen te gaan werken of een koolstofbalans op te stellen en het ontstaan van metabolieten of beter nog de afbraak tot milieuvriendelijke stoffen te volgen. Op de open OECD bevestigingstest is een variant, de Coupled Units Test, ontwikkeld waarbij door overdracht van actief slib tussen twee parallelle testsystemen volledige afbraak alsnog te beoordelen is.

De testduur van de gesloten testen ligt op ongeveer 4 weken (voorstel van de OECD(35)), terwijl de testduur van de continue testen, afhankelijk van de snelheid waarmee informatie verkegen wordt, in het algemeen langer zal zijn. De kosten aan apparatuur lopen uiteen van enkele tientallen tot enkele tienduizenden guldens, waarbij de personele kosten nog moeten worden opgeteld. In het algemeen zijn de gesloten testen goedkoper dan de continue testen, met als richtbedrag duizend gulden per stof per methode.

Wat betreft de toepasbaarheid zijn de open systemen met uitzondering van de chemostaat meer beperkt dan de gesloten systemen. Alle afbreekbaarheidsmethoden zijn in eerste instantie ontwikkeld voor goed oplosbare, niet vluchtige, aëroob afbreekbare, organische verbindingen. Afhankelijk van de testmethode kunnen ook andere typen verbindingen onderzocht worden. In testsystemen die gesloten zijn of kunnen worden voor gasuitwisseling (Sturm Test, Closed Bottle test, MITI test, AKZO Repetitive Die Away test, chemostaat) kunnen vluchtige verbindingen onderzocht worden. Methoden die zuurstofverbruik (MITI test, Closed Bottle test, AKZO RDA test) of kooldioxydeproductie (Sturmtest) als afbraakparameter hebben, kunnen gebruikt worden voor slecht oplosbare en onoplosbare stoffen.

Anaërobe afbraak kan alleen geschieden in systemen waar zuurstof uitgesloten kan worden.

V VERTAALBAARHEID VAN DE TESTRESULTATEN.

Aan de vertaalbaarheid van de verkregen gegevens is tot nu toe relatief weinig aandacht besteed. Aangenomen wordt dat een stof, die in niet te 'krachtige' screeningstesten afbreekt, ook in normale aërobe milieucompartimenten goed wordt afgebroken. Voorts neemt men aan dat de simulatietesten inderdaad een relatie hebben tot het gedrag in de werkelijke milieusituatie.

Screeningstesten geven weinig informatie over de factor tijd en dus snelheid. De aanloopfase tot het begin van de afbraak kan in samenhang met de ent van test tot test en van methode tot methode sterk uiteenlopen. Is de afbraak eenmaal begonnen dan bepalen alleen de substraataffiniteitsconstante, de maximale groeisnelheid en de stofconcentratie de afbraaksnelheid. De relevantie voor het milieu is daarom onduidelijk temeer daar de stof vaak als enige bron van koolstof en energie aanwezig is en de stofconcentratie en het testmilieu voortdurend veranderen. Die uiteenlopende testresultaten zijn duidelijk terug te vinden bij de resultaten van de screeningstest ringonderzoeken van de EEG(9) en de OECD(34) (figuren 5 en 6). De microecosystemen zijn bijzonder complex. Omdat voor de evaluatie van de resultaten te veel expertise en tijd nodig is zijn deze systemen niet goed bruikbaar voor afbreekbaarheidsonderzoek (42).

Wat betreft de open systemen zijn de actief slib systemen gericht op het onderzoek naar het gedrag van de stof in een aërobe zuiveringsinstallatie. De resultaten zijn dus niet relevant voor het gedrag in het aquatisch milieu, hoewel informatie wel tot steun kan zijn. Ditzelfde geldt eveneens voor de resultaten van de testen met biologische filters.

De chemostaat afbreekbaarheidsmethoden zijn tot nu toe erg beperkt onderzocht, hoewel hierbij juist sprake is van een duidelijke relatie tussen de afbraak van een stof onder continue toevoer en de contacttijd (of verblijftijd) tussen de micro-organismengemeenschap en de stof.

VI STAND VAN ZAKEN BIJ DE OECD, DE EEG EN IN NEDERLAND.

Om de schadelijkheid van chemische stoffen voor het milieu te kunnen vaststellen ('environmental hazard assessment') wordt door de OECD voorgesteld een basisdossier van de te produceren, importeren of op de markt te brengen stof te overleggen. In dit basis dossier worden allerlei gegevens van toxiciteit, accumulatie en persistentie onderzoek vermeld. Zowel door de OECD als door de EEG zijn stapsgewijze testprogramma's voorgesteld. In het kader van dit chemicaliën testprogramma is door de OECD een aanbeveling (35) uitgebracht over onder andere afbreekbaarheidstesten en de niveau's die hierin aan te brengen zijn. De door de OECD aanbevolen testmethoden zijn vervolgens bij de EEG ingebracht ter invulling van annex 5 van de richtlijn 79/831/EEG.

Een hoger testniveau betekent dat meer en complexere testmethoden moeten worden uitgevoerd, waarvan de resultaten steeds betrouwbaarder moeten zijn. De overgang naar hogere testniveaus is bij de OECD afhankelijk van de testresultaten op het vorige niveau, terwijl dit bij de EEG afhankelijk is van de productiehoeveelheid van een stof. Een belangrijk aspect van het gebruiken van stapsgewijze programma's zoals dat van de OECD, is dat soms, afhankelijk van het totale pakket verkregen informatie, ook bij negatieve resultaten onderzoek op een volgend niveau niet nodig is. Bij het EEG programma ligt dit anders en de vraag is of de EEG het OECD programma nog zal overnemen.

Op niveau 1 van de OECD (EEG niveau 0) worden de 'ready' bioafbreekbaarheidstesten voorgeschreven. Aan de invulling op dit niveau is door de OECD en de EEG de meeste aandacht besteed. Aanbevolen worden: de gemodificeerde OECD screeningstest (54), de MITI test (31), de Closed Bottle test (12, 15), de gemodificeerde Sturm test (48) en de AFNOR T90 - 302 test (3). Al deze methoden zijn wat betreft opzet, duur en interpretatie van de resultaten van de test gemodificeerd ten opzichte van de eerste beschrijving.

Op niveau 2 (EEG niveau 1) zijn de 'inherent' bioafbreekbaarheidstesten geplaatst en worden als voorbeelden de Zahn Wellens test (55) en de SCAS (30, 40) genoemd. Op dit niveau kan echter elke methode die afbraak vaststelt ingebracht worden.

De simulatietesten worden tenslotte op niveau 3 (EEG niveau 2) genoemd. Deze testen moeten onder milieurelevante omstandigheden informatie verschaffen over afbraak, afbraaksnelheden en afbraakprodukten. Allerlei testsystemen zijn dus nodig die zich op de uiteenlopende milieucompartimenten richten. Juist hier zitten grote lacunes in de beschikbare kennis, want eigenlijk zijn alleen voor aërobe en anaërobe biologische waterzuiveringen en rivieren modellen ontwikkeld. Op dit gebied is daarom nog veel onderzoek vereist, hetgeen ook de OECD in de aanbevelingen (35) vermeldt. Op niveau 3 zijn voorlopig de OECD bevestigingstest (33, 17), de Coupled Units Test (13, 14) en de Porous Pot test (46) aanbevolen.

In Nederland wordt door een werkgroep van het Nederlands Normalisatie Instituut gewerkt aan het optimaliseren van een afbreekbaarheidsmethode waarin testomstandigheden en interpretatie van de resultaten een belangrijke rol spelen.

VII R.I.V.O. AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK.

A OPZET VAN HET R.I.V.O. AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK.

In het aquatisch milieu treedt een continue aanvoer van organische stof op door de primaire productie van het fytoplankton. Aangezien geen ophoping van deze organische stoffen plaatsvindt, maar sprake is van een vrij constante hoeveelheid organische koolstof, de zogenaamde 'standing crop', moet in het aquatisch milieu een continue afbraak plaatsvinden. Door deze continue produktie en afbraak van organische stoffen bevindt het aquatisch milieu zich in een dynamische evenwichts toestand. De afbraak wordt onder de in de natuur voorkomende substraatconcentraties voornamelijk door de heterotrofe bacteriën verzorgd (41).

Metingen van de afbraak van radioactief gemerkte verbindingen, vooral glucose en aminozuren door heterotrofe bacteriën in aquatische compartimenten volgens de methode van Hobbie en Crawford (21) geven voor deze verbindingen 'in situ' omzettingssnelheden en turnovertijden (tijd die nodig is om de verbinding af te breken). De turnovertijd blijkt afhankelijk van plaats en jaargetij sterk te kunnen variëren en wordt door allerlei factoren, o.a. het aantal actieve bacteriën, bepaald.

Om het gedrag van milieuvreemde stoffen in het aquatisch milieu te kunnen voorspellen moet aan de hand van de volgende gegevens een modelsysteem ontwikkeld worden:

- een continue toevoer van organische stoffen en een continue afbraak door heterotrofe microorganismen,
- een dynamische evenwichts toestand en
- uiteenlopende turnovertijden.

Een dynamische evenwichts toestand kan alleen verkregen worden in een continue cultuur met constante aanvoer van stoffen, constante afbraak door microorganismen en een constante afvoer van de resterende stoffen en de microorganismen. Door in de continue cultuur te werken volgens het chemostaat principe (50), waarbij één factor in de voedingsstoffenoplossing in een groeibeperkende concentratie aanwezig is, kan het systeem op een grote verscheidenheid aan verblijftijden ingesteld worden. De verblijftijd is de tijd die stoffen en organismen gemiddeld in cultuurvat verblijven en gedurende welke tijd afbraak door de organismen van die stoffen mogelijk is. Deze verblijftijd is vergelijkbaar met de turnovertijd. Een korte verblijftijd betekent een korte turnovertijd.

Een unieke en bijzonder nuttige eigenschap van chemostaatcultures is dat ze zelfstabiliserend zijn en bij verstoringen zelf terugkeren naar de evenwichtstoestand.

De primaire produktie wordt nagebootst door de toevoer van vele natuurlijke, redelijk afbreekbare organische stoffen in betrekkelijk hoge concentraties

ten opzichte van het aquatisch milieu. Deze oplosbare organische stoffen vormen de koolstof- en energiebron en zijn in het R.I.V.O. chemostaat-onderzoek gekozen als beperkende factor. Dit betekent dat alle andere groeifactoren (fosfor, stikstof, zwavel, enz.) in overmaat aanwezig zijn, een situatie die overigens in het aquatisch milieu misschien wel anders ligt.

De ten opzichte van het aquatisch milieu relatief hoge gehalten aan organische stoffen in de aanvoer leggende groei en daarmee de relatief hoge biomassa aan heterotrofe microorganismen vast. In vergelijking met het aquatisch milieu zijn daarom hogere afbraaksnelheden mogelijk. Een tweede reden voor het gebruik van deze relatief hoge concentraties vormen de noodzakelijke analyses van de te onderzoeken milieuvreemde verbinding en van de achtergrond aan organische stoffen.

Een duidelijk nadeel van deze hoge concentraties aan organische stoffen is dat beoordeling van volledige afbraak van de stof in onderzoek tot kool-dioxyde, water en biomassa niet mogelijk is.

De toevoer van een groot aantal organische stoffen maakt het mogelijk een sterk gemengde microorganismengemeenschap in stand te houden en eventuele cometabolische omzettingen te stimuleren. In de competitie om de beschikbare substraten geeft een groter aantal substraten een grotere kans op handhaving van een groot aantal soorten organismen. Cometabolisme (23) is het verschijnsel waarbij geen groei van een organisme optreedt op het aangeboden substraat, maar wel afbraak daarvan plaatsvindt door hetzelfde organisme als deze een andere stof als bron van koolstof en energie voor de groei gebruikt. Zo is bijvoorbeeld de bacterie *Pseudomonas methanica* in staat te groeien op methaan (CH_4) en niet op ethaan (C_2H_6), terwijl een mengsel van methaan en ethaan wel omzetting van ethaan tot azijnzuur (CH_3COOH) oplevert (28).

Het onderzoek naar het gedrag van de milieuvreemde verbinding vindt plaats door deze stof aan de voedingsstoffenoplossing toe te voegen in concentraties die afhankelijk van de toxiciteit voor de microorganismen, op koolstofbasis maximaal 5% bedragen. Als functie van de verblijftijd wordt in het onderzoek de mate van afbraak vastgesteld (figuur 7). Het is vanzelfsprekend dat bij een langere verblijftijd, met een langduriger contact tussen stof en microorganismen een grotere kans op afbraak bestaat. Uiteindelijk worden de verblijftijden waarbij 0 en 100 % afbraak optreedt (figuur 7) als karakteristieke gegevens bepaald. In figuur 8 is de meetopstelling weergegeven.

B VERTAALBAARHEID VAN HET R.I.V.O. CHEMOSTAAT ONDERZOEK.

Met behulp van de verblijftijden bij 0 en 100 % afbraak moet het gedrag van een milieuvreemde stof in het aquatisch milieu voorspeld kunnen worden. Bij de opzet van dit modelsysteem is uitgegaan van gegevens over het aquatisch milieu en verwacht wordt dat de resultaten een redelijke indruk over de afbreekbaarheid in het aquatisch milieu zullen geven. Een belangrijke vraag hierbij is of de tamelijk lange verblijftijden in het aquatisch milieu in het experiment gereduceerd kunnen worden tot toepasbare waarden.

In de chemostaat worden groei op en volledige afbraak van de organische stoffen waargenomen bij verblijftijden langer dan 1.51 uur. Experimenten met kortere verblijftijden zijn nog niet uitgevoerd. Op grond hiervan wordt de minimaal benodigde verblijftijd voor afbraak van de aangeboden organische stoffen op 1 uur geschat. Hieruit kunnen de toevoer en afbraak van de organische stoffen berekend worden. De biomassa aan microorganismen, de potentiële afbrekers, is bekend en daaruit volgt de afbraak per eenheid biomassa en tijd (tabel 2).

Uitgaande van het gegeven dat in het aquatisch milieu geen ophoping van organische stoffen plaatsvindt kan de afbraak in aquatische milieucapartimenten geschat worden door de afbraak gelijk te stellen aan de continue productie van organische stof door de primaire productie van het fytoplankton.

De afbraak wordt dus berekend door de primaire productie om te zetten in de hoeveelheid koolstof die per eenheid biomassa en tijd wordt afgebroken. In tabel 2 zijn de gegevens en resultaten verzameld voor open oceanen, kustzones en estuaria en het IJsselmeer. Uit deze resultaten kan een verhouding voor de afbraaksnelheid in de chemostaat en de verschillende aquatische milieucompartmenten berekend worden.

Uit de literatuur (22, 41) zijn turnovertijden bekend voor de afbraak van glucose 'in situ' in het aquatisch milieu en het onderzoek heeft voorlopig een schatting opgeleverd van één uur voor de minimale verblijftijd die nodig is voor 100 % afbraak van glucose in de chemostaat. Ook deze gegevens uit de praktijk geven een verhouding voor de afbraaksnelheid in de chemostaat en de aquatische milieucompartmenten. Deze verhouding op grond van de praktijkgegevens komt, zoals uit tabel 2 op te maken valt, goed overeen met de verhouding op grond van de geschatte afbraaksnelheden. De uit het chemostaatonderzoek verkregen gegevens lijken het gedrag van een stof in het aquatisch milieu dus redelijk goed te kunnen voorspellen. Van een milieuvreemde stof met onbekend gedrag in het aquatisch milieu vindt voorspelling plaats door vergelijking van het gedrag in de chemostaat met dat van een stof (bijvoorbeeld glucose) waarvan het gedrag zowel in het milieu als in de chemostaat bekend is.

Het vastleggen van een limiet van 10 jaar als maximaal toelaatbare verblijftijd in de open oceaan betekent voor het chemostaatonderzoek in de huidige opzet een limiet voor de verblijftijd van 20 dagen, hetgeen experimenteel nog haalbaar is. Het testsysteem zou in principe op een verblijftijd van 20 dagen ingesteld kunnen worden, waarbij het gedrag van de milieuvreemde stof vastgesteld wordt. In het algemeen wordt vanwege praktische problemen bij lange duur proeven eerst onderzoek met kortere verblijftijden uitgevoerd. De plaats van het chemostaatonderzoek in de gefaseerde opbouw van de schatting van de schadelijkheid van een chemische verbinding voor het milieu ('environmental hazard assessment') zoals de OECD deze voor ogen heeft, moet vanwege de aspecten tijd en kosten niet op de eerste twee niveaus gezocht worden, maar hoort thuis in de rij van de simulatiemethoden (niveau 3). Er wordt meer informatie verkregen over het gedrag in het aquatisch milieu ondermilieu relevante omstandigheden dan met andere bestaande simulatiemethoden.

C EXPERIMENTELE RESULTATEN.

Het afbreekbaarheidsonderzoek is in de eerste fase gericht geweest op het ontwikkelen van de aërobe chemostaat afbreekbaarheidsmethode voor goed oplosbare, niet vluchtige organische stoffen.

In de tweede fase is begonnen met het verzamelen van gegevens over het verband tussen verblijftijd en de mate van afbraak van organische verbindingen.

Glucose is opgenomen in de voedingsstoffenoplossing en dient als indicatieverbinding voor de activiteit van de microorganismen in de chemostaat en als modelverbinding voor het maken van schattingen van verblijftijden van andere organische verbindingen in het mariene milieu. Bij alle tot nu toe uitgevoerde proeven (verblijftijden 1,51 - 84,3 uur) bleek glucose volledig te worden afgebroken. De voor 100 % afbraak minimaal vereiste verblijftijd is dus nog korter.

Fenol en gechlloreerde en nitro-fenolen werden als eerste testverbindingen gebruikt omdat ze:

- a. een gebied van slecht tot goed afbreekbare stoffen bestrijken,
- b. inzicht geven in structuur-afbreekbaarheidsrelaties,
- c. milieu relevantie bezitten (bestrijdingsmiddelen),
- d. niet vluchtig zijn,
- e. eenvoudig aantoonbaar zijn.

Met een aantal verbindingen zijn al proeven uitgevoerd, maar de minimale verblijftijden die nodig zijn voor 100 % afbraak zijn nog niet vastgelegd. Fenol wordt bij een verblijftijd van 1,55 uur of langer volledig afgebroken.

4-Chloorfenol wordt bij een verblijftijd van 5,13 uur of langer wel, maar bij een verblijftijd van 3,20 uur niet afgebroken. De afbraak van 4-chloorfenol verloopt via een geel gekleurd metaboliet dat volgens literatuurgegevens (25) waarschijnlijk het 5-chloor, 2-hydroxymuconzuur semialdehyde is, dat weer verder wordt afgebroken. Voor deze tweede fase in de afbraak kunnen nog geen karakteristieke verblijftijden gegeven worden. 4-Nitrofenol, dat als hydrolyse produkt kan ontstaan bij de biologische of chemische afbraak van het bestrijdingsmiddel parathion, vertoonde bij verblijftijden tot 80 uur geen afbraak. Dit resultaat staat in tegenstelling tot proeven met de OECD screeningstest (56). In de meeste gevallen werd daarbij wel afbraak geconstateerd, hoewel vaak sprake was van een lange aanloopfase voordat de afbraak begon.

Een van de mogelijke oorzaken van de nog niet waargenomen afbraak in het chemostaatonderzoek kan een nog te korte verblijftijd zijn. Een andere mogelijkheid is dat in de competitie om de beschikbare voedingsstoffen de potentiële afbreker nog van andere voedingsstoffen gebruik maakt. Een groot probleem vormt in het algemeen de ent. Alleen microorganismen die in de ent voorkomen krijgen een kans om de aanwezige stoffen af te breken. Hoe groot de ent ook gekozen wordt, het is altijd mogelijk dat het stof-afbrekende organisme in zulke lage concentraties aanwezig is, dat de kans op bemonstering en enten met dat organisme klein is en afbraak dus niet geconstateerd kan worden.

De zwaarte van dit probleem zal sterk afhankelijk zijn van de kans die dat organisme in het aquatisch milieu zal krijgen om tot afbraak van de stof te komen. Dit probleem speelt niet alleen bij continue cultures, maar is misschien nog wel groter bij de gesloten testsystemen, omdat daar vaak sprake is van een kleine ent. Bij continue cultures kan naast dit ent-probleem nog selectie plaatsvinden tijdens de continue afvoer, afhankelijk van de ingestelde verblijftijd. Omdat in de screeningstesten wel afbraak van 4-nitrofenol werd waargenomen lijkt een te selectieve ent niet de reden voor de niet geconstateerde afbraak in de chemostaatproeven.

D VERDERE ONTWIKKELINGEN.

In de lopende fase van het onderzoek zal de relatie afbreekbaarheid-verblijftijd voor gechloreerde fenolen en nitrofenolen afgerond worden. Vervolgens of daarnaast moet aandacht besteed worden aan testmethoden voor onderzoek naar de afbraak van vluchtige verbindingen, slecht oplosbare of onoplosbare verbindingen en aan afbraaksystemen in anaërobe milieus, zowel in de water- als de sedimentfase.

Een nog latere fase in het onderzoek is het identificeren van produkten die gevormd worden tijdens de afbraak. Is de afbraak echt volledig of ontstaan soms persistentere en/of giftigere verbindingen? Dit kan gebeuren door onderzoek met gemerkte verbindingen of door het meten van de volledigheid van de afbraak aan de hand van de kooldioxyde produktie uit de testverbindingen. Uiteindelijk dienen alle organische stoffen immers afgebroken te worden tot kooldioxyde en water.

E CONCLUSIES.

Aangegeven zijn de eerste stappen op weg naar een afbreekbaarheidstest waarvan de resultaten vertaalbaar lijken en waaruit een criterium ten aanzien van de afbraak in testsystemen kan voortvloeien. Het aquatisch milieu is in model gebracht met een continue cultuur volgens het chemostaatprincipe. Karakteristieken van de methode zijn:

- dynamische evenwichtstoestand,
- primaire produktie in de vorm van de toevoer van een groot aantal organische stoffen,
- bevorderen van cometabolisme,
- stimuleren van de vorming van een goed gemengde microorganismengemeenschap,

- variabele, instelbare verblijftijden,
- opgelost organisch koolstof als groeibeperkende factor.

Een belangrijk probleem bij het afbreekbaarheidsonderzoek vormt de selectie van de microorganismen door keuze en grootte van de ent en door het werken met de continue cultuur.

VIII LITERATUURREFERENTIES.

1. AFNOR, Determination of the biodegradability of detergents containing anionic surface active agents. T73-260. L'Association Francaise de Normalisation, Parijs (1971).
2. AFNOR, Determination of the biodegradability of nonionic surface active agents. T73-270. L'Association Francaise de Normalisation, Parijs (1974).
3. AFNOR, Testing Water-Evaluation of total biodegradability of organic products. T90-302. L'Association Francaise de Normalisation, Parijs (1977).
4. Berg, R.van den, dit rapport.
5. Blok, J., Int. Biodetn. Bull. 15 (1979) 57.
6. Borstlap, C. and P.L. Kooyman, J. Am. Oil Chem. Soc. 40 (1963) 78.
7. Brink, R.H. and J.A. Meyers, J. Am. Oil Chem. Soc. 43 (1966) 449.
8. Bunch, R.L. and C.W. Chambers, J. Water Poll. Contr. Fed. 39 (1967) 181.
9. CEC Environmental and Consumer Protection Service 'Ecotoxicological testing of chemicals', Final Report of Intercomparison programme on detecting biodegradability of chemicals in water, München (1979)
10. Edeline, F. and G. Lambert, Tribune CEBEDEAU. 18 (1965) 120.
11. Engelmann, G., P. Wilderer and L. Hartmann, Z.f. Wasser- und Abwasser-Forschung, 11 (1978) 44.
12. Fischer, W.K. Vom Wasser, 40 (1973) 305.
13. Fischer, W.K. and P. Gerike, Water Research, 9 (1975) 1137.
14. Fischer, W.K., P. Gerike and W. Holtmann, Water Research, 9 (1975) 1131.
15. Fischer, W.K., P. Gerike and R. Schmid, Wasser- und Abwasser Forschung 7 (1974) 99.
16. Gerike, P., W.K. Fischer and W. Holtmann, Water Research, in press.
17. German Government, Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- und Reinigungsmitteln. Bundesgesetzblatt nr49 12/12 1962 part 1, 698.
18. Gledhill, W.E., Appl. Microb. 30 (1975) 922.
19. Hammerton, C., J. Appl. Chem. 5 (1955) 517.
20. Hitzman, D.O., J. Am. Oil Chem. Soc. 41 (1964) 593.
21. Hobbie, J.E. and C.C. Crawford, Verh. Internat. Verein. Limnol. 17 (1969) 725.
22. Hoppe, H. G., Neth. J. Sea Research, 12 (1978) 78.
23. Horvath, R.S., Bact. Reviews, 36 (1972) 146.
24. Janicke, W. and G. Hilge, Z. für Wasser- und Abwasser-Forschung, 10 (1977) 4.
25. Janke, D. and W. Fritsche, Z. Allg. Mikrob., 19 (1979) 139.
26. Jenkins, S.H., N. Harkness, A.Lennon and K. James, Water Research, 1 (1967) 31.
27. Kreuk, J.F. de and A.O. Hanstveit, De bepaling van potentiële milieu-effecten, in het water, van chemicaliën en afvalwater: Afbreekbaarheid, Toxiteit en Bio-accumulatie, Centraal Laboratorium T.N.O., Delft, (1979), deel II.3. 5, 15.
28. Leadbetter, E.R. and J.W. Foster, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 491.
29. Lichtenstein, E.P., T.T. Liang and T.W. Fuhremann, J. Agr. Food Chem. 26 (1978) 948.
30. Mausner, M., J.H. Benedict, K.A. Booman, T.E. Brenner, R.A. Conway, J.R. Duthie, L.J. Garrison, C.D. Hendrix and J.E. Shewmaker, J. Am. Oil Chem. Soc. 46 (1969) 432.
31. M.I.T.I., Law concerning the examination and regulation of manufacture, etc. of chemical substances, Law no. 117. Ministry of International Trade and Industry, Tokyo, (1975), 64.
32. Müller, D. and T. Tittizer, Z. für Wasser- und Abwasser- Forschung 12 (1979) 14
33. OECD, Pollution by detergents. Determination of the biodegradability of anionic synthetic surface active agents, Parijs, 1971.

34. OECD, Chemicals Testing Programme, Degradation/ Accumulation Group, Final Report of Ring-test programme 1978/79 on detecting biodegradability of chemicals in water, München (1979).
35. OECD, Chemicals Testing Programme, Final Report of the Expert Group on Degradation and Accumulation, Berlijn en Tokyo (1979).
36. Pitter, P., Water Research, 10 (1976) 231.
37. Prochazka, G.J. and W.J. Payne, Appl. Microb. 13 (1965) 702.
38. Rossall, B., Int. Biodetn. Bull. 10 (1974) 95.
39. Schefer, W., Gas Wasser Abwasser, 57 (1978) 253.
40. SDA, Subcommittee on biodegradation test methods, J. Am. Oil Chem. Soc. 42 (1965) 986.
41. Sepers, A.B.J., Hydrobiologia, 52 (1977) 39.
42. Smies, M., Group Research Report TLER. 0171.78, Shell Toxicology Laboratory (Tunstall), Sittingbourne (1979).
43. Standards Association of Australia, Method for determining the biodegradability of surfactants, AS 1792 (1976).
44. Standing Committee of Analysts, Amenability of sewage sludge to anaerobic digestion. HMSO (1977).
45. Standing Technical Committee on Synthetic Detergents, Supplement to the eight progress report. HMSO (1966).
46. Standing Technical Committee on Synthetic Detergents, Fifteenth Progress Report. HMSO (1974).
47. Stennett, G.V. and G.E. Eden, Water Research, 5 (1971) 601.
48. Sturm, R.N., J. Am. Oil Chem. Soc., 50 (1973) 159.
49. Swisher, R.D., J.T.O.'Rourke and H.D. Tomlinson, J. Am. Oil Chem. Soc., 41 (1964) 746.
50. Tempest, D.W., in: Methods in Microbiology, vol. 2. eds. J.R. Norris and D.W. Ribbons, (1970) 259.
51. Treccani, V., G. Baggi, E. Galli, G. Pensotti and V. Andreoni, La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 50 (1973) 418.
52. Wagner, R., Vom Wasser, 42 (1974) 271.
53. Wayman, C.H., Progress Ind. Microb. 10 (1971) 219.
54. Wuhrmann, K. and K. Mechsner, Effluent and Water Treatment Journal, (1974) 710.
55. Zahn, R. and H. Wellens, Chem. Zeitung. 98 (1974) 228.
56. Resultaten ringonderzoek, NNI- WG Bacteriën - 1979/1980- deelname: AKZO, Philips Duphar, R.I.V., R.I.D., R.I.V.O., T.N.O.

Tabel I	Gesloten testsystemen		Open testsystemen	
	Primaire afbraak	Volledige afbraak	Primaire afbraak	Volledige afbraak
1. Bioafbreekbaarheid 'potential' testen a. 'ready' bioafbreekbaarheid	OHCD screeningstest- stof (33) STCSD test-stof (43, 45) Growth test- Groei (37, 53)	Genod. OECD scr. test- DOC (54) Closed Bottle test- O ₂ (12, 15) Sturm test- CO ₂ (48) AFNOR T90-302-DOC (3) M.I.T.I. test- O ₂ stof (31, 52) Warburg test- O ₂ (7) Hach test- O ₂ (38)		
b. 'inherent' bioafbreekbaarheid	Bunch Chambers test- stof (8) SDA Shake culture- stof (40) Treccani elective test- stof (51) AFNOR T73-260/270- stof (1, 2)	Zahn Wellentest- COD, DOC (55) TOC Abbauteest-DOC (32) EMPA test-COD, DOC (39) Gledhill compact test- CO ₂ (18) Pitter test-COD, DOC (36)	Repetitive Die Away test- O ₂ -DOC (5)	
2. Simulatietesten a. aërobe aktief slib installatie			SDA Semi continuous test- stof (30, 40) OECD confirmatory-test stof, DOC (17, 33) Swisher minitest-stof (49) Porous pot test-stof (46)	Coupled Units Test- DOC (12, 13, 14, 15) Square Wave Feeding Test-DOC (16)
b. anaërobe zuiveringsinstallatie			Karlsruher test-stof (11)	Anaërobic digestie test-gas (44)
c. rivier	River Die Away Test-stof (6, 19, 20) General River Elimination Test-stof (24)		R.I.V.O. chemostaat-stof (4) " " " " " " " " " "	T.N.O. chemostaat-DOC (27) " " " " "
d. estuarium e. zec			Trickling filter- stof (47) Recirculating filter- stof (10, 26)	Coupled Trickling Filters-DOC (16)
f. bodem g. biologisch filter				
h. ecosysteem	microecosystemen-stof (29)			

TABEL 2

	prim.prod. gC/m ² jr	diepte m	Cafbraak gC/m ³ jr	biomassa DW mg/m ³	Cafbraak/ biomassa gC/gDW jr	verhouding chem / x
CHEMOSTAAT			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	
OCEAAN	50	200	0.25	5-50	5-50	200-2000
ESTUARIA/ KUSTZONES	100-500	20	5-25	10-100	50-2500	4-200
IJSSELMEER	2000	4	500	4-10.10 ²	500-1250	8-20

praktijkgegevens
verblijftijden
(uren)

chemostaat	∞
ocean	1000 (200-6000)
estuaria/ kustzones	20 (1-500)

10 jaar in de oceaan als limiet ∞ 20 dagen in de chemostaat

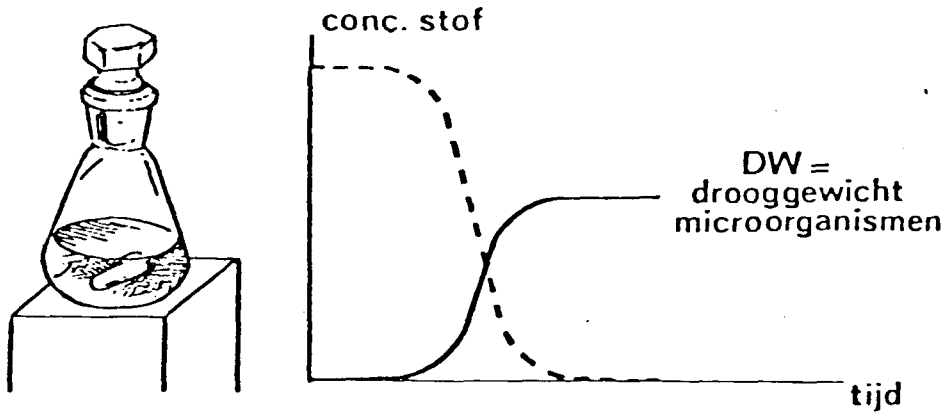


FIG.1. 'DIE AWAY' TEST, PROEF MET ÉÉN MALIGE STOF TOEVOER.

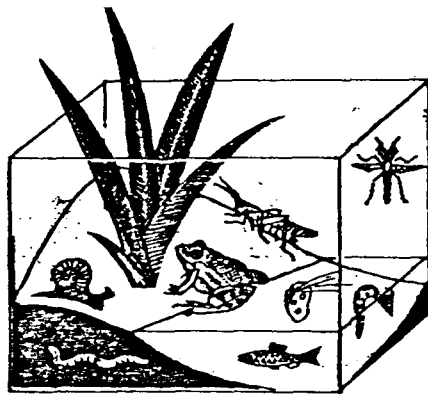


FIG.2 MICRO-ECOSYSTEEM.

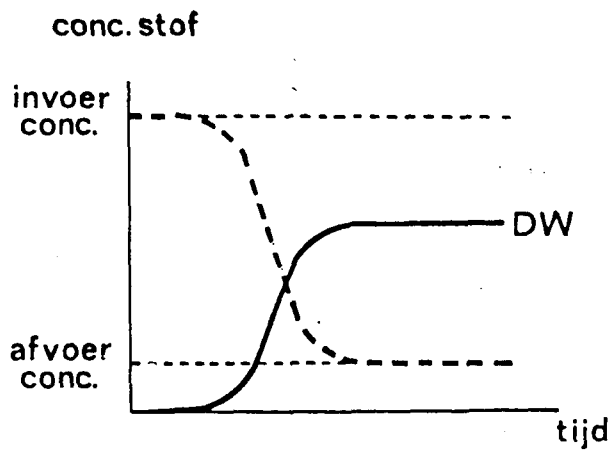


FIG.3. PROEF MET CONTINÛE STOF TOEVOER.

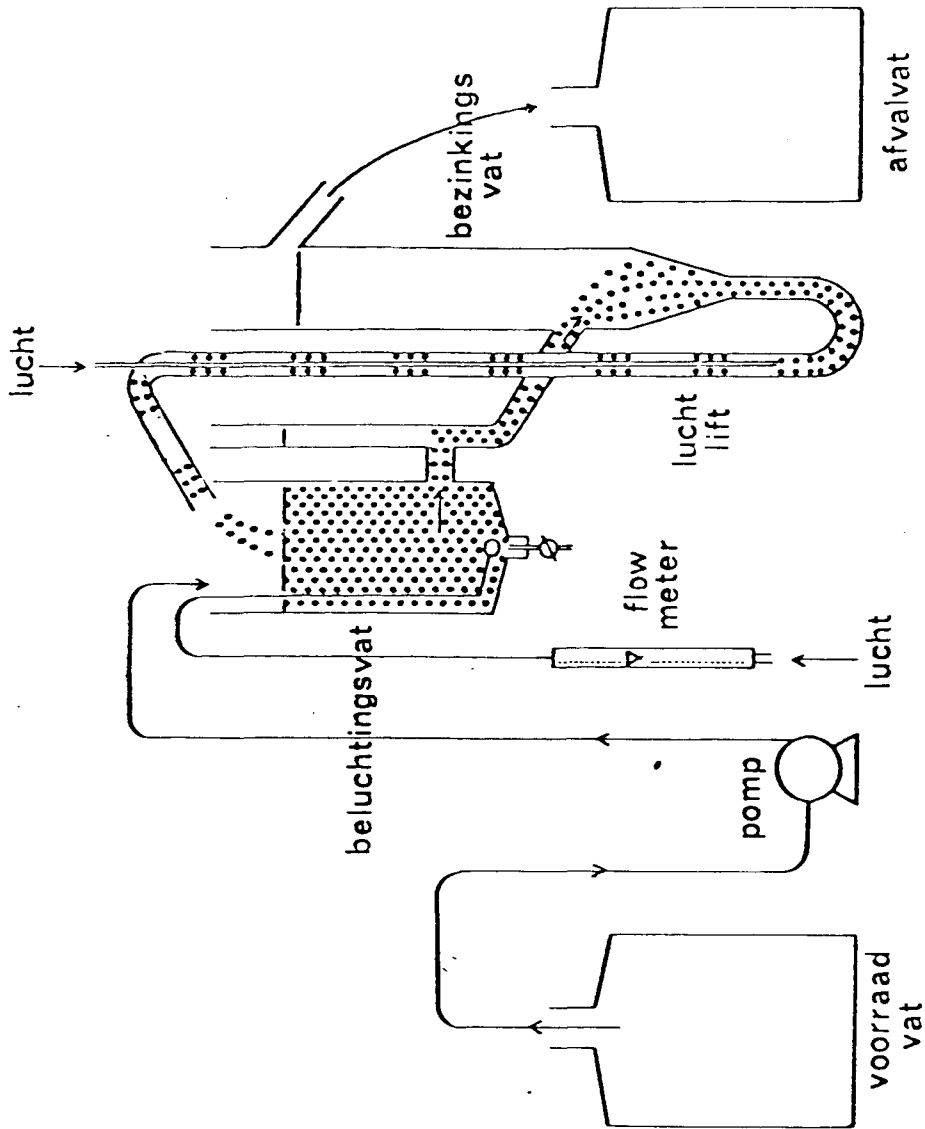


FIG. 4. MINI AKTIEF SLIB INSTALLATIE.

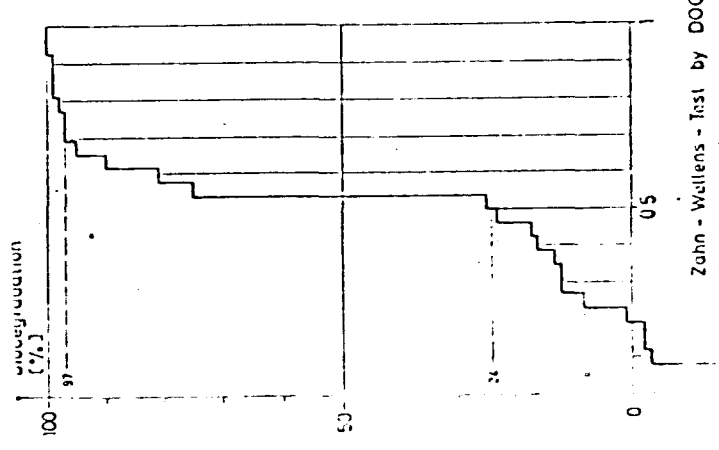
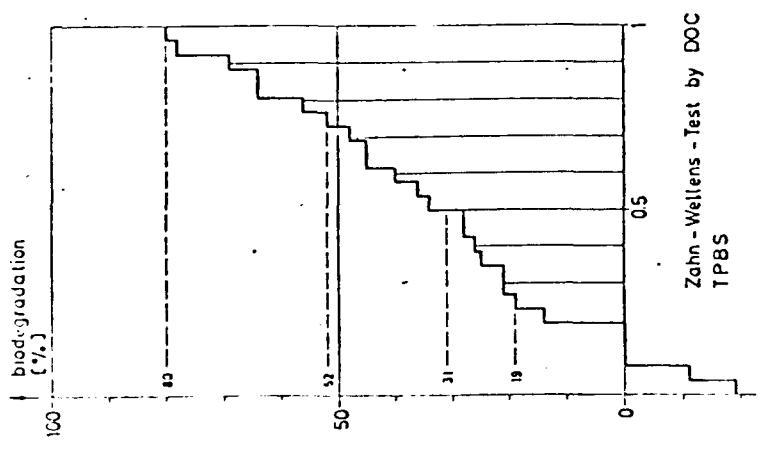
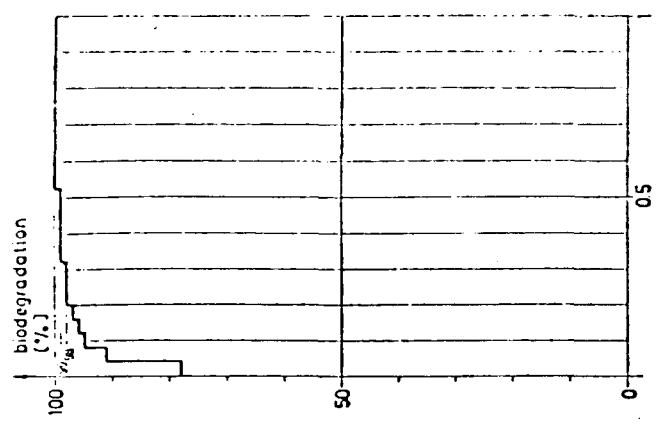
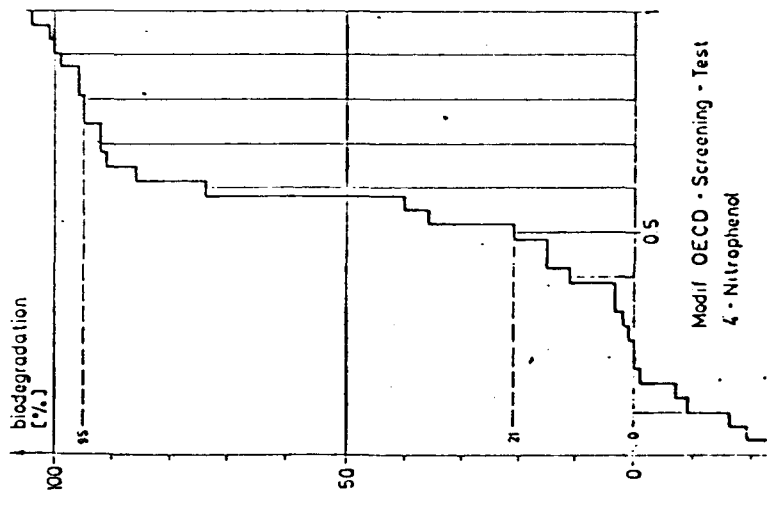
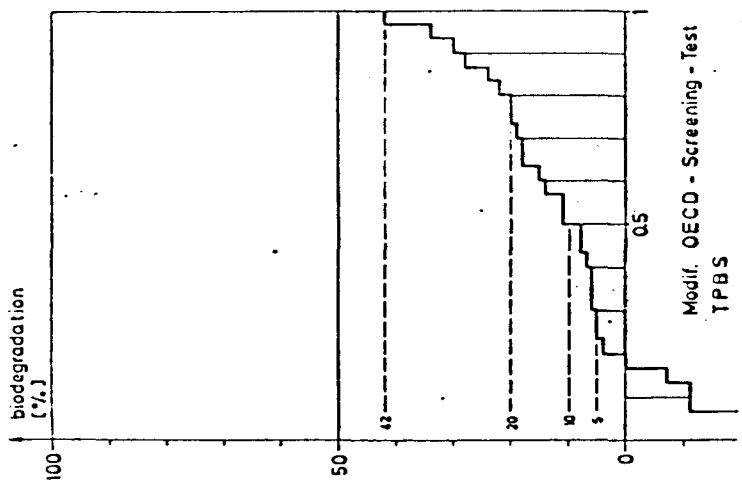
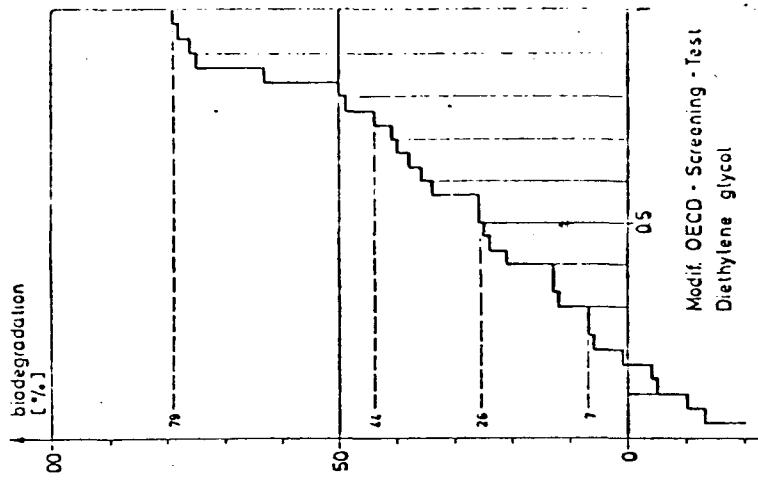


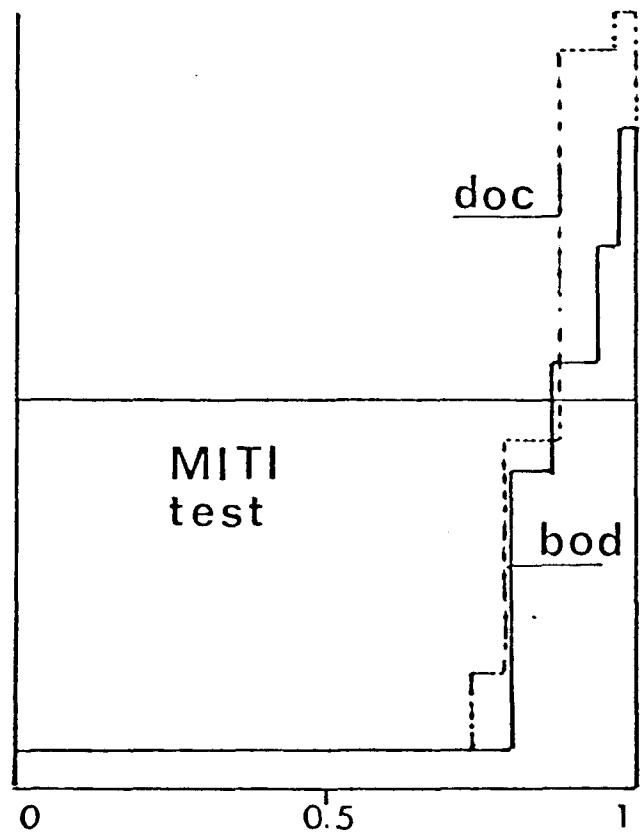
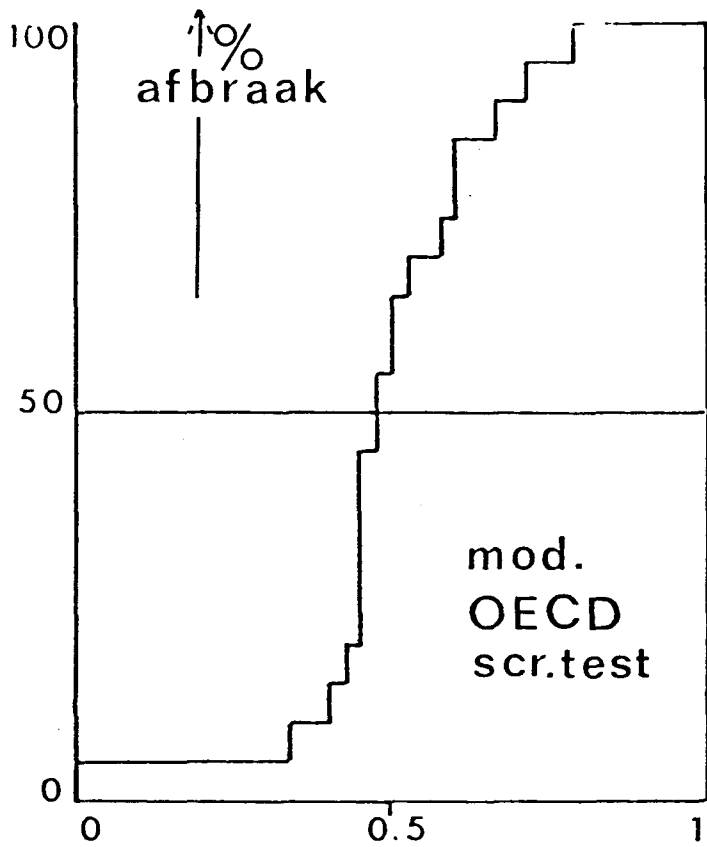
Figure 1: Modified OECD-Screening-Test

ordinate: Biodegradation after 19 days
abscissa: fraction of reports

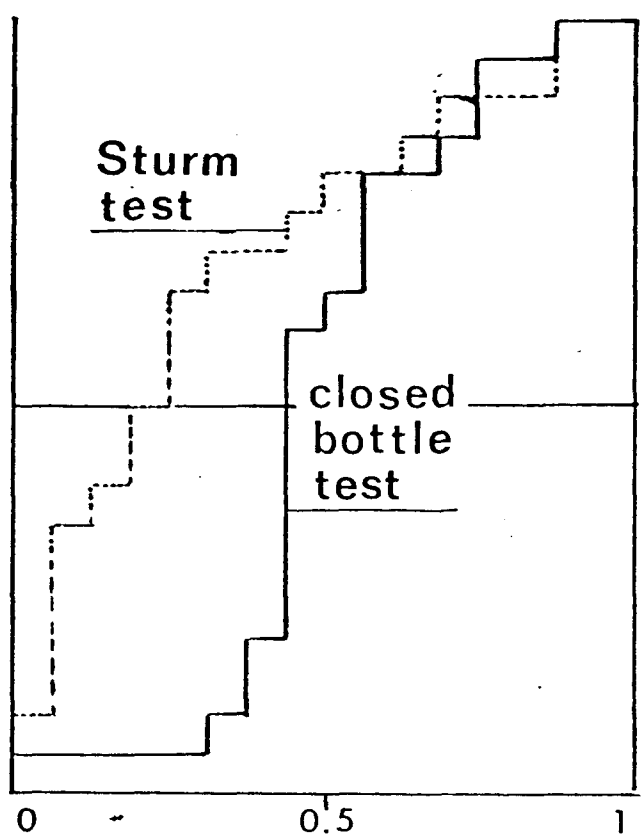
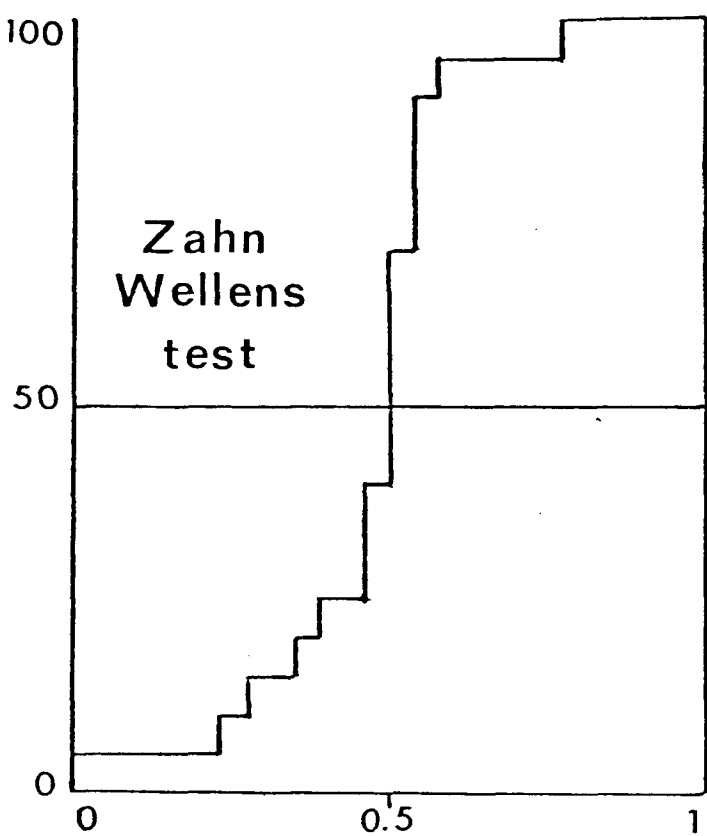
Figure 2: Zahn-Wellens-Test by DOC

(scales: see fig. 1)

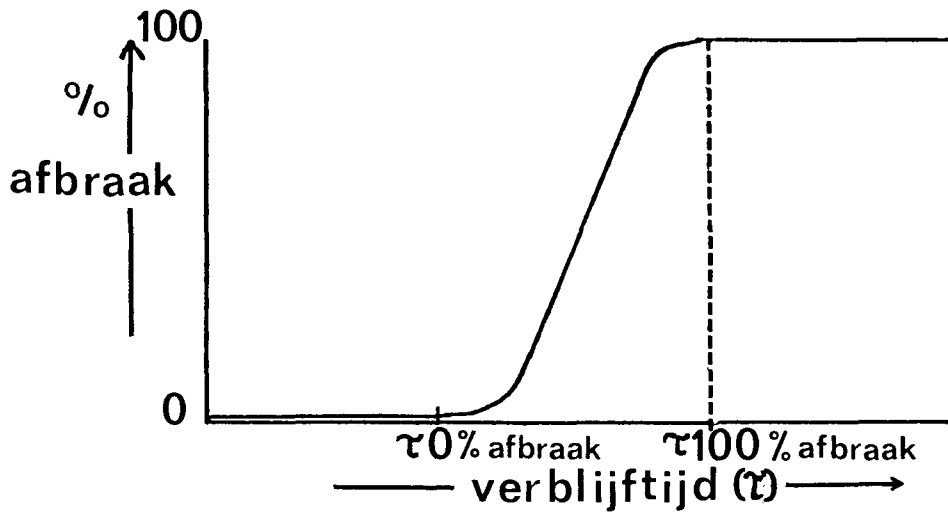
EEG-RINGTEST FIGUUR 5



————— fractie v.d. rapporten —————>



OECD RINGONDERZOEK
4-nitrofenol
FIGUUR 6



FIGUUR 7

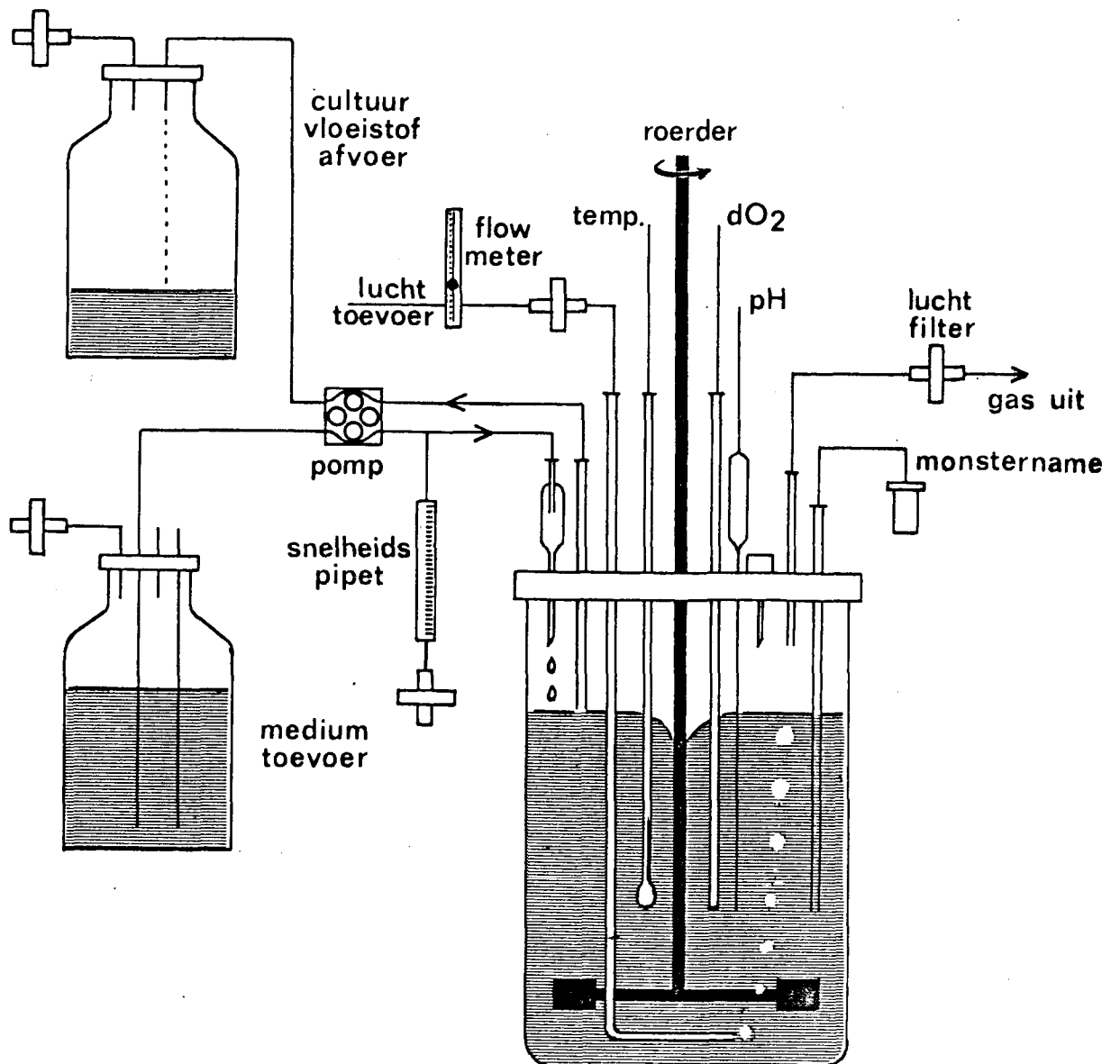


FIG.8. RIVO - CHEMOSTAAT.