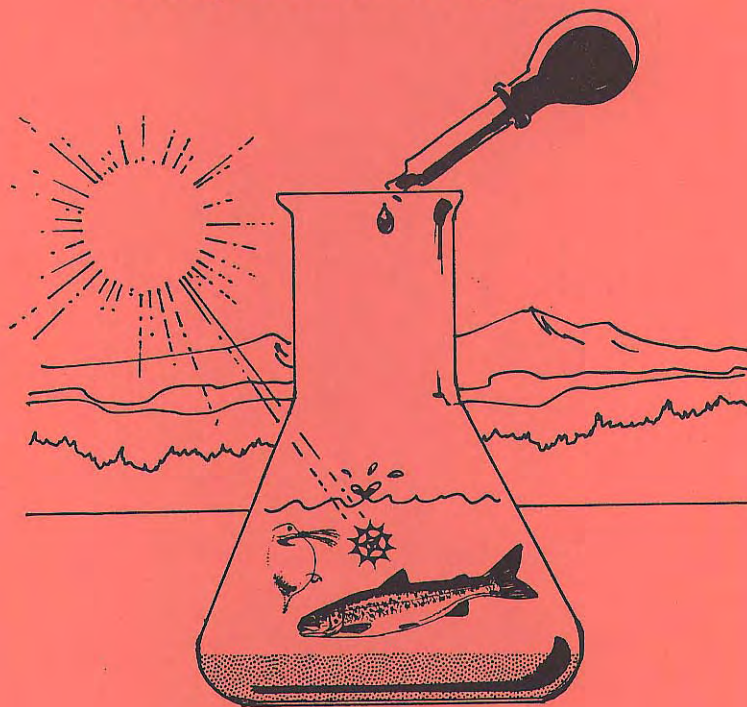




O-90114

KARAKTERISERING AV AVLOPPSVATTEN FRÅN  
**Neste Oxo AB**

Stenungsund  
**Kompletterad rapport**



# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

<b>Hovedkontor</b>	<b>Sørlandsavdelingen</b>	<b>Østlandsavdelingen</b>	<b>Vestlandsavdelingen</b>
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-90114
Undernummer:
Løpenummer:
2583
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:	Dato:
Karakterisering av avloppsvatten från Neste Oxo, Stenungsund Kompletterad rapport	31.05.91
Forfatter (e):	Faggruppe:
Torsten Källqvist	
	Geografisk område:
	Sverige
	Antall sider (inkl. bilag):
	116

Oppdragsgiver:	Oppdragsg. ref. (evt. NTNf-nr.):
Neste Oxo, AB	K. Flodmark

## Ekstrakt:

En karakterisering av utgående avløpsvann fra Neste Oxo, Stenungsund, Sverige er utført etter direktiver fra Statens Naturvårdsverk. Programmet omfattet kjemisk og biologisk karakterisering av prøver tatt over en uke 6-12/6 1990. Noen kompletterende undersøkelser er foretatt i april 1991. Resultatene viste toksiske effekter ned til 2.5% konsentrasjon. Toksisiteten ble lite endret ved 4 ukers nedbrytning. Det ble ikke påvist mutagene effekter. Ca. 30% av løst organisk karbon ble omsatt ved 4 ukers nedbrytbarhetstest ved 20 °C. Avløpsvannet inneholdt 3.7 mg/l potensielt bioakkumulært materiale. Denne rapporten erstatter rapport med løpenummer 2522 fra 18/12-90 med samme tittel.

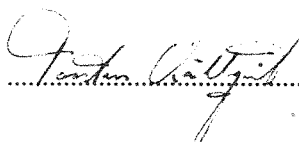
4 emneord, norske

1. Industriavløpsvann
2. Kjemisk industri
3. Økotoksikologi
4. Biologisk nedbrytbarhet

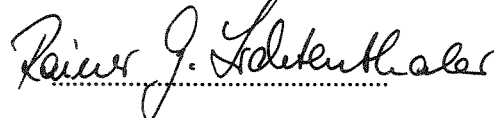
4 emneord, engelske

1. Industrial wastewater
2. Chemical industry
3. Ecotoxicology
4. Biological degradation

Prosjektleder

  
.....

For administrasjonen

  
.....

ISBN 82-577-1913-7

Norsk Institutt for Vannforskning

O-90114

# KARAKTERISERING AV AVLOPPSVATTEN

FRÅN

NESTE OXO

STENUNGSUND

(Kompletterad rapport)

Prosjektledare: **Torsten Källqvist, NIVA**

Medarbetare:

**NIVA**

Harry Efraimsen

Randi Romstad

Åse Bakketun

**SI**

Berit Holestøl

Hilde Drangsholt

Frøydis Oreld

**Göteborgs Universitet**

Sten Åke Wängberg

Sverker Molander

**Kristinebergs Marin-  
biologiska Station**

Åke Granmo

Esbjörn Telemo

## FÖRORD

*Som ett led i kartläggningen av utsläpp från kemisk industri, har Statens naturvårdsverk anmodat Neste Oxo i Stenungsund att utföra en kemisk/biologisk karakterisering av avloppsvattnet efter riktningslinjer från Naturvårdsverkets "STORK"-projekt. Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA), i samarbete med Senter for Industrieforskning (SI) fick i maj 1990 uppdraget att genomföra karakteriseringen.*

*Utöver de nämnda institutionerna har VBB konsult AB varit ansvarig för provtagning och leverans av prover till Oslo. Tester med marina alger har utförts vid Botaniska Institutionen, Göteborgs Universitet och toxicitetstester med storspigg vid Kristinebergs Marinbiologiska Station, Fiskebäckskil. Analyser av dygnprover utfördes lokalt vid Neste Oxo's egna laboratorier. Analyser av olja (IR-metod) utfördes av Bærum kommuns laboratorium. Övriga tester och analyser har utförts vid NIVA och SI.*

*Efter genomgång av resultaten på ett möte med Statens Naturvårdsverk i Stenungsund 18.2. 1991, beslutades att undersökningen skulle kompletteras med några ytterligare tester/analyser och att vissa rättelser och kommentarer skulle läggas till rapporten. Detta kompletterande material har inarbetats i den ursprungliga rapporten och föreliggande rapport ersätter därmed den tidigare rapporten "O-90114, Karakterisering av avloppsvatten från NesteOxoAB, Stenungsund (NIVA-rapport nr. 2522, 1990).*

*Oslo maj 1991*

*Torsten Källqvist*

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>1. Material och metoder</b>	4.
1.1. Beskrivning av anläggning	4.
1.2. Provtagning	4.
1.3. Provbehandling	4.
1.4. Test-och analysprogram	5.
<b>2. Resultat</b>	8.
2.1. Variationsstudie	8.
2.2. Blandprov	8.
2.2.1. Kemisk karakterisering	8.
2.2.2. Bioackumuleringspotential	9.
2.2.3. Toxicitet	10.
2.2.4. Mutagenitet	13.
2.2.5. Nedbrytbarhet	13.
2.2.6. Kemisk karakterisering efter nedbrytning	14.
2.2.7. Toxicitet efter nedbrytning	15.
<b>3. Kommentarer</b>	15.
<b>4. Referenser</b>	16.
APPENDIX 1. Analyser av mineralolja	17
APPENDIX 2. Priority pollutants	23
APPENDIX 3. Bioackumuleringspotential	33
APPENDIX 4. Toxicitetstest med aktivt slam	53
APPENDIX 5. Toxicitetstester med Microtox	55
APPENDIX 6. Toxicitetstester med <i>Selenastrum</i>	61
APPENDIX 7. Toxicitetstester med marina alger	68
APPENDIX 8. Akut toxicitet, <i>Nitocra spinipes</i>	74
APPENDIX 9. Reproduktionstest med <i>Nitocra spinipes</i>	77
APPENDIX 10. Akut toxicitet, Storspigg	95
APPENDIX 11. Ames test	102
APPENDIX 12. Nedbrytbarhetstester	110
APPENDIX 13. Metoder	115

## 1. MATERIAL OCH METODER

### 1.1 Beskrivning av anläggning

Anläggningen består av fyra processenheter; syntesgas, butyraldehyd, oktanol (2-etylhexanol) och mjukningsmedel (ftalater). Syntesgasen produceras av olja och syrgas, och utgör tillsammans med propen råvaror för produktionen av butyraldehyd och oktanol. Mjukningsmedlen tillverkas satsvis av i huvudsak oktanol och ftalsyraanhydrid.

Processavloppsvatten från oktanol och mjukningsmedelenheterna behandlas genom dekantering/destillering och förbränning. De renade delströmmarna blandas med dagvatten och processvatten från samtliga enheter i en koncentrationsutjämningsbassäng (luftad bassäng), där närsalter tillsätts (1.9 kg P och 1.07 kg N per dygn). Efter pH-justering (svavelsyra) leds avloppsvattnet till biorotorer. Efter passering av biorotorerna justeras pH-värdet på nytt med natronlut, och järnklorid tillsätts som fällningskemikalie. De flockningsmedel som används är Zetag 53, Zetag 57 och Zetag 78. De två första är i fast form och innehåller ej nonylfenol. Zetag 78 är i flytande form och kan möjligen innehålla nonylfenol. Efter sedimentering tillsätts en polymer, och vattnet sandfiltreras.

Normalt är sammansättning av vatten till reningsverket följande per dygn:

1. 120-125 m<sup>3</sup> processvatten från syntesgasanläggningen (100 ppm TOC).
2. 50-52 m<sup>3</sup> processvatten från oktanolanläggningen (900 ppm TOC under perioden)
3. 8-10 m<sup>3</sup> processvatten från mjukningsmedelanläggningen
4. 30-35 m<sup>3</sup> vatten från facklan
5. 50 m<sup>3</sup> vatten från laboratorier, verkstad, spolning av hårdgjorda ytor mm.
6. X m<sup>3</sup> regnvatten från hårdgjorda ytor.

Punkt 1 och 2 kommer i eget rör direkt till den luftade bassängen. Övriga går via flödesutjämningsbassängen.

### 1.2. Provtagning

7 dygnsprov togs ut under en vecka 6-12/6 1990. Proverna togs med en automatisk, flödesproportionell provtagare från utloppet efter biorening och filtrering.

### 1.3. Provbehandling

Dygnsproverna överfördes till 5 l flaskor/kannor av polyeten som förvarades frysta. Ett delprov togs ut för analys av dygnsproverna, som utfördes lokalt inom 6 timmar efter provuttag. Microtox-testerna utfördes av Berol Nobel och övriga analyser på Neste Oxos eget laboratorium.

Efter avslutad provtagning transporterades de frysta proverna till testlaboratorierna i Oslo, Fiskebäckskil och Göteborg. Proverna ankom Oslo med frystransport 13/6. Proverna tinades genom att kannorna placerades i rinnande vatten av ca. 15 °C, och blandades därefter proportionellt mot dygnsflödet till ett blandprov, som fördelades till de olika testerna och

analyserna. Som blandningskar användes en tank av rostfritt stål, som rengjorts med aceton och destillerat vatten. Samma blandningsförhållande användes för veckoblandprovet till testen med marina alger och storspigg.

Dygnslödet i avloppsströmmen registrerades på provtagningspunkten. Flödesregistreringarna och blandningsförhållandet redovisas i tabell 1.

Tabell 1. Dygnslöde av avloppsvatten vid provtagningspunkten; utlopp från sedimenteringsdamm, samt blandningsförhållande av dygnspröver i blandprov.

Datum	6/6	7/6	8/6	9/6	10/6	11/6	12/6
Flöde m <sup>3</sup> /d	320	368	414	455	376	229	200
Blandningsförhållande %	13.6	15.6	17.5	19.3	15.9	9.7	8.5

Variationerna i flöde kan delvis bero på nederbörd, eftersom avrinning från invallade ytor ingår i avloppsmängden. Bolaget har emellertid en viss framförhållning vad gäller nivån i uppehållsbassängen, med avseende på förväntad nederbörd; om man väntar nederbörd försöker man tömma uppehållsbassängerna dagarna innan, vilket leder till ökad utsläppsvolym. Efterrinning sker under ett par dygn. Nederbörden dagarna före och under provtagningen redovisas i tabell 2.

Tabell 2. Nederbörd registrerad vid observationsstationen Lilla Komperöd mellan 3 och 12 juni 1990. Avläsningen av nederbördsmängd sker kl 7<sup>00</sup>.

Datum	3/6	4/6	5/6	6/6	7/6	8/6	9/6	10/6	11/6	12/6
mm	1.7	0	2.4	0	3.0	14.9	0	0	0	0

#### 1.4. Test-och analysprogram

Programmet för karakteriseringen är upplagt efter Statens Naturvårdsverks "STORK-projekt" (Bengtsson och medarb. 1990). I korthet går undersökningen ut på att avloppsvattnet karakteriseras med hjälp av kemiska analyser och biologiska tester. Vid de biologiska testerna undersöks avloppsvattnets giftverkan på olika vattenlevande organismer (toxicitetstester), och den mikrobiella nedbrytbarheten av organiska ämnen i avloppsvattnet.

Programmets uppläggning framgår av figur 1.

I dygnspröverna undersöktes giftverkan på bakterien *Photobacterium phosphoreum* med Microtox-test. Dessutom bestämdes prövernans elektrolytiska ledningsförmåga, pH-värde samt innehållet av totalt och löst organisk kol (TOC, DOC).

Den kemiska karakteriseringen av veckoblandprovet omfattade följande parametrar:

Kemisk syreförbrukning	COD	NS 4748, (SS 028142)
Biokemisk syreförbrukning	BOD <sub>7</sub>	NS 4749, (SS 028143)
Totalt organiskt kol	TOC	Standard methods 505
Löst organiskt kol	DOC	Standard methods 505
Mineralolja	-	Se appendix 1
Olja		SS 028145
Extraherbart organiskt halogen	EOX	Se appendix 13
Priority pollutants	-	SI, Se appendix 2
Kjeldal-kväve	N	Standard methods
Ammonium	NH <sub>4</sub> -N	NS 4745, SIS 028134
Organiskt fosfor	P	NS 4724, 4725 (SIS 028126-028127)
pH	-	NS 4720 (SS 028122)
Ledningsförmåga	-	NS4721 (SS 028123)
Suspenderat material	-	NS 4733 (SS028112)

Avloppsvattnets innehåll av potentiellt bioackumulerbara organiska ämnen undersöktes med hjälp av en tunnslikt-kromatografisk metod genom fraktionering och kvantifiering av lipofila komponenter.

Mutageniciteten undersöktes med Ames test, med bakteriestammarna TA 98 och TA 100, med och utan tillsats av leverenzym S9.

Avloppsvattnets giftverkan undersöktes med 7 toxicitetstester:

Organism	parameter	metod
Heterotrofa mikroorganismer (aktivt slam)	EC <sub>50</sub> hämning av syreförbrukning	ISO 8192
Photobacterium phosphoreum	EC <sub>50</sub> hämning av ljusprod.	Microtox
Selenastrum capricornutum	EC <sub>50</sub> hämning av växt	ISO
Marina alger	EC <sub>0</sub> , EC <sub>100</sub> hämning av växt	Blanck & Björnsäter 1989
Nitocra spinipes	LC <sub>50</sub>	DS -F 88/225
Nitocra spinipes	EC <sub>50</sub> , reproduktion	VKI
Storspigg	LC <sub>50</sub>	SS 28162

Bionedbrytning av organiska ämnen i avloppsvattnet undersöktes enligt ISO 7827 "Water quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)". Testen utfördes i 82% koncentration av avloppsvatten tillsatt standard lösningar av näringssalter och fosfatbuffer. Testtemperaturen var 20 °C .

Parallellt med denna nedbrytbarhetstest gjordes en test efter spädning av avloppsvattnet 1:1 (50%) i respirometer (ISO 9408 " Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds"), med daglig registrering av syreförbrukningen. Denna test utfördes för att följa utvecklingen av BOD över tid. Testen gjordes vid 20 °C.



En tredje nedbrytbarhetstest utfördes efter spädning till 50% koncentration i saltvatten efter en modifierad version av ISO 7827. Saltvattentesten gjordes vid temperaturen 4-5 °C. Det gjordes också en respirometrisk test i saltvatten vid samma temperatur efter en modifierad ISO 9408 metod).

Efter nedbrytningen upprepades delar av den kemiska karakteriseringen och toxicitetstesterna (utom testen med aktivt slam) av den persistenta fraktionen från nedbrytbarhetstesten ISO 7827 (20 °C, sötvattentest).

#### Dygnprover

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---

Microtox, TOC, DOC, pH

#### Blandprov

Kemisk karakterisering  
Toxicitetstester  
Bioakkumulerbarhetstest  
Mutagenitetstest

Nedbrytbarhetstester

Kemisk karakterisering  
Toxicitetstester

Fig. 1. Skiss av program för karakteriseringen.

## 2. RESULTAT

### 2.1. Variationsstudie

Resultaten av analyserna av dygnsproverna redovisas i tabell 3.

Tabell 3. pH, totalt och löst organiskt kol (TOC, DOC) och EC<sub>50</sub> (15 min.) för Microtox i dygnprover.

\* anger att Microtox-värdet förkastats.

Datum:		6/6	7/6	8/6	9/6	10/6	11/6	12/6
pH		7.3	7.0	7.5	7.4	7.6	7.3	7.0
TOC	mg/l	50	42	33	47	32	57	42
DOC	mg/l	15	30	36	39	21	38	38
Microtox	EC <sub>50</sub> (%)	>100	>100	*	>100	>100	*	*

Dygnsprovernas innehåll av TOC varierade mellan 33 och 57 mg/l. För den lösta fraktionen (DOC) var variationen 15-38 mg/l. Andelen DOC av TOC var 30 - 90%.

Microtox-testen utfördes i 4 utspädningar från 12.5 - 100%. I de flesta proverna blev EC<sub>50</sub>-värdet (koncentrationen som gav 50% effekt) i Microtox beräkningsprogram bestämt till >100% koncentration. För några av proverna (8/6, 11/6 och 12/6) var dos/responsförloppet oregelbundet (t.ex. störst effekt vid intermediära koncentrationer) och de EC<sub>50</sub>-värden som beräknats av modellen måste förkastas. Detta är markerat med "\*" i tabell 3. Det är troligt att det verkliga EC<sub>50</sub>-värdet för samtliga dygnsprov var >100%.

### 2.2. Blandprov

#### 2.2.1. Kemisk karakterisering

Resultat av de kemiska analyserna av veckoblandprovet redovisas i tabell 4. I tabellen anges också i vilket appendix detaljerade uppgifter om de olika analyserna återfinns.

Avloppsvattnet hade ett neutralt pH-värde. Ledningsförmågan visar att innehållet av lösta salter är ganska högt (6-7 g/l). Enligt företaget utgörs salterna främst av natriumsulfat. Innehållet av totalt organiskt kol (TOC) var 32 g/l, vilket är något lägre än analyserna av dygnsproverna visade. Det samma gäller för löst organiskt kol (DOC). Vid genomgången av resultaten diskuterades om detta kan förklaras med skillnader i analysmetodik vid Neste Oxo (som analyserade dygnproven) och NIVA. Vid bägge laboratorierna används instrument från ASTRO, men olika modeller. Principerna för analysen är den samma (persulfat/UV-oxidation och IR-detektor). Resultaten bör därför vara jämförbara. En skillnad kan vara att Neste Oxos instrument är kalibrerat för ett högre koncentrationsområde än NIVAs. Vid motsvarande karakteriseringar av avloppsvatten från Statoil och Berol Nobel där också dygnsproverna analyserades vid Neste Oxos laboratorium visade resultaten från Statoils avloppsvatten samma bild som Neste Oxos, d.v.s. DOC-halterna i dygnproverna var högre än i veckoblandprovet. För Berol Nobel var emellertid resultaten i överensstämmelse. Detta tyder på att koncentrationen av DOC i Neste Oxos (och Statoils) avloppsvatten har sjunkit något i samband med lagring och transport. Orsaken kan tänkas vara nedbrytning innan infrysningen eller avdunstning av flyktiga komponenter. För DOC kan också ändringar ha skett genom att mängden suspenderat material påverkas vid frysning.

Mineralolja kunde inte påvisas vid GC-analysen, medan IR-metoden visade 6.3 mg/l totalt extraherbara ämnen, dock inga opolära kolväteföreningar.

Det konstaterades spår av extraherbart organiskt halogen (EOX). Det kan nämnas att företaget under 1989 har utfört fem analyser med avseende på AOX. Dessa visade från 10-53 µg/l, med medelvärdet 26 µg/l (Analyser utförda av KM-laboratorierna).

Av gruppen "priority pollutants" påvisades 57 µg/l di-2etylhexylftalat, 11 µg/l p-nonylfenol samt spår av metylnaftalener.

Innehållet av kväveföreningar var högt i förhållande till kolinnehållet (ca. 150 mg/l). Innehållet av organiskt bundet kväve var 6 mg/l. Fosforinnehållet uppgick till 4 mg/l, varav ca. 95% i form av fosfat.

Tabell 4. Resultat av kemisk karakterisering av avloppsvatten före och efter 28 dygns nedbrytbarhetstest. Värderna efter nedbrytning har korrigerats för utspädning vid nedbrytbarhetstesten.

Parameter	enhet	före nedbrytn.	efter nedbrytn.	Reduktion %	Appendix
Ledningsförmåga	mS/m	1098	-		
pH		7.22	-		
Suspenderat material	mg/l	64.8	-		
COD	mg O/l	95	85	10	
BOD	mg O/l	14	<2.35	>80	
TOC	mg/l	32	22	30	
DOC	mg/l	25	22	12	
Mineralolja	mg/l	i.p.	i.p.		App. 1
Olja, totalt extraherbart	mg/l	6.3	2.2	65	
Olja, opolära kolväten	mg/l	<0.1	0.5		
EOX	mg/l	<0.02	i.p.		
Kjeldal-N	mg N/l	52	-		
NH <sub>4</sub>	mg N/l	46			
NO <sub>3</sub>	mg N/l	105	-		
Tot. P	mg P/l	4	-		
PO <sub>4</sub>	mg P/l	3.8	-		
p-nonylfenol	µg/l	10.8	-		App. 2
di-(2-etylhexyl)ftalat	µg/l	56.9	-		App. 2
1 och 2-metylnaftalen	µg/l	<1	-		App. 2

### 2.2.2. Bioackumulerbarhetspotential

Bioackumuleringspotentialen blev undersökt i ett surt och ett basiskt extrakt av avloppsvatten. Innehållet av kromatograferbara ämnen i de två extrakten före och efter fraktionering med tunnskiktskromatografi visas i tabell 5. GC-kromatogrammen för de olika fraktionerna visas i appendix 3. Som potentiellt bioackumulerbara räknas ämnen med fördelningskoefficient oktanol/vatten ( $P_{ow}$ )  $>10^3$ . Testen visade att det sura extraktet innehöll 1.8 mg/l av ämnen med  $P_{ow}>10^5$  och 1.9 mg/l med  $P_{ow}$  mellan  $10^3$  och  $10^5$ . GC-kromatogrammet av det sura extraktet visar en extremt samlad topp i kokpunktsintervallet 130-170 °C. På grund

av att potentiellt bioackumulerbara ämnen konstaterades beslöts att också vattnet efter nedbrytning skulle testas. Samtidigt testades avloppsvatten från oktanolanläggningen uttaget efter destillationen. Resultaten av dessa tester redovisas i tabell 5.

Avloppsvattenextraktet efter nedbrytning innehöll mer organiska substanser än före nedbrytning. Detta kan förklaras med att kromatograferbara ämnen bildats vid nedbrytningen. Också fraktionen med  $P_{OW}$  mellan  $10^3$  och  $10^5$  ökade vid nedbrytning medan det inte kunde påvisas ämnen med  $P_{OW} > 10^5$  efter nedbrytning.

Provet från oktanolprocessen, efter destillation innehöll ganska stora mängder potentiellt bioakkumulerbart material, särskilt i fraktionen med  $P_{OW}$  mellan  $10^3$  och  $10^5$ , (23 mg/l).

Tabell 5. Innehåll av kromatograferbara ämnen (mg/l) i avloppsvatten före och efter nedbrytning, samt avloppsvatten från oktanolanläggning. Fraktion II och III är fraktioner med fördelningskoefficient oktanol vatten ( $P_{OW}$ )  $> 10^5$  resp.  $10^3$ - $10^5$ . Värdena efter nedbrytning har korrigerats för utspädning vid nedbrytbarhetstesten (1.2 ggr.). i.p.=icke påvisat.

Avloppsvatten	Extrakt	Före fraktionering	Applikationszon	Fraktion II $P_{OW} > 10^5$	Fraktion III $P_{OW} = 10^3$ - $10^5$
Före nedbrytning	Surt	3.8	i.p.	1.8	1.9
Före nedbrytning	Basiskt	0.04	i.p.	i.p.	i.p.
Efter nedbrytning	Surt	5.9	i.p.	i.p.	2.6
Oktanolanläggning	Surt	124	i.p.	0.4	23

### 2.2.3. Toxicitet

Resultaten av toxicitetstesterna har sammanfattats i tabell 6. I tabellen anges också i vilket appendix testrapporterna kan återfinnas. För de heterotrofa mikroorganismerna i aktivt slam och bakterien *Photobacterium phosphoreum* (Microtox) kunde en svag hämning påvisas vid höga koncentrationer, men  $EC_{50}$ -värdet för bägge testerna var  $> 100\%$ . I aktivt slam-testen reducerades syreförbrukningen med ca 25% vid avloppsvattenkoncentrationen 90%. En screeningtest med full avloppsvattenkoncentration gav 34% hämning i Microtox-testen.

Växten av sötvattensalgen *Selenastrum capricornutum* påverkades negativt av koncentrationer över ca. 5% (se fig. 2.).  $EC_{50}$ -värdet för växthastighet var 15% och  $EC_{10}$ -värdet 4.8%. För area under växtkurvan, som är en annan responsparameter, som bestäms vid samma test, var  $EC_{50}$ -värdet 6%.

Testen med de åtta marina algerna visade  $EC_0$ -värden från 2.5-20% efter 5 dagars inkubering. Den mest känsliga arten var kalkflagellaten *Emiliana huxleyi*. För de flesta arterna ökade  $EC$ -värdena med tiden och efter 12 dygn kunde växt registreras i den högsta testkoncentrationen (40%) för alla alger utom *E. huxleyi*. Det betyder att de övriga algerna hade förmågan att anpassa sig till avloppsvattnet, eller att gifteffekten minskade med tiden.

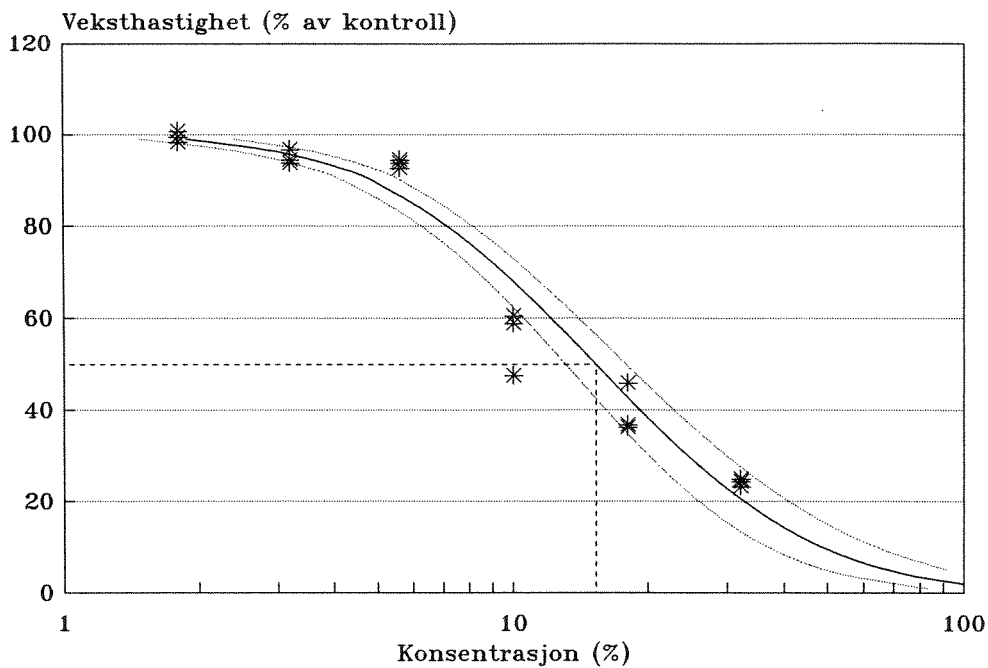
I akut-testen med *Nitocra spinipes* registrerades en klar ökning av dödligheten vid koncentrationer över ca. 30%.  $LC_{50}$ -värdet vid 4 dygns exponering bestämdes till 60%.

Reproduktionen påverkades av koncentrationer över ca. 10%, och EC<sub>50</sub>-värdet för antal unga individer som producerats pr. vuxen hona vid 14 dygns exponering var 16% (se fig. 3).

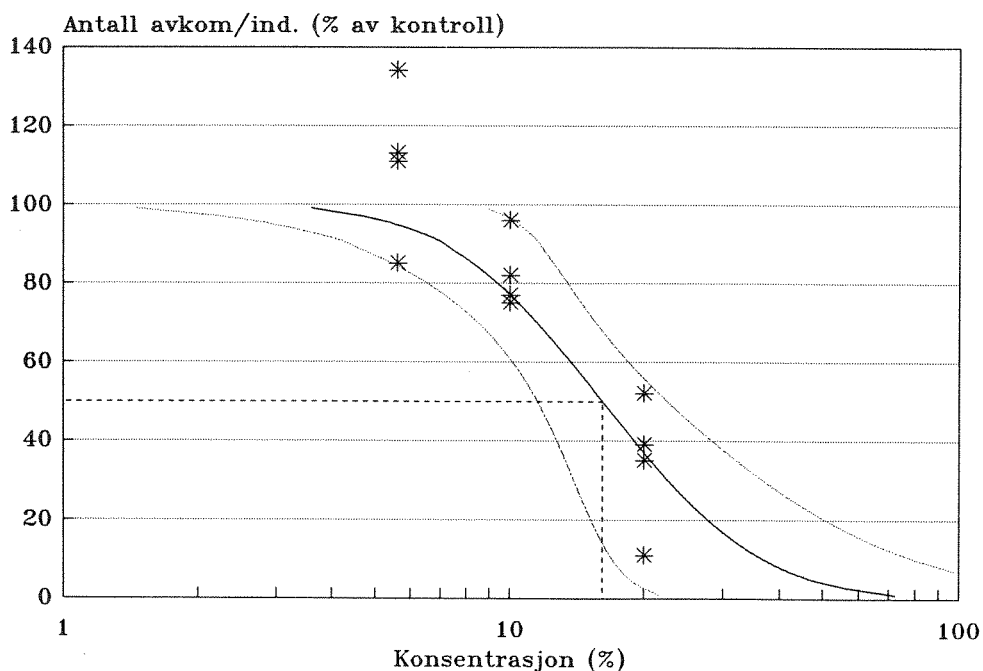
För storspigg registrerades ca. 80% dödlighet efter 3 dygn i full koncentration av avloppsvatten. LC<sub>50</sub>-värdet efter 48 timmar bestämdes till 48% och efter 72 timmar till 34%. EC<sub>50</sub>-värdet för passivitet hos testfisken uppskattades till 35%.

Tabell 6. Toxicitet i avloppsvatten före och efter nedbrytbarhetstest. (EC- och LC-värden angivet som % avloppsvatten). EC-och LC värden efter nedbrytning har korrigerats för utspädning vid nedbrytbarhetstesten.

Test	respons	före nedbr.	efter nedbr.	Appendix
Aktiv slam	EC <sub>50</sub> , syrekonsumtion	>100	-	App. 4
Aktiv slam	EC <sub>20</sub> , syrekonsumtion	85		App. 4
Microtox	EC <sub>50</sub> , ljusprod. 15 min.	>100	>100	App. 5
Microtox	EC <sub>20</sub> , ljusprod. 15 min.	<30%	-	
Selenastrum	EC <sub>50</sub> , växthastighet 72 tim.	15	21	App. 6
Selenastrum	EC <sub>20</sub> , växthastighet 72 tim.	7	10	App. 6
Selenastrum	NOEC, växthastighet	1.8	<8.2	App. 6
Selenastrum	EC <sub>50</sub> , areal under växtkurva	6	6.6	App. 6
Marina alger	EC <sub>0</sub> , växt (medelvärde) 5 d.	7.4	2.8	App. 7
Marina alger	EC <sub>0</sub> ,växt (lägsta värde) 5 d.	2.5	1.0	App. 7
Marina alger	EC <sub>100</sub> , växt (medelvärde)	49	44	App. 7
Marina alger	EC <sub>100</sub> ,växt (lägsta värde)	5	17	App. 7
Nitocra spinipes	LC <sub>50</sub> (96 timmar)	60	21	App. 8
Nitocra spinipes	LC <sub>20</sub> (96 timmar)	16	12	App. 8
Nitocra spinipes	EC <sub>50</sub> , reproduktion	16	17	App. 9
Nitocra spinipes	EC <sub>20</sub> , reproduktion	9	10	App. 9
Storspigg	LC <sub>50</sub> (48 timmar)	48	58	App. 10
Storspigg	LC <sub>20</sub> (48 timmar)	16	20	App. 10
Storspigg	LC <sub>50</sub> (72 timmar)	34	-	App. 10
Storspigg	LC <sub>20</sub> (72 timmar)	14	-	App. 10
Storspigg	NOEC (passivitet)	10	-	App. 10



Figur 2. Effekt av avloppsvattnet på växthastigheten hos *Selenastrum capricornutum*. 100% växthastighet=væksthastighet i kontrollkulturer. Prickade linjer=95% konfidensintervall för responskurvan (Probit-analys). Streckad linje anger 50% respons ( $EC_{50}$ )



Figur 3. Effekt av avloppsvattnet på reproduktion hos *Nitocra spinipes*. Streckade linjer anger 95% konfidensintervall runt responskurvan, som beräknats genom probit-analys.

#### 2.2.4. Mutagenitet

Ames test utförd på avloppsvattnet visade inga mutagena effekter. Låga doser av avloppsvattenextraktet (5-20 µl) gav varken dosrespons eller en fördubbling av antal kolonier i förhållande till blindprovet. Högre doser på 50-100 µl visade toxiska effekter på bakterierna genom att man antingen fick en minskning av antalet kolonier i förhållande till blindprovet, eventuellt att inga kolonier växte upp. (Se appendix 11).

#### 2.2.5. Nedbrytbarhet

Nedbrytbarhetstesterna är redovisade i appendix 12. Huvudtesten för nedbrytbarhet vid 20 °C visade ett långsamt nedbrytningsförlopp. DOC-koncentrationen i provlösningen och i ett blindprov med samma mikroorganism-ymp visas i tabell 7.

Tabell 7. Löst organiskt kol (DOC) i nedbrytbarhetstesten vid 20 °C.

Dag nr:	0	4	7	14	21	28
82% Avloppsv.	28.6	27.5	22.5	21.7	21	19.8
Blindprov	0.4		0.4	0.3		0.3
Korrigerat DOC	28.2	27.1	22.1	21.4	20.7	18.9
DOC-reduktion (%)	0	4	22	24	27	33

Reduktionen av DOC var 22% efter en vecka, men ökade därefter mycket långsamt till 33% efter 4 veckor. (Se fig. 4). Testen i respirometer, där också syreförbrukningen registrerades visar samma utveckling. (Se fig. 5). Bio-oxidationen mätt som BOD är emellertid osäker p.g.a. vattnets höga innehåll av ammonium. Nitrifikation kan ha bidragit till syreförbrukningen. DOC-analyser vid respirometerstesten visade lägre reduktion (20%) än i huvudtesten. I detta fallet analyserades inte DOC i blindprovet, men bidraget från ympen utgör högst ca. 2% av DOC-innehållet i provet vid start och påverkar inte den beräknade DOC-reduktionen signifikant.

I saltvattenstesterna av nedbrytbarhet som gjordes vid 4-5 °C uppmättes reduktionen i DOC under 4 veckor till endast 0-3.5%. På grund av hög detektionsgräns i saltvatten är det inte utfört korrektion för DOC i blindprov. Normalt ligger DOC-värdena i blindprovet mellan 1 och 2 mg/l, vilket är 7-14% av DOC i avloppsvattenlösningen. Trots att ingen signifikant reduktion av DOC registrerades var syreförbrukningen omräknat till full avloppsvattenkoncentration totalt ca. 30 mg O/l (BOD<sub>28</sub>). Orsaken till denna syreförbrukning är troligtvis avloppsvattnets höga innehåll av ammonium som oxiderats under nedbrytbarhetstesten (nitrifikation).

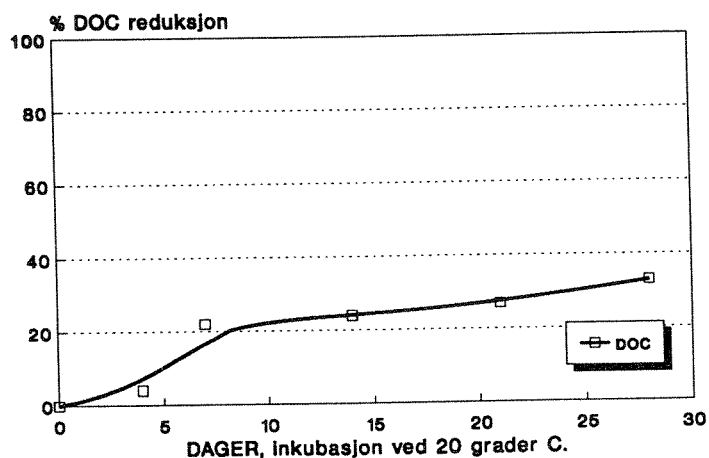


Fig. 4. Koncentrationer av DOC mått ved nedbrytbarhetstest ved 20 °C.

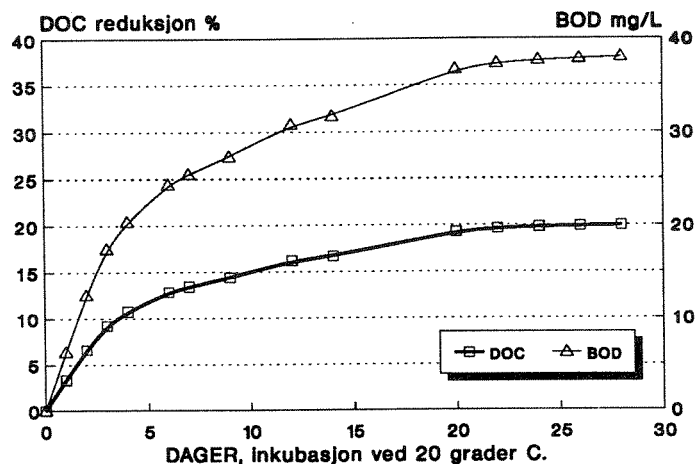


Fig. 5. Syreförbrukning vid nedbrytbarhetstest vid 20°C. Den undre kurvan indikerar DOC- förlopp på basis av syreförbrukning.

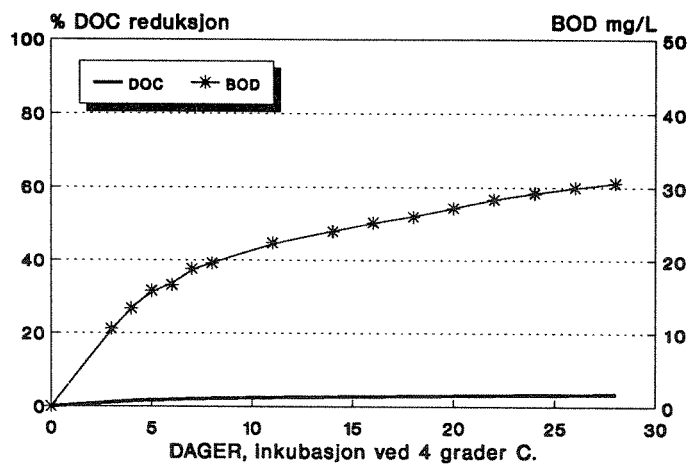


Fig. 6. Syreförbrukning och DOC reduktion i respirometrisk nedbrytbarhetstest i saltvatten vid temperaturen 4 °C.

#### 2.2.6. Kemisk karakterisering efter nedbrytning

Resultaten av de kemiska analyserna, som utfördes på avloppsvattnet efter nedbrytning, redovisas i tabell 4. Den kemiska syreförbrukningen (COD) var 85 mg/l, vilket är 11% lägre än innan nedbrytning. Reduktionen av COD är alltså lägre än reduktionen av DOC vid nedbrytbarhetstesten (33%) Detta kan bero på att icke-organiska föreningar eller suspenderat material bidrar till den kemiska syreförbrukningen. För TOC är reduktionen något större (ca. 40%), men analysen av TOC är mer osäker p.g.a. ofullständig oxidering av partikulärt material. Den biokemiska syreförbrukningen (BOD) var som väntat mycket låg efter nedbrytbarhetstesten.



Innehållet av EOX, som var lågt men kunde påvisas i avloppsvattnet innan nedbrytning, kunde inte påvisas efter nedbrytbarhetstesten.

Mängden totalt extraherbart kolväte efter nedbrytning var 2.2 mg/l d.v.s. en reduktion med 65%. Emellertid var andelen opolära kolväten 0.5 mg/l, vilket är mer än analysen före nedbrytning visade. Oljeanalyserna utfördes på prover som lagrats frysta i 10-11 månader och provet av avloppsvatten efter nedbrytning var lagrat i plastflaska medan analysmetoden föreskriver glasflaskor. Detta kan vara förklaringen till att opolära kolväten påvisades.

### 2.2.7. Toxicitet efter nedbrytning

Resultaten av toxicitetstesterna efter nedbrytbarhetstesten redovisas i tabell 6. Bionedbrytningen medförde en något minskad toxicitet i några av testerna, och ökad toxicitet i andra. Ändringen i toxicitet var överlag ganska liten. Effekten på Microtox var för svag för att tillåta bestämning av EC<sub>50</sub>-värdet. En screening-test vid full koncentration (d.v.s. 82 % koncentration när man tar hänsyn till utspädningen vid nedbrytbarhetstesten) gav 31% hämning, vilket är ungefär det samma som före nedbrytning.

För sötvattensalgen *Selenastrum capricornutum* var EC<sub>50</sub>-värdet för hämning av växthastigheten 21%, vilket är 1.4 ggr. högre än före nedbrytning. För den andra responsparametern som bestämdes vid testen, area under växtkurvan, var ändringen i toxicitet inte signifikant.

EC<sub>0</sub>-värdena för marina alger var lägre efter nedbrytning än före. Detta skulle tyda på att giftigheten ökat vid bionedbrytningen. Några av EC<sub>100</sub>-värdena visar emellertid en motsatt tendens, vilket betyder att responskurvorna har ett flackare förlopp efter nedbrytning.

Den akuta toxiciteten på kräftdjuret *Nitocra spinipes* var också högre efter nedbrytning (LC<sub>50</sub> = 21%). I reproduktionstesten var effekten däremot oförändrad (EC<sub>50</sub> = 17%). Effekter på reproduktionen uppträder alltså först vid koncentrationer i närheten av LC<sub>50</sub>-värdet, vilket är anmärkningsvärt. Samma förhållande påpekades vid undersökningarna som utfördes i samband med MUST-utredningen 1983. (Granmo 1984).

Toxicitetstesterna med storspigg visade samma LC<sub>50</sub>-värde efter nedbrytning som före (ca. 50%), när man tar hänsyn till utspädningen vid nedbrytbarhetstesten.

## 3. KOMMENTARER

I det utgående avloppsvattnet från Neste Oxo i Stenungsund är innehållet av organiskt material av samma storleksordning som i kemiskt renat kommunalt avloppsvatten. Den biologiska nedbrytbarheten av detta är emellertid låg, särskilt vid låga temperaturer i saltvatten. Den relativt stora andelen persistent eller svårnedbrytbart material är ett resultat av att den lätt nedbrytbara organiska fraktionen till största delen har omsatts i det biologiska reningssteget. Resultaten av nedbrytbarhetstesterna överensstämmer med vad som rapporterades vid den tidigare "MUST"-utredningen (Granmo 1986). Också vid undersökningen 1983 konstaterades således obetydlig nedbrytning vid +4 °C.

De specifika analyserna av organiska ämnen förklarar bara en liten del av det totala organiska materialet. Det blev funnet spår av extraherbart organiskt bundet halogen, metyl- och dimetylnaftalener samt c.a. 11 µg/l av p-nonylfenol. Innehållet av di2-etylhexylftalat var 57 µg/l. Denna förening blev också funnen vid "MUST"-undersökningen 1983, men då i betydligt högre koncentration (1430 µg/l). Denna stora förändring beror troligen på att bolaget har installerat ett sandfilter, som eventuellt filtrerar bort en stor del av ämnet.

Innehållet av kväveföreningar är högt, medan fosforinnehållet är jämförelsevis lågt. Kväveutsläppet motsvarar ca. 4000 personekvivalenter i kommunalt avloppsvatten.

Gifteffekter på alger kunde påvisas vid koncentrationer över ca. 3%. För övriga testade organismer var toxiciteten lägre. Koncentrationer omkring 50-60% orsakade 50% dödlighet hos storspigg och kräftdjuret *Nitocra spinipes*. Mikrobiell nedbrytning i fyra veckors nedbrytbarhetstest gav ingen entydig reduktion av avloppsvattnets toxicitet. Den marina algtesten och akut-testen med *Nitocra* visade t.o.m. högre giftighet efter nedbrytning. Detta tyder på att de ämnen som förorsakar gifteffekten till en stor del är persistenta, och eventuellt att nya toxiska komponenter tillkommer vid nedbrytning.

Jämfört med de toxicitetstester som utfördes vid MUST-utredningen var både akut och kronisk giftighet på *Nitocra* lägre vid denna undersökning. Testen med Storspigg och flera av de marina algerna tyder emellertid på en något ökad toxicitet.

Utspädning av avloppsvattnet i recipienten kommer snabbt att reducera koncentrationen under den nivå som ger gifteffekter vid korttidsexponering. Eftersom de toxiska komponenterna inte är identifierade och till största delen persistenta och dessutom att potentiellt bioakkumulerbara ämnen har konstaterats, kan emellertid miljöeffekter inte utslutas.

#### 4. REFERANSER

Bengtsson, B.E., Björklund, I. och Wahlberg, C. (1990): Effluents from the Chemical Industry - Programme for characterization of persistence and effect (The STORK project). Version 4 (1990-03-08). Statens Naturvårdsverk.

Blanck, H. and Björnsäter, B. (1989): The algal microtest battery - A manual for routine tests of growth inhibition. KEMI report 3/89.

Granmo, Å. (1984): Delprojekt vatten. Översiktsplan samt biologiska tester av industriavloppsvatten från Stenungsund. Naturvårdsverket, Rapport SNV PM 1845

Granmo, Å. (1986): Delprojekt vatten. Slutrapport, MUST, Miljøutredningen för Stenungsund. Rapport nr. 36. Statens Naturvårdsverk Rapport 3200.

Hovind, H. (1990): Bestemmelse av organisk stoff i avløpsvann. NIVA Rapport 2386.

## APPENDIX 1

### Analyser av mineralolja

## Mineralolje

### Analysemetode

Ved mottak ble prøvene surgjort til pH 1 med svovelsyre og oppbevart ved 4 °C inntil de ble analysert.

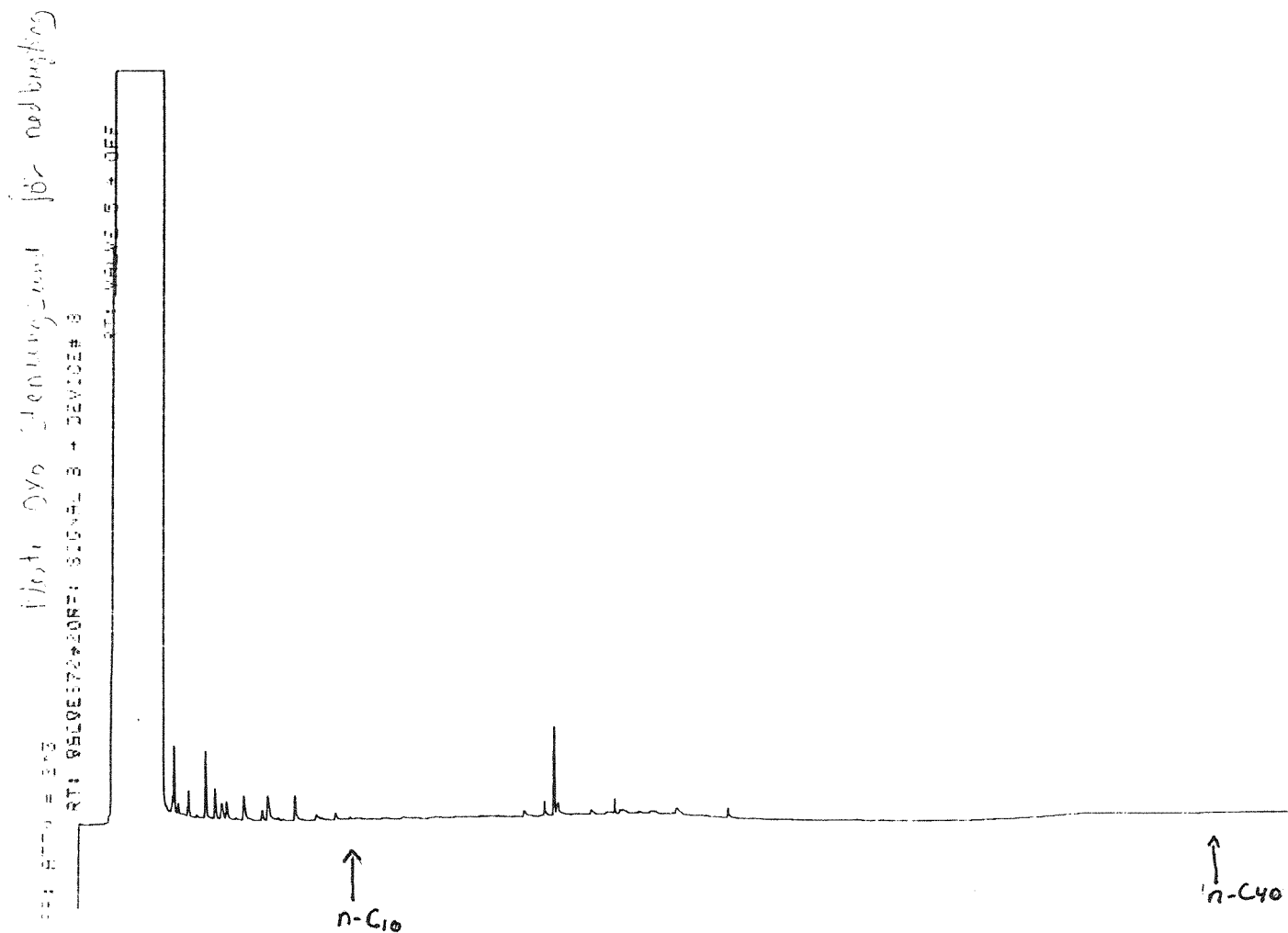
Prøvene ble ekstrahert med diklormetan. Prøveekstraktene ble rensert på en silica kolonne (Bond elut) for å fjerne polare forbindelser, før de ble analysert med gasskromatografi (GC). Denne teknikken gir opplysning om fordeling av ulike komponenter i prøven som funksjon av kokepunkt. Dette vil gi opplysning om hvilken oljetype prøven består av (mønstergjennkjenning). Dersom gasskromatogrammet ikke viser en kjent oljeprofil, vil det være nødvendig med gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) analyse for å fastslå hvilke forbindelser en prøve består av.

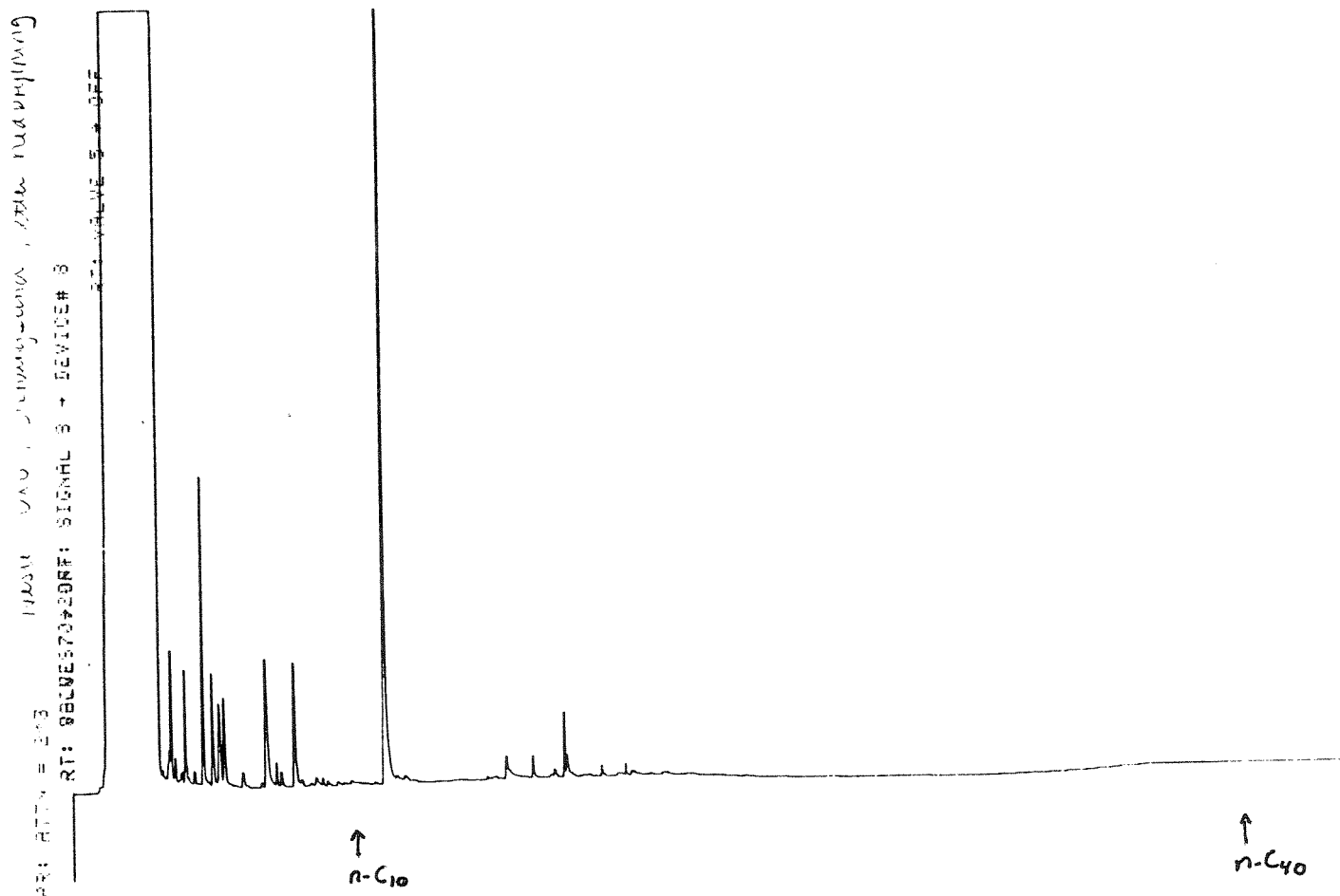
Som blindprøve ble 2 l springvann ekstrahert og opparbeidet nøyaktig som de øvrige prøvene.

### Resultat

Det ble ikke påvist hydrokarboner i avløpsvannet før og etter nedbrytning. Påvisningsgrensen for denne analysen er satt til 0.05 mg/l.

Kromatogrammene for prøvene før og etter nedbrytning er vedlagt.

**Figur 3****Neste Oxo, Stenungsund för nedbryting****Prøvevolum: 2017 ml****Ekstraktvolum: 1 ml****Mengde hydrokarboner: < 0.05 ppm**

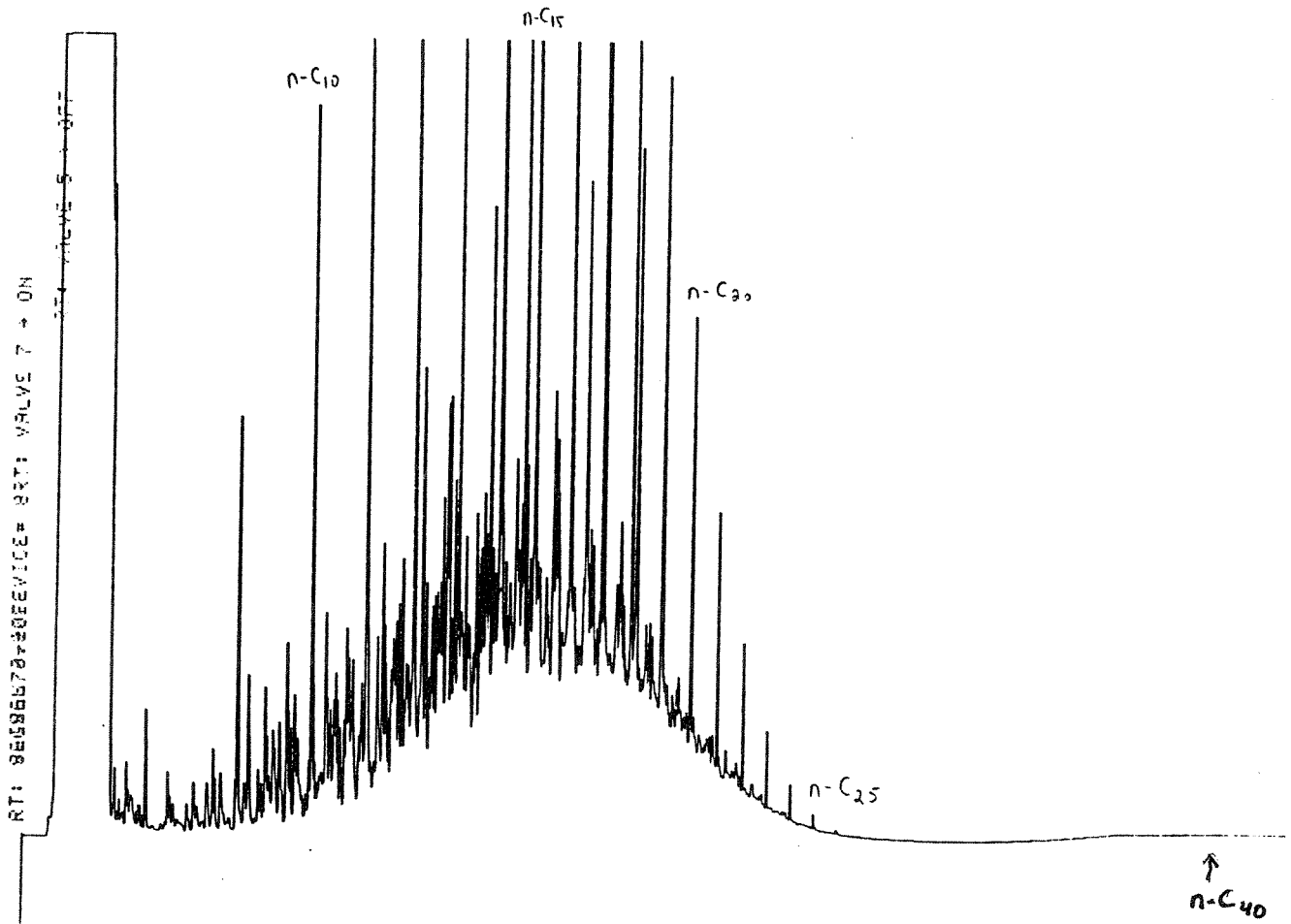
**Figur 4**

**Neste Oxo, Stenungsund etter nedbryting**

**Prøvevolum: 1983 ml**

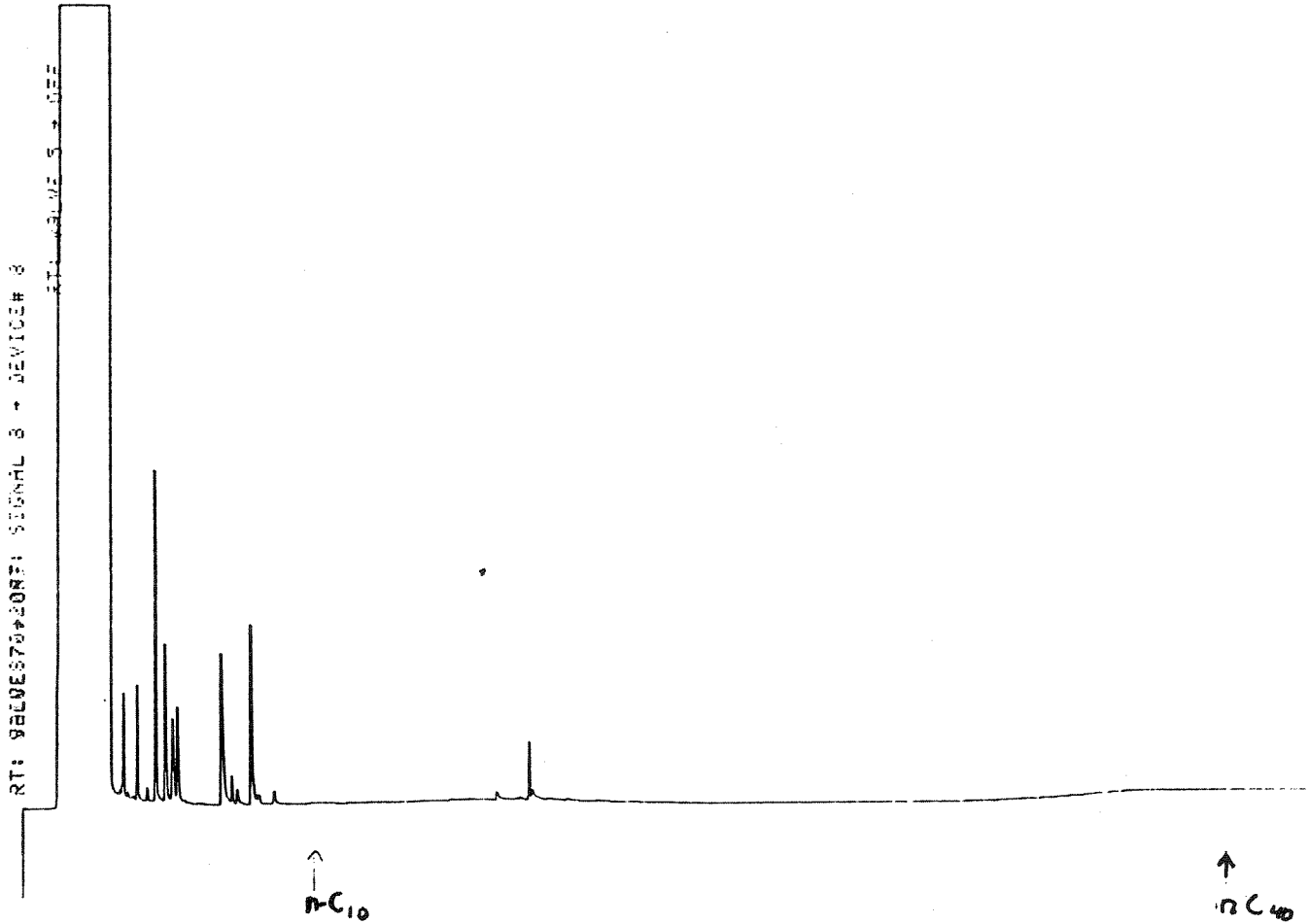
**Ekstraktvolum: 1 ml**

**Mengde hydrokarboner: < 0.05 ppm**



Figur 12

Standard marin diesel

**Figur 11****Blindprøve, springvann****Prøvevolum: 2000ml****Ekstraktvolum: 1 ml****Mengde hydrokerverner:  $\leq 0.05$  ppm**



## APPENDIX 2

### Priority pollutants

900802 v/Bent Holstøl, SI.

## RAPPORT

Deres ref.	Deres henv. av	SI's saksbehandler HVD/kmh	Dato 19.09.90
Oppdragets tittel <b>AVLØPSVANN</b> <b>ANALYSE AV "PRIORITY POLLUTANTS" I TO PRØVER</b>			Oppdrag nr <b>442-1054</b>

Vi mottok to vannprøver for analyse av "Priority Pollutants". Prøvene var merket:

- |             |              |                       |
|-------------|--------------|-----------------------|
| 1) Ukeprøve | NESTE OXO,   | Stenungsund. 900618-1 |
| 2) Ukeprøve | BEROL NOBEL, | Stenungsund. 900618-1 |

## RESULTAT

Tabellene 1 og 2 viser innholdet av "Priority Pollutants" komponenter i de to prøvene. I prøve 1 ble bare p-nonylfenol og di-(2-etylheksyl)ftalat påvist i kvantifiserbare mengder.

Prøve 2 inneholder i tillegg dioksan, fenol og antagelig benzenmetanol. Benzenmetanol er ikke med i Priority Pollutants listen, men forbindelsen har et massepektrum som er svært likt spektret av kresoler.

Forbindelser som står oppført under gruppen fenoler, var vanskelig å analysere i disse to prøvene. Årsaken er interferens mellom tilsatt intern standard, deuterert fenol, og andre forbindelser i prøven.

Kvantifiseringsgrenser og metodebeskrivelser er også vedlagt.

→ Med vennlig hilsen  
Senter for industriforskning

Nina Gjør

*Hilde Drangsholt*  
Hilde Drangsholt

Kopi gitt Bent Holstøl, SI.

Tabell 1: "Priority Pollutants" i avløpsvann fra NESTE OXO, Stenungsund  
900618-1

MONO- OG BICYKLISKE AROMATER: UG/L

Benzen	
Toluen	
Etylbenzen	
m-/p-Xylen	
o-Xylen	
Styren	
Naftalen . . . . .	*
2-Metylnaftalen . . . . .	*
1-Metylnaftalen . . . . .	*
2,3-Dimetylnaftalen	
2,3,5-Trimetylnaftalen	
Bifenyl	

POLYCYKLISKE AROMATISKE HYDROKARBONER:

Dibenzofuran
Fenantren
Dibenzotiofen
Pyren
Fluoranten
Benzo(b)fluoren
Benzo(a)antracen
Krysen/Trifenylen
Benzo(e)pyren
Benzo(a)pyren
Indeno(1,2,3-c,d)pyren
Benzo(ghi)perylen
Benzo(b/j/k)fluoranten

KLORERTE AROMATER:

Klorbenzen
1,3-Diklorbenzen
1,4-Diklorbenzen
1,2-Diklorbenzen
1,2,4-Triklorbenzen
Pentaklorbenzen
Heksaklorbenzen
Oktaklorstyren
Tetraklorbifenyl
Pentaklorbifenyl
Heksaklorbifenyl
Diklor-p-cymen

## Tabell 1 (forts)

Prøve: Avløpsvann fra NESTE OXO, Stenungsund 900618-1

## FENOLER: UG/L VANN

Fenol	
o-Kresol	
m-/p-Kresol	
2-Nitrofenol	
p-Nonylfenol . . . . .	10.8
2,4,6-Triklorfenol	
Pentaklorfenol	
Tetraklorguajakol	

## PESTICIDER:

Lindan  
4,4'-DDE  
4,4'-DDD  
4,4'-DDT

## FTALATER/ADIPATER:

Dimetylftalat	
Dietylftalat	
Di-n-butylftalat	
Butylbenzylftalat	
Di-(2-etylheksyl)ftalat . . . . .	56.9
Di-(2-etylheksyl)adipat	

## FOSFAT-ESTERE:

Tri-n-butylfosfat  
Trifenylfosfat  
Triresylfosfat

## AROMATISKE NITROGEN-FORBINDELSER:

Nitrobenzen  
Difenylamin

## ETERE:

Dioksan

Tabell 1 (forts)

Prøve: Avløpsvann fra NESTE OXO, Stenungsund 900618-1

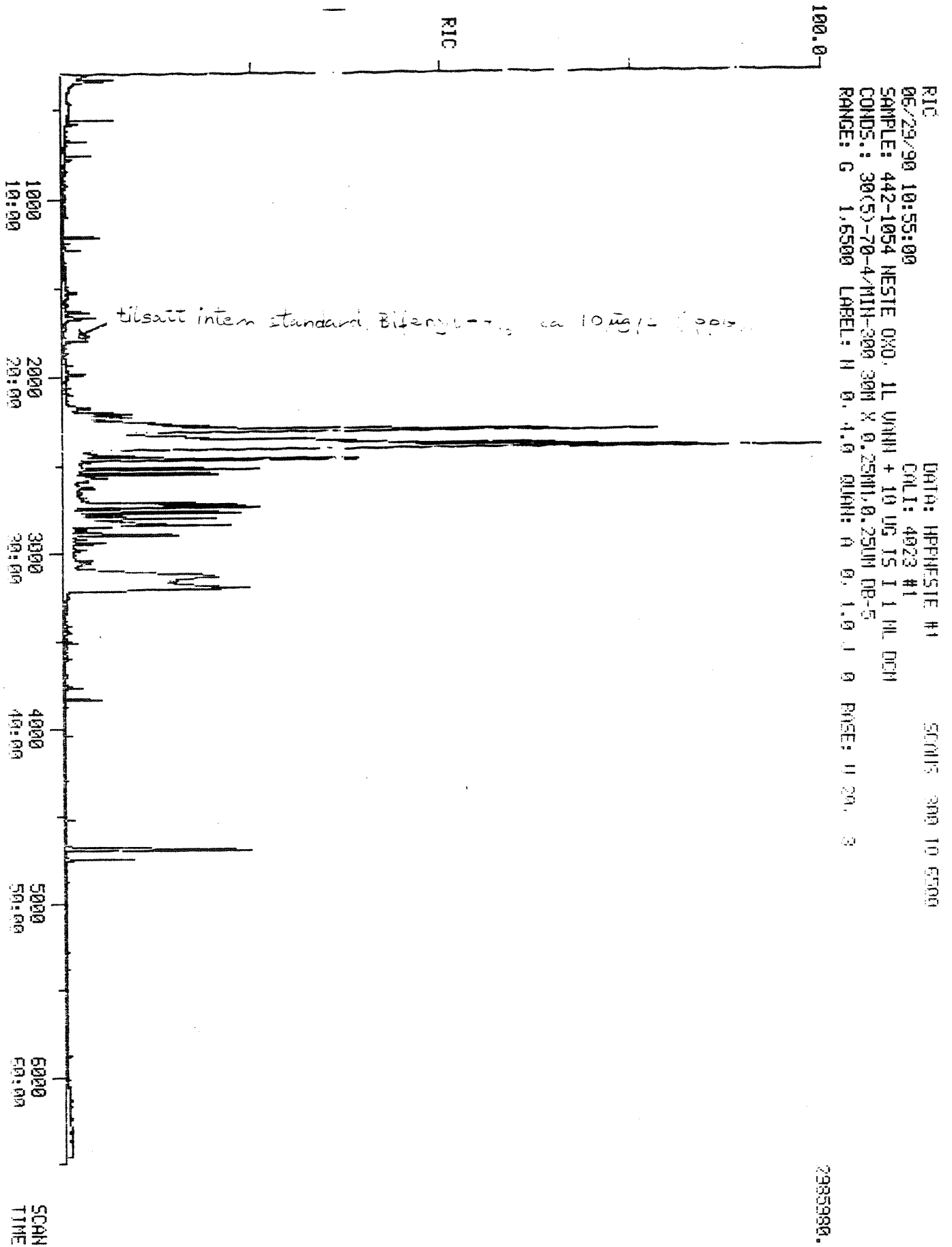
HALOGENERTE ALIFATER:

UG/L VANN

Kloroform  
Bromdiklormetan  
Dibromklormetan  
Bromoform  
Tetraklormetan  
Trikloretan  
1,1,1-Trikloretan  
1,1,2-Trikloretan  
Tetrakloretan  
Heksakloretan

\*: Mengden er mindre enn kvantifiserings-grensen,  
men arealet er minst 3.0 ganger større enn arealet i blind-prøven.  
!: Mengdene er over kvantifiseringsgrensen.

28  
Figur 1. GC/MS-kromatogram av avløpsvann fra NESTE OXO, Stenungsund.  
900618-1



Tabell 3: Kvantifiseringsgrenser

## ANALYSE AV PRIORITY POLLUTANTS

## KVANTIFISERINGS-GRENSER:

UG/L

## MONO- OG BICYKLISKE AROMATER:

BENZEN	10.00	-	100.
TOLUEN	10.00	-	100.
ETYLBENZEN	1.00	-	100.
M-/P-XYLEN	2.00	-	200.
O-XYLEN	1.00	-	100.
STYREN	1.00	-	100.
NAFTALEN	1.00	-	100.
2-METYLNAFTALEN	1.00	-	100.
1-METYLNAFTALEN	1.00	-	100.
2,3-DIMETYLNAFTALEN	1.00	-	100.
2,3,5-TRIMETYLNAFTALEN	1.00	-	100.
BIFENYL	1.00	-	100.

## POLYCYKLISKE AROMATISKE HYDROKARBONER:

DIBENZOFURAN	5.00	-	100.
FENANTREN	1.00	-	100.
DIBENZOTIOFEN	1.00	-	100.
PYREN	1.00	-	100.
FLUORANTEN	1.00	-	100.
BENZO (B) FLUOREN	5.00	-	100.
BENZO (A) ANTRACEN	5.00	-	100.
KRYSEN/TRIFENYLEN	5.00	-	100.
BENZO (E) PYREN	5.00	-	100.
BENZO (A) PYREN	5.00	-	100.
INDENO (1, 2, 3-C, D) PYREN	5.00	-	100.
BENZO (GHI) PERYLEN	5.00	-	100.
BENZO (B/J/K) FLUORANTEN	5.00	-	200.

## KLORERTE AROMATER:

KLORBENZEN	1.00	-	100.
1,3-DIKLORBENZEN	1.00	-	100.
1,4-DIKLORBENZEN	1.00	-	100.
1,2-DIKLORBENZEN	1.00	-	100.
1,2,4-TRIKLORBENZEN	1.00	-	100.
PENTAKLORBENZEN	1.00	-	100.
HEKSAKLORBENZEN	1.00	-	100.
OKTAKLORSTYREN	5.00	-	100.
TETRAKLORBIFENYL	5.00	-	500.
PENTAKLORBIFENYL	10.00	-	1000.
HEKSAKLORBIFENYL	5.00	-	500.
DIKLOR-P-CYMEN	5.00	-	100.

Tabell 3 (forts)

KVANTIFISERINGS-GRENSER: FENOLER:	UG/L		
FENOL	10.00	-	100.
O-KRESOL	10.00	-	100.
M-/P-KRESOL	20.00	-	200.
2-NITROFENOL	1.00	-	100.
P-NONYLFENOL	10.00	-	1000.
2, 4, 6-TRIKLORFENOL	1.00	-	100.
PENTAKLORFENOL	5.00	-	100.
TETRAKLORGUAJAKOL	5.00	-	100.
PESTICIDER:			
LINDAN	1.00	-	100.
4, 4' -DDE	1.00	-	100.
4, 4' -DDD	1.00	-	100.
4, 4' -DDT	1.00	-	100.
FTALATER/ADIPATER:			
DIMETYLF TALAT	1.00	-	100.
DIETYLF TALAT	1.00	-	100.
DI-N-BUTYLF TALAT	10.00	-	100.
BUTYLBENZYLF TALAT	1.00	-	100.
DI-(2-ETYLHEKSYL) FTALAT	10.00	-	100.
DI-(2-ETYLHEKSYL) ADIPAT	1.00	-	100.
FOSFAT-ESTERE:			
TRI-N-BUTYLFOSFAT	1.00	-	100.
TRIFENYLFOSFAT	1.00	-	100.
TRIKRESYLFOSFAT	5.00	-	100.
AROMATISKE NITROGEN-FORBINDELSER:			
NITROBENZEN	1.00	-	100.
DIFENYLAMIN	1.00	-	100.
ETERE:			
DIOKSAN	1.00	-	100.



Tabell 3 (forts)

KVANTIFISERINGS-GRENSER: HALOGENERTE ALIFATER:	UG/L
DIKLORMETAN	1.00 - 100
KLOROFORM	1.00 - 100
BROMDIKLORMETAN	1.00 - 100
DIBROMKLORMETAN	1.00 - 100
BROMOFORM	1.00 - 100
TETRAKLORMETAN	1.00 - 100
TRIKLORETEN	1.00 - 100
1, 1, 1-TRIKLORETAN	1.00 - 100
1, 1, 2-TRIKLORETAN	1.00 - 100
TETRAKLORETEN	1.00 - 100
HEKSAKLORETAN	1.00 - 100

## METODEBESKRIVELSE

### PRIORITY POLLUTANTS I VANN

1 l vannprøve tilsettes 10 µg deutererte standarder (toluen-d<sub>8</sub>, naphthalen-d<sub>8</sub>, bifenyl-d<sub>10</sub>, fenantren-d<sub>10</sub>, pyren-d<sub>10</sub>, krysen-d<sub>12</sub> og fenol-d<sub>6</sub>). Prøven blir ekstrahert med diklormetan først surt (pH=2), deretter basisk (pH 12). Ekstraktet dampes inn til 1 ml og analyseres med koblet gasskromatografi/- massespektrometri (GC/MS). Prøven kvantifiseres vha. standardløsninger opparbeidet likt med prøven.

De halogenerte alifatene bestemmes i et uinndampet pentanekstrakt vha. gasskromatograf med electron capture detector (GC/ECD).

#### Instrumentbetingelser

Massespektrometer	:	Finnigan 4023
Gasskromatograf	:	Finningan 9610
Datasystem	:	Super Incos, NOVA 4X
Disk-drive	:	Priam. 70M byte
GC-kolonne	:	30m x 0.25mm, 0,25µm DB-5

#### Temperaturer

Kolonne	:	30°C(5 min)-70°C-4°C/min-300°C(10 min <sup>^</sup> )
Injektor	:	270°C
Interface	:	250°C
Ionekilde	:	250°C
Bæregass	:	He
Ionisering	:	70 eV
Scan frekvens	:	0.6 sec/scan
Masseområde	:	35-400
Injeksjon	:	2 µl

## APPENDIX 3

### Bioakkumuleringspotential

## Vedlegg

## METODE FOR BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER.

## Surt ekstrakt

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

I Fraksjon: Applikasjonssone

II " :  $P_{ow} > 10^5$

III " :  $P_{ow} 10^3 - 10^5$

## Basisk ekstrakt

Den sure vannprøven ble gjort basisk med natriumhydroksydpastiller til pH ca.11 og ekstrahert 2 ganger med heksan. Heksanekstraktet ble vasket med vann pH ca.11 og forøvrig ble den samme fremgangsmåten fulgt som for det sure ekstraktet.

Lipofile eller potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser ble bestemt ved tynnsjiktskromatografi av heksanekstrakter av vannprøvene. Metoden er en tillempling av en metode utarbeidet av Lars Renberg et al.<sup>1</sup> Substanser med en fordelingskonstant oktanol/vann  $P_{ow} > 10^3$  ble regnet som potensielt bioakkumulerbare. Fraksjonene ble utskrapet og ekstrahert med aceton/hexan (1:1) 3 ganger. De samlede Aceton/heksan-ekstraktene ble ristet med vann pH ca.2 for surt ekstrakt, med vann pH ca.11 for basisk ekstrakt og vann/acetonfasen ble skilt fra. Heksanekstraktet ble vasket med vann (surt for surt ekstrakt, basisk for basisk ekstrakt) og tørket med natriumsulfat.

Den potensielt bioakkumulerbare mengden i hvert ekstrakt ble bestemt ved gasskromatografisk analyse med flammejonisasjonsdetektor (FID). Arealet av de enkelte toppene relatert til en ytre eller 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 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.

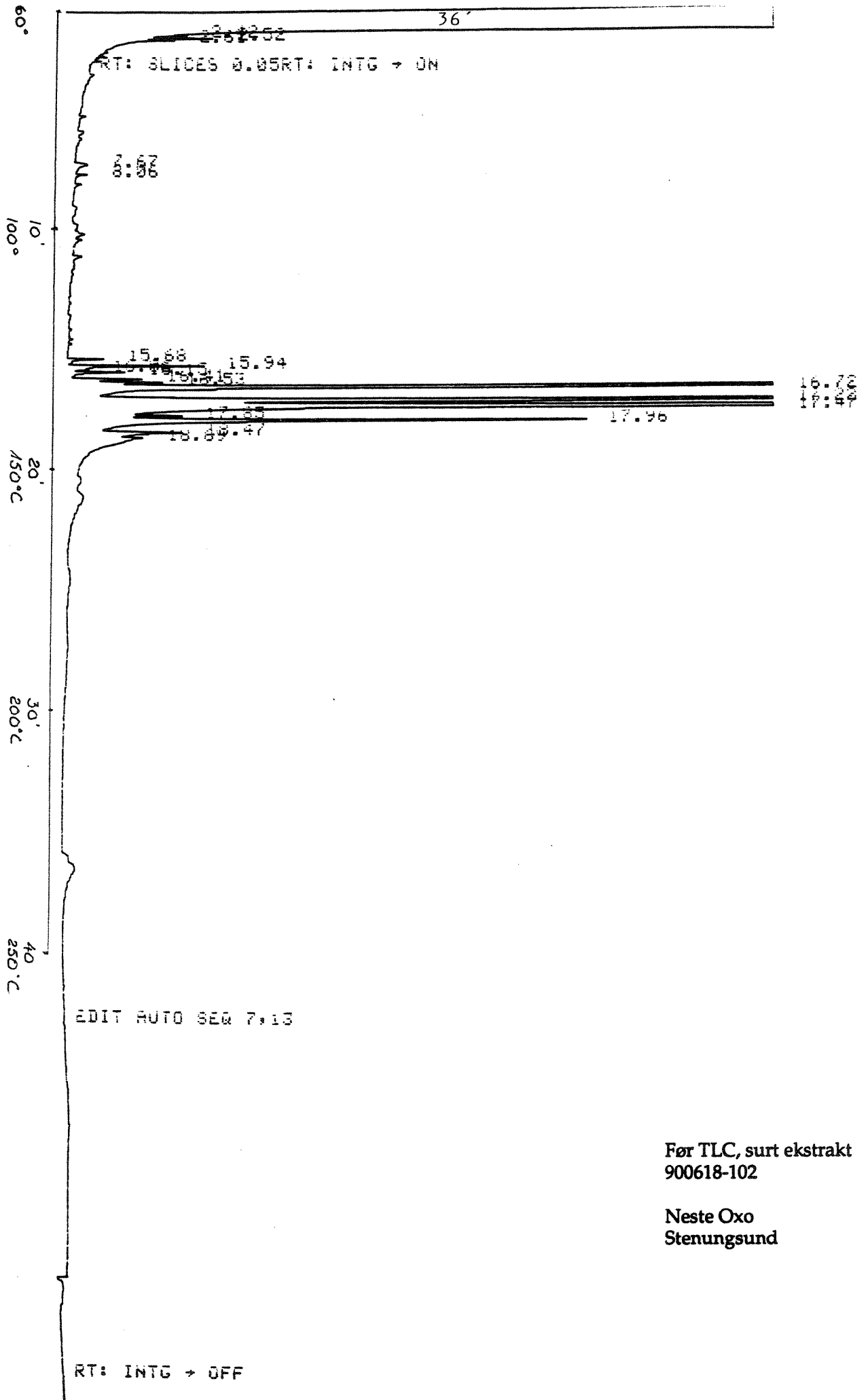
**Testbetingelser ved GC-analysen:**

Kapillærkolonne, fused silica, DB5,  
1.30 m indre diameter.=0,24 mm

**Program:**

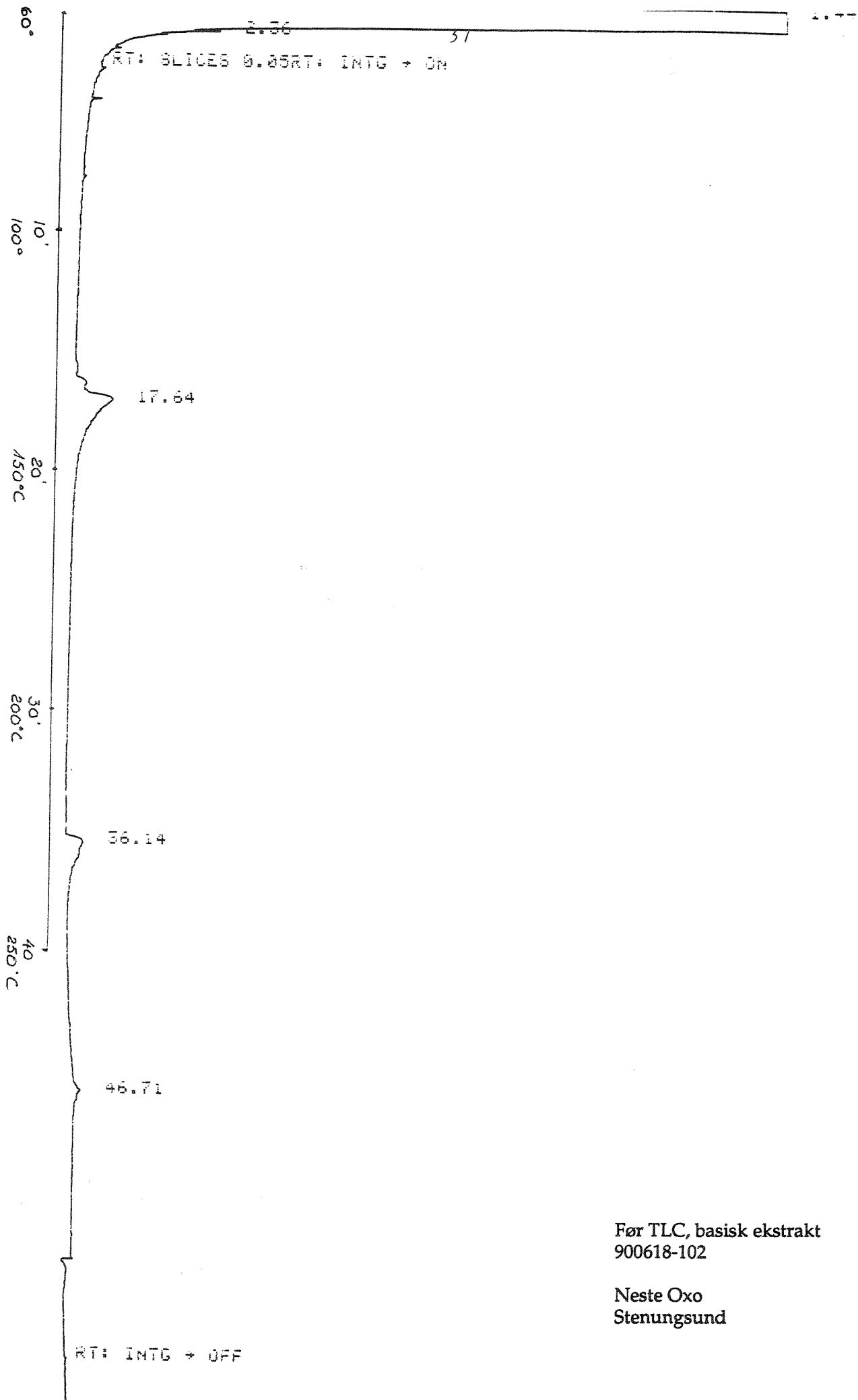
Starttemp.60°C, Henstand 2 min.  
Oppvarmingshastighet 5°C  
Sluttemp.280°C, Henstand 8 min.  
Attn. før TLC 2<sup>5</sup>  
Attn. etter TLC 2<sup>3</sup>  
Ytre standard n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>=106,9µg/ml før TLC  
Indre standard " " etter TLC

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



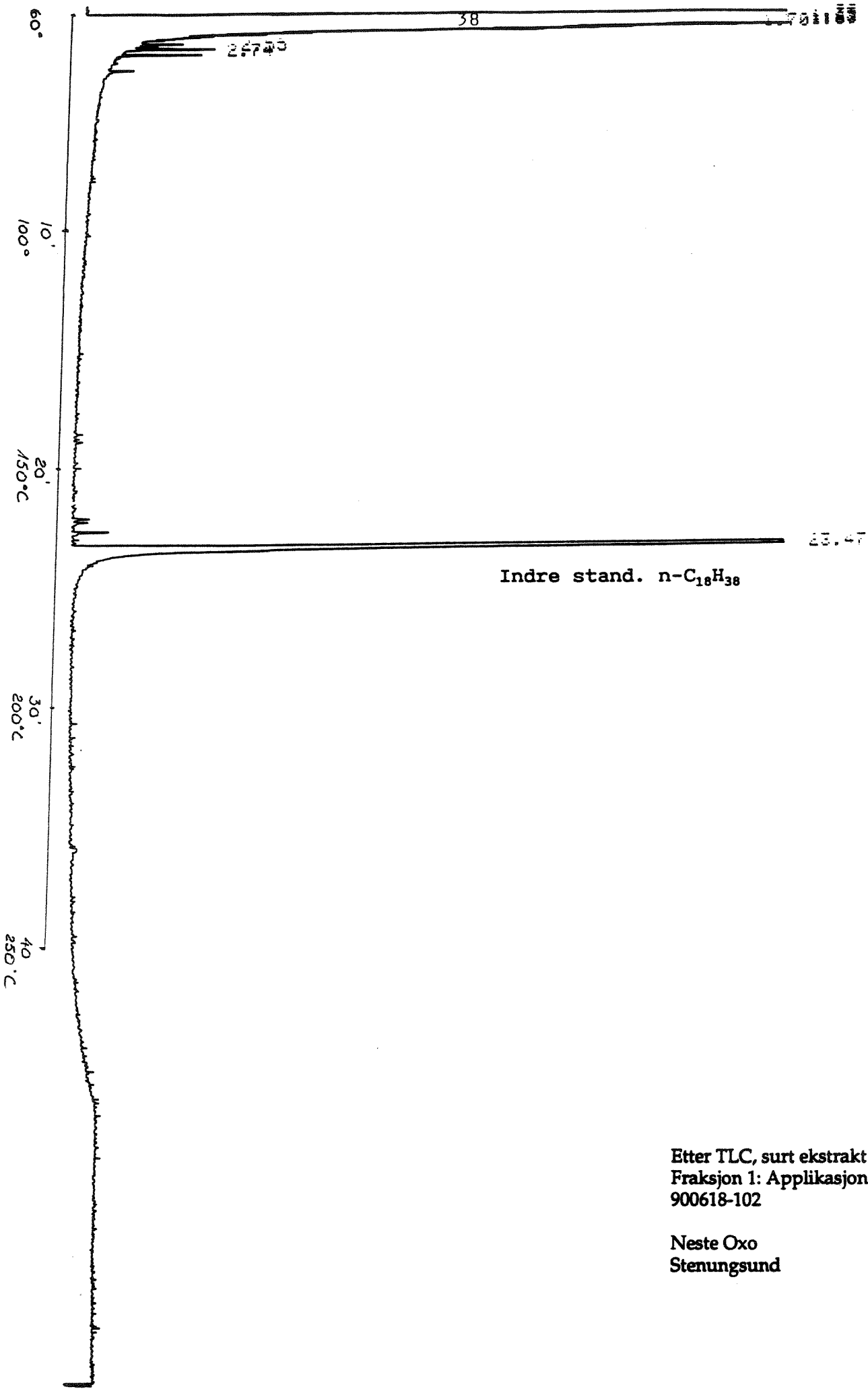
Før TLC, surt ekstrakt  
900618-102

Neste Oxo  
Stenungsund



Før TLC, basisk ekstrakt  
900618-102

Neste Oxo  
Stenungsund

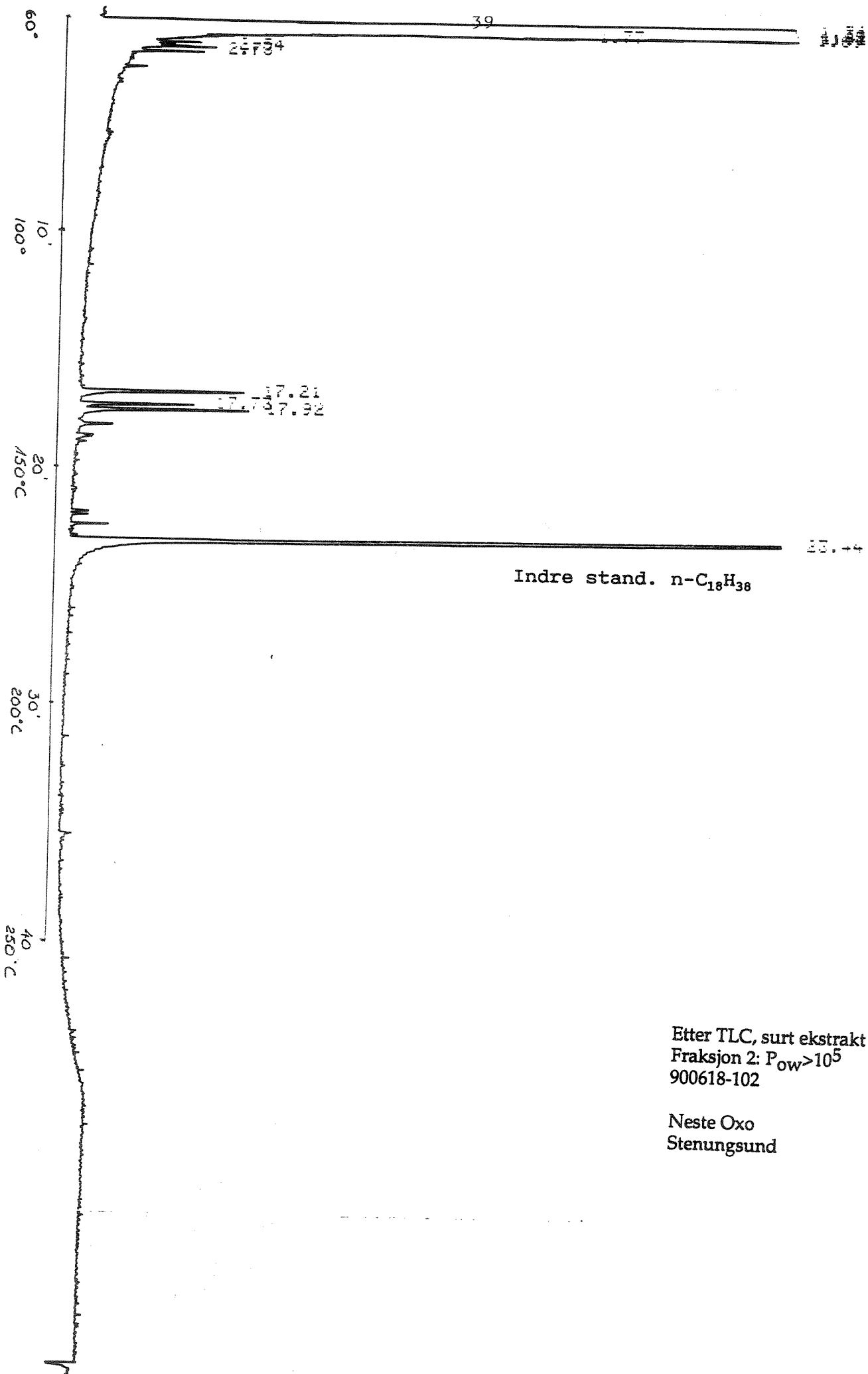


004

Etter TLC, surt ekstrakt  
Fraksjon 1: Applikasjonsone  
900618-102

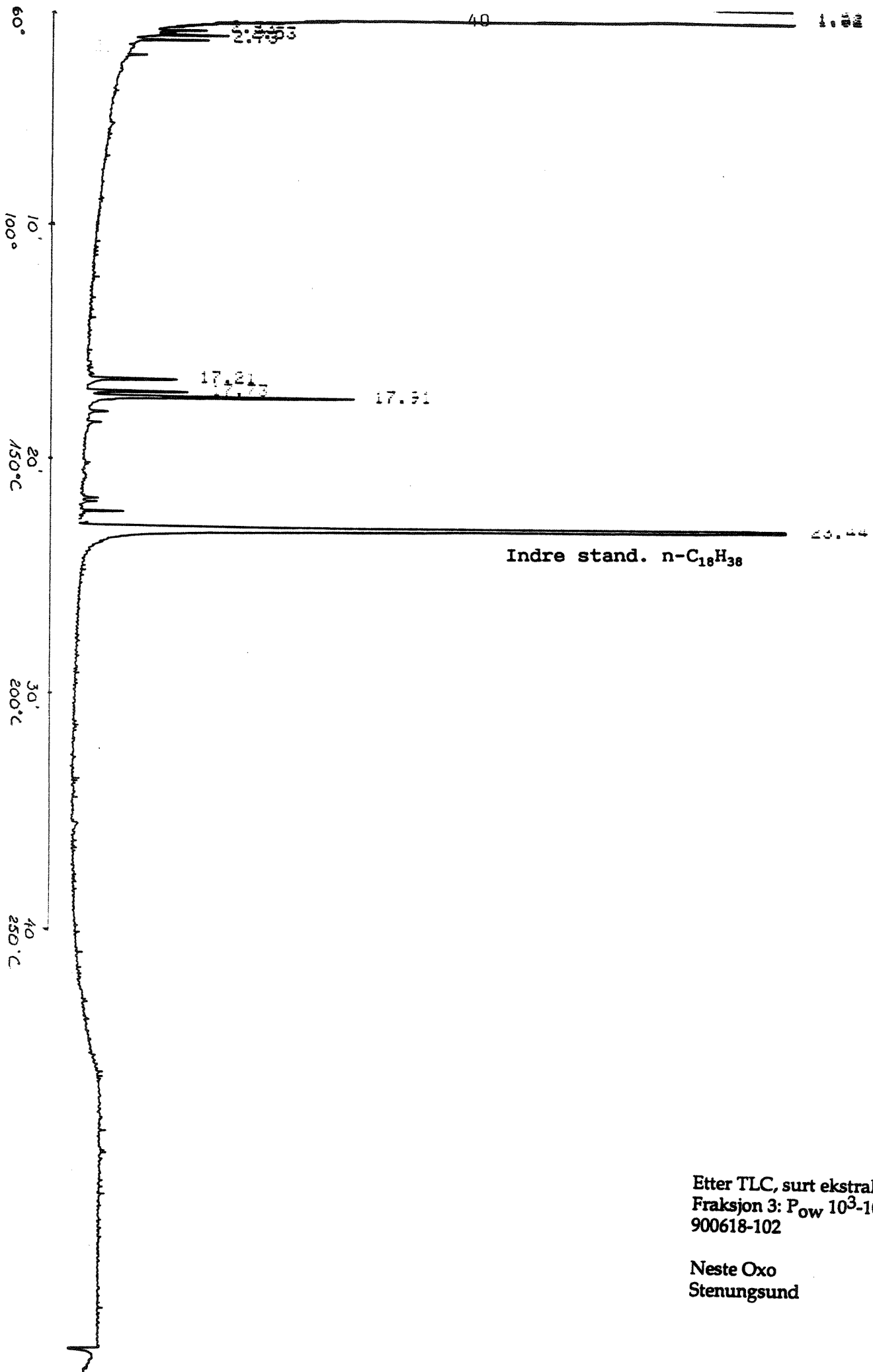
Neste Oxo  
Stenungsund





Etter TLC, surt ekstrakt  
 Fraksjon 2:  $P_{ow} > 10^5$   
 900618-102

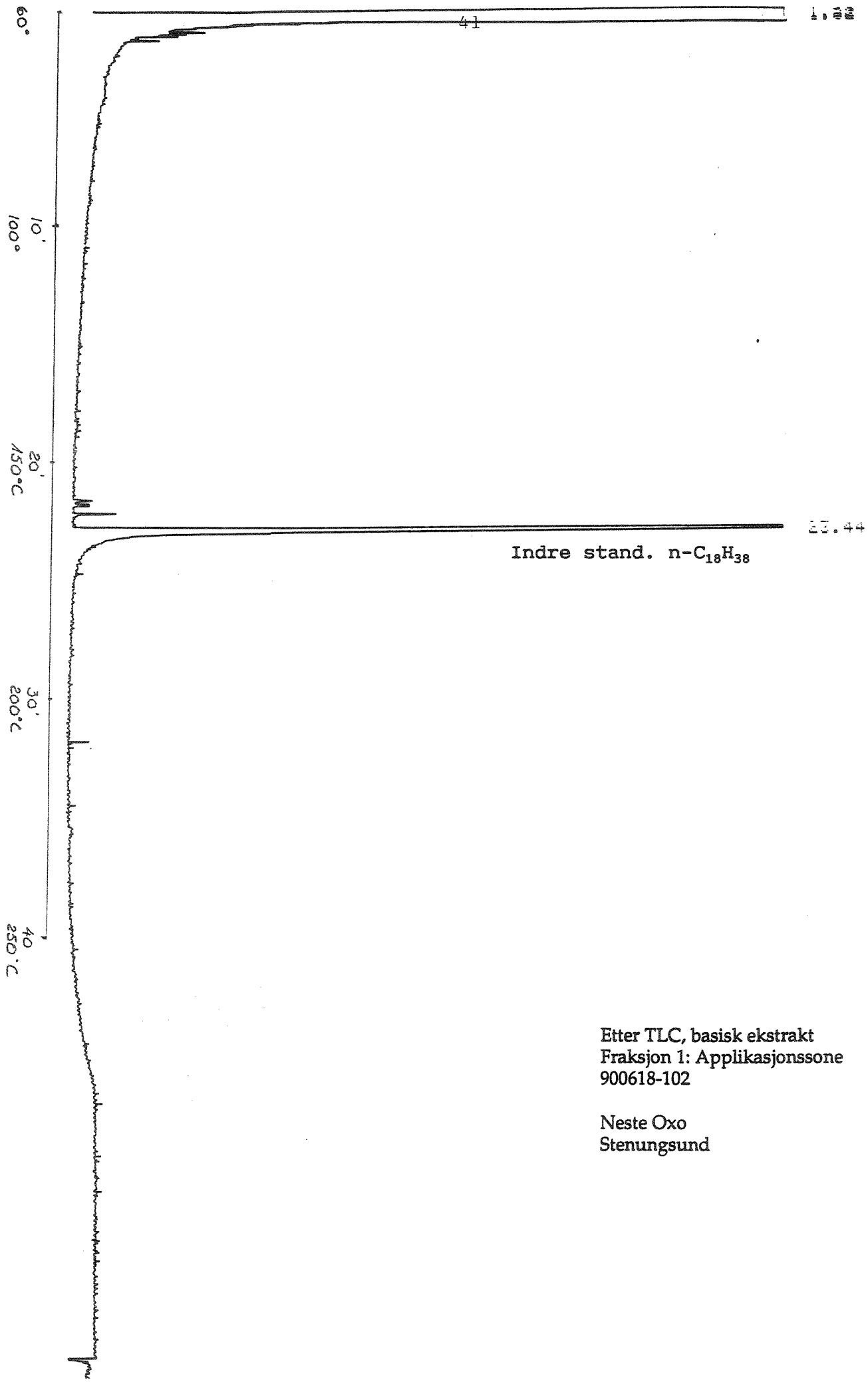
Neste Oxo  
 Stenungsund



007

Etter TLC, surt ekstrakt  
 Fraksjon 3: P<sub>ow</sub> 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>  
 900618-102

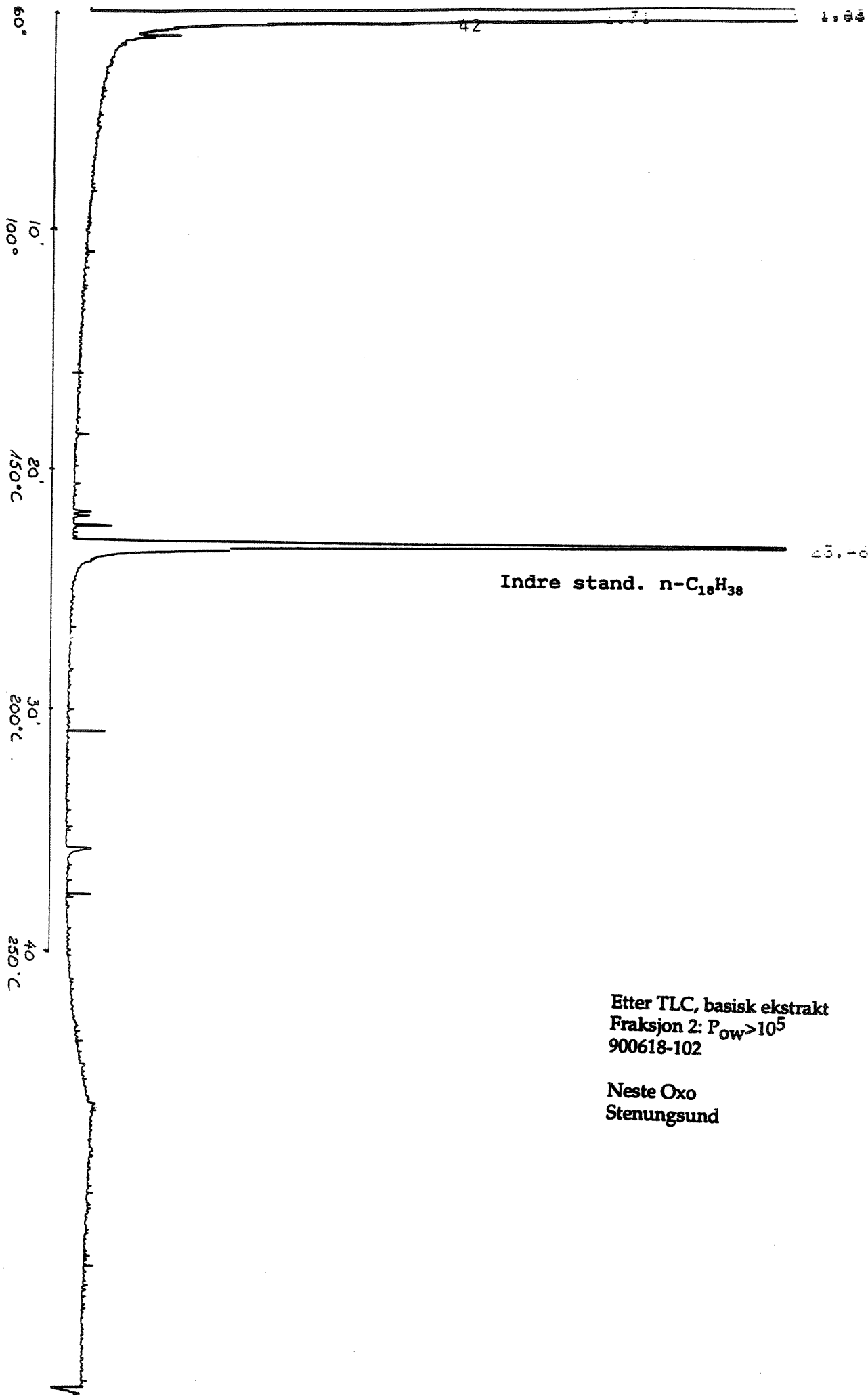
Neste Oxo  
 Stenungsund



Indre stand. n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>

Etter TLC, basisk ekstrakt  
Fraksjon 1: Applikasjonsone  
900618-102

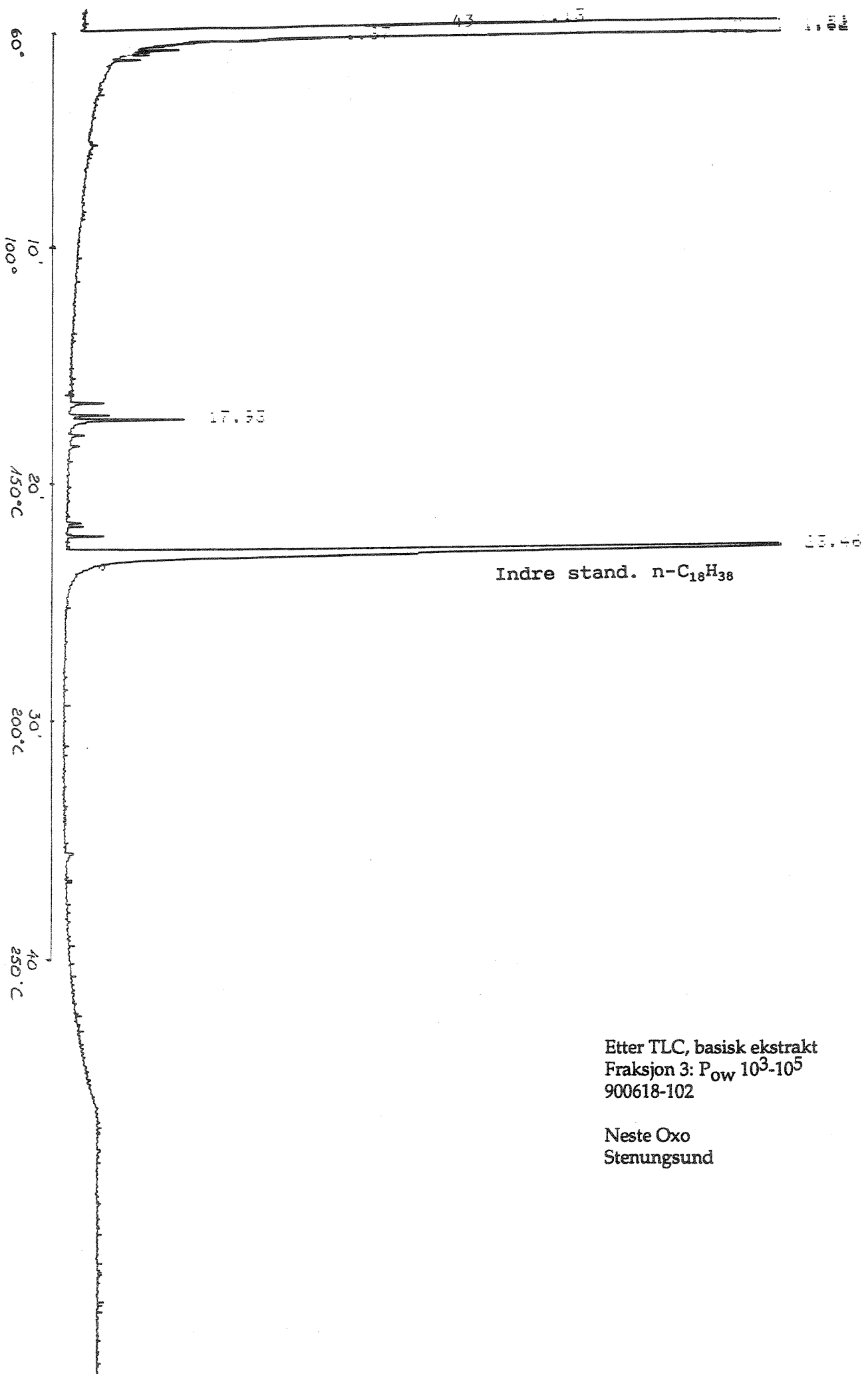
Neste Oxo  
Stenungsund



Indre stand. n-C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>

Etter TLC, basisk ekstrakt  
Fraksjon 2: P<sub>ow</sub>>10<sup>5</sup>  
900618-102

Neste Oxo  
Stenungsund



Etter TLC, basisk ekstrakt  
Fraksjon 3: P<sub>ow</sub> 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>  
900618-102

Neste Oxo  
Stenungsund

Neste Oxo AB  
S-44484 Stenungsund  
SVERIGE

**Rapport**

Att.: K. Flodmark

Deres ref.	Vår ref.	Direkte innvalg	Dato
	BHO/kmh	+472 45 28 24	29.04.1991

Oppdragets tittel	Oppdrag nr
<b>Bestemmelse av potensielt bioakkumulerbart materiale i to vannprøver</b>	<b>114401-038</b>
	<b>1-91-025</b>
	<b>1-91-037</b>

Den 4.3.91 ble det mottatt en vannprøve etter nedbrytning fra NIVA og den 18.3.91 en vannprøve fra oktanolprosessen etter destillasjon fra Neste Oxo for bestemmelse av potensielt bioakkumulerbart materiale i surt ekstrakt (tynnsjikt-kromatografi og fingerprint på gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor).

Analysemetode (se vedlegg).

Etter avtale er prøvene ekstrahert ved pH ~ 2 og TLC fraksjonert i to fraksjoner,  $P_{ow} > 10^5$  og  $P_{ow} > 10^3-10^5$ .

Resultater er gjengitt i tabell 1.

I prøven etter nedbrytning viser GC-kromatogrammene etter nedbrytning topper i det bioakkumulerbare området log  $P_{ow} 10^3-10^5$  beregnet til 2.6 mg/l. Før nedbrytning (tidligere målt) var verdiene 1.8 mg/l for log  $P_{ow} > 10^5$  og 1.9 for  $P_{ow} 10^3-10^5$ .

Prøven etter oktanolprosessen (etter destillasjon) inneholder ganske store mengder bioakkumulerbart materiale, 23 mg/l i fraksjon 3:  $P_{ow} 10^3-10^5$ , og 0.4 mg/l i fraksjon 2:  $P_{ow} > 10^5$ .

Tabell 1

Surt ekstrakt	Før TLC fraksjonering	Fraksjon 2 log P <sub>ow</sub> > 10 <sup>5</sup>	Fraksjon 3 log P <sub>ow</sub> 10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>
prøve etter nedbrytning	4.9 x 1.2 <sup>xx</sup> = 5.9 mg/l	i.p. x	2.2 x 1.2 <sup>xx</sup> 2.6 mg/l
prøve fra oktanolprosess	124 mg/l	0.4 mg/l	23 mg/l

xx Fortynningsfaktor. Prøven ble fortynnt 1.2 ganger under nedbrytningstesten.

x ikke påvist

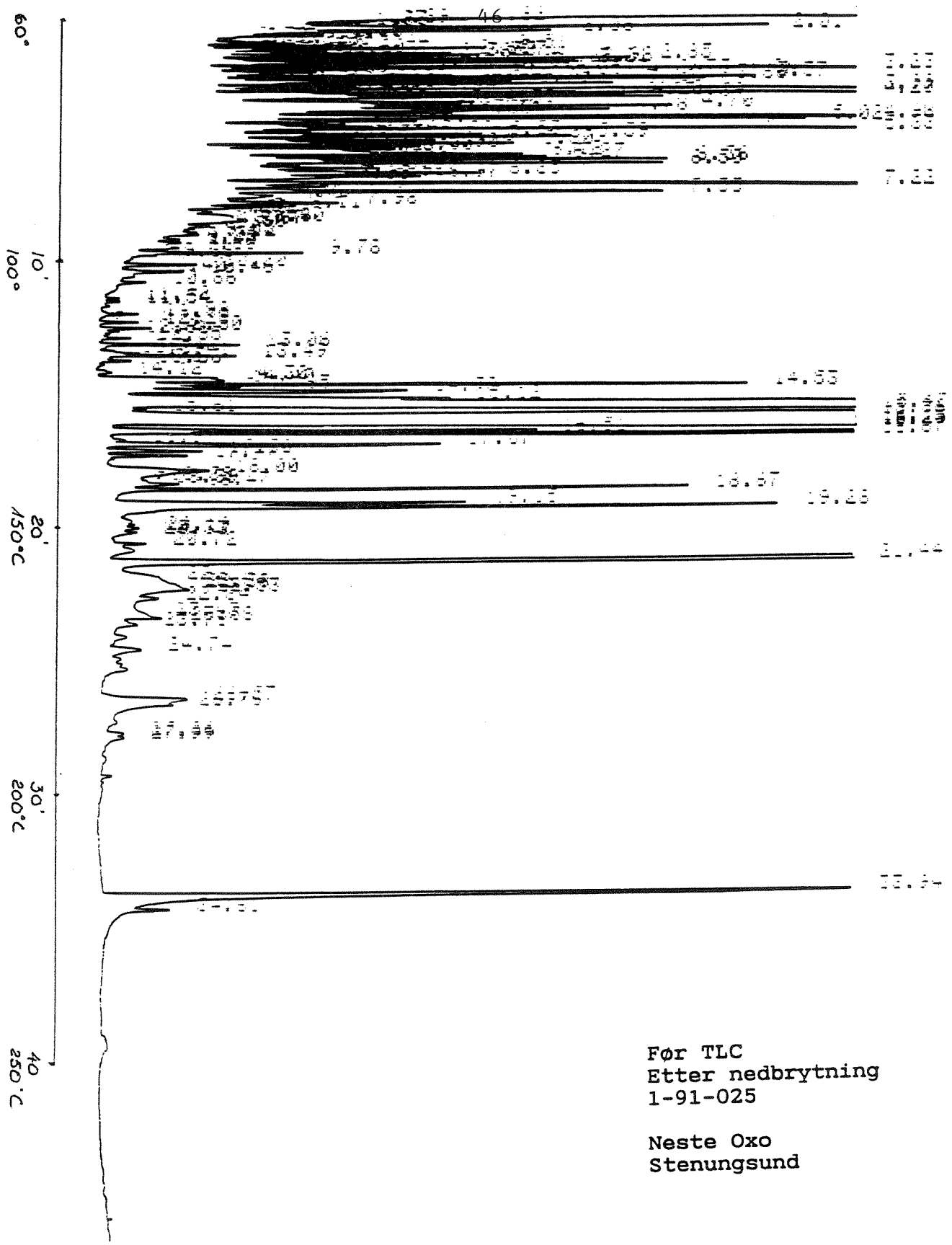
Med vennlig hilsen  
SENTER FOR INDUSTRIFORSKNING

*Arne Lund Kvernheim*  
Arne Lund Kvernheim

*Berit Hølestøl*  
Berit Hølestøl

Vedlegg

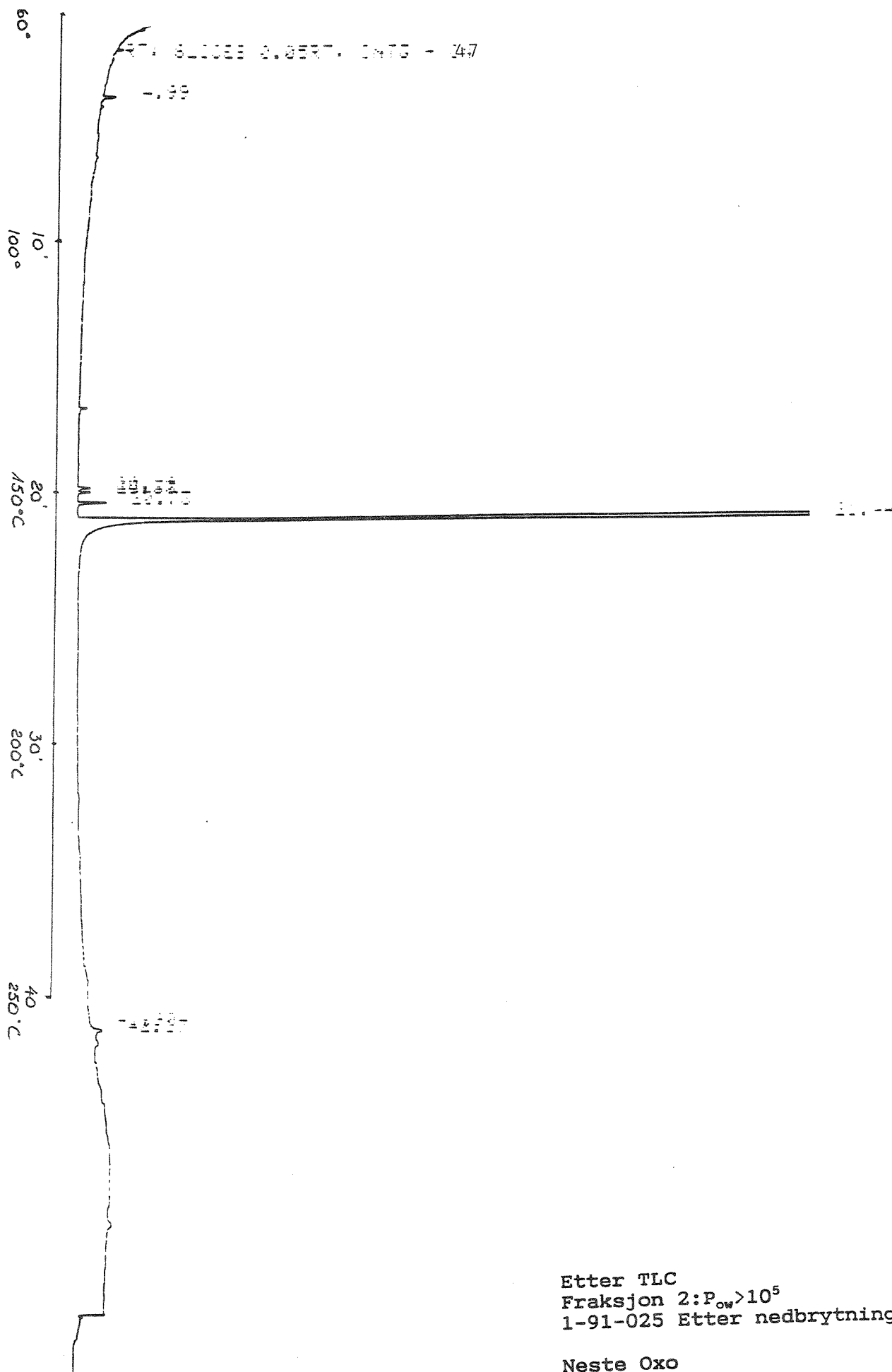
Kopi til T. Källqvist, NIVA



Før TLC  
Etter nedbrytning  
1-91-025

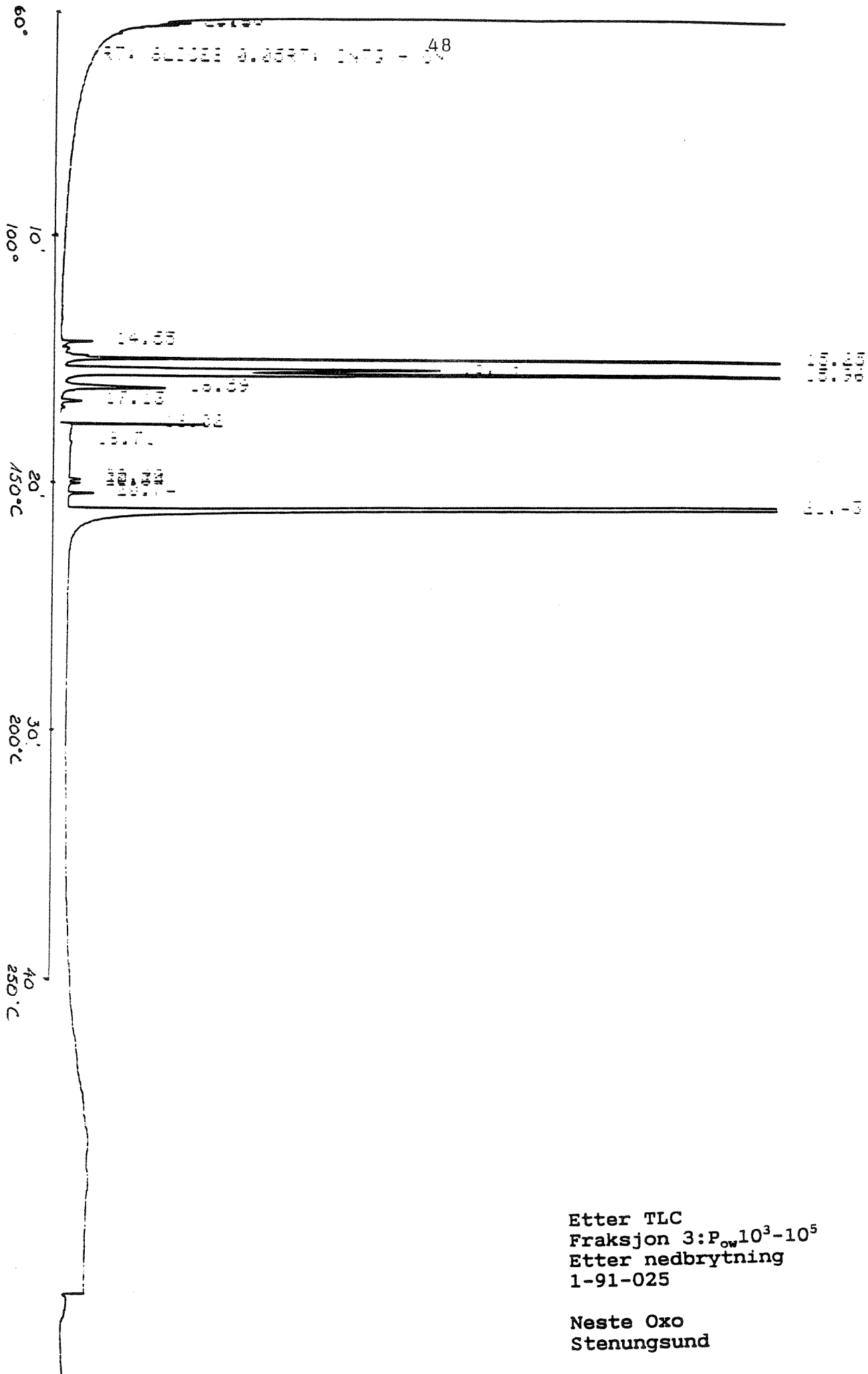
Neste Oxo  
Stenungsund





Etter TLC  
 Fraksjon 2:  $P_{ow} > 10^5$   
 1-91-025 Etter nedbrytning

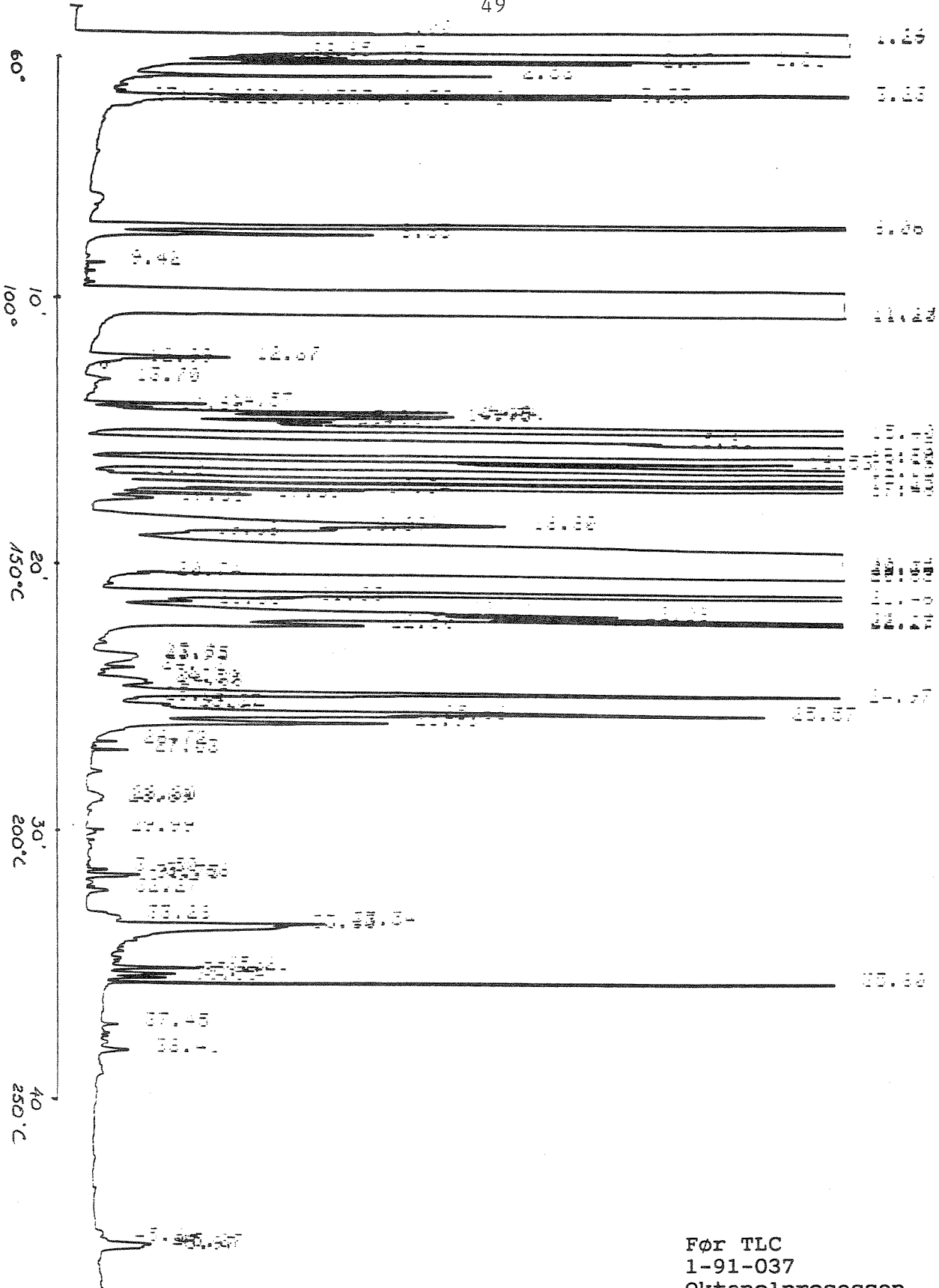
Neste Oxo  
 Stenungsund



Etter TLC  
 Fraksjon 3:  $P_{ow} 10^3-10^5$   
 Etter nedbrytning  
 1-91-025

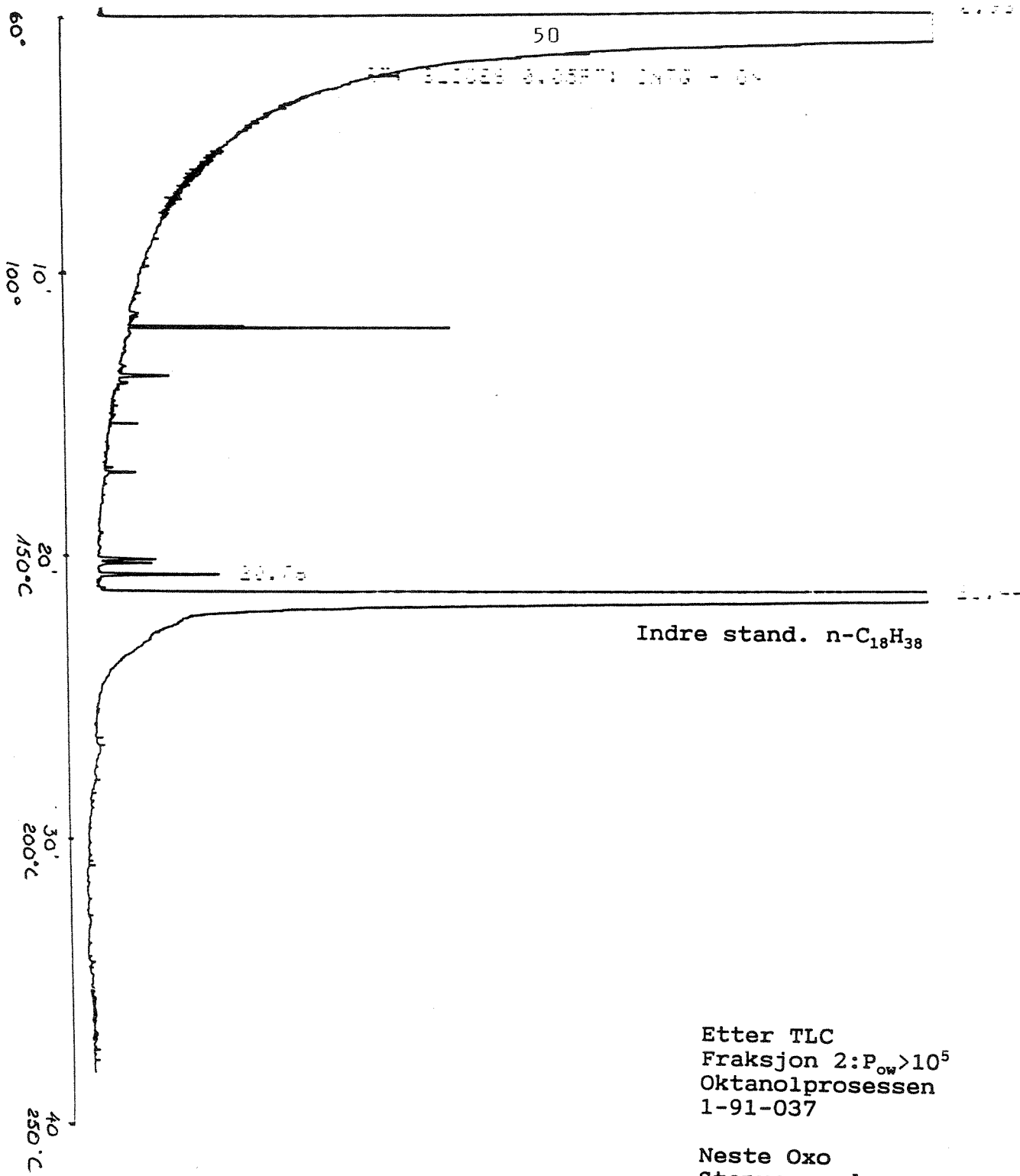
Neste Oxo  
 Stenungsund

III



Før TLC  
1-91-037  
Oktanolprosessen

Neste Oxo  
Stenungsund



Etter TLC  
 Fraksjon 2: P<sub>ow</sub> > 10<sup>5</sup>  
 Oktanolprosessen  
 1-91-037

Neste Oxo  
 Stenungsund



VEDLEGG

**METODE FOR BESTEMMELSE AV BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER**

Vannprøven ble ekstrahert med cyklohexan ved pH~2. Emulsjon ble fjernet ved gjentatt nedfrysing og tining. Ekstraktene ble kombinert, vasket med vann (pH#2) og tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ekstraktet ble oppkonsentrert til lite volum, analysert gasskromatografisk og videre fraksjonert på TLC i to fraksjoner Pow >10<sup>5</sup> og 10<sup>5</sup>>Pow>10<sup>3</sup>.

Lipofile eller bioakkumulerbare organiske forbindelser bestemmes ved tynnsjikt-kromatografi av cyklohexanekstrakter av vannprøvene. Metoden som er anvendt, er en tillempning av en metode utarbeidet av Lars Renberg, Statens Naturvårdsverk, Stockholm. Substanser med en fordelingskonstant oktanol/vann Pow >10<sup>3</sup> blir regnet som bioakkumulerbare. Fraksjonen blir utskrapet og ekstrahert med cyklohexan/isopropanol (1:1). De samlede cyclohexan/-isopropanol-ekstrakter ristes med vann (pH~2) og vann/isopropanolfasen skilles fra. Cyklohexanekstraktet vaskes med vann (pH~2) og tørkes med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ekstraktene dampes inn med nitrogentilføring på varmeblokk.

Den bioakkumulerbare mengden i hvert ekstrakt bestemmes ved gasskromatografisk analyse hvor den generelle flammeionisasjonsdetektoren (FID) benyttes. Arealet av de enkelte toppene relatert til en ytre standard C<sub>18</sub> gir et mål for mengden organiske kromatograferbare forbindelser. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfelle organiske substanser med en molekylvekt opptil ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk. Det tas forbehold om at vi ved beregningen antar at de bioakkumulerbare forbindelsene har lik repons med den utvalgte ytre standarden. Vår erfaring er at responsen med FID-detektor for ulike organiske forbindelser kan variere endel, opptil 50%. Blindprøve opparbeides og kjøres parallelt med prøveekstraktet.

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

program: Starttemp. 60°C, henstand 2 min  
oppv.hast 5°C/min  
sluttemp. 280°C, henstand 8 min,  
attn. 2<sup>3</sup>

ytre standard: n-C<sub>18</sub> H<sub>38</sub> = 106.9 µg/ml  
indre standard: n-C<sub>18</sub> H<sub>38</sub> = 106.9 µg/ml

## APPENDIX 4

### Toxicitetstest med Aktivt slam

Norsk institutt for vannforskning

**TESTRAPPORT ISO 8192****HEMNING AV OKSYGENOPPTAK I MIKROORGANISMER I AKTIV-SLAM  
(TEST FOR INHIBITION OF OXYGEN CONSUMPTION OF ACTIVATED SLUDGE) METODE A**

TESTSTOFF: Avløpsvann, NESTE OXO Stenungsund

TESTORGANISMER: Aktiv-slam produsert av OECD syntetisk kloakkvann i lab-skala, (Husmann unit).

FORBEHANDLING: Slammene ble sentrifugert og resuspendert i isotonisk saltvann. Behandlingen ble utført 2 ganger og suspensjonen ble kontinuerlig luftet under gjennomføringen av testingen.

TESTDATO: 15.06. 1990.

## BETINGELSER FOR TESTPRØVER:

Testkonsentrasjoner: 1. serie, 10, 18, 32, 56 og 90% avløpsvann.  
2. serie,Slamkonsentrasjon i testprøvene; 1. testserie: 70 mg STS/L  
2. testserie:

pH i testprøvene: 7,4

Testtemperatur:  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ Abiotisk oksygenforbruk i fysisk-kjemisk kontroll  $< 0,1 \text{ mg/L}$ REFERANSESTOFF: 3,5-diklorfenol:  $\text{EC}_{50}$ -verdi på testslammet: 11,0 mg/L

## RESULTATER:

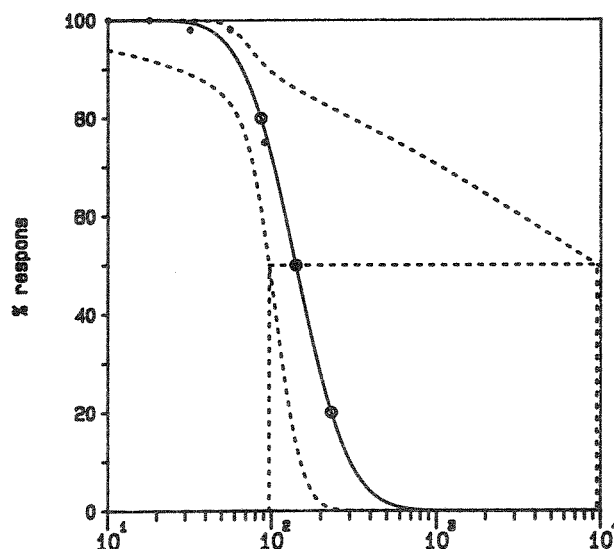
$\text{EC}_{50}$	95% konfidensintervall	$\text{EC}_{20}$	$\text{EC}_{80}$
Ikke hemn.		85 %	

PROBIT

NESTE-Sten

## Kommentarer:

Det ble kun påvist redusert biologisk aktivitet (respirasjon) ved 90 % avløpsvann. Probit dose-respons diagram (ugyldig) er opptegnet.



REFERANSE: 1. ISO 8192 Water Quality - Test for Inhibition of oxygen consumption of activated sludge. Method A. 2. OECD guideline for testing of chemicals, Method 209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test. Dansk Standard DS 297.



## APPENDIX 5

### Toxicitetstester med Microtox

## MICROTOX, STANDARD METODE

Testen er utført etter standardmetoden ( Microtox TM System Operating manual Beckman 1982.)

Microtox-apparatet ble startet 2 timer før forsøk ble satt i gang for at temperaturen i inkubasjonskamrene skulle stabiliseres. Temperaturen i bakterie-oppbevaringskammeret ble justert til 3°C og i de andre kamrene til 15°C.

De frysetørrede bakteriene ble suspendert i 1 ml. destillert, dejonisert vann og plassert i bakterieoppbevaringskammeret.

Før en normal toksitetstesting settes i gang, må det kjøres en "screening-test for nye prøver, for å finne ut hvilke konsentrasjoner som skal velges for å komme inn på kurven hvor den ønskete EC-verdien kan avleses.

Ved en standard toksisitetstesting ble 15 kuvetter plassert i inkubasjonskamrene. Til 10 av disse (reaksjonskuvetter) ble 0,5 ml. 2% NaCl-løsning pipettert. I fire av de resterende fem kuvetter ble det gjort en fortyningsserie av testprøven, basert på resultatene fra forforsøket. Den siste kuvetten var beregnet for blindprøve, og denne ble tilsatt 1ml. 2% NaCl-løsning.

Til de 10 reaksjonskuvettene ble 10 µl bakteriesuspensjon tilsatt, og etter 10 min. akklimatisering ble den initiale luminescensen ( $I_0$ ) målt i de respektive kuvetter. Deretter ble det med jevne tidsintervaller tilsatt 0,5 ml. av de respektive prøvekonsentrasjoner i reaksjonskuvettene. Luminescensen  $I_t$  ble målt etter 5 og 15 min. eksponeringstid. Det ble målt på to paralleller av hver testkonsentrasjon.

Som kontrollsubstans for bakteriene ble benyttet  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Før måling ble pH justert til ca. 6,8-7,2 i prøven.

Data av resultatene ble beregnet etter Microtox manual okt.89 "How to run the microtox calculation program on an IBM PC-computer."

## UTREGNING AV EC-VERDIEN

Luminescensen  $I^0 \times I_t$  til hver reaksjonskuvette ble nedtegnet, og ut fra disse data kan EC-verdien regnes. Bakteriesuspensjonens lysproduksjon minsker gradvis etter overføring til reaksjonskuvettene. For å korrigere for denne minskningen, som skyldes forltyningseffekt ved prøvetilsetting, regnes det ut en reduksjonsfaktor,  $R_t$ .

$$R_t = \frac{I_t \text{ (blind)}}{I \text{ (blind)}}$$

Minskningen i luminescensen anses å være et mål på prøvens giftighet overfor bakteriene ved de ulike konsentrasjoner. Denne responsen,  $\Gamma_t$ , kan regnes ut etter følgende formel:

$$\Gamma_t = \frac{R_t (I_0 - I_t)}{I_t}$$

Ved beregning av EC-verdien plottes testkonsentrasjonen mot  $\Gamma$ -verdien i et log-log diagram. Ut fra denne kurven bestemmes  $EC_{50}$ -verdien ved å avlese konsentrasjonen som tilsvarer  $\Gamma = 1$ . Ved rød- eller brunfargede løsninger må det korrigeres for hvor mye fargen nedsetter luminescensen. Til dette formål er det laget en spesialkuvette som består av et tynt rør omgitt av en kappe. Røret er beregnet for bakteriesuspensjon, og i kappen fylles den fargede løsningen. Ved denne testen må det utvises nøyaktighet, så ikke bakteriesuspensjonen blir kontaminert med prøveløsningen. Spesialkuvetten plasseres i tårnet og bakteriesuspensjonen tilsettes bakterierøret, hvoretter  $I_0$  avleses. Så fylles kappen som omgir bakterierøret opp med den fargede prøven og  $I$  avleses. Ut fra disse verdiene beregnes adsorpsjonen  $LA$ , som skyldes fargen  $A_f$ :

$$A_f = 3.1 \ln \frac{10}{\dots}$$

## MICROTOX, 100%-SCREENING METODE

Metoden er beskrevet i Microtox Applicatin Note M-111. Microtox Corp. 1987.

Metoden ble benyttet i de tilfeller der prøven var spesielt lav-toksisk slik at en dose-respons kurve ikke kunne oppnås. Dette betyr at målinger utført på denne måten bare angir % lysreduksjon i en ufortynnet prøve, ikke EC50-verdien.

I motsetning til Standard-metoden, som går ut på å eksponere de luminescerende bakterier for forskjellige prøvekonsentrasjoner (høyeste prøvekonsentrasjon 45 %) omfatter 100% screeningtesten kun måling av prøven i en konsentrasjon ( 99% saltjustert prøve )  
Målingene ble utført i 3 paralleller av prøven, samtidig med 3 paralleller av blindprøven av 2% natriumkloridløsning.  
Eksponeringstid for bakteriene med prøveløsning ble holdt til 5 min. eventuelt 15 min.  
Prøvene ble justert til pH ca.6.8-7,2 før måling.  
Som kontrollsubstans for bakteriene ble benyttet  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Følgende formel ble benyttet ved utregningen:

Lysreduksjon i %:

$$A = \frac{\bar{X}_{\text{blind}} - \bar{X}_{\text{prøve}}}{\bar{X}_{\text{blind}}}$$

100% - fejling.

DATO	9/7-90
FØLSOMHED	x1
BATCH	910
KLØRTAV	040

900618-102

PRØVE	Neste Oko stjernungsund ukprøve
UL	SL
pH i UL	_____ korr. till _____ med _____

$\sum_{05}$	$\sum_5$
88.0	55.7
92.5	60.9
87.7	61
$\bar{x}_{05}$	$\bar{x}_5$
89.4	59.2
$T_{05}$	$A_5$
	33.7%

$\sum_{15}$	$\sum_{15}$
79.8	51.5
83.3	57
80	60
$\bar{x}_{15}$	$\bar{x}_{15}$
81	56.1
$T_{15}$	$A_{15}$
	30.7%

Beregninger:

$$T' = \frac{\bar{x}'_{BLANK} - 1}{\bar{x}'}$$

Lysminstning i %

$$A = \frac{\bar{x}'_{BLANK} - \bar{x}'}{\bar{x}'_{BLANK}} \times 100$$

100% - lysning

DATO	16/8-90
FØLSOMHET	x1
BATCH	910
KLØRTAV	040

PRØVE	Neste OKO stengningsund
UL	SL
pH i UL	_____
med	Korr. til _____

J <sub>05</sub>	J <sub>5</sub>
01.4	54
70.8	54.0
74.8	55
$\bar{X}_{05}$	$\bar{X}_5$
70.3	54.6
T <sub>5</sub>	A <sub>5</sub>
	30.3%

J <sub>015</sub>	J <sub>15</sub>
$\bar{X}_{015}$	$\bar{X}_{15}$
T <sub>15</sub>	A <sub>15</sub>

Beregninger:

$$T' = \frac{\bar{X}'_{BLANK} - 1}{\bar{X}'}$$

Lysminskning i %

$$A = \frac{\bar{X}'_{BLANK} - \bar{X}'}{\bar{X}'_{BLANK}} \times 100$$

APPENDIX 6

Toxicitetstest med *Selenastrum capricornutum*

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

## TOKSISITETSTEST MED ALGER

## ISO/DIS 8692 Water quality - Algal growth inhibition test.

Prøve: Avløpsvann fra Neste Oxo, Stenungsund, veckoblandprov  
6-12/6 1990

Organisme: Selenastrum capricornutum NIVA CHL 1, dyrket i vekstmedium  
10% Z8 (Staub 1961).

Test Start dato: 18/6-90 Varighet: 72 t  
dok: Testede konsentrasjoner: 1, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18, 32 %

Inku- 50 ml kulturer i 100 ml rundkolber. Inkubert på gyngbord  
bering: Lys: 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , kontinuerlig fra "dagslys"-lysstoffrør  
Temperatur: 20 °C  
pH i kontroll ved start: 7.2, pH ved slutt: 8.6  
Måling av celletetthet: Partikkel telling med  
Coulter Multisizer

Resultat: Tabell 1 viser celletetthet ved hvert målepunkt, beregnet areal under vekstkurven og veksthastighet i hver kolbe. Middelerverdier for hver konsentrasjon og for kontrollene er listet nederst i tabellen. Vekstkurvene for hver konsentrasjon er vist i figur 1. Konsentrasjon/respons-kurver for veksthastighet og areal under vekstkurve er vist i henholdsvis fig. 2 og 3.

	Veksthastighet	Areal under vekstkurve
EC <sub>50</sub> :	15%	6%
95 % koinf. lim.	13 - 18%	5.2 - 7.0%
NOEC	1.8%	1.8%

EC<sub>50</sub> (Konsentrasjon som gir 50% effekt på veksthastighet eller areal under vekstkurve) er bestemt ved lineær regresjon av probit-transformert respons mot logaritmen for konsentrasjon. NOEC (No Effect Concentration)= høyeste testede konsentrasjon uten signifikant inhibering. (t-test).

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

Testansvarig:

  
Torsten Källqvist



TEST:&gt;&gt; ISO/DIS 8692

Dato&gt;&gt;&gt; 18.6.90

TESTSTOFF&gt;&gt;&gt;&gt; Neste Oxo, Stenungsund

TESTALGE>>>> *Selenastrum capricornutum*

Medium&gt; ISO

INOKULUM&gt;&gt;&gt;&gt;&gt;

10 mill. celler/l

	Timer:	Dag 1 24 mil/l	Dag 2 48 mil/l	Dag 3 72 mil./l	Areal	Areal %	V. hast.	V. hast %
Kons. 1	32	31	44	37	1644	5	0.44	25
%		29	42	34	1512	4	0.41	23
		28	38	36	1416	4	0.43	24
Kons.2	18	44	65	115	3396	10	0.81	46
%		41	61	69	2676	8	0.64	36
		44	62	71	2796	8	0.65	37
Kons. 3	10	55	127	228	6504	19	1.04	59
%		53	93	124	4392	13	0.84	47
		61	124	246	6792	19	1.07	60
Kons. 4	5.6	54	268	1440	24408	70	1.66	93
%		52	274	1510	25344	73	1.67	94
		59	264	1360	23472	67	1.64	92
Kons. 5	3.2	55	280	1460	24960	72	1.66	94
%		53	278	1480	25104	72	1.67	94
		65	336	1680	29184	84	1.71	96
Kons. 6	1.8	58	316	1960	31896	91	1.76	99
%		63	342	1830	31080	89	1.74	98
		63	374	2100	35088	101	1.78	100
Kons. 7	1	60	350	1800	30840	88	1.73	98
%		64	394	1960	33912	97	1.76	99
		66	418	2310	38736	111	1.81	102
Kontroll		63	416	2110	36216	104	1.78	101
		59	386	2090	35160	101	1.78	100
		54	376	2450	39120	112	1.83	103
		66	388	1930	33456	96	1.75	99
		62	364	1850	31824	91	1.74	98
		62	394	1940	33624	96	1.76	99

## MIDDELVERDIER

32.00 Mv.	29.33	41.33	35.67	1524.00	4.37	0.42	23.87
St. d.	1.25	2.49	1.25	93.47	0.27	0.01	0.66
18.00 Mv.	43.00	62.67	85.00	2956.00	8.47	0.70	39.65
St. d.	1.41	1.70	21.23	314.96	0.90	0.08	4.40
10.00 Mv.	56.33	114.67	199.33	5896.00	16.89	0.98	55.39
St. d.	3.40	15.37	53.77	1069.97	3.07	0.10	5.76
5.60 Mv.	55.00	268.67	1436.67	24408.00	69.94	1.66	93.28
St. d.	2.94	4.11	61.28	764.24	2.19	0.01	0.80
3.20 Mv.	57.67	298.00	1540.00	26416.00	75.69	1.68	94.56
St. d.	5.25	26.88	99.33	1958.15	5.61	0.02	1.19
1.80 Mv.	61.33	344.00	1963.33	32688.00	93.66	1.76	99.13
St. d.	2.36	23.72	110.25	1729.44	4.96	0.02	1.06
1.00 Mv.	63.33	387.33	2023.33	34496.00	98.84	1.77	99.63
St. d.	2.49	28.16	212.97	3249.87	9.31	0.03	1.94
Kontroll Mv.	61.00	387.33	2061.67	34900.00	100.00	1.77	100.00
St. d.	3.74	16.03	196.16	2337.48	6.70	0.03	1.72

## Neste Oxo, Stenungsund Selenastrum, vekstkurver

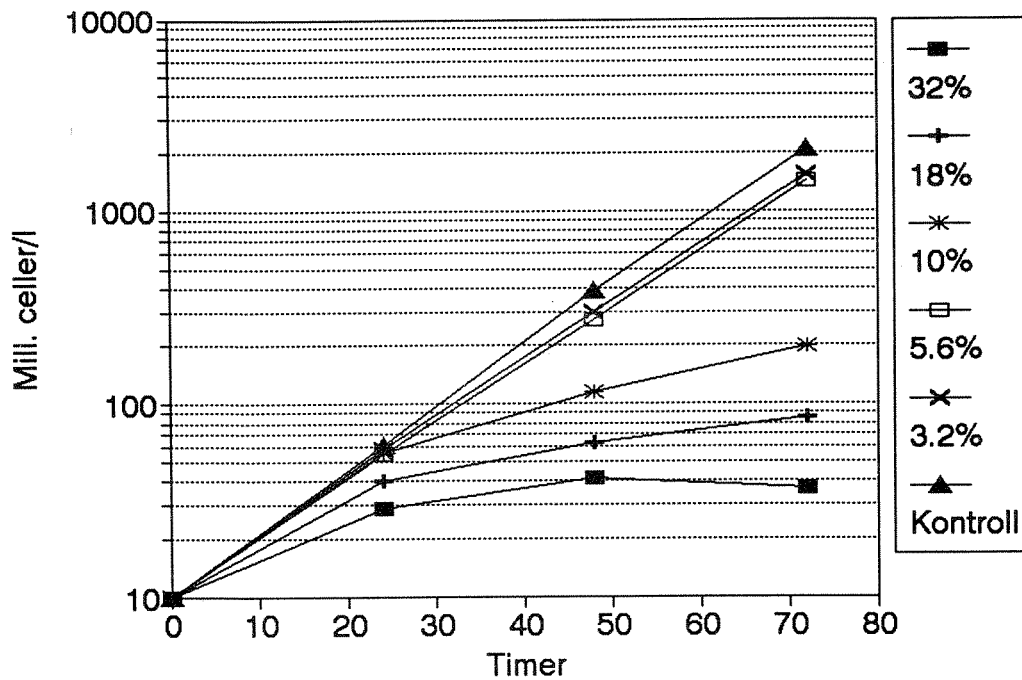


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann.

## Neste Oxo, Stenungsund *Selenastrum*, veksthastighet

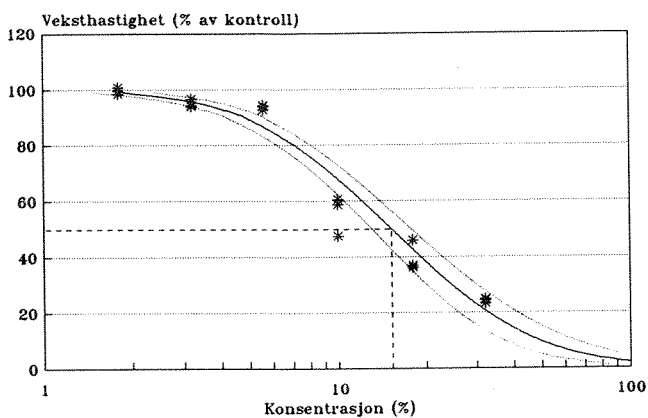


Fig. 2. Effekt av avløpsvann på veksthastigheten hos *Selenastrum capricornutum*

## Neste Oxo, Stenungsund *Selenastrum*, areal under vekstkurve

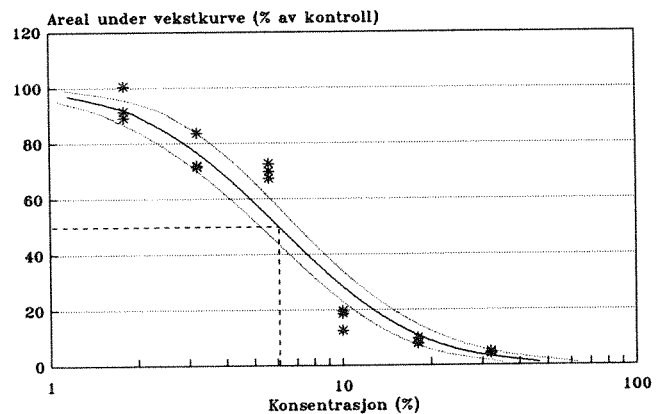


Fig. 3. Effekt av avløpsvann på areal under vekstkurve for *S. capricornutum*

## NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

## TOKSISITETSTEST MED ALGER

## ISO/DIS 8692 Water quality - Algal growth inhibition test.

Prøve: Avløpsvann fra Neste Oxo, Stenungsund, veckoblandprov  
6-12/6 1990 etter nedbrytning

Organisme: Selenastrum capricornutum NIVA CHL 1, dyrket i vekstmedium  
10% Z8 (Staub 1961).

Test Start dato: 18/6-90 Varighet: 72 tim  
dok: Testede konsentrasjoner: 8.2, 15, 26, 46 og 74 %.  
(konsentrasjonene korrigert for fortykning ved nedbrytbar-  
hetstesten).

Inku- 50 ml kulturer i 100 ml rundkolber. Inkubert på gyngbord  
bering: Lys: 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , kontinuerlig fra "dagslys"-lysstoffrør  
Temperatur: 20 °C  
pH i kontroll ved start: 7.2, pH ved slutt: 8.5  
Måling av celletetthet: Partikkel telling med  
Coulter Multisizer


Resultat: Tabell 1 viser celletetthet ved hvert målepunkt, beregnet areal under vekstkurven og veksthastighet i hver kolbe. Middelværdier for hver konsentrasjon og for kontrollene er listet nederst i tabellen. Vekstkurvene for hver konsentrasjon er vist i figur 1. Konsentrasjon/respons-kurver for veksthastighet og areal under vekstkurve er vist i henholdsvis fig. 2 og 3.

	Veksthastighet	Areal under vekstkurve
EC <sub>50</sub> :	21%	6.6%
95 % koinf. lim.	16 - 27%	4.9 - 9.0%
NOEC	<8.2%	<8.2%

EC<sub>50</sub> (Konsentrasjon som gir 50% effekt på veksthastighet eller areal under vekstkurve) er bestemt ved lineær regresjon av probit-transformert respons mot logaritmen for konsentrasjon. NOEC (No Effect Concentration)= høyeste testede konsentrasjon uten signifikant inhibering. (t-test).

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

Testansvarig:

  
Torsten Källqvist

TEST:&gt;&gt; ISO/DIS 8692

Dato&gt;&gt;&gt; 6.8.90

TESTSTOFF&gt;&gt;&gt;&gt; Neste, Stenungsund etter nedbrytning, (korrigerede konsentrasjoner)

TESTALGE>>>>> *Selenastrum capricornutum*

Medium&gt; ISO

INOKULUM&gt;&gt;&gt;&gt;&gt;

12 mill. celler/l

	Timer:	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal %	V. hast.	V. hast %
		24 mill/l	48 mill/l	72 mill./l				
Kons 1	74	14	12	11	36	0	-0.03	-2
%		13	8	9	-108	0	-0.10	-6
		12	10	9	-84	0	-0.10	-6
Kons 2	46	13	18	39	492	2	0.39	25
%		13	18	32	408	2	0.33	21
		13	25	50	792	3	0.48	30
Kons 3	26	29	67	153	3420	13	0.85	54
%		30	67	78	2544	10	0.62	40
		28	77	180	3960	15	0.90	58
Kons 4	15	45	76	94	3312	13	0.69	44
%		45	78	90	3312	13	0.67	43
		44	84	182	4536	18	0.91	58
Kons 5	8.2	57	130	425	8868	34	1.19	76
%		56	122	464	9120	35	1.22	78
		58	176	810	14616	57	1.40	90
Kons. 6								
Kons. 7								
Kontroll		72	421	1000	23112	89	1.47	94
		73	409	1280	26208	101	1.56	100
		72	425	1110	24528	95	1.51	97
		64	347	1200	23544	91	1.54	98
		65	320	1550	27120	105	1.62	104
		69	335	1800	30576	118	1.67	107

## MIDDELVERDIER

%: 74	Mv.	13.00	10.00	9.67	-52.00	-0.20	-0.07	-4.71
	St. d.	0.82	1.63	0.94	62.99	0.24	0.03	2.02
%: 46	Mv.	13.00	20.33	40.33	564.00	2.18	0.40	25.53
	St. d.	0.00	3.30	7.41	164.83	0.64	0.06	3.90
%: 26	Mv.	29.00	70.33	137.00	3308.00	12.80	0.79	50.72
	St. d.	0.82	4.71	43.15	583.48	2.26	0.12	7.73
%: 15	Mv.	44.67	79.33	122.00	3720.00	14.39	0.75	48.35
	St. d.	0.47	3.40	42.46	577.00	2.23	0.11	6.88
%: 8.2	Mv.	57.00	142.67	566.33	10868.00	42.05	1.27	81.39
	St. d.	0.82	23.80	173.03	2652.23	10.26	0.10	6.10
	Mv.							
	St. d.							
	Mv.							
	St. d.							
Kontroll	Mv.	69.17	376.17	1323.33	25848.00	100.00	1.56	100.00
	St. d.	3.53	43.15	272.56	2537.65	9.82	0.07	4.25

Neste Oxo Stenungsund, etter nedbrytn.  
Senastrum, vekstkurver

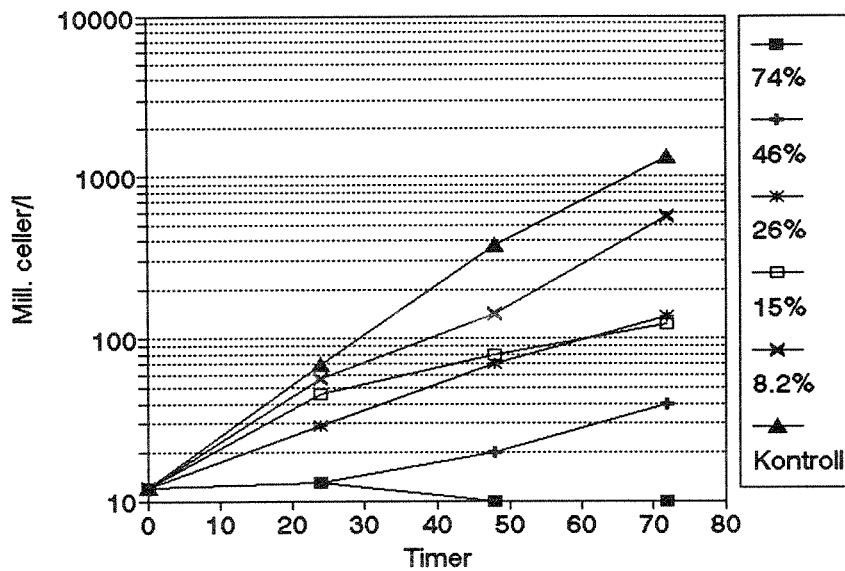


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann.

Neste Oxo, Stenungsund etter nedbrytning  
*Senastrum*, veksthastighet

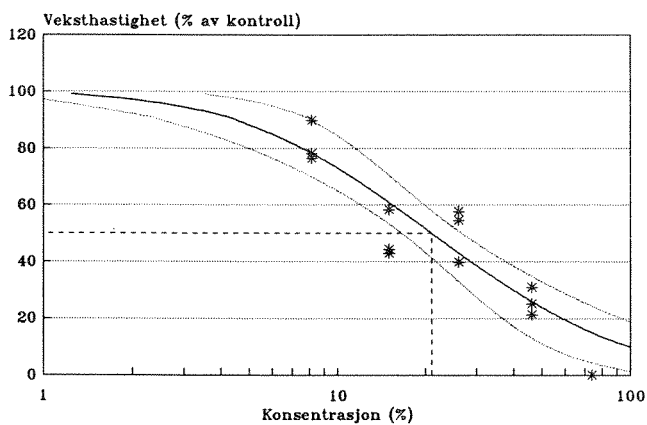


Fig. 2. Effekt av avløpsvann på veksthastigheten hos *Selenastrum capricornutum*

Neste Oxo, Stenungsund etter nedbrytning  
*Senastrum*, areal under vekstkurve

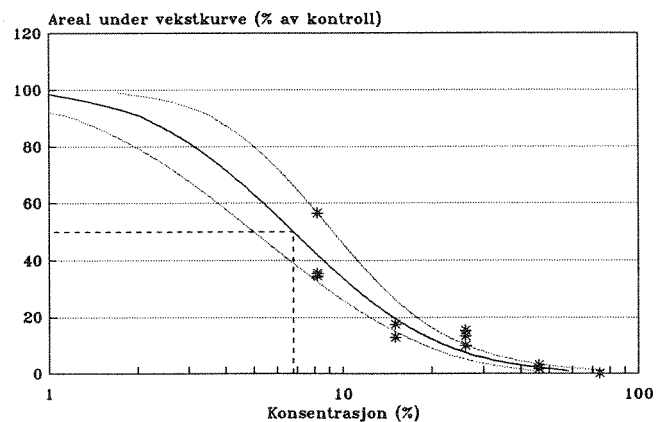


Fig. 3. Effekt av avløpsvann på areal under vekstkurve for *S. capricornutum*

## APPENDIX 7

### Toxicitetstest med marina alger

Undersökning av algtoxiciteten hos avloppsvatten från Stenungssundsområdet - STORK.

Sten-Åke Wängberg och Sverker Molander, Avdelningen för Fysiologisk Botanik, Göteborgs Universitet

#### METODER

Tillvägagångssättet följer i stort sett det som gjordes i MUST-utredningen (Wängberg et al, 1984). Några förändringar har gjorts för att anpassa det hela till den standard som utvecklats (Blanck och Björnsäter, 1989). Den viktigaste förändringen är att näringsmediet har ändrats så att odlingen nu skett i ISO-medium (12%) med berikning av silikat (1.15 mg/l) och vitaminer (thiamin 12.5  $\mu\text{g/l}$ , biotin 0.125  $\mu\text{g/l}$  och B<sub>12</sub> 0.125  $\mu\text{g/l}$ ). Ljusstyrkan under odlingen var 45  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (kontinuerligt ljus). Som saltvatten användes djupvatten från Kristineberg vilket antogs ha en salinitet på 33 ‰. Detta späddes med destillerat vatten till en salinitet på 26 ‰ i näringsmedierna.

Utläggningen på plattorna framgår av figur 1. Av denna framgår att vi för varje koncentration har gjort en salinitetskontroll för att kontrollera att den toxicitet som visade sig inte var beroende av salinitetseffekter. I denna späddes destillerat vatten på samma sätt som avloppsvattnet. Den högsta koncentration som testades var 40% avloppsvatten vilket gav en salinitet på 18.6 ‰ i salinitetskontrollen.

Avläsningen av tillväxt skedde visuellt på ljusbord efter 5 och 12 dagars inkubering. Vid avläsningen noterades om det skett någon synbar växt över huvud taget och om den bildade algbiomassan var lägre än kontrollen. Den lägsta koncentration där ingen tillväxt skett betecknas EC100 medan den högsta koncentration där tillväxten är lika stor som kontrollen betecknas EC0. Vissa avloppsvatten skapade förändringar i sedimentationen och pelletbildning i mikrotiterplattan. Dessa förändringar har inte tagits med i sammanställningen av resultat om det inte var uppenbart att biomassan var mindre än kontrollen.

I tabell 1 ges även geometriska medelvärden samt range för de olika vattnen vid de olika avläsningstillfällena. När tillväxten var densamma i den högsta testade koncentrationen som i kontrollen har EC0-värdet satts till 40% vid beräkningen

av geometriskt medelvärde och då tillväxt skedde även i den högsta koncentrationen sattes EC100-värdet till 80%.

#### Testade algarter

Följande stammar av alger testades:

#### CHLOROPHYCEAE

Dunaliella tetriolecta Butcher MBL

#### PRASINOPHYCEAE

Platymonas subcordiformis (Willie) Hazen CCAP 161/19

Tetraselmis sp. CCAP 66/8

#### PRYMNESIOPHYCEAE

Emiliana huxleyi (Lohm.) Hay et Moher NIVA-7/82

Hymenomonas carterae (Braarud & Fagerl.) Braarud CCAP 961/8

#### DINOPHYCEAE

Prorocentrum minimum Schiller NIVA-2/85

#### RHODOPHYCEAE

Porphyridium cruentum (Ag.) Nägeli UTEX 161

#### BACILLARIOPHYCEAE

Phaeodactylum tricornutum Bohlin UTEX 642

MBL = Marinbiologiskt Laboratorie, Helsingör

CCAP = The Culture Collection of Algae and Protozoa, Cambridge

NIVA = Norsk Institutt for vannforskning, Oslo

UTEX = The Culture Collection of algae at the University of Texas at Austin.

#### RESULTAT

En sammanställning av resultaten ges i Tabell 1. Något förvånande visade det sig att åldringen av vatten inte minskade toxiciteten, snarare ökade den i flera fall. För att kontrollera att detta inte var något misstag reproducerades testen med vattnen från Neste och Statoil för två alger (Phaeodactylum och Prorocentrum) vilket gav samma resultat. Prorocentrum visade en dålig tillväxt vilket gör att 5-dagars värden inte var möjliga att avläsa med den teknik som använts. Emiliana uppvisade ibland minskad tillväxt i salinitetskontrollen för den högsta koncentrationen vilket ingen annan alg gjorde.



**REFERENSER**

Blanck H., Björnsäter B. (1989): The algal microtest battery - A manual for routine tests of growth inhibition. KEMI report 3/89.

Wängberg S.-Å., Molander S., Blanck H. (1984) Inverkan av åtta industriella avloppsvatten på tillväxt av arton marina mikroalger. i Granmo Å: Delprojekt Vatten, MUST rapport nr 1. SNV PM 1845.



Tabell 1

5-dagars avläsning ECO (%)		
	Neste	* åldrat
Dunaliella bioculata	Färskt 5	2.5
Platymonas subcordiformis	20	5
Tetraselmis sp.	5	10
Emiliana huxleyi	2.5	1.25
Prorocentrum minimum	-	-
Porphyridium cruentum	5	2.5
Phaeodactylum tricornerutum	5	1.25
Hymenomonas carterae	>	10
geom.medel	7.430	3.365
range	2.5->	1.25-10
5-dagars avläsning EC100		
	Neste	åldrat
Dunaliella bioculata	Färskt >	>
Platymonas subcordiformis	>	>
Tetraselmis sp.	>	>
Emiliana huxleyi	5	20
Prorocentrum minimum	-	-
Porphyridium cruentum	40	20
Phaeodactylum tricornerutum	>	>
Hymenomonas carterae	>	>
geom.medel	48.761	53.836
range	5->	20->
12-dagars avläsning ECO		
	Neste	åldrat
Dunaliella bioculata	Färskt >	40
Platymonas subcordiformis	>	20
Tetraselmis sp.	>	>
Emiliana huxleyi	2.5	2.5
Prorocentrum minimum	-	-
Porphyridium cruentum	>	5
Phaeodactylum tricornerutum	>	20
Hymenomonas carterae	>	20
geom.medel	26.918	14.860
range	2.5->	2.5->
12-dagars avläsning EC100		
	Neste	åldrat
Dunaliella bioculata	Färskt >	>
Platymonas subcordiformis	>	>
Tetraselmis sp.	>	>
Emiliana huxleyi	20	>
Prorocentrum minimum	-	>
Porphyridium cruentum	>	>
Phaeodactylum tricornerutum	>	>
Hymenomonas carterae	>	>
geom.medel	65.627	80.000
range	20->	>

\* OBS. Koncentrationerna av åldrat vatten är inte korrigerade för den utspädning som gjordes vid nedbrytbarhetstesten (82:100). De angivna koncentrationerna skall alltså multipliceras med 0.85 för att representera det ursprungliga avloppsvattnet.

## APPENDIX 8

**Akut toxicitet, *Nitocra spinipes***

**TESTRAPPORT****TOKSISITETSTEST MED NITOCRA SPINIPES**

Metode: Forslag til Dansk Standard Akut Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret *Nitocra spinipes*. Statisk metode. DS F 88/225.

TESTSTOFF: NESTE-OXO Stenungsund. Avløpsvann

TESTORGANISMENS OPPRINNELSE: Stamme fra VKI Danmark

FØRINGSBETINGELSER: Dyrket i henhold til forslag til Dansk Standard

TESTBETINGELSER: Sjøvann fra 40 m, utenfor Solbergstrand. Fortynnet med testprøve, eller destillert vann til 1,5 % og justert til pH 8.0.

Antall enheter: 5 pr. konsentrasjon. Antall individ pr. kons.: 5-7.

Testtemperatur: 20 ± 0,5 °C pH: 7,9 - 8,0 Oksygen metn.% = > 95

Testkonsentrasjoner: 5.6, 10, 18, 32 og 56 %

Testperiode: 18.06 -22.06.1990

Kontrollstoff: Kaliumdikromat, 96 t  $EC_{50} = 31,3$  mg/L

**RESULTATER:**

% dødlighet (immobilitet) i kontrollene: 96t = 0

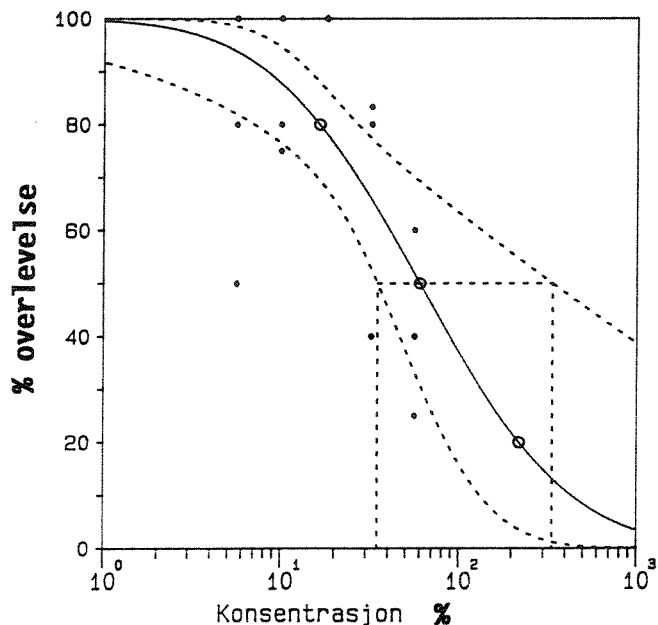
96 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

Verdier	Avl.vann %	95 % konfidensintervall
LC <sub>50</sub>	60	35 -
LC <sub>20</sub>	16	
LC <sub>80</sub>	-	

**Kommentarer:**

På grunn av lav giftighet er det utført få test-konsentrasjoner med tilstrekkelig dødlighet til å gi en probit-beregning med pålitelig konfidensintervall.

Dose-respons diagram: PROBIT



Norsk institutt for vannforskning

**TESTRAPPORT****TOKSISITETSTEST MED NITOCRA SPINIPES**

Metode: Forslag til Dansk Standard Akut Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret *Nitocra spinipes*. Statisk metode. DS F 88/225.

TESTSTOFF: NESTE-OXO Stenungsund. Avløpsvann. Etter bionedbrytning BOD<sub>28</sub>

TESTORGANISMENS OPPRINNELSE: Stamme fra VKI Danmark

FØRINGSBETINGELSER: Dyrket i henhold til forslag til Dansk Standard

TESTBETINGELSER: Sjøvann fra 40 m, utenfor Solbergstrand. Fortynnet med testprøve, eller destillert vann til 1,5 % og justert til pH 8.0.

Antall enheter: 5 pr. konsentrasjon. Antall individ pr. kons.: 5-7.

Testtemperatur: 20 ± 0,5 °C pH: 8,0 - 8,0 Oksygen metn.% = > 95

Testkonsentrasjoner av testprøve: 8.2, 14.8, 26.2, 28.7, 41 og 57.4 % \*

Testperiode: 02.08 -06.08. og 09.08.1990

Kontrollstoff: Kaliumdikromat, 96 t EC<sub>50</sub> = 29 og 24 mg/L

**RESULTATER:**

% dødlighet (immobilitet) i kontrollene: 96t = 0

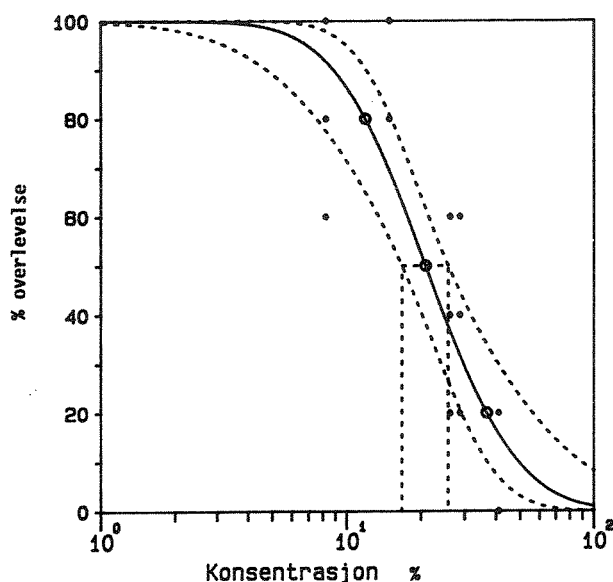
96 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

Verdier		95 % konfidensintervall
Avl.vann %		
LC <sub>50</sub>	21	17 - 26
LC <sub>20</sub>	12	
LC <sub>80</sub>	37	

**Kommentarer:**

Normale dose-respons kurver.  
Økt giftighet sammenlignet med før bionedbrytning.

Dose-respons diagram: PROBIT



\* Konsentrasjonene korrigeret for fortynning ved nedbrytbarhetstesten

## APPENDIX 9

### Reproduktionstest, *Nitocra spinipes*

**TESTRAPPORT****REPRODUKSJONSTEST MED NITOCRA SPINIPES**

Metode: Forslag til Dansk Standard Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret *Nitocra spinipes*. Reproduksjons-metode.

TESTSTOFF: NESTE-OXO Stenungsund. Avløpsvann

TESTORGANISMENS OPPRINNELSE: Stamme fra VKI Danmark

FØRINGSBETINGELSER: Dyrket etter metodeforslag fra WKI, Danmark.  
Ekstra føring etter 7 døgn med ca 1 mg tørket fiskefôr.

TESTBETINGELSER: Sjøvann fra 40 m, utenfor Solbergstrand. Fortynnet med testprøve, eller destillert vann til 1,5 % og justert til pH 8.0.

Antall enheter: 4 pr. konsentrasjon. Antall individ pr. kons.: 20.

Testtemperatur: 20 ± 0,5 °C    pH: 7,9 - 8,0    Oksygen metn.% = > 90

Testkonsentrasjoner: 5.6, 10, 20 %

Testperiode: 05.07 -19.07. og 18.09. - 1.10.1990 (20 % testkons.)

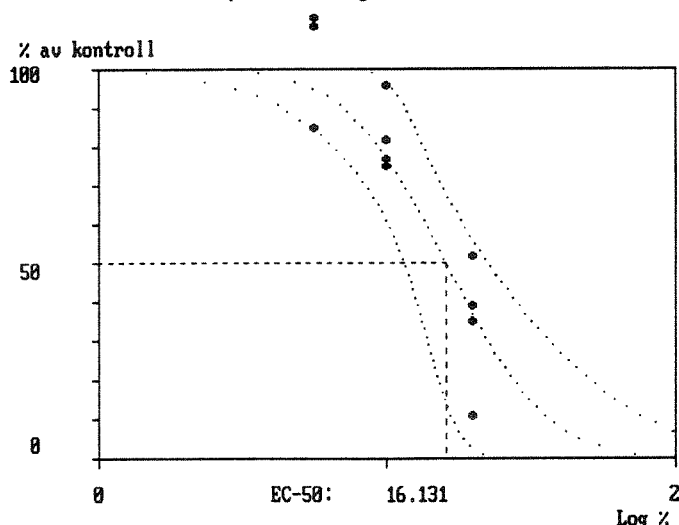
**RESULTATER:**

Kons.	Antall Glass	Foreldre		Antall avkom			Copepod. Nauplier	
		Individ	Lev. 14 d	Totalt	Snitt/gl	SD	snitt/gl	snitt
Kontroll	4	5	20	463	116	20	58	58
kontroll *	4	5	20	901	225	34	112	113
5.6	4	5	15	515	129	20	64	65
10	4	5	12	382	95	9	46	49
20 *	4	5	17	309	77	33	20	57

EC<sub>50</sub>-verdi= 16 %. 95 % konf. int. 11.5 - 23 % avløpsvann

**Kommentarer:**

20 % testprøve ble utført adskilt fra de øvrige. Produksjonen av avkom var vesentlig høyere enn ved første test. Dette kan forklares ved forskjell i livssyklus hos foreldregenerasjonen. Utviklingen fra nauplier til copepod-itter er tydelig påvirket ved 20 %.

**Dose-respons diagram:****Referanse:**

Renberg, L. et al. 1980 Chemosphere 9: 143-150.  
Chlorinated guaiacols and catechols bioaccumulation potential in bleaks (*Alburnus alburnus*, Pisces) and reproductive and toxic effects on the harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea).



**TESTRAPPORT****REPRODUKSJONSTEST MED NITOCRA SPINIPES**

Metode: Forslag til Dansk Standard Økotoksikologisk undersøgelse med krebsdyret *Nitocra spinipes*. Reproduksjons-metode.

TESTSTOFF: NESTE-OXO Stenungsund. Avløpsvann Etter nedbrytning.

TESTORGANISMENS OPPRINNELSE: Stamme fra VKI Danmark

FØRINGSBETINGELSER: Dyrket etter metodeforslag fra WKI, Danmark.  
Ekstra føring etter 7 døgn med ca 1 mg tørket fiskefôr.

TESTBETINGELSER: Testprøve etter bionedbrytning er tilsatt salter iflg. SS 028189, tilsvarende  $\approx 1,5$  % salinitet. Justert pH til pH 8.0.

Antall enheter: 4 pr. konsentrasjon. Antall individ pr. kons.: 20.

Testtemperatur: 20  $\pm$  0,5 °C pH: 7,9 - 8,0 Oksygen metn.% = > 90

Testkonsentrasjoner: 8.2, 14.8, 26.2, 46 % korrigert for fortynning ved nedbrytbarhetstesten

Testperiode: 18.09. - 1.10.1990

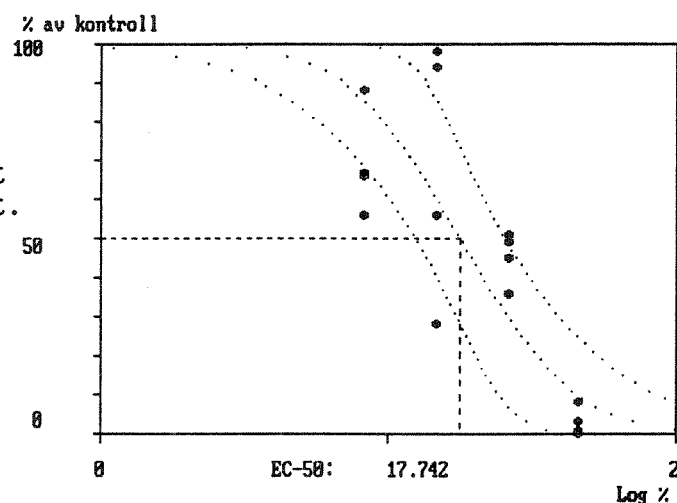
**RESULTATER:**

Kons.	Antall Glass	Foreldre		Antall avkom			Copepod. Nauplier	
		Individ	Lev. 14 d	Totalt	Snitt/gl	SD	snitt/gl	snitt
kontroll	4	5	20	901	225	34	112	113
8.2 %	4	5	20	624	156	26	72	84
14.8 %	4	5	20	620	155	65	46	49
26.2 %	4	5	20	407	102	13	39	63
46 %	4	5	19	25	6	6	0	6

EC<sub>50</sub>-verdi = 17 % 95 % konf. int. 12 - 25 % avløpsvann.

**Kommentarer:**

Spesielt stort standard avvik (SD) for 14.8 % kons. p.g.a. lite avkom fra individ i to testglass.  
Ved 26 % var utviklingen av nauplier til copepoditter betydelig påvirket, og ved 46 % testkonsentrasjon ble det ikke funnet copepoder i det hele tatt. Ved høyeste testkonsentrasjonen ble det født svært få nauplier.

**Dose-respons diagram:****Referanse:**

Renberg, L. et al. 1980 Chemosphere 9: 143-150.  
Chlorinated guaiacols and catechols bioaccumulation potential in bleaks (*Alburnus alburnus*, Pisces) and reproductive and toxic effects on the harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea).



VANDUNDERSØGELSE:

ØKOTOKSIKOLOGISK TESTNING  
MED KREBSDYRET NITOCRA SPINIPES  
- AKUT OG KRONISK TEST

UDARBEJDET AF:

LIC.SCIENT. K. OLE KUSK  
CAND.SCIENT. ESTELLE BJØRNESTAD  
1983.11.04

(REVIDERET 1988.09.16)

METODEFORSKRIFT FOR ØKOTOKSIKOLOGISK TESTNING MED KREBS-  
DYRET NITOCRA SPINIPES - AKUT OG KRONISK TEST

-----

1. INDLEDNING

Krebsdyr er generelt en dyregruppe, som anses for følsom overfor miljøfremmede stoffer og tungmetaller, og krebsdyr er derfor velegnede til økotoksikologisk testning af sådanne stoffer.

Dyr, der i Danmark skal kunne anvendes i tests året rundt, skal kunne holdes i kultur i laboratoriet, da det danske klima ikke tillader indsamling af dyr på alle årstider.

Krebsdyret Nitocra spinipes, Boeck, tilhører ordenen Harpacticoida (harpacticiderne).

N. spinipes opfylder en række krav, som man må stille til dyr, der skal holdes i laboratoriet. Blandt disse kan nævnes følgende:

Den lever og reproducerer på knust fiskefoder,  
den optræder ikke kannibalistisk,  
den er lidet pladskrævende,  
den tåler temperaturer fra 0-30° C  
og saltpromiller fra 1-35.

(3-25) *Smudsrik*

Tillige er den påvist i Nivå Bugt samt flere steder i umiddelbar nærhed af Danmark (svenske, norske, øst- og vesttyske kyster, bl.a. ved Nordsøen) og kan således formodes at være ret almindeligt forekommende ved danske kyster. Herudover har den en vid geografisk udbredelse.

Disse egenskaber og forhold gør N. spinipes til en særdeles velegnet testorganisme ved økotoksikologiske undersøgelser.

## 2. BESKRIVELSE AF ARTEN

Nitocra spinipes opnår som voksen en længde på 0,6 mm for hanner og 0,8 mm for hunner. Arten er som nævnt vidt udbredt /1/. Den forekommer ofte i stort antal i kystnære områder, især på og i de øverste mm af sandbund og på bundens plantedække. Den tolererer saltholdigheder fra 1-35 ‰ og temperaturer fra 0-30° C /2/.

Dyrene når voksenstadiet 10-14 dage efter klækningen. Parringen finder sted umiddelbart efter, at hunnerne har kastet sidste larvehud og dermed nået voksenstadiet. Parringen kan vare fra et par timer og op til 2 døgn. Hunnerne kan opbevare sæden, således at de kun behøver at parre sig én gang i deres liv /2/. Hunnerne anlægger herefter en ægsæk (figur 1). Så snart larverne er klækket og har forladt ægsækken, kastes denne og en ny anlægges efter 1-2 døgn. Dette kan gentages adskillige gange (8 eller mere) /2/.

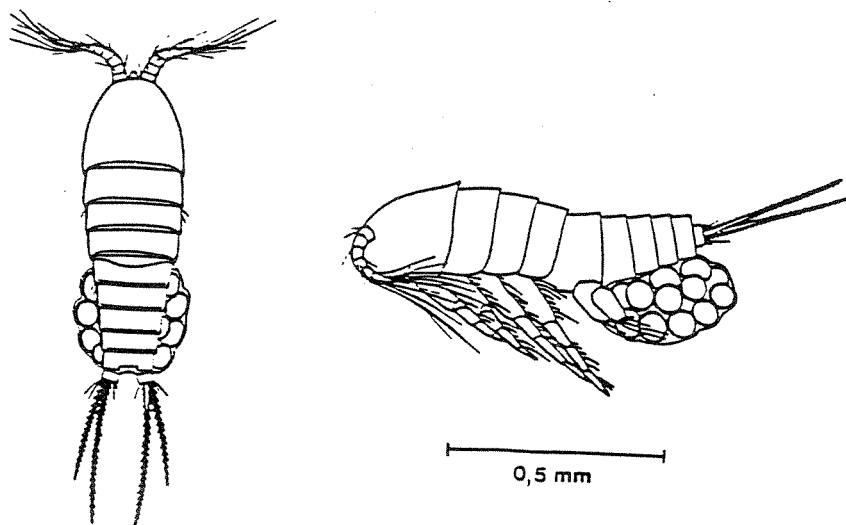
Som andre krebsdyr vokser N. spinipes kun ved hudskifter. Larverne gennemgår således adskillige stadier (figur 2), der adskilles af hudskifter. Under selve hudskiftet antages det, at dyrene er særligt følsomme. Der er 6 naupliestadier og 5 copepodstadier inden voksenstadiet nås.

## 3. KULTIVERING AF NITOCRA SPINIPES

N. spinipes har været holdt i laboratoriet siden 1975 /2/. På VKI har den været holdt siden 1981.

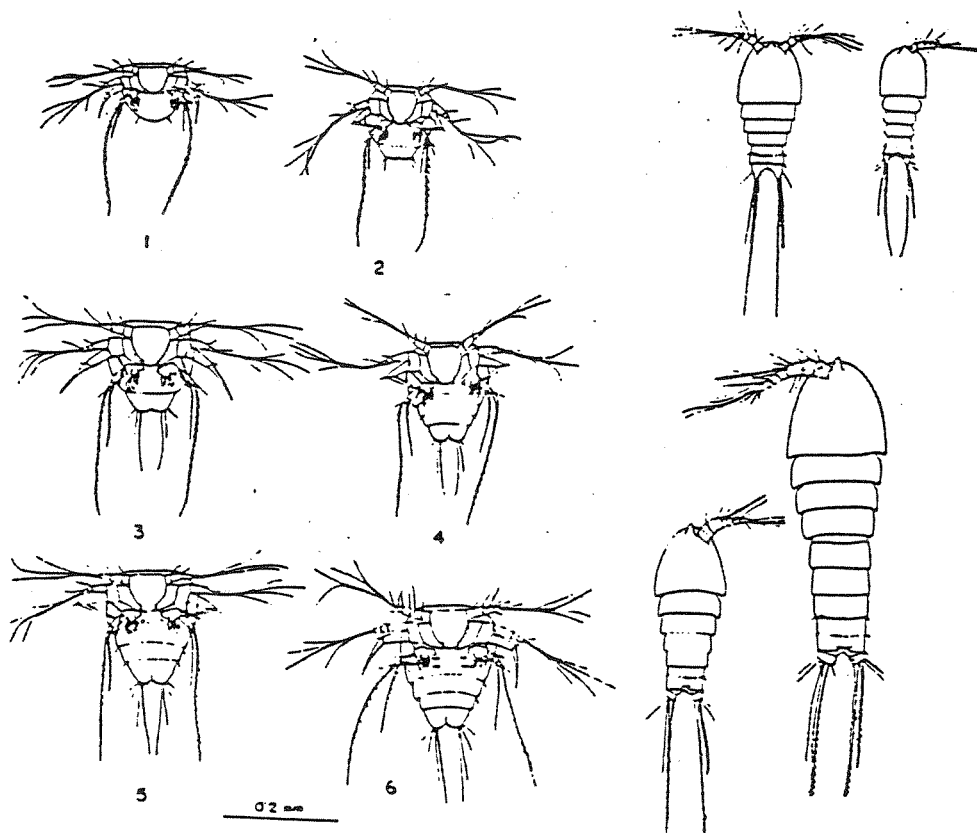
På VKI holdes dyret i filtreret, naturligt havvand med saltpromiller på 9 og på 15 ved 20° C.

Havvandet (mediet) varmebehandles (opvarmes til 80° C) inden anvendelsen.



Nitocra spinipes

Figur 1 Nitocra spinipes - hun med ægsæk set fra oven og fra siden



Figur 2 Nitocra spinipes - larveudvikling 1.-6. nauplie-  
stadie til venstre og fire copepoditstadier til  
højre. Fra: Abraham & Gopalon 1975 /5/.

Nitocra spinipes: voksne eller yngre individer  
 (mest) f. s.

Dyrene fodres én gang ugentligt med knust, tørret fiskefoder.

#### 4. METODE FOR AKUT-TEST

##### Princip

Undersøgelsen er en korttidstest for akut toksicitet overfor N. spinipes. Ved undersøgelsen registreres dødeligheden af dyrene hver 24. time i 96 timer i en fortyndingsrække af stoffet/prøven. På grundlag heraf beregnes stoffets/prøvens toksicitet, som angives som de koncentrationer, der efter 96 timer dræber 10 og 50% af dyrene (96 hr LC 10 og LC 50).

##### Fremgangsmåde

Akut-testen udføres som en statistisk test som beskrevet i /2/ bortset fra, at testtiden er forlænget fra 48 timer til 96 timer.

Forsøgsmaterialet er store copepoditter og voksne dyr uden ægsæk.

Som fortyndingsvand anvendes dyrkningsmedium, dvs. naturligt saltvand almindeligvis med en saltpromille på 9 eller 15.

Testene udføres i prøverør af glas med 10 ml testopløsning. I hvert glas anbringes 5 dyr og for hver koncentration anvendes 4 glas, dvs. 20 dyr anvendes pr. koncentration. Glassene anbringes mørkt ved  $20,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ .

Dyrene fodres ikke under akut-testen.

Glassene tilses hver 24. time i 96 timer og antal dyr og antal døde aflæses.

Dyr betragtes som døde, hvis de ligger ubevægelige i 15 sek eller mere efter en svag omrystning af glasset.

Iltindhold og pH måles ved aflæsningerne.

Iltindholdet skal i alle testopløsninger være > 70% af mætning under hele testen.

Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10% ved testens slutning.

Testsystemet og dyrenes følsomhed kontrolleres jævnligt på VKI med  $K_2Cr_2O_7$  som referencestof.

Resultaterne behandles statistisk ved probitanalyse under anvendelse af EDB-programmet PROBIT fra programsystemet SAS /3/. Specielt beregnes de koncentrationer, som er dødelige for 10, 50 og 90% af dyrene (LC 10, LC 50 og LC 90, LC  $\approx$  lethal concentration) efter 24, 48, 72 og 96 timer.

## 5. METODE FOR REPRODUKTIONSTESTEN

### Princip

Fortyndingsrækker af stoffet/prøven fremstilles. Koncentrationerne vælges, bl.a. på grundlag af resultatet af akut-testen, som altid skal udføres forud for reproduktionstesten.

Foder tilsættes og hunner med ægsæk overføres til glassene med testopløsninger. Efter ca. 2 uger foretages en optælling af antallet af afkom og reproduktionen i testopløsningerne udtrykkes i forhold til kontrolreproduktionen. Højeste koncentration uden effekt og laveste koncentration/koncentrationsområde med effekt (EC 20; EC  $\approx$  effect concentration) angives. Tillige angives EC

50-værdien (koncentration/koncentrationsområde, der halverer reproduktionen).

#### Fremgangsmåde

Testen udføres som en statistisk eller som en gennemstrømningstest. Metoden er en modifikation af den i /4/ beskrevne.

Som fortyndingsvand anvendes samme vandtype som i akuttesten.

Testen udføres i glas med 25 ml testopløsning. Inden starten tilsættes til hvert glas 2 mg findelt fiskefoder af typen EWOS T50. 5 hunner med ægsæk overføres til hvert glas. Der anvendes mindst 20 hunner pr. koncentration, dvs. mindst 4 glas pr. koncentration.

Antallet af levende moderdyr optælles mindst 1 gang ugentligt og udvikling og antal af larver vurderes. Ilt og pH måles samtidig i glas, som ikke optælles ved testens afslutning.

Efter 7 dage fodres yderligere med 1 mg foder pr. glas.

Testen afsluttes, når de først klækkede larver nærmer sig voksenstadiet, dvs. på et tidspunkt, hvor stadierne stadig kan skelnes fra hinanden. Ved afslutning optælles antallet af overlevende moderdyr. Herefter dræbes og fikseres alle dyr i alle glassene. Vand og dyr hældes på et filter, og vandet suges bort, hvorefter nauplier, copepoditter og moderdyr optælles.

For hver koncentration angives reproduktionen som antal afkom pr. moderdyr ved starten. Dette forhold udtrykkes også i forhold til kontrolreproduktionen. Tillige angives antallet af overlevende moderdyr ved testens afslutning.



Højeste koncentration uden effekt på reproduktionen og laveste koncentration/koncentrationsområde med signifikant effekt (erfaringsmæssigt EC 20) angives. Tillige angives EC 50-værdien.

## 6. REFERENCER

- /1/ Lang, 1948:  
Monographie der Harpacticiden.  
II - 1682 pp. Stockholm.
  
- /2/ Bentgsson, B.-E., 1981:  
The harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea)  
as a test organism in brackish water toxicological  
bioassays.  
INSERM Vo. 106: 421-430.
  
- /3/ SAS Institute  
SAS/ETS User's Guide, Statistics, 1985 Version 5  
Edition.  
SAS Institute Inc., P.O. Box 8000, Raleigh,  
North Carolina 27511, USA.
  
- /4/ Renberg, L. et al. 1980:  
Chlorinated guaiacols and catechols bio-  
accumulation potential in bleaks (*Alburnus alburnus*,  
Pisces) and reproductive and toxic effects on the  
harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea).  
Chemosphere 9: 143-150.
  
- /5/ Abraham, S. and U.K. Gopalan, 1975:  
Growth of an estuarine harpacticoid copepod  
*Nitocra spinipes* Boeck cultured in the laboratory.  
Bull. Dept. Mar. Sci. Univ. Cochin VII, 2:  
309-318.

SUPPLERENDE LITTERATUR

- Bengtsson, B.-E., 1978:  
Toxicitetstest med *Nitocra spinipes*, Crustacea.  
NORDFORSK, Miljøvårdssekretariatet,  
Publikation 1978:2
- Gopalan, V.K., 1977:  
Experimental mass culture of a harpacticoid  
copepod *Nitocra spinipes* Boeck.  
Proc. Symp. Warm Water Zoopl. Spl,  
Publ. UNESCO/N10: 558-562.
- Bengtsson, B.-E., 1978:  
Use of a harpacticoid copepod in toxicity test.  
Mar. Pollut. Bull. 9: 238-241.
- Noodt, W., 1970:  
Zur Ökologie der Copepoda Harpacticoidea des  
Küstengebietes von Tvärminne (Finland).  
Acta Zoo. Finn. 128: 1-35.
- Muus, B.J., 1967:  
The fauna of the Danish estuaries and lagoons.  
Distribution and ecology of the dominating species  
in the shallow reaches of the mesohaline zone.  
Meddl. Danm. Fisk, Havundersøg. 5: 54-55.
- Linden, E., Bengtsson, B.E., Svanberg, O.  
and Sundström, G., 1979:  
The toxicity of 78 chemicals and pesticide  
formulations against two brackish organisms,  
the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid  
*Nitocra spinipes*.  
Chemosphere 11/12: 843-851.

Bengtsson, B.-E. and Tarkpea, M., 1983:

The acute aquatic toxicity of some substances carried by ships.

Mar. Pollut. Bull. 14(6): 213-214.

Bengtsson, B.-E. and Bergström, B., 1982:

Toxicity tests with *Nitocra spinipes* (Crustacea) and some metals released from a smelter industry.

In: Müller, K. (ed.): Coastal Research in the Gulf of Bothnia. Pp. 439-444.

Dr. W. Junk Publisher, The Hague.

Barnes, H. and Stanbury, F.A., 1948:

The toxic action of copper and mercury salts both separately and when mixed on the harpacticid copepod *Nitocra spinipes*.

J. exp. Biol. 25:270-275.

Tarkpea, M. and Svanberg, O., 1982:

The acute toxicity of motor fuels to brackish water organisms.

Mar. Pollut. Bull. 13(4): 125-127.

Bengtsson, B.-E. and Bergström, B., 1987:

A flowthrough fecundity test with *Nitocra spinipes* (Harpacticoida, Crustacea) for aquatic toxicity.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 14; 000-000.

## ANNEX A

Eksempel på bestemmelse af dødeligheden af et testdyr ved eksponering for et teststof

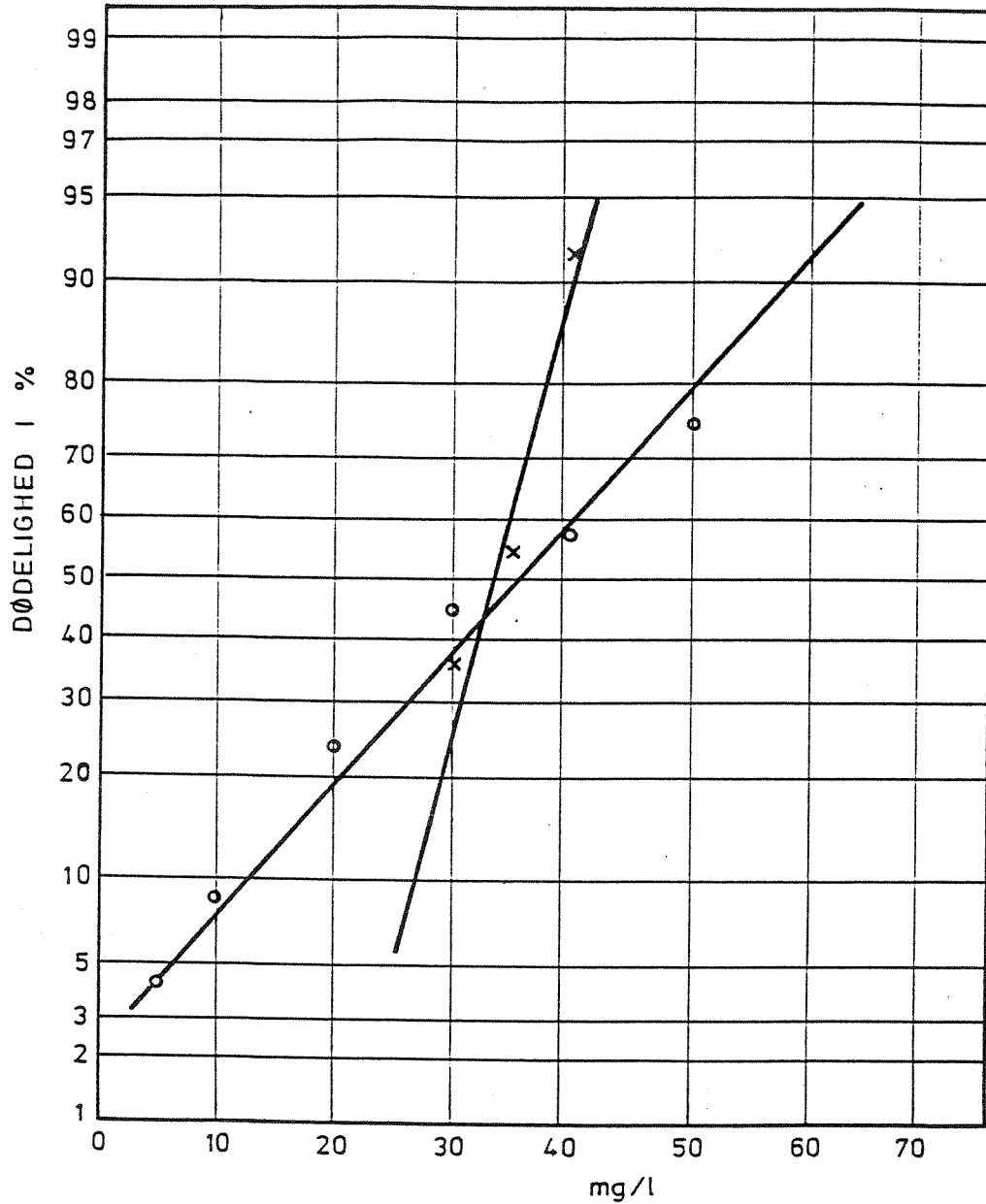
Resultat af preliminær test efter 96 timers eksponering:

KONCENTRATION	ANTAL DYR	ANTAL DØDE
Kontrol	10	0
1 mg/l	10	0
3 mg/l	10	0
10 mg/l	10	1
30 mg/l	10	4
100 mg/l	10	10

Resultat af den definitive test efter 96 timers eksponering:

Kontrol	20	0
2 mg/l	20	0
5 mg/l	24	1
10 mg/l	23	2
20 mg/l	21	5
30 mg/l	22	10
40 mg/l	24	14
50 mg/l	20	15
100 mg/l	20	20

Bestemmelse af LC-værdier kan laves i hånden ved hjælp af kurvetegning (se figur 1) eller ved hjælp af EDB-programmet PROBIT, som findes indlagt i SAS-systemet /1/, der bl.a. er tilgængeligt via UNI·C. SAS-programmet PROBIT er baseret på Finney's metode /2/. Udskriften fra en sådan EDB-behandling af ovenstående data er indsat bagest i annexet.



Figur 1 Dødelighed forårsaget af to stoffer afsat på normalfordelingspapir. Regressionskurverne for de to stoffer er indtegnet.

### Rapportering af LC-værdier:

I figur 1 er indtegnet resultatet af tests med 2 forskellige stoffer. Det ses, at begge stoffer har 96 timers LC 50-værdier nær 35 mg/l. Men LC 10- og LC 90-værdierne er ret forskellige. Derfor er det væsentligt også at angive i hvert fald LC 10-værdien. Denne værdi betragtes ofte som laveste koncentration med en signifikant sikker effekt.

### Dødelighed i kontrollen:

Ved akut test tillades oftest en dødelighed i kontrollen (af tilfældige årsager) på op til og med 10%.

Ved behandlingen af data korrigeres herfor ved hjælp af Abbots formel /2,3/:

$$D_A = \frac{(D/N - D_K/N_K)}{1 - D_K/N_K} ; D_A \geq 0$$

hvor  $D_A$  = korrigeret dødelighed efter Abbots formel  
 $D$  = antal døde observeret i testkoncentration  
 $D_K$  = antal døde i kontrollen  
 $N$  = antal dyr i den pågældende koncentration  
 $N_K$  = antal dyr i kontrollen

### Referencer:

- /1/ SAS-Institute: SAS User's Guide: Statistics. 1985, Version 5 Edition. - SAS Institute Inc., Box 8000, Cary, North Carolina 27511, USA.
- /2/ Finney, D.J., 1971. Statistical Method in Biological Assay. 2. edition. - London, Griffin Press.
- /3/ Stephan, C.E., 1977. Methods for Calculating an LC 50. In: Mayer, F.L. & Hamelink, J.L. (Eds.): Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634. pp. 65-84.

SAS

OBS	CONC	N	DEAD
1	0	20	0
2	2	20	0
3	5	24	1
4	10	23	2
5	20	21	5
6	30	22	10
7	40	24	14
8	50	20	15
9	100	20	20

SAS

10:26 THURSDAY, JANUARY 31, 1985 2

PROBIT ANALYSIS ON CONC

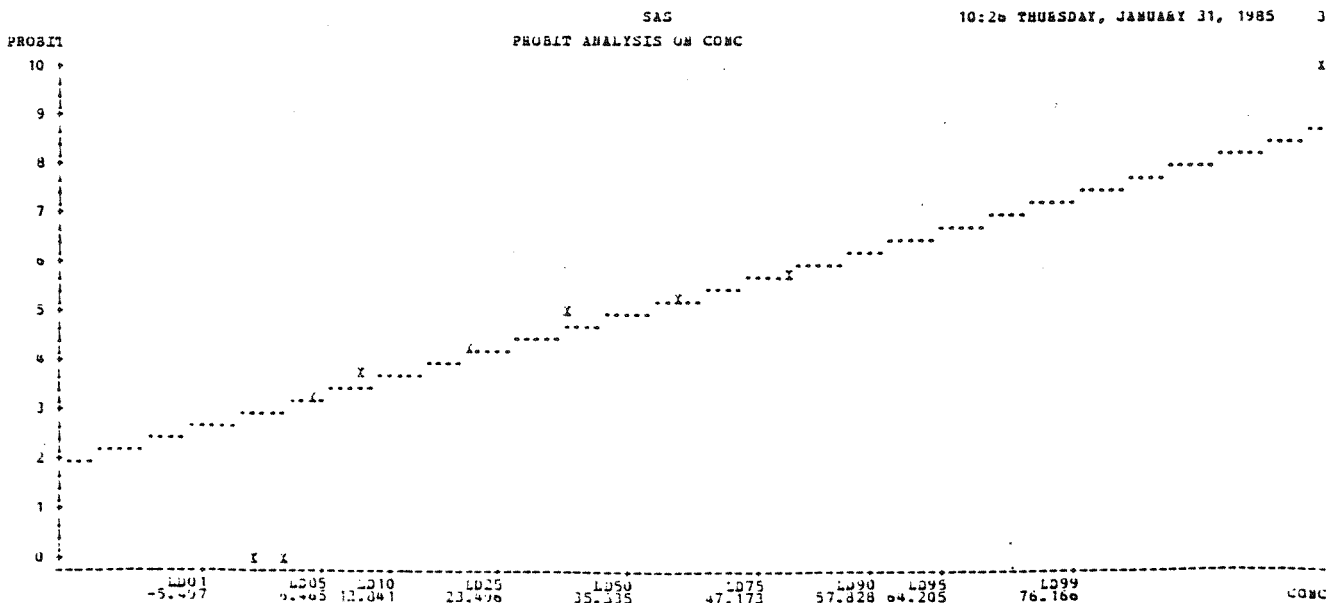
ITERATION	INTERCEPT	SLOPE	MU	SIGMA
0	1.12594769	0.05297550	15.37583312	18.87665194
1	1.77411222	0.03674927	15.31226278	17.82117219
2	2.98685718	0.05697354	15.33469990	17.55208444
3	2.98682902	0.05697430	15.33471983	17.55177289

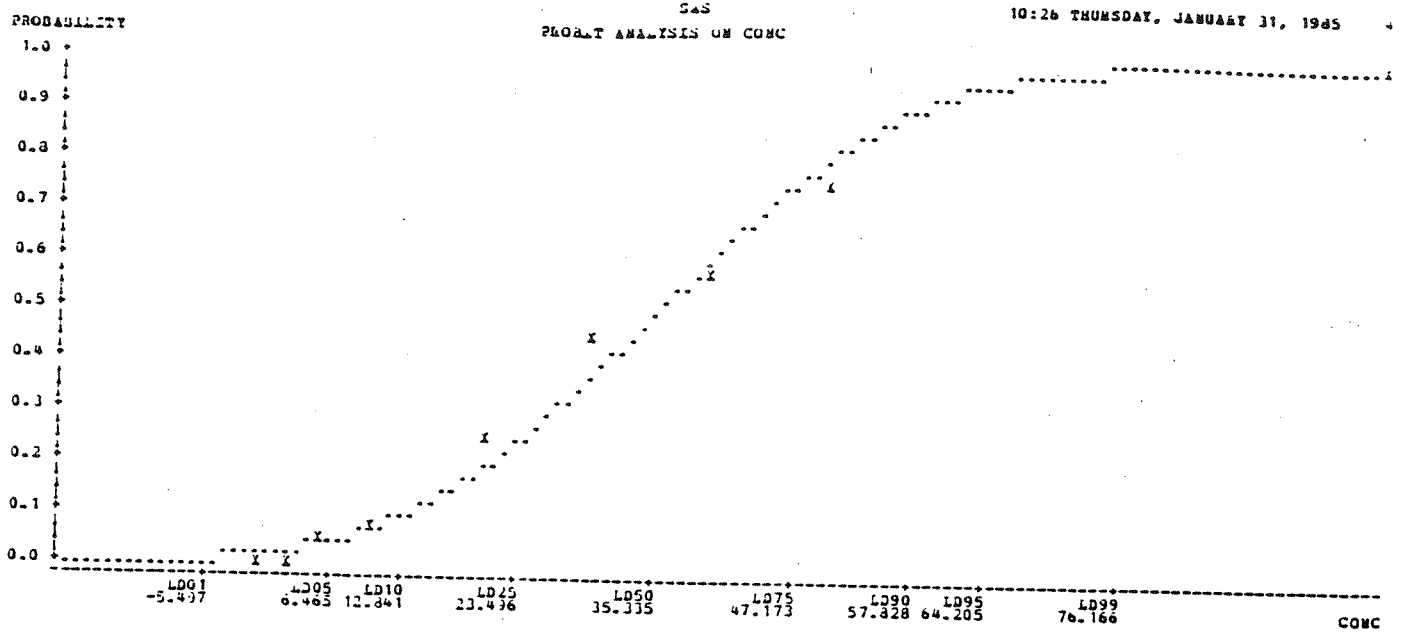
  

COVARIANCE MATRIX		COVARIANCE MATRIX	
	INTERCEPT	SLOPE	MU
INTERCEPT	0.00271621	-0.00171028	5.75718055
SLOPE	-0.00171028	0.00006155	2.51124797
			SIGMA
			3.84096948

CHI-SQ = 2.2437 WITH 7 DF PROB > CHI-SQ = 0.9451

NOTE: SINCE THE CHI-SQUARE IS SMALL (P > 0.10), FIDUCIAL LIMITS WILL BE COMPUTED USING A T VALUE OF 1.96 .





SAS  
PROBIT ANALYSIS ON CONC

PROBABILITY	CONC	95 PERCENT FIDUCIAL LIMITS	
		LOWER	UPPER
0.01	-5.49680365	-18.75425036	2.53086568
0.02	-0.71221456	-12.34354670	6.44109791
0.03	2.32345762	-9.24883529	8.94469324
0.04	4.60707556	-5.27147245	10.84336648
0.05	6.46223328	-2.32091291	12.39975728
0.06	8.04568685	-0.74517204	13.73456048
0.07	9.43197093	1.06593053	14.91378782
0.08	10.67322295	2.67960656	15.97769044
0.09	11.80209202	4.13967062	16.95272551
0.10	12.84121784	5.47664969	17.85277071
0.15	17.14347840	10.92291135	21.69149354
0.20	20.56277511	15.11526172	24.87497804
0.25	23.49622394	18.58189387	27.73615547
0.30	26.13056115	21.57064196	30.42997594
0.35	28.57166253	24.22394894	33.04237560
0.40	30.88802902	26.67674572	35.59262978
0.45	33.12914042	28.87903574	38.10831145
0.50	35.34719633	31.06770733	40.59883518
0.55	37.54029425	33.04743647	43.07831454
0.60	39.78141064	35.04331130	45.55334649
0.65	42.09777714	37.16071185	48.02796006
0.70	44.53887852	39.48497331	49.97809416
0.75	47.17321072	41.93868673	52.42457932
0.80	50.10666456	44.50118172	55.34344466
0.85	53.53596327	47.16857806	59.08111353
0.90	57.82282182	50.05788249	64.27884457
0.91	58.86734765	51.24750683	69.97836764
0.92	59.99621671	52.16860276	71.37020157
0.93	61.23746975	53.01792075	72.88421076
0.94	62.62375281	54.0554967	74.55111537
0.95	64.20481706	55.08721584	76.41523242
0.96	66.06236411	57.08955635	78.54411032
0.97	68.34598204	59.31200443	81.04872014
0.98	71.18165422	61.7468294	84.13230414
0.99	76.16624931	65.21232492	88.23793637
			94.72123628



**APPENDIX 10**

**Akut toxicitet, Storspigg**

UNDERSÖKNING AV AKUT TOXICITET HOS AVLOPPSVATTEN FRÅN BEROL  
NOBEL AB OCH NESTE OXO AB, STENUNGSUND FÖR EN MARIN FISKART

EKOTOXIKOLOGISKA GRUPPEN  
KRISTINEBERGS MARINBIOLOGISKA STATION  
450 34 FISKEBÄCKSKIL

## SAMMANFATTNING

Avloppsvatten från Berol Nobel AB, och Neste Oxo AB i Stenungsund har undersökts med avseende på akut toxicitet för storspigg, en marin fiskart. Arbetet har skett inom ramen för "STORK projektet". För båda industrierna har avloppsvattnet erhållits via Norsk Institutt for Vannforskning. Även avloppsvatten, som genomgått nedbrytbarhetstest (enl. OECD), undersöktes.

Resultaten visar för Berol Nobel AB ett LC50 värde för 48h på 3.0 procent avloppsvatten och ett 72h LC50 på 2.5%

En test med nedbrutet vatten utfördes även, men resultaten kunde inte användas på grund av dålig kondition hos testfisken.

För Neste Oxo AB erhöles ett 48h LC50 värde på 48 procent avloppsvatteninblandning och ett 72h värde på 34 procent. Det nedbrutna vattnet gav ett 48h LC50 värde på 68%

Förutom dödlighet registrerades även subletala (icke dödliga) effekter som beteendeförändringar, och här erhöles för Berol nedsatt aktivitet för 50% av djuren efter 48h (EC50 värde) vid 2% inblandning, EC20 uppskattades till 1% och ett NOEC värde (no observed effect concentration) runt 0.1% . För Neste Oxo erhöles ett 48h EC50 värde på 35 procent, ett EC20 värde på ca. 20% och ett NOEC värde på ca. 10% . För det nedbrutna vattnet blev 48h EC50 värdet 58 procent avloppsvatteninblandning, och ett 48h EC20 värde uppskattades till ca. 10 procent. Något NOEC värde kunde inte beräknas.

Undersökta avloppsvatten

Vattenprover uttogs genom NIVA:s försorg dagligen enl. ett fastställt schema under ett antal veckor. För Berol Nobel AB togs vattnet vid uttagpunkt A4 (enl. företagets beteckning), vilket motsvarar ett totalavloppsvatten före slutlig spädning. Neste Oxo -vattnet uttogs från befintlig sedimenteringsbassäng. Båda vattnen motsvarar dem som undersöktes 1983 i samband med MUST- utredningen. Vattnen levererades frusna till KMBS och användes ofiltrerade.

Följande data uppmättes:

	salthalt	pH
	0/00	
Berol	1.1	8.0
Neste	1.3	7.7
Neste nedbr.	1.3	6.7
Havsvatten	31.1	7.9
Syntetiskt havsvatten	30.4	7.9

### Försöksdjur

Storspigg (*Gasterosteus aculeatus* L.) med en längd av 30 - 50 mm fångade i Gullmarsfjorden. Till varje försökstank användes 10 st fiskar.

### Försöksbetingelser

Försöket utfördes under 48 timmar med semistatistisk teknik med vattenbyte en gång per dygn. Metodiken ansluter till svensk standard (SS028162) och testen utfördes på samma sätt som en tidigare test 1983 (Granmo, 1984). På grund av en begränsad tillgång på avloppsvatten valdes dock försökstiden till 48h.

Försökstankarna var tillverkade av glas, och vattenvolymen var 7 l. Temperaturen under försöket hölls vid 11°C ± 1°C.

För att öka syremättnaden luftades det nya vattnet med luftstenar omedelbart före vattenbyte. Vattnets syrehalt kontrollerades under försökets gång och befanns genomgående ha en tillfredsställande nivå (> 70% mättnad).

Före spädningen av avloppsvattnen justerades deras salthalt till havsvattennivå genom tillsats av salter enl. Brujeviczs (1931). Avloppsvattnens pH-värde justerades så att de blev ungefär samma som havsvattnets.

För utspädning användes vatten från Gullmarsfjorden (35 m) med 31% salthalt. Som kontroll användes dels tankar med syntetiskt dels naturligt havsvatten.

Prövade koncentrationer var:

Berol:	0.1, 1, 10 och 100 %
Neste:	0.1, 1, 10 och 100 %
Neste nedbr.:	25, 50 och 100 %

Avläsningar gjordes regelbundet under försökets gång. Förutom dödlighet noterades även avvikelser från normalt beteende hos fiskarna, såsom passivitet, balansstörningar och förändrad andningsfrekvens. Kumulativ dödlighet avsattes mot tiden för respektive koncentration och letal koncentration för 50% dödlighet beräknades enl. Spearman Karber (Hamilton et al. 1978).

Beteendeförändringarna har uttryckts som 48h EC50, och beräknats på motsvarande sätt som LC50 värdena.

### RESULTAT

BEROL NOBEL AB

Dödligheten framgår av fig. 1. 48h LC50 värdet beräknades till 3% och 72h till 2.5% avloppsvatteninblandning.

Som synes har avloppsvattnet en rel. hög toxicitet. Jämfört med en liknande test utförd 1983 (LC50 = 2 %) är dock avloppsvattnet något mindre toxiskt ( LC50 = 3 %).

Beteendeförändringar i form av passivitet uppträdde, och det mediana värdet vid 48h (EC50) beräknades till 2 procent avloppsvatteninblandning, EC20 värdet var 1% medan NOEC beräknades till ca. 0.1%

#### NESTE OXO AB

För Neste Oxo:s avloppsvatten erhöles ett 48h LC50-värde på 48% inblandning och ett 72h värde på 34% (fig. 2), medan en median icke dödlig effekt (EC50 48h) uppträdde i form av passivitet hos testfisken vid 35% , EC20 beräknades till 20% och ett NOEC värde till ca. 10% .

Motsvarande värden från 1983 är ett 48 h LC 50 på ca. 69% och ett EC 50 värde på ca. 25 procent avloppsvatteninblandning. Sedan 1983 har dock Neste:s reningsanläggning kraftigt förändrats varför direkta jämförelser inte kan göras.

För det nedbrutna vattnet blev 48h LC50 värdet 68% (fig.2), 48h EC 50 värdet 58% och 48h EC20 ca. 10% avloppsvatteninblandning.\*

Undersökningen har utförts vid Kristinebergs marinbiologiska station under september månad 1990 av Esbjörn Telemo och Åke Granmo.

#### LITTERATUR

Brujewicz, S.W. 1931: In N.N. Subow et al. Ed. Oceanographical Tables. Oceanographical Institute, Hydro-Meteorological Committee of USSR, Moscow p. 146.

Granmo, Å. 1984. : Översiktsplan samt biologiska tester av industriavloppsvatten från Stenungsund. SNV rapp. PM 1845.

Hamilton, M.a., R.C. Russo and R.V. Thurston 1977.: Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7):714-719.

Fiskebäckskil 1990-10-23

(reviderad 1991)

Åke Granmo

\* OBS. Koncentrationerna av avloppsvatten efter nedbrytning är inte korrigerade för den utspädning som gjordes vid nedbrytbarhetstesten (82:100). De angivna koncentrationerna skall alltså multipliceras med 0.85 för att representera det ursprungliga avloppsvattnet.

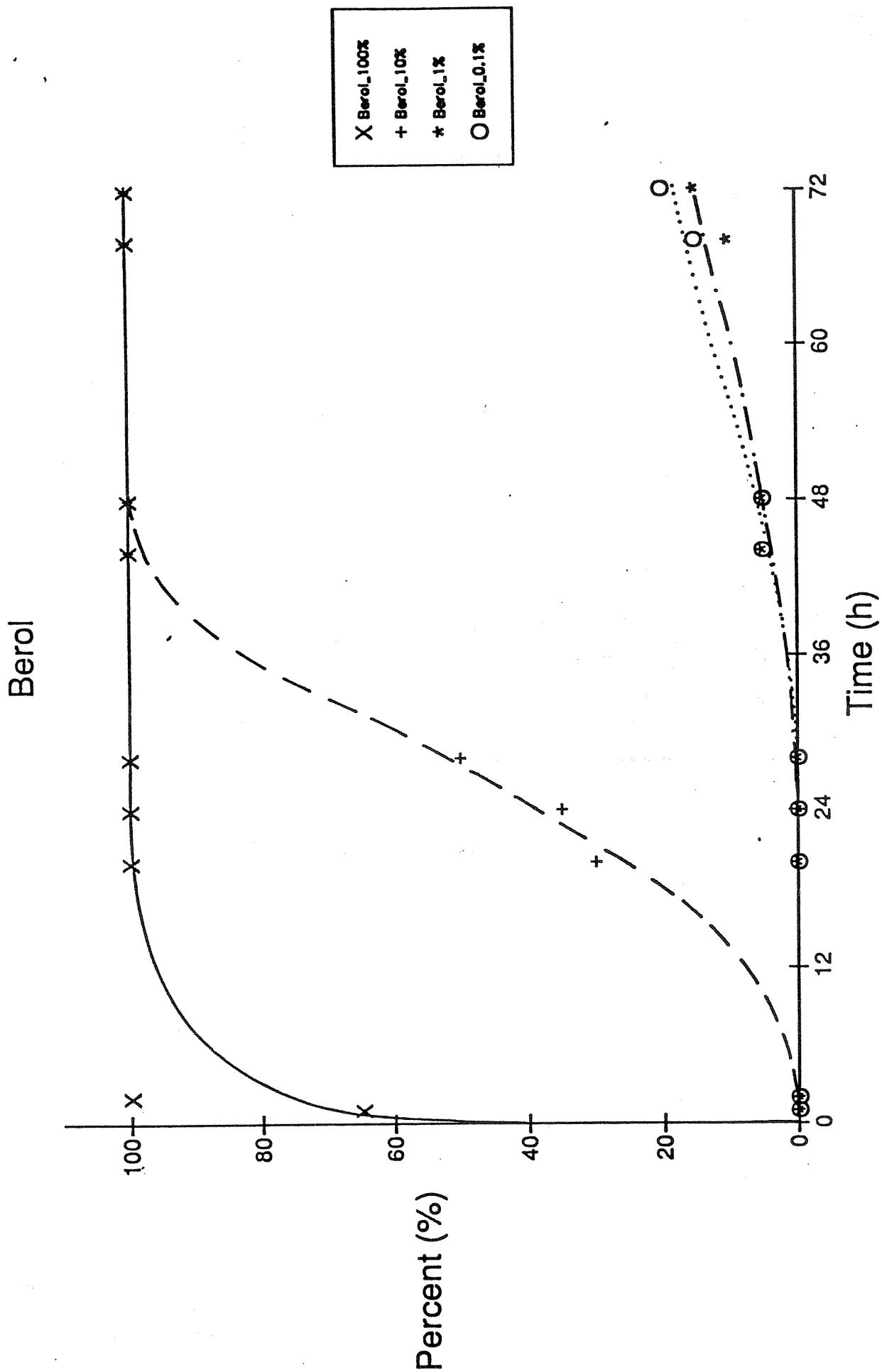


Fig. 1. Kumulativ dödlighet hos storspigg vid exponering för avloppsvatten från Berol Nobel AB.

Neste / Neste degraded

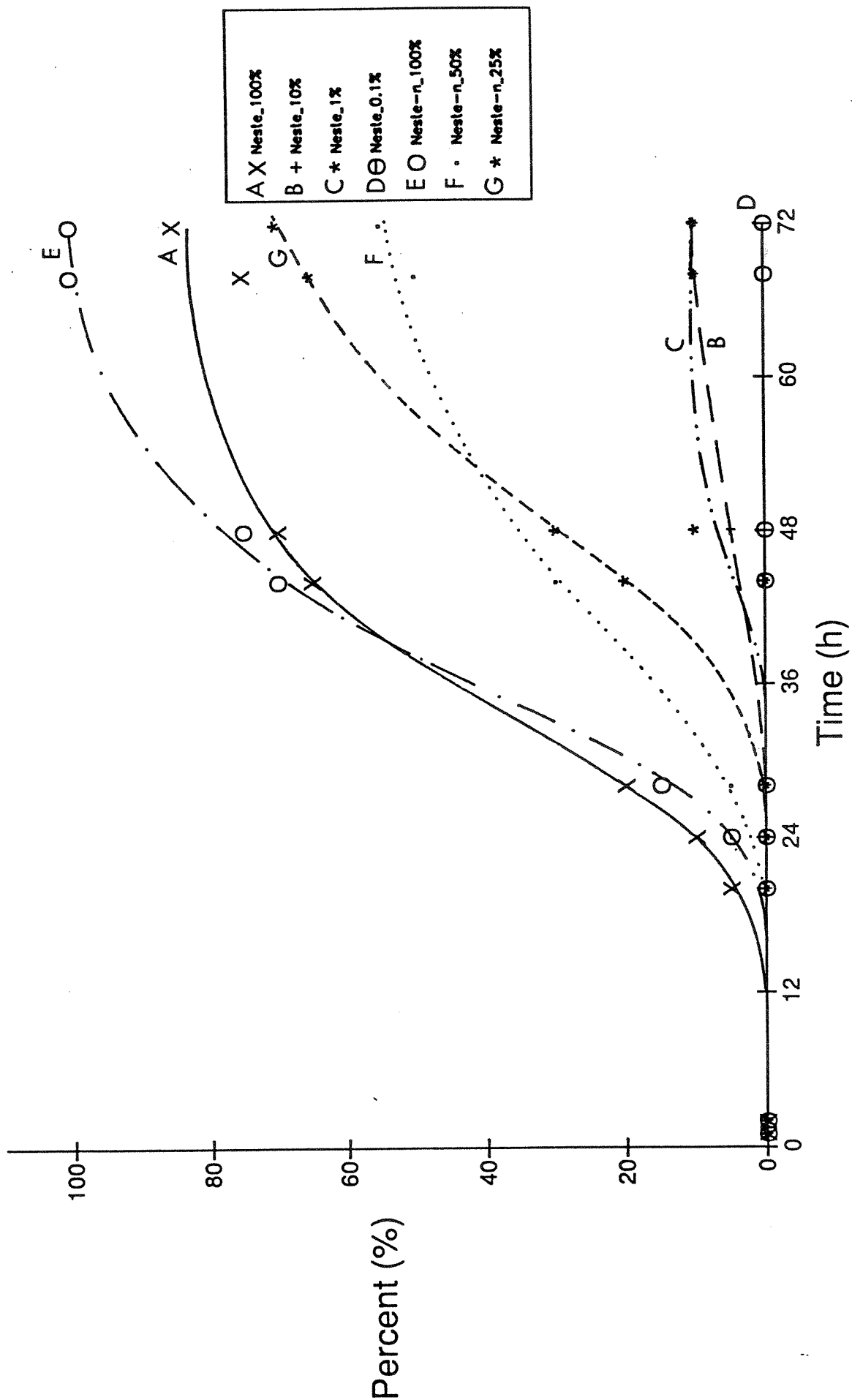


Fig. 2. Kumulativ dödlighet hos storspigg vid expo-nering för avloppsvatten från Neste Oxo AB. "Neste-n" i diagrammet betecknar avloppsvatten som genomgått nedbrytbarhetstest.

**APPENDIX 11**

**Ames test**



## SALMONELLA/MIKROSOMTESTEN

Salmonella/mikrosomtesten er en genotoksisk korttidstest. En beskrivelse av testen er presentert i vedlegg. I disse forsøkene er bakteriestammene TA 98 og TA100 blitt benyttet. Disse har forskjellig følsomhet overfor ulike typer forbindelser. TA 98 er mest følsom overfor mutagener som induserer leserammeforskjyvnng. TA 100 er mest følsom for mutagener som induserer baseparsubstitusjon.

Enkeite forbindelser er mutagener,såkalte direkte mutagener,andre er mutagene bare etter omvandling (metabolisering) i organismen. For å simulere denne metaboliseringen, testes prøvene både med og uten tilsats av et leverenzympreparat (S9).

Et vanlig krav til positivt utslag i Salmonella/mikrosomtesten er en dobling av antall mutantkolonier i forhold til bakgrunnen (spontanmutasjoner) og/eller en klar lineær doserespons sammenheng.

## RESULTATER.

Resultatene fra testingen er presentert i tabellene 1,2,3 OG 4 og viser ingen mutagene effekter i Ames' test da antallet kolonier på prøveplatene ikke er vesentlig forskjellig fra blindprøvene. I høyere doser på 50-100µl var antallet kolonier lavere enn blindprøven. Dette tyder på at prøvene virker toksiske på bakteriene i for høye doser.

## Vedlegg

## NESTE OXO, STENUNGSUND

Tabell 1. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikrosom-testen av ekstrakter av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 2 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller)

Prøve	Vol µl	Bakteristamme Ta98-S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		24	
	10		21	
	20	24	36	20
	50	21		tox
	1 00			tox
Etter nedbr.	5		32	
	10		28	
	20	26		21
	50	29		26
	1 00			TOX
Kontr. 0,2µg NP		20	29	18
		1800	1700	2000

## Vedlegg

## NESTE OXO, STENUNGSUND

Tabell 2. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikrosom-testen av ekstrakter av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 2 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller)

Prøve	vol µl	Bakteristamme Ta98+S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		18	
	10		27	
	20	20	43	20
	50	22		tox
	1 00			tox
Etter nedbr.	5		26	
	10		23	
	20	23		27
	50	28		16
	1 00			tox
Kontr. 5µg BaP		21	27	23
		225	250	360

## Vedlegg

## NESTE OXO, STENUNGSUND

Tabell 3. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikrosom-testen av ekstrakter av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 2 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller)

Prøve	Vol µl	Bakteriestamme Ta100-S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		112	
	10		125	133
	20	119	131	110
	50	tox		112
Etter nedbr.	5		142	
	10		132	107
	20		147	
	50			75
Kontr. 2µg NP		115	120	110
		2000	1500	1600

## Vedlegg

## NESTE OXO, STENUNGSUND

Tabell 4. Mutagenitetstesting med Salmonella/levermikrosom-testen av ekstrakter av avløpsvann. Tallene i tabellen representerer antall kolonier pr. plate. (gjennomsnitt av 2 plater, 5 plater av ubehandlede kontroller)

Prøve	Vol µl	Bakteriestamme Ta100+S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		123	
	10		142	119
	20	103	122	97
	50			73
Etter nedbr.	5		122	
	10		113	105
	20		119	
	50			83
Kontr. 5µg BaP		110	125	114
		1200	1100	1100

## Vedlegg

## OPPARBEIDING AV VANNPRØVER TIL AMES TEST

Vannprøve på 800 ml. surgjøres til pH ca.2 med kons HCl, ekstraheres 3 ganger med dietyleter P.A. ( 350ml totalt.) Ekstraksjonen utføres i en 1L erlenmeyerkolbe med magnetrører på isbad i løpet av 3 t. Eterekstraktet fraskilles vannfasen. Siste rest av vann fryses ut over natten. Eterekstraktet inndampes på Rotavapor på vannbad til nesten tørrhet. Dimetylsulfoksyd (DMSO) 2ml tilsettes og siste rest av eter avdampes på varmeblokk under nitrogentilførsel.

Lit.: Proceedings of the technical Association of the Pulp and Paper Industri 1982 s.382.

## HVA ER AMES' TEST?

Ames' test (Salmonella-testen) benyttes til orienterende undersøkelser av stoffers mutagene (arvestoffskadende), eventuelt kreftfremkallende virkning. Ved forsøk er det funnet at 80-90% av de stoffer som er kreftfremkallende i dyreforsøk, også er mutagene i Ames' test. Metoden er en korttidstest med Salmonella-bakterier, utviklet av Bruce Ames, Berkeley, California.

Det anvendes spesielle Salmonella-bakterier, som mangler evnen til å gro uten aminosyren histidin, dvs bakteriene formerer seg ikke i fravær av histidin. For å vokse og danne kolonier på et histidin-fritt medium, må bakteriene gjennomgå en mutasjon. Et mutagent stoff vil føre til at et økt antall kolonier vokser opp.

Mange stoffer virker som aktive mutagener eller karsinogener først etter omdanning (metabolisering) i kroppen (indirekte mutagener). Bakterier, som har et meget enklere enzymsystem enn pattedyr, vil normalt ikke metabolisere indirekte mutagener. For å simulere betingelsene i pattedyr, aktiveres testsubstansen ved tilsetning av et leverenzympreparat fra rotter til testsystemet.

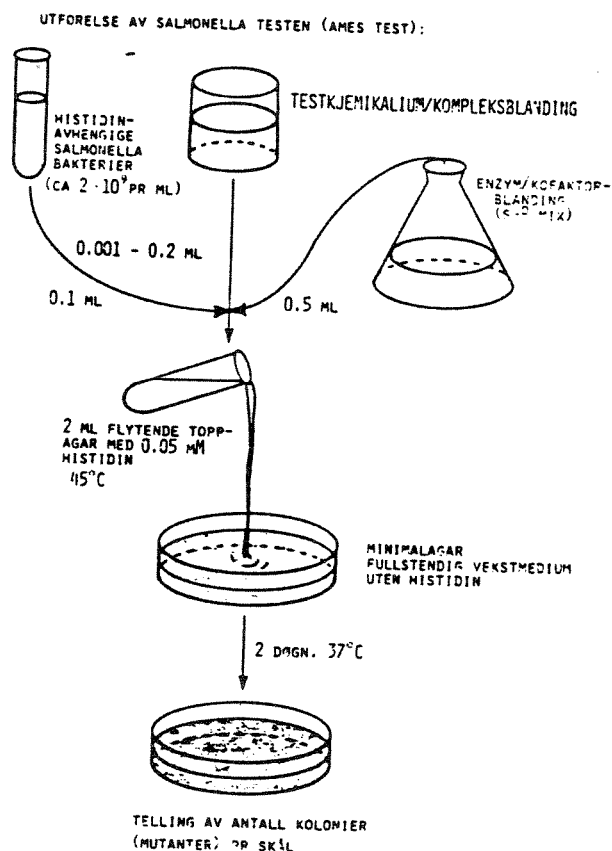
### HVORDAN TESTES PRØVER I PRAKSIS?

Metoden utføres som beskrevet av Ames et al. (Mutation Research 31, 1975, 347).

Rent eksperimentelt gjøres følgende:

Til et reagensrør med 2 ml smeltet toppagar (45°C) tilsettes 0.1 ml bakteriekultur (ca  $10^8$  celler) og testsubstans. Det hele blandes raskt og helles over på vekstplater. (Minimalplater kun tilsatt spor av histidin for igangsettelse av vekst.) Til halvparten av skålene tilsettes leverenzymblanding (S9-mix), 25 mg protein/plate. Platene inkuberes ved 37°C, og etter 2 døgn telles antall kolonier (mutanter) på platene. Et vanlig krav til positivt resultat er en fordobling av antall revertanter i forhold til bakgrunnen, eller en lineær doseavhengighet. Prøvene testes i 3-5 doser, med to paralleller pr dose.

For å kontrollere antall spontanmutasjoner, inkluderes plater uten tilsats av testsubstans. Som positive kontroller blir benzo(a)pyren (BaP) og 1-nitropyren (1NP) benyttet.



## APPENDIX 12

### Nedbrytbarhetstester



Norsk institutt for vannforskning

**TESTRAPPORT****NEDBRYTBARHETSTEST: REDUKSJON I LØST ORGANISK KARBON OVER 28 DØGN**

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

TESTSTOFF: Avløpsvann, NESTE-OXO Stenungsund.

**TESTBETINGELSER**

APPARATUR: 100 L beholder (polyetylen), med magnetrørverk.

TEST-MEDIUM: Avløpsvann tilsatt saltløsninger og destillert vann til en fortykninggrad på 41:50, (82 %).

INOKULUM: Mikroorganismer fra luftet kom. avløpsvann (NS 4749) og effluent fra Husmann enhet (OECD) lab. anlegg.  
Kimtall =  $4 \times 10^5$  /ml. Tilsetning, 2 ml/L

INKUBASJON: Temperatur;  $20 \pm 1.0$  °C . Varighet: 28 dager.

REFERANSE STOFF: Anilin 20 mg C/l  
Nedbrytningsgrad, DOC reduksjon: 80 % etter 7 og 90 % etter 28 døgn.

Dato for test-start: 15.06. 1990

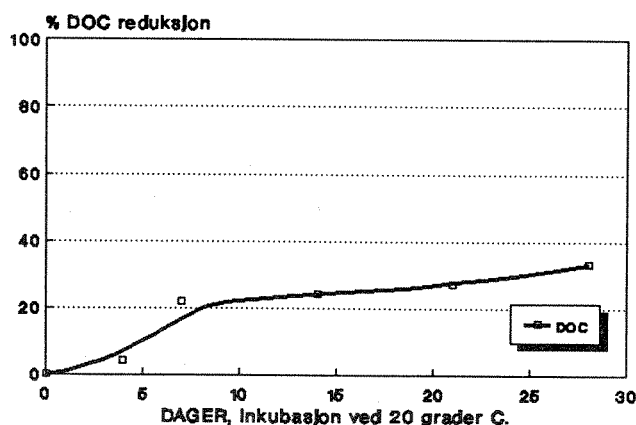
**RESULTATER:**Løst organisk karbon DOC

Neste-OXO	Konsentrasjon etter x dager ( mg/l C )					
	0	4	7	14	21	28
Avl.vann 82% i dest.v. tils.næringssalter	28.6	27.5	22.5	21.7	21.0	19.2
Blank (med inoculum)	0,4		0,4	0,3		0,3
DOC korr. for blank	28.2	27.1	22.1	21.4	20.7	18.9

Evaluering av DOC-data

Døgn fra start	% DOC reduksjon etter x dager				
	4	7	14	21	28
DOC-reduksjon	4	22	24	27	33

Diagram:



**TESTRAPPORT****BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART ORGANISK STOFF**

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

**TESTSTOFF:** Avløpsvann, NESTE-OXO Stenungsund.

**TESTAPPARATUR:** Manometrisk respirometer, WtW 2001

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

**INOCULUM:** Effluent fra biologisk lab. enhet (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk og luftet kom. avløpsvann (NS 4749).  
Kimtall/ml:  $3,5 \cdot 10^5$ . Tilsetning: 2 ml/L testløsning.

**INKUBASJON:** Temperatur:  $20 \pm 1^\circ \text{C}$ . Varighet: 28 dager.  
pH: Start 7,6 Slutt: 8,0

Testperiode: 22.08 -19.09.1990

Testkonsentrasjon: 1:1 (50% avløpsvann)

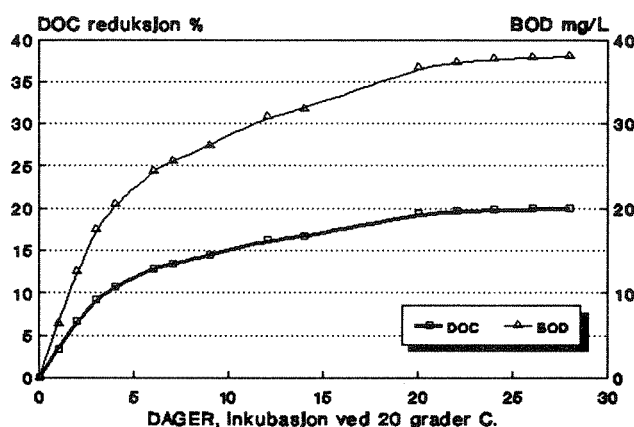
13,6 mg/L DOC

TOC-verdiene på MF-filtrede prøver ved start (dag<sub>0</sub>) og etter 28 døgn bionedbrytning er ikke korrigert for DOC<sub>0</sub> og DOC<sub>28</sub> i blank-prøve (inoculum).

**RESULTATER:** BOD<sub>28</sub> = 38 mg/L DOC-reduksjon = 20 %

	Analyser, mg/L			% DOC-reduksjon
	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	
Testprøve (1:2)	19,0	13,6	10,9	20 %

BOD utvikling:



Middelverdi av 4 paralleller for BOD

**Kommentarer:**

Biooksidasjon målt som BOD er svært usikker, fordi det ble analysert meget høy konsentrasjon av nitrat i testprøven etter 28 døgn. Konsentrasjonen av nitrat ble ikke målt ved start.

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. TOC og DOC (filtret, mf 0,45 µm) er analysert på ASTRO mod. 2001 TOC/TC analysator. Oppslutningsmetoden er en UV katalysert kjemisk oksidasjon med peroxodisulfat.

Norsk institutt for vannforskning

**TESTRAPPORT****NEDBRYTBARHETSTEST: REDUKSJON I LØST ORGANISK KARBON OVER 28 DØGN**

Metode: Modified (Seawater) ISO 7827 Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability og organic compounds.  
Analysis of DOC in Seawater

**TESTSTOFF:** NESTE-OXO Stenungsund. 1:1 (50% avløpsvann) i sjøvann

**TESTBETINGELSER**

**APPARATUR:** 25 L beholder (glassflaske), med magnetrørverk.

**TEST-MEDIUM:** Sjøvann (fra 40 m dyp utenfor Solbergstrand forsøksstasjon) lagret i 3 døgn ved 4 °C før bruk. Dekantert sjøvann ble blandet med avløpsvann og tilsatt 1 ml/L av løsn. a,b,c,d. 5 mg/L NH<sub>4</sub>Cl ble tilsatt. Bl.forhold, avl./sjøv. 1:2.

**INOKULUM:** Mikroorganismer fra luftet kom. avløpsvann (NS 4749) og effluent fra Husmann enhet (OECD) lab. anlegg.  
Kimtall = 4 x 10<sup>5</sup> /ml. Tilsetning, 0,5 ml/L  
Sjøvannets kimtall= 750/ml

**INKUBASJON:** Temperatur: 4-5 °C . Varighet: 28 dager.

Dato for test-start: 27.06. 1990

**RESULTATER:****Løst organisk karbon DOC**

NESTE-OXO Stenungsund	Konsentrasjon etter x dager ( mg/l C )					
	0	4	7	14	21	28
Avl.vann 1:1 i sjøvann tils.næringssalter	13,8	13,7	13,7	13,9	13,6	14,0

**Evaluering av DOC-data**

Døgn fra start	% DOC reduksjon etter x dager				
	4	7	14	21	28
DOC-reduksjon	-	-	-	-	-

Anm: Ingen nedbrytning ble påvist i løpet av 28 døgn inkubasjon.

Norsk institutt for vannforskning

**TESTRAPPORT****BIOOKSIDASJON AV LETT NEDBRYTBART ORGANISK STOFF**

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

**TESTSTOFF:** Avløpsvann, NESTE-OXO Stenungsund.

**TESTAPPARATUR:** Manometrisk respirometer, WtW 2001

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

**INOCULUM:** Effluent fra biologisk lab. enhet (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk og luftet kom. avløpsvann (NS 4749).  
Kimtall/ml:  $4,0 \cdot 10^5$ . Tilsetning: 2 ml/L testløsning.

**INKUBASJON:** Temperatur:  $4 \pm 1^{\circ} \text{C}$ . Varighet: 28 dager.  
pH: Start 7,6 Slutt: 7,6

Testperiode: 04.07 -01.08.1990

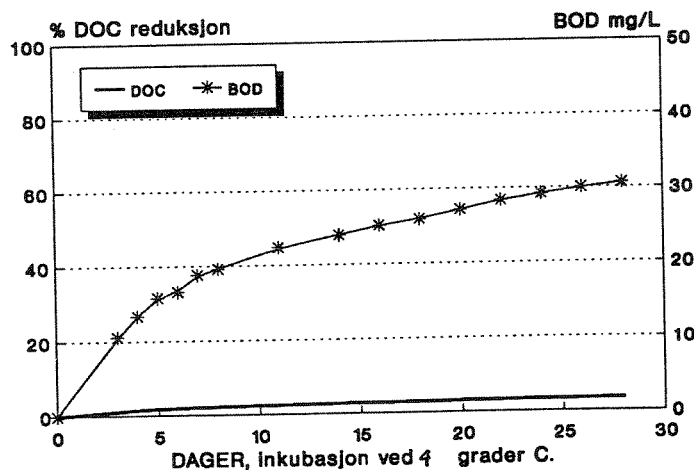
Testkonsentrasjon: 1:1 (50% avløpsvann) i sjøvann, 14,5 mg DOC/L

TOC-verdiene på MF-filtrerte prøver ved start (dag<sub>0</sub>) og etter 28 døgn bio-nedbrytning er ikke korrigert for DOC<sub>0</sub> og DOC<sub>28</sub> i blank-prøve (inoculum).

**RESULTATER:** BOD<sub>28</sub> = 31 mg/L DOC-reduksjon = 3,5 %

	Analyser, mg/L			% DOC-reduksjon
	BOD <sub>28</sub>	DOC <sub>0</sub>	DOC <sub>28</sub>	
Testprøve 50%	15,3	14,5	14,0	3,5

BOD-utvikling:



BOD, middelverdi av triplikater

**Kommentarer:** Biooksidasjon viste en rask utvikling under de 7-8 første døgn av inkubasjon, for å avta i den etterfølgende periode.

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. TOC og DOC (filtrert, mf 0,45 µm) er analysert på ASTRO mod. 2001 TOC/TC analysator. Oppslutningsmetoden er en UV katalysert kjemisk oksidasjon med peroxodisulfat.

## APPENDIX 13

### Metoder

## Metodebeskrivelser

### TOC (Totalt organisk karbon)

Totalt organisk karbon er analysert på ASTRO mod. 2001 TOC/TC analysator. Oppslutningsmetoden er en UV-katalysert oksidasjon med peroxodisulfat.

Analyserna av dygnsproverna som utførdes vid Neste Oxos laboratorium i Stenungsund gjordes med samma analysmetod men en annan instrumentmodell (ASTRO mod. 1800 P)

### DOC (Løst organisk karbon)

Analysert som TOC etter filtrering gjennom 0.45 µm membranfilter.

### Øvrige metoder

For øvrige metoder vises til refererte standarder og/eller respektive bilag.

## Ekstraherbart organisk halogen (EOX) klor-brom eller jod

Vannprøven ble surgjort med vann (pH ca 2) og ekstrahert to ganger med heksan. Heksanekstraktene ble kombinert og en eventuell emulsjon fjernet ved utsalting med natriumklorid. Ekstraktene ble vasket med surgjort vann (pH ca 2) og tørket med natriumsulfat. Ekstraktet ble oppkonsentrert ved 40°C med svakt vakuum og N<sub>2</sub>-strøm til ca 2-4 ml. EOX ble bestemt i en delmengde av ekstraktet ved nøytronaktivering (NAA). Nøytronaktiveringsanalysen ble utført på Institutt for Energiteknikk, Kjeller.

Deteksjonsgrensen for nøytronaktiveringsanalysen:

EOCl	10-20	µg/l	vannprøve
EOBr	1-2	"	"
EOJ	1-2	"	"