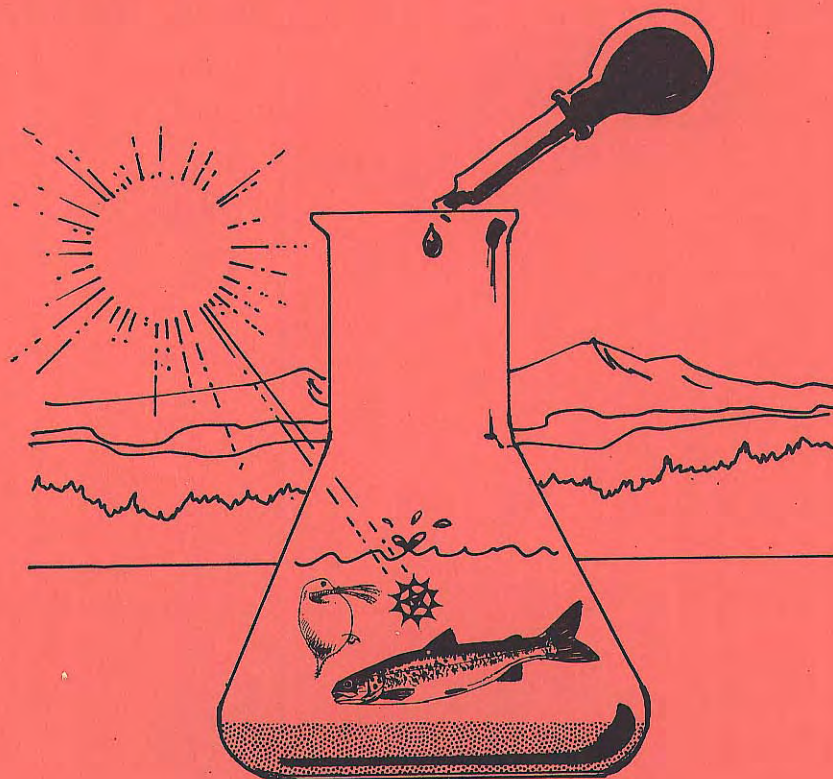




O-90142

# Biologisk testing av bindemiddel og brytningsvann ved produksjon av emulsjonsgrus



# NIVA – RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

**Hovedkontor**  
Postboks 69, Korsvoll  
0808 Oslo 8  
Telefon (02) 23 52 80  
Telefax (02) 39 41 89

**Sørlandsavdelingen**  
Televeien 1  
4890 Grimstad  
Telefon (041) 43 033  
Telefax (041) 43 033

**Østlandsavdelingen**  
Rute 866  
2312 Ottestad  
Telefon (065) 76 752  
Telefax (065) 78 402

**Vestlandsavdelingen**  
Breiviken 5  
5035 Bergen-Sandviken  
Telefon (05) 95 17 00  
Telefax (05) 25 78 90

Prosjektnr.: 0-90142
Undernummer:
Løpenummer: 2477
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:  BIOLOGISK TESTING AV BINDEMIDDEL OG BRYTNINGSVANN VED PRODUKSJON AV EMULSJONSGRUS	Dato: 30. November 1990
	Prosjektnummer: 0-90142
Forfatter (e): Egil Gjessing, Torsten Källqvist, Harry Efraimsen, Magne Grande, Randi Romstad.	Faggruppe: Biotest
	Geografisk område:
	Antall sider (inkl. bilag): 33

Oppdragsgiver: Statens vegvesen, Vegkontoret i Buskerud	Oppdragsg. ref. (evt. NTFN-nr.):
--	----------------------------------

Ekstrakt: Ved produksjon av emulsjonsgrus blandes bitumen med en emulgatorløsning. Når denne bitumen-emulsjonen iblandes grus, skilles det ut, brytningsvann, som kan gi negative miljøeffekter. Toksisiteten av emulgatorløsning, bitumenemulsjon og brytningsvann er testet på alger, dafnier og fisk. Resultatene viser at emulgatorløsningen er særdeles giftig overfor alle tre organismetyper. Eksempelvis gir en ca. 500.000 ganger fortykning 50 % dødelighet for alger og dafnier. Brytningsvannet er minst giftig overfor alger og fisk, men viser markert effekt overfor dafnier. Det samme gjelder bitumenemulsjon. Den antas at virkningsmekanismene for de tre prøvene er forskjellig overfor testorganismene. En sekundæreffekt av denne typen forurensningskomponenter i vannresipienter, er turbiditetsøkning og derved redusert lystilgang for organismer.
---


4 emneord, norske:


1. Emulsjonsgrus
2. Vegforurensing
3. Biologiske effekter
4. Bitumen

4 emneord, engelske:

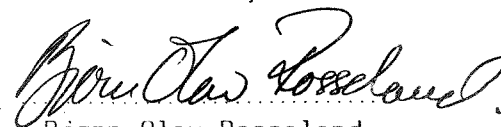
1. Emulsion gravel
2. Road pollution
3. Biological effects
4. Bitumen

Prosjektleder:

  
Egil Gjessing

  
Torsten Källqvist

For administrasjonen:

  
Bjørn Olav Rosseland

ISBN 82-577 -1790-8

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING  
Oslo

0 - 9 0 1 4 2

**BIOLOGISK TESTING AV BINDEMIDDEL OG BRYTNINGSVANN**  
**VED PRODUKSJON AV EMULSJONSGRUS**

Oslo, august 1990

Saksbehandler: Egil Gjessing

Medarbeidere: Torsten Källqvist  
Magne Grande  
Harry Efraimsen  
Randi Romstad

## F O R O R D

I tilknytning til produksjon av emulsjonsgrus kan rester av kjemikalier sige ut i tilstøtende vassdrag og ha mulige økologiske effekter. I møte mellom Statens Veglaboratorium og NIVA i Gaustadalléen 25 den 19/11-89, ble fremgangsmåter for en effektvurdering diskutert. I brev fra NIVA av 11/2-90 ble det fremlagt forslag til et prosjekt for å vurdere toksisitet av tre prøvevarianter: EMULGATORLØSNING, BITUMENEMULSJON og BRYTNINGSVANN. Som testorganismer ble det foreslått å anvende FISK (ørret), DAFNIER (Daphnia magna) og ALGER (Selenastrum capricornutum). I brev fra Veglaboratoriet av 2/8-90 ble NIVA's testopplegg og økonomiske ramme akseptert.

## INNLEDNING

Vegtrafikk representerer et meget omfattende og variert forurensningspotensial, både i luft og i vann. I perioden 1980 - 1983 ble det, etter oppdrag fra Statens Veglaboratorium gjennomført et omfattende forskningsprosjekt med sikte på å kartlegge forurensningstransporten fra motorveg til drikkevannskilder. Dette prosjektet konkluderte med at det er en betydelig tilrenning av forurensningskomponenter til vann fra vegtrafikk. Imidlertid viste resultatene at en overveiende del av disse forurensningene er knyttet til partikulært materiale og at dette i stor grad vil sedimentere i innsjøbassenger. Den hydrobiologiske aktivitet av disse forurensningene og de hydroøkologiske konsekvenser er imidlertid bare i mindre grad vurdert. Vegmyndighetene har i de senere år i økende grad satt søkelyset på de miljømessige sider av vegbygging, vegvedlikehold og trafikk.

I forbindelse med produksjon av emulsjonsgrus, som i stor grad gjøres i "felt", får man et avfallsprodukt, "Brytningsvann". Dette vannet kan nå frem til nærliggende vann og vassdrag. Hensikten med dette prosjektet er å vurdere toksisiteten av de viktigste komponentene som inngår i produksjonen av emulsjonsgrus m.a.o. emulgatorløsning, bitumenemulsjon samt avfallsproduktet, brytningsvannet.

## KARAKTERISERING AV PRØVENE

### Emulgatorløsning

Blakket, noe tykkflytende hvit væske med aromatisk lukt. Innblandes godt i vann, turbiditet ved fortykning 1:200  $\approx$  8 NTU (appendiks 4).

### Bitumenemulsjon

Tykkflytende svartbrun væske, med svak tjærelignede lukt. Er lite blandbar med vann. Innblanding i vann i konsentrasjon 1:100.000, ga et gulbrunt turbid vann med turbiditet  $\approx$  8 NTU (se appendiks 4).

### Brytningsvann

Middels tykkflytende (noe mindre tykkflytende enn Bitumenemulsjon) svartbrun væske med samme lukt som bitumenemulsjon. Ved innblanding i vann i konsentrasjon 1:50.000 ble resultatet en brun turbid suspensjon med turbiditet  $\approx$  8 NTU (se appendiks 4).

## TESTMETODER

Detaljer ved testmetodene er beskrevet i testrapportene i vedlegg 1-3, samt i refererte standarder. En kort beskrivelse av testprinsippene blir gitt nedenfor.

### Toksisitet, alger

Giftighetstesten med alger ble utført i henhold til OECD Guidelines test nr. 201, med grønnalgen Selenastrum capricornutum som testorganisme. Algenes vekst i et vekstmedium tilsatt ulike konsentrasjoner av prøven ble undersøkt over tre døgn. Vekstmediet inneholder uorganiske plantenæringsstoffer og sporstoffer og har alkalitet 0.04 meq./l.

Kulturene ble inkubert på et gyngbord med kontinuerlig belysning fra lysstoffrør av daglys-type. Innstrålingen var ca. 80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  og temperaturen 20°C. Veksten ble målt ved telling av algeceller med en elektronisk partikkelteller; Coulter Multisizer.

På grunn av høyt "olje partikkelinnhold" kunne den normale testprosedyren ikke brukes ved testene av bitumenemulsjon og brytningsvann. For testing av disse prøvene ble algene immobilisert ved innstøping i alginatkuler. Hver kule, som hadde et volum på ca. 0.08 ml, inneholdt ca.  $120 \times 10^3$  celler av Selenastrum capricornutum. Alginatkulene ble plassert i plastbegere som ble tilsatt vekstmedium med ulike konsentrasjoner av brytningsvann eller emulsjon. Algekulene var bare såvidt dekket av mediet slik at skyggeeffekten av partiklene ble ubetydelig. Mediet ble skiftet ut hver dag. Begrene ble plassert på gyngbord under samme betingelser som ved den normale testprosedyren. Etter tre døgn ble celledtallet i to alginatkuler fra hvert beger bestemt. Alginatkulene ble løst opp i 5% Na-hexametafosfat og algene tallet med partikkelteller.

Algenes veksthastighet ble beregnet ut fra økningen i celledtall i kulturene over tre døgn fra start. Veksthastighetene ble normalisert mot veksthastigheten målt i kontrollkulturer og transformert til probit-verdier. Dose/responskurvens forløp samt konsentrasjonene som gir 10%, 50% og 90% reduksjon av veksthastigheten ( $\text{EC}_{10}$ ,  $\text{EC}_{50}$  og  $\text{EC}_{90}$ ), ble bestemt ved lineær regresjon av probit-verdiene mot logaritmen for konsentrasjonen.

### Toksisitet, dafnier

Giftighetstesten med vannloppen Daphnia magna ble utført i henhold til OECD Guidelines nr. 202 og ISO 6341. Organismen blir holdt i kultur i laboratoriet. Unge individer (<24 timer) ble brukt i testen. Det ble brukt 20–25 forsøksdyr i hver konsentrasjon av avløpsvannet som ble fortynnet i naturlig innsjøvann (Maridalsvatn) tilsatt mineralsalter. Antall overlevende dyr i hver konsentrasjon ble bestemt etter 24 og 48 timer. Den konsentrasjon som ga 50% dødelighet etter hhv. 24 og 48 timer ble beregnet etter probittransformering.

### Toksisitet, ørret

Testen ble utført i samsvar med OECD Guidelines 203. Som testorganisme ble årsyngel av ørret, med en middelvikt på 1.8 g benyttet. Forsøkene ble utført i glassakvarier med 10 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon. Avløpsvannene ble fortynnet i naturlig innsjøvann (Maridalsvatn). Fiskene ble overført til ny løsning hvert døgn. Dødelighet ble observert minimum to ganger pr. dag i 4 døgn. 4d-LC<sub>50</sub> (konsentrasjon som ga 50% dødelighet etter 4 døgn) ble bestemt etter plotting av dødelighet mot konsentrasjon.

## RESULTAT OG KOMMENTARER

Resultatene av giftighetstestene er sammenstilt i appeniks 1 (alger), appendiks 2 (dafnier) og appendiks 3 (fisk). Tabellen nedenfor sammenfatter resultatene av giftighetstestene angitt som EC<sub>50</sub>-verdier for alger og LC<sub>50</sub>-verdier for dafnier og fisk.

Tabell I. Giftvirkninger av emulgatorløsning, bitumenemulsjon og brytningsvann på organismer i vann.

Prøve	EC <sub>50</sub> alger	LC <sub>50</sub> dafnier	LC <sub>50</sub> ørret	
Emulgatorløsning	0.0021	0.0015	0.023	ml/l
Bitumenemulsjon	>1	0.064	0.23	g/l
Brytningsvann	38	0.045	0.35	ml/l

Giftighetstestene viser tildels store forskjeller i følsomhet hos de ulike testorganismene. Forskjellene skyldes trolig ulike virkningsmekanismer og dessuten at testorganismene er mer eller mindre utsatt for disse mekanismene.

Emulgatorløsningen hadde en meget kraftig gifteffekt, særlig på alger og dafnier. 50% effekt på disse organismene ble registrert ved konsentrasjonene på 0.0021 resp. 0.0015 ml/l (480,000 - 670,000 gangers fortykning). Konsentrasjonen 0.0008 ml/l (1,250,000 gangers fortykning) reduserte algenes veksthastighet med 10%. Algenes vekstforløp i ulike konsentrasjoner av emulgator tyder på at emulgatoren hadde en meget hurtig effekt på algene som førte til at en del av cellene ble drept, mens de som overlevde vokste med normal veksthastighet allerede etter et døgn. Dette reaksjonsmønster er tidligere beskrevet også for oljedispergeringsmidler.

Fisken var mindre følsom overfor emulgatorløsningen; dødelighet ble registrert først ved konsentrasjonen over 0.02 ml/l og  $LC_{50}$  var 0.023 ml/l.

Bitumenemulsjonen virket sterkest på dafniene.  $LC_{50}$ -verdien er beregnet til 0.064 g/l (16,000 gangers fortykning). For ørret ble det registrert økt dødelighet fra 0.2 g/l og  $LC_{50}$  var 0.23 g/l. Emulsjonen farger vannet brunsvart selv ved meget lave konsentrasjoner og vil derfor påvirke algenes vekst ved å redusere lystilgangen til fotosyntese. Algetestene måtte derfor utføres med en modifisert metode, hvor algene ble støpt inn i alginat-kuler. (Se under avsnitt om testmetoder). Denne teknikken tillater transport av komponenter i løsning ved diffusjon inn og ut av alginat-matriksen. Tester med ulike plantevernmidler har vist at immobiliserte alger i alginat påvirkes ved de samme giftkonsentrasjonene som "frie" algeceller.

Det ble ikke funnet signifikant hemming av algenes veksthastighet i bitumenemulsjon opp til konsentrasjonen 1 g/l. Den lave følsomheten for bitumen-emulsjon hos alger i forhold til dafnier og fisk tyder på at emulsjonen inneholder lite vannløselige giftstoffer. Giftvirkningen på dafnier og fisk skyldes trolig at emulsjonen har en fysisk påvirkning av organismene. Dafniene får sin føde ved å filtrere partikler ut av vannet. De små oljepartiklene i emulsjonen som har høy affinitet til overflater blir fanget opp i dafnienes "filter", som da blir klebet igjen. Effektene på fisk kan skyldes at oljeemulsjonen fester seg på gjellene.

Brytningsvannet har tildels samme egenskaper som emulgatorløsning, men konsentrasjonen av bitumenemulsjon er betydelig lavere. Dafniene var mest følsomme, med  $LC_{50}$ -verdien 0.045 ml/l (2,200 gangers fortykning). At dafniene således var mer følsomme for brytningsvannet enn for emulsjonen tyder på at effekten ikke skyldes bare emulgert bitumen. Vannløselige komponenter har trolig bidratt til giftvirkningen. Kanskje frigjøres en del av emulgatoren ved brytningen slik at brytningsvannet inneholder mer emulgator i vannløsning enn emulsjonen.



Den forholdsvis lave giftigheten på alger i alginat-kuler tyder imidlertid ikke på høy konsentrasjon av emulgator i brytningsvannet.

Effekter av brytningsvannet på fisk ble funnet ved ca. 10 ganger høyere konsentrasjon enn for dafnier.  $LC_{50}$ -verdien ble bestemt til 0.35 ml/l.

Det bør bemerkes at de stoff-konsentrasjoner som er angitt er nominelle, d.v.s. vekt eller volum stoff tilsatt/l til de ulike testsystemene. Bitumenemulsjonen har en meget sterk affinitet til overflater og festet seg derfor delvis til glassveggene i de beholdere som ble brukt ved testene. Det betyr at angitt mengde stoff var tilstede i testbeholden, men testorganismens eksponeringskonsentrasjon (i vannfasen) kan ikke defineres eksakt.

Resultatene av de biologiske testene viser at utslipp av ren emulgatorløsning til en ferskvannsresipient vil gi akutte gifteffekter ned til ca.  $10^6$  gangers fortykning. Ved utslipp av bitumen-emulsjon eller brytningsvann vil de fysiske effektene av at emulsjonen fanges opp på steiner, vegetasjon og organismer sannsynligvis være de viktigste. Spesielt utsatte organismer er de som får sin føde ved uselektiv filtrering av partikler fra vannfasen. Dette gjelder enkelte krepsdyr og insektlarver. Veksten av alger og høyere planter vil i tillegg kunne reduseres p.g.a. redusert lystilgang som følge av høy turbiditet. Ved vedvarende utslipp av bitumenemulsjon eller brytningsvann vil dette kunne ha betydning for forholdene i resipienten.

## RESULTATENE I SAMMENLIGNING MED ANDRE TILSVARENDE DATA

### Toksisitet

Nedenfor, i Tabell II, er gitt toksisitetsdata for noen kjente miljøgifter.

Tabell II. Toksisitet for DDT, Lindan, Pentaklorfenol, 1,4-Diklorbenzen og fenol overfor alger, dafnier og laksefisk.

	Alger EC50	Dafnier LC50	Laksefisk LC50
DDT 1)	0.001	0.0036	0.007
Lindan 1)	0.3	--	0.022
Pentaklorfenol 1)	0.1	0.48	0.048
1,4-Diklorbenzen 1)	0.1	1.6	1:2
Fenol	100 <sup>4)</sup>	12.6 <sup>3)</sup>	9.7 <sup>2)</sup>

Sammenligningen kompliseres ved at de testede prøvene er blandinger eller fortynninger. Et annet utgangspunkt kan derfor være den fortynning som gir 50% effekt på testorganismene. (Tabell III):

Tabell III. Nødvendig fortynning for å oppnå 50% giftvirkning på Alger, Dafnier og Fisk:

	Emulgatorløsning	Bitumenemulsjon	Brytningsvann	Fenol
Alger	480.000	< 1.000	26	10.000
Dafnier	670.000	16.000	22.000	79.365
Fisk	43.480	4.350	2.857	103.093

En slik sammenligning med f.eks. fenol, viser at emulgatorløsningen er giftigere overfor alger og dafnier og følgelig må fortynnes mer for at effekten skal reuseres til 50%-nivået. Tilsvarende er for fisk, derimot, fortynningsbehovet mindre.

For brytningsvann og bitumenemulsjon er fortynningsbehovet lavere enn for fenol.

For de øvrige miljøgiftene gitt i Tabell II er giftigheten av 1,4-diklorbenzen overfor alger og dafnier sammenlignbar med den emulgatorløsningen som er testet. De øvrige miljøgiftene er gjennomgående mer giftige enn de kjemikaliene som er testet i denne undersøkelsen.

### Turbiditet

I Tabell IV nedenfor er gitt den fortynning som er nødvendig for å oppnå en turbiditet omkring 8 NTU (se forøvrig appendiks 4).

Tabell IV. Turbiditet ved ulike fortynninger, sammenlignet med turbiditeten i endel norske vannforekomster.

	Fortynning	Turbiditet (NTU)
Emulgatorløsning	1:200	7.8
Bitumenemulsjon	1:100.000	7.6
Brytningsvann	1:50.000	8.5
Frøylandsvann (eutrof) 5)	---	9.1
Bøvertunvatn (brepåvirket) 5)	---	6.9
Orrevann (eutrof) 5)	---	6.2
Gjersjøen (svakt eutrof) 5)	---	2.0
Maridalsvannet (Oslos vannkilde) 5)	---	0.6

## REFERANSER

1. Kemikalieinspektionen 1989. Miljøfarliga ämnen. Exempellista och vetenskaplig dokumentation. Rapport från Kemikalieinspektionen 10/89.
2. Hodson P.V. 1985.: A comparison of the acute toxicity of chemicals to fish, rat and mice. J. Appl. Toxicol. 5, 220.
3. Holcombe G.W. et. al. 1987: Simultaneous multiple species testing. Acute toxicity of 13 chemicals to 12 diverse freshwater amphibian, fish and invertebrate families. Arch. Environm. Confam. Toxicol. Vol. 16, 687.
4. Källqvist, T.K. Ormerod og O. Sortkjær. 1981: Miljøgifters virkning på planktonalger - bakterier og andre, heterotrofe mikroorganismer. NIVA-rapport F 409.
5. Nicholl M. 1984: Lys, siktedyp, turbiditet og farge (Vennerød, red.): Vassdragsundersøkelsen. En metodebok i limnologi, Universitetsforlaget.

**A P P E N D I K S 1**  
**toksisitetstester - alger**

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

## TOKSISITETSTEST MED ALGER

TESTMETODE: OECD Guidelines 201

TESTSTOFF: Emulgatorløsning

TESTALGE: Selenastrum capricornutum, klon NIVA CHL1, isolert fra Nitelva, Romerike. Kulturen blir vedlikeholdt i semikontinuerlig kultur i vekstmediet 10% Z8 (Staub 1961, Källqvist 1984)

TESTDATA:

Tidsrom for test: 18.7.90 - 21.7.90

Testkonsentrasjoner: 0.56, 1.0, 1.8, 3.2 µl/l

Vekstmedium: 10% Z8

Testoppsett: 50 ml kulturer i 100 ml ståkolber inkubert på gyngebord. Tre parallelle kulturer for hver konsentrasjon og 6 kontrollkulturer.

Lys: 80 µE/m<sup>2</sup>/s fra Osram "hvit" lysstoffrør. Temperatur: 20 °C.

Biomassebestemming: Telling av celletall med Coulter Multisizer.

Beregninger: Gjennomsnittlig veksthastighet beregnes fra økningen i celletall i løpet av 3 døgn. (ISO/DIS 8692). Veksthastigheten i hver kultur blir normalisert i forhold til kontrollkulturer og transformert til probit. Responsforløpet med EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub> og EC<sub>90</sub>-verdier blir fastlagt ved lineær regresjon av probitverdiene mot logaritmen for konsentrasjonen. (EC<sub>x</sub>= den konsentrasjon som gir x% hemming av veksthastigheten).

RESULTAT: Konsentrasjon/responsdiagram er vist i figur 1. Effektkonsentrasjonene med konfidensintervall er:

	kons. µl/l	95% konfidensintervall	
EC <sub>50</sub>	2.1	1.7	- 2.6
EC <sub>10</sub>	0.8	0.6	- 1.0
EC <sub>90</sub>	5.5	3.4	- 8.7

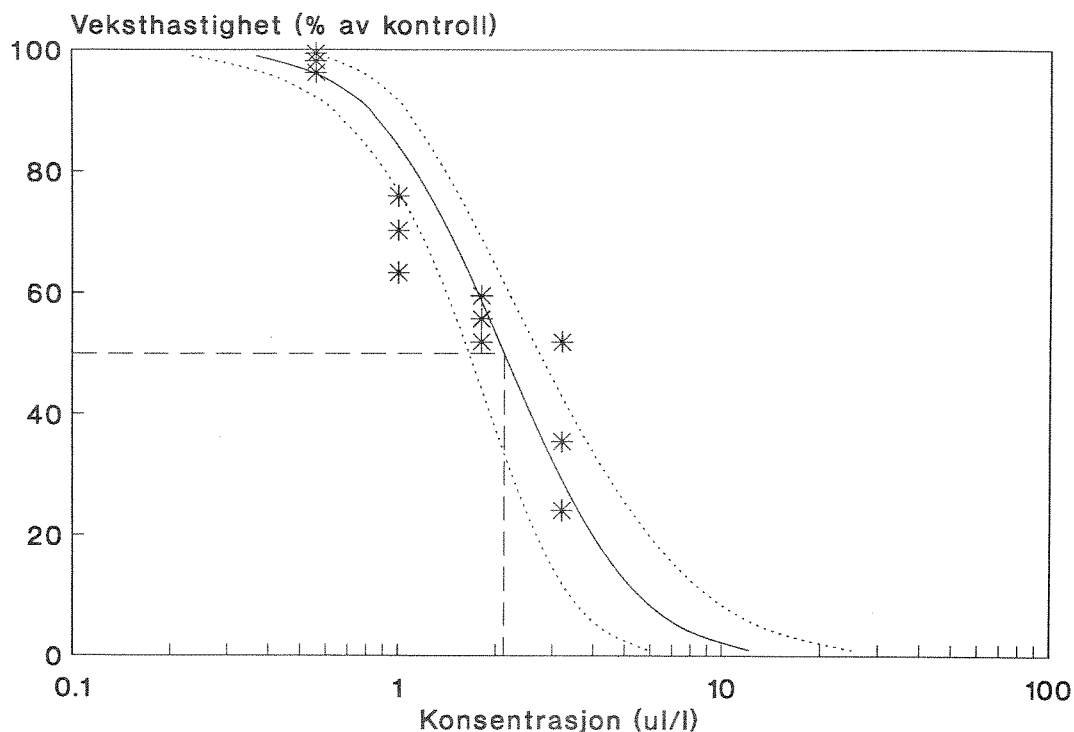


Fig. 1. Effekt av emulgatorløsning på vekst av Selenastrum capricornutum.

Testansvarlig:  
Torsten Källqvist

REFERANSER: OECD 1981: Guidelines for Testing of Chemicals, no. 201

ISO/DIS 8692. Algal Growth Inhibition Test.

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

Källqvist, T. 1984: Biotester i Vannerød, K. (red.): Vassdragsundersøkelser, en metodebok i limnologi. Universitetsforlaget. s. 252-267.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

**TOKSISITETSTEST MED ALGER**

TESTMETODE: OECD Guidelines 201 (Modifisert)

TESTSTOFF: Bitumen emulsjon

TESTALGE: Selenastrum capricornutum, klon NIVA CHL1, isolert fra Nitelva, Romerike, immobilisert i Na-alginatkuler,  $120 \cdot 10^6$  celler/kule.

TESTDATA:

Tidsrom for test: 16.7.90 - 19.7.90

Testkonsentrasjoner: 0.1, 0.21, 0.46, 1.0 g/l

Vekstmedium: 10% Z8

Testoppsett: ca. 10 ml medium i 30 ml begere, inkubert på gyngebord. Fem alginatkuler i hvert beger.

Lys: 80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  fra Osram "hvit" lysstoffrør. Temperatur: 20 °C.

Biomassebestemming: Telling av celletall med Coulter Multisizer, etter oppløsning av alginatkulene i 5% Na-hexametafosfat.

Beregninger: Gjennomsnittlig veksthastighet beregnes fra økningen i celletall i løpet av 3 døgn. (ISO/DIS 8692). Veksthastigheten i hver kultur blir normalisert i forhold til kontrollkulturer og transformert til probit. Responsforløpet med  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{10}$  og  $\text{EC}_{90}$ -verdier blir fastlagt ved lineær regresjon av probitverdiene mot logaritmen for konsentrasjonen. ( $\text{EC}_x$ = den konsentrasjon som gir x% hemming av veksthastigheten).

RESULTAT: Konsentrasjon/responsdiagram er vist i figur 2. Ingen signifikant hemming av algeveksten kan påvises. Effektkonsentrasjoner kan ikke beregnes.

	g/l	95% konfidensintervall
$\text{EC}_{50}$	>1	-
$\text{EC}_{10}$	>1	-
$\text{EC}_{90}$	>1	-



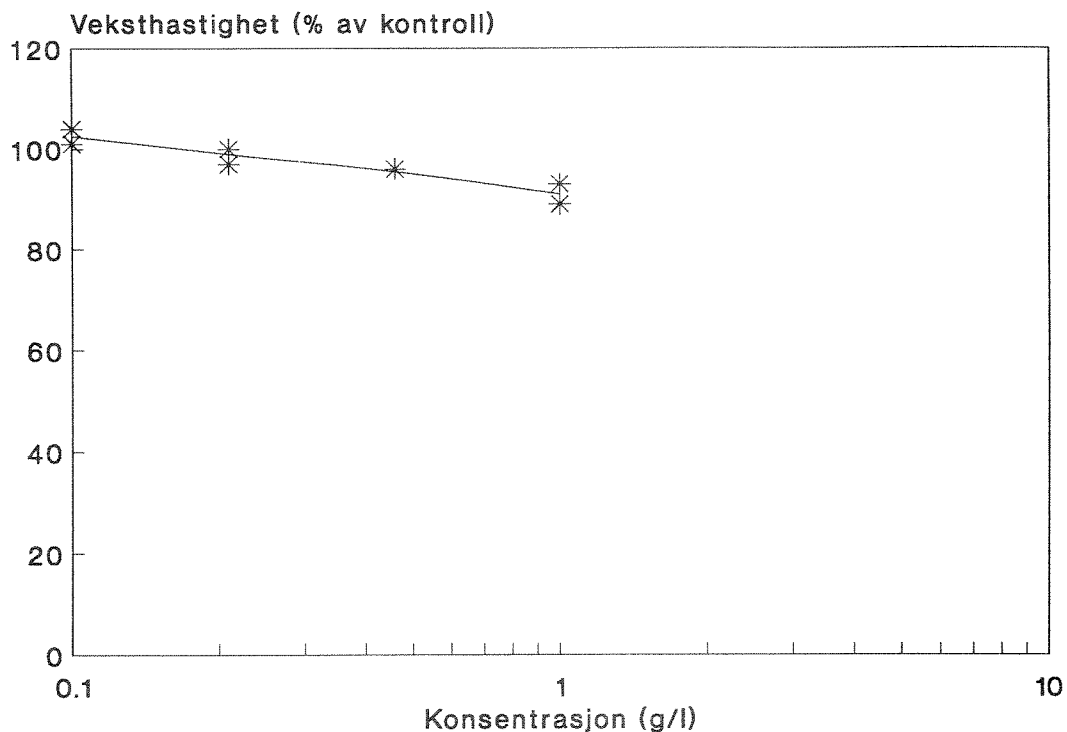


Fig. 2. Effekt av bitumenemulsjon på vekst av Selenastrum capricornutum.

Testansvarlig:  
Torsten Källqvist

REFERANSER: OECD 1981: Guidelines for Testing of Chemicals, no. 201

ISO/DIS 8692. Algal Growth Inhibition Test.

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

Källqvist, T. 1984: Biotester i Vennerød, K. (red.): Vassdragsundersøkelser, en metodebok i limnologi. Universitetsforlaget. s. 252-267.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

**TOKSISITETSTEST MED ALGER**

TESTMETODE: OECD Guidelines 201 (Modifisert)

TESTSTOFF: Brytningsvann

TESTALGE: Selenastrum capricornutum, klon NIVA CHL1, isolert fra Nitelva, Romerike, immobilisert i Na-alginatkuler,  $120 \cdot 10^6$  celler/kule.

TESTDATA:

Tidsrom for test: 16.7.90 - 19.7.90

Testkonsentrasjoner: 4.6, 10, 21, 46 ml/l

Vekstmedium: 10% Z8

Testoppsett: ca. 10 ml medium i 30 ml begere, inkubert på gyngebord. Fem alginatkuler i hvert beger.

Lys: 80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  fra Osram "hvit" lysstoffrør. Temperatur: 20 °C.

Biomassebestemming: Telling av celletall med Coulter Multisizer, etter oppløsning av alginatkulene i 5% Na-hexametafosfat.

Beregninger: Gjennomsnittlig veksthastighet beregnes fra økningen i celletall i løpet av 3 døgn. (ISO/DIS 8692). Veksthastigheten i hver kultur blir normalisert i forhold til kontrollkulturer og transformert til probit. Responsforløpet med  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{10}$  og  $\text{EC}_{90}$ -verdier blir fastlagt ved lineær regresjon av probitverdiene mot logaritmen for konsentrasjonen. ( $\text{EC}_x$ = den konsentrasjon som gir x% hemming av veksthastigheten).

RESULTAT: Konsentrasjon/responsdiagram er vist i figur 3. Effekt-konsentrasjonene med konfidensintervall er:

	ml/l	95% konfidensintervall
$\text{EC}_{50}$	38	25 - 58
$\text{EC}_{10}$	16	12 - 28
$\text{EC}_{90}$	8.9	41 -190

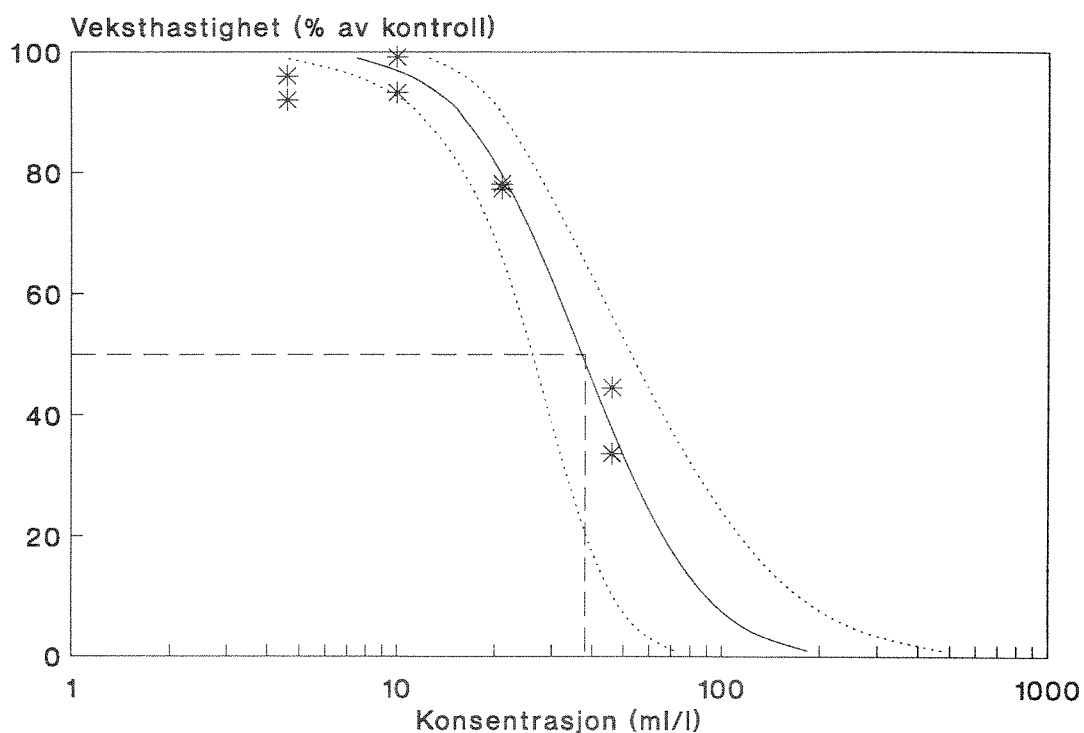


Fig. 3. Effekt av brytningsvann på vekst av Selenastrum capricornutum.

Testansvarlig:  
Torsten Källqvist

REFERANSER: OECD 1981: Guidelines for Testing of Chemicals, no. 201

ISO/DIS 8692. Algal Growth Inhibition Test.

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

Källqvist, T. 1984: Biotester i Vennerød, K. (red.): Vassdragsundersøkelser, en metodebok i limnologi. Universitetsforlaget. s. 252-267.

**A P P E N D I K S 2**  
**toksisitetstester - dafnier**

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

**TESTRAPPORT TOKSISITETSTEST MED DAFNIER**

Testmetode : ISO 6341 Water Quality - determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna

Testorganismen: Daphnia magna klon fra Gøteborg universitet.

Forbehandling: Filtr. naturlig overfl. vann + 20 % ISO 6341 salter

Føring: Kontinuerlig tilsats av Selenastrum capricornutum dyrket på 1/10 Z 8 næringssaltløsning.

Lysforhold: 700 lux

Teststoff: Emulgatorløsning

Testdato(start): 25. juli 1990

Testbetingelser: Fortynningsvann: Maridalsvann (5 µ filtrert) tilsatt 20 % ISO 6341 salter.

Antall enheter: 4 pr. testkonsentrasjon

Antall individ pr. enhet: 5-7

Testtemperatur: 20 +- 0,5° C

Lysforhold: 700 lux                      Oksygen metn. %: > 90

	Start	Slutt
pH: Høyeste testkonsentrasjon,	8,2	7,6
	7,8	7,8

Testkonsentrasjoner: 7.5, 10, 18, 32, 56 mikroliter/L

Testansvarlig: Harry Efraimsen

**RESULTATER:**


---

% dødlighet (immobilitet) i kontrollene: 24t = 0    48t = 0

Referankestoff: Kaliumdikromat,                      24 t-LC<sub>50</sub> = 0,15 mg/L

---

Probit beregning av analysedata:  
24 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
22 µl/L	19 - 26	16	30

48 timers eksponering

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
15 µl/L	13 - 18	12	19

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TESTSTOFF: Emulgatorløsning

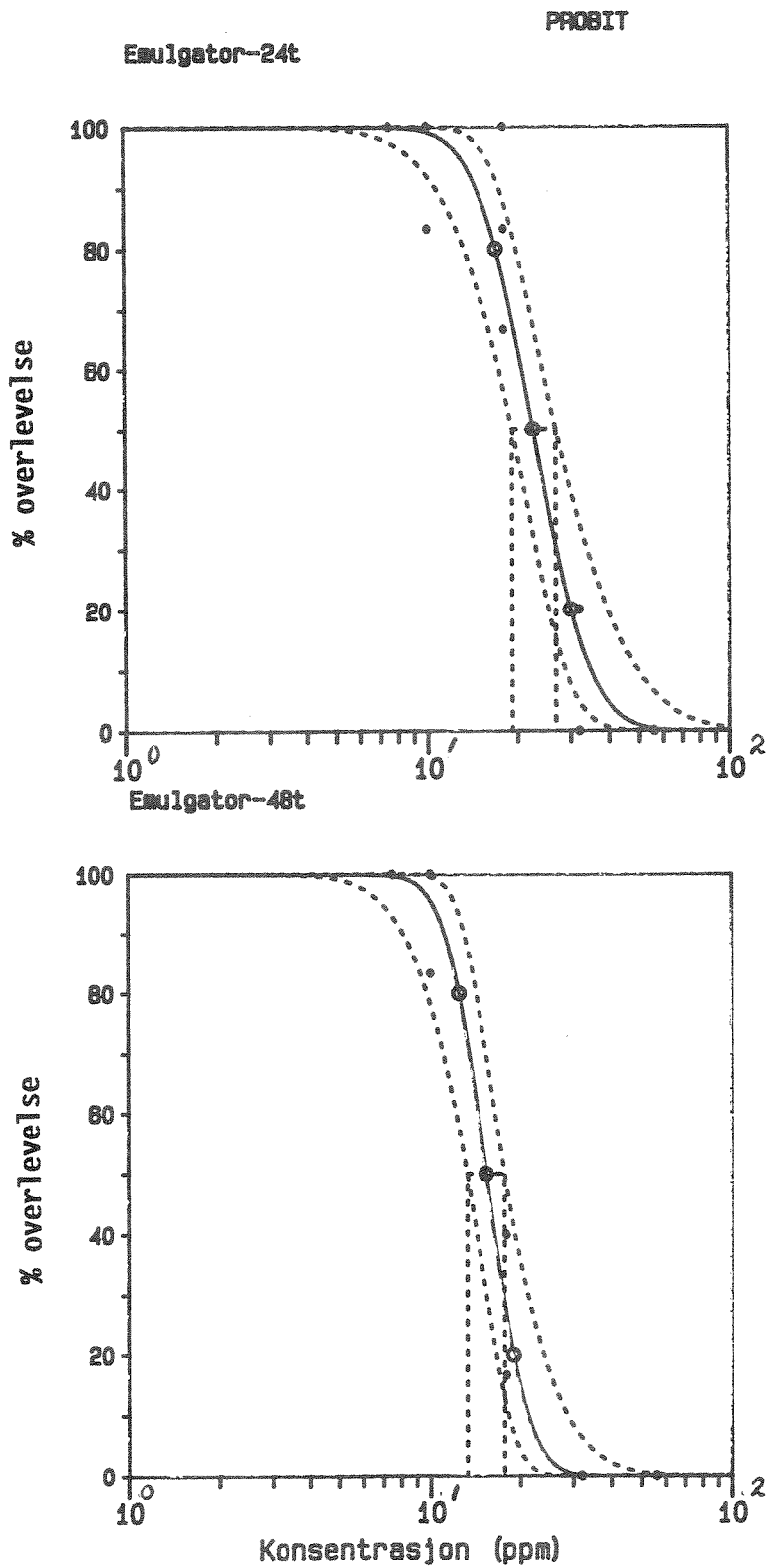


Fig. 1 Dose - responsdiagram. Emulgatorløsning

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

**TESTRAPPORT TOKSISITETSTEST MED DAFNIER**

Testmetode : ISO 6341 Water Quality - determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna

Testorganismen: Daphnia magna klon fra Gøteborg universitet.

Forbehandling: Filtr. naturlig overfl. vann + 20 % ISO 6341 salter

Føring: Kontinuerlig tilsats av Selenastrum capricornutum dyrket på 1/10 Z 8 næringssaltløsning.

Lysforhold: 700 lux

Teststoff: Bitumenemulsjon

Testdato(start): 2. aug. 1990

Testbetingelser: Fortynningsvann: Maridalsvann (5 µ filtrert) tilsatt 20 % ISO 6341 salter.

Antall enheter: 4 pr. testkonsentrasjon

Antall individ pr. enhet: 5-7

Testtemperatur: 20 ± 0,5° C

Lysforhold: 700 lux Oksygen metn.%:> 90

Start Slutt

pH: Høyeste testkonsentrasjon, 7,7 7,6

7,8 7,8

Preparert stamløsning: 1 g/L

Testkonsentrasjoner: 10 mg/L, 18, 32, 56, 100, 180, 320 mg/L

Testansvarlig: Harry Efraimsen

**RESULTATER:**

% dødlighet (immobilitet) i kontrollene: 24t = 0 48t = 1  
Referankestoff: Kaliumdikromat, 24 t-LC<sub>50</sub> = 0,30 mg/L

Probit beregning av analysedata:

24 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
165 mg/L	102 - 380	31	890

48 timers eksponering

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
64 mg/L	43 - 100	15	283

**Kommentarer:**

Asfalt-belegg på dafniene som hindret deres bevegelse og som "kvelte" dem langsomt. Illustreres med svært bredt konfidensintervall og stor forskjell i LC-verdiene mellom 24 og 48 timer.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TESTSTOFF: Bitumenemulsjon

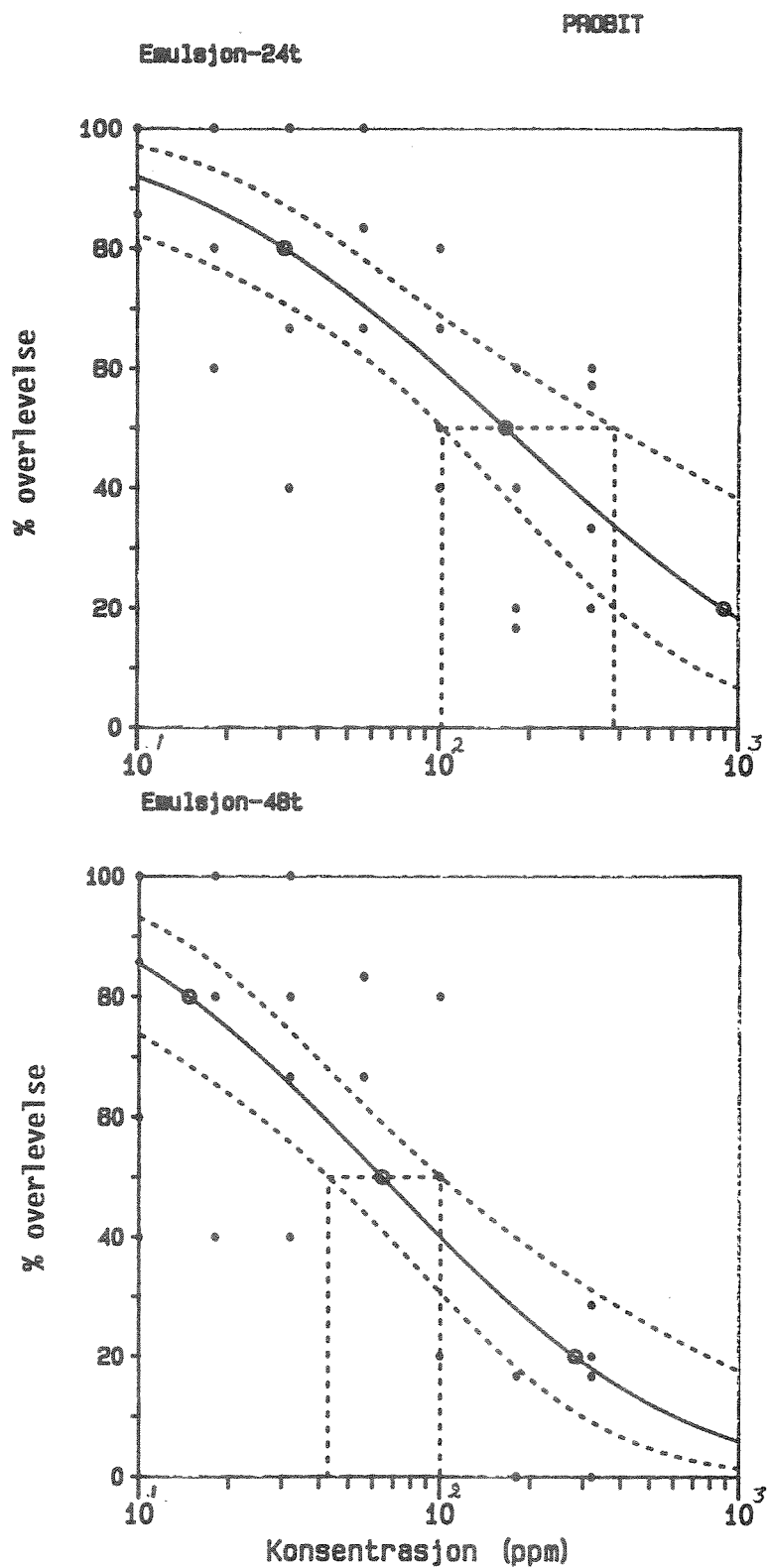


Fig. 2 Dose - responsdiagram. Bitumenemulsjon



## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

**TESTRAPPORT TOKSISITETSTEST MED DAFNIE**

Testmetode : ISO 6341 Water Quality - determination of the Inhibition of the Mobility of Daphnia magna

Testorganismen: Daphnia magna klon fra Gøteborg universitet.

Forbehandling: Filtr. naturlig overfl. vann + 20 % ISO 6341 salter

Føring: Kontinuerlig tilsats av Selenastrum capricornutum dyrket på 1/10 Z 8 næringssaltløsning.

Lysforhold: 700 lux

Teststoff: Brytningsvann

Testdato(start): 26. juli 1990

Testbetingelser: Fortynningsvann: Overflatevann (5  $\mu$  filtrert) tilsatt 20 % ISO 6341 salter.

Antall enheter: 4 pr. testkonsentrasjon

Antall individ pr. enhet: 5-6

Testtemperatur: 20  $\pm$  0,5<sup>o</sup> C

Lysforhold: 700 lux Oksygen metn.%:> 90

	Start	Slutt
pH: Høyeste testkonsentrasjon,	7,6	7,5
	7,6	7,5

Preparert stamløsning: 10 ml/L

Testkonsentrasjoner: 10  $\mu$ l/L, 32, 56, 100, 180, 320  $\mu$ l/L

Testansvarlig: Harry Efraimsen

**RESULTATER:**

% dødlighet (immobilitet) i konrollene: 24t = 0 48t = 0  
Referansestoff: Kaliumdikromat, 24 t-LC<sub>50</sub> = 0,20 mg/L

Probit beregning av analysedata:

24 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
56 $\mu$ l/L	39 - 75	23	135

48 timers eksponering

LC <sub>50</sub>	95 % konfidensintervall	LC <sub>20</sub>	LC <sub>80</sub>
45 $\mu$ l/L	32 - 59	21	95

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TESTSTOFF: Brytningsvann

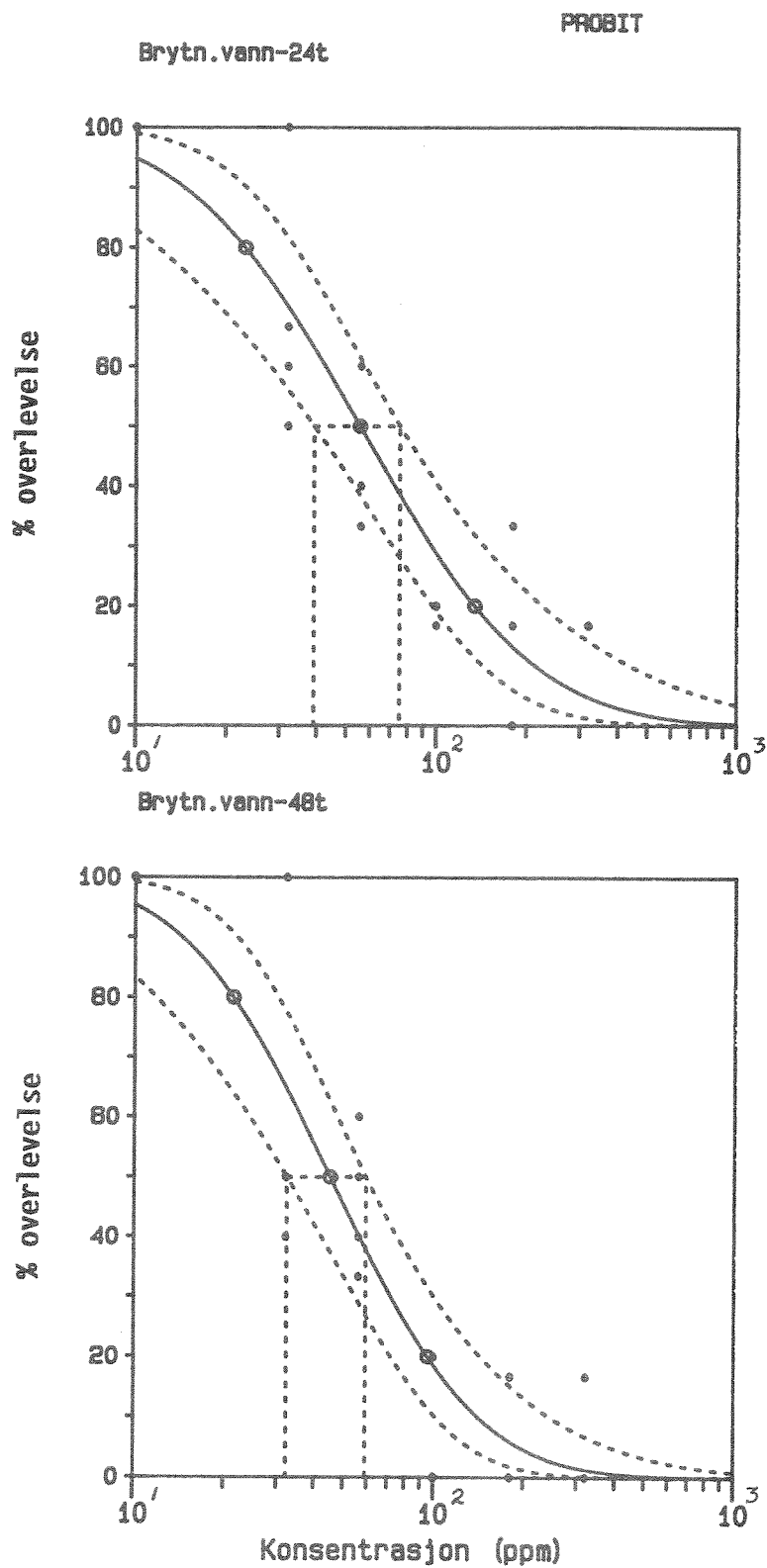


Fig. 3 Dose - responsdiagram. Brytningsvann

APPENDIKS 3  
toksisitetstester – fisk

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

### TOKSISITETSTEST MED FISK

Testmetode: Testen er utført i overensstemmelse med "OECD Guidelines for testing of Chemicals" (No. 203; Fish, acute toxicity test) og en noe modifisert Norsk Standard, NS 4717; "Bestemmelse av kjemiske produkters og avløpsvanns akutte toksisitet for ferskvannsfisk".

Testorganisme: Årsyngel (0+) av ørret, (*Salmo trutta*), med middelvekt 1.8 g og -lengde 5.5 cm. Fisken var hentet på et opdrettplass ved Oslo (OFA-Sørkedalen) og tilvendt forholdene på laboratoriet i en uke.

Utførelse: Forsøkene ble utført i glassakvarier med 10 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon av teststoffene. Testfiskene ble overført til ny løsning hvert døgn (semistatisk metode) og forsøkene pågikk i 4 døgn. Fisken ble observert minimum 2 ganger pr døgn og døde fisk ble notert og fjernet. Vannkvaliteten i det benyttede fortynningsvannet fremgår av tabell 1. Vannet er et typisk norsk overflatevann, bløtt, svakt surt og med relativt lite innhold av løste organiske stoffer. Temperaturen under forsøkene var  $14 \pm 0.5$  °C.

Tabell 1. Noen kjemiske data for vann benyttet i test med ørret (Maridalsvatn).

pH		6.3
Konduktivitet	mS/m 25 °C	3.2
Farge	mg Pt/l	21
Perm. tall	mg O/l	4.0
Hardhet	mg CaCO <sub>3</sub> /l	11

Resultater: I tabellene 3-5 og fig. 1-3 er oppført dødeligheten i hver konsentrasjon av de forskjellige prøvene. På figurene er 4d LC<sub>50</sub>-verdiene avsatt (De konsentrasjoner som dreper 50% av forsøksfisken i løpet av 4 døgn). LC<sub>50</sub>-verdiene er sammenstillt i tabell 2.

Tabell 2. 4d LC<sub>50</sub> verdier for ørret. Konsentrasjonene angitt som %.

	LC <sub>50</sub>	
Emulgatorløsning	0.023	ml/l
Bitumen emulsjon	0.235	g/l
Brytningsvann	0.350	ml/l

Tabell 3 Kumulativt antall (%) døde fisk ved forskjellig eksponeringstid. Emulgatorløsning.

Konsentrasjon ml/l	Eksponeringstid, timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.02	0	0	0	14
0.03	0	43	100	100
0.04	14	100	100	100
0.05	100	100	100	100

Tabell 4. Kumulativt antall (%) døde fisk ved forskjellig eksponeringstid. Bitumen emulsjon.

Konsentrasjon g/l	Eksponeringstid, timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.2	0	0	0	14
0.3	100	100	100	100

Tabell 5. Kumulativt antall (%) døde fisk ved forskjellig eksponeringstid. Brytningsvann.

Konsentrasjon ml/l	Eksponeringstid, timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.2	0	0	0	0
0.3	0	0	0	0
0.4	29	71	86	86

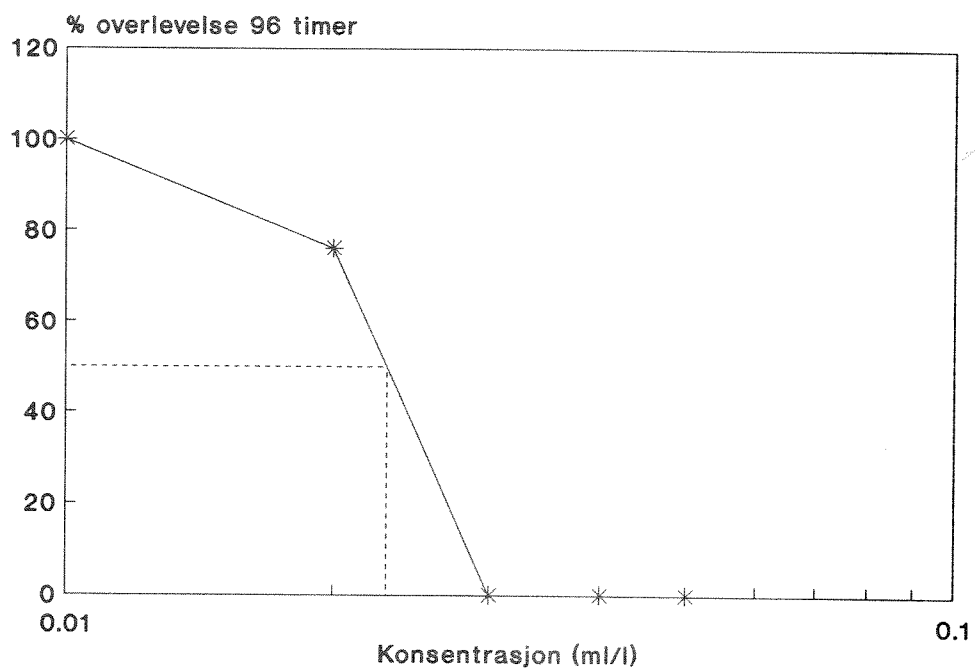


Fig. 1. Overlevelse av fisk (%) som funksjon av konsentrasjon av emulgator.

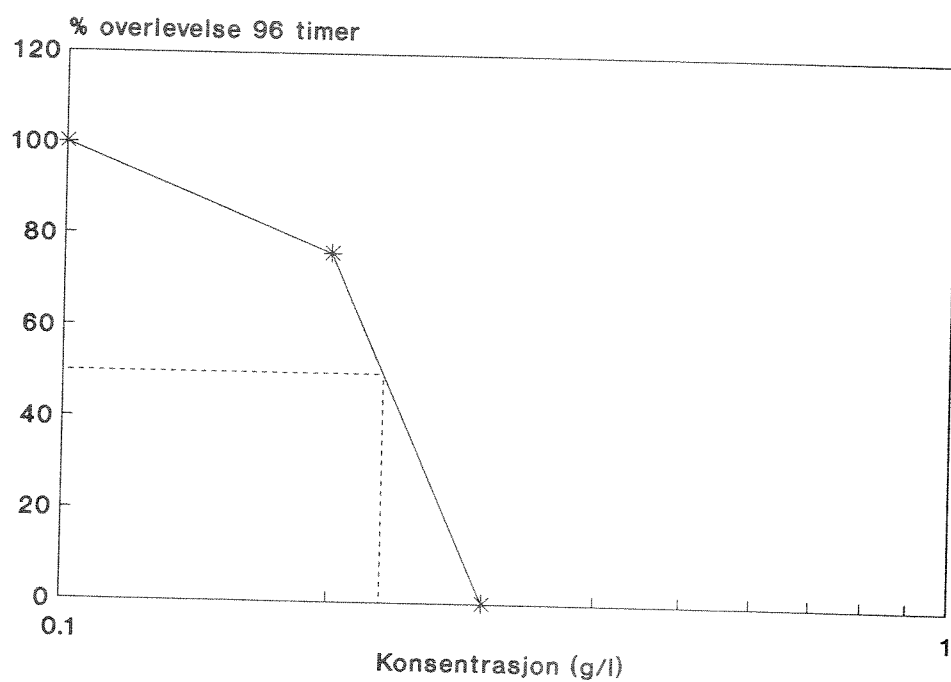


Fig. 2. Overlevelse av fisk (%) som funksjon av konsentrasjon av bitumen emulsjon.

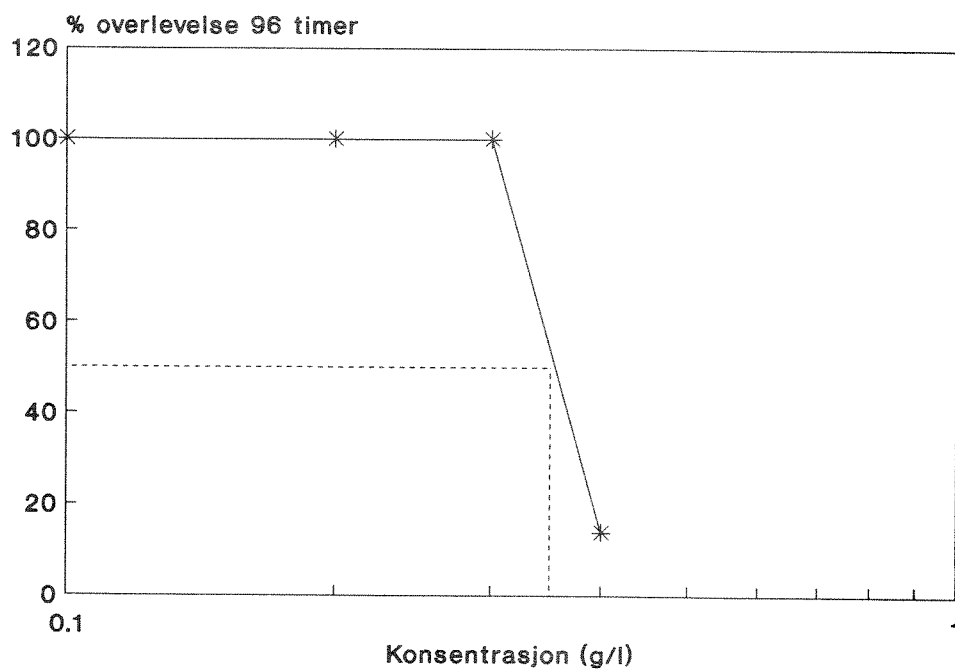


Fig. 3. Overlevelse av fisk (%) som funksjon av konsentrasjon av brytningsvann.

Testansvarlig: Magne Grande

Referanser: OECD 1981: Guidelines for Testing of Chemicals, nr. 203

**A P P E N D I K S 4****turbiditet - NTU**



## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

### TURBIDITET I VANN

Turbiditet er et uttrykk for "partikulært" materiale i vann og karakteriseres som den nedsatte siktbarhet disse partiklene forårsaker.

Turbiditeten bestemmes ved en nefelometrisk metode. Denne baserer seg på partiklenes evne til å spre innfallende hvitt lys. Spredningen måles ved at lyskilde og detektor i instrumentet står med en vinkel på 90° i forhold til hverandre. Spredningen er avhengig av partiklenes antall, størrelse, form, farge og brytningsindeks. Dette medfører at turbiditeten ikke nødvendigvis har noen direkte sammenheng med konsentrasjonen eller vekten av det partikulære materialet.

Turbiditeten bestemmes ved å sammenligne intensiteten av lysspredningen i en prøve under definerte betingelser med lysspredningen i en standard suspensjon av formazin under de samme betingelser.

Turbiditet angis som NTU eller FTU (Formazin Turbidity Unit).

Nedenfor er gitt resultatene av turbiditetsmålinger av ulike fortynninger av emulgatorløsning, brytningsvann og bitumenemulsjon i destillert vann. Bitumen løste seg ikke fullstendig, mens de to andre stoffene tilsynelatende var løselige i vann. Det ble veid en viss mengde av hvert stoff og løst i vann. Fra denne løsning ble det så gjort volumetrisk fortynningsrekke i konsentrasjoner vist i tabellen nedenfor.

Emulgatorløsning Menge	Volum ml	Fortynning	Konsentrasjon mg/l	Turbiditet NTU
2.0 g	50	1:25	$4 \cdot 10^4$	75.3
1.0 "	50	1:50	$2 \cdot 10^4$	16.7
1.0 "	100	1:100	$10^4$	11.0
0.25 "	50	1:200	$5 \cdot 10^3$	7.8
5.0 ml	50	1:1.000	$10^3$	2.0
fra 1:100				
0.5 ml	50	1:10.000	$10^2$	0.2
fra 1:100				

## BITUMENEMULSJON

Veid 0.5 g i 25 ml. Fra dette er det tatt flg. fortynninger:

Bitumen Mengde	Volum dest. vann	Fortynninger	Konsentrasjoner mg/L	Turbiditet NTU
0.5 ml	50 ml	1:5.000	$2 \cdot 10^2$	135
0.25 "	"	1:10.000	$10^2$	68.0
0.1 "	"	1:25.000	40	28.1
0.05 "	"	1:50.000	20	14.9
0.05 "	100 ml	1:100.000	10	7.6

## BRYTNINGSVANN

Veid 1 g til 100 ml destillert vann. Fra dette følgende fortynninger.

Brytningsvann Mengde	Volum dest. vann	Fortynning	Konsentrasjon mg/l	Turbiditet NTU
2.0 ml	50 ml	1:2.500	$4 \cdot 10^2$	174
1.0 "	"	1:5.000	$2 \cdot 10^2$	82.7
0.5 "	"	1:10.000	$10^2$	42.0
0.25 "	"	1:20.000	50	21.4
0.1 "	"	1:50.000	20	8.5

## BAKTLAB

LAGER: BAK-TURB

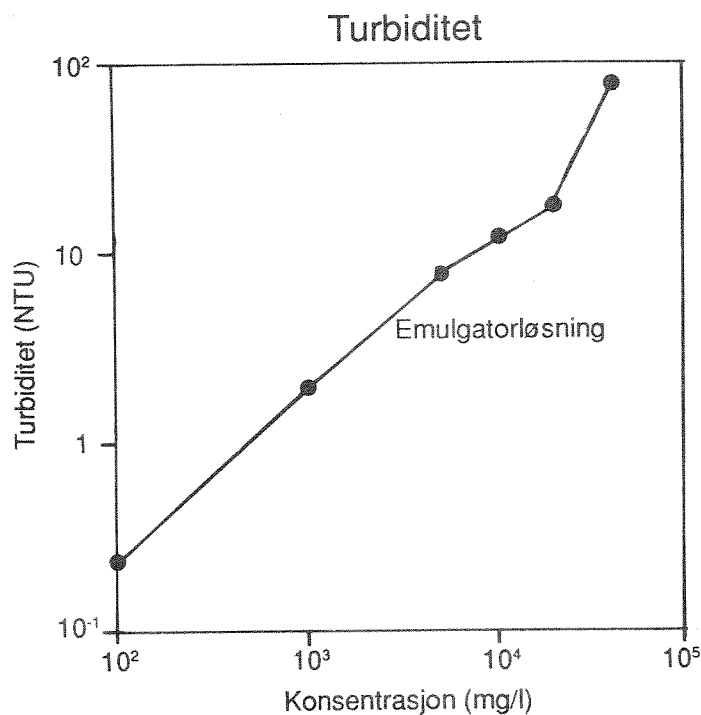


Fig. 1. Turbiditet av Emulgatorløsning i ulike fortynninger i destillert vann.

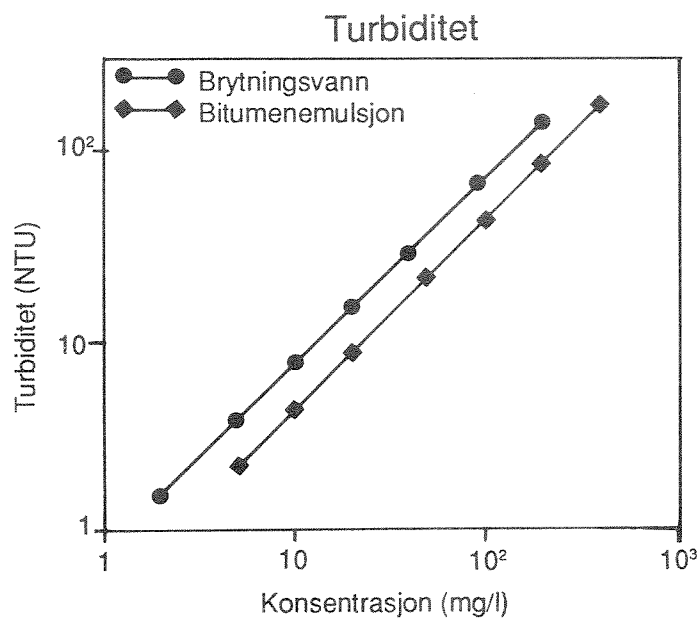


Fig. 2. Turbiditet av Brytningsvann og Bitumenemulsjon i ulike fortynninger i destillert vann.

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Postboks 69, Korsvoll  
0808 Oslo 8

ISBN 82-577 -1790-8