

CA 80-03

AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK MET
DE OECD-SCREENINGSTEST-II.

R. v.d. Berg, J. Buntsma-Hamers
en B. Verboom.

CA 80-03

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

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

Afdeling: CHEMISCH ONDERZOEK

Rapport: CA 80-03
AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK MET
DE OECD-SCREENINGSTEST-II.

Auteur: R. v.d. Berg, J. Buntsma-Hamers
en B. Verboom.

Project: 2-7124 - Afbreekbaarheidsonderzoek

Projectleider: Ir. R. v.d. Berg

Datum van verschijnen: Maart 1980

Inhoud: I SAMENVATTING
II INLEIDING
III METHODEN
IV CHEMISCHE ANALYSE
V RESULTATEN
VI CONCLUSIES
VII REFERENTIES
TABEL
1 BIJLAGE

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

/MV

2291524

I. SAMENVATTING

In een ringonderzoek met de gemodificeerde OECD afbreekbaarheids-test is voor 4-nitrofenol de invloed van de herkomst van de ent en van de concentratie van de teststof op de afbraak onderzocht. 4-Nitrofenol kon in deze serie testen als goed afbreekbaar beoordeeld worden. De effecten van de herkomst van de ent (effluent van een afvalwaterzuivering, grondextract, slootslibextract en zeewater) beperkten zich tot een verschil in de tijdsduur tot een begin van afbraak. Slechts in een tweetal gevallen (20 mg/l 4-nitrofenol en slootslibextract als ent) was na 6 weken nog geen afbraak van 4-nitrofenol geconstateerd. Deze twee gevallen toonden ook een effect van de toegepaste teststofconcentratie: slootslibextract als ent geeft bij 10 mg/l wel, bij 20 mg/l geen afbraak. Op grond van de resultaten lijkt het zinvol inderdaad met meerdere teststofconcentraties te gaan werken, desnoods door de testen niet meer in duplo uit te voeren.

Het werken met enten van verschillende herkomst geeft zeker meer informatie maar vergt ook meer inspanning.

II INLEIDING

De Werkgroep "Bacteriën -bioafbreekbaarheid" van de NNI Commissie 311 147 05 besloot op haar bijeenkomst van 23 december 1979 tot een nieuw vergelijkend onderzoek naar de afbreekbaarheid in water van 4-nitrofenol.

Uit de resultaten van het eerste ring-onderzoek door het RIV (1), RID (2) en RIVO (3) en van een ringonderzoek van de EEG en de OECD (4) bleek dat 4-nitrofenol in zo'n 50 % van de gevallen volledig afgebroken werd, terwijl in de andere 50 % van de gevallen een volledige persistentie (gedurende de duur van de test) gevonden werd. In het NNI-ringonderzoek kon alleen het RIV afbraak van 4-nitrofenol constateren, terwijl het RIVO en het RID geen afbraak vonden.

Daarom werd besloten een nieuw ringonderzoek te starten met 4-nitrofenol als teststof. Natriumacetaat zou worden gebruikt als standaardstof en voor de toxiciteitstest.

In plaats van een test in duplo werd besloten tot een test in enkelvoud, met de teststof in twee concentraties en enten van diverse herkomst.

Andere wijzigingen ten opzichte van de opzet in het eerste ringonderzoek waren:

- één vaste incubatietemperatuur van 20 ± 1 °C,
- geen onderzoek naar chemische of fysische afbraak van 4-nitrofenol, omdat dit in het eerste ringonderzoek niet geconstateerd was,
- wekelijkse bemonstering gedurende vier en eventueel zes weken,
- de erlenmeyers worden afgesloten met een metalen kap om verdamping te voorkomen, terwijl toch genoeg zuurstof voor volledige afbraak aanwezig is,
- naast de DOC analyse wordt ook een 4-nitrofenol analyse uitgevoerd, omdat deze specifieke analyse veel gevoeliger is dan de DOC-analyse.

III. METHODEN

Aan 5,85 l bidest, waarvan het DOC-gehalte 2 mg/l was, werd 6 ml van elk van de volgende oplossingen A t/m D toegevoegd: (dat wil zeggen per 195 ml bidest 0,2 ml van A t/m D).

A.	KH ₂ PO ₄	0,850 g
	K ₂ HPO ₄	2,175 g
	Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	3,34 g
	bidest	100 ml
B.	NH ₄ Cl	2,5 g
	CaCl ₂	2,75 g
	FeCl ₃ . 6 H ₂ O	25 mg
	EDTA	38,5 mg
	bidest	100 ml

C. MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,25	g
bideest	100	ml
D. MnSO ₄ · 4 H ₂ O	39,9	mg
H ₃ BO ₃	57,2	mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	42,8	mg
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	34,7	mg
gistextract	150	mg
bideest	1000	ml

De aldus verkregen oplossing werd gesteriliseerd door filtratie via een 0,2 µm membraanfilter van cellulose nitraat. Vervolgens werd met behulp van een doseerapparaat 195 ml in gesteriliseerde erlemmeyers van 600 ml gebracht, die afgesloten waren met een steriestop omwikkeld met aluminiumfolie. Daarna werden volgens onderstaand schema de volgende via een 0,2 µm cellulose nitraat membraanfilter gesteriliseerde oplossingen toegevoegd:

1. 4-nitrofenol : 2,00 g/l bideest,
2. natriumacetaat : 3,42 g/l bideest.

Kolf	ml toegevoegd:		
	oplossing 1	oplossing 2	ent
1	1		2
2		1	2
3	1	1	2
4	2		2
5		2	2
6	2	2	2
7			2

Per serie werden 7 kolven geënt met 2 ml:

- A. effluent van de huishoudelijk afvalwaterzuiveringsinstallatie te Beverwijk (met een BOD₅²⁰ van 10-15 mg/l) nadat het 1 uur ter bezinking was laten staan.
- B. extract van tuingrond, op de volgende wijze bereid: aan 100 g tuinaarde werd 1 l drinkwater toegevoegd. Het geheel werd even geroerd en na 30 min. bezinken werd het supernatant over een grof papierfilter gefiltreerd. De eerste 200 ml van het filtraat werd weggegooid. De rest van het filtraat kon als ent gebruikt worden. Tot het moment van gebruik werd dit filtraat belucht.
- C. extract van slootslib (in plaats van rivierslib, in verband met problemen bij het nemen van het entmonster), dat op dezelfde wijze bereid werd als dat van de tuinaarde onder B.
- D. zeewater genomen aan de kop van de Visserijhaven te IJmuiden. Bij aanvang van de proef (na het enten) werd van iedere kolf een monster genomen (week t = 0). De monstergrootte was gedurende de gehele proef 10 ml. Vervolgens werden de kolven

op een schudmachine bij een temperatuur van $23,4 \pm 1$ °C en een schudsnelheid van 200 rpm in het donker geïncubeerd.

De volgende bemonsteringen werden na 1, 2, 3, 4, 5, en 6 weken uitgevoerd. De monsters werden direct geanalyseerd op DOC en 4-nitrofenol. De restanten werden ingevroren in verband met eventuele herhalingen van de analyses.

IV. CHEMISCHE ANALYSE

- De DOC analyse werd uitgevoerd met de Beckman Total Organic Carbon Analyzer, zoals beschreven in RIVO-rapport CA 79-11 (3). Het injectievolume was echter 30 µl en er werd een reeks standaardoplossingen van 0 - 30 g/m³ gebruikt.
- 4-Nitrofenol werd geanalyseerd volgens het voorschrift RvdB-80-01: Fotometrische analyse van p-nitrofenol in water (bijlage I).

V. RESULTATEN

De resultaten van de afbreekbaarheidstest met 4-nitrofenol zijn weergegeven in tabel I. Gegeven zijn de opgelost organisch koolstof concentratie (DOC) en de 4-nitrofenol concentratie (4-NP) in mg/l. De afbraakpercentages per meting zijn niet gegeven in verband met de variaties in de DOC-gehalten. De figuren 1 t/m 8 geven enkele karakteristieke afbraakcurven te zien, waarin de DOC concentraties gecorrigeerd zijn voor de blanco.

Uit tabel I volgt dat in de blanco-kolven op $t = 0$ veel meer organische stof aanwezig was (~ 8 mg/l DOC) dan op grond van de mediumbereiding met bidest (DOC ~ 2 mg/l) en de concentratie in de ent (toegevoegde DOC $\sim 0,2$ mg/l) werd verwacht. Dit kan het gevolg zijn van het gebruik van niet geheel schoon glaswerk, het gebruiken van filters van organisch materiaal en van een filtratieopstelling die normaal voor media met een DOC-gehalte van ongeveer 100 g/m³ gebruikt wordt.

Op grond van de DOC en 4-nitrofenol gehalten van de series van 20 mg/l 4-nitrofenol met slootslibextract als ent (series C 4 en C 6) kan geconcludeerd worden dat verdamping van de vloeistof vrijwel niet plaatsgevonden heeft, ondanks het feit dat niet van metalen kappen maar van met aluminiumfolie afgedekte steriestoppen gebruik gemaakt is.

Ten aanzien van de resultaten van de proef kunnen de volgende opmerkingen gemaakt worden:

- in alle testen was natrium-acetaat na één week verdwenen, zodat niet van een remming van de afbraak binnen deze termijn door 4-nitrofenol gesproken kan worden.
- in 14 van de 16 testen werd volledige afbraak van 4-nitrofenol vastgesteld, zowel met behulp van de 4-nitrofenol als van de DOC analysegegevens.
- de testen waarbij, ook na 6 weken, nog geen 4-nitrofenol afbraak geconstateerd was waren die met ongeveer 20 mg/l 4-nitrofenol en slootslibextract als ent.
- het is bijzonder opmerkelijk dat in een tweetal gevallen (series A 1/A 4 en D 1/D 4) eerder volledige afbraak bij 20 mg/l 4-nitrofenol gevonden werd dan enige afbraak bij 10 mg/l. Dit zou kunnen wijzen op een snellere inductie van de benodigde enzymen bij hogere concentraties.

- in een tweetal gevallen (series C 1/C 3 en D 4/D 6) werd eerder volledige afbraak van 4-nitrofenol gevonden in de test met deze stof als enige bron dan in de toxiciteitstest tezamen met acetaat.
- de lagfase, die duurt van het moment van enten tot de afbraak begint, is het kortst bij grondextract als ent, gevolgd door effluent, zeewater en het slootslibextract. Een verklaring hiervoor kan zijn een veel hoger aantal micro-organismen in grondextract dan in effluent of zeewater of een snellere adaptatie van de aanwezige micro-organismen.
- bij de series C 3 (figuur 5) en D 6 (figuur 8) is een duidelijk gescheiden afbraakproces te zien: eerst de afbraak van natriumacetaat en vervolgens die van 4-nitrofenol. In vier andere toxiciteitsseries (A 3, A 6, B 3, B 6) vindt binnen één week zowel volledige afbraak van natriumacetaat als van 4-nitrofenol plaats.
- uit de verkregen gegevens is weinig op te maken over de snelheid van de afbraak. Als afbraak plaatsvindt is alles ook binnen één week afgebroken.

VI CONCLUSIES

- De acetaatafbraak werd bij geen enkele ent geremd door de toegepaste 4-nitrofenol concentraties van 10 en 20 mg/l voor zover deze beoordeling na één week nog mogelijk is.
- 4-Nitrofenol is op grond van deze testresultaten als goed afbreekbaar te beoordelen, slechts in 12,5 % van de testen werd geen afbraak geconstateerd.
- Beoordeling van de tijdsduur van enten tot begin van de afbraak levert in volgorde van toenemende duur:
grondextract - effluent - zeewater - slootslibextract,
misschien samenhangend met de concentratie van de micro-organismen in de ent of een sneller adaptatievermogen.
- Op grond van deze testopzet zijn moeilijk gegevens over de snelheid van de afbraak te verkrijgen. Voor "goede" kinetiekgegevens moeten toch meer bemonsteringen uitgevoerd worden.
- Het lijkt zinvol meerdere enten te gebruiken bij de beoordeling van de afbreekbaarheid van een stof. Dit volgt niet eenduidig uit alle resultaten omdat bij de vorige ringtest (1, 2, 3) ook ongeveer 20 mg/l 4-nitrofenol gebruikt werd en in twee van de drie onderzoeken met effluent als ent geen afbraak geconstateerd werd.
- Bijzonder nuttig is het inzetten van meerdere concentraties van de teststof. Bij slootslibextract als ent werd bij 20 mg/l 4-nitrofenol geen en bij 10 mg/l wel volledige afbraak gevonden, terwijl 20 mg/l 4-nitrofenol niet toxisch was voor de acetaatafbraak; mogelijk was dit wel het geval voor de 4-nitrofenolafbraak.
- De totale proef heeft aan inspanning 8 - 10 mandagen gekost (of ongeveer f 4.000,=).

VII. REFERENTIES

1. RIV-rapport: Afbreekbaarheid van para-chloorfenol en para-nitrofenol - Dr. Th.J.M. Pouw en J. Stoltenkamp, 1979.
2. Mondelinge mededeling Drs. H.J. Kool - RID op de vergadering van 23-12-1979.
3. RIVO-rapport CA 79-11: Afbreekbaarheidsonderzoek met de OECD-Screeningstest - R. v.d. Berg, J. Buntsma-Hamers en B. Verboom.
4. Final Reports of the CEC and OECD Interlaboratory Programmes on "Methods for Testing Biodegradability of Chemicals in Water" - 1979.

TABEL I - Afbraak van 4-nitrofenol en natriumacetaat door enten van verschillende herkomst - DOC en 4-nitrofenol (4 NP) in mg/l.

Tijd in weken	Serie 1		Serie 2	Serie 3		Serie 4		Serie 5	Serie 6		Serie 7
	DOC	4 NP	DOC	DOC	4 NP	DOC	4 NP	DOC	DOC	4 NP	DOC
SERIE A: EFFLUENT											
0	16,2	8,7	15,3	18,4	9,4	17,5	19,3	22,2	34,9	18,9	7,5
1	16,6	8,9	10,3	11,4	0,0	7,5	0,0	7,9	10,2	0,0	9,4
2	11,5	7,9	6,4	7,9	0,0	7,1	0,0	9,3	8,9	0,0	6,8
3	4,8	0,0	4,8	5,1	0,0	4,7	0,0	5,4	4,5	0,0	5,1
4	6,1	0,0	6,0	5,3	0,0	5,3	0,0	5,6	5,5	0,0	5,2
SERIE B: GRONDEXTRACT											
0	13,5	7,9	16,3	19,2	9,4	19,0	18,5	18,8	35,0	18,7	8,6
1	5,9	0,0	9,4	9,0	0,0	8,2	0,0	8,3	6,1	0,0	7,3
2	7,8	0,0	8,9	6,8	0,0	7,3	0,0	6,9	8,2	0,0	7,6
3	5,6	0,0	5,6	5,0	0,0	4,9	0,0	4,1	5,0	0,0	4,0
4	6,8	0,0	6,8	6,2	0,0	5,7	0,0	6,8	6,5	0,0	6,8
SERIE C: SLOOTSLIBEXTRACT											
0	12,4	7,2	15,7	18,4	9,5	18,6	19,3	17,5	34,3	19,1	8,1
1	11,2	5,3	7,3	12,4	9,7	19,5	19,5	7,2	19,2	19,1	6,6
2	7,6	0,0	5,7	11,1	9,5	18,5	19,6	6,6	17,4	19,6	5,2
3	4,7	0,0	5,4	6,0	0,0	17,8	19,3	6,0	17,9	19,5	6,4
4	5,6	0,0	6,4	5,0	0,0	17,2	20,2	5,2	17,0	19,8	5,2
5						16,7	16,3		17,8	19,2	4,5
6						18,2	17,0		20,3	17,9	7,4
SERIE D: ZEEWATER											
0	13,1	7,6	16,5	18,7	9,6	18,4	19,1	20,9	32,8	19,1	9,4
1	12,1	7,7	7,5	14,1	10,1	8,3	0,0	9,0	19,6	19,6	7,3
2	9,6	6,1	8,6	6,0	0,0	8,4	0,0	9,5	17,8	15,4	7,3
3	4,1	0,0	4,2	4,0	0,0	4,2	0,0	4,5	5,1	0,0	3,9
4	5,4	0,0	5,3	5,5	0,0	4,8	0,0	5,5	5,7	0,0	5,2

Opmerkingen:

De series zouden ongeveer de volgende hoeveelheden stof moeten bevatten:

- Serie 1 : 10 mg/l 4 NP
- Serie 2 : 5 mg/l C-NaAc
- Serie 3 : 10 mg/l 4 NP + 5 mg/l C-NaAc
- Serie 4 : 20 mg/l 4 NP
- Serie 5 : 10 mg/l C-NaAc
- Serie 6 : 20 mg/l 4 NP + 10 mg/l C-NaAc
- Serie 7 : blanco

X as: tijd in weken Y as: conc. DOC of 4NP in mg/l

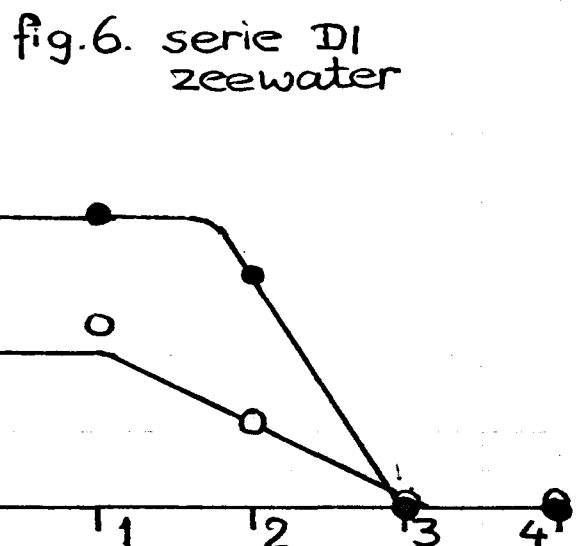
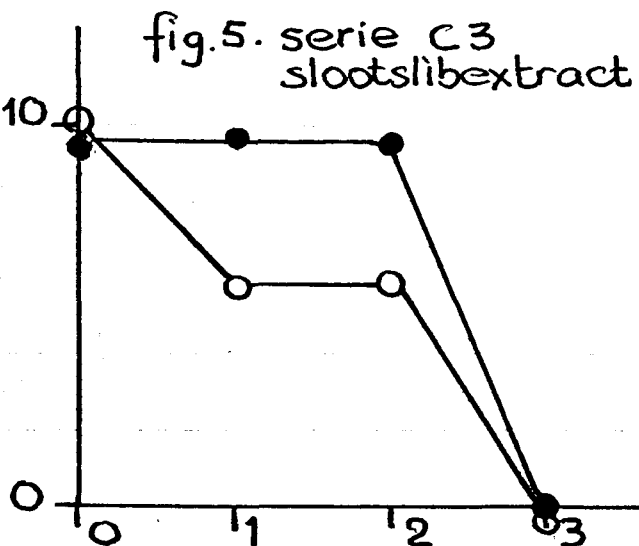
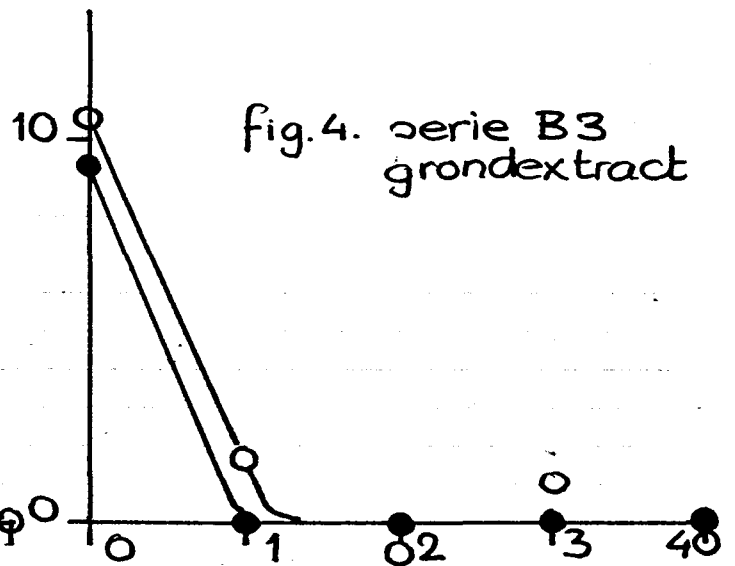
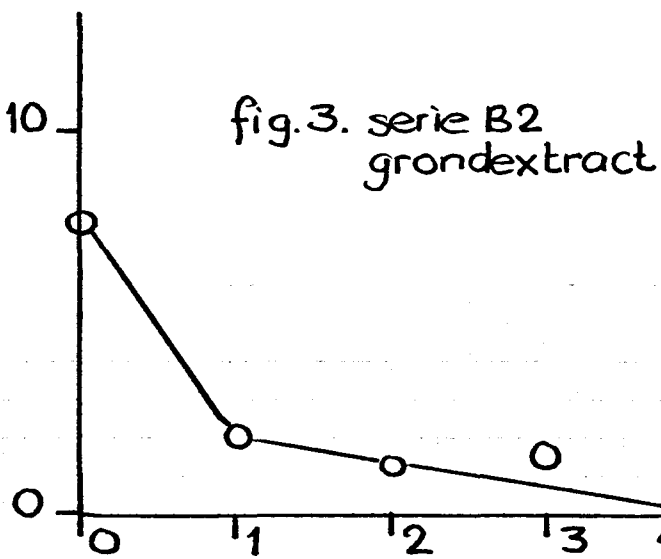
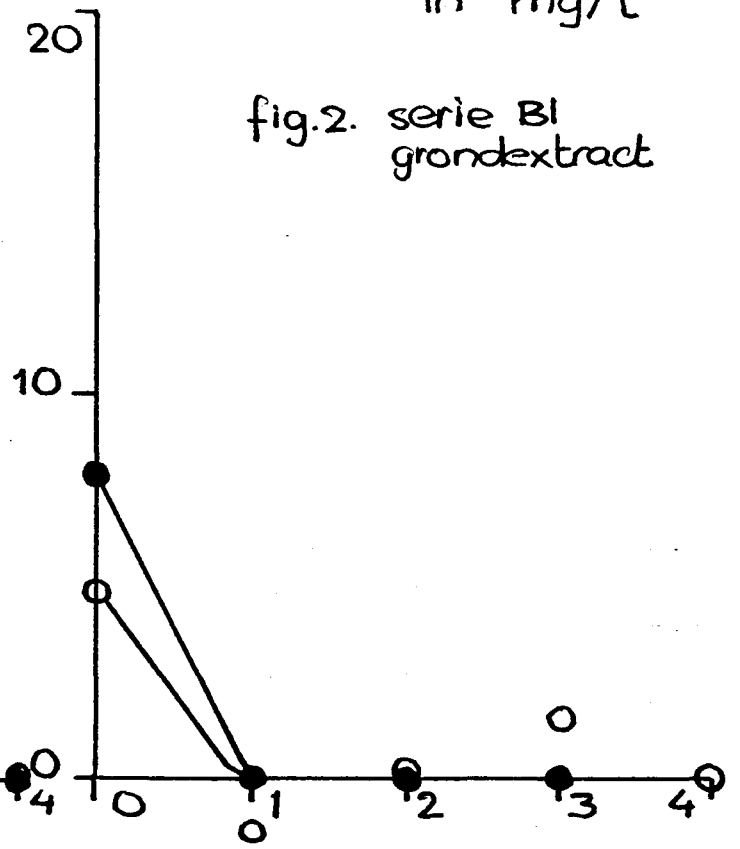
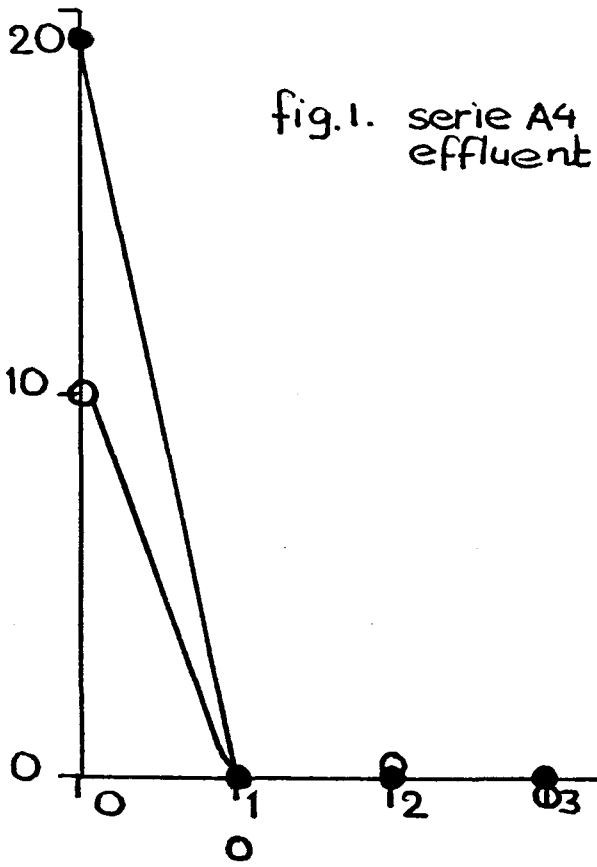


fig.7. serie C6
slootslibextract

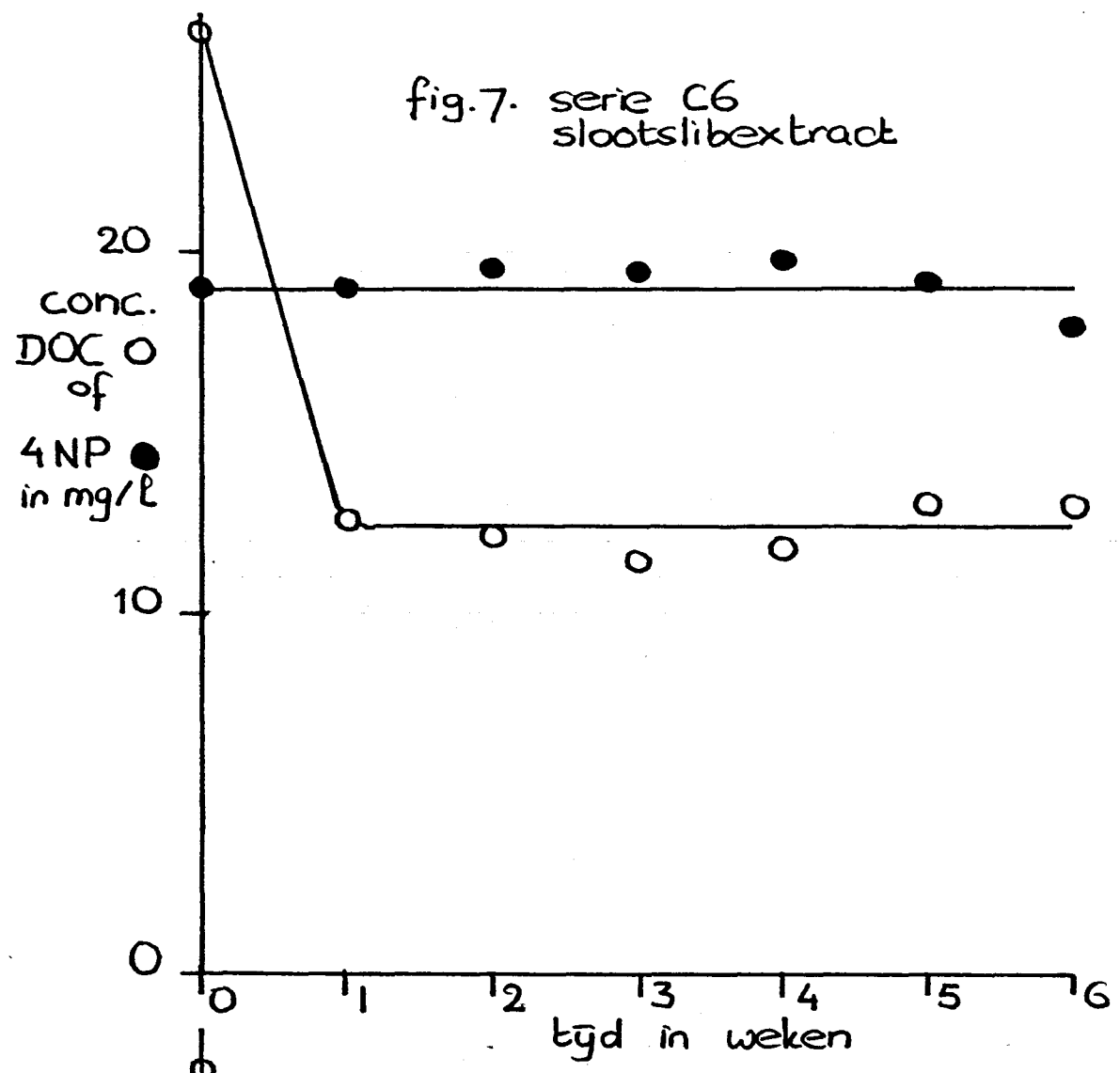
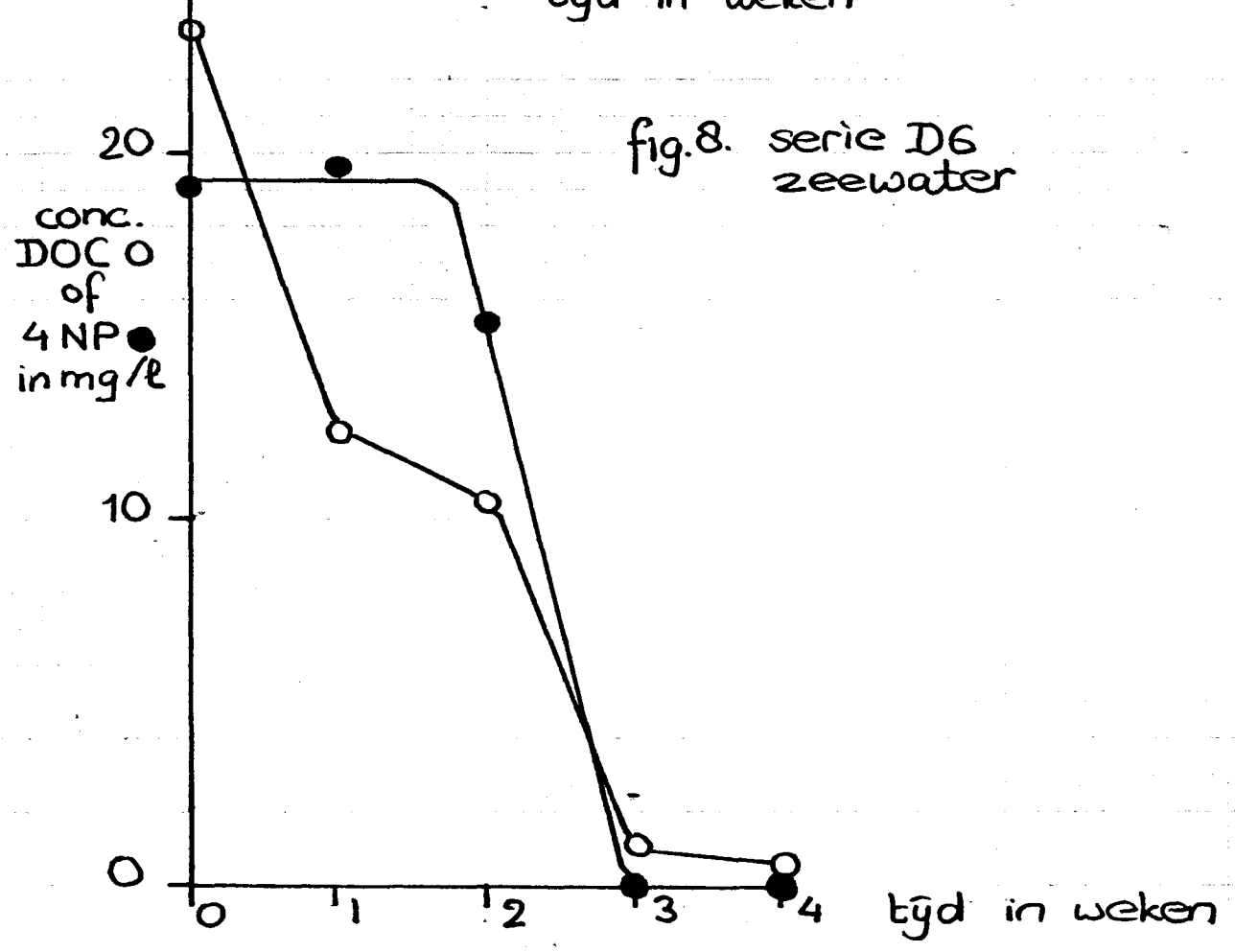


fig.8. serie D6
zeewater



Project 2-7124
 Afbreekbaarheidsonderzoek
 RvdB-80-01

DE FOTOMETRISCHE ANALYSE VAN PARA-NITROFENOL IN WATER

De analyse berust op het meten van de absorptie van de monsters in een alkalisch milieu bij ongeveer 400 nm.

In alkalisch milieu verschuift het zuur-base evenwicht van para-nitrofenol naar de gedissocieerde vorm, het fenolaation, dat in chinon-achtige grensstructuren voorkomt. Dit fenolaation heeft een absorptiemaximum bij 400 nm.

De pH van het monster legt samen met de pKa van het p-nitrofenol de verhouding ongedissocieerd-gedissocieerd vast en om > 99.9% in de fenolaatvorm te krijgen is minimaal een OH^- eindconcentratie van $5 \cdot 10^{-4} \text{N}$ nodig. In de praktijk worden hogere OH^- concentraties toegepast. (7.15)

Benodigde apparatuur en reagentia.

- . spectrofotometer instelbaar op ongeveer 400 nm of een fotometer met een filter van ongeveer 400 nm.
- . 10 mm lichtweg kuvetten.
- . oplossing 0.5 N NaOH.
- . stockoplossing van 200 mg/l p-nitrofenol in bidest, waaruit door opeenvolgende 10-voudige verdunningen oplossingen van 20, 2 en 0.2 mg/l gemaakt worden.

Methode

Afhankelijk van totaal monstervolume en het kuvetvolume kan de hoeveelheid het monster voor de analyse gekozen worden.

Het monster wordt in een reageerbuis gepipetteerd. Daaraan wordt per ml. monster 0.1 ml van 0.5 N NaOH toegevoegd ($[\text{OH}^-]$ eind 0.05 N.).

Na menging kan bij ongeveer 400 nm de absorptie gemeten worden. Als referentie dient een op dezelfde wijze behandeld blanco monster (bidest).

Naast de monsters worden een aantal standaard-oplossingen meegenomen, waarvan de gewenste concentraties afhankelijk zijn van de concentraties in de monsters. Een ijklijn van oplossingen met concentraties van 20, 10, 2, 1, 0.2 en 0.1 mg/l p-nitrofenol is meestal voldoende. Deze standaard-oplossingen kunnen uit de stockoplossing verkregen worden door verdunning.

De standaard-oplossingen worden verder op dezelfde manier behandeld als de monsters.

Uit de ijklijn en de gemeten absorpties van de monsters volgen direct de p-nitrofenolconcentraties van de monsters.

- Opm. 1. De te meten oplossing moet helder zijn, dus eventuele neerslagen (die bijvoorbeeld bij zeewatermonsters ontstaan na toevoeging van loog) moeten gecentrifugeerd worden.
2. Als de absorptie niet meer te meten is ($A > 2.0$) kan men het monster eerst verdunnen en daarna NaOH toevoegen óf minder monster nemen en meer NaOH toevoegen (bv. bij 30 mg/l: 0.5 ml monster + 0.5 ml 0.5 N NaOH).

Karakteristieken van de analyse:

- benodigde monsterhoeveelheid, afh. kuvetvolume en p-nitrofenolconcentratie.
- ondergrens: $\sim 0.05 \text{ mg/l}$ ($A_{400} \sim 0.005$).
- bovengrens (zonder verdunning): $\sim 20 \text{ mg/l}$ ($A_{400} \sim 2.0$).
- nauwkeurigheid: 0.02-0.05 mg/l.
- analyseduur: ± 25 monsters/uur.