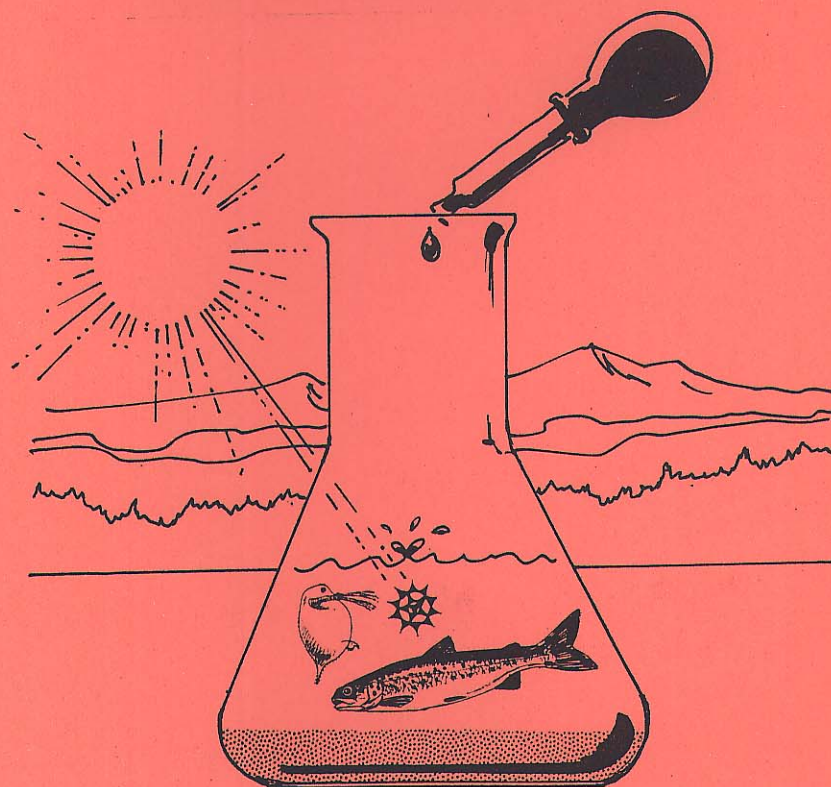




O-91063

Biologisk/kemisk karakterisering
av avloppsvatten från
Fiskeby Board AB



NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

| | | | |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Hovedkontor | Serielandavdelingen | Østlandavdelingen | Vestlandavdelingen |
| Postboks 69, Korsvoll | Televeien 1 | Rute 866 | Breiviken 5 |
| 0808 Oslo 8 | 4890 Grimstad | 2312 Ottestad | 5035 Bergen - Sandviken |
| Telefon (47 2) 23 52 80 | Telefon (47 41) 43 033 | Telefon (47 65) 76 752 | Telefon (47 5) 95 17 00 |
| Telefax (47 2) 39 41 89 | Telefax (47 41) 44 513 | Telefax (47 65) 78 402 | Telefax (47 5) 25 78 90 |

| |
|-------------------------|
| Prosjektnr.: O-91063 |
| Undernummer: |
| Løpenummer: 2616 |
| Begrenset distribusjon: |

| | |
|--|---|
| Rapportens tittel: Biologisk karakterisering av avløpsvatten från Fiskeby Board AB | Dato: 14.08.91 |
| | Faggruppe: Analyse |
| Forfatter (e): Torsten Källqvist | Geografisk område: Sverige |
| | Antall sider: 38 Opplag: 70 |

| | |
|---|---|
| Oppdragsgiver: Fiskeby Board AB | Håkan Grangård Beställning 194369 |
|---|---|

Ekstrakt:

En prøve av avløpsvann fra treforedlingsbedriften Fiskeby Board AB er analysert for innhold av organiske forbindelser, nedbrytbarhet og giftighet overfor akvatiske organismer. Innholdet av organisk karbon var ca. 140 mg/l. COD var 600 mg/l og BOD₇ 234 mg/l. Ca. 90% av det organiske materialet ble omsatt i løpet av en 28 døgns nedbrytbarhetstest. Giftigheten var moderat. EC₅₀-verdien for alger var 17%, og for Microtox 56%. Sebrafisk overlevde i full konsentrasjon i 4 døgn, men effekter på egg/ungel-utvikling ble registrert ned til 25%, men ikke ved 12% konsentrasjon.

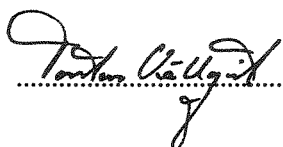
4 emneord, norske

1. Industriavløpsvann
2. Treforedling
3. Giftighetstester
4. Nedbrytbarhet

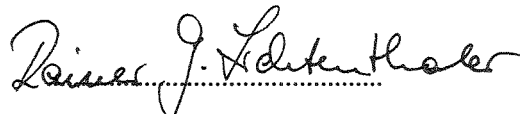
4 emneord, engelske

1. Industrial waste water
2. Pulp-and paper industry
3. Toxicity tests
4. Biodegradation tests

Prosjektleder


.....

For administrasjonen


.....

ISBN 82-577-1946-3

Norsk Institutt for Vannforskning NIVA

O-91063

Biologisk/kemisk karakterisering av avloppsvatten från

Fiskeby Board AB

Prosjektledare: Torsten Källqvist, NIVA
Medarbeidere: Harry Efraimsen, NIVA
Magne Grande, NIVA
Sigbjørn Andersen, NIVA
Randi Romstad, NIVA
Berit Holestøl, SI
Astrid Broch-Due, PFI

FÖRORD

Ångpanneföreningen-IPK, vände sig i april 1991 till NIVA med en förfrågan om genomföring av en kemisk biologisk karakterisering av avloppsvatten från Fiskeby Bruk AB i Norrköping. Karakteriseringen skulle omfatta samma tester och analyser som vid en tidigare undersökning utförd av IVL 1990.

Ett programförslag för karakteriseringen översändes och godkändes 18.4.91, och ett prov av avloppsvattnet mottogs på NIVA, Oslo 19.4.91.

Undersökningen av potentiellt bioackumulerbara ämnen har utförts på Senter for Industrieforskning (SI) av Berit Holestøl. Microtox-testerna har utförts vid Paririndustriens Forskningsinstitut (PFI) av Astrid Broch-Due. Övriga tester och analyser utfördes vid NIVA. Samtliga medverkande tackas för bidraget.

Oslo augusti 1991

Torsten Källqvist

INLEDNING

Fiskeby Bruk tillverkar kartong med vitt ytskikt, lämpat för högklassigt tryck, samt diverse laminat. Produktionen är returpapperbaserad och uppgår till ca. 100.000 ton per år.

Karakteriseringar av Fiskeby Boards avloppsvatten har tidigare genomförts av IVL under 1985, 1988 och 1990. Vid den senare undersökningen rapporterades problem med vissa av de biologiska testerna p.g.a. mikrobiologisk påväxt. Av denna anledning önskade man genomföra en förnyad karakterisering efter liknande uppläggning.

Ett prov av avloppsvattnet för karakteriseringen ankom NIVA 19/4 -91 i 3 st. 25 l plastkannor. En del av provet fördelades på 5 l polyeten-kannor och frystes för de tester/analyser som inte kunde genomföras omedelbart.

PROGRAM FÖR KARAKTERISERINGEN

Karakteriseringen av avloppsvattnet före biologisk nedbrytning omfattade

Kjemiska analyser

| | |
|------------------|-----------------|
| BOD ₇ | SS028143 |
| COD | SS028142 |
| TOC | ASTRO mod. 2001 |
| DOC | ASTRO mod. 2001 |

Toxicitetstester

| | |
|---------------------|--------------------|
| Microtox | Microtox (Beckman) |
| Zebrafisk akut 96 t | SS028162 |
| Zebrafisk ägg/yngel | SS028193 |
| Alger (Selenastrum) | ISO/DIS 8692 |

Bioackumuleringstest (tunnskikt-kromatografi, Renberg et al. 1980)

Nedbrytbarhetstest ISO 9408 och ISO 7827

Efter nedbrytningstesten utfördes en ny toxicitetstest med Microtox

RESULTAT

Kemisk karakterisering

Resultaten av den kemiska karakterisering av avloppsvattnet före nedbrytning redovisas i tabellen nedan.

| | | |
|------------------|-----|------|
| BOD ₇ | 234 | mg/l |
| COD | 600 | mg/l |
| TOC | 143 | mg/l |
| DOC | 139 | mg/l |

Toxicitet

Toxicitetstesterna av avloppsvattnet före nedbrytning gav följande resultat:

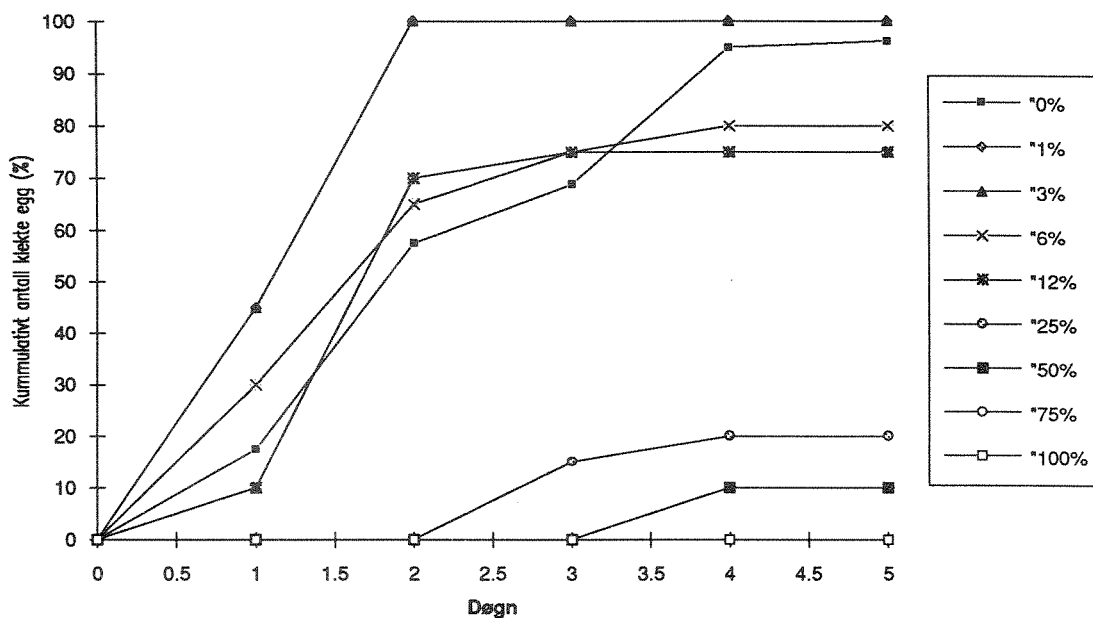
| | | | |
|-------------|---|---|------|
| Microtox | EC ₅₀ , luminiscens, 5 min. | % | 56 |
| Microtox | EC ₂₀ , luminiscens, 5 min. | % | 17 |
| Microtox | EC ₅₀ , luminiscens, 15 min. | % | 53 |
| Microtox | EC ₂₀ , luminiscens, 15 min. | % | 19 |
| Selenastrum | LC ₅₀ , växthastighet, 3 d. | % | 17 |
| Selenastrum | EC ₂₀ , växthastighet, 3 d. | % | 6.5 |
| Selenastrum | EC ₁₀ , växthastighet, 3 d. | % | 3.1 |
| Zebrafisk | LC ₅₀ 4 d. | % | >100 |
| Zebrafisk | LC ₂₀ 4 d. | % | >100 |
| Zebrafisk | NOEC, ägg yngeltest | % | 12 |

Med EC₅₀ menas den koncentration av avloppsvattnet som ger 50% hämmande effekt på den undersökta responsen (t. ex. växthastighet). I testen med zebrafisk var responsen dödlighet (letalitet) och resultatet anges som LC₅₀. Analogt med detta anger EC₂₀ och LC₂₀ de koncentrationer som ger 20% effekt, respektive dödlighet. NOEC (No Observed Effect Concentration) anger den högsta testade koncentrationen utan signifikant effekt.

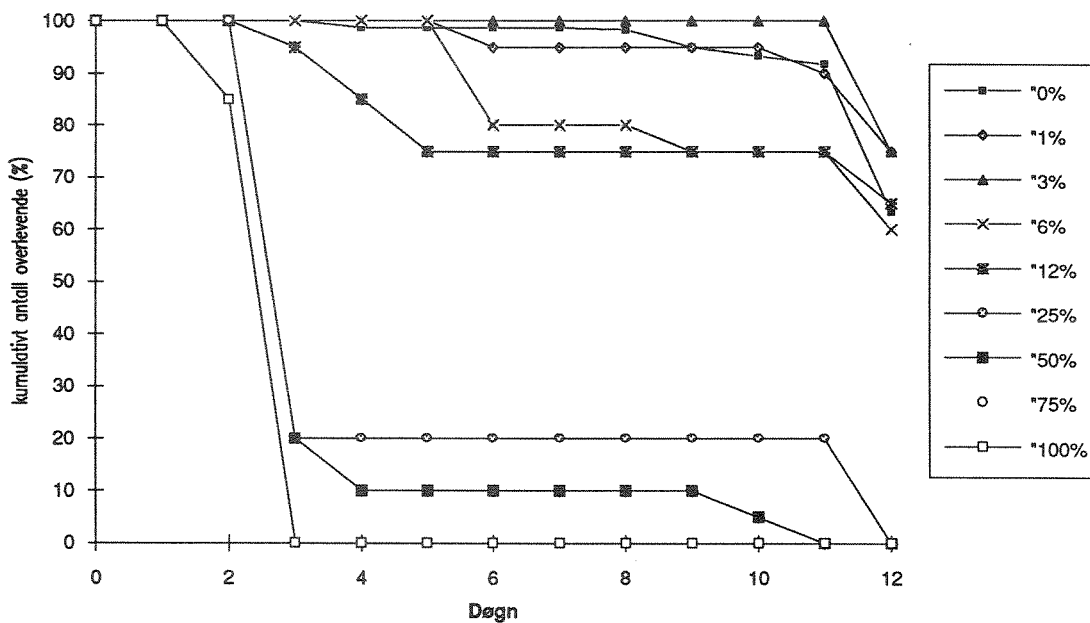
Toxicitetstesterna visade ingen akut toxicitet för zebrafisk. Ingen dödlighet registrerades vid full koncentration av avloppsvatten under 4 dygn, och fisken tycktes vara i god form när testen avslutades. (Se bilaga 3).

Vid ägg/yngeltesten med zebrafisk registrerades inga signifikanta effekter på kläckning och överlevnad upp till 12% koncentration (NOEC). Vid 25% kläcktes bara 20% av äggen inom 5 dygn och 80% av äggen/ynglen var döda efter 3 dygn. (Se figur 1 och 2). På de ägg som inte kläcktes utvecklades en vit hinna som bestod av bakterier och svamptrådar. Detta kan vara samma

fenomen som har rapporterats från tidigare tester av detta avloppsvatten, men effekten är troligen sekundär och indikerar att ägget har skadats. Se vidare bilaga 4.



Figur 1. Kumulativt antal kläckta ägg (%) vid olika exponeringstid. Kurvan för "0%" anger medelvärde för 4 kontroller.

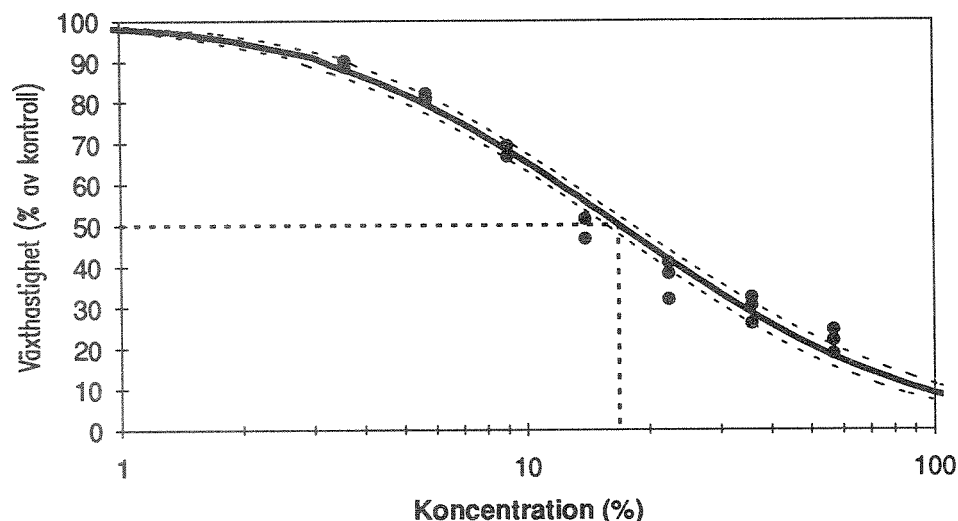


Figur 2. Kumulativt antal överlevande fiskar/ägg (%) vid olika exponeringstid. Kurvan för "0%" anger medelvärde för 4 kontroller.

Gift effekter på Microtox, d.v.s. hämning av ljusemission från bakterien *Photobacterium phosphoreum* påvisades vid koncentrationer över ca. 5 %. EC_{20} -värdet vid 15 minuters exponering var 19% och EC_{50} -värdet 53% (Se bilaga 1).

Algernas växt hastighet reducerades något redan vid den lägsta testade koncentrationen, 3,6%, och 50% hämning (EC_{50}) beräknades till 17% koncentration av avloppsvatten. (Se bilaga 2).

Avloppsvattnets effekt på algernas växt hastighet framgår av figur 3.



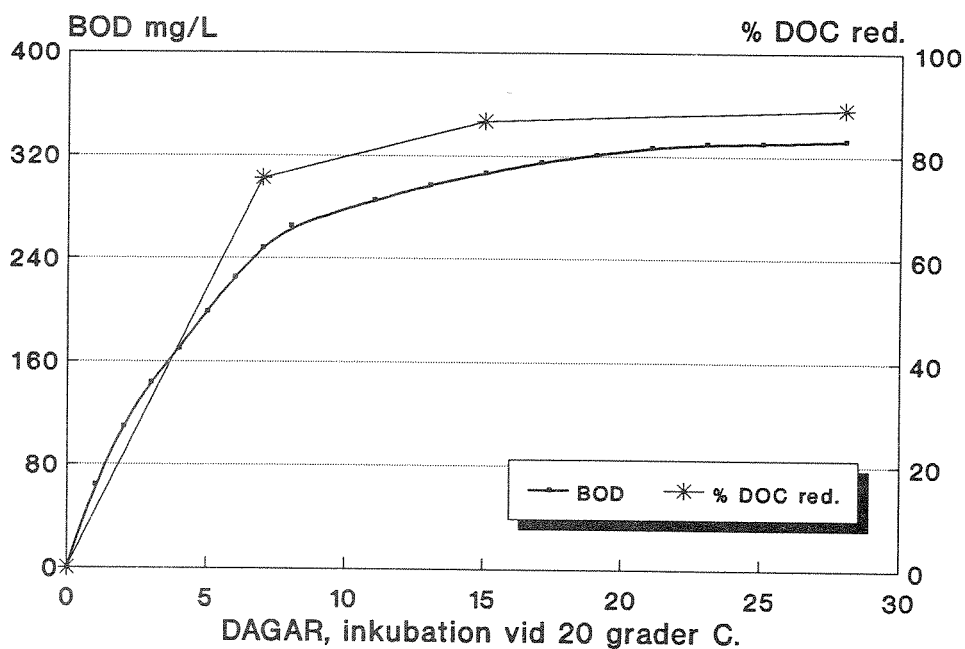
Figur 3. Avloppsvattnets effekt på växt hastigheten av *Selenastrum capricornutum*. Streckade kurvor visar konfidensintervall (95%) runt responskurvan.

Bioackumulerbarhet

Vid den tunnskikt-kromatografiska testen av potentiell bioackumulerbara substanser fraktioneras ett extrakt av avloppsvatten i fraktioner med olika lipofilitet. Lipofiliteten anges som fördelningskoefficient oktanol/vatten (P_{OW}). Extraktet innehöll 1.7 mg/l. Det kunde inte påvisas potentiellt bioackumulerbara ämnen i någon av fraktionerna efter kromatografering. (Se bilaga 5).

Nedbrytbarhet

Nedbrytbarheten undersöktes med två olika testsystem, dels i en sluten respirometer (ISO 9408) med spädning till 50% och dels i en öppen behållare (ISO 7827) med spädning till 50% och 25%. Testerna visade att huvuddelen av det lösta organiska materialet omsätts snabbt. Långtids BOD (28 dygn) var 330 mg/l. 90% av syreförbrukningen skedde inom 14 dagar. Förhållandet BOD_{28}/COD var 55%. Reduktionen av DOC efter 28 dygn var 89% i bägge testerna. Syreförbrukningsförloppet och DOC-reduktionen i respirometer-testen visas i figur 4. Ytterligare dokumentation återfinns i bilaga 6.



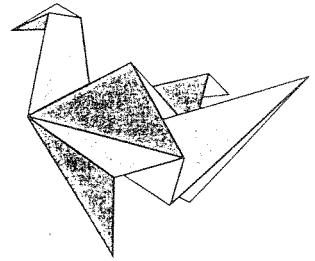
Figur 4. Förlopp av syreförbrukning och DOC vid nedbrytbarhetstesten (ISO 9408)

Toxicitet efter nedbrytning

Eftersom avloppsvattnet späddes 1:1 vid nedbrytbarhetstesten och ytterligare spädning måste göras vid testen, kunde koncentrationer över 23% inte testas på Microtox. Vid denna koncentration hade avloppsvattnet ingen gifteffekt på Microtox-systemet. Vid motsvarande koncentration av avloppsvatten före nedbrytning var hämningen ca. 40%. Det innebär att gifteffekten hade reducerats vid nedbrytningen.

BILAGA 1

Toxicitet - Microtox



NIVA
Postboks 69 Korsvoll
0808 OSLO 8

Att.: Torstein Kallqvist

Vinderen 91.06.11
29303/abd

MICROTOXTEST AV VANNPRØVER

Prøver:

Tirsdag 4. juni 1991 mottok vi via SI (Berit Holestøl) 2 stk. vannprøver for Microtox-testing:

Flaskene hadde følgende merking:

- Fiskeby 19.04.19
- 91063 gf/c-filtr. etter 28 d nedbrytning

Testmetode:

Prøvene er testet for toksisitet v.h.a. Mikrottox.

Testen er utført etter "Microtox Standard-metode og Microtox 100%-metode slik de står beskrevet i Microtoxmanualen "How to run toxicity tests using the Microtox Model 500", Microbics Corporation, Carlsbad, California, USA.

Benyttet referansesubstans: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Forbehandling av prøvene:

pH i prøvene ble justert til 7.0 og sentrifugert før testing.

Resultat:

| Prøve | EC50 _{5 min} vol% | EC50 _{15 min} vol% | Metode |
|---------------------|--|--------------------------------|--------|
| Fiskeby 19.04.91 | 56.3 (39.6-80.0) | 52.8 (37.5-74.5) | Std. |
| Fiskeby 19.04.91 | 57.4 (37.9-86.7) | 60.5 (41.0-81.2) | 100% |
| 91063 gf/c | Denne prøven er ikke toksisk i Microtox-systemet. Reduksjon i lysintensiteten i fortynninger opp til 45.5 vol% er som for blindprøven. | | |

Referansesubstans: EC50_{15 min}=6.6 mg/liter (6.0-7.1)

Tallene i parentes angir 95% konfidensintervall

Det gjøres oppmerksom på at utførelse etter 100%-metoden innehar større usikkerhet enn Standardmetoden.

Med hilsen

Papirindustriens Forskningsinstitutt

Astrid Broch-Due

Astrid Broch-Due

4 vedlegg

MICROTOX(®) DATA SHEET

LE NAME: niva09 05

REPORT DATE: 06-07-1991 00:17:53

Sample Description: "Fishery 18.04.91, pH gustect til 7.0, 7.juni 1991. abd"

Lot: 1000000000

Number of Dilutions: 4

Sample Volume: 100 µl

Sample Volume: 100 µl

Microtox(®) 7045

Microtox(®) 7045

| Time | Fluorescence | Light | Stress | Stress |
|--------|--------------|-------|--------|--------|
| 5.688 | 91.0/ 86.0 | 0.077 | 0.077 | |
| 11.375 | 91.0/ 62.0 | 0.147 | 0.159 | |
| 23.750 | 92.0/ 54.0 | 0.231 | 0.351 | |
| 45.500 | 89.0/ 38.0 | 0.830 | 0.777 | |

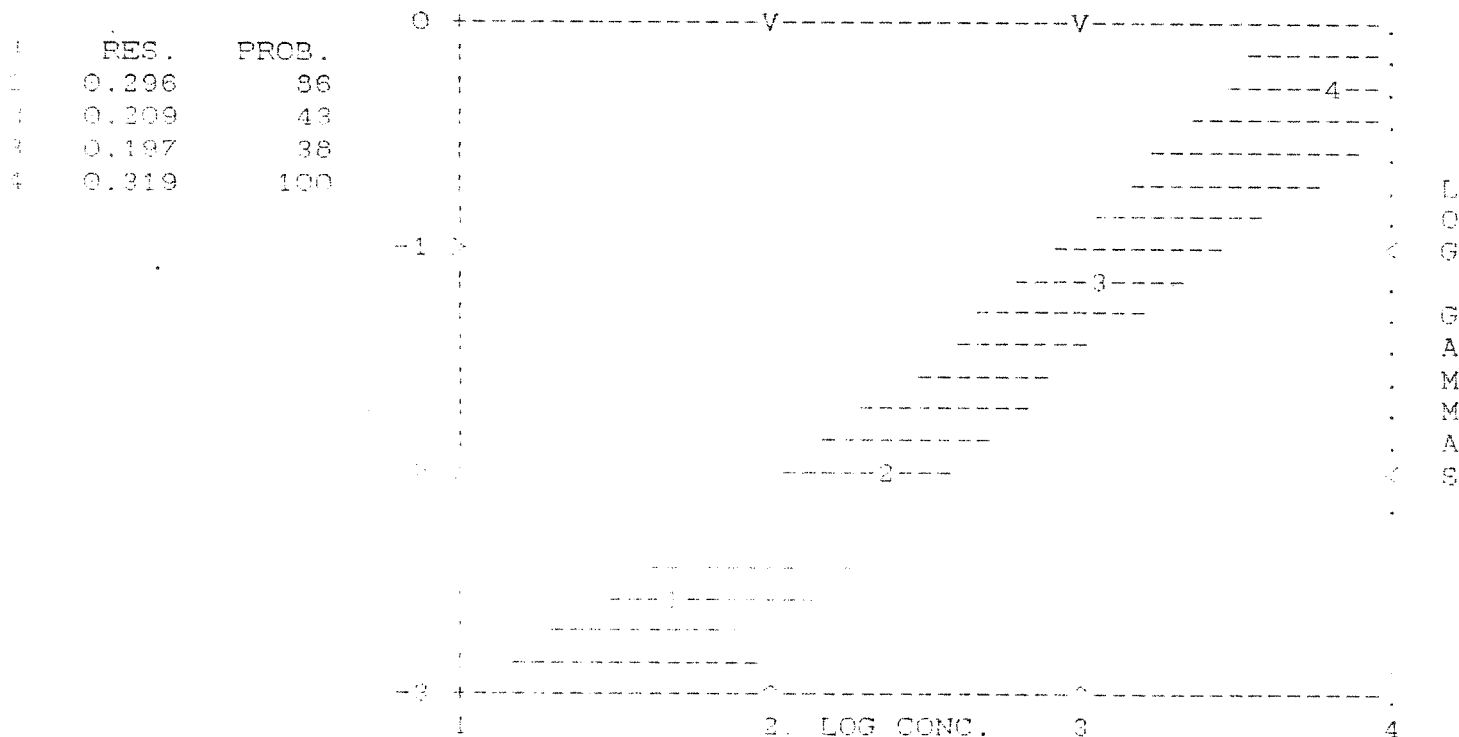
ANK Bo/Bt= 96 / 75

ANK RATIO= 0.7813

7.50 = 56.286 (39.614 TO 79.974)

7.20 = 16.903 (14.051 TO 20.334)

R=0.99694 SLOPE = 0.8677 INTERCEPT = +4.0304



MICROTOX(P) DATA SHEET

FILE NAME: 01V989.017

REPORT DATE: 06-07-1991 00:00:27

Sample Description : "Fiskeby 10.04.91, pH justert til 7.0, 7. juni 1991, abd"
 Procedure : STANDARD
 Number of Dilutions : 4
 Dilution Factor : 2

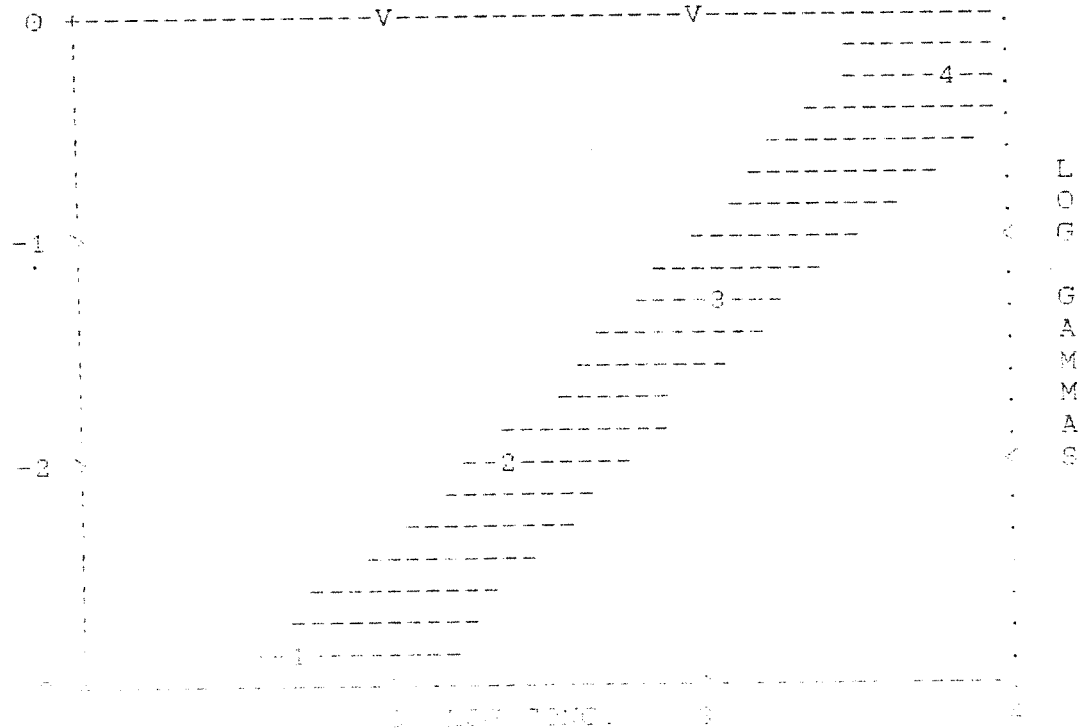
| Time | Count | Count | Count | Count |
|--------|------------|------------|------------|------------|
| 5.583 | 91.0/ 58.0 | 91.0/ 58.0 | 91.0/ 58.0 | 91.0/ 58.0 |
| 11.375 | 91.0/ 53.0 | 91.0/ 53.0 | 91.0/ 53.0 | 91.0/ 53.0 |
| 22.750 | 92.0/ 47.0 | 92.0/ 47.0 | 92.0/ 47.0 | 92.0/ 47.0 |
| 45.500 | 89.0/ 33.0 | 89.0/ 33.0 | 89.0/ 33.0 | 89.0/ 33.0 |

ANK Ba/Bt= 96 / 64
 ANK RATIO= 0.6667

50 = 52.819 (37.455 TO 74.483)
 20 = 18.935 (15.636 TO 22.929)

r = -0.99684 SLOPE = 0.7400 INTERCEPT = +3.9669

| RES. | PROB. |
|-------|-------|
| 0.324 | 100 |
| 0.198 | 37 |
| 0.202 | 39 |
| 0.311 | 92 |



MICROTOX is a Registered Trademark of Microbiologic ApS

MICROTOX(r) DATA SHEET

FILE NAME: nival10.05

REPORT DATE: 06-07-1991 00:01:18

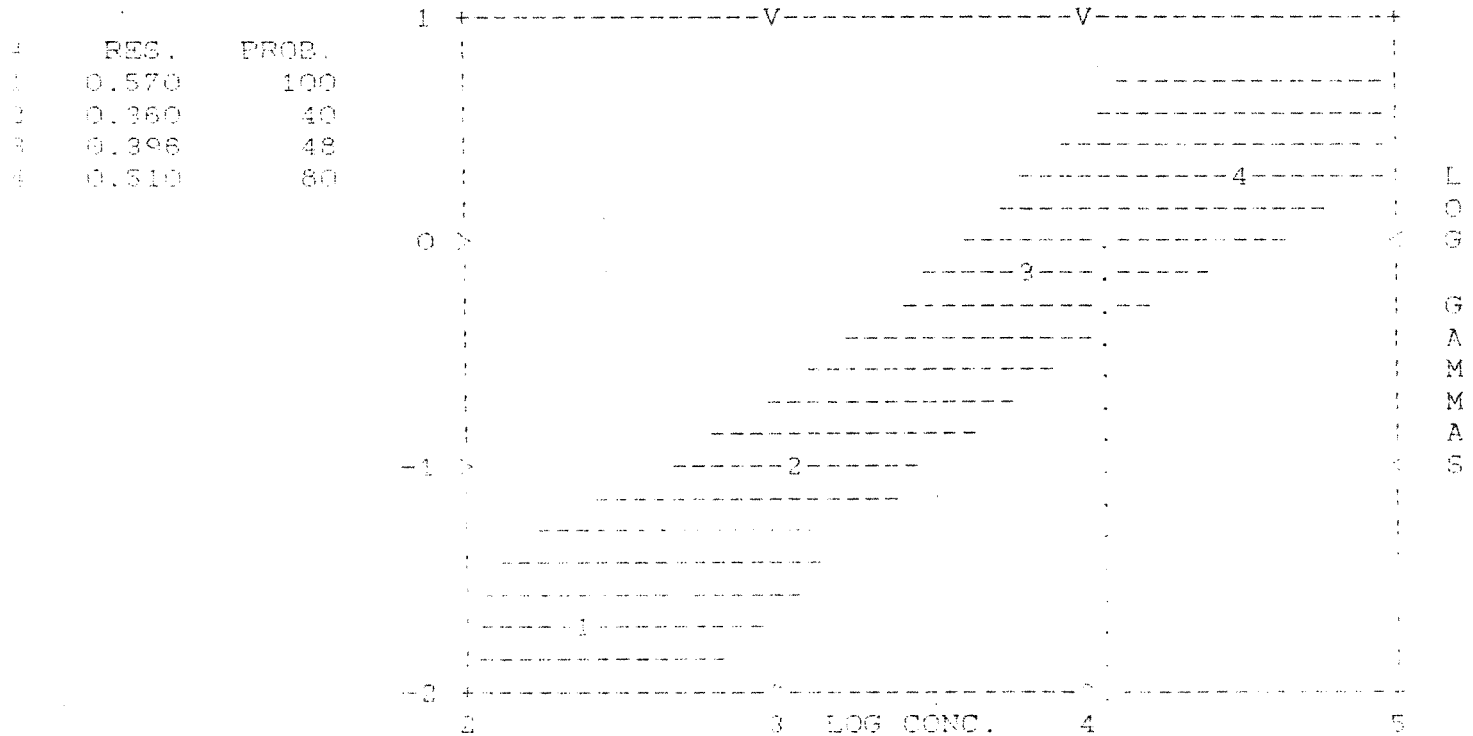
Sample Description : "fishbath 19.04.31, pH adjust to 7.0, 7. June 91, and"
 Procedure : 100 %-prosedyre Number of Dilutions : 4
 Initial Concentration : 90.9 % Dilution Factor : 2
 Inoc Adjustment : MOAS Assay Time : 5

| PL # | CONC. | Io/It | G-GBS | G-EST |
|------|--------|------------|-------|-------|
| 1 | 11.363 | 96.0/ 60.0 | 0.196 | 0.208 |
| 2 | 22.725 | 31.0/ 43.0 | 0.408 | 0.405 |
| 3 | 45.450 | 88.0/ 34.0 | 0.934 | 0.790 |
| 4 | 90.900 | 89.0/ 23.0 | 1.376 | 1.541 |

BLANK Bo/Bt= 95 / 71
 BLANK RATIO= 0.7474

50 = 57.354 (37.927 TO 86.733)
 20 = 13.992 (8.600 TO 22.765)

r=0.99015 SLOPE = 1.0177 INTERCEPT = +4.0492



MICROTOX(r) DATA SHEET

PLATE NAME: niva10.015

REPORT DATE: 06-07-1991 00:00:41

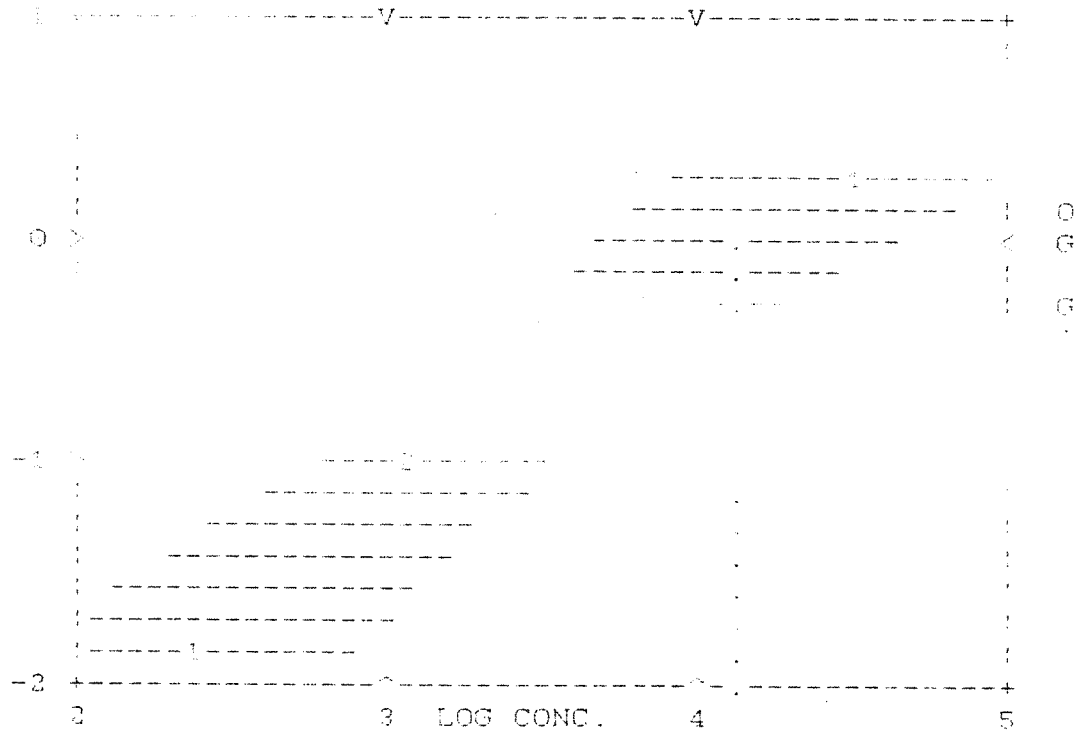
Sample Description : "fiskeby19.04.91, pH justert til 7.0, 7. juni 91, abd"
 Procedure : 100 %-prosedyre Number of Dilutions : 4
 Initial Concentration : 90.9 % Dilution Factor : 2
 Mic Adjustment : MOAS Assay Time : 15

| L # | CONC. | Io/It | G-OBS | G-EST |
|-----|--------|------------|-------|-------|
| 1 | 11.363 | 96.0/ 53.0 | 0.166 | 0.180 |
| 2 | 22.725 | 81.0/ 37.0 | 0.383 | 0.365 |
| 3 | 45.450 | 83.0/ 30.0 | 0.853 | 0.739 |
| 4 | 90.900 | 89.0/ 24.0 | 1.342 | 1.500 |

BANK Bo/Bt= 95 / 60
 BANK RATIO= 0.6316

150 = 60.464 (40.970 TO 89.233)
 120 = 15.883 (10.563 TO 23.882)

R=0.99184 SLOPE = 0.9643 INTERCEPT = +4.1020



MICROTOX(r) DATA SHEET

FILE NAME: niva06.05

REPORT DATE: 06-06-1991 00:31:01

Sample Description : "gf/c, ph justert til 7.0 91.06.05 r.aa."
 Procedure : ~~STANDARD~~ 100%
 Initial Concentration : 91 %
 Ionic Adjustment : MOAS

Number of Dilutions : 3
 Dilution Factor : 2
 Assay Time : 5

| DIL # | CONC. | Io/It | ΔI | G-OBS | G-EST |
|----------------------|--------|------------|------------|-------|-------|
| 1 | 11.875 | 85.0/ 86.0 | 19 | 0.057 | 0.051 |
| 2 | 22.750 | 83.0/ 86.0 | 17 | 0.033 | 0.041 |
| 3 | 45.500 | 82.0/ 85.0 | 17 | 0.036 | 0.032 |
| BLANK Bo/Bt= 95 / 76 | | | 17 | | |
| BLANK RATIO= 0.8211 | | | | | |

MICROTOX(r) DATA SHEET

FILE NAME: niva06.015

REPORT DATE: 06-06-1991 00:31:20

Sample Description : "gf/c, ph justert til 7.0 91.06.05 r.aa."
 Procedure : STANDARD
 Initial Concentration : 91 %
 Ionic Adjustment : MOAS

Number of Dilutions : 4
 Dilution Factor : 2
 Assay Time : 15

| DIL # | CONC. | Io/It | ΔI | G-OBS |
|----------------------|--------|------------|------------|-------|
| 1 | 11.875 | 85.0/ 87.0 | 18 | 0.033 |
| 2 | 22.750 | 83.0/ 86.0 | 15 | 0.025 |
| 3 | 45.500 | 82.0/ 87.0 | 15 | 0.021 |
| BLANK SAMPLE 95 / 71 | | | 23 | |
| BLANK RATIO= 0.7559 | | | | |

MICROTOX(r) DATA SHEET

TEST NAME: ms05.015

REPORT DATE: 06-08-1991 00:16:45

Sample Description : "znso4 *7 h2o 30 mg/l"

Procedure : standard

Number of Dilutions : 4

Initial Concentration : 13.64 mg/l

Dilution Factor : 2

Micro Adjustment : MOAS

Assay Time : 15

| L # | CONC. | Lo/Hi | G-OBS | G-EST |
|-----|--------|------------|-------|-------|
| 1 | 1.705 | 82.0/ 81.0 | 0.049 | 0.052 |
| 2 | 3.410 | 85.0/ 52.0 | 0.260 | 0.237 |
| 3 | 6.820 | 92.0/ 34.0 | 1.086 | 1.079 |
| 4 | 13.640 | 82.0/ 11.0 | 4.746 | 4.915 |

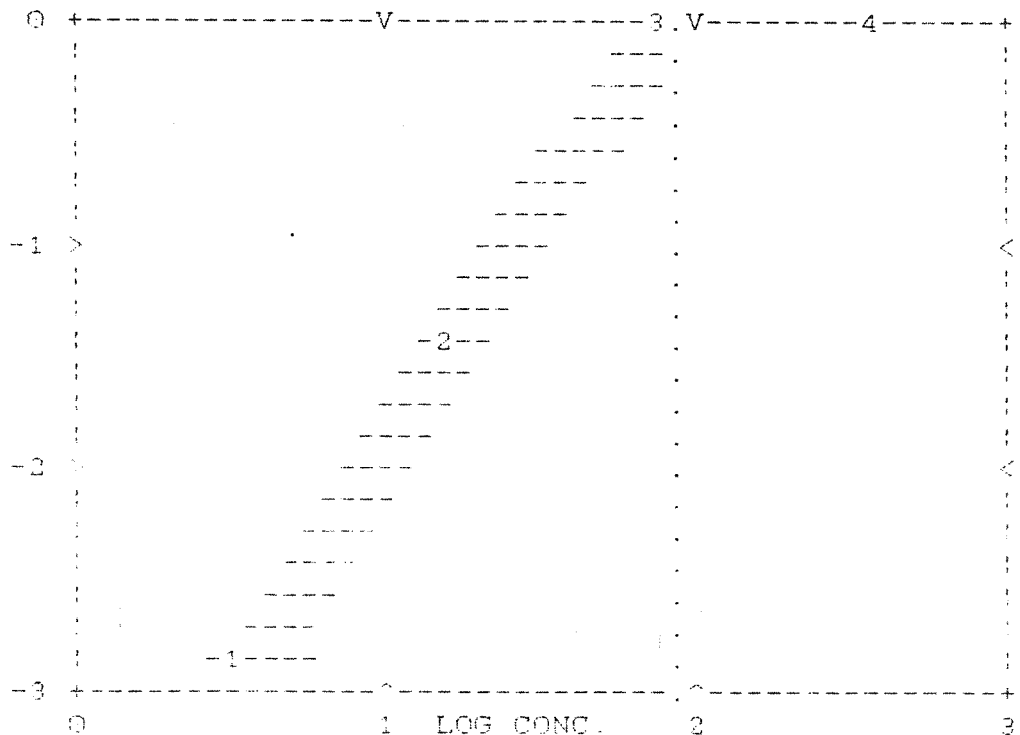
BLANK Bo/Bt= 96 / 74

BLANK RATIO= 0.7708

1.50 = 6.584 (6.027 TO 7.191)
 1.20 = 3.495 (3.199 TO 3.820)

r = 0.99940 SLOPE = 0.4567 INTERCEPT = +1.8846

| # | RES. | PROB. |
|---|-------|-------|
| 1 | 0.140 | 100 |
| 2 | 0.088 | 40 |
| 3 | 0.090 | 41 |
| 4 | 0.136 | 95 |



BILAGA 2

Toxicitet - Slenastrum capricornutum

Norsk institutt for vannforskning NIVA

Testrapport

Toksisitetstest med alger, ISO 8692, OECD 201

Teststoff: Avløpsvann fra Fiskeby Board, april 1991

Test data

| | |
|---------------------------------|---|
| Organisme: | <i>Selenastrum capricornutum</i> NIVA CHL1 |
| Testparameter: | Veksthastighet fra start til 72 timer |
| Stamkultur: | Semikontinuerlig i 10% Z8 vekstmedium (Staub 1961) |
| Start dato: | 1.5.91 |
| Konsentrasjoner: | 3.6, 5.7, 9, 14, 22.5, 36, 57, 90 % |
| Test medium: | ISO 8692 |
| Inkuberingsutstyr: | Gyngbord |
| Dyrkingsflasker: | 100 ml ståkolber med 50 ml medium |
| Lys: | 70 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør |
| Temperatur: | 20 °C |
| pH | Start : 7.0 (kontroll), 7.15 (90% kons.). Etter 72 tim.: 7.15 (kontroll), 7.19 (90% kons.) |
| Vekstmåling: | Partikkel telling med Coulter Multisizer |
| Beregning av EC_{50} * | Probit transformering og lineær regressjon av probit verdier mot log konsentrasjon. |
| Beregning av NOEC * | t-test |

Resultater

Celletetthet på hvert målepunkt, den beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middeler verdier for kontroller og ved ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på å skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1. Konsentrasjon/responskurven er vist i figur 2.

| Parameter | Enhet | EC_{50} | 95% konf. int. | EC_{10} | 95% konf. int. | NOEC |
|----------------|---------|------------------|----------------|------------------|----------------|-------|
| Veksthastighet | % kons. | 17 | 15.7 - 18.2 | 3.1 | 2.7 - 3.6 | <3.6 |
| Areal | % kons. | 3.8 | 3.5 - 4.1 | 1.1 | 0.9 - 1.3 | <<3.6 |

Ansvarlig for testen: Torsten Källqvist

* EC_{50} = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

* NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

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

Norsk institutt for vannforskning NIVA

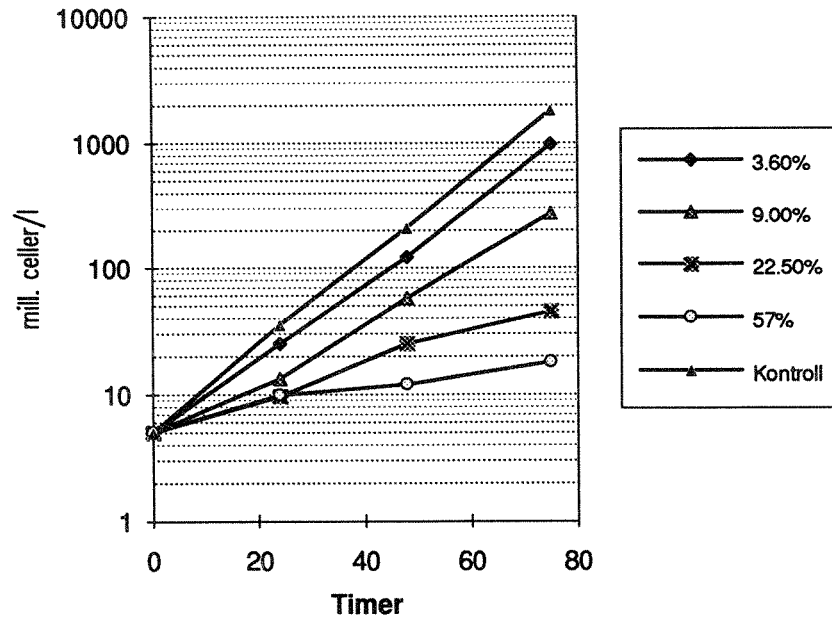


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann fra Fiskeby Bruk.

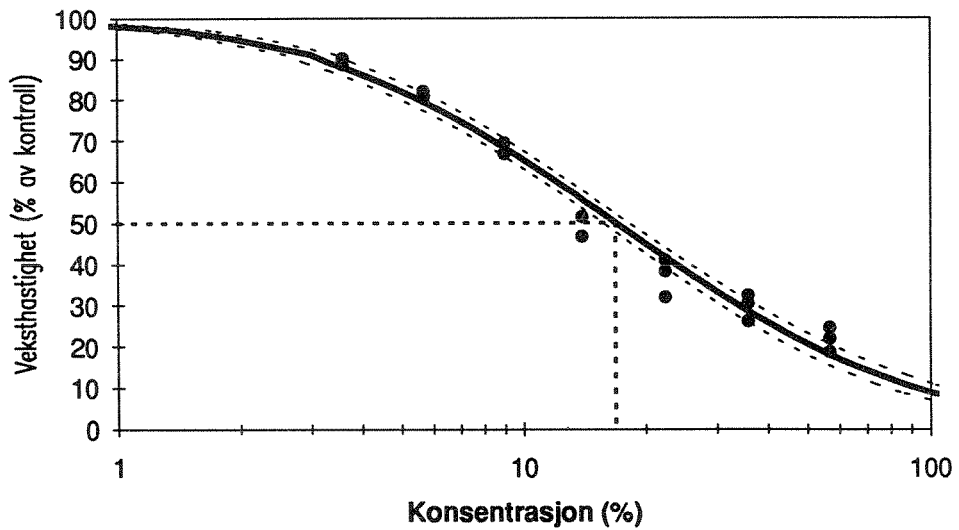


Fig. 2. Effekt av avløpsvann på veksthastigheten til *Selenastrum capricornutum*. Den heltrukne linien viser konsentrasjon/responskurven med 95% konfidensintervall (strekede linier).

TEST:>> ISO 8692 Algal toxicity test

Dato>>> 1.5.91

TESTSTOFF>>>> Avløpsvann fra Fiskeby Board, april 1991.

TESTALGE>>>>> *Selenastrum capricornutum*

Medium ISO

INOKULUM>>>>> 5 mill. celler/l

| | | Dag 1 | Dag 2 | Dag 3 | Areal | Areal % | V. hast. | V. hast % |
|----------|--------|--------|--------|---------|-------|---------|----------|-----------|
| Timer: | | 24 | 48 | 75 | | | | |
| | | mill/l | mill/l | mill./l | | | | |
| Kons. 1 | 3.60% | 25 | 118 | 1008 | 16902 | 55 | 1.70 | 90 |
| | | 25 | 124 | 993 | 16853 | 55 | 1.69 | 90 |
| | | 25 | 124 | 929 | 15989 | 52 | 1.67 | 89 |
| Kons. 2 | 5.70% | 19 | 73 | 625 | 10440 | 34 | 1.55 | 82 |
| | | 17 | 83 | 575 | 9972 | 33 | 1.52 | 80 |
| | | 17 | 81 | 605 | 10326 | 34 | 1.53 | 81 |
| Kons. 3 | 9.00% | 14 | 57 | 260 | 4985 | 16 | 1.26 | 67 |
| | | 14 | 55 | 258 | 4907 | 16 | 1.26 | 67 |
| | | 12 | 60 | 298 | 5526 | 18 | 1.31 | 69 |
| Kons. 4 | 14% | 11 | 46 | 103 | 2513 | 8 | 0.97 | 51 |
| | | 11 | 51 | 104 | 2654 | 9 | 0.97 | 51 |
| | | 8.3 | 30 | 78 | 1702 | 6 | 0.88 | 47 |
| Kons. 5 | 22.50% | 8.7 | 22 | 33 | 900 | 3 | 0.60 | 32 |
| | | 10.4 | 27 | 47 | 1258 | 4 | 0.72 | 38 |
| | | 9.9 | 26 | 56 | 1342 | 4 | 0.77 | 41 |
| Kons. 6 | 36% | 9.9 | 18 | 30 | 787 | 3 | 0.57 | 30 |
| | | 9.9 | 16 | 34 | 790 | 3 | 0.61 | 32 |
| | | 9.1 | 14 | 23 | 571 | 2 | 0.49 | 26 |
| Kons. 7 | 57% | 9.5 | 11 | 15 | 396 | 1 | 0.35 | 19 |
| | | 10 | 11 | 21 | 489 | 2 | 0.46 | 24 |
| | | 10.2 | 14 | 18 | 530 | 2 | 0.41 | 22 |
| Kontroll | | 36 | 198 | 1673 | 28184 | 92 | 1.86 | 99 |
| | | 36 | 206 | 1636 | 27888 | 91 | 1.85 | 98 |
| | | 37 | 206 | 2000 | 32826 | 107 | 1.92 | 102 |
| | | 34 | 200 | 1879 | 30968 | 101 | 1.90 | 101 |
| | | 33 | 220 | 1844 | 30981 | 101 | 1.89 | 100 |
| | | 37 | 220 | 1943 | 32414 | 106 | 1.91 | 101 |

MIDDELVERDIER

| | | | | | | | |
|--------------|-------|--------|---------|-------|--------|------|--------|
| 0.04 Mv: | 25.00 | 122.00 | 976.67 | 16581 | 54.29 | 1.69 | 89.40 |
| St. d. | 0.00 | 2.83 | 34.26 | 419 | 1.37 | 0.01 | 0.60 |
| 0.06 Mv. | 17.67 | 79.00 | 601.67 | 10246 | 33.55 | 1.53 | 81.19 |
| St. d. | 0.94 | 4.32 | 20.55 | 199 | 0.65 | 0.01 | 0.58 |
| 0.09 Mv. | 13.33 | 57.33 | 272.00 | 5139 | 16.83 | 1.28 | 67.70 |
| St. d. | 0.94 | 2.05 | 18.40 | 275 | 0.90 | 0.02 | 1.12 |
| 0.14 Mv. | 10.10 | 42.33 | 95.00 | 2289 | 7.50 | 0.94 | 49.76 |
| St. d. | 1.27 | 8.96 | 12.03 | 419 | 1.37 | 0.04 | 2.26 |
| 0.23 Mv. | 9.67 | 25.00 | 45.33 | 1167 | 3.82 | 0.70 | 36.97 |
| St. d. | 0.71 | 2.16 | 9.46 | 191 | 0.63 | 0.07 | 3.73 |
| 0.36 Mv. | 9.63 | 16.00 | 29.00 | 716 | 2.34 | 0.56 | 29.58 |
| St. d. | 0.38 | 1.63 | 4.55 | 102 | 0.34 | 0.05 | 2.76 |
| 0.57 Mv. | 9.90 | 12.00 | 18.00 | 472 | 1.54 | 0.41 | 21.55 |
| St. d. | 0.29 | 1.41 | 2.45 | 56 | 0.18 | 0.04 | 2.33 |
| Kontroll Mv. | 35.50 | 208.33 | 1829.17 | 30543 | 100.00 | 1.89 | 100.00 |
| St. d. | 1.50 | 8.75 | 133.26 | 1902 | 6.23 | 0.02 | 1.25 |

BILAGA 3

Akut toxicitet - Zebrafisk

Norsk Institutt for vannforskning NIVA

Akutt toksisitet, sebrafisk

Testmetode

Testen er utført i overensstemmelse med Norsk Standard NS 4757 som er identisk med Svensk Standard SS 028162, 1981: "Bestämning av kemiska produkters akuta toxicitet för sötvattenfisk, Semistatisk metod".

Testorganisme

Sebrafisk (*Brachydanio rerio*) i lenger på 30 +/- 3 mm ble benyttet som testorganisme. Fisken var innkjøpt fra akvarieforretning og oppbevart i laboratoriet i en periode på mer enn 14 dager før forsøket startet.

Utførelse

Forsøket ble bare utført som "preliminært prov" i glassakvarier med 5 l testløsning og 5 fisk. Testløsningen ble luftet lett i forsøksperioden som var 4 døgn. Løsningen ble skiftet hvert døgn. Fisken ble observert flere ganger daglig. Temperaturen under forsøket varierte mellom 24.6 og 21 °C. En kontrolltest med vann uten innblanding av avløpsvann ble utført samtidig.

Resultater

Det oppsto ingen dødelighet hverken i kontrollen eller i ufortynnet avløpsvann i løpet av testperioden. Fisken var tilsynelatende i god form ved forsøkets avslutning. Avløpsvannet viste således ingen akutt giftighet overfor sebrafisk.

Ansvarig for testen: Magne Grande

BILAGA 4

Toxicitet på ägg och yngel av zebrafisk

Norsk Institutt for vannforskning NIVA

Toksisitet for egg og yngel av sebrafisk

Testmetode

Testen er utført i overensstemmelse med Norsk Standard, NS 4663; "Bestemmelse av toksisitet for egg og yngel av ferskvannsfisk, semistatisk metode". Denne standard er identisk med Svensk Standard SS 028193-1988: "Bestämning av toxicitet för embryoner och yngel av sötvattensfisk, semistatisk metod".

Testorganisme

Det ble benyttet sebrafisk (*Brachydanio rerio*) innkjøpt i akvarieforretning. Fisken ble holdt i laboratoriet ca. 2 måneder før forsøkets start. Produksjon av egg ble foretatt i overensstemmelse med NS 4663, Bilag A.

Utførelse

Forsøkene ble utført som angitt i standarden. Sebrafisken som ble satt til lek (gyting) om kvelden gytt morgen etter i tidsrommet 7³⁰-8³⁰. 30 egg ble lagt i 50 ml petriskåler med forskjellige konsentrasjoner av avløpsvann. Etter et døgn ble de døde eggene plukket ut slik at det ble 20 egg igjen i hver petriskål. Egg og yngel ble observert daglig inntil alle var klekket og yngelen begynte å dø i større omfang etter ca. 12 døgn. Forsøkene ble da avsluttet. Egg og yngel ble hvert døgn flyttet over til skåler med ny løsning. Temperaturen under forsøkene varierte fra 25-27 °C, med et enkelt fall i temperaturen en dag til 23 °C. Dette hadde tilsynelatende ingen effekt på resultatene. pH, oksygen i løsningene samt dødelighet av nylagte egg var for øvrig innenfor de rammer som standarden forutsetter.

Resultater

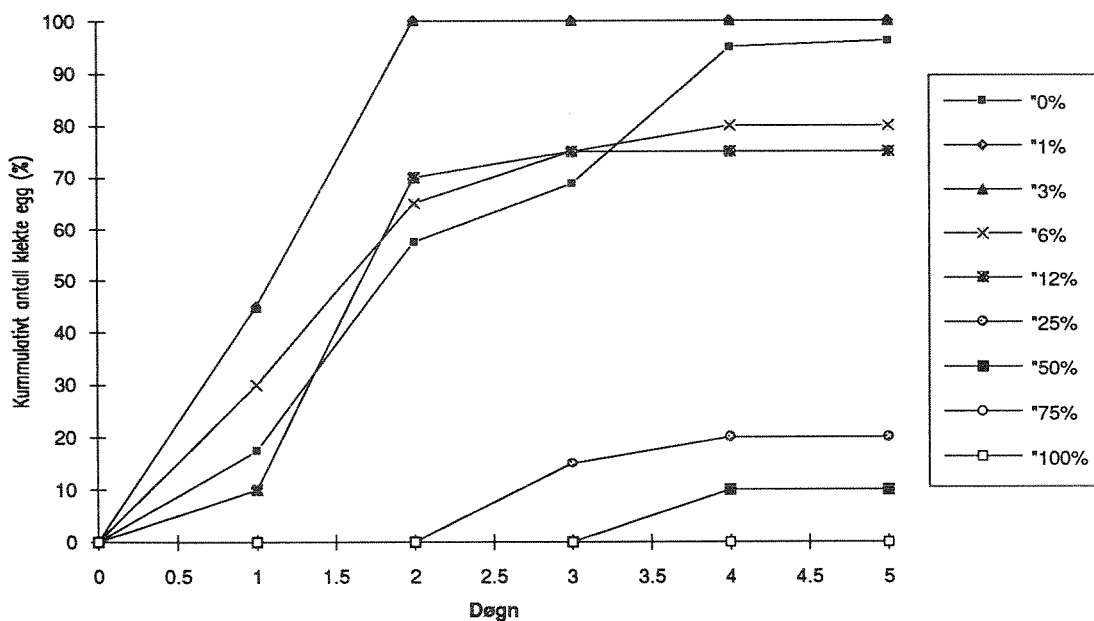
Resultatene fremgår av tabell 1-3 og figur 1-3.

Det ble registrert forholdsvis stor forskjell i klekkingstid i de 4 kontroll-løsningene. I tre av disse var imidlertid klekkingen 100% etter 4 døgn, og middelveidien for alle kontrollene var 95%.

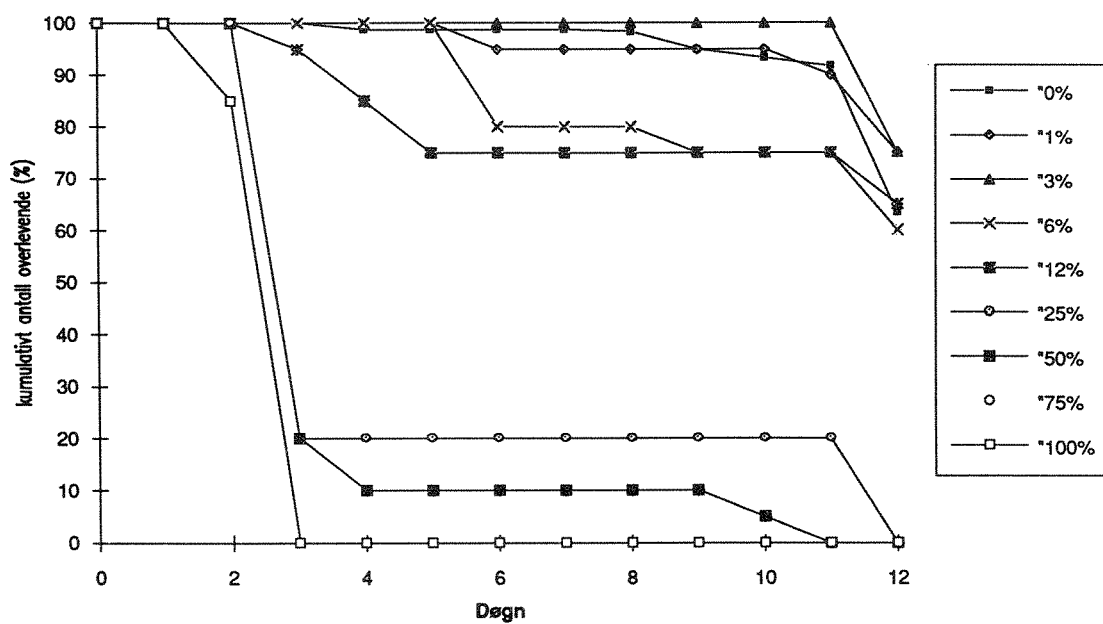
Klekkingen ble sterkt påvirket av avløpsvann i konsentrasjoner ned til 25%. Effekten besto i at eggene ble dekket av et hvitt lag som besto av sopp og bakterier. Dette var sannsynligvis en sekundæreffekt som følge av beskadigelse av egginnen. Dette resulterte i at eggene ikke klekket. Overlevingen var da også bare 20% eller mindre i disse konsentrasjonene. I 12% konsentrasjon og lavere var det ikke signifikante effekter hverken på klekketidspunkt eller overleving. Høyeste konsentrasjon uten signifikante effekter (NOEC) var således 12% (120 ml avløpsvann/l).

Tabell 3. Mediane klekke-og overlevelsesperioder (døgn) ved ulike konsentrasjoner (%) av avløpsvann

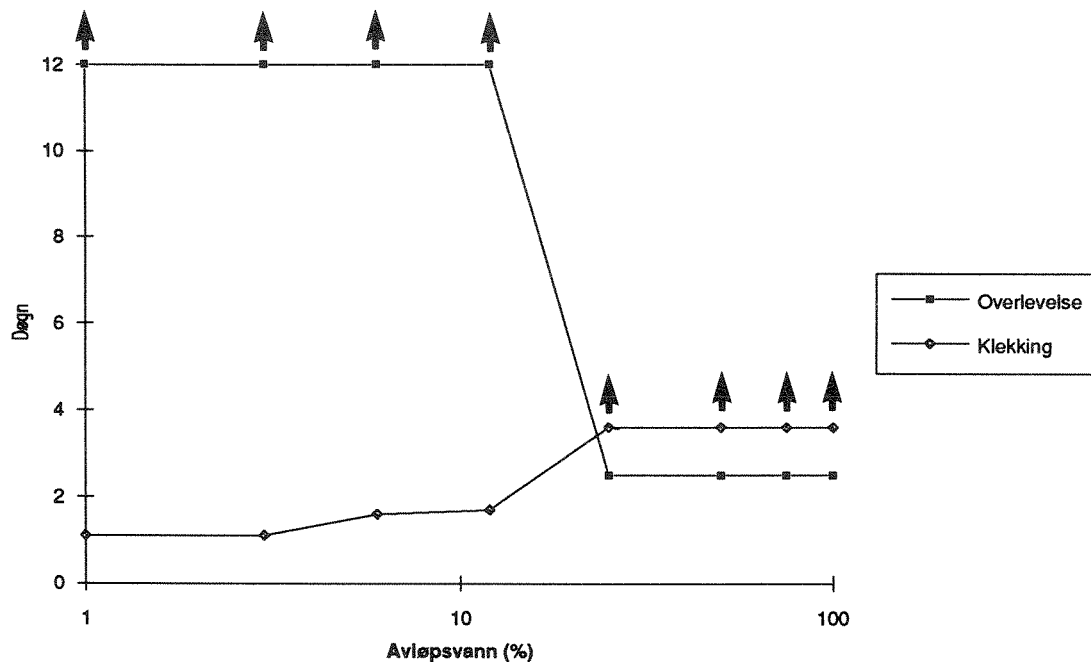
| Avløpsvann % | Median klekkesetid døgn | Median overlevestid døgn |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0 | 0.75 | >12 |
| 0 | 3.2 | >12 |
| 0 | 3.4 | >12 |
| 0 | 1.5 | >12 |
| 1 | 1.1 | >12 |
| 3 | 1.1 | >12 |
| 6 | 1.6 | >12 |
| 12 | 1.7 | >12 |
| 25 | >4 | 2.5 |
| 50 | >4 | 2.5 |
| 75 | >4 | 2.5 |
| 100 | >4 | 2.5 |



Figur 1. Kumulativt antall klekte egg (%) ved forskjellig eksponeringstid. Kurven for "0%" angir middelverdien for 4 kontroller.



Figur 2. Kumulativt antall overlevende fisk/egg (%) ved forskjellig eksponeringstid. Kurven for "0%" angir middelverdien for 4 kontroller.



Figur 3. Tid for 50% overlevelse og klekking av sebrafisk som funksjon av konsentrasjon av avløpsvann.

BILAGA 5

Potentiell bioackumulerbarhet

NIVA
v/T.Källqvist
Postboks 69 Korsvoll
0808 Oslo 8

| | |
|--------------------------------------|---------|
| NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING | |
| J. nr.: | 1600/91 |
| Sak nr.: | 90114 |
| Mottatt: | 22.5 |

SI SENTER FOR
INDUSTRIFORSKNING
Center for Industrial Research

Rapport

Deres ref.

Vår ref.
Berit Holestøl

Direkte innvalg
452824

Dato
15.05-91

Oppdragets tittel

**BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBART
MATERIALE I EN VANNPRØVE.**

Oppdrag nr
114401-045
1-91-048

Den 22.04.91 ble det mottatt en frosset prøve merket "Fiskeby 19.04-91". Potensielt bioakkumulerbart materiale skulle bestemmes med tynnsjikt-kromatografi og gasskromatografisk analyse med flammejonisasjonsdetektor (FID).

ANALYSEMETODE (se vedlegg)

RESULTAT

| Ekstrakt | fraksjonering | Applikasjonssone | $\log P_{ow} > 10^5$ | $\log P_{ow} > 10^3-10^5$ |
|----------|---------------|------------------|----------------------|---------------------------|
| | Før TLC | Fraksj.1 | Fraksj.2 | Fraksj.3 |
| surt | 1.7 mg/l | i.p.* | i.p.* | i.p.* |

* ikke påvist

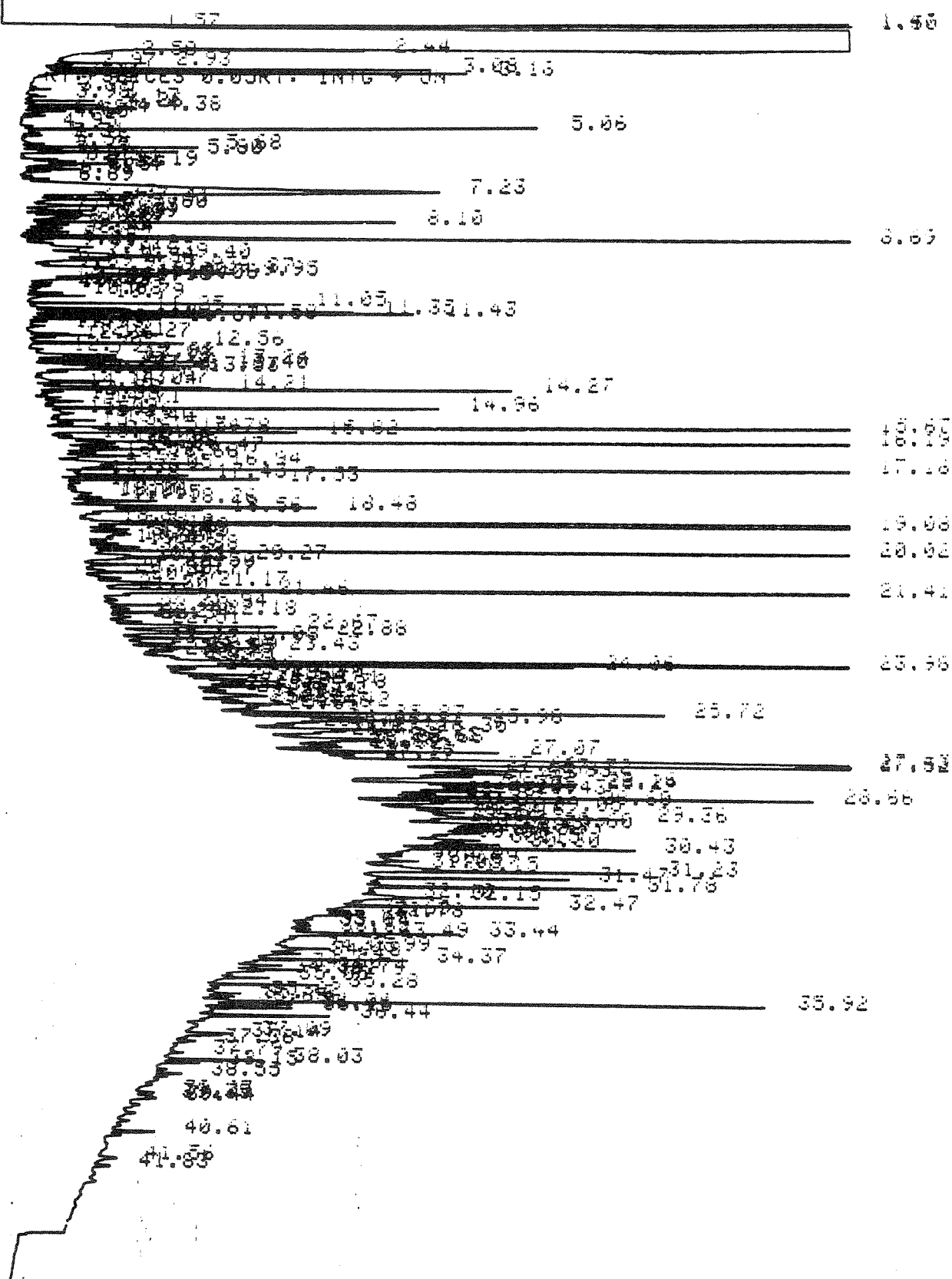
Med vennlig hilsen

SENTER FOR INDUSTRIFORSKNING

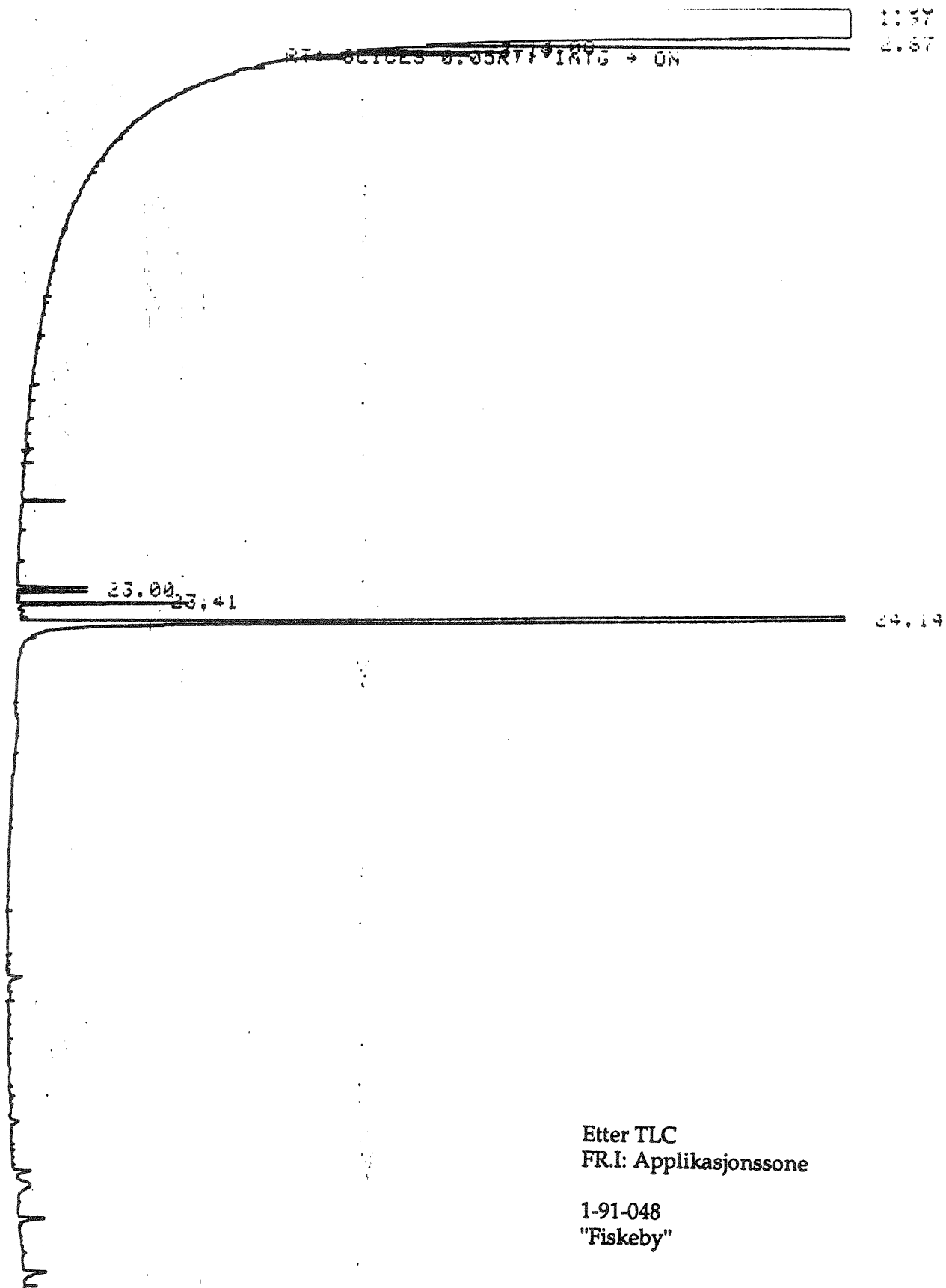
Arne L. Kvernheim
Arne L. Kvernheim

Berit Holestøl

Vedlegg: 5

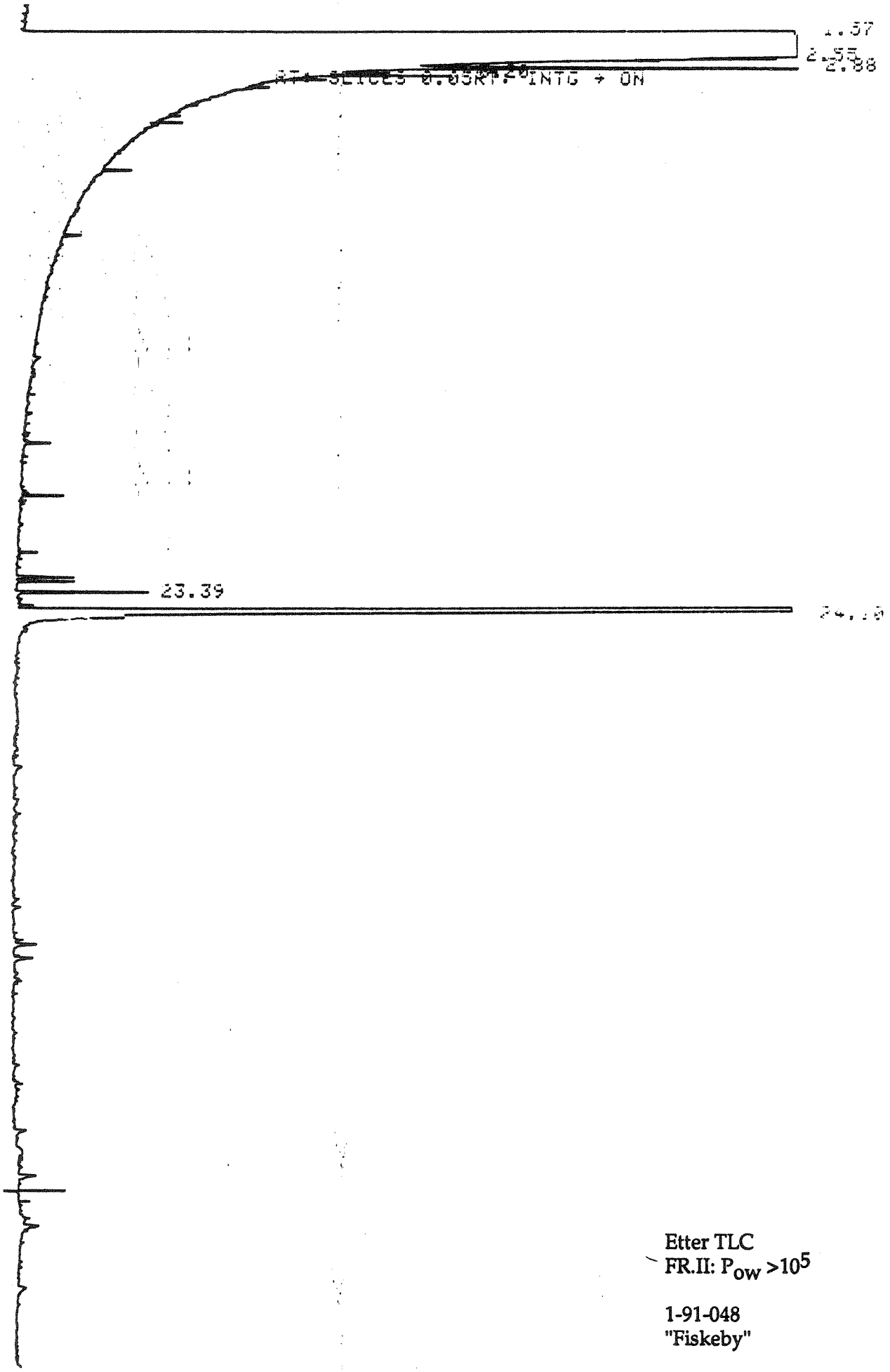


07



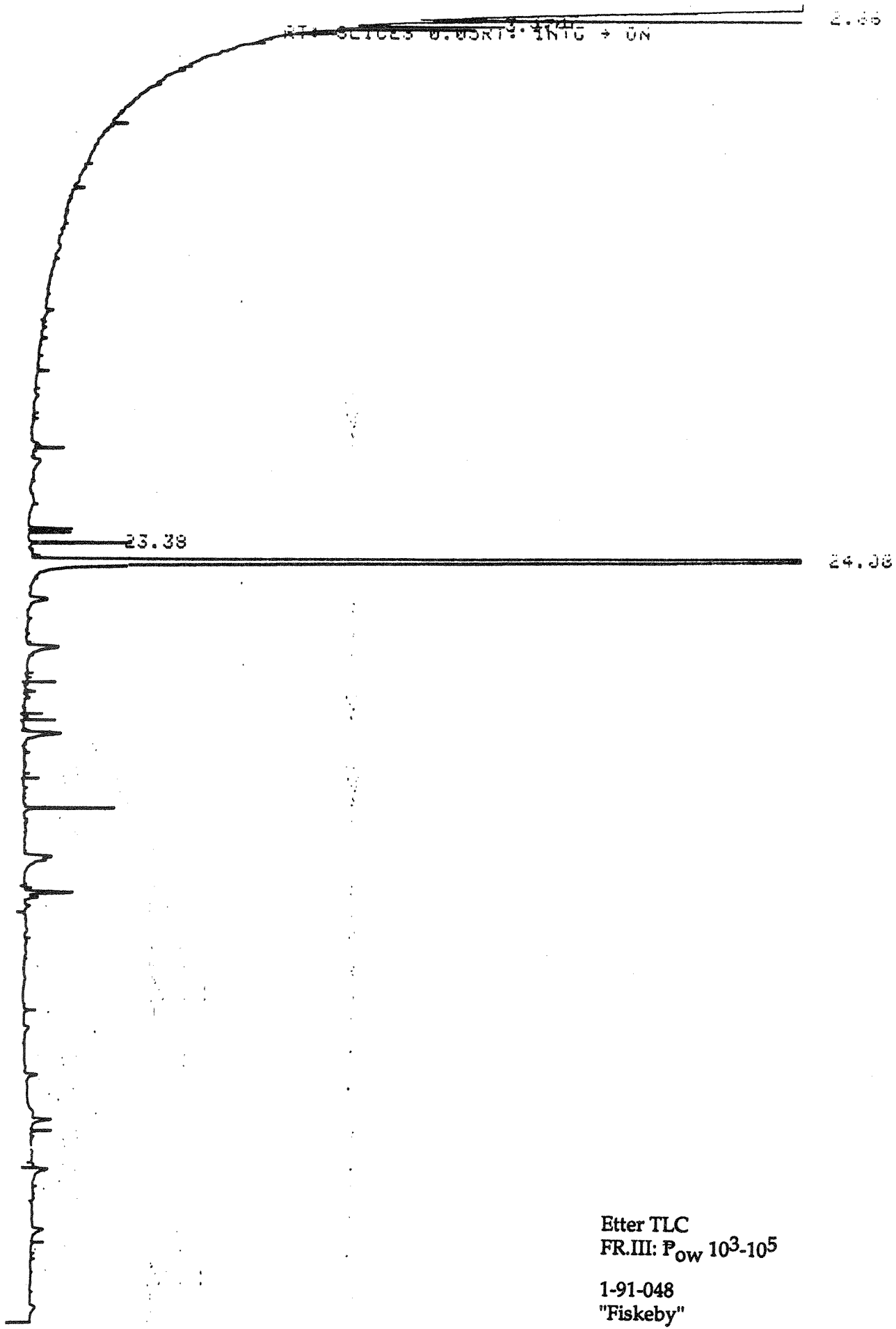
Etter TLC
FR.I: Applikasjonsone

1-91-048
"Fiskeby"



130

Etter TLC
FR.II: P_{ow} >10⁵
1-91-048
"Fiskeby"



Etter TLC
FR.III: Pow 10³-10⁵
1-91-048
"Fiskeby"

METODE FOR BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER

Surt ekstrakt

Vannprøven ble først ekstrahert 2 ganger med sykloheksan ved pH ca 2 (justert med svovelsyre). Eventuell emulsjon ble fjernet ved utfrysing. Ekstraktene ble kombinert, vasket med vann pH ca 2 og tørket med natriumsulfat. Ekstraktet ble oppkonsentrert til lite volum (1-5 ml), analysert gasskromatografisk og viderefraksjonert på tynnsjikt (TLC) i tre fraksjoner.

- I Fraksjon: Applikasjonsone
- II " : Pow $>10^5$
- III " : Pow $10^3 - 10^5$

Lipofile eller potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser ble bestemt ved tynnsjiktskromatografi av sykloheksanekstrakter av vannprøvene. Metoden er en tillempning av en metode utarbeidet av Lars Renberg et al.¹⁾ Substanser med en fordelingskonstant oktanol/vann Pow $>10^3$ ble regnet som potensielt bioakkumulerbare. Fraksjonene ble utskrapt og ekstrahert med sykloheksan/isopropanol (1:1) 3 ganger. De samlede ekstraktene ble ristet med vann pH ca 2. Sykloheksanekstraktet ble vasket med surt vann og tørket med natriumsulfat.

Den potensielt bioakkumulerbare mengden i hvert ekstrakt ble bestemt ved gasskromatografisk analyse med flammeionisasjonsdetektor (FID). Arealet av de enkelte toppene relatert til en indre standard $C_{18}H_{38}$ ga et mål for mengden organiske kromatograferbare forbindelser. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfelle organiske substanser med en molekylvekt opp til ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk. Ved beregningen ble det antatt at de potensielt bioakkumulerbare forbindelsene har lik respons med den utvalgte indre standarden. Vår erfaring er at responsen med FID-detektor for ulike organiske forbindelser kan variere med opptil 50%. Dette betyr at metoden må betraktes som semikvantitativ. Blindprøve ble opparbeidet og kjørt parallelt med prøveekstraktet.

Forsøksbetingelser ved GC analysen: Kapillærkolonne, fused silica, DB5, l. 30 m indre diam. = 0,24 mm

program: Starttemp. $60^{\circ}C$, henstand 2 min
oppv.hast $5^{\circ}C/min$
sluttemp. $280^{\circ}C$, henstand 8 min,
attn. 2³

standard: $n-C_{18}H_{38} = 106.9 \mu g/ml$

¹⁾ Lars Renberg et al., *Chemosphere*, Vol. 9, 1980, s.683-691

BILAGA 6

Nedbrytbarhetstester

TESTRAPPORT**BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART ORGANISK STOFF**

Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds. ISO 9408

Oppdrag nr.: 91063

TESTSTOFF: Avløp vann. Fiskeby Board AB

TESTAPPARATUR: Manometrisk respirometer, WTW 2001

NÆRINGSLØSNING: ISO/DIS 9408 Saltløsn. A, 10 ml/L (1,3 mg N/L)

INOCULUM: Blanding av aktiv-slam fra lab. enhet (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk og luftet (2 døgn) kom. avløpsv. (NS 4749). Sentrifugert, vasket (2x) og resuspendert i fortynningsvann. Kimtall: $7,9 \cdot 10^4$ /mg STS. Tilsetning: 20 mg STS/L.

INKUBASJON: Temperatur: 20 ± 1 °C . Varighet: 28 dager.
pH: Start 7,4 Slutt: 7,4

Testperiode: 23.04.91 - 21.05.1991

REFERANSE-STOFF: Anilin, 20 mg C/L Lag-fase 2 døgn
Nedbrytningsgrad: DOC-reduksjon, 97 % etter 28 døgn.
Sammenlignet ned anilinkontrollen ble det ikke observert hemningseffekt i blandinger av anilin og testprøve ved de anvendte testkonsentrasjoner.

Konsentrasjon av TOC i avløpsvannet: 143 mg/L

Konsentrasjon av DOC i avløpsvannet: 139 mg/L

Karbon-verdiene som DOC ved start (dag₀) og etter 28 døgn bionedbrytning er korrigert for DOC₀ og DOC₂₈ i blank-prøve (inoculum).
(DOC=Løst organisk karbon, BOD=Biokjemisk oksygenforbruk)

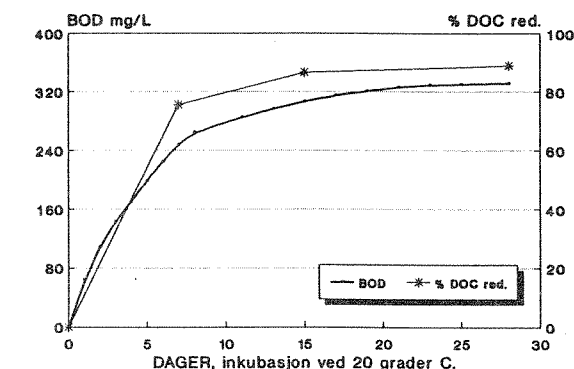
RESULTATER: DOC- reduksjon = 89 % BOD₂₈ = 330 mg/L

| Fort. grad | Analyser, mg/L. DOC reduksjon | | | | | | BOD ₂₈ mg/L ⁸ | |
|------------|-------------------------------|------------------|----|-------------------|----|-------------------|-------------------------------------|-----|
| | DOC ₀ | DOC ₇ | % | DOC ₁₄ | % | DOC ₂₈ | | % |
| 1:4 I | 33,2 | 8,15 | 75 | 4,42 | 87 | 3,65 | 89 | 83 |
| II | 33,4 | | | | | 3,53 | 89 | 82 |
| 1:2 I | 66,2 | | | | | 7,87 | 88 | 162 |

Kommentarer:

Det ble påvist et meget rask biokjemisk oksygenforbruk og DOC-reduksjon. Dette viser at meste-parten av de organiske stoffene er lett nedbrytbare. NO₃-N analyser påviste ikke nitrifikasjon under inkubasjonen.

DOC-red. og BOD utvikling:



Middelsverdi av duplikater for BOD

Testansvarlig: H. Efraimsen

REFERANSE: 1. ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds- Method by determining the oxygen demand in closed respirometer.
2. DOC er analysert på ASTRO mod. 2001 TOC/TC analysator.

Norsk Institutt for Vannforskning

**TESTRAPPORT:
BIOOKSIDASJON AV ORGANISKE FORBINDELSER I VANN**

Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds. ISO 7827 DOC analysis.

Oppdrag nr.: 91063

TEST STOFF: Avløpsvann. Fiskeby Board AB

TESTBETINGELSER

APPARATUR: 10 L Glass flasker

TEST-KONSENTRATSJON: 1 : 2 (50 %)fortynnet i BOD-fortynningsløsning.

TEST-MEDIUM: ISO 7827 Fortynningsløsning tilsatt næringsalter
Tilsats av løsn. A: 5 ml /L.
N-kilde: 5 mg/L NH₄Cl. Standard av øvrige løsninger.

INOKULUM: Blanding av aktiv-slam fra lab. enhet (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk og luftet (2 døgn)kom. avløpsv. (NS 4749). Sentrifugert, vasket (2x) og resuspendert i fortynningsvann.
Kimtall: $7,9 \cdot 10^4$ /mg STS. Tilsetning: 20 mg STS/L.

INKUBASJON: Temperatur; $20 \pm 1,0^{\circ}$ C . Varighet: 28 dager.
pH, start: 7,4 pH, slutt: 7,4

Testperiode: 23.04.- 21.05. 1991

REFERANSE STOFF: Anilin 20 mg C/l. Nedbrytningsgrad, DOC reduksjon: 97 % etter 28 døgn.

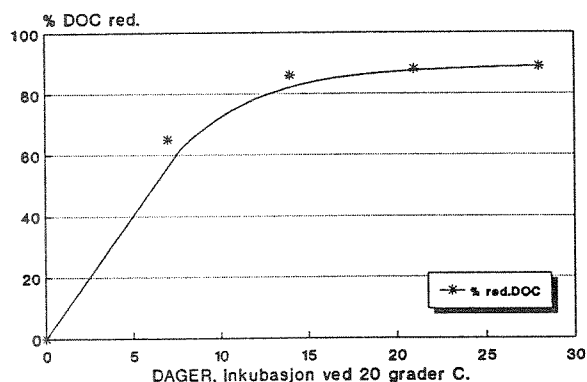
RESULTATER

DOC reduksjon etter 28 døgn inkubasjon: 89 %

Kommentarer:

Bionedbrytningen målt som DOC reduksjon gikk meget raskt. Hele 65 % reduksjon ble det påvist etter 5 døgn.

DOC-reduksjon kurve:



Harry Efraimsen
Testansvarlig

REFERENCE: ISO 7827 Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds. DOC analysis.

BIOOKSIDASJON I FERSKVANN

DATA SKJEMA

Test laboratorium: Norsk Institutt for Vannforskning, NIVA

Produkt: Avløpsvann. Fiskeby Board AB

Metode: Kontinuerlig omrøring (ISO 7827 DOC analysis).

Dato for test-start: 23.04. 1991

Avløpsvannets karbon-innhold: 143 mg/l TOC
 Konsentrasjon i test-løsningen: 67.7 mg/l DOC

Inoculum: Mikroorganismer i effluent aktiv slam anlegg + luftet kloakk vann. Tilsats: 20 mg/L Suspendert stoff.

Løst organisk karbon DOC

| | Fl. Nr. | | Konsentrasjon etter x dager (mg/l C) | | | | |
|---|---------|----------------|--|------|------|------|------|
| | | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Teststoff testvann+ nærings- salter. | 1 | t ₁ | 66.0 | 25.5 | 9.6 | 8.5 | 7.86 |
| | 2 | t ₂ | 67.4 | 23.6 | 9.6 | 8.8 | 7.84 |
| | | Ct Snitt | 67.7 | 24.0 | 9.6 | 8.65 | 7.85 |
| Blank tettvann+ nærings- salter. | 1 | b ₁ | 0.47 | | 0.57 | 0.58 | 0.7 |
| | 2 | b ₂ | 0.63 | | | | 0.72 |
| | | Cbl Snitt | 0.55 | | 0.57 | 0.6 | 0.7 |

Evaluering av rå-data

| DOC-konsentrasjon - blank | % DOC reduksjon etter x dager | | | |
|--|-------------------------------|----|----|----|
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Snitt $Dt = \left[1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_{t_0} - C_{bl_0}} \right] \cdot 100$ | 65 | 86 | 88 | 89 |

Dt = % DOC reduksjon ved tid t.

C₀ = DOC konsentrasjon ved start.

C_t = DOC konsentrasjon ved tid t.

C_{bl₀} = DOC konsentrasjon i blank ved tid start.

C_{bl_t} = DOC konsentrasjon i blank ved tid t.

Carbon analysator:

Karbon ble analysert på ASTRO 2001 TC/TOC analyser.