

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

Blindern

0-12/73

A2 - 08

VEKSTFORSØK I FORBINDELSE MED
FORURENSNINGSUNDERSØKELSER I NEDRE OTRA

Saksbehandler: siv.ing. Morten Laake

Rapporten avsluttet: 15. november 1974

FORORD

Vårt arbeid med heterotrofe begroingsorganismer har hittil konsentrert seg om grunnleggende vekstfysiologiske undersøkelser i kjemostat, som tidligere beskrevet i rapporter fra 1970 og 1973 (B-8/71). Ved planleggingen av en ny forurensningsundersøkelse for Nedre Otra, der begroingsproblemet er det dominerende, ble det klargjort at en mer direkte angrepsmåte var nødvendig for innen rimelige tids- og kostnadsrammer å kunne gi veiledende svar. Dette har gått på bekostning av tid og midler til fortsatte kjemostatforsøk.

Resultatene fra det gjennomførte forsøksprogrammet har imidlertid også betydelig forskningsmessig interesse, og denne rapporten er ment å gi en relativt detaljert dokumentasjon av hva som hittil er gjort.

Mye av det praktiske arbeidet med forsøkene er utført av laborant Ellen Corneliussen, cand.mag. Åse Bakketun og meieritekniker Harry Efraimsen, som også har deltatt i feltundersøkelsene. Cand.mag. Eli-Anne Lindstrøm har utført mikroskopisk analyse av artssammensetningen i begroingsprøvene. En takk rettes til alle som har hjulpet til på en eller annen måte.

Blindern, 15. november 1974

Morten Laake

INNHALDSFORTEGNELSE

| | Side |
|--|------|
| 1. BAKGRUNN OG MÅLSETTING FOR BEGROINGSUNDERSØKELSER | 7 |
| 2. HETEROTROFE BEGROINGSSAMFUNN | 8 |
| 2.1 Artssammensetning | 8 |
| 2.2 Fysiske og kjemiske forhold | 9 |
| 2.3 Økologisk funksjon og konsekvens | 11 |
| 2.4 Begroingssamfunnet i nedre Otra | 12 |
| 3. BIOLOGI OG VEKSTFYSIOLOGI FOR SOPPSLEKTEN <i>Fusarium</i> | 12 |
| 3.1 Taksonomi, morfologi og livssyklus | 12 |
| 3.2 Biologi og økologi | 14 |
| 3.3 Vekstfysiologi og økofysiologi hos <i>Fusarium aquaeductuum</i> (Radleh. & Rabh.) Sacc. | 14 |
| 3.4 Vekstfysiologiske forsøk i kjemostat | 15 |
| 3.5 Sulfitlut som vekstsubstrat | 18 |
| 4. METODIKK VED VEKSTFORSØK OG ANALYSER | 21 |
| 4.1 Valg av forsøksorganismer | 21 |
| 4.2 Dyrkningsmetode | 21 |
| 4.3 Dyrkningsmedier og forsøksmateriale | 22 |
| 4.4 Isoleringsmetoder | 28 |
| 4.5 Biomassebestemmelse ved ATP-analyse | 28 |
| 4.6 Tynnsjikt-kromatografi av vekstmedier | 28 |
| 4.7 Dyrkningsbetingelser ved utførte forsøk | 29 |
| 5. RESULTATER OG BEREGNINGER | 29 |
| 5.1 Preferanse for ulike N-kilder hos <i>F. aquaeductuum</i> og <i>G. candidum</i> | 29 |
| 5.2 Preferanse for ulike fraksjoner av sulfitlut som energi- og karbonkilde hos <i>F. aquaeductuum</i> og <i>G. candidum</i> | 29 |
| 5.3 Utnyttbarhet av lignosulfonsyrer og sukkerarter | 31 |
| 5.4 Vekstutbyttet for <i>G. candidum</i> ved tilsats av glukose i sulfitlutmediet | 35 |

| | Side |
|---|------|
| 5.5 Vekstutbytte for <i>F. aquaeductuum</i> , <i>G. candidum</i> og NIVAC 4-74 som funksjon av type og konsentrasjon av Mg-base-avluter | 35 |
| 5.6 Begrensende næringsfaktorer for heterotrof vekst i vann fra Steinsfoss | 36 |
| 5.7 Kloakkvann som N- og P-kilde | 42 |
| 5.8 Heterotrof vekstpotensial og nivå av organisk karbon og næringsalter i nedre del av Otra | 42 |
| 5.9 Variasjoner i øvrige kjemiske parametre | 48 |
| 5.10 Begroingssamfunnets sammensetning | 51 |
| 5.11 Sopp isolert på sulfittlutmedier | 52 |
| 6. DISKUSJON OG OPPSUMMERING | 55 |
| 6.1 Metodiske begrensninger | 55 |
| 6.2 Organiske utslipps og næringssaltenes betydning for den heterotrofe begroing | 56 |
| 6.3 Toksiske effekter ved ulike utslipp | 56 |
| 6.4 Effekter på sjøresipienten | 57 |
| 6.5 Fortsatte undersøkelser over den heterotrofe begroing i nedre Otra | 57 |
| 7. LITTERATURHENVISNINGER | 59 |

TABELLFORTEGNELSE

| | |
|--|----|
| 1. Kjemisk sammensetning av tørrsubstansen i sulfittavlut fra et kraftpapirkok etter fjerning av uorganiske bestanddeler | 19 |
| 2. Konsentrasjon av monomere sukker i sulfittavlut fra Na-basekok på furuvirke | 20 |
| 3. Kjemiske analysedata for vann fra Otra benyttet til vekstforsøk | 24 |
| 4. Kjemiske analysedata for sulfittavluter benyttet til vekstforsøk | 25 |
| 5. Kjemiske analysedata for mekanisk og kjemisk rensed kloakk anvendt ved vekstforsøk | 25 |
| 6. Sammensetning av agarmedier anvendt ved isolering av lignosulfonsyreretolerante gjær og sopp | 26 |

| | | |
|-----|---|-------|
| 7. | Oversikt over utførte forsøk med sulfittlut som karbon- og energikilde | 27 |
| 8. | Absorbans ved 500 nm i kulturfiltrat etter dyrkning av <i>F. aquaeductuum</i> , <i>G. candidum</i> og NIVAC 4-74 på ulike sulfittlutmedier (1 w/v %) | 33 |
| 9. | Semi-kvantitativ analyse av hexoser og pentoser i ulike avluter bedømt ut fra tynnsjikt-kromatografi | 34 |
| 10. | Økning i totalt vekstutbytte (ΔY_s) og beregnet vekstutbytte med hensyn på glukose (Y_{glu}^s) ved tilsetning av glukose (60 mM) i vekstmedier med ulike typer sulfittlut (1,0 w/v %) | 37 |
| 11. | Forekomst av benthos i Otra, 9. mai 1974 | 53-54 |

FIGURFORTEGNELSE

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | Selvrensingsprosessen i en elv | 10 |
| 2. | Dominerende mikroorganismer i heterotrof begroing | 13 |
| 3. | Teoretisk veksthastighet for <i>Fusarium aquaeductuum</i> og <i>Sphaerotilus</i> sp. som funksjon av glukosekonsentrasjonen | 17 |
| 4. | Oversikt over bedrifter og prøvetakingsstasjoner i OTRAS nedre løp | 23 |
| 5. | Vekstutbytte (Y_s) på fraksjonert og ufraksjonert sulfittlut (Ca-base, gran) tilsatt i destillert vann (1,0 w/v %) med tilskudd av fosfor (1 mM P) og ulike nitrogensalter (10 mM N) | 32 |
| 6. | Vekstutbytte av <i>Geotrichum candidum</i> i vann fra Steinsfoss tilsatt ulike sulfittavluter (1,0 w/v %) anriket med fosfor (1 mM P), nitrogen (10 mM N) og glukose (0,18 w/v %) | 38 |
| 7. | Vekstutbytte (Y_s) på sulfittlut (gran) tilsatt vann fra Steinsfoss med tilskudd av fosfor (P) og nitrogen (N) | 38 |
| 8. | Vekstutbytte (Y_s) på sulfittlut (furu + 10% løv) tilsatt vann fra Steinsfoss med tilskudd av fosfor (P) og nitrogen (N) | 39 |
| 9. | Vekstutbytte (Y_s) på sulfittlut (løv) tilsatt vann fra Steinsfoss med tilskudd av fosfor (P) og nitrogen (N) | 39 |
| 10. | Vekst av <i>Geotrichum candidum</i> på sulfittlut (furu + 10% løv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) som funksjon av N-tilsetningen (forsøk 9) | 40 |

| | Side |
|---|------|
| 11. Vekst av <i>Geotrichum candidum</i> på sulfittlut (furu + 10% løv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) som funksjon av P-tilsetningen (forsøk 9) | 40 |
| 12. Vekst av <i>Geotrichum candidum</i> på sulfittlut (furu + 10% løv) i vann fra Steinsfoss (0,05 - 0,1 - 0,5 w/v % lut) med tilsetning av rensset kloakk (forsøk 4) | 43 |
| 13. Vekst av <i>Geotrichum candidum</i> på sulfittlut (furu + 10% løv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) med tilsetning av rensset kloakk (forsøk 7) | 43 |
| 14. Heterotrof vekstpotensial ved poding av <i>Geotrichum candidum</i> i vann fra nedre Otra (prøvedato 9/5-74) med ulike anrikninger av C-kilde og N | 44 |
| 15. Heterotrof vekstpotensial ved poding av <i>Geotrichum candidum</i> i vann fra nedre Otra (prøvedato 9/5-74) med ulike anrikninger av N og P | 44 |
| 16. Konsentrasjonsforløpet for oppløst organisk karbon (LOC) og totalt organisk karbon (TOC) i nedre Otra. | 45 |
| 17. Konsentrasjonsforløpet for ortofosfat og totalfosfat i nedre Otra | 46 |
| 18. Konsentrasjonsforløpet for oppløst og partikulært nitrogen (Tot N), ammonium (NH ₄) og nitrat (NO ₃) i nedre Otra | 46 |
| 19. Forløpet for spesifikk elektrolyttisk ledningsevne (κ_{20}) i nedre Otra | 49 |
| 20. Konsentrasjonsforløpet for sulfat i nedre Otra | 49 |
| 21. Konsentrasjonsforløpet for Mg, Ca, Na og K i nedre Otra | 50 |
| 22. Forløpet av pH i nedre Otra | 50 |

1. BAKGRUNN OG MÅLSETTING FOR BEGROINGSUNDERSØKELSENE

Tilstanden i Otras nedre løp er beskrevet gjennom tidligere undersøkelser (Bergmann-Paulsen 1962), og det er utført forsøk som påviser at sulfittlut har toksiske effekter på fisk (Grande 1964). Men fremdeles har vi en manglende kunnskap om relasjonene mellom mengden av ulike typer forurensninger i vassdraget og den heterotrofe begroing, og vi vet lite om hvilke komponenter i de ulike utslipp som er av størst betydning for veksten, eller som har skadelige effekter på vassdraget eller resipienten.

I tidligere undersøkelser har problemet blitt vurdert mest fra kjemiske og fiskeribiologiske synsvinkler, noe som gjenspeiles i at de kjemiske analyser som ble utført på Otra-vannet i 1960-61 er lite relevante sett fra en mikrobiologs synspunkt.

I NORDFORSKs regi er det nå startet opp et arbeid for å klarlegge fysiske, kjemiske og biologiske sider ved de fleste av treforedlingsindustriens virksomheter og prosesser, blant annet toksitetsundersøkelser. NIVA deltar i dette arbeid med to prosjekter - vekstfysiologiske undersøkelser av begroingsorganismer i kjemostat og den pågående Otra-undersøkelsen. Resultater fra andre prosjekter innen NORDFORSK-gruppen vil således direkte komme Otra-undersøkelsen tilgode, men også i egen regi bør det gjennomføres toksitetsforsøk med de forskjellige utslipp.

Det kan formuleres en rekke spørsmål og problemstillinger for nærmere å belyse begroingens årsak, natur og virkning, og følgende punkter ble satt opp ved arbeidets start høsten 1973:

1. Beskrivelse av begroingssamfunnets artssammensetning og struktur langs vassdraget.
2. Fysiske og kjemiske faktorerers variasjon over året og eventuell innvirkning på begroingsintensitet og kvalitet.

3. Hvilke næringsfaktorer begrenser veksten, og hvilke fysisk-kjemiske faktorer virker inn.
4. Hva betyr utslipp av husholdningskloakk som kilde til organisk stoff og særlig næringssalter for begroingen.
5. Hva betyr andre utslipp til vassdraget, som blekeriavluter, wall-boardavlut, vaskeri- og garveriutslipp.
6. Hva betyr de tungt nedbrytbare deler av sulfittavluten som ligno-sulfonsyrer og trefiber i relasjon til lett nedbrytbare organiske syrer og karbohydrater, som energi-, karbon- eller næringssaltkilde.
7. Hvilke effekter har begroingen på vassdragets verdi for rekreasjon og fiske, og som vannkilde, og til hvilket nivå må hvilke utslipp reduseres utfra disse hensyn.
8. Forsøk på kvantitative beregninger og modellstudier på grunnlag av eksperimentelle resultater for om mulig å kunne gi direkte veiledning til prioritering og valg av rensetekniske tiltak.

Arbeidet langs disse linjer har nå kommet såvidt godt igang at det er hensiktsmessig å beskrive hva som vites om den heterotrofe begroings økologi, spesielt i sulfittlutbelastede elver, og enkelte viktige arters biologi, samt rapportere resultater fra en feltbefaring og laboratorieforsøk med begroingsorganismer.

2. HETEROTROFE BEGROINGSSAMFUNN

2.1 Artssammensetning

Man har i mange år vært klar over at organisk belastning i et vassdrag i form av kloakkutslipp, avløp fra næringsmiddelindustri som meierier, bryggerier, potetmelfabrikker og slakterier, og særlig fra sulfittcellulosefabrikker gir opphav til en kraftig oppblomstring av såkalt "sewage fungus", spesielt umiddelbart etter utslippsstedet.

Det foreligger en omfattende litteratur om hvilke arter som forekommer, og om deres kvantitative betydning i økosystemet. Som navnet tilsier er innslaget av sopp ganske markant. I sin mest utviklede form har begroingen utseende av "lammehaler" som i tette matter svinger i vannstrømmen, eller det dannes et tykt, glatt belegg på stein og annet fast underlag.

Curtis (1969) beskriver "sewage fungus" som en matrix av filamentære mikro-organismer (bakterier, sopp og protozoer) som binder samfunnet til underlaget, og som igjen inneholder andre ikke filamentære, vanligvis bevegelige organismer (protozoer, diatoméer og bakterier). Høyere organismer som hjuldyr (*Rotifera*), rundormer (*Nematoda*) og fjærmygglarver (*Chironomidae*) er ofte assosiert med de beleggdannende organismer og danner det øvre ledd i næringskjeden.

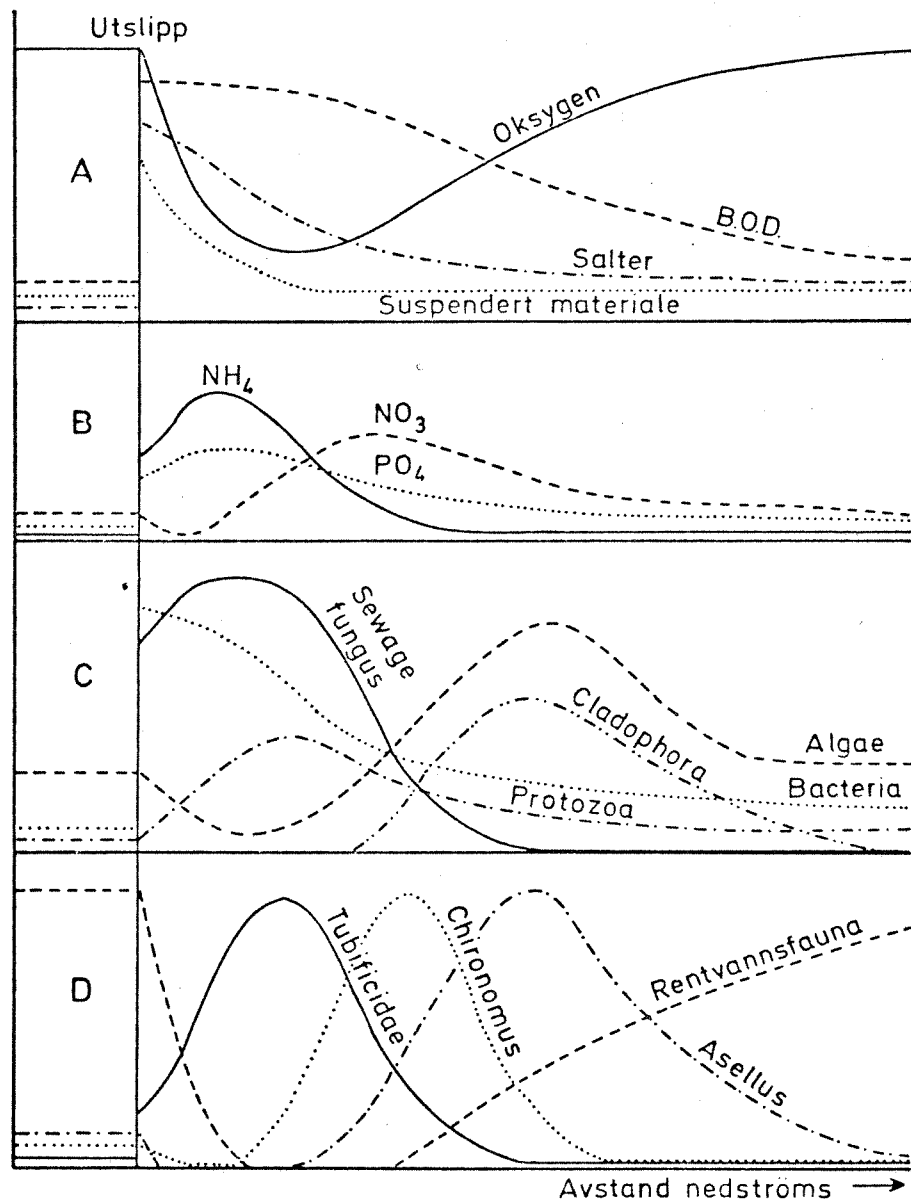
Nyere undersøkelser fra England (referert av Curtis 1969) har vist at følgende filamentære organismer der er de mest vanlige dannere av "sewage fungus"; av bakterier *Sphaerotilus natans*, *Zoogloea* sp. og *Beggiatoa alba*, av sopp *Geotrichum candidum* og *Leptomitius lacteus* av fastsittende ciliater *Charaxesium polypinum*, og av alger *Stigeoclonium tenue* og forskjellige diatoméer. Selv om forekomst av *Fusarium aquaeductuum* angis av flere forfattere, anses den vanligvis som sjelden, mens den i enkelte norske vassdrag (Ormerod, Grynne og Ormerod 1966) synes å dominere vekstbildet i "sewage fungus" i fravær av *Sphaerotilus*.

Ved NIVAs undersøkelser i sør-norske elver belastet med sulfittavlut har det lyktes å identifisere og rendyrke en del sopparter fra begroingssamfunn, hvorav de hyppigst forekommende er *Geotrichum candidum*, *Fusarium aquaeductuum*, *Leptomitius lacteus* og *Phialophora* sp.

2.2 Fysiske og kjemiske forhold

Hvilke fysiske og ernæringsmessige betingelser er det så som leder til en slik dominans av fastsittende, filamentære, heterotrofe organismer i et hurtigrennende vassdrag. Hynes (1960) illustrerer de kvalitative trends i enkelte målbare størrelser som gjengitt i fig. 1,

Fig.1 Selvrengingsprosessen i en elv etter utslipp av organisk forurensning
A og B: fysiske og kjemiske faktorer,
C: mikro-organismer, D: større dyr
(Etter Hynes 1960)



og en ser her at vannet i sonen med "sewage fungus" er karakterisert ved et meget høyt biokjemisk oksygenforbruk (BOD) som raskt synker nedstrøms. Det er tydelig at organismene er hovedansvarlige for oksydasjon og mineralisering av det organiske utslipp. Mengden oppløst oksygen i vannet synker, men erstattes raskt ved turbulens og fotosyntetisk aktivitet i den påfølgende utvikling av alger som mineraliseringsproduktene kan gi opphav til.

Ved utslipp av sulfittavlut i et vassdrag må en vente et noe annet bilde enn det ovenfor beskrevne for kloakkutslipp, da avluten inneholder svært lite biologisk utnyttbart nitrogen og også fosfat. Mineraliseringsproduktene vil f.eks. ikke umiddelbart føre til øket algeproduksjon.

2.3 Økologisk funksjon og konsekvens

Heterotrofe begroingsamfunn spiller en viktig rolle ved raskt å mineralisere organisk avfall, og det er en forutsetning for dette at vannet er friskt strømmende og har et høyt oksygennivå. Videre er det viktig at vekstformen er filamentær og fastsittende. Et høyt nivå av aktiv biomasse med stor kontaktflate kan da opprettholdes i vannmassene og derved representere et stort omsetningspotensial. Dersom omsetningen bare skulle skje ved heterotrof, frittstrømmende organismer, ville disse i stor grad føres med strømmen uten å få tid til å bygge opp et høyt biomassenivå før utslippet fortynnes ytterligere i en innsjø eller fjord. I stilleflytende vann vil mineraliseringen gå langt langsommere diffusjon av oksygen inn i vannmassene, og oksygenfritt bunnvann ville bli følgen. Det er også sannsynlig at begroingen bidrar til å avgifte og nedbryte toksiske forbindelser fra sulfittavlut og blekeriavluter.

Tross sin viktige rolle i mineralisering av organisk stoff, representerer "sewage fungus" betydelige problemer. Estetisk er jo ikke en elvebunn dekket av sopp og logrende lammehaler å foretrekke, og ernærings- og reproduksjonsforhold for fisk og hvirvelløse dyr må ventes å bli mer eller mindre ødelagt.

2.4 Begroingsamfunnet i nedre Otra

I 1960 og 61 gjennomførte NIVA en begrenset undersøkelse over forurensningene i OTRAS nedre løp, fra Venneslafjorden til utløpet (Bergmann-Paulsen 1962). Man fant da at det fiberliknende belegget på elvebunnen vesentlig besto av sopparten *Fusarium aquaeductuum* og inneholdt fjærmygglarver (orthocladine chironomider). *F. aquaeductuum* forekommer også i Andelva, Hunnselva og Vestfosselva (Steensland 1970), og på grunn av sin hyppige forekomst i Norge har dens fysiologi blitt gjenstand for nærmere undersøkelser (Laake 1971, Steensland 1973).

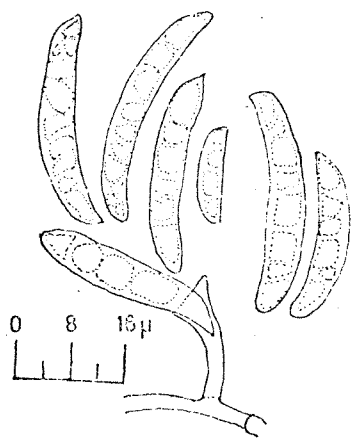
3. BIOLOGI OG VEKSTFYSIOLOGI FOR SOPPSLEKTEN *Fusarium*

3.1 Taksonomi, morfologi og livssyklus

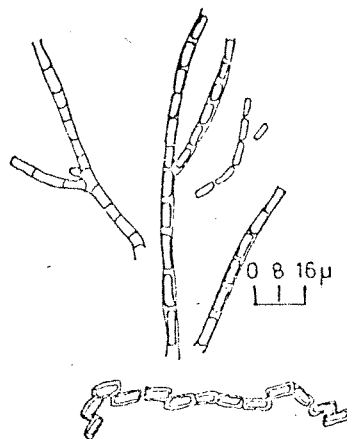
Systematisk henføres *Fusarium* gjerne til underklassen *Deuteromycetes* (synonymt: *Fungi imperfecti*), hvor de slekter innen *Eumycetes* henføres som tilsynelatende mangler seksuell livssyklus. Det vil si at de danner ikke basidie- eller ascussporer, mens de utfra morfologiske kriterier skulle henføres til henholdsvis *Basidiomycetes* eller *Ascomycetes*. Av de omkring 50 arter av *Fusarium* med sine karakteristiske båtformede sporer (conidiesporer, aseksuelle sporer), kan enkelte betraktes som aseksuelle former av *Ascomycetes*-slekten *Nectria*, mens de innen *Deuteromycetene* henføres til ordenen *Moniliales* på grunnlag av frittstående conidier (Barnett 1960). Conidiene er morfologisk variable, men en kan skille mellom noen hovedtyper:

- a) Encellede mikro-conidier av ovoid fasong.
- b) To-trecellede intermediære conidier av avlang, avrundet, dels svakt bøyd fasong.
- c) Flercellede (vanlig 4) makro-conidier av typisk kanofasong med spisse ender.

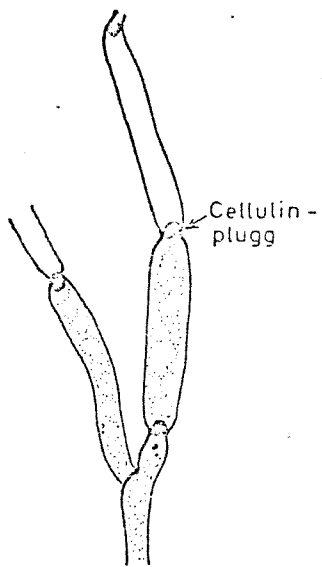
Fig.2 Dominerende mikroorganismer i heterotrof begroing
(Etter Steensland og Eimhjellen 1973)



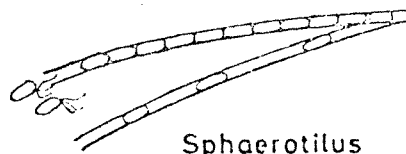
Fusarium



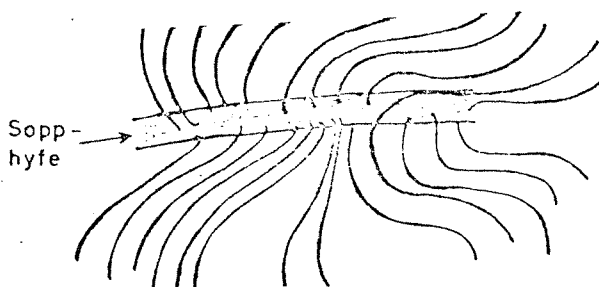
Geotrichum



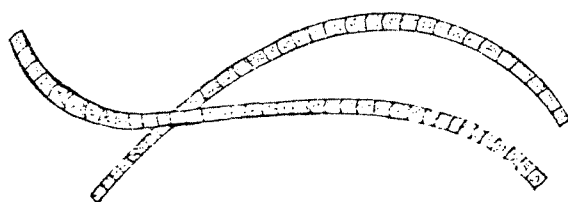
Leptomitus



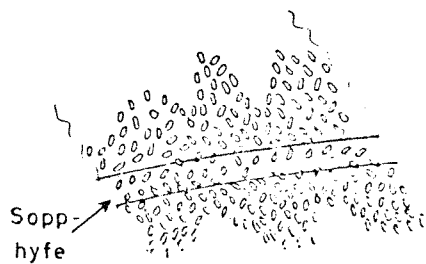
Sphaerotilus



Trådformet bakterie, Flexibacterium?



Beggiatoa



Zooglös vekst

Mycelet er vanligvis utstrakt, 3-6 μm i diameter, noe forgrenet, og ikke-coenocytisk med relativt hyppige septer (se fig. 2). Enkelte arter er vist å kunne danne sfæriske, resistente sporer (chlamydo-sporer) og liknende strukturer er også blitt påvist hos *F. aquaeductuum* (Laake 1971).

3.2 Biologi og økologi

F. aquaeductuum er den eneste art i slekten som er en ren vannsopp, men de øvrige arter er kjent som parasitter på høyere planter og saprofytter på råtnende plantemateriale. Conidiesporene føres lett med vannstrømmen og er et effektivt spredningsstadium.

Innen slekten *Fusarium* har en påvist pektolyttiske enzymer hos *F. roseum*, *F. solani* og forskjellige underarter av *F. oxysporum* (referert av Perley og Page 1971). Disse kan nyttiggjøre seg mucinsyre, polygalacturonsyre og andre pektinstoffer, dels ved ekstracellulær hydrolyse. Pektinstoffer er som kjent viktige intercellulære kittsubstanser i deler av høyere planter. Det foreligger rapporter om at arter som *F. moniliforme* og *F. hulbigenum* samt flere uspesifiserte arter (referert av Klug og Markovetz 1971) kan nyttiggjøre seg alifatisk N-hydrokarboner av varierende kjedelengde - hovedsakelig C_{10-30} , og også aromatiske forbindelser.

Evnen til å nedbryte cellulose, lignin og hemicelluloser fullstendig eller til løselige grupper er vel kjent hos sopp av andre slekter (hvitråtesopp), men en har ikke sett beskrivelser av slik aktivitet hos *Fusarium*.

3.3 Vekstfysiologi og økofysiologi hos *Fusarium aquaeductuum* (Radleh. & Rabh.) Sacc.

F. aquaeductuum (NIVA E-70) ble isolert fra Andelva og dyrket på ulike medier i batchkultur av Steensland (1970). På komplekst medium (TCY = trypton - glycerol - gjærekstrakt) gav den sterk alkalisering under veksten, noe som tyder på at aminosyrer foretrekkes som karbonkilde

fremfor glycerol, og at ammoniakk da avspaltes i større grad enn den opptas. Arten viser full toleranse for start-pH i området 3-9, og vid pH-toleranse er et generelt trekk ved conidiesporedannende sopp.

På syntetiske medier viste arten samme vekstutbytte på N-kildene NH_4NO_3 og KNO_3 med glycerol som C-kilde, sommed glutamat som både N- og C-kilde. Derimot gav både NH_4Cl med glycerol og glutamat med glycerol svakt øket og aminosyrer i blanding sterkt øket vekstutbytte. Tilsetning av vitaminene biotin og thiamin gav liten eller ingen effekt. Utviklingen av pH ved forsøkene viste at N fortrinnsvis opp-
tas som NH_3 i cellene.

Flere forfattere (referert av Curtis 1969) angir at arten *F. aquaeductuum* foretrekker sure vassdrag. Dette støttes av norske undersøkelser hvor en i Otra (pH 5.8, hardhet 1 mg/l CaO) fant dominans av *F. aquaeductuum*, mens en i Drammenselva (pH 7.0, hardhet 8 mg/l CaO) fant dominans av *Sphaerotilus* (Ormerod, Grynne og Ormerod 1966). Steenslands (1970) resultater støttes av eldre data fra Painter (1954), som viste at soppen lot seg dyrke i pH-området 4-9. Forfatteren anser høy oksygenhalt for å være en viktigere økologisk faktor enn lav pH.

Ved den tidligere Otra-undersøkelse (Bergmann-Paulsen 1962) ble det utført enkelte dyrkningsforsøk som viste at *F. aquaeductuum* vokser meget godt på sulfittlutens sukkerbestanddeler, og disse må antas å være soppens viktigste C-kilde i Otra.

3.4 Vekstfysiologiske forsøk i kjemostat

Steensland (1973) har ved dyrking av soppen i kjemostat bestemt dens affinitet til glukose, beregnet som halvmetningskonsentrasjonen (lik den konsentrasjon av glukose i mediet der soppen vokser med halvparten av sin maksimale veksthastighet), $K_G = 0,3$ mg glukose/l. Dette er en ekstremt lav verdi sett i forhold til andre organismer, som f.eks. bakterier i sjøvann med K_G -verdier på 3 mg melkesyre/l og 1 mg glycerol/l (Jannash 1967). Disse er tilpasset de lave naturlige konsentrasjoner av oppløst karbon i havvann. *F. aquaeductuum* har følgelig et

effektivt og aktivt opptak av glukose og antakelig også andre karbohydrater, som setter den istand til å ekstrahere disse fra forbistrømmende vannmasser.

Ved samme undersøkelse ble soppens vekstutbytte (Y) bestemt til 0,4 - 0,5 mg tørrvekt celler pr. mg glukose, optimal veksttemperatur var i området 20 - 28°C, mens veksthastigheten ved 10°C var ca. 20% av den maksimale. Maksimal veksthastighet ved 20°C (μ max) lå i området 0,11 - 0,14 (h^{-1}) noe avhengig av forsøksbetingelsene.

Mellom maksimal spesifikk veksthastighet (μ max) og fordoblingstiden (T_D) gjelder følgende relasjon:

$$T_D = \frac{\ln 2}{\mu \text{ max}} = \frac{0,69}{0,11 - 0,14} \text{ (h)} = \underline{4,9 - 6,3 \text{ (h)}}$$

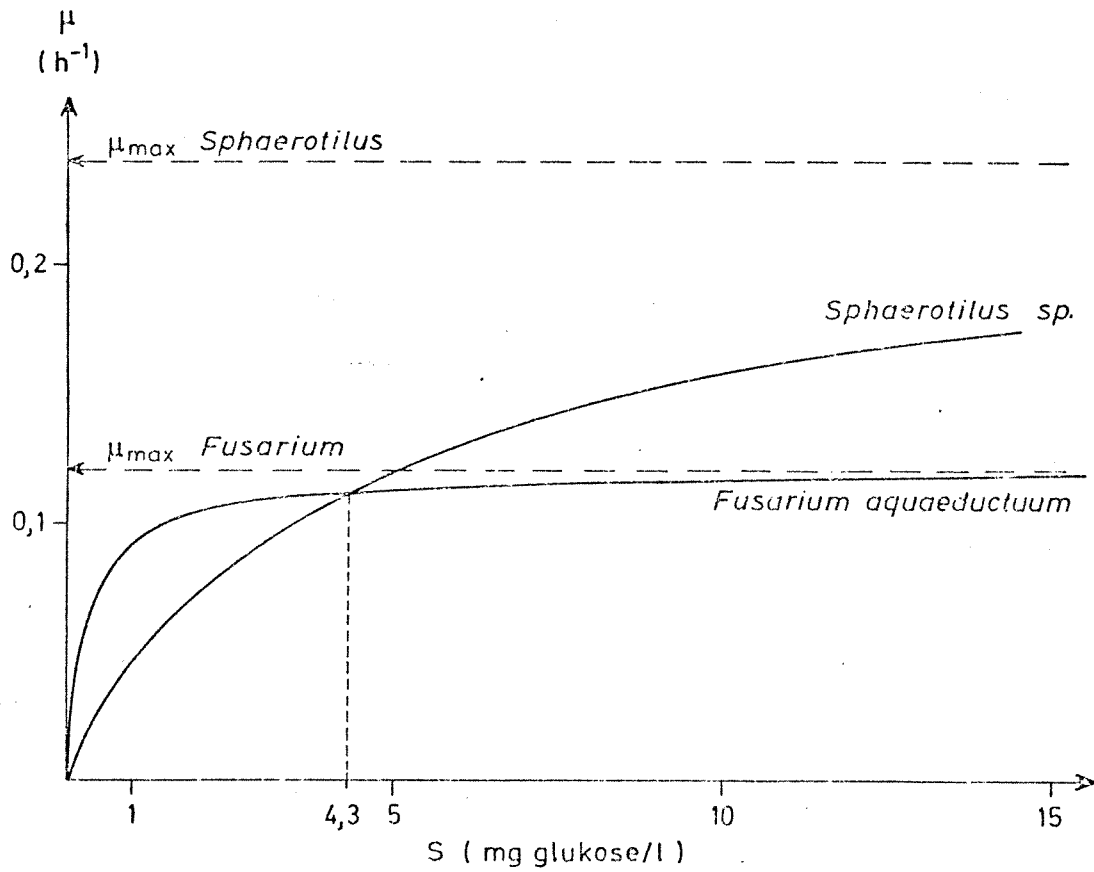
Soppen kan fordoble sin biomasse i løpet av 5-6 timer når glukosekonsentrasjon og temperatur er optimal.

F. aqueductuums høye affinitet til glukose kan tildels forklare dens evne til å dominere begroingsamfunnet i nedre Otra. Dens veksthastighet som funksjon av glukosekonsentrasjonen er vist i fig. 3, og samtidig er det antydnet hvordan den tilsvarende kurven for en bakterie, f.eks. *Sphaerotilus*, kan tenkes å se ut om man antar $K_S = 5 \text{ mg/l}$ og $\mu \text{ max} = 0,24 \text{ h}^{-1}$ (utfra Phaup 1968).

Som man ser, vil soppen vokse hurtigst ved glukosekonsentrasjoner under 4,3 mg/l, og bakterien vil helt eller delvis bli utkonkurrert. I tillegg vil faktorer som toleranse overfor lav pH og evne til å feste seg til underlaget selv i hurtig turbulent strøm virke til soppens fordel. Dens evne til å utkonkurrere andre sopp, kan skyldes de samme eller andre faktorer.

Undersøkelsene i kjemostat pågår fremdeles som et forskningsprosjekt ved NIVA med sikte på å bestemme soppens affinitet og krav til P- og N-kilder, evne til å utnytte ulike bestanddeler av sulfittavlut, krav til

Fig.3 Teoretisk veksthastighet for *Fusarium aquaeductuum* og *Sphaerotilus sp.* som funksjon av glukosekonsentrasjonen



oksygennivå, konkurranseevne overfor andre begroingsorganismer og evne til å nedbryte lignosulfonater og blekeriligniner.

3.5 Sulfittlut som vekstsubstrat

Et karakteristisk trekk ved de refererte funn av *F. aquaeductuum* i norske vassdrag er at arten bare finnes dominant i elver med tilførsel av sulfittavlut. Det forhold at arten dominerer må skyldes at den henter sitt substrat direkte fra oppløste stoffer i vannet uavhengig av andre begroingsorganismer. Bergmann-Paulsen (1962) har beregnet sulfittluten til å utgjøre ca. 85% av totalutslippet fra Hunsfoss fabrikk beregnet som personekvivalenter, og det er da naturlig å ta utgangspunkt i sulfittlutens sammensetning når en skal lete etter naturlige vekstsubstrater. Ved Hunsfos fabrikk benyttes for tiden (1973) både furu-, gran- og løvtrevirke som råstoff med andeler på henholdsvis 60, 25 og 15%. Avluten fra sulfittkok vil ha noe ulik sammensetning avhengig av råstoffet.

Karbohydratene i veden utsettes for en rekke forandringer under sulfittkoket, hvorav den viktigste er syrehydrolyse av glykosidiske bindinger. Hydrolysen leder til depolymerisasjon og oppløsning av den lettest tilgjengelige og lavmolekylære del, hovedsakelig hemicelluloser, samt en viss degradering av gjenværende fibre. Den delen som oppløses i kokluten, undergår videre depolymerisasjon til monomere sukkerer, som tildels nedbrytes under dannelse av aldonsyrer og sukkersulfonater. Enkelte sukkerer dehydrerer under dannelse av heterocycliske forbindelser som furfural.

Delignifisering av tremasse foregår ved sulfonering, hydrolyse av bindinger til hemicelluloser og dannelse av løselige, polymere lignosulfonater av varierende sammensetning og polymerisasjonsgrad, avhengig av det råstoff og den kokeprosess som anvendes. Man regner at ca. 50% av tørrvekten i trestokken følger kokluten, som ved sulfittprosesseren stort sett slippes direkte i vassdragene. Uten forutgående nøytralisering vil surhetsgraden i utslippet ligge omkring pH 2-3.

Tabell 1. Kjemisk sammensetning av tørrsubstansen i sulfittavlut fra et kraftpapirkok etter fjerning av uorganiske bestanddeler.
(Etter Rydholm (1965), side 518.)

| Fraksjons- gruppe | Beskrivelse av komponent | Prosentdel av tørrvekt. |
|----------------------|--|----------------------------|
| I | Lignosulfonsyrer, høymolekylære | 23.7 |
| | " " , lavmolekylære | 28.6 |
| | α - Conidendrin (?) | 0.4 |
| | Hydroxymatairesinolsulfonsyre (?) | 2.2 |
| | Carbohydratsulfonsyrer (?) | 0.6 |
| | " " | 1,9 |
| | Ikke undersøkte stoffer | <u>2.6</u> |
| | | 60.0 |
| II | O- (4-O-methyl- α -D-glucosyluronsyre)- (1 \rightarrow 2)-D-xylose | 2.5 |
| III | Glucuronsyre + små mengder urenheter | 1.0 |
| IV | Fire polysakkarider som gir: | |
| | (1) glucose, mannose, galactose | |
| | (2) glucose, mannose | |
| | (3) mannose, glucose | |
| | (4) xylose | 3.2 |
| V | D-Glucose | 2.6 |
| | D-Xylose | 4.6 |
| | D-Mannose | 11.0 |
| | D-Galactose | 2.6 |
| | L-Arabinose | 0.9 |
| | Ikke undersøkte stoffer (aldonsyrer) | <u>4.4</u> |
| | | 26.1 |
| VI | Hovedkomponent eddiksyre | <u>5.7</u> |
| | Total mengde organisk stoff | 98.5 |

Tabell 2. Konsentrasjon av monomere sukkere i sulfittavlut fra Na-basekok på furuvirke.

| Sukkerart | Konsentrasjon (g/l) | | |
|------------------------|---------------------|-------|------|
| | A | B | C |
| Pentoser: | | | |
| Rhamnose | 0,31 | 0,33 | 0,38 |
| Arabinose | 1,11 | 1,25 | 1,11 |
| Xylose | 5,29 | 7,71 | 7,56 |
| Hexoser: | | | |
| Mannose | 6,78 | 15,98 | - |
| Galactose | 2,50 | 3,19 | - |
| Glucose | 1,42 | 5,10 | - |
| Sukkerinnhold som % av | | | |
| tørrvekt | 12,9 | 24,9 | 7,9 |

A : Maksimal koketemp. 135°C, 58% masseutbytte,
13,7% tørrvekt i avluten.

B : Rayonpulp, maks.koketemp. 145%, 45 % masseutbytte.

C : B etter sulfittspritgjæring.

Som eksempel på sulfittlutens sammensetning gjengis data fra Rydholm (1965) i tabell 1.

I tabell 2 gjengis data fra Larsson og Samuelson (1967) over konsentrasjonen av monomere sukker i avlut fra Na-base-kok med furu etter normal koking (A), sterk koking (B) og sulfittspritgjæring av B (C).

4. METODIKK VED VEKSTFORSØK OG ANALYSER

4.1 Valg av forsøksorganismer

Følgende renkulturer har blitt anvendt:

| | |
|------------------------------|---------------|
| <i>Geotrichum candidum</i> | (NIVAC G2-70) |
| <i>Fusarium aquaeductuum</i> | (NIVAC E-70) |
| Gjærtype isolert fra Otra | (NIVAC 4-70) |

Innledningsvis forsøkte en også andre arter, som *Phialophora* sp. og *Sphaerotilus natans*, men disse viste seg vanskelige å dyrke ved de valgte betingelser. *G. candidum* og *F. aquaeductuum* er vanlige i fastsittende begroing og spesielt aktuelle i nedre Otra, og deres fysiologi er relativt godt beskrevet (Steensland 1970, Steensland 1973).

4.2 Dyrkningsmetode

En valgte for den innledende del av undersøkelsene ikke å benytte kjemostat, som er relativt tid- og arbeidskrevende, selvom miljøfaktorer som pH og konsentrasjoner av næringsfaktorer og av metabolitter da kan holdes konstant (Steensland 1973). I stedet ble forsøkene utført i 250 ml rundkolber med 40 ml kulturvolum, inkubert mørkt på gyngebord ved 20°C i 5 døgn. Ved hvert forsøk ble 36 kolber anvendt med et like stort antall ulike kombinasjoner av konsentrasjoner, medier og organismer. Ved start ble 0,1 ml standard inokulumskultur (1/8 TGY-medium i 2 døgn på rystebord ved 20°C) tilsatt i dyrkningskolber med sterilt medium.

Ved avslutning av forsøket ble kulturen filtrert over Millipore membranfilter (0,6 µm) og absorbans ved 500 nm og pH målt på filtratet før eventuell nedfrysing. Vekstutbyttet ble bestemt som mg tørrvekt på filtrene etter skylling med destillert vann.

4.3 Dyrkningsmedier og forsøksmateriale

Vekstmedium for forsøk 2-9 ble preparert i vann hentet ved Steinsfoss (stasjon 1) 12/12-1973. Vannet er karakterisert ved et lavt fosfatinnhold og et relativt høyt nitrogennivå (tabell 3). Lav pH må skyldes en betydelig påvirkning fra sur nedbør. I forsøk 10 og 11 har en anvendt vann fra stasjonene 5 til og med 16 (fig. 4).

Ved forsøk med sulfitttilsetning har en anvendt 6 ulike avluter. A/S Borregaard (siv.ing H. Evju) utførte ultrafiltrering av sulfittavlut over DDS membran nr. 600, som skiller ved molekylvekt ca. 20.000, slik at man som konsentrat hovedsakelig får høymolekylære lignosulfonater, mens lavmolekylære karbohydrater og syrer finnes i en permeatfraksjon. For forsøk 3-11 er det anvendt avluter fra henholdsvis gran-, furu- og løvvirke fra A/S Hunsfos fabrikk (siv.ing. T. Kittelsen). En del kjemiske analyser ble utført på avlutene (tabell 4).

Ved forsøk med kloakktilsetning er det anvendt mekanisk rensset kloakk og kjemisk rensset kloakk med aluminiumsulfat som fellingsmiddel, hentet ved NIVAs forsøksanlegg på Kjeller 10/1-1974 til forsøk 4 og 19/3-1974 til forsøk 7 (tabell 5).

Sterile stamopløsninger av glukose, nitrogenforbindelser og ortho-fosfat ble laget i 100 ganger ønsket mediekonsentrasjon og tilsatt i volumer på 0,1 - 1,0 ml pr. 40 ml kulturmedium (fosfat etter autoklaveringen). Alle kulturmedier ble justert til pH 5,0 med 1 N HCl eller NaOH før start.

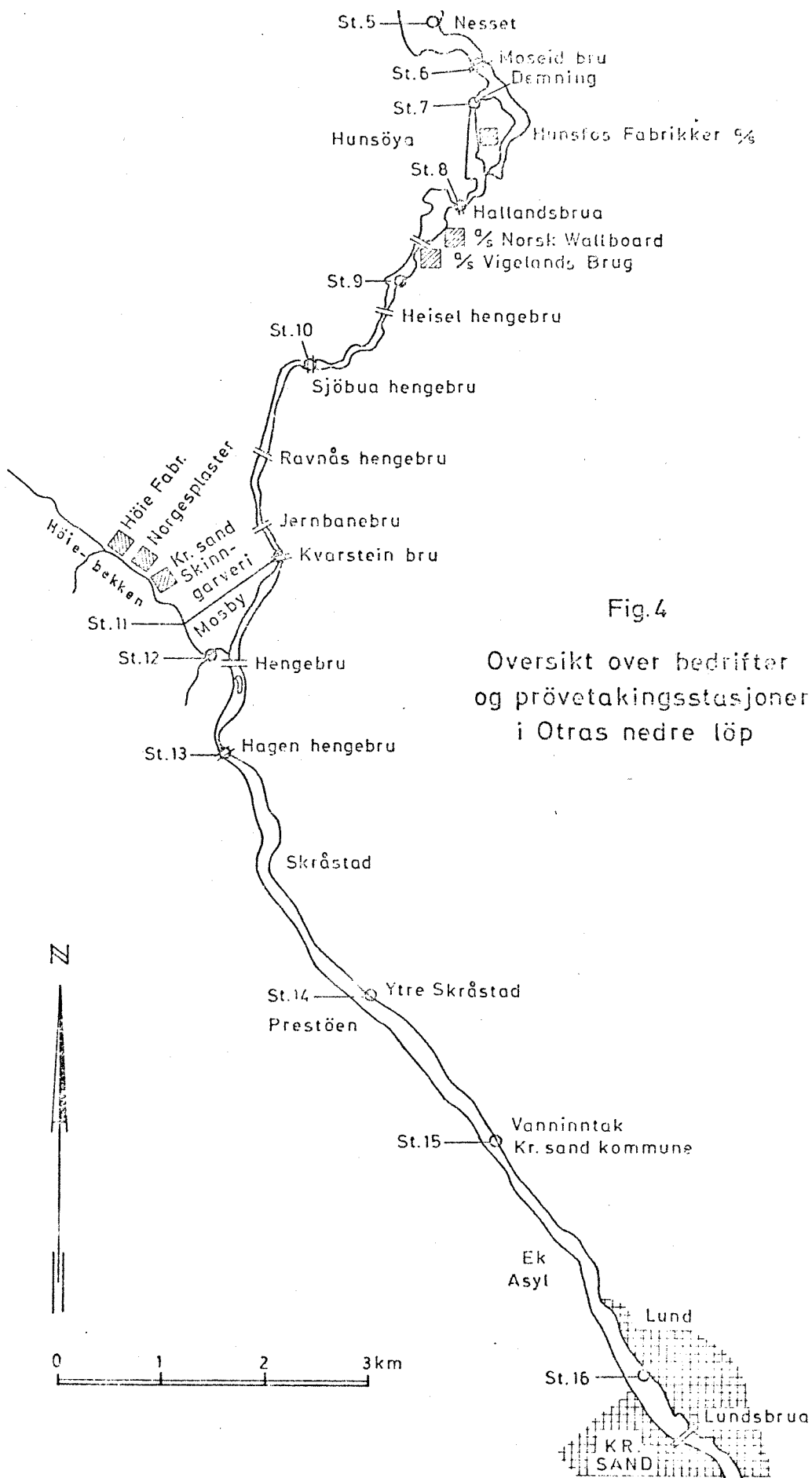


Fig.4

Oversikt over bedrifter og prøvetakingsstasjoner i OTRAS nedre løp

Tabell 3. Kjemiske analysedata for vann fra Otra benyttet til vekstforsøk.

| Stasjon | nr. | dato | pH | Total karbon mg C/l | Løst karbon mg l/l | Total nitrogen µg N/l | NH ₄ ⁺ µg N/l | NO ₃ ⁻ µg N/l | Total fosfat µg P/l | PO ₄ ³⁻ µg P/l | SO ₄ ²⁻ mg SO ₄ /l | mg/l | | | |
|----------------|-----|----------|------|------------------------|-----------------------|--------------------------|--|--|------------------------|---|--|------------------|------------------|--------------------------------|------|
| | | | | | | | | | | | | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | Na ⁺ K ⁺ | |
| Steinsfoss | 1 | 5.10.73 | 5,51 | 3,3' | 0,8 | 195 | 10 | 80 | | <2 | 2,9 | 0,26 | 1,14 | 1,49 | 0,28 |
| " | 1 | 12.12.73 | 5,28 | 2,7 | | 200 | 40 | 110 | 3 | | | | | | |
| " | 1 | 10.1.74 | 6,21 | | | 200 | | | 3 | <2 | | | | | |
| Neset | 5 | 9.5.74 | 5,80 | 1,4 | 1,6 ^x | 200 | 35 | 110 | 9 | 5 | 2,9 | 0,26 | 0,81 | 2,00 | 0,33 |
| Moseid bru | 6 | " | 6,25 | 3,0 | 1,5 | 390 | 200 | 120 | 89 | 67 | 5,9 | 0,32 | 1,19 | 1,71 | 0,45 |
| Hunfoss | 7 | " | 5,60 | 1,8 | 1,3 | 175 | 20 | 100 | 11 | 5 | 2,5 | 0,26 | 0,78 | 1,17 | 0,34 |
| Hallandbrua | 8 | " | 4,92 | 8,0 | 7,5 | 160 | 5 | 50 | 6 | <2 | 4,5 | 1,02 | 0,88 | 1,69 | 0,18 |
| Vigelands Brug | 9 | " | 5,08 | 8,5 | 7,0 | 160 | <5 | 50 | 6 | <2 | 4,4 | 0,92 | 0,85 | 1,45 | 0,17 |
| Sjøbua | 10 | " | 5,10 | 8,5 | 8,0 | 155 | <5 | 30 | 5 | <2 | 4,2 | 0,92 | 0,86 | 1,50 | 0,27 |
| Kvarstein | 11 | " | 5,36 | 8,5 | 7,5 | 160 | 10 | 70 | 8 | <2 | 4,1 | 0,82 | 0,85 | 1,52 | 0,26 |
| Høiebekken | 12 | " | 11,0 | 23,0 | 13,5 | 5200 | 800 | 260 | 280 | 190 | 9,2 | 0,94 | 2,20 | 43,7 | 2,14 |
| Hagen | 13 | " | 5,60 | 14,0 | 9,0 | 165 | <5 | 80 | 10 | <2 | 4,9 | 0,88 | 0,97 | 1,75 | 0,29 |
| Ytre Skråstad | 14 | " | 5,20 | 8,5 | 7,5 | 150 | <5 | 60 | 7 | <2 | 4,2 | 0,83 | 0,88 | 1,56 | 0,25 |
| Vanninntaket | 15 | " | 5,20 | 8,0 | 8,0 | 130 | <5 | 40 | 7 | <2 | 4,1 | 0,86 | 0,94 | 1,48 | 0,24 |
| Kristiansand | 16 | " | 5,28 | 8,5 | 8,0 | 150 | <5 | 70 | 6 | <2 | 8,5 | 0,94 | 1,04 | 1,71 | 0,25 |

x Verdi høyere enn total karbon.

Tabell 4. Kjemiske analysedata for sulfittavluter benyttet til vekstforsøk.

| Sulfittavlut | pH | Organisk tørrvekt g/l | Total karbon mg C/l | Total nitrogen mg N/l | Lignolsul- fonsyrer g/l | Total fosfat mg P/l | SO ₄ ²⁻ mg SO ₄ /l | mg/l | | | |
|----------------|------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|--|------------------|------------------|--------------------------------|------|
| | | | | | | | | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ | Na ⁺ K ⁺ | |
| Borregaard | | | | | | | | | | | |
| Konsentrat | 4,70 | 240 | 5500 | 12,0 | 90,0 | 1,0 | 100 | 3,8 | 322 | 105 | 6,4 |
| Permeat | 4,88 | 70 | 5000 | 2,0 | 34,8 | 1,5 | 58 | 4,6 | 352 | 376 | 16,9 |
| Avlut gran | 2,55 | 140 | 5000 | 8,0 | 42,8 | 1,0 | - | 4,3 | 331 | 1,9 | 7,4 |
| Hunsfoss | | | | | | | | | | | |
| Gran | 4,31 | 182 | 7000 | 10,0 | 90,0 | 0,9 | - | 760 | 45 | 15,3 | 13,7 |
| Løv | 4,08 | 179 | 7000 | 8,0 | 60,0 | 1,5 | - | 780 | 40 | 5,7 | 20,2 |
| Furu + 10% løv | 3,79 | 200 | 8500 | 12,0 | 87,0 | 1,3 | - | 700 | 43 | 6,0 | 13,6 |

Tabell 5. Kjemiske analysedata for mekanisk og kjemisk renset kloakk anvendt ved vekstforsøk.

| | Dato | Total nitrogen mg N/l | NH ₄ ⁺ mg N/l | NO ₃ ⁻ mg N/l | Total fosfat mg P/l | PO ₄ ³⁻ mg P/l | Total organisk karbon mg C/l | pH |
|---------------------|---------|--------------------------|--|--|------------------------|---|---------------------------------|------|
| Mekanisk | | 33,6 | 31,5 | 0,200 | 0,25 | 0,004 | 26,3 | 6,80 |
| Kjemisk (Al-sulfat) | 10.1.74 | 39,6 | - | 0,090 | 6,6 | 3,8 | 71,3 | 7,25 |

Data for 19/3 mangler foreløpig.

Tabell 6. Sammensetning av agarmedier anvendt ved isolering av lignosulfonsyretolerante gjær og sopp.

| Kode | Karbonkilder: | % org. tørr vekt: | Tilsatt volum pr. 1000 ml |
|---------------|---|-------------------|---------------------------|
| 1/8 BL | Sulfittlut, Ca-base gran (Borregaard) | 0,125 | 8,8 ml |
| 1/1 BL | " | 1,00 | 70 ml |
| 1/8 BK | Lignosulfonsyre-konsentrat (Borregaard) | 0,125 | 5,0 ml |
| 1/1 BK | " | 1,00 | 40 ml |
| Tilsetninger: | 0,5 N NH ₄ Cl | | 5,0 ml |
| | 0,1 N P-buffer (pH 5,0) | | 5,0 ml |
| | Agar til 1,5 % | | |

Tabell 7. Oversikt over utførte forsøk med sulfittlut som karbon- og energikilde.

| Forsøk nr. | Resipient- vanntype | Sulfittlut type | Sulfittlut | | Vitamin + mineral- løsning | Anrikninger (mM N, P eller C) | | | Kloakk- tilsatt (vol %) | Organismer | | | Resultater Cjengitt i Tabell Figur |
|------------|--------------------------------|---|----------------------------------|-------|----------------------------------|----------------------------------|------------|----|-------------------------------|------------|-------|------|--|
| | | | vekst- ofønsisk tjørnstoff | vekt% | | N | P | C | | E-70 | HIVAC | 4-74 | |
| 1 | Destillert H ₂ O | Ca-base: gran + fraksjonert | 1,0 | x | | 10 | 1 | - | - | x | x | | 5 8 |
| 2 | | Ca-base: gran Mg-base: gran, furu + 10% løv og løv | 1,0 | x | | 10 | 1 | 60 | - | x | x | | 6 10 |
| 3 | Steinsfoss | Mg-base: gran, | 0,5 | | | | | | | | | | 7 |
| 5 | 12.des. | furu + 10% løv | 1,0 | x | | 10 | 1 | - | - | x | x | | 8 |
| 6 | 1973 | og løv | 5,0 | | | | | | | | | | 9 |
| 4 | | Mg-base: | 0,05 | | | | | | 0,05, 0,1 | | | | 12 |
| 7 | | furu + 10% løv | 0,10 | (x) | | (1) | - | - | 0,5, 1,0 | | x | | 13 |
| | | | 0,5 | | | | | | 2,5, 5,0 | | | | |
| 8 | | Mg-base: | 0,5 | | | 1,25 - 12,5 | 0,25-2,5 | - | - | | x | | Ikke sjengitt |
| | | furu + 10% løv | 1,0 | | | | | | | | | | 10 |
| 9 | | | 5,0 | | | 0,125-1,25 | 0,025-0,25 | - | - | | x | | 11 |
| 10 | Stasjon | | | | | | | | | | | | 14 |
| 11 | 5 - 16 i nedre Otra | - | - | | | 5 | 1 | 60 | - | | x | | 15 |

() Bare i kontrollkulturer.

4.4 Isoleringsmetoder

Resten av vekstmediene anvendt ved forsøk 1 ble uten autoklaving satt til side i kjøleskap i 45 døgn, og alle viste ved mikroskopering tydelige tegn på vekst av bakterier, gjær og sopp. Anrikningskulturene ble anvendt for utstrykning på agarplater med sulfittlut og lignosulfonsyrekoncentrat fra Borregaard som C-kilde (tabell 6). Platene ble inkubert i kjøleskap, og etter ca. 14 dager ble enkeltkolonier overført til nye plater. Etter tredje overføring var alle sopp og gjærtyper bakteriefrie.

4.5 Biomassebestemmelse ved ATP-analyse

Vekstutbyttet i kulturen ble vanligvis bestemt ved tørking og veiing av frafiltrert mycel, men når tørrstoffmengden underskrider 10 mg/l, blir metoden ubrukbar for såvidt små kulturvolumer som 40 ml. Sett i forhold til naturlige biomassekonsentrasjoner i vann er 10 mg/l fremdeles svært høyt. I de senere år har ekstraksjon og analyse av adenosintrifosfat (ATP) blitt mye anvendt som et mål på levende mikrobiell biomasse i jord, sjøvann og sedimenter, og analysemetode og apparatur er nå vel innarbeidet ved NIVA (Laake 1974). ATP finnes i relativt konstant nivå i alle levende organismer, men nedbrytes raskt når cellene dør. Analysemetoden er svært følsom med en deteksjonsgrense på ca. $5 \cdot 10^{-12}$ molar. Vekstutbyttet er i forsøk 10 og 11 angitt som $\mu\text{g ATP/l}$, som i denne sammenheng kan anses å være proporsjonalt med enheten mg tørrvekt/l.

4.6 Tynnsjikt-kromatografi av vekstmedier

De ulike lutmedier og enkelte kulturfiltrater er analysert semi-kvantitativt for pentosene xylose, arabinose og rhamnose og hexosene glukose, galactose og mannose ved tynnsjikt-kromatografi. 5-20 μl ble applicert på SiO_2 -gel (0,25 mm) på 20 x 20 cm plater aktivert ved 110°C i 30 min. Flere løpemidler, impregneringsmidler og sprayreagenser ble forsøkt, og god separasjon med relativt intense flekker ble oppnådd med methylethylketon (60 deler): iseddik (20 deler): methanol (20 deler)

som løpemiddel på plate impregnert med 0,1 N Borsyre før aktivering (Scherz, Stehlik, Bancher og Kaendl 1968). Etter tørking ble platene fremkalt med anilin-diphenylaminfosforsyre - sprayreagens, og flekkenes posisjon ble så bestemt relativt til væskefronten (R_f), hvor

$$R_f = \frac{\text{Avstand fra startpunkt til flekkens sentrum}}{\text{avstand fra startpunkt til væskefronten}}$$

Separasjonen av glucose og mannose var dårlig. Sukkersammensetningen ble bestemt ved sammenlikning med en standardløsning (1 g/l av alle 6 sukkerarter), og mengden bedømt ut fra intensiteten av fargeflekkene.

4.7 Dyrkningsbetingelser ved utførte forsøk

I alt 11 dyrkningsforsøk har blitt utført periodevis i tiden 1/12-1973 til 21/8-1974, og forsøksprogrammet med den anvendte metodikk anses som avsluttet. En oversikt over dyrkningsmedier, organismer og tilsetninger er gitt i tabell 7.

5. RESULTATER OG BEREGNINGER

5.1 Preferanse for ulike N-kilder hos *F. aquaeductuum* og *G. candidum*

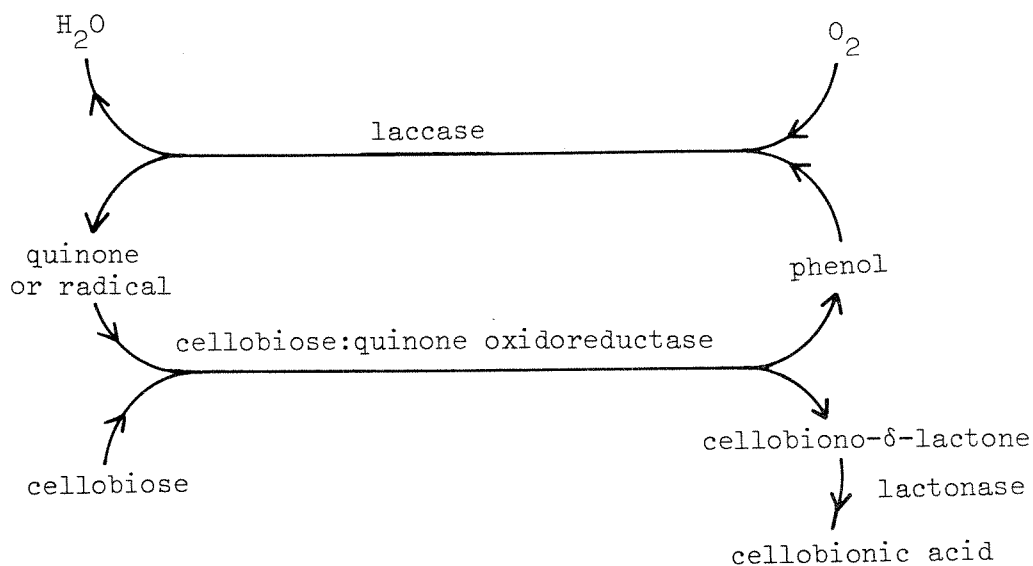
Som vist i fig. 5, har *G. candidum* ingen eller bare liten evne til å utnytte oksydert N i form av KNO_3 , men i kombinasjon med redusert N som NH_4NO_3 , utnytttes både oksydert og redusert N like godt uavhengig av karbonkildens natur. *F. aquaeductuum* utnytter begge former like godt på både høy- og lavmolekylær fraksjon, mens kombinasjonen NH_4NO_3 utnytttes litt dårligere. På sulfittlut derimot er det en klar preferanse for NH_4Cl . Resultatene bekrefter observasjoner av Cooke (1957) om at *G. candidum* ikke kan utnytte nitrat. Ved alle påfølgende forsøk ble NH_4Cl benyttet som N-kilde.

5.2 Preferanse for ulike fraksjoner av sulfittlut som energi- og karbonkilde hos *F. aquaeductuum* og *G. candidum*

I forsøket med fraksjonert sulfittlut (Ca-base, gran) fra Borregaard (fig. 5) viser begge arter meget god vekst på den lavmolekylære fraksjon med en utnyttelsesgrad på hele 23,4% for *G. candidum* ved tilskudd av både N og P, og tilsvarende dårlig vekst på den høymolekylære frak-

sjon. *G. candidum* synes å kunne utnytte langt flere komponenter i den lavmolekylære fraksjon enn *F. aquaeductuum*. Ved tilskudd av N og P gir imidlertid *F. aquaeductuum* langt høyere vekstutbytte på sulfittluten enn på den lavmolekylære fraksjon alene, mens forholdet er motsatt for *G. candidum*. Dette er svært interessant og viser at *F. aquaeductuum* har energimessig utbytte av komponenter i ligninfraksjonen. De lavmolekylære komponentene utnyttes følgelig mer effektivt i kombinasjon med komponenter i den høymolekylære fraksjonen. Vekstutbyttet på sulfittlut med ulike N-kilder viser at N^{-III} er nødvendig.

Westermarck og Eriksson (1974) har nylig påvist at hvitråtesoppen *Chrysosporium lignorum* under nedbrytning av cellulose utnytter fenolgrupper i lignin som H-akseptor i en ekstra-cellulær respirasjonsprosess etter følgende skjema:



En tilsvarende mekanisme kan lede til at *F. aquaeductuum* utnytter disakkarider i den lavmolekylære fraksjon gjennom utskillelse av ekstracellulære enzymer når frie fenolgrupper er tilstede. Dannelsen av frie radikaler kan lede til spontan polymerisasjon av aromatiske ringer til lengre kjeder, noe som kan observeres som en blåbrun farging av vekstmediet (Sundmann og Selin 1970). Ved alle vekstforsøk har

graden av farging blitt målt som absorbans ved 500 nm, og særlig kraftig økning har blitt observert ved vekst av både *F. aquaeductuum* og *G. candidum* på medier med sulfittlut fra løvtrevirke (tabell 8). Absorbansen er pH-avhengig, men titrering av enkelte kulturfiltrater har vist at dette ikke rokker ved tendensen til øket absorbans.

5.3 Utnyttbarhet av lignosulfonsyrer og sukkerarter

Innholdet av lignosulfonsyrer i kulturfiltratene ble forsøkt analysert i forsøk 1, men metoden (Lindberg 1963) viste seg lite anvendbar på grunn av dårlig reproducerbarhet og ikkelinear sammenheng mellom analyseverdier og fortynningsgrad. På ett og samme medium antyder imidlertid resultatene 10-15% reduksjon etter 5 døgn ved tilsetning av både P og N. Ved senere forsøk i felt vil en forsøke en fluorescence-spektrometrisk metode for bestemmelse av humus og lignosulfonsyrer i blanding (Almgren og Josefsson 1973) med følsomhet ned i 0,2 mg/l. Konsentrat som eneste karbonkilde gav noe vekst (fig. 5), mest for *F. aquaeductuum*, som for en stor del trolig skyldes restmengder av lavmolekylære forbindelser.

Bedømmelse av sukkerinnholdet i ulike avluter ved tynnsjikt-kromatografi viser at Ca-base-avluten fra Borregaard hadde et høyt innhold av pentosene arabinose og xylose, mens dette var betraktelig lavere i Mg-base-avlut fra Hunsfoss (tabell 9). Forskjellen må skyldes at kokeprosessen med Ca-base har ledet til større grad av hydrolyse av de polymere karbohydrater i veden. Det kan videre spores restmengder av monomere sukkerer i konsentratet. I permeatet fantes dessuten to tydelige flekker med R_f 0,76 og 0,90, trolig tetroses eller trioser.

Mg-base-lut fra Hunsfoss viser et jevnt over lavere sukkerinnhold, særlig med granvirke. Pentoseinnholdet var som ventet markert høyere i avlut fra løvvirke. Svake flekker med R_f 0,8-0,9 ble også funnet med disse avlutene, og dessuten svake flekker i området R_f 0,1-0,3 (di- og trisakkarider). Sukkerinnholdet må som før nevnt (3.5) ventes å variere mye med betingelsene under kokeprosessen.

Tabell 8. Absorbans ved 500 nm i kulturfiltratet etter dyrkning av *F. aquaeductuum*, *G. candidum* og NIVAC 4-74 på ulike sulfittlutmedier (1 w/v %).

| <u>Tilsetninger</u> Karbon- og energikilde | - | PO_4^{3-} | NO_3^- | NH_4^+ | NH_4NO_3 | $NH_4^+ + PO_4^{3-}$ |
|---|-------|-------------|----------|----------|------------|----------------------|
| <u><i>Fusarium aquaeductuum</i></u> | | | | | | |
| Ca-base, gran | 0,193 | 0,190 | 0,320 | 0,241 | 0,207 | 0,218 |
| - konsentrat | 0,315 | 0,317 | 0,321 | 0,311 | 0,342 | 0,327 |
| - permeat | 0,031 | 0,030 | 0,034 | 0,053 | 0,058 | 0,056 |
| Mg-base, gran | 0,060 | 0,055 | - | 0,070 | - | 0,055 |
| - furu + 10% løv | 0,144 | 0,137 | - | 0,162 | - | 0,205 |
| - løv | 0,238 | 0,238 | - | 0,358 | - | 0,438 |
| <u><i>Geotrichum candidum</i></u> | | | | | | |
| Ca-base, gran | 0,187 | 0,190 | 0,189 | 0,208 | 0,240 | 0,200 |
| - konsentrat | 0,317 | 0,310 | 0,316 | 0,325 | 0,311 | 0,310 |
| - permeat | 0,029 | 0,030 | 0,040 | 0,191 | 0,197 | 0,074 |
| Mg-base, gran | 0,061 | 0,061 | - | 0,072 | - | 0,069 |
| - furu + 10% løv | 0,150 | 0,152 | - | 0,169 | - | 0,155 |
| - løv | 0,192 | 0,190 | - | 0,530 | - | 0,480 |
| <u>Gjær (NIVAC 4-74)</u> | | | | | | |
| Mg-base, gran | 0,067 | 0,062 | - | 0,116 | - | 0,091 |
| - furu + 10% løv | 0,169 | 0,158 | - | 0,220 | - | 0,177 |
| - løv | 0,092 | 0,090 | - | 0,281 | - | 0,194 |

Tabell 9. Semi-kvantitativ analyse av hexososer og pentososer i ulike avluter bedømt ut fra tynnskikt-kromatografi.

| | PENTOSER | | | HEXOSER | | |
|--------------------------|-------------|---------|----------|-------------------|-------------------|--------------|
| | Arabinose | Xylose | Rhamnose | Glukose | Mannose | Galaktose |
| Flekkens farge | Brunfiolett | Fiolett | Røddlig | Svakt brunfiolett | Svakt brunfiolett | Svakt fiolet |
| Posisjon: R _f | 0,465 | 0,54 | 0,645 | 0,41 | 0,41 | 0,37 |
| Ca-base, gran | 5 | 10 | 0,3 | 10 | | 10 |
| - konsentrat | (-) | + | (-) | + | | + |
| - permeat | 5 | 10 | 0,7 | 20 | | 10 |
| Mg-base, gran | 0,1 | - | + | + | | (+) |
| " furu | | | | | | |
| + 10% løv | 0,5 | (+) | (+) | 5 | | 5 |
| " løv | 1,0 | 0,5 | 0,2 | 5 | | 5 |

+ tilstede
 - ikke tilstede
 () usikker

Metoden som her er innarbeidet, gir raskt og uten alt for stor arbeidsinnsats et inntrykk av hvilke sukkerarter som omsettes av begroingsorganismene. Hittil har bare noen få kulturfiltrater blitt analysert, og det kan derfor ikke sies noe mer om organismenes preferanse for ulike sukkerer annet enn at det er markerte forskjeller.

5.4 Vekstutbyttet for *G. candidum* ved tilsats av glukose i sulfittlutmediet

Ved tilsetning av en lett nedbrytbar karbon- og energikilde til ulike sulfittlutmedier viser økningen i vekstutbyttet klar avhengighet av hvilken av luttypene mediet består av (fig. 6, tabell 10). Dersom avlutkomponentene gav samme energiutbytte som glukose, skulle en vente 18% økning i Y_s med N og P i overskudd, lavere verdier skulle indikere at inhiberende faktorer i mediet fører til lav utnyttelsesgrad for glukose (Y_{glu}), mens høyere ΔY_s viser at avlutkomponentene er lite nedbrytbare eller mindre effektive energikilder.

Resultatene indikerer at faktorer i mediet med Borregaard-lut inhiberer glukoseomsetningen i større grad enn med avluter fra Hunsfoss. Hva normal Y_{glu} skal være er vanskelig å si; verdien angitt for *F. aqueductuum* i kjemostat er ikke overførbar, og selv maksimalverdien (4,9 %) synes lav sammenliknet med en maksimal $Y_s = 23,4\%$ funnet ved forsøk 1.

En ser imidlertid tydelig at Mg-base-lut fra gran har et meget lavt innhold av utnyttbare forbindelser bedømt ut fra vekstutbytte uten glukose med P og N i overskudd, Mg-base-lut fra furu + 10% løv og fra løv ligger ca. 35 ganger høyere. Resultatene er i god overensstemmelse med karbohydratnivået i de ulike avluter.

5.5 Vekstutbyttet for *F. aqueductuum*, *G. candidum* og NIVAC 4-74 som funksjon av type og konsentrasjon av Mg-base-avluter

Som vist i fig. 7, så utnyttet avlut fra granvirke ikke av *F. aqueductuum*, trolig på grunn av en kombinasjon av toksisk påvirkning og manglende evne til å omsette de lavmolekylære forbindelsene. Arten

synes generelt å være den mest følsomme for høye konsentrasjoner. Også *G. candidum* og NIVAC 4-74 blir fullstendig inhibert ved 5% konsentrasjon i mediet. Alle avluter viser en tydelig, men svak inhibitorisk effekt ved 1 w/v% konsentrasjon i forhold til 0,5 w/v%, og markant inhibisjon ved 5 w/v% (fig. 6, 7 og 8). Gifteffekten kan delvis skyldes akkumulering av toksiske nedbrytningsprodukter i mediet.

5.6 Begrensende næringsfaktorer for heterotrof vekst i vann fra Steinsfoss

Vannets totale nitrogeninnhold var ifølge kjemisk analyse 200 µg N/l, tilsvarende ca. 14 mM N, og av dette er 3 mM NH_4^+ og 8 mM NO_3^- . Totalfosfatnivået var 3 µg P/l tilsvarende 0,1 mM. Etter tilsetning av NH_4Cl (fig. 6, 7 og 8) har således nivået av utnyttbart nitrogen blitt fordoblet til ca. 20 mM N, mens fosfatnivået tidobles ved tilsetning av fosfatbuffer. Likevel er tydeligvis nitrogen den primært vekstbegrensende faktor. Dette kan forklares ut fra analyseresultatene for sulfittavlutene (tabell 4), som viser at disse inneholder fra 0,9 til 1,5 mg P/l. Etter fortykning til 1,0 w/v% medier vil dette gi 4,1 mM i avlut fra gran, 8,1 mM i avlut fra furu + 10% løv, og 6,7 mM i avlut fra løvtrevirke. Innholdet av utnyttbart nitrogen i avlutene kan trolig neglisjeres. N:P-forholdet uten tilsetning har altså vært henholdsvis 2,8:1, 1,4:1 og 1,6:1, når bare NH_4^+ og NO_3^- regnes med.

Kravet til nitrogen og fosfor hos *G. candidum* ble bestemt i forsøk hvor P ble holdt konstant mens N varierte og omvendt (fig. 10 og 11). Metodikken er ikke særlig tilfredsstillende, fordi organismenes livsmiljø er under stadig forandring under forsøket, og resirkulasjon av N og P innen systemet ikke har blitt bestemt. Dessuten er substratkonsentrasjonene unormalt store. Ut fra forsøket kan kravet til N:P-forholdet anslagsvis beregnes til 14:1.

G. candidum har en cellevegg vesentlig bestående av polysakkarider og litt chitin og inneholder 2,3% nitrogen, mens andre sopp (f.eks.

Tabell 10. Økning i totalt vekstutbytte (ΔY_s) og beregnet vekstutbytte med hensyn på glukose (Y_{glu}) ved tilsetning av glukose (60 mM) i vekstmedier med ulike typer sulfittlut (1,0 w/v %).

| | | Sulfittlut tilsatt | Anrikning: (1 mM P, 10 mM N) | | | |
|--------------------|--|-----------------------|------------------------------|------|------|-------|
| | | | - | P | N | P + N |
| ΔY_s (%) | | Ca-base, | 3,2 | 6,1 | 4,4 | 4,5 |
| Y_{glu} (vekt %) | | gran | 0,14 | 0,28 | 0,56 | 1,25 |
| ΔY_s (%) | | Mg-base, | 100 | 200 | 1200 | 750 |
| Y_{glu} (vekt %) | | gran | 0,14 | 0,28 | 1,67 | 4,16 |
| ΔY_s (%) | | Mg-base, furu + | 11,1 | 0 | 32,8 | 14,5 |
| Y_{glu} (vekt %) | | 10% løv | 0,14 | 0 | 2,78 | 2,78 |
| ΔY_s (%) | | Mg-base, | -18 | 0 | 27,8 | 25,4 |
| Y_{glu} (vekt %) | | løv | 0 | 0 | 3,47 | 4,86 |

Fig.6 Vekstutbytte av *Geotrichum candidum* i vann fra Steinsfoss tilsatt ulike sulfittavluter (1,0 w/v %) anriket med fosfor (1 mM P), nitrogen (10 mM N) og glukose (0,18 w/v %)

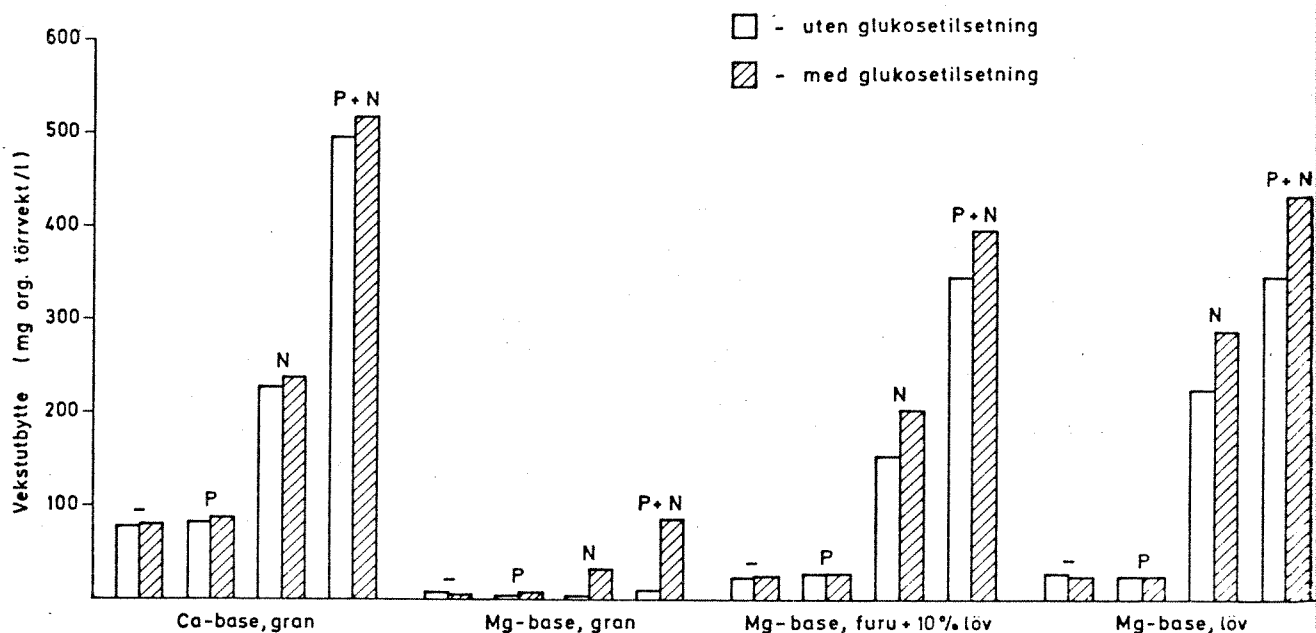
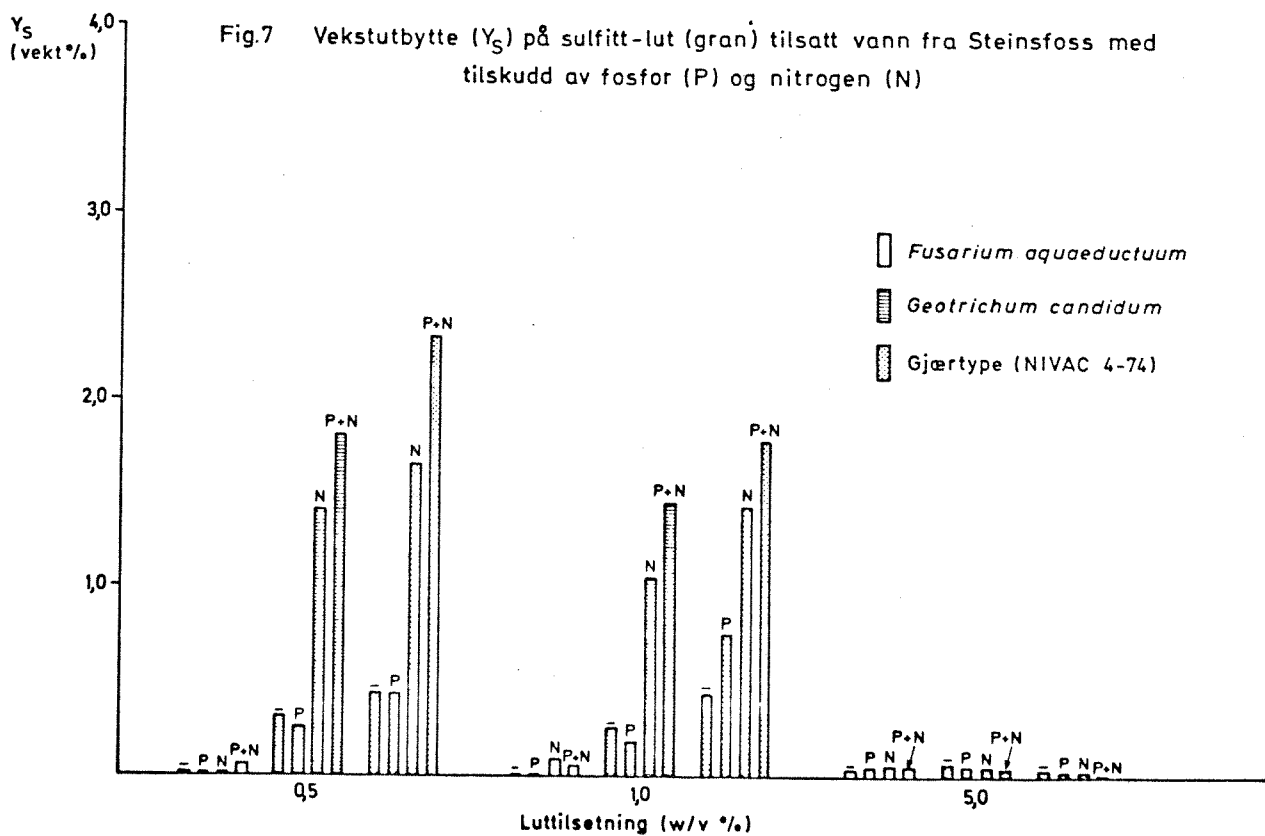


Fig.7 Vekstutbytte (Y_S) på sulfitt-lut (gran) tilsatt vann fra Steinsfoss med tilskudd av fosfor (P) og nitrogen (N)



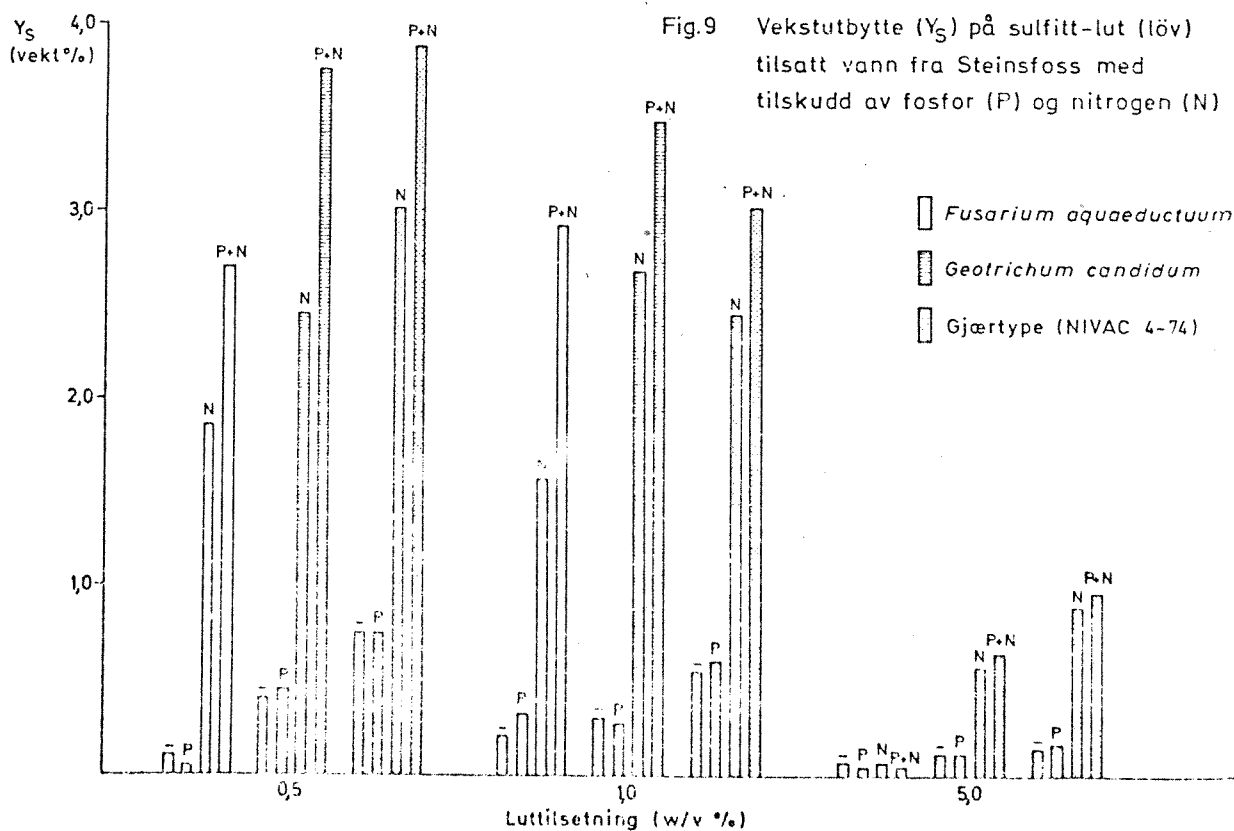
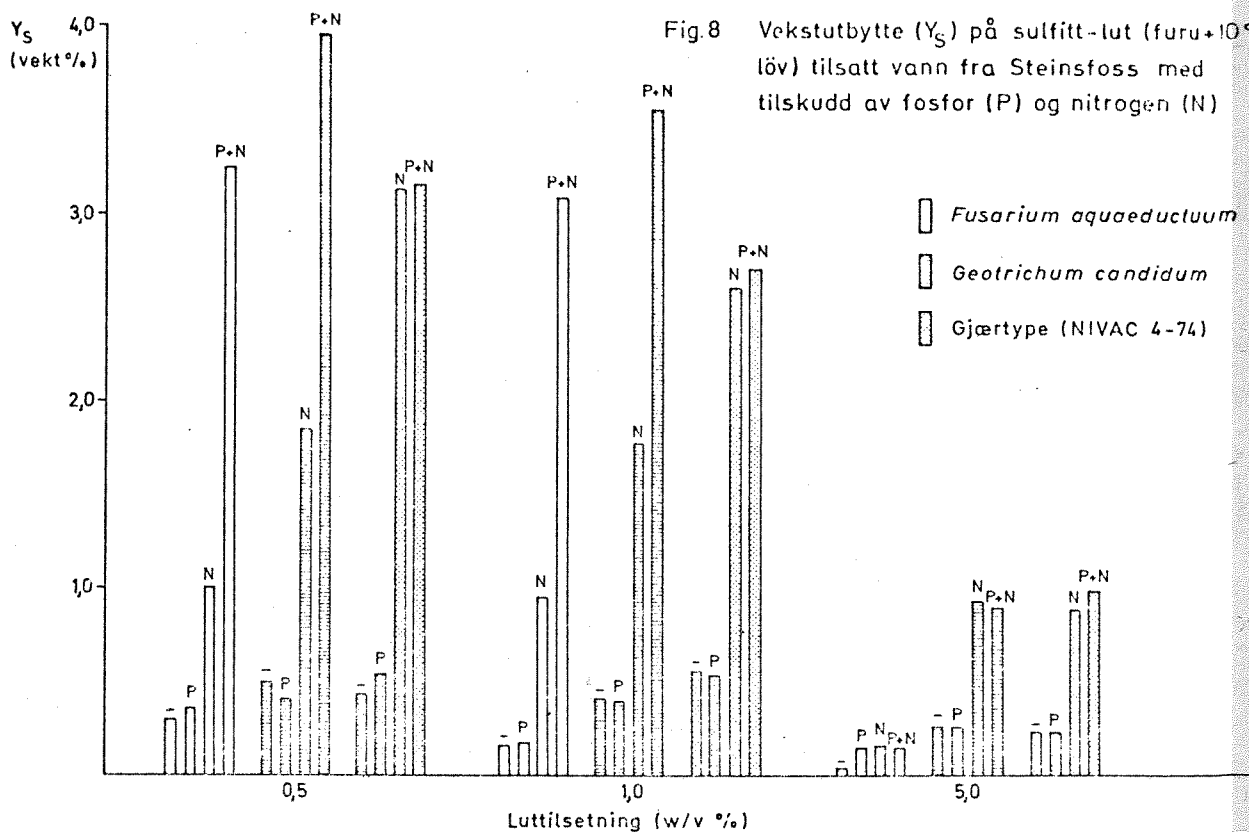


Fig.10 Vekst av *Geotrichum candidum* på sulfittlut (furu + 10% löv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) som funksjon av N-tilsetningen (forsök 9)

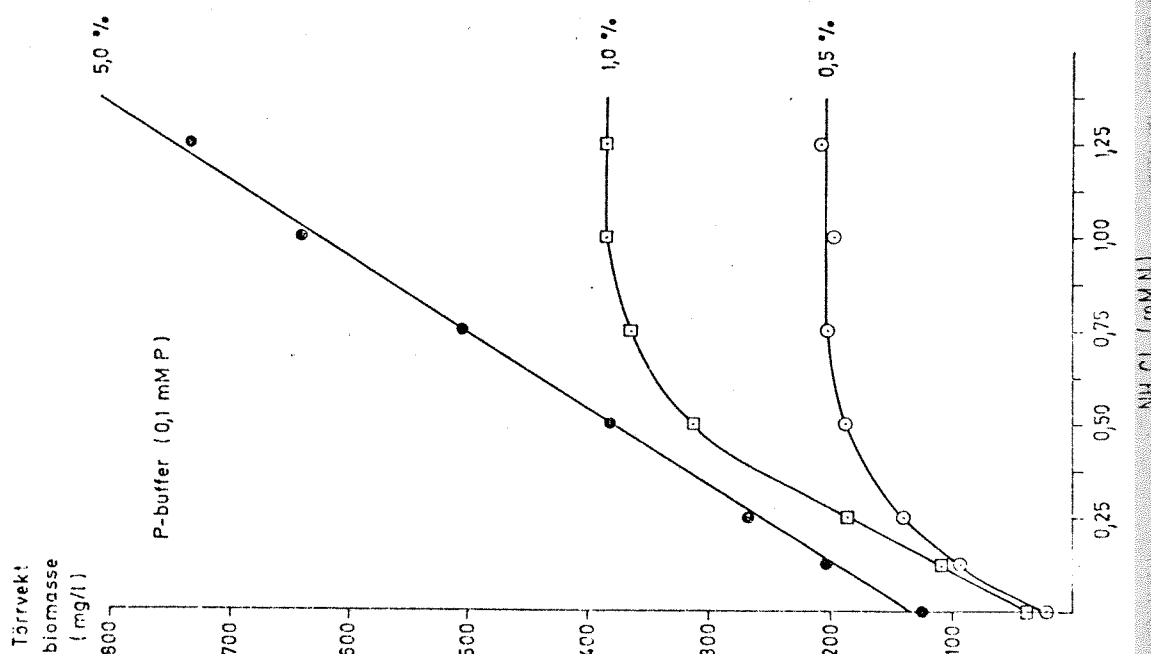
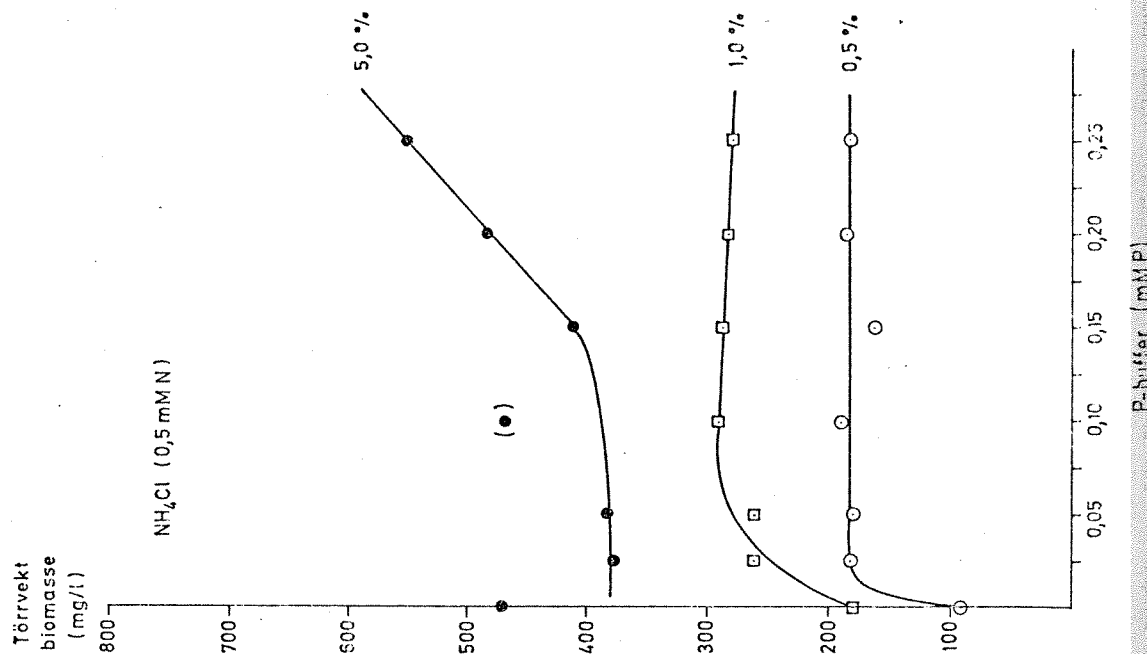


Fig.11 Vekst av *Geotrichum candidum* på sulfittlut (furu + 10% löv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) som funksjon av P-tilsetningen (forsök 9)



F. aquaeductuum) har tykke cellevegger bygget opp vesentlig av chitin og ventelig et høyere nitrogeninnhold. Overslagsberegninger gir et N:P-forhold på 50-25:1 i et balansert vekstmedium. Forsøkene viser at de ulike artene har noe ulik respons på tilsetninger av P og N, og mer eksakte verdier for kravet til fosfor og nitrogen som næringsfaktorer må fastlegges ved kjemostatforsøk.

Som vist i figurene 7, 8 og 9 er nitrogen primært vekstbegrensende i alle medier ved de anvendte avlutskonsentrasjoner. Tilsetning av fosfor i tillegg gir imidlertid et relativt større utslag ved laveste konsentrasjon i samsvar med at N:P-forholdet i utgangsmediet da er større. Tilsetning av fosfor alene gir ikke et slikt utslag fordi nitrogen ikke er tilgjengelig. Tilsetning av N alene gir imidlertid noe større utslag enn en skulle vente fra bakgrunnsverdier i vannet. Forklaringen kan være at 3/4 av nitrogenforbindelsene foreligger som nitrat, som er en dårlig N-kilde for organismene.

Ved lavere avlutskonsentrasjoner i resipientvannet enn 0,1 vol % vil tilskuddet av fosfor fra avluten bli neglisjerbart i forhold til bakgrunnskonsentrasjonen, og settes denne til 3 µg/l, kan N:P-forholdet beregnes til ca. 30:1 når bare NH_4^+ tas med og ca. 110:1 når både NO_3^- og NH_4^+ tas med, dersom ingen andre utslipp medregnes. Det er følgelig temmelig nær balanse mellom fosfor og nitrogen som nærings-salter for heterotrof begroing i vann fra Steinsfoss ved avlututslipp under 0,1 vol%, mens nitrogen må antas å bli begrensende ved høyere utslippskonsentrasjoner.

Spørsmålet er så om karbonkilder kan tenkes å begrense veksten, og det er vanskelig å vurdere utfra disse forsøk. Det er for lite kunnskap om de aktuelle begroingsorganismers evne til å utnytte de ulike karbonkildene i utslippene ved de aktuelle konsentrasjoner. Andre næringsfaktorer som K, Mg, Ca og S bør også vurderes.

5.7 Kloakkvann som N- og P-kilde

To innledende forsøk for å studere kombinerte effekter av kloakk- og industriutslipp (fig. 12 og 13) med tilnærmet reelle utslippskonsentrasjoner har blitt utført. I forsøk 4 var vekstresponsen proporsjonal med kloakkvanntilsetningen, og ved lave sulfittlutkonsentrasjoner var responsen på mekanisk rensed ca. det dobbelte av mekanisk-kjemisk rensed kloakkvann. Nivået av NH_4^+ er ca. 3 ganger høyere etter mekanisk rensing (tabell 5), og responsen samsvarer således relativt godt med at utnyttbart nitrogen er vekstbegrensende.

I forsøk 2 med høyere avlutkonsentrasjoner var dessverre avløpsvannet av en annen kvalitet, og kjemiske analyser foreligger ikke ennå. Vekstresponsen tyder imidlertid på at kloakkvann også kan virke inhiberende på *G. candidum*, da det ikke er noen klar tendens til økning i vekstrespons som funksjon av kloakkvann doseringen, selv om tilsetningen må medføre en økning i N- og P-nivået. Økningen i vekstutbyttet som funksjon av kloakkvann doseringen var generelt overraskende lav.

Det er likevel åpenbart at kloakkvannutslipp i kombinasjon med stor organisk belastning vil være av avgjørende betydning for begroingsproblemet gjennom sitt tilskudd av P og N. Det vil ved fortsatte forsøk være viktig å avklare samspillet mellom utslippene nærmere.

5.8 Heterotrof vekstpotensial og nivå av organisk karbon og nærings-salter i nedre del av Otra

G. candidum ble podet på vannprøver tatt under en feltbefaring 9/5-1974, og vekstresponsen etter 5 døgn bestemt ved ATP-analyse (fig. 14 og 15). Metoden er et forsøk på direkte å bestemme hva som er de vekstbegrensende faktorer for heterotrof vekst langs vassdraget med et naturlig nivå av nedbrytbare stoffer. Den gir et verdifullt korrektiv til de øvrige laboratorieforsøkene. Resultatene kan sammenholdes med nivået av organisk karbon, fosfor- og nitrogenforbindelser langs vassdraget (fig. 16, 17 og 18).

Fig.12 Vekst av *Geotrichum candidum* på sulfittlut (furu +10% löv) i vann fra Steinsfoss (0,05 - 0,1 - 0,5 w/v % lut) med tilsetning av rensed kloakk (forsök 4)

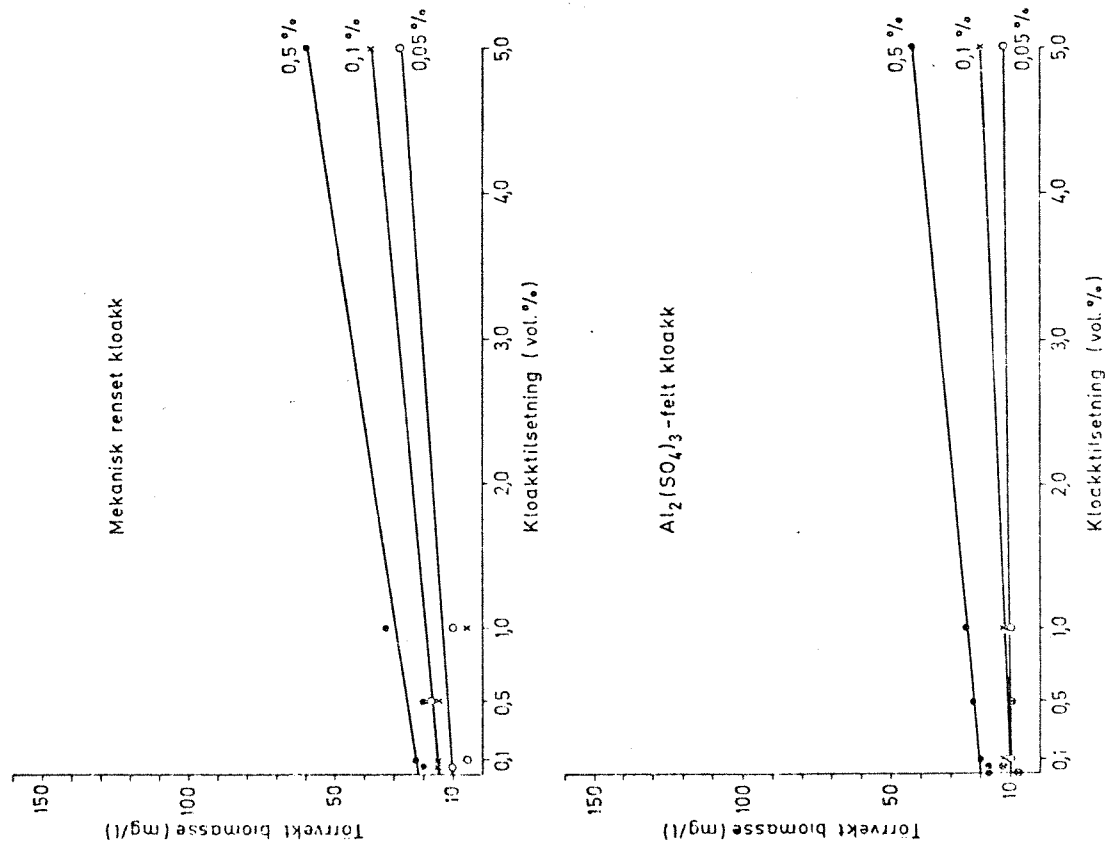
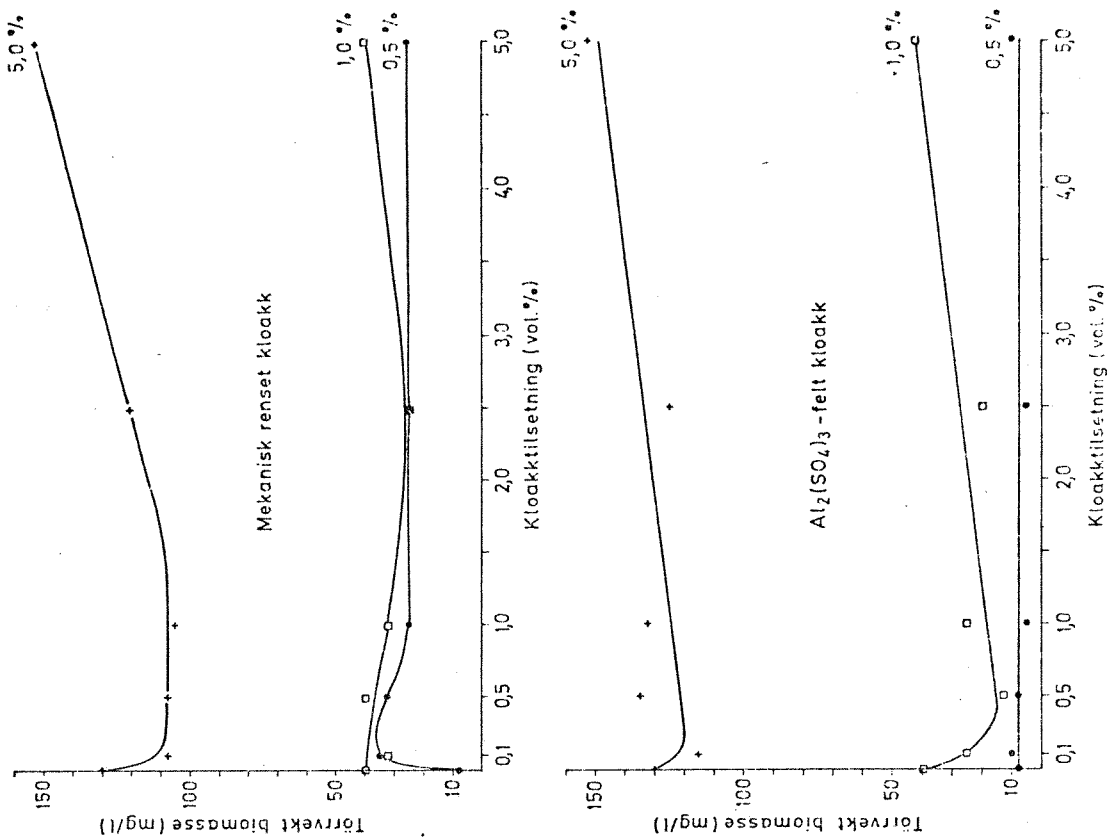


Fig.13 Vekst av *Geotrichum candidum* på sulfittlut (furu +10% löv) i vann fra Steinsfoss (0,5 - 1,0 - 5,0 w/v % lut) med tilsetning av rensed kloakk (forsök 7)



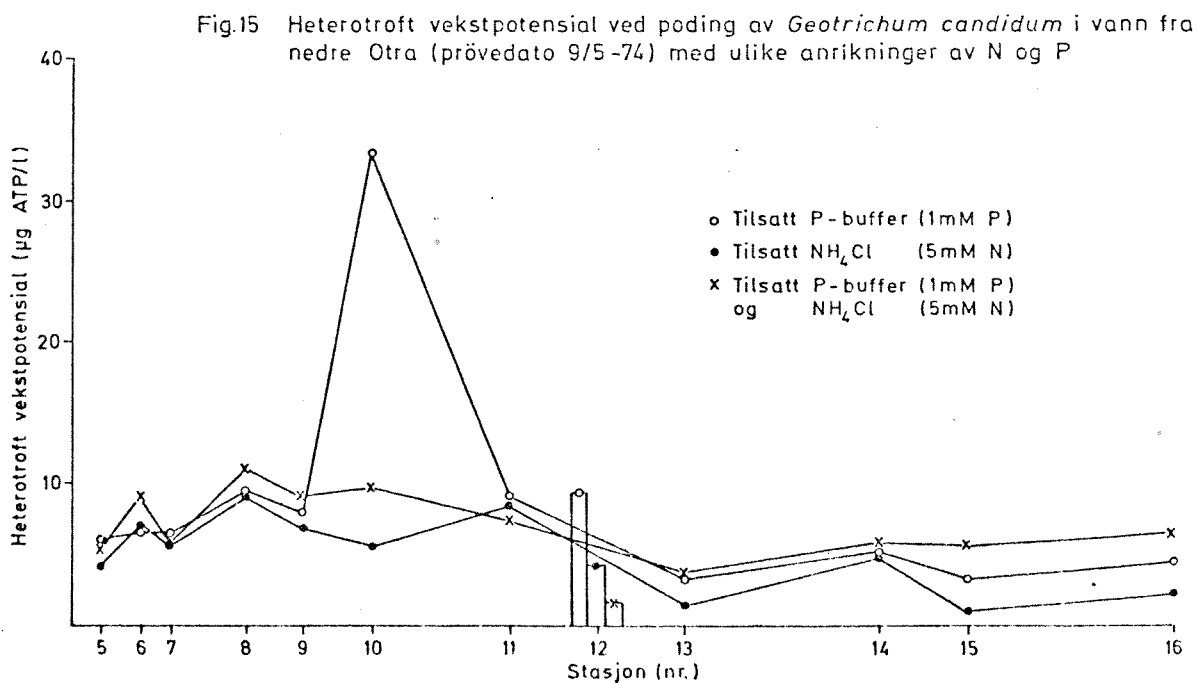
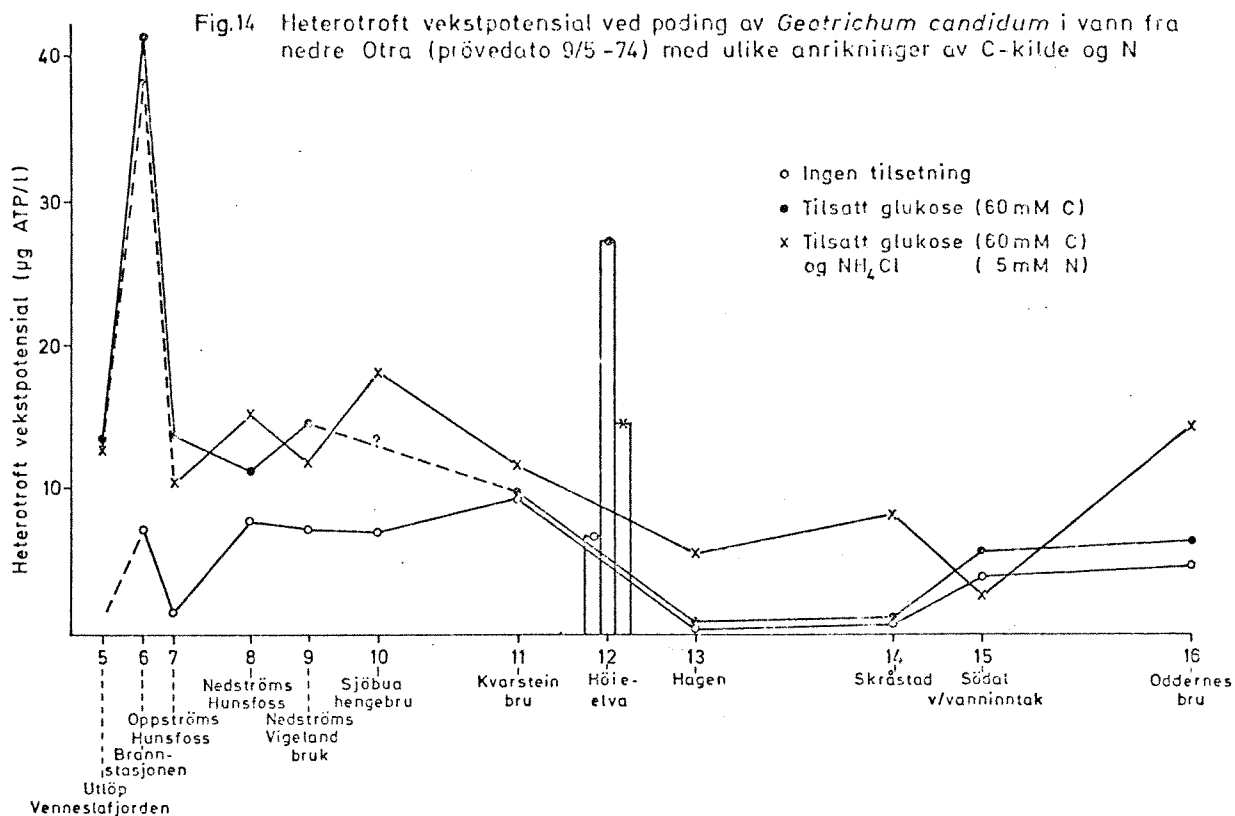


Fig.16 Konsentrasjonsforløpet for oppløst organisk karbon (LOC) og totalt organisk karbon (TOC) i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974

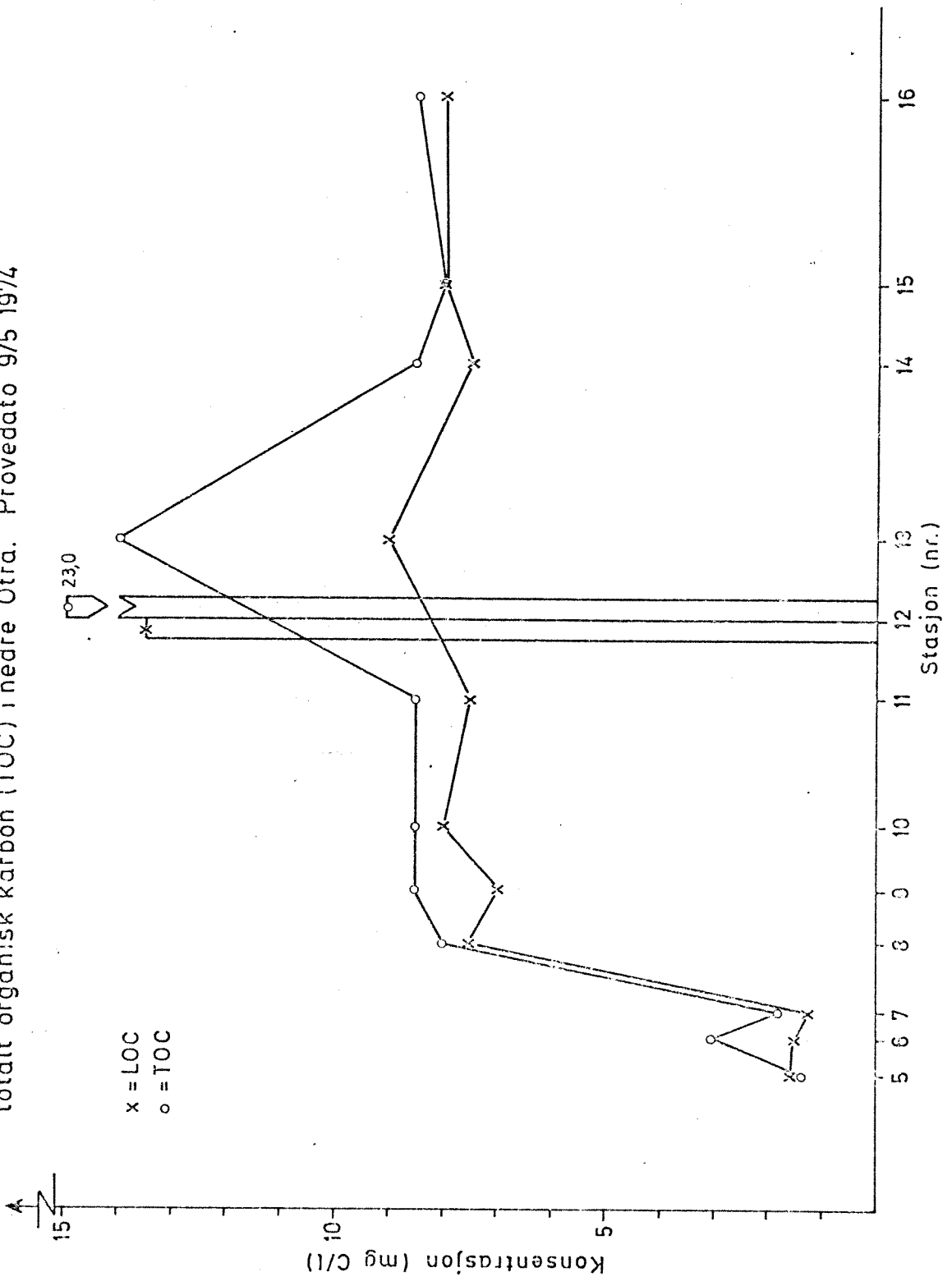


Fig.17 Konsentrasjonsforløpet for ortofosfat og totalfosfat i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974

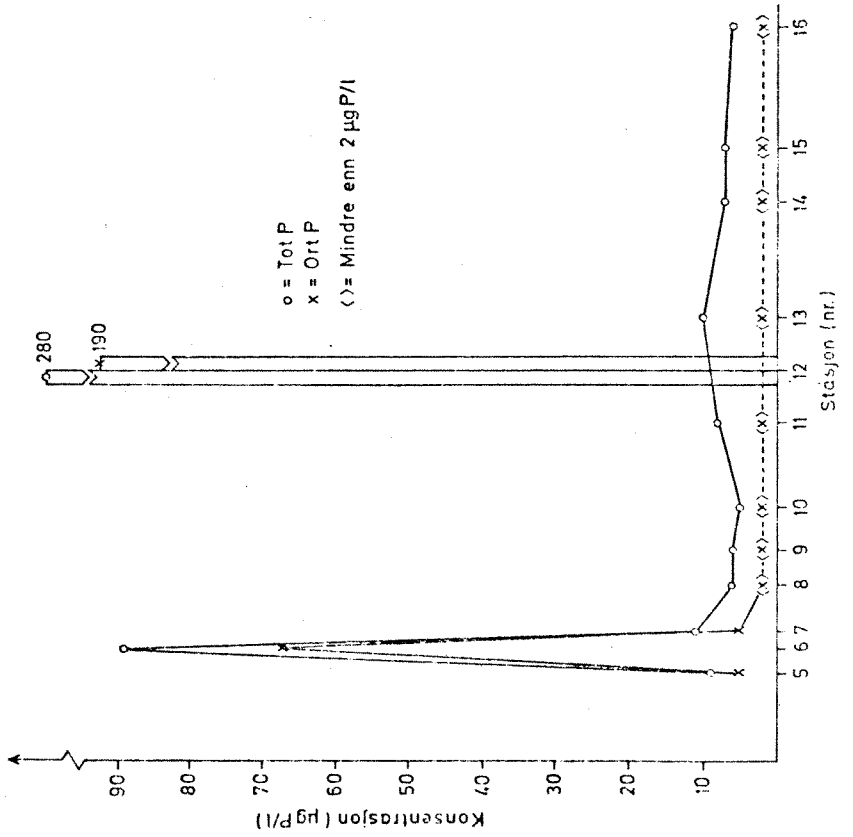
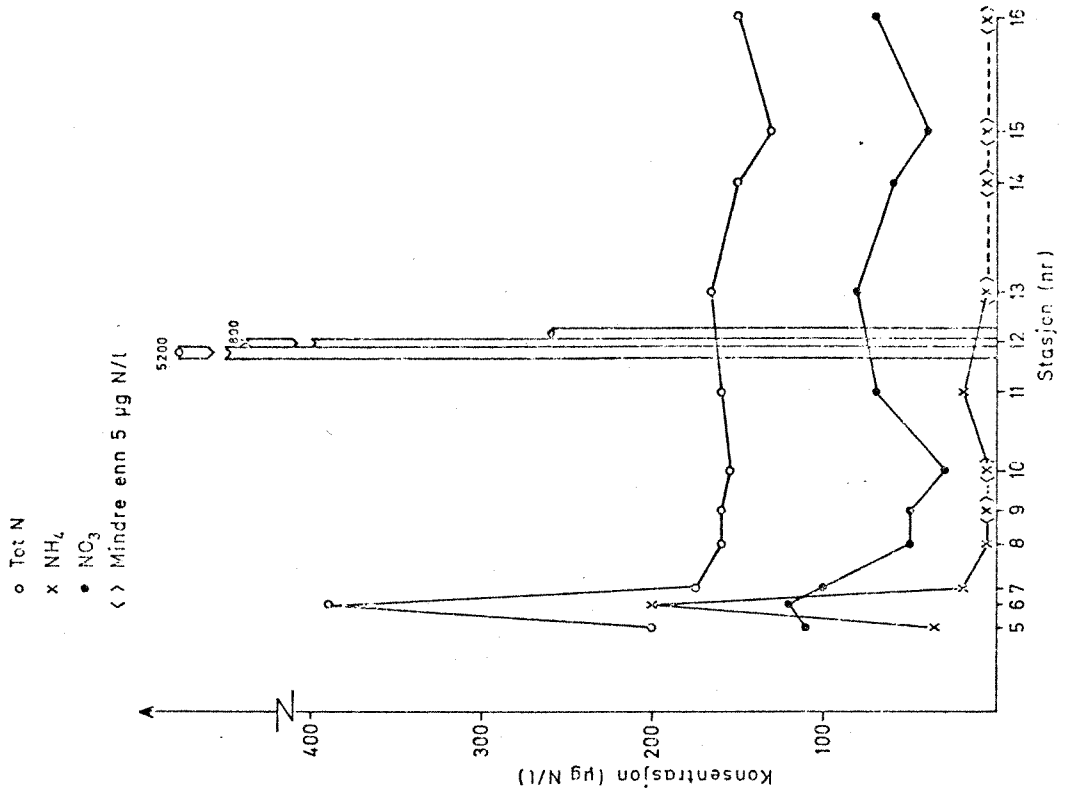


Fig.18 Konsentrasjonsforløpet for oppløst og partikulært nitrogen (Tot N), ammonium (NH₄) og nitrat (NO₃) i nedre Otrå. Prøvedato 9/5 -74



Vann tatt ved stasjon 5 (utløpet av Venneslafjorden) og 6 (brannstasjonen) er ikke representativt for vassdraget på disse stasjonene på grunn av sigevannspåvirkning fra landbruk (5) og kloakkvannutslipp (6) på prøvestedet (se fig.4). Dette kan tydeligst ses ut fra den spesifikke elektrolyttiske ledningsevne, som på stasjon 7 (inntaksbassenget ved Hunsfoss) ligger adskillig lavere. Tilsetning av glukose ved stasjon 6 gir kraftig økning i vekstutbyttet, noe som illustrerer at i vann påvirket av kloakkutslipp er karbon begrensende. Vannet har meget høye nivåer av P og N.

Oppstrøms Hunsfoss fabrikker (st. 7) har imidlertid vannet et N-nivå på linje med verdier fra Steinsfoss (stasjon 1), mens P-nivået er opp i 5 µg P/l. Alle tilsetninger gir noe øket vekstrespons, glukose mest.

Nedstrøms Hunsfoss fabrikker (st. 8) øket vekstpotensialet markert, og tilskudd av nitrogen i kombinasjon med glukose og fosfat gir øket respons. Dette samsvarer med en reduksjon i NH_4^+ til 5 µg N/l, og også NO_3^- reduseres. Fosfat reduseres også kraftig til <2 µg P/l. Positivt utslag fås også overraskende nok av glukose, selv om løst organisk karbon her er det femdobbelte.

Like nedstrøms Vigeland Bruk (st. 9) fås en svak reduksjon i vekstpotensialet, og glukose gir positivt utslag.

Ved stasjon 10 (Sjøbua hengebru) fås et sterkt utslag ved tilsetning av fosfat. Da utslaget i kombinasjon med ammonium er langt mindre, så kan dette skyldes forekomst av partikulært karbon i mediet. Vannet ble ikke filtrert før forsøkene. Utslaget er forøvrig størst for ammonium og glukose i blanding, og det synes som om alle tre faktorer ligger nær begrensende nivåer. Nitratkonsentrasjonen har sunket til 30 µg N/l, og tendensen i N-kurvene viser klart at NH_4^+ utnyttes først og hurtigst, men at også NO_3^- kan utnyttes når NH_4^+ ikke er tilgjengelig.

Stasjon 11 (Kvarstein bru) viser en stigning i nivået av både NO_3^- , NH_4^+ og total-fosfat, og vekstpotensialet øker selv om løst organisk karbon minsker. Bare tilskudd av glukose + NH_4^+ gir en svakt øket respons.

Høiebekken (stasjon 12) er en tilløpsbekk med liten vannføring, men høye konsentrasjoner av næringssalter, organisk karbon og andre komponenter, samt svært høy pH. Effekten på hovedvassdraget kan spores i alle kjemiske parametre ved stasjon 13 (tabell 3). Vannet i bekken gir et noe unormalt vekstpotensial, da tilsats av NH_4^+ + PO_4^{3-} virker klart negativt. Tilsetning av glukose gir imidlertid en kraftig respons som viser underskudd på lett utnyttbar karbonkilde.

Ved stasjon 13 (Hagen) har NO_3^- , totalt fosfat og totalt nitrogen øket noe, men NH_4^+ og PO_4^{3-} er igjen svært lave. Vekstpotensialet er svært lavt og har sunket på tross av en økning i organisk karbon. Glukose + NH_4^+ gir positivt utslag. En toksisk effekt av utslippet fra stasjon 12 kan ikke utelukkes.

Ved stasjon 14 (Skråstad) har organisk karbon igjen sunket, nitrat og partikulært fosfat tjener som N- og P-kilder, og alle tilsetninger gir positiv respons, glukose + NH_4^+ størst.

Ved stasjon 15 (Sødal ved vanninntaket) har vekstpotensialet uten tilsetninger øket igjen. Tilsetning av NH_4^+ synes å gi en negativ respons, og ingen faktorer har særlig stor positiv respons. Det kan se ut som om en ukjent faktor virker begrensende eller toksisk.

Ved stasjon 16 (Oddernes bru) har det særlig skjedd en økning i nitrat og sulfat, og glukosetilsetning gir positiv respons.

5.9 Variasjoner i øvrige kjemiske parametre

I parametre som spesifikk elektrolyttisk ledningsevne (fig. 19), sulfat (fig. 20), Mg, Ca, Na og K (fig. 21) og pH (fig. 22) kan effektene av kloakkutslipp, utslipp fra Hunsfoss, fra Høiebekken og fra kilder nær Oddernes bru klart spores.

Fig.19 Forløpet for spesifikk elektrolyttisk ledningsevne (κ_{20}) i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974

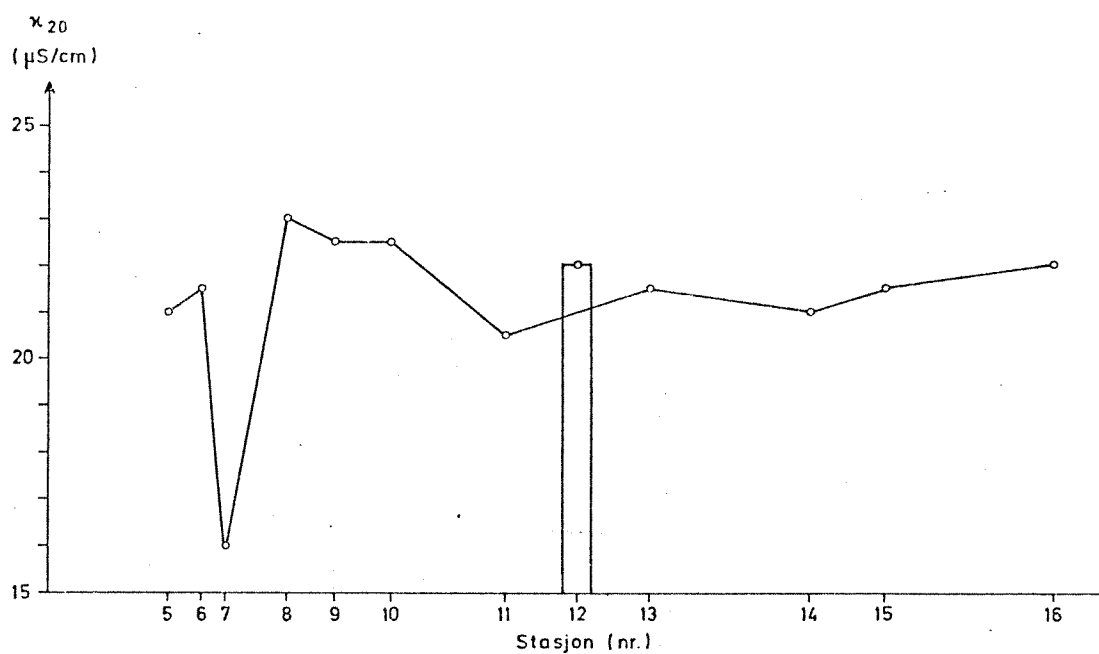


Fig.20 Konsentrasjonsforløpet for sulfat i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974

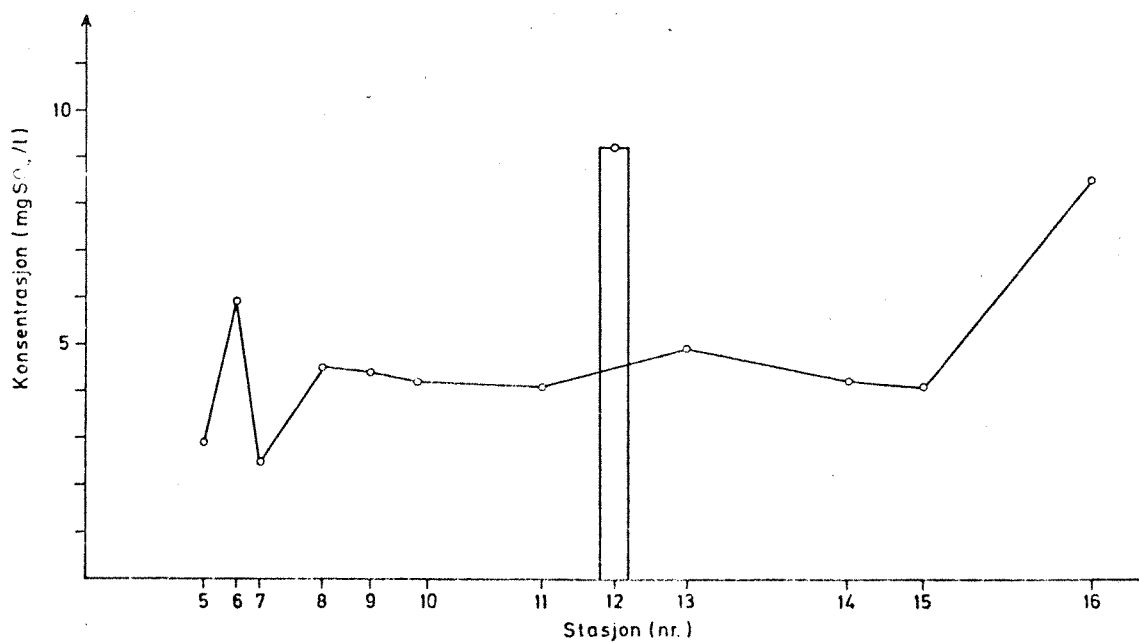


Fig.21. Konsentrasjonsforløpet for Mg, Ca, Na og K i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974

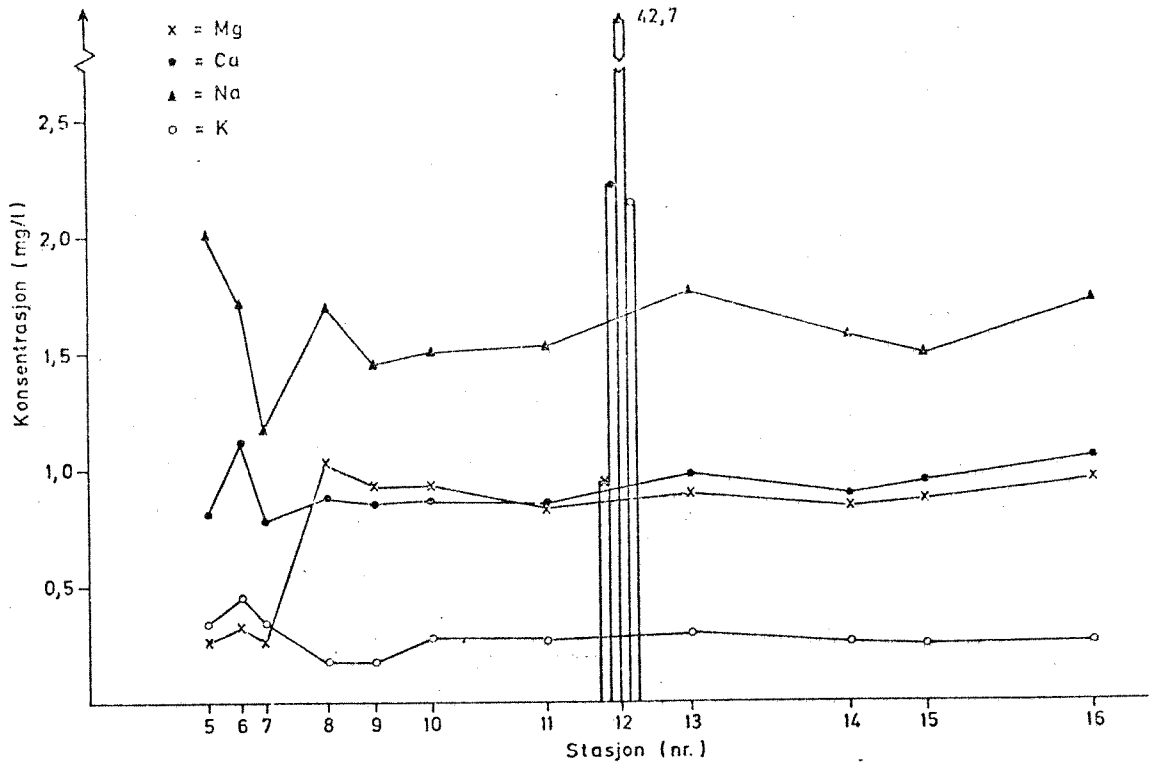
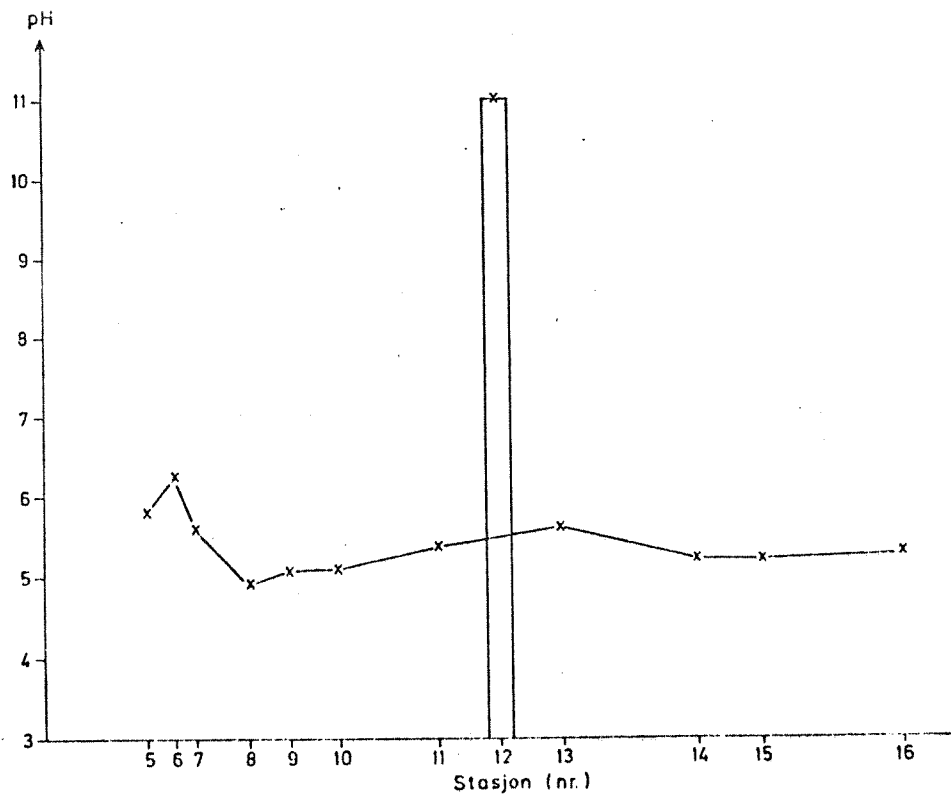


Fig.22 Forløpet av pH i nedre Otra. Prøvedato 9/5 1974



En klar nedgang i K^+ kan spores mellom stasjonene 7 og 9, og både Na, Mg og SO_4^{2-} synker noe etter stasjon 8 og stasjon 13, noe som kan skyldes binding i heterotrof biomasse.

Konsentrasjonene er imidlertid fremdeles høye, og det er ganske usannsynlig at noen av disse kan virke vekstbegrensende for den heterotrofe begroingen, selv om sopp krever 4 ganger så mye kalium som fosfor.

5.10. Begroingssamfunnets sammensetning

Benthosmateriale innsamlet under prøvetaking 9/5-1974 er undersøkt i lupe og mikroskop og vurdert mengdemessig etter følgende skala:

- 5: Dominant
- 4: Hyppig
- 3: Vanlig
- 2: Sparsom
- 1: Sjelden
- +: Forekommer

Resultatene foreligger i tabellform (tabell 11):

Stasjon 1 (Steinsfoss): Bare ubetydelig heterotrof begroing, samfunnet utgjøres nesten utelukkende av *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kütz. og *Tribonema* sp. *Tabellaria flocculosa* er en vanlig benthosalge som tolererer svært varierende betingelser. *Tribonema* derimot påtreffes oftest på forurensningsbelastede lokaliteter. Lite organismer i vannfasen. I en annen prøve er det lite heterotrof begroing. Materialet domineres av en *Ulothrix* art. Slekten *Ulothrix* foretrekker næringsrike lokaliteter. Ellers finnes en del diatoméer sammenfiltret med detritus og fibre i fnokker.

Stasjon 6: En viss forekomst av bladmoser, i tillegg inneholder prøven tuster med heterotrof begroing, blågrønnalger og diatoméer. Blågrønnalgeslekten *Lyngbya* finnes vanligvis i forurensningssammenheng.

Stasjon 7: Prøven består av diverse trådformede organismer, blågrønnalger, grønnalger og heterotrof begroing likt representert. Vannfasen preges av *Tabellaria flocculosa*.

Stasjonene 8, 9, 10 og 11: På samtlige stasjoner domineres begroings- samfunnet fullstendig av heterotrofe organismer, vesentlig *Fusarium* og *Leptomitus*. Foruten *Tabellaria flocculosa* har ingen alger kvantitativ betydning i prøvene.

Stasjon 12: Den heterotrofe vekst er ikke fullt så markert som på st. 8, 9, 10 og 11. Blågrønnalgen *Lynghya* har kvantitativ betydning, i tillegg er observert friske grønne tråder av *Ulothrix*. Sessil alge (ubestemt) er en viktig bestanddel av vannfasen.

Stasjonene 13,14 og 15: Fibre og heterotrof begroing utgjør hoveddelen av benthosmaterialet. Mengden av organismer i vannfasen varierer litt, på stasjon 15 er påvekstalgene ganske godt representert.

5.11 Sopp isolert på sulfittlutmedier

Fra anrikningskulturer i vann fra Otra med sulfittavluter som karbon- og energikilde har 4 dominante organismer blitt isolert i renkultur. Alle vokser godt på agarplater med sulfittlutmedier.

NIVAC 1-74 og NIVAC 2-74 er muggsopper med blågrønne sporer, men syntes likevel å vokse uavhengig av fast substrat. Trolig stammer de fra luftbårne sporer. Begge vokste godt på lignosulfonsyrekoncentrat, og NIVAC 2-74 ledet til hurtig mørkfarging av agaren.

NIVAC 4-74 og 5-74 er gjærsopper med dårligere vekst på konsentratet. NIVAC 4-74 er en apiculat gjær med uregelmessig form som danner lyserøde kolonier. Den formerer seg ved knoppskyting og danner trolig pseudomycel.

Tabell 11. Forekomst av benthos i Otra, 9. mai 1974.
(Bearbeiding ved mikroskopering og subjektiv mengdevurdering.)

| Stasjon | 1 | 1 | 6 | 7 | 8 | 9 | 9 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-----|---|---|---|---|-----|-----|---|-----|----|-----|-----|-----|----|
| Makrovegetasjon og trådformet begroing (Steinsfoss) | 1-2 | 1 | 4 | 3 | 5 | 4-5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3-4 | 4-5 | 4 | 5 |
| HETEROTROF VEKST | | | | | | | | | | | | | | |
| Forekomst totalt | | | | | | | | | | | | | | |
| Fusarium aquaeductuum | | | | | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | | 4 | 3 | 3 |
| Leptomitius sp. | | | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | | + | 2 | 1 |
| Sopp, ubestemt | | + | | | 1 | 1 | + | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Sopp, sporer | | | | | 3 | 2 | + | + | + | + | | + | 1 | + |
| Sphaerotilus sp. | | | | | | | | | | | | | | |
| Flexibacterium sp. | | | 3 | | | | | | | | | | | |
| Protozoer, diverse | | | 3 | | | | | | | | 2 | + | | |
| CYANOPHYCEAE | | | | | | | | | | | | | | |
| Lyngbya sp. | | | 2 | 1 | | | | | | | 3 | | | |
| Pseudanabaena sp. | | | 2 | 1 | 1 | + | | | | | + | | + | |
| Trådformede, ubestemte | | | | 1 | | | | | | | | | | 1 |
| CHLOROPHYCEAE | | | | | | | | | | | | | | |
| Bulbochaete sp. | | | | 1 | | | 1 | | | | | | | + |
| Mougeotia sp. | 2 | | | 1 | | 1-2 | | | | | | | + | |
| Stigeoclonium sp. | | 1 | | | | 1 | 1-2 | | | | | 2 | 1-2 | 1 |
| Tribonema sp. | 4 | | | 2 | 1 | | | | | | | | 1-2 | 1 |
| Ulothrix sp. | | 5 | | 1 | | | | | | | 1 | | | |
| Trådformet, ubestemt | | | | | | | | | 1-2 | | | | | |
| BRYOPHYTA | | | | | | | | | | | | | | |
| Bryales | | | 3 | | 1 | | | | | | | | | |
| Hepaticae | 2 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| CELLULOSEFIBRE | 2 | 1 | 1 | + | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3 |

6. DISKUSJON OG OPPSUMMERING

6.1 Metodiske begrensninger

Ut fra våre undersøkelser over begroingssamfunnets sammensetning i Otra (5.10) må det innrømmes at *G. candidum* ikke er en særlig representativ art. Arten ble valgt innledningsvis fordi den vanlig forekommer i sulfittlutbelastede elver, andre varianterers fysiologi er relativt godt kjent av leger og parasitologer, og den er lett å dyrke i laboratoriet. Den er en typisk testorganisme for heterotrof begroing. Forøvrig kan den vokse både som gjær (encellet) og som mycel (Filamenter).

F. aquaeductuum er imidlertid den dominerende sopp i Otra, og ved senere forsøk vil hovedvekten bli lagt på å studere denne artens økofysiologi. Dessuten vil *Leptomitus lacteus* bli forsøkt anvendt.

Metoden med dyrking i kolbe på et rystebord er svært rasjonell, men en må bruke høye substratkonsentrasjoner og vekstmiljøet er under kontinuerlig forandring under forsøket, slik at den har begrenset verdi ved vekstfysiologiske studier. Hensikten var imidlertid noenlunde raskt å få en oversikt over samspillet mellom de viktigste faktorer som er bestemmende for den heterotrofe begroings natur, og til dette formålet har metoden vist seg meget brukbar.

De anvendte avluter og resipientvann er relativt representative for hva en finner som et gjennomsnitt i nedre Otra, bedømt ut fra kjemiske analyser og data fra tidligere undersøkelser. Utslippene fra Husfoss foregår periodevis, og strømningshastigheten i elva er såvidt stor at en tilsvarende periodisitet i kjemiske parametre kan påvises langs hele elvestrekningen. Det vil derfor være aktuelt å gjennomføre en ny episodestudie hvor vannprøver tas for analyser på de viktigste næringssalter og organisk karbon, og for vekstpotensialmålinger tilsvarende forsøk 10 og 11.

6.2 Organiske utslipps og næringssaltene betydning for den heterotrofe begroing

Ved kjemiske analyser har en vist at nivåene av utnyttbart nitrogen og fosfat ofte ligger svært lavt i elven. Noe organisk bundet fosfat som inngår i tallet for totalfosfat, kan trolig frigjøres kjemisk eller ved ekstracellulær enzymaktivitet (fosfataser) og utnyttes, men konsentrasjonsnivåene vil da ligge såvidt lavt at organismenes veksthastighet vil begrenses. Nitrogen må hentes fra nitrat når ammonium er oppbrukt, og siden nitrat utnyttes dårligere må selv relativt høye nitratnivåer ventes å være hastighetsbegrensende. Enhver tilførsel av nitrat, ammonium og fosfat vil derfor sannsynligvis bidra til øket begroing så lenge utslippet av organisk stoff er uendret. Kloakkvann-tilførselens betydning bør vurderes nærmere i denne sammensetning.

Den organiske belastning på nedre Otra er svært stor, men på grunn av stor vannføring og et raskt fall mot sjøen er neppe tilgangen på oppløst oksygen noen minimumsfaktor. Utslippet av sulfittlut fra Hunsfoss dominerer, men også utslipp fra Norsk Wallboard og utslipp i Høiebekken kan spores. 60-70% vil være tungt nedbrytbare forbindelser, og det er usikkert i hvilken grad begroingen er istand til å mineralisere disse i løpet av den relativt korte tid som står til rådighet. Lignosulfonsyrene bidrar antakelig til at *F. aqueductuum* mer effektivt kan utnytte vannets innhold av lavmolekylære stoffer. Analyseverdiene for løst organisk karbon viser klar nedgang etter hvert hovedutslipp, og selv om næringssalter har betydning for begroingsintensiteten, så er det opplagt den store organiske belastning som er den egentlige årsak.

6.3 Toksiske effekter ved ulike utslipp

Ved fortsettelsen av undersøkelsen vil det være viktig å vurdere toksiske effekter ved utslippene, både overfor organismer som naturlig forekommer i en sørlandselv og overfor saltvannsorganismer og fisk. Ved blekeprosessen i celluloseindustrien benyttes bl.a. klorforbindel-

ser som oksydasjonsmidler, og nyere erfaringer viser tydelig at bl.a. klorerte, aromatiske forbindelser finnes igjen i avlutene. Disse er mer eller mindre kjemisk stabile og generelt toksiske. Det er også grunn til å rette oppmerksomheten mot utslippene av tensider og lut i Høiebekken og eventuelt andre utslipp. Med tanke på en reduksjon av begroingen er det viktig å vite hvilken rolle denne spiller i avgiftning og nedbrytning av toksiske forbindelser.

6.4 Effekter på sjøresipienten

Bare en mindre del av tilført organisk stoff mineraliseres helt til karbondioksyd og vann på elvestrekningen, resten vil havne i estuarområdet. Hva som her skjer med toksiske og tungt nedbrytbare forbindelser er dårlig kjent. Fra Østersjøen og Sveriges vestkyst vet en imidlertid at lignosulfonsyrene kan spores i mange mil fra utslippsstedet (Almgren, Josefsson og Nyquist 1974). Nær munningen vil trefibre og begroingsorganismer, som stadig løsrives og transporteres nedover, sedimentere og kunne skape oksygenfrie forhold i bunnvannsområder.

6.5 Fortsatte undersøkelser over den heterotrofe begroing i nedre Otra

Vekstfysiologiske forsøk med begroingsorganismer vil bli videreført i kjemostat og med andre teknikker, dels gjennom NIVAs egne forskningsprosjekter. Vekstforsøk i forsøksrenner ved vassdraget med tilsetning av nitrogen- og fosforkilde bør også videreføres. Biomassen på elvebunnen og i elvevannet vil bli bestemt ved ATP-analyse og dens reelle stoffskifteaktivitet bestemt ved oksygenopptaksmålinger på elvebunnen.

Med sikte på en bedre forståelse av sammenhengen mellom begroingsaktivitet og vannkjemiske parametre, bør det gjennomføres en episodestudie med simultan prøvetaking på flere stasjoner, foruten enkelte fysikalske målinger på stedet. Det vannkjemiske analyseprogrammet vil bli utvidet med sikte på en mer detaljert analyse av de organiske komponenter. Dette vil så alt i alt gi et grunnlag for enkle modell-

betraktninger med sikte på en nærmere vurdering av selvrensingsgrad, samspillet mellom ulike faktorer og massebalanser.

Litteraturstudier og innledende forsøk bør igangsettes med sikte på en nærmere vurdering av gifteffekter ved ulike utslipp.

21/11-1974

LAA/KEN

7. LITTERATURHENVISNINGER

- ALMGREN, T. og JOSEFSSON, B. (1973): A fluorimetric determination of lignin sulfonates from natural waters in the presence of humic substances. Svensk Papperstidning 76:19-23.
- ALMGREN, T., JOSEFSSON, B. og NYQUIST, G. (1974): A fluorescence method in studies of spent sulfite liquor and humic substances in sea water. Environ. Sci. & Techn. in press.
- BARNETT, H. L. (1960): Illustrated genera of imperfect fungi. 2. utg. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- BERGMANN-PAULSEN, B. (1962): Forurensningen i Otrå nedre løp. Vattenhygien 4(62): 1-13.
- COOKE, W. B. (1957): Nutritional requirements of nine common sewage fungi. Sew. & Ind. Wastes 29:1243-1251.
- CURTIS, W. M. (1969): Sewage fungus: its nature and effects. Water Res. 3:289-311
- GRANDE, M. (1964): Water pollution studies in the river Otra, Norway: Effect of pulp and paper mill wastes on fish. Int. J. Air & Water Poll. 8:77-88.
- HYNES, H.B.N. (1960): The biology of polluted waters. Liverpool University Press.
- JANNASH, H. W. (1967): Enrichments of aquatic bacteria in continuous culture. Arch. Mikrobiol. 59:165-173.
- LAAKE, M. (1971): Vekstfysiologiske undersøkelser av *Fusarium* sp. NIVAC E-70 (Deuteromycetes) i kjemostat. Hovedoppgave. Norges Tekniske Høgskole, Kjemiavdelingen.
- LAAKE, M. (1974): Innarbeidelse og utvikling av biotestmetoder. Norsk institutt for vannforskning, Oslo.

- LARSSON, L.-I., og SAMUELSSON, O. (1967): Sugars in sulfite liquor. Svenska Papperstidning 70:18.
- LINDBERG, A. (1963): Bestemning av lignin och lignosulfonsyra. Vattenhygien 4:106.
- ORMEROD, J.G., GRYNNE, B. og ORMEROD, K.S. (1966): Chemical and physical factors involved in the heterotrophic growth response to organic pollution. Verh. int. Verein. theor. angew. Limnol. 16:906-910.
- PAINTER, H.A. (1954): Factors affecting the growth of some fungi associated with sewage purification. J. gen. Microbiol. 10:177-190.
- PERLEY, A.F. og PAGE, O.T. (1971): Differential induction of pectolytic enzymes of *Fusarium roseum* (lk.) emend. Snyder and Hansen. Can. J. Microbiol. 17:415-420.
- PHAUP, J.D. (1968): The biology of *Sphaerotilus* species. Water Res. 2:597-614.
- RYDHOLM, S. (1965): Pulping Processes. John Wiley & Sons, Inc., London.
- SCHERZ, H., STEHLIK, G., BANCHER, E. og KAINDL, K. (1968): Dünnschichtchromatographie der Kohlhydrate. Chromatog. Rev. 10:1-17.
- STEENSLAND, H. (1970): Innledende studier i forbindelse med prosjekt B-8/71. Vekstfysiologi hos fastsittende heterotrofe mikroorganismer. Norsk institutt for vannforskning, Oslo.
- STEENSLAND, H. (1973): Continuous culture of a sewage fungus *Fusarium aquaeductum*. Arch. Mikrobiol. 93:287-294.

STEENSLAND, H. og EIMHJELLEN, K. (1973): Vann - rent og urent.
(Forelesninger i Teknisk Biokjemi). Norges Tekniske Høgskole,
Trondheim.

SUNDMANN, V. og SELIN, J.F. (1970): Microbial utilization of
lignosulphonates of various molecular sizes. Papper och Trä
52:473-479.

WESTERMARK, G. og ERIKSSON, K.-E. (1974): Cellulose:quinone
oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot
fungi. Acta Chem. Scand. B 28: 209-214.