

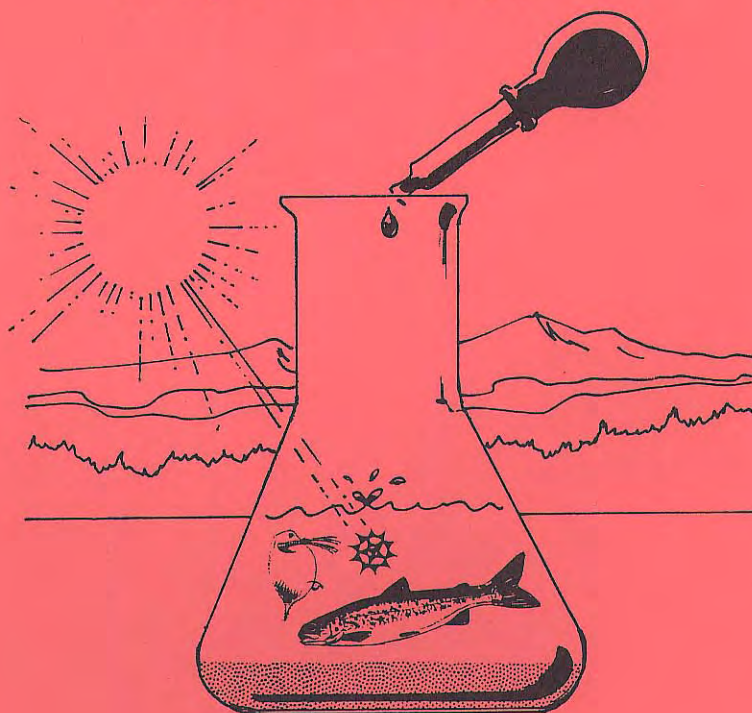
O-90114

KARAKTERISERING AV AVLOPPSVATTEN FRÅN

Berol Nobel

Stenungsund

Kompletterad rapport



NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Hovedkontor	Sørlandsavdelingen	Østlandsavdelingen	Vestlandsavdelingen
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:

2589

Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:	Dato:
Karakterisering av avloppsvatten från Berol Nobel, Stenungsund	31.05.91
Forfatter (e):	Faggruppe:
Torsten Källqvist	Analyse
	Geografisk område:
	Sverige
	Antall sider (inkl. bilag):
	111

Oppdragsgiver:	Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.):
Berol Nobel AB	Knut Andréén

Ekstrakt:

En karakterisering av utgående avløpsvann fra Berol Nobel i Stenungsund, Sverige er utført etter direktiver fra Statens Naturvårdsverk. Programmet omfattet kjemisk og biologisk karakterisering av prøver tatt over en 10 ukers periode i april-juni 1990. Undersøkelsen er komplettert med noen nye opplysninger i 1991. Resultatene viste toksiske effekter på akvatiske organismer ned til ca. 0.3% konsentrasjon. Toksisiteten var tildels persistent. Kjemisk karakterisering viste innhold av bl. a. p-nonylfenol (1.6 mg/l), dioxan (0.5 mg/l) og fenol (0.2 mg/l). Disse stoffene kan imidlertid ikke forklare toksisiteten. Denne rapporten erstatter den tidligere rapporten (løpenummer 2514) fra 11.12.90 med samme tittel.

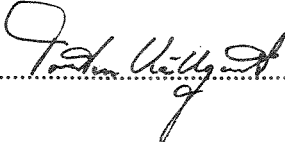
4 emneord, norske

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

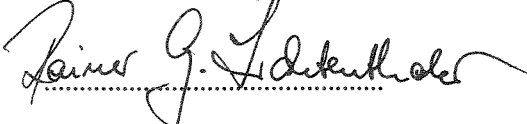
4 emneord, engelske

1. Industrial wastewater
2. Chemical industry
3. Ecotoxicology
4. Biodegradation

Prosjektleder



For administrasjonen



ISBN 82-577-1912-9

Norsk Institutt for Vannforskning

O-90114

KARAKTERISERING AV AVLOPPSVATTEN

FRÅN

BEROL NOBEL

STENUNGSUND

Kompletterad rapport

Prosjektledare: Torsten Källqvist, NIVA

Medarbeidere:

NIVA

Harry Efraimsen

Randi Romstad

Åse Bakketun

SI

Berit Holestøl

Hilde Drangsholt

Frøydis Oreld

Göteborgs Universitet

Sten Åke Wängberg

Sverker Molander

**Kristinebergs Marinbiolo-
giska Station**

Åke Granmo

Esbjörn Telemo

FÖRORD

Som ett led i kartläggningen av utsläpp från kemisk industri, har Statens naturvårdsverk anmodat Berol Nobel i Stenungsund att utföra en kemisk/biologisk karakterisering av avloppsvattnet efter riktninglinjer 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 dygnsprover utfördes lokalt vid Berol Nobel (Microtox) och Neste Oxo (DOC). Övriga tester och analyser har utförts vid NIVA och SI.

Efter genomgång av resultaten på et 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 Berol Nobel, Stenungsund (NIVA-rapport nr. 2514, 1990).

Oslo maj 1991

Torsten Källqvist

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

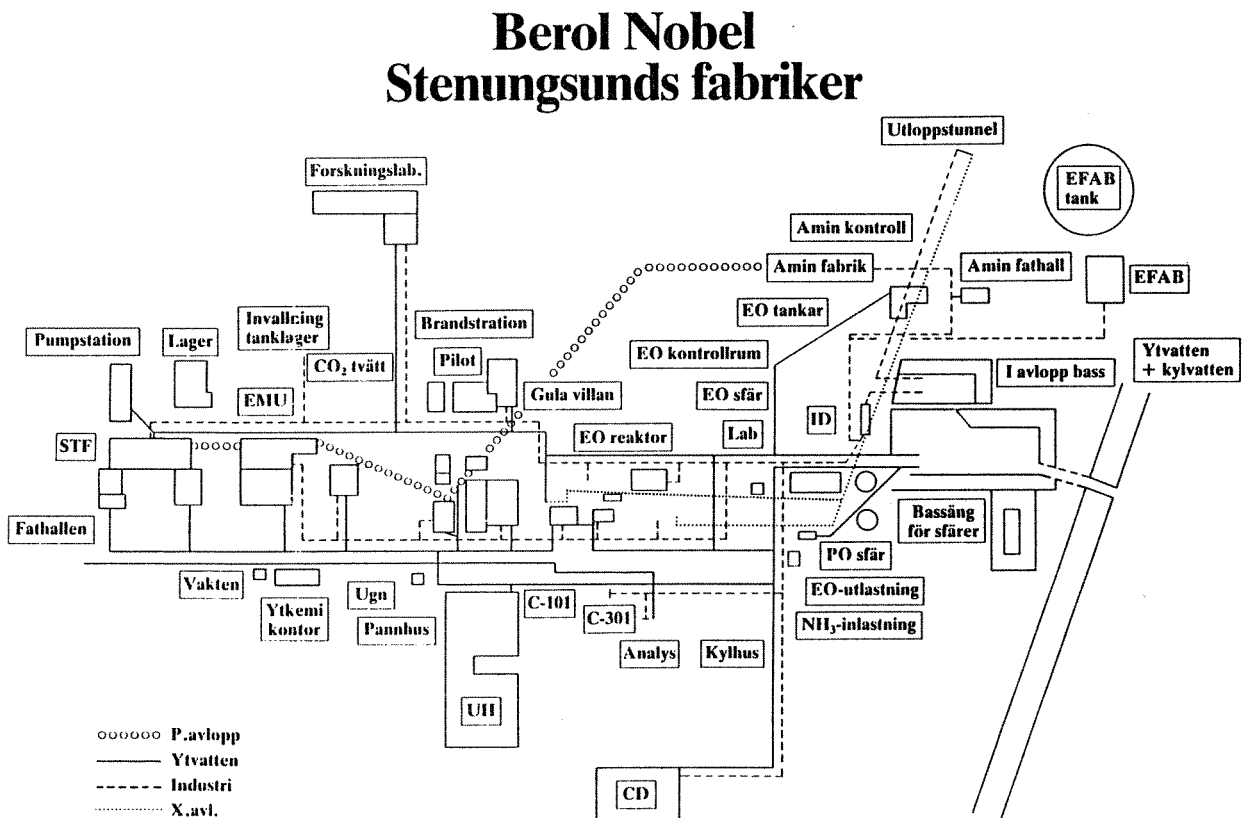
	Sida
1. Material och metoder	4
1.1. Beskrivning av anläggning	4
1.2. Provtagning	6
1.3. Provbehandling	6
1.4. Test-och analysprogram	7
2. Resultat	10
2.1. Variationsstudie	10
2.2. Blandprov	10
2.2.1. Kemisk karakterisering	10
2.2.2. Bioackumuleringspotential	12
2.2.3. Toxicitet	12
2.2.4. Mutagenitet	13
2.2.5. Nedbrytbarhet	15
2.2.6. Kemisk karakterisering efter nedbrytning	16
2.2.7. Toxicitet efter nedbrytning	17
3. Kommentarer	18
4. Referanser	19
APPENDIX 1. Analyser av mineralolja	20
APPENDIX 2. Priority pollutants	26
APPENDIX 3. Bioackumuleringspotential	36
APPENDIX 4. Toxicitetstest med aktivt slam	47
APPENDIX 5. Toxicitetstester med Microtox	49
APPENDIX 6. Toxicitetstester med <i>Selenastrum</i>	56
APPENDIX 7. Toxicitetstester med marina alger	63
APPENDIX 8. Akut toxicitet, <i>Nitocra spinipes</i>	69
APPENDIX 9. Reproduktionstest med <i>Nitocra spinipes</i>	72
APPENDIX 10. Akut toxicitet, Storspigg	90
APPENDIX 11. Ames test	97
APPENDIX 12. Nedbrytbarhetstester	105
APPENDIX 13. Metoder	110

1. MATERIAL OCH METODER

1.1. Beskrivning av anläggning

Berol Nobel utvecklar, tillverkar och säljer ytkemiska produkter. Produktionsverksamheten i Stenungsund drivs inom tre divisioner; etylenoxid (EO), amin och ytkemi (EMU+SFT). EO divisionen driver dessutom en eteterminal, samt hjälpanläggningar.

Inom industriområdet finns fyra tillverkningsenheter; etylenoxid - glykolfabriken, emulgolfabriken, specialtensidfabriken och aminfabriken. (Se fig. 1).



Figur 1. Översikt över Berol Nobels fabriker och avloppssystem

Tillverkningen av etylenoxid sker från eten och syrgas. Etylenoxiden är råvara vid produktionen av monoetylenglykol och dietylenglykol i glykolanläggningen och till amin och ytkemis produkter. Produktionen är kontinuerlig.

Aminfabriken består av två produktionsprocesser för produktion av etanolamin och etylenamin med ammoniak och etylenoxid som råvaror. Produktionen är kontinuerlig.

Ytkemis fabriker består av emulgolfabriken och specialtensidfabriken. Vid emulgolfabriken tillverkas nonjonaktiva tensider, s.k. emulgoler och en liten del polyoler. Produktionen sker satsvis.

Vid specialtensidfabriken tillverkas anjonaktiva och katjonaktiva tensider. Även blandningar av nonjontensider med anjon eller katjontensider sker här. Tillverkningen är uppdelad i tre olika reaktorsystem och sker satsvis.

Avloppen inom anläggningarna är ordnade med separata ledningar för ytvatten, industriavloppsvatten, processvatten, X-avlopp och sanitärt avlopp. Saltvatten för kylning avleds dels till ytvattensystemet, dels genom systemet för industriavlopp som spädvatten efter reningsanläggningen. Processavloppsvatten samlas till förbränning.

Ytvattenavloppet utgörs av uppsamlat regnvatten, delström av kylvatten, kondensat som inte återanvänds mm. Det går via en uppsamlingsbassäng direkt ut i havet.

Industriavloppet utgörs av ett något mer förorenat vatten. Lätt förorenat vatten från Ytkemi, Oxidfabriksplattorna och samtliga invallningar leds till industriavloppet. EO-fabrikens avlopp från reaktorplatta är invallat och släpps till avlopp efter okulärbesiktning.

X-avlopp utgör den avloppsdelen som leder utgående saltvatten från etylenoxidlagret och glykolfabriken till tunneln. I detta avlopp avleds saltvatten som använts vid kylning. Detta vatten utnyttjas till spädning av industriavloppet i tunneln.

Ytvattnet med kylvatten avleds via utjämningsbassäng till de inre delarna av Askeröfjorden - Jordhammarsviken via öppen kanal. Industriavloppet avleds via oljeavskiljare och utjämningsbassäng, med ca. 5 dygns uppehållstid. Efter spädning med vatten från X-avlopp leds industriavloppet till Askeröfjorden via tunnel och avloppstub som mynnar på ca. 9 m djup.

1.2. Provtagning

10 dygnsprov togs ut under ett dygn/vecka i 10 veckor från 9.4 - 12.6 1990. Proverna togs med en automatisk, flödesproportionell provtagare från utloppet av utjämningsbassängen för industriavlopp.

1.3. Provbehandling

Dygnsproverna överfördes till flaskor/kannor av polyeten som förvarades frysta. Ett delprov togs ut för analys av dygnsproverna som utfördes lokalt inom 6 timmar efter provuttag.

Av dygnsproverna filtrerades ca. 1 l genom membranfilter med porositeten 0.47 μm för analys av löst organisk kol (DOC) vid Neste Oxo's laboratorium. Analysmetoden för DOC var i princip den samma som användes vid NIVA (Se appendix 13). Microtox-test utfördes vid Berols 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 med 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.

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

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

Datum:	9/4	17/4	23/4	2/5	8/5	17/5	22/5	28/5	6/6	12/6
Flöde m ³ /d	276	304	252	260	332	322	302	243	352	311
Blandningsförhållande %	9.3	10.3	8.5	8.8	11.2	10.9	10.2	8.2	11.9	10.5

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 upplägning framgår av figur 2.

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

Den kemiska karakteriseringen av veckoblandprovet omfattade följande parametrar:

Parameter		Metod
Kemiskt syreförbruk	COD	NS 4748 (SS 028142)
Biokemiskt syreförbruk	BOD ₇	NS 4749 (SS 028143)
Totalt organiskt kol	TOC	Standard methods 505 (Se app. 13.)
Löst organiskt kol	DOC	Standard methods 505 (Se app. 13).
Mineralolja		Se appendix 1
Nonylfenoletoxylat		Berol (Se app. 13)
Priority pollutants		SI, (Se appendix 2)
Organiskt kväve	N	NS 4743, 4744, 4745 (SIS 028131-028133)
Organiskt fosfor	P	NS 4724, 4725 (SIS 028126-028127)
pH		NS 4720 (SS028122)
Konduktivitet		NS4721 (SS 028123)
Suspenderat material		NS 4733 (SS 028112)

Dygnsgrepp

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Microtox, TOC, DOC, Konduktivitet, pH

Blandgrepp

Kemisk karakterisering
Toxicitetstester
Bioackumuleringstest
Mutagenitetstest

Nedbrytbarhetstester

Kemisk karakterisering
Toxicitetstester

Fig. 2. Skiss av program för karakteriseringen.

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

Mutageniteten 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 ₅₀ hämning av syreförbrukning	ISO 8192
Photobacterium phosphoreum	EC ₅₀ hämning av ljusprod.	Microtox
Selenastrum capricornutum	EC ₅₀ hämning av växt	ISO DIS 8692
Marina alger	EC ₀ , EC ₁₀₀ hämning av växt	Blanck & Björnsäter 1989
Nitocra spinipes	LC ₅₀	DS -F 88/225
Nitocra spinipes	EC ₅₀ , reproduktion	VKI (Se appendix 9)
Storspigg	LC ₅₀	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 efter spädning av avloppsvattnet till 30% koncentration i en 100 l polyeten-behållare. Testtemperaturen var 20 °C

Parallellt med denna nedbrytbarhetstest gjordes en test efter spädning av avloppsvattnet 1:4 (25% koncentration) 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 i saltvatten (30% konc.) efter en modifierad version av ISO 7827. Saltvattentesten gjordes vid temperaturen 4-5 °C.

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).

2. RESULTAT

2.1. Variationsstudie

Resultaten av analyserna av dygnsproverna redovisas i tabell 2. Analyserna visar ganska stor variation i avloppsvattnets sammansättning och giftighet. pH värdet var lägst under de första veckorna, högt (9.8-11.8) från 17.4 - 28.5 och lägre igen den sista veckan. Löst organiskt kol (DOC) visar ingen samvariation med pH-värdet, men också här är variationerna stora, från 100 mg/l 22/5 till 222 mg/l 23/4. Medelvärde är 160 mg/l. Ledningsförmågan var mellan 115 och 370 mS/m.

Toxiciteten mätt med Microtox visar en viss samvariation med DOC, men avvikelser förekommer. EC₅₀-värdena (15 min.) varierar mellan 0.4% och 39% avloppsvatten. Medelvärde är 8%.

Tabell 2. Ledningsförmåga, löst organiskt kol (DOC) och EC₅₀ (5 och 15min.) för Microtox i dygnsprover.

Datum:		9/4	17/4	23/4	2/5	8/5	17/5	22/5	28/5	6/6	12/6
pH		6.9	6.5	9.8	10.0	11.8	9.9	-	11.5	-	7.7
Ledningsförmåga	mS/m	146	131	156	115	120	113	240	370	130	165
DOC	mg/l	200	125	222	172	172	173	100	118	161	161
Microtox 5 min	EC50 (%)	1.28	21.3	4.1	9.52	0.9	5.9	51.5	4.05	5.11	3.72
Microtox 15 min	EC50 (%)	0.42	12	3.2	-	0.75	4.3	39	3.62	4.7	3.83

2.2. Blandprov

2.2.1. Kemisk karakterisering

Resultat av de kemiska analyserna av veckoblandprovet redovisas i tabell 3. Avloppsvattnet är basiskt, med pH-värdet 10.2. Ledningsförmågan, 219 mS/m motsvarar ett saltinnehåll på ca. 1.4 g/l. Innehållet av suspenderat material är lågt.

Parametrarna COD, BOD, TOC och DOC visar att avloppsvattnet har ett reaktivt högt innehåll av organiskt material, huvudsakligen i löst form. Nivåerna motsvarar ungefär vad man finner i kommunalt avloppsvatten. DOC-innehållet överensstämmer med vad analyserna av delproverna visade. TOC-analysen gav lägre värde än DOC vilket är orimligt, men som antagligen beror på att det partikulära materialet inte oxideras vid uppslutningen men i stället

minskar oxidationen av det lösta organiska materialet. Det är tidigare visat at våtoxideringen med peroxidsulfat som används vid denna analys inte förmår oxidera partikulärt organiskt material i avloppsvatten fullständigt (Hovind 1990).

Endast en mycket liten del av det organiska materialet har identifierats med de specifika analyserna (mineralolja och "priority pollutants"). Den största komponenten av de identifierade ämnena är p-nonylfenol (1.6 mg/l), dioxan (0.5 mg/l) och fenol (0.2 mg/l). Mineraloljeanalysen visade 0.1 mg kolväten/l, men gaskromatogrammet visade inget karakteristiskt mineraloljemönster.

Mängden organiskt bundet kväve uppgick till ca. 8 mg/l.

Tabell 3. Resultat av kemisk karakterisering av avloppsvatten före och efter 28 dygns nedbrytbarhetstest. Analysresultaten efter nedbrytning har korrigerats för utspädning med havsvatten genom multiplikation med spädningsfaktorn (3.3x).

Parameter	enhet	före nedbrytn	efter nedbrytn.	reduktion	Appendix
pH		10.2	-		
Ledningsförmåga	mS/m	219	-		
Suspenderat material	mg/l	23	-		
COD	mg O/l	550	250	55%	
BOD	mg O/l	225	17	92%	
TOC	mg/l	160	47	71%	
DOC	mg/l	170	57	66%	
Mineralolja	mg/l	0.1	<0.17	-	App. 1
Nonylfenoletoxylat	mg/l	8.1	<1	>88%	
p-Nonylfenol	mg/l	1.6*	-	-	App. 2
Fenol	µg /l	200	-	-	App. 2
Di-(2 etylhexyl)ftalat	µg /l	49	-	-	App. 2
Dioxan	µg/l	500*	-	-	App. 2
Tot. N	mg /l	11.7	-	-	
Organiskt N	mg/l	8.0	-	-	
NO ₃	mg N/l	0.095	-	-	
NH ₄	mg N/l	3.65	-	-	
Tot. P	mg/l	0.5	-	-	
PO ₄	mg P/l	0.2	-	-	

* Värde > intern standard, men anses ändå som pålitligt

2.2.2. Bioackumulerbarhetspotential

Bioakkumuleringspotentialen blev undersökt i ett surt och ett basiskt extrakt av avloppsvattnet. Innehållet av kromatograferbara ämnen i de två extrakten före och efter fraktionering med tunnskiktskromatografi visas i tabell 4. Som potentiellt bioackumulerbara räknas ämnen med fördelningskoefficient oktanol/vatten (P_{ow}) $>10^3$. Testen visade inget innehåll av potentiellt bioackumulerbara ämnen. Påvisningsgränsen är ca. 0.06 mg/l.

Tabell 4. Innehåll av kromatograferbara ämnen i surt och basiskt extrakt av avloppsvatten (mg/l). Fraktion II och III är fraktioner med fördelningskoefficient oktanol vatten (P_{ow}) $>10^5$ resp. 10^3 - 10^5 . (i.p.=icke påvisat).

Extrakt	Före fraktionering	Fraktion I Applikationszon	Fraktion II $Pow >10^5$	Fraktion III $Pow 10^3$ - 10^5
Surt	7.7	i.p.	i.p.	i.p.
Basiskt	0.7	i.p.	i.p.	i.p.

2.2.3. Toxicitet

Resultaten av toxicitetstesterna har sammanfattats i tabell 5. Med undantag för testen med aktivt slam, visade samtliga tester gifteffekter ned till ca. 1% koncentration eller lägre. Hämning av algernas växt var den mest känsliga responsen av de som undersöktes. Växthastigheten hos grönalgen *Selenastrum capricornutum* hämmades med 10% vid koncentrationen 0.3 % (EC_{10}). EC_{50} (50% växthämning) var vid 1.4%. (Se fig. 3.). Det lägsta EC_0 -värdet (0% effekt) för tre av de testade marina algerna var 0.62 %.

Microtox-testen visade något mindre känslighet än de flesta algerna. EC_{50} -värdet vid 15 min. exponering var 2.52%, vilket är betydligt lägre än medelvärdet för de olika delprovernas EC_{50} -värden (8%).

Hos kräftdjuret *Nitocra spinipes* observerades dödlighet vid koncentrationer över 1 %. LC_{50} -värdet var 3.2 %. (Se figur 4.) . Nedsatt reproduktion påvisades vid 1% och högre koncentrationer. Vid koncentrationen 1.8% var reproduktionen reducerad med 80% i förhållande till kontrollen. EC_{50} -värdet estimerades till 1%

Testen med storspigg visade 100% dödlighet vid 10% koncentration efter 2 dygns exponering och LC₅₀-värdet (2 dygn) var 3 %. Förutom dödlighet observerades även subletala (icke dödliga) effekter som beteendeförändringar, och här observerades nedsatt aktivitet för 50% av djuren (EC₅₀-värde) vid 2% inblandning.

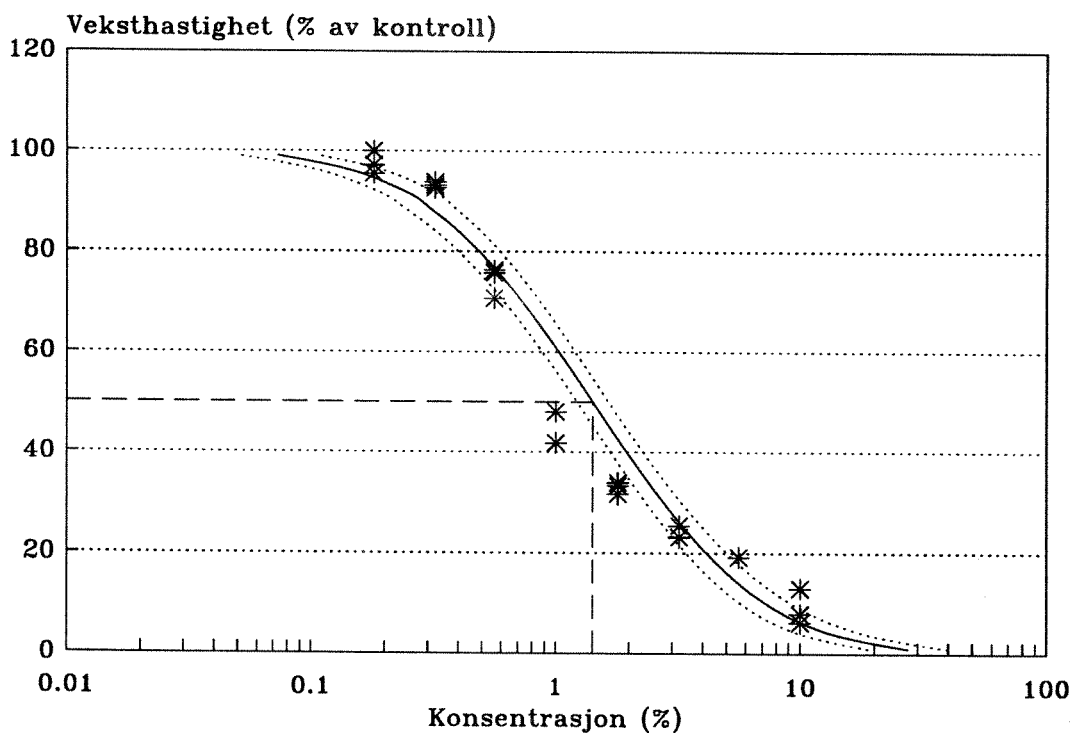
Tabell 5. Toxicitet i avloppsvatten före och efter nedbrytbarhetstest. (EC- och LC-värden angivet som % avloppsvatten). EC- och LC₅₀ värden efter nedbrytning har korrigerats för den utspädning som gjordes vid nedbrytningstesten.

Test	respons	före nedbr.	efter nedbr.	Appendix
Aktiv slam	EC ₅₀ , syrekonsumention	ca. 100%	-	App. 4
Aktiv slam	EC ₂₀ , syrekonsumention	14%	-	App. 4
Microtox	EC ₅₀ , ljusproduktion 15 min.	2.52	>30	App. 5
Microtox	EC ₂₀ , ljusproduktion 15 min.	0.55	>30	App. 5
Selenastrum	EC ₅₀ , växthastighet (3 d.)	1.4	41	App. 6
Selenastrum	EC ₂₀ , växthastighet (3 d.)	0.5	27	App. 6
Selenastrum	NOEC, växthastighet (3 d.)	<0.32	17	App. 6
Selenastrum	EC ₅₀ , areal under växtkurva	0.46	7.5	App. 6
Marina alger	EC ₀ , växt (medelvärde, 5 d.)	1.85	2.22	App. 7
Marina alger	EC ₀ , växt (lägsta värde 5, d.)	0.62	0.75	App. 7
Marina alger	EC ₁₀₀ , växt (medelvärde 5 d.)	36	17.7	App. 7
Marina alger	EC ₁₀₀ , växt (lägsta värde 5 d.)	10	12	App. 7
Nitocra	LC ₅₀ (4 d.)	3.2	>30	App. 8
Nitocra	LC ₂₀ (4d.)	1.9	>30	App. 8
Nitocra	EC ₅₀ , reproduktion	1	>17	App. 9
Nitocra	EC ₂₀ , reproduktion	0.9	ca. 8	App. 9
Storspigg	LC ₅₀ (2 d.)	3	-	App. 10
Storspigg	LC ₂₀ (2 d.)	1.4	-	App. 10
Storspigg	LC ₅₀ (3d)	2.5	-	App. 10
Storspigg	LC ₂₀ (3d)	1.1	-	App. 10
Storspigg	NOEC (passivitet)	0.1	-	App. 10

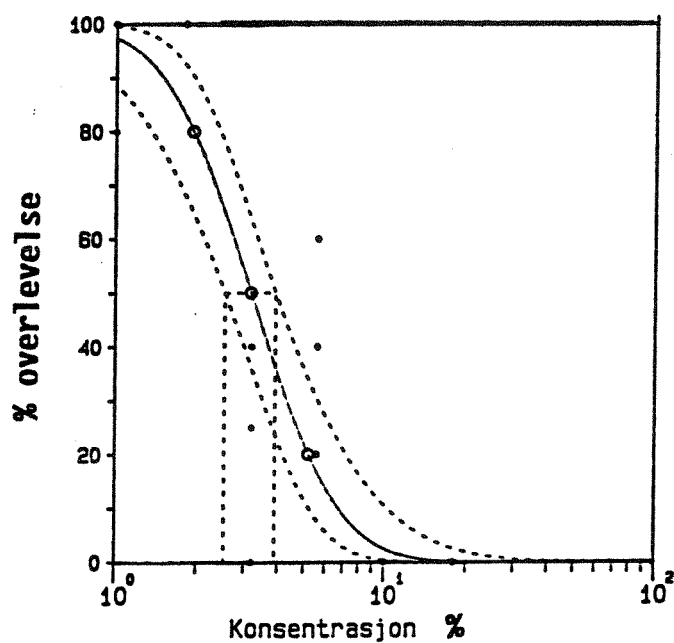
2.2.4. Mutagenitet

Ames test utförd på avloppsvattnet visade inga mutagena effekter vid dosering av upp till 100 µl extrakt. Försök med högre doser visade toxiska effekter på bakterierna genom att man

antingen fick en minskning i antal kolonier i förhållande till blindprovet, eventuellt att inga kolonier växte upp (Se appendix 11).



Figur 3. Effekt av avloppsvattnet på växthastigheten hos *Selenastrum capricornutum*. 100% växthastighet=växthastighet i kontrollkulturer. Prickade linjer=95% konfidensintervall för responskurvan (Probit-analys). Streckad linje anger 50% respons (EC₅₀)



Figur 4. Effekt av avloppsvattnet på överlevnad hos *Nitocra spinipes*. Streckade linjer anger 95% konfidensintervall runt responskurvan som beräknats genom probit-analys.

2.2.5. Nedbrytbarhet

Huvudtesten för nedbrytbarhet gjordes efter spädning av avloppsvattnet till koncentrationen 30% för att erhålla en DOC-koncentration som var innanför rekommendationerna i metoden. DOC-koncentrationen i provlösningen och i ett blindprov med samma mikroorganism-ymp visas i tabell 6. DOC-koncentrationen avtog genom hela testen, men långsammare mot slutet, och när testen avbröts efter 35 dygn, var DOC-reduktionen 60%. (Se fig. 5). Det var detta vatten som gick till karakterisering efter nedbrytning.

Tabell 6. Löst organiskt kol (DOC) i nedbrytbarhetstesten vid 20 °C.

Dag nr:	0	4	7	14	21	28	35
30% Avloppsv.	42.8	35.9	31.3	23.3	22.7	18.9	17.1
Blindprov	0.3		0.3	0.2		0.2	0.2
Korrigerat DOC	42	35.6	31	23.1	22.5	18.7	16.9
DOC-reduktion (%)	0	15	26	45	46	55	60

Parallellt med huvudtesten gjordes en test i respirometer med avloppsvatten utspätt till koncentrationen 25%. Testen visar syreförbrukningen över 28 dygn (Se figur 6.). Syreförbrukningskurvan visar att 85% av syreförbrukningen skedde under de första 8 dygnen. BOD₂₈ omräknat till koncentrerat avloppsvatten var 330 mg/l. Också i respirometerstesten analyserades DOC-koncentrationen vid start och slut. Resultaten visade en något högre nedbrytningsgrad (74%) än i huvudtesten. I detta fallet analyserades inte DOC i blindprovet, men bidraget från ympen utgör högst ca. 1% av DOC-innehållet i provet vid start och påverkar inte den beräknade DOC-reduktionen signifikant.

Nedbrytbarhetstesten i saltvatten utfördes med koncentrationen 30% avloppsvatten, vid temperaturen 4-5 °C, och pågick i 35 dygn. Också i denna testen var omsättningen snabbast under den första veckan. (Se figur 7.). DOC-värdena stagnerade därefter och visade t.o.m. en ökning mot slutet. Variationerna i DOC under den senare delen av testen får anses ligga inom felmarginalerna som är större vid analyser i saltvatten än i sötvatten. 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 2-4% av startvärdet och 3-6% av slutvärdet för DOC i avloppsvattenlösningen och alltså inte nämnvärt påverkar beräkningen av DOC-reduktion. Total DOC-reduktion var 40-50%, d.v.s lägre än vid de övriga testerna. Den lägre nedbrytningsgraden kan bero på saltvattensmediet eller den lägre temperaturen.

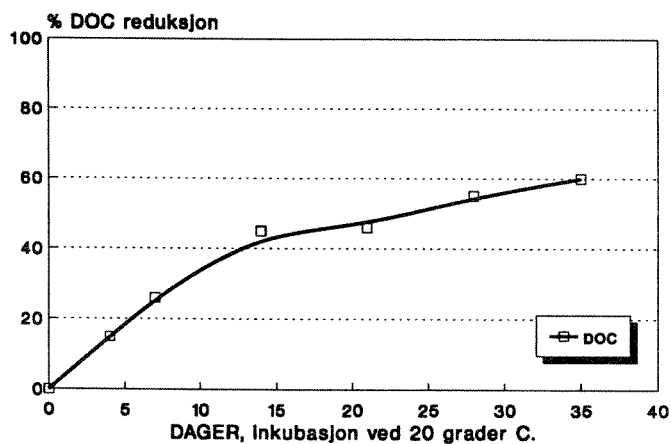


Fig. 5. Koncentrationer av DOC mått ved nedbrytbarhetstest ved 20 °C.

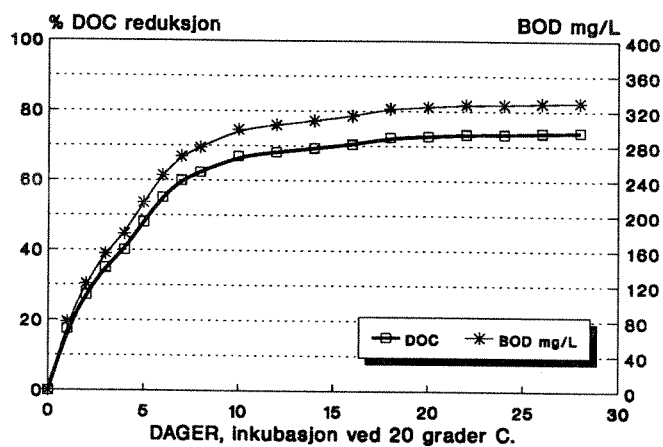


Fig. 6. Syreforbrukning ved nedbrytningstest ved 20 °C. Den undre kurvan indikerar DOC-forlopp på basis av syreforbrukning

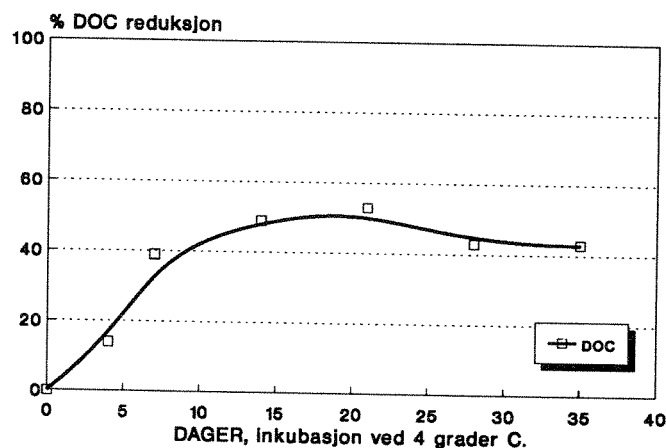


Fig. 7. Reduksjon av DOC mått ved nedbrytbarhetstest i saltvatten ved temperaturen 4-5 °C.

2.2.6. Kemisk karakterisering efter nedbrytning

Resultaten av de kemiske analysene som utførtes på avloppsvattnet efter nedbrytning redovisas i tabell 3. Værdene har korrigert for utspædningen ved nedbrytbarhetstesten for å kunne jmføres med analysene fre nedbrytning.

Den kemiska syreförbrukningen (COD) var efter nedbrytningen något mindre än hälften av värdet innan nedbrytningen. Reduktionen var alltså mindre än för DOC. Det kan tyda på att oorganiska föreningar eller partikulärt material bidrar till COD.

Koncentrationen av mineralolja var i det analyserade provet mindre än detektionsgränsen (0.05 mg/l), vilket betyder att det p.g.a. utspädningen inte kan avgöras om koncentrationen har minskat vid nedbrytningen.

2.2.7. Toxicitet efter nedbrytning

Nedbrytningen medförde en viss reduktion av toxiciteten på alla testade organismer. Resultaten redovisas i tabell 5. EC_{50} -värdet för *Microtox* ökade från 2.5 till >30%. EC_{50} -värdet för *Selenastrum* ökade med en faktor 30 och för de marina algerna ökade EC_{50} -värdena ca. 4 ggr. Hämmningen av alger vid de högsta testade koncentrationerna kan emellertid delvis bero på den höga koncentrationen av fosfor i vattnet efter nedbrytbarhetstesten (fosfatbuffer används för att kontrollera pH-värdet vid nedbrytning). En toxicitetstest i nedbrytbarhetstestmedium (utan avloppsvatten) visade att växten av *Selenastrum* hämmades vid höga koncentrationer. Detta medför att giftverkan på alger efter nedbrytning är osäker. Vid låga koncentrationer av det nedbrutna avloppsvattnet observerades en stimulering av algväxten, som också kan bero på de salter som tillsatts vid nedbrytbarhetstesten.

För *Nitocra* noterades ingen ökad dödlighet i det utspädda (30%) avloppsvattnet efter nedbrytningen och LC_{50} -värdet kunde därför inte bestämmas. Testen med storspigg efter nedbrytning misslyckades p.g.a. för hög dödlighet i kontrollen och något LC_{50} -värde kan därför inte heller här anges.

Reproduktionen av *Nitocra* efter nedbrytning reducerades något vid den högsta testade koncentrationen, som motsvarar 16.8 % avloppsvatten. EC_{50} -värde kan inte bestämmas.

3. KOMMENTARER

Utgående avloppsvatten från Berol Nobel, Stenungsund innehåller organiska föreningar i koncentrationer som är ca. 4-5 ggr. högre än i kemiskt renat kommunalt avloppsvatten. Av detta är ca. hälften förhållandevis lätt nedbrytbart. Resterande fraktion brytes ned långsamt eller ofullständigt. I förhållande till den tidigare "MUST"-utredningen (Granmo 1986), var nedbrytbarheten betydligt högre vid 4 °C, medan den vid 20 °C var på samma nivå som en test utförd vid 15 °C visade 1983.

Endast en liten fraktion av det organiska materialet är identifierat vid de analyser som har utförts. Av kategorien "priority pollutants" blev det funnet p-nonylfenol (1.6 mg/l), fenol (0.2 mg/l), di-(2etylhexyl)ftalat (49 µg/l) och dioxan (0.5 mg/l). Samtliga dessa föreningar identifierades också vid en analys som företogs i samband med MUST-utredningen 1983 (Granmo 1986), men då i koncentrationer som var från 6-55 ggr. högre än vid denna undersökning. (Se tabell 7.). I MUST redovisades 5-12 mg paranonylfenol/l och 3 mg dioxan/l, kortkedjiga nonylfenoletoxylater förekom i samma storleksordning som p-nonylfenol. I det samlade avloppsvattnet uppgick halten till 26-37 mg/l. Årsutsläppet av nonylfenoladdukter enligt MUST motsvarade 3 ton.

Toxiska effekter på alger har registrerats ned till ca. 0.3% , medan akuta effekter i form av 50% dödlighet på kräftdjuret *Nitocra spinipes* och på storspigg uppstod vid ca. 3% koncentration. Dessa resultat tyder på att toxiciteten inte minskat mycket för storspigg och marina alger sedan MUST-utredningen genomfördes 1983. Nitocra-testen visade emellertid 5-10 gånger lägre gifteffekt nu än vid MUST-utredningen. (Se tabell 7.)

Avloppsvattnets toxicitet reducerades klart vid 4 veckors biologisk nedbrytning, men flera av testerna visar att de giftiga komponenterna till en del är persistenta.

Variationsstudien visade att avloppsvattnets sammansättning, och i synnerhet dess toxicitet är varierande. Resultaten tyder på att toxiska komponenter härstammar från icke-kontinuerliga processer vid anläggningen.

Det blev inte funnet genotoxiska eller potentiellt bioackumulerbara ämnen i avloppsvattnet. Vid undersökningen 1983 konstaterades däremot viss genotoxicitet.

Undersökningen visar att de åtgärder som har vidtagits för att reducera utsläppen till vatten sedan 1983, bl. a. förbränning av processvatten, har medfört vissa förbättringar, som något högre biologisk nedbrytbarhet, väsentlig reduktion av flera "priority pollutants" och

genotoxicitet. Avloppsvattnets toxiska effekter på vattenlevande organismer tycks däremot inte ha minskat i motsvarande grad. Den toxiska effekten kan inte förklaras av de föreningar som har identifierats vid den kemiska karakteriseringen.

Tabell 7. Innehåll av några organiska komponenter och resultat av toxicitetstester vid denna undersökning och vid MUST-utredningen 1983. (Granmo 1984, 1986).

Parameter		1983 (MUST)	1990
Fenol	mg/l	11	0.2
P-nonylfenol	mg/l	5-12	1.6
Di-n-butylftalat	µg/l	46	i.p.
Butylbensylftalat	µg/l	32	i.p.
Di-(2-etylhexyl)ftalat	µg/l	855	49
Dioxan	mg/l	3	0.5
Nitocra LC ₅₀ 96 tim.	%	0.32-0.62	3.2
Storspigg LC ₅₀ 48 tim.	%	2	3
Marina alger, EC ₀ (medelvärde)	%	1.28	1.85
Marina alger, EC ₀ (lägsta värde)	%	0.3	0.62

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, Miljöutredningen 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 intil de ble analysert.

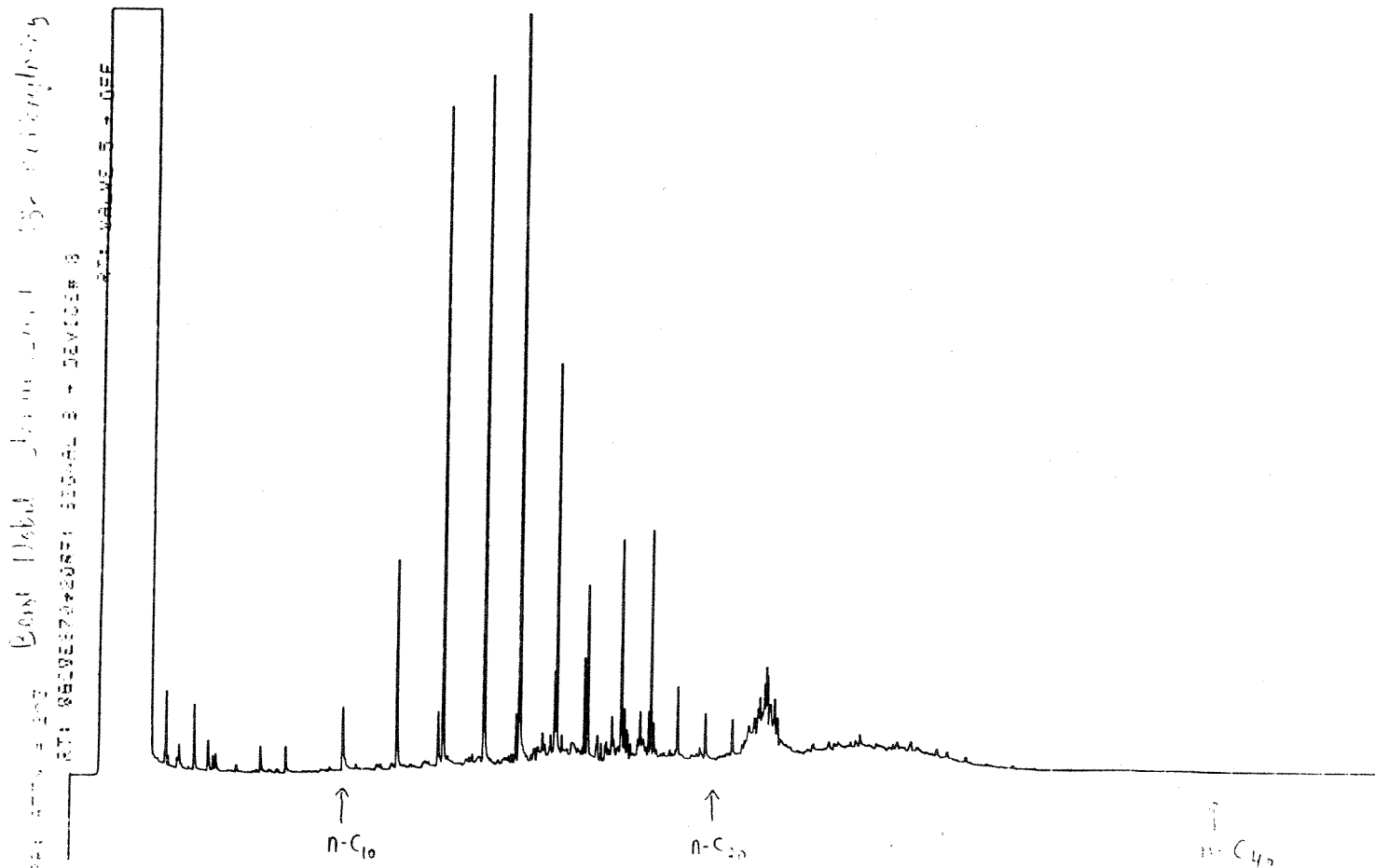
Prøvene ble ekstrahert med diklormetan. Prøveekstraktene ble rensert på en silica kolonne (Bond elut) for å fjerne polare forbindelser, før de ble analysert med gasskromatografi (GC). Denne teknikken gir opplysning om fordeling av ulike komponenter i prøven som funksjon av kokepunkt. Dette vil gi opplysning om hvilken oljetype prøven består av (mønsterkjennning). 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

Avløpsvannprøven fra Berol Nobel, Stenungsund før nedbrytning inneholdt 0.1 mg hydrokarboner/l. I prøven etter nedbrytning (fortynnet 1:3.33) kunne mineralolje ikke påvises. Påvisningsgrensen for denne analysen er satt til 0.05 mg/l.

Kromatogrammene for prøvene før og etter nedbrytning er vedlagt.



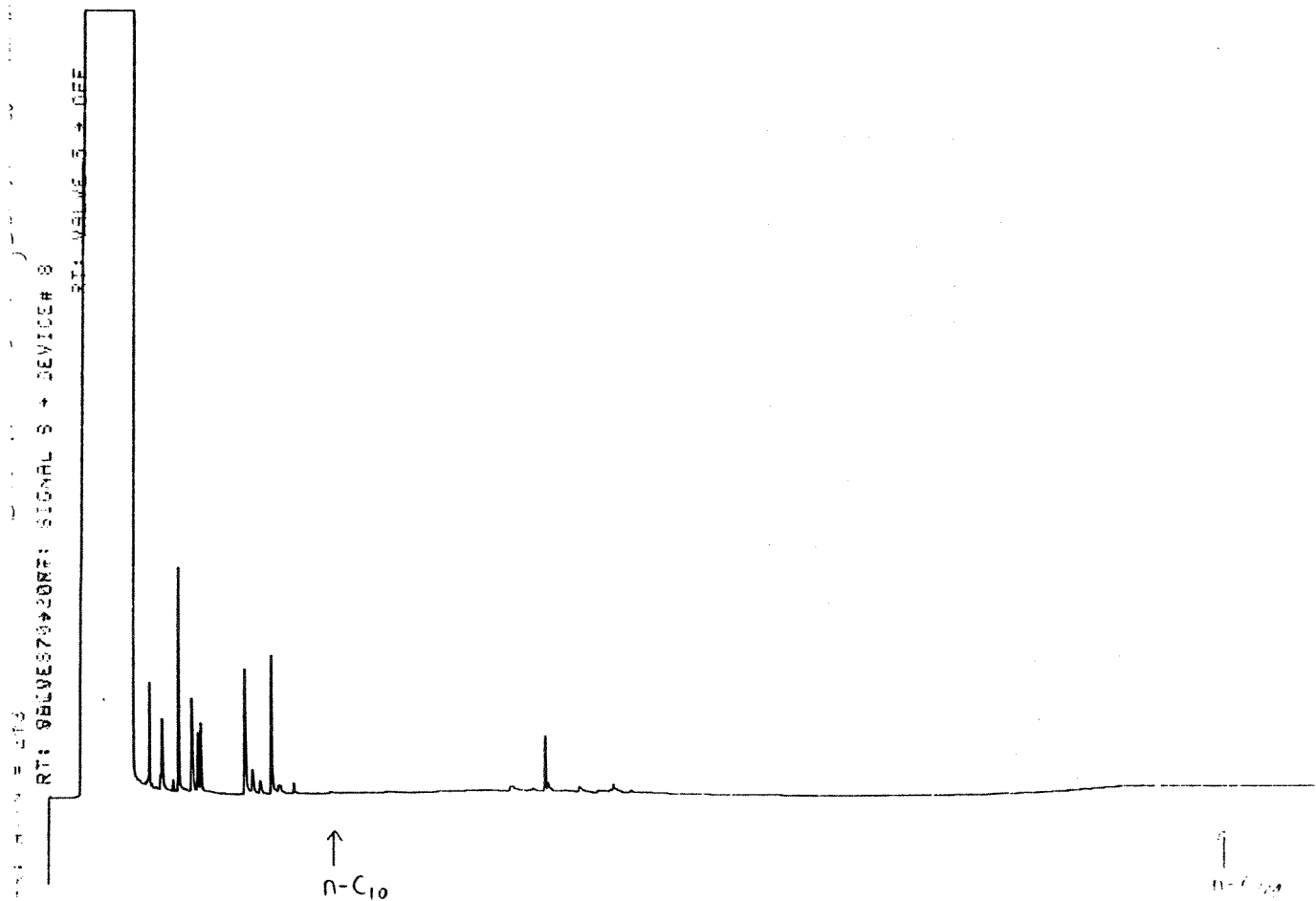
Figur 1

Berol Nobel, Stenungsund før nedbryting

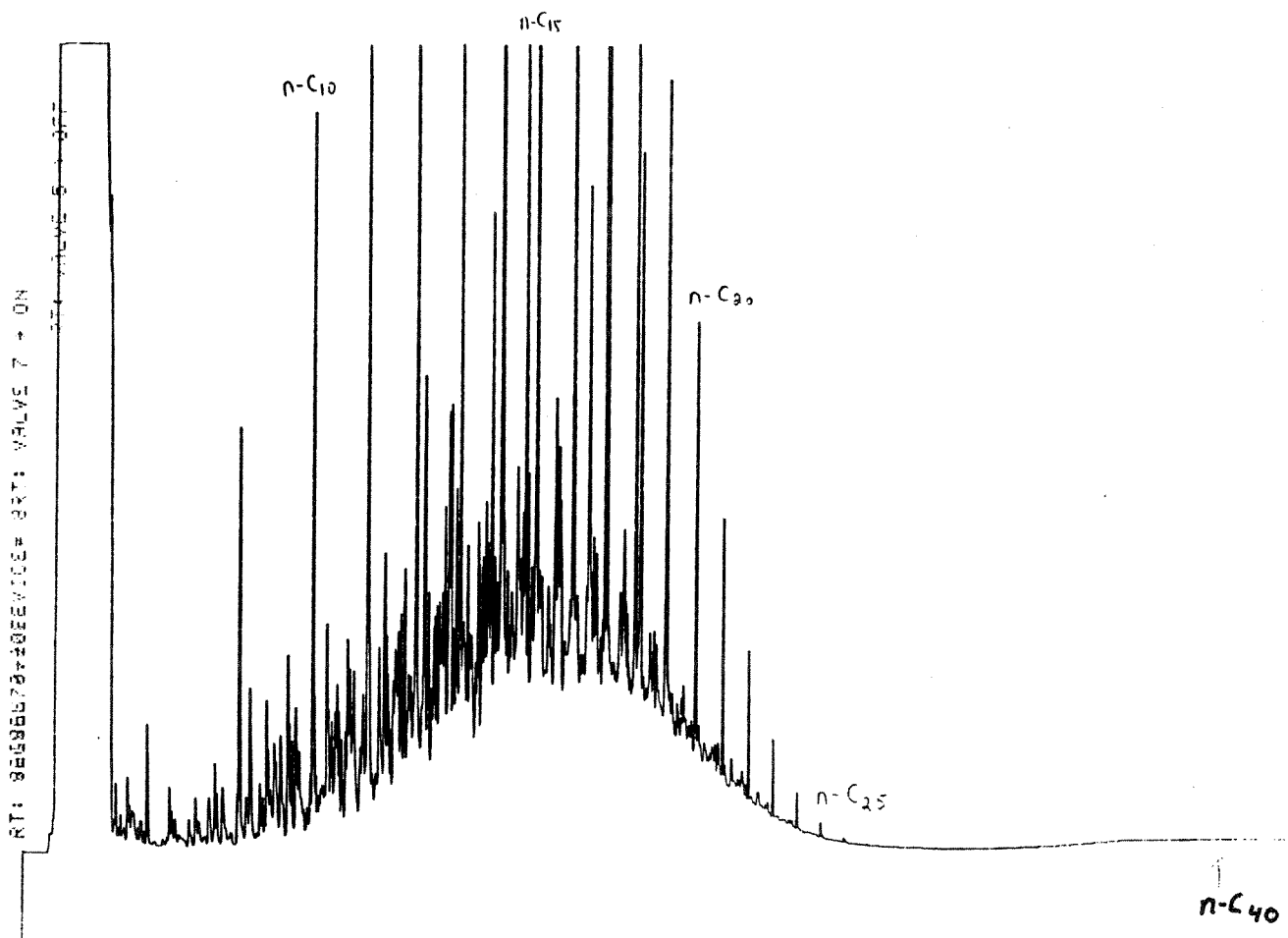
Prøvevolum: 2000 ml

Ekstraktvolum: 1 ml

Mengde hydrokarboner: 0.1 ppm

**Figur 2**

Berol Nobel, Stenungsund etter nedbryting
Prøvevolum: 1982 ml
Ekstraktvolum: 1 ml
Mengde hydrokarboner: < 0.05 ppm



Figur 12

Standard marin diesel

**Figur 11****Blindprøve, springvann****Prøvevolum: 2000ml****Ekstraktvolum: 1 ml****Mengde hydrokarboner: < 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 AVLØPSVANN ANALYSE AV "PRIORITY POLLUTANTS" I TO PRØVER			Oppdrag nr 442-1054

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 masse-spektrum 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 Gjøs

Hilde Drangsholt
Hilde Drangsholt

Kopi gitt Bent Holstøl, SI.

Tabell 2: "Priority Pollutants" i avløpsvann fra BEROL NOBEL, 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 2 (forts)

Prøve: Avløpsvann fra BEROL NOBEL, Stenungsund. 900618-1

FENOLER:	UG/L VANN
Fenol	200.0 **
o-Kresol	
m-/p-Kresol	
2-Nitrofenol	
p-Nonylfenol	1570.0 !
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 49.0
Di-(2-etylheksyl)adipat

FOSFAT-ESTERE:

Tri-n-butylfosfat
Trifenylfosfat
Tri-kresylfosfat

AROMATISKE NITROGEN-FORBINDELSER:

Nitrobenzen
Difenylamin

ETERE:

Dioksan 500.0 !

**) Mengdeangivelsen av fenol er usikker pga interferens mellom tilsatt intern standard, 10 ug deuterert fenol, og andre forbindelser i prøven.

Tabell 2 (forts)

Prøve: Avløpsvann fra BEROL NOBEL, Stenungsund. 900618-1

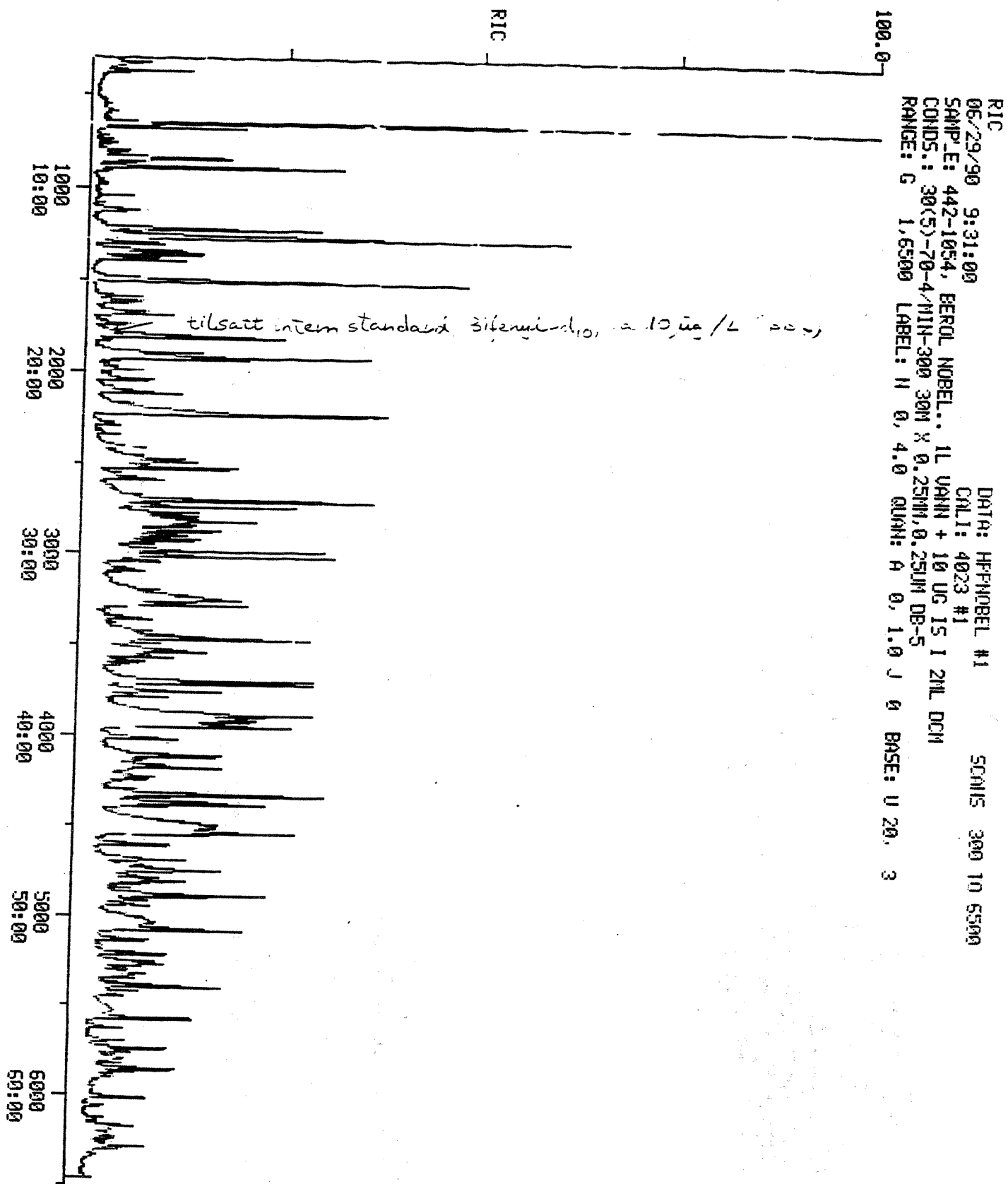
HALOGENERTE ALIFATER:

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.

Figur 2. GC/MS-kromatogram av avløpsvann fra BEROL NOBEL, Stenungsund.
900618-1



177560.

SCAN
TIME

Tabell 3: Kvantifiseringsgrenser

ANALYSE AV PRIORITY POLLUTANTS

KVANTIFISERINGS-GRENSER: MONO- OG BICYKLISKE AROMATER:	UG/L		
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.

KLORETE 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:		UG/L	
FENOLER:			
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.
BUTYLBENZYL 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-d₈, naphthalen-d₈, bifenyld₁₀, fenantren-d₁₀, pyren-d₁₀, krysen-d₁₂ og fenol-d₆).

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

Instrumentbetingelser

Massespektrometer	:	Finnigan 4023
Gasskromatograf	:	Finnigan 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 [^])
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

Bioackumuleringspotential

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 viderefeksjonert på tynnsjikt (TLC) i tre fraksjoner.

I Fraksjon: Applikasjonsone

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

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

Basisk ekstrakt

Den sure vannprøven ble gjort basisk med natriumhydroksyd-pastiller 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 tillempning av en metode utarbeidet av Lars Renberg et al.¹ 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/hexan-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 2⁵

Attn. etter TLC 2³

Ytre standard n-C₁₈H₃₈=106,9 µg/ml før TLC

Indre standard " " etter TLC

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

RT: 3.89 CES 0.05 RT: INTG + ON
4.48

6.595
6.70

7.66

9.09
9.18

10.22

11.10
11.13
11.19

12.82

17.50
17.51

14.73
15.41

16.15 16.26

17.84
18.52
18.68
19.73

20.12
20.60
20.66
20.83

22.54
22.54

23.15

24.24
24.64

25.24
25.64
25.75
25.84

27.12
27.25
27.39
27.51
27.77

29.16
29.89
29.48

30.47
30.44
30.93
31.34
31.63

31.68

32.73
32.29
32.89

33.93
33.38
34.55

35.05
35.65
36.16

36.87

38.20

38.77

39.79
39.22

41.82

42.50

43.51

43.56

44.43

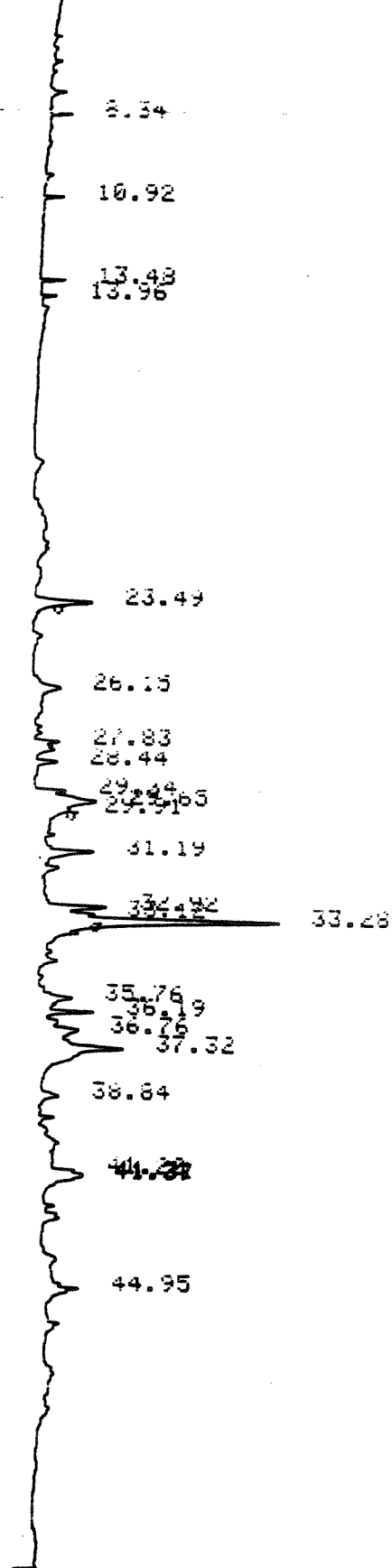
127

Før TLC, surt ekstrakt
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

RT: INTG + OFF

RT: SLICES 0.05 RT: INTG → ON
4.44



135

Før TLC, basisk ekstrakt
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

RT: INTG → OFF

F

41

1.34

2.74

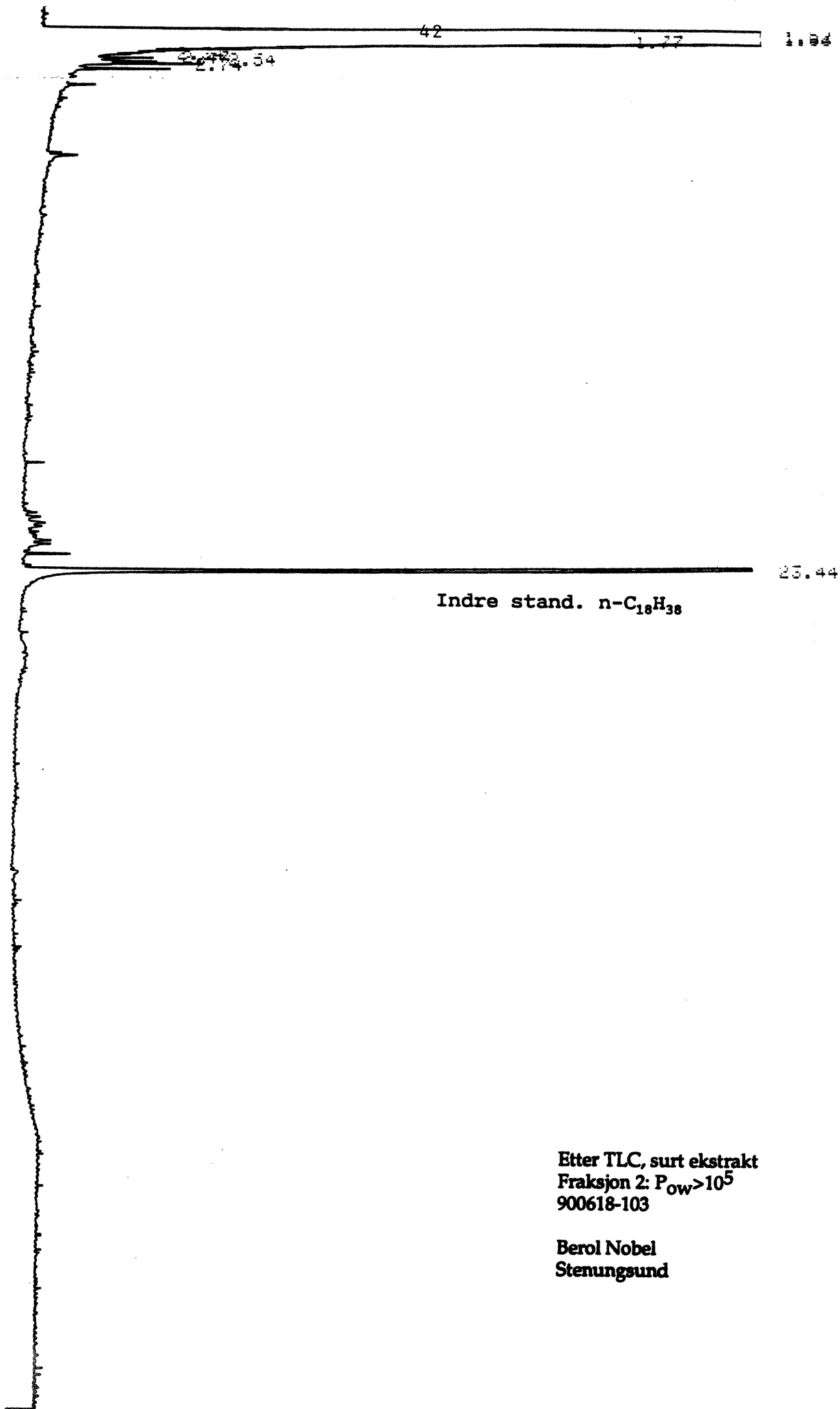
23.44

Indre stand. n-C₁₈H₃₈

013

Etter TLC, surt ekstrakt
Fraksjon 1: Applikasjonsone
900618-103

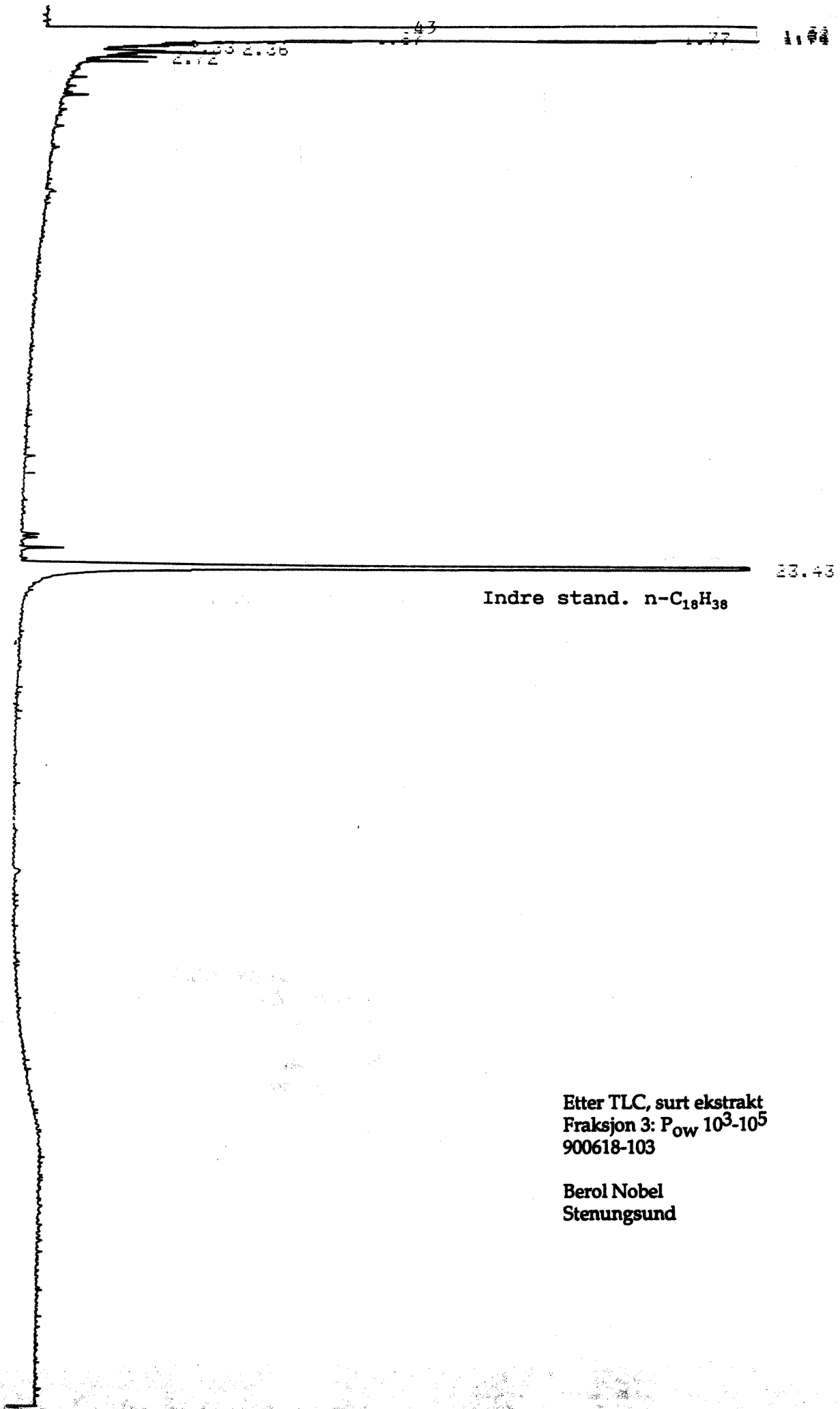
Berol Nobel
Stenungsund



Indre stand. $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$

Etter TLC, surt ekstrakt
Fraksjon 2: $P_{ow} > 10^5$
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

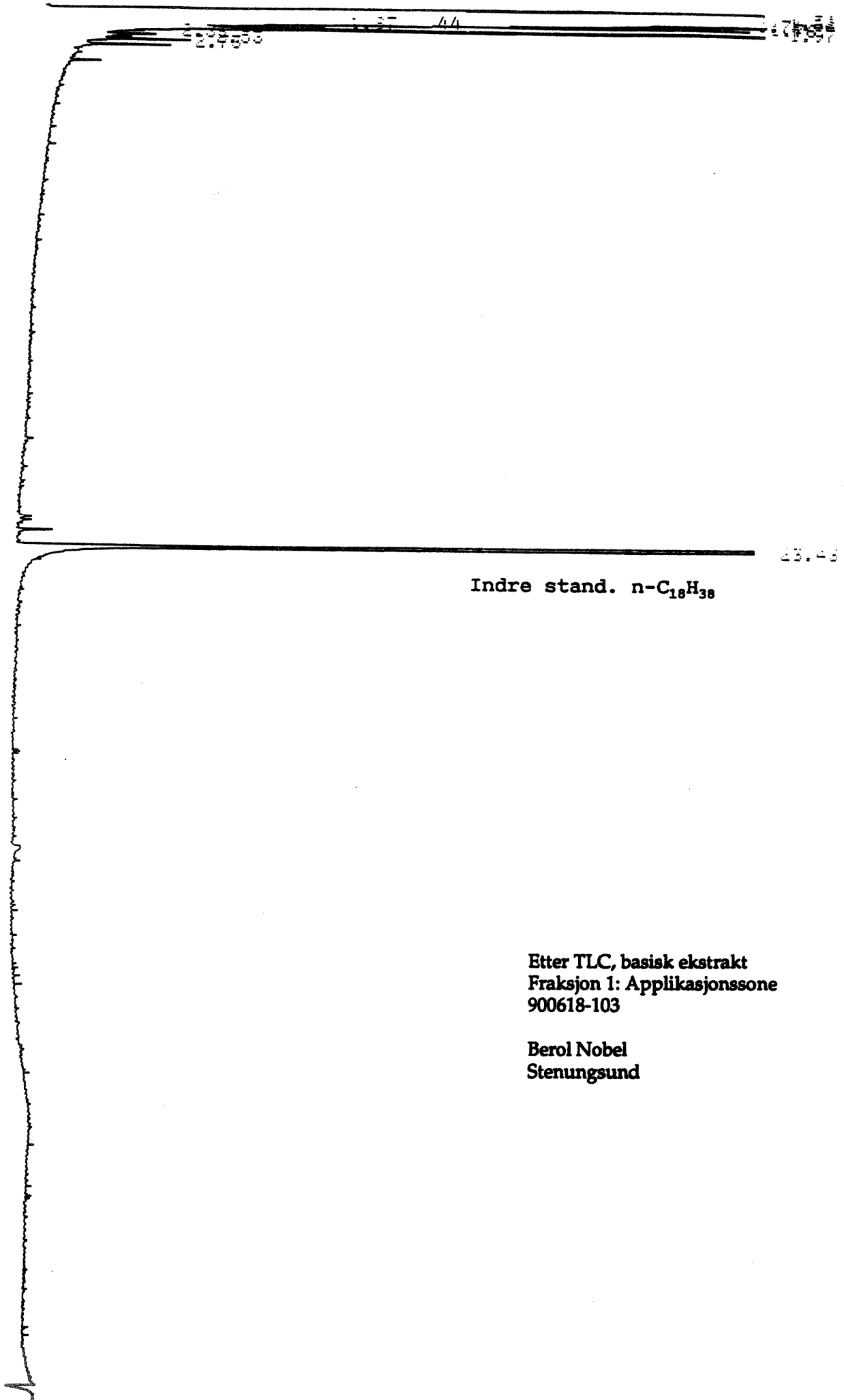


Indre stand. n-C₁₈H₃₈

23.48

Etter TLC, surt ekstrakt
Fraksjon 3: P_{ow} 10³-10⁵
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

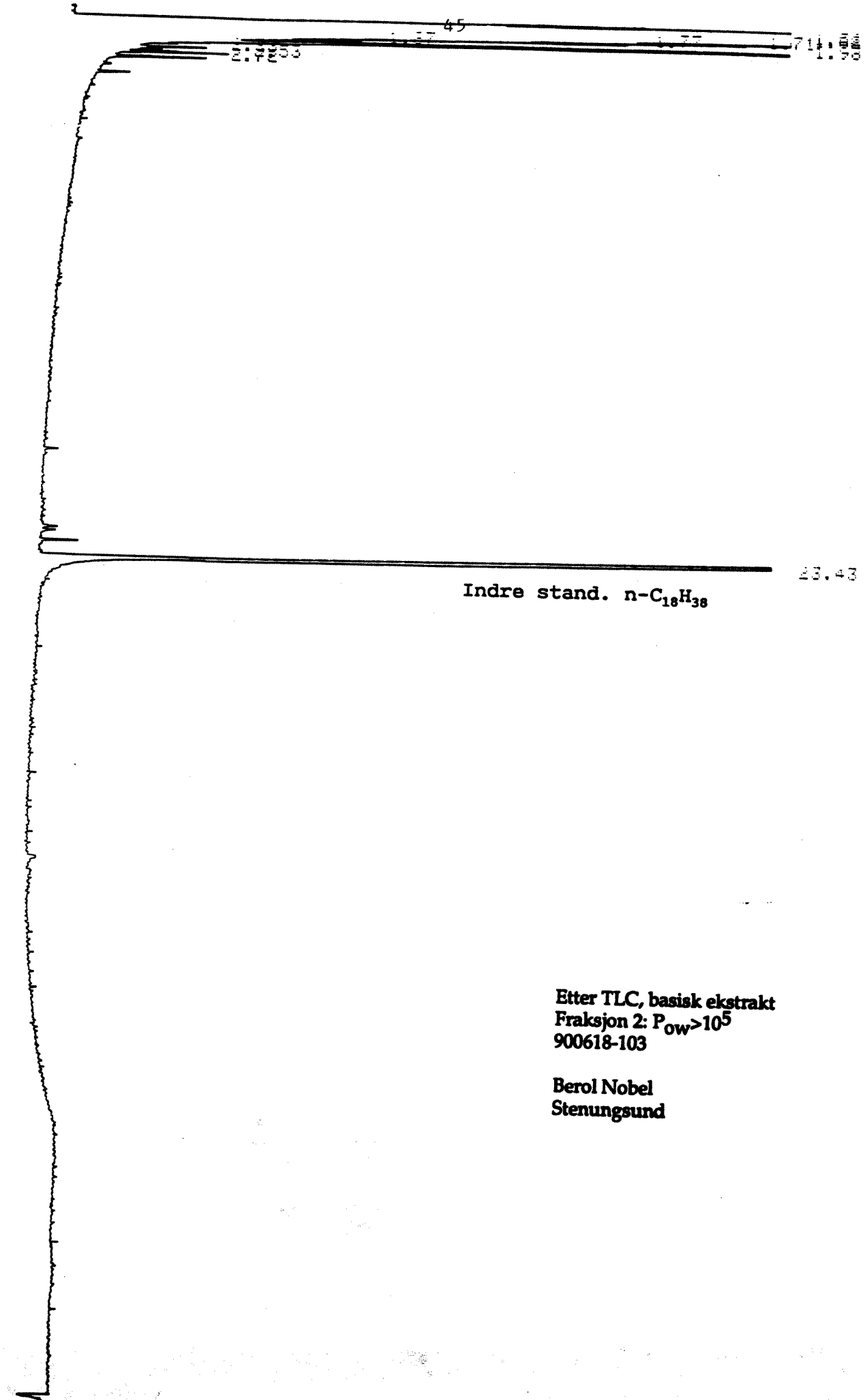


Indre stand. n-C₁₈H₃₈

23.43

Etter TLC, basisk ekstrakt
Fraksjon 1: Applikasjonsone
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund



1/1

Indre stand. n-C₁₈H₃₈

43.43

Etter TLC, basisk ekstrakt
Fraksjon 2: P_{ow}>10⁵
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

46

27.92

23.45

Indre stand. n-C₁₈H₃₈

Etter TLC, basisk ekstrakt
Fraksjon 3: P_{ow} 10³-10⁵
900618-103

Berol Nobel
Stenungsund

111

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, BEROL NOBEL, Stenungsund

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

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

TESTDATO: 18.06. 1990.

BETINGELSER FOR TESTPRØVER:

Testkonsentrasjoner: 1. serie: 5,6 10, 18, 32, 56 og 90% avløpsvann.
2. serie:

Slamkonsentrasjon i testprøvene; 1. testserie: 80 mg STS/L
2. testserie:

pH i testløsningene: 7,4

Testtemperatur: $20 \pm 2^{\circ} \text{C}$

Abiotisk oksygenforbruk i fysisk-kjemisk kontroll $< 0,1 \text{ mg/L}$

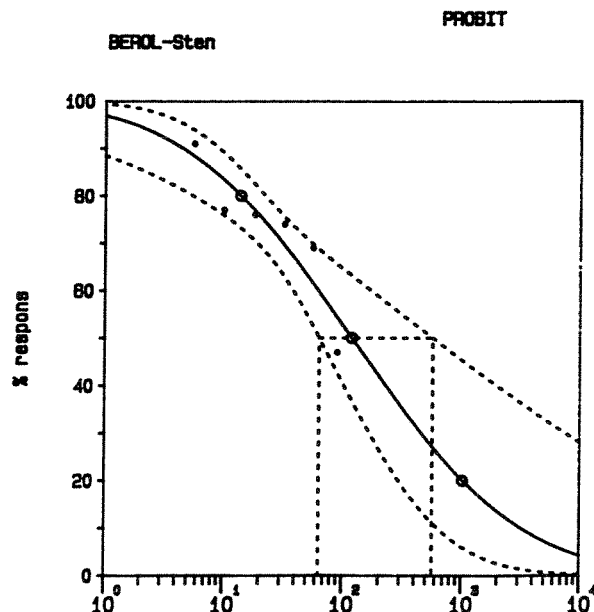
REFERANSESTOFF: 3,5-diklorfenol: EC_{50} -verdi på testslammet: 6,2 mg/L

RESULTATER:

EC_{50}	95% konfidensintervall	EC_{20}	EC_{80}
Ca 100 %		14 %	

Kommentarer:

Det ble registrert hemning på respirasjonsaktiviteten over et relativt bredt konsentrasjonsområde, uten at eksakt EC_{50} kan beregnes og opptegnes i probit diagrammet.



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, Γ_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 Γ -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 prøvelesningen. Spezialkuvetten plasseres i tårnet og bakteriesuspensjonen tilsettes bakterierøret, hvorefter 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 :

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

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 %:

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

MICROTOX(r) DATA SHEET

53

Berol Nobel, ukeprøve, Stenungsund, Fort. 1:10, 5min. 26/6-90

PAIR #	CONC.	Io/It	G-OBS	G-EST
1	0.560	86.7/ 67.9	0.208	0.210
2	1.130	87.2/ 59.6	0.384	0.378
3	2.250	86.4/ 48.6	0.681	0.672
4	4.500	83.8/ 36.3	1.183	1.200

BLANK Bo/Bt= 84.8 / 80.2
BLANK RATIO= 0.9458

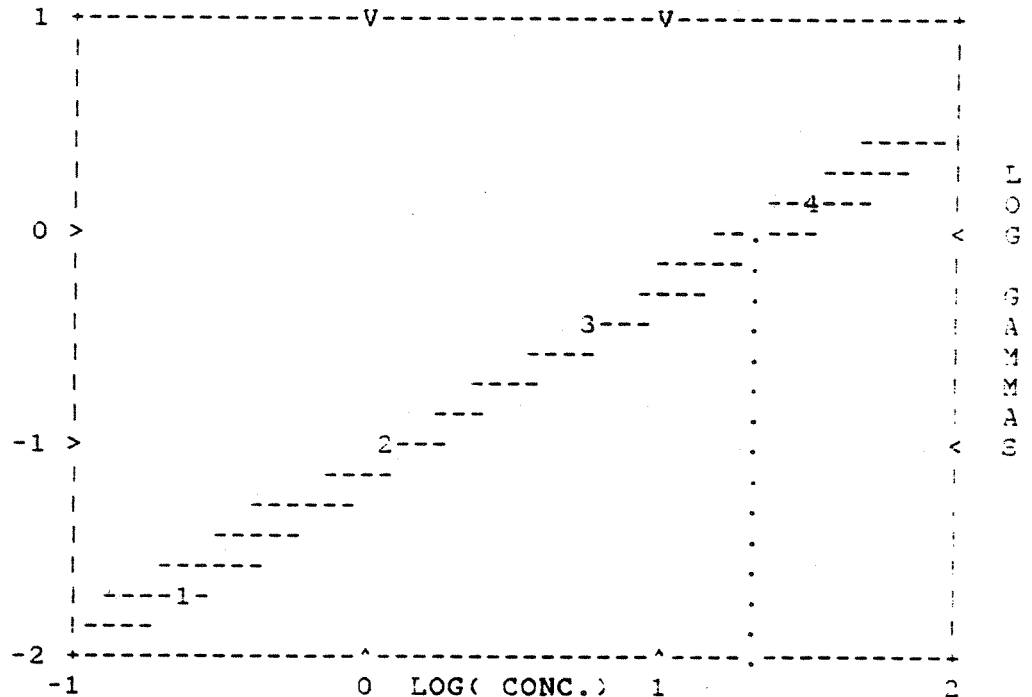
EC 50 = 3.618 (3.364 TO 3.891)
EC 20 = 0.688 (0.640 TO 0.741)
EC 80 = 19.015 (16.085 TO 22.478)

R = 0.99978 SLOPE = 1.1970 INTERCEPT = +1.2859

#	CONC.	GAMMAS
1	0.560	0.208
2	1.130	0.384
3	2.250	0.681
4	4.500	1.183

#	LOG CONC.	LOG GAMMAS
1	-0.58	-1.572
2	0.12	-0.958
3	0.81	-0.384
4	1.50	0.168

#	RES.	PROB.
1	0.085	100
2	0.054	41
3	0.055	42
4	0.083	96



MICROTOX is a Registered Trade Mark of the Microbics Corporation.

MICROTOX(r)⁵⁴ DATA SHEET

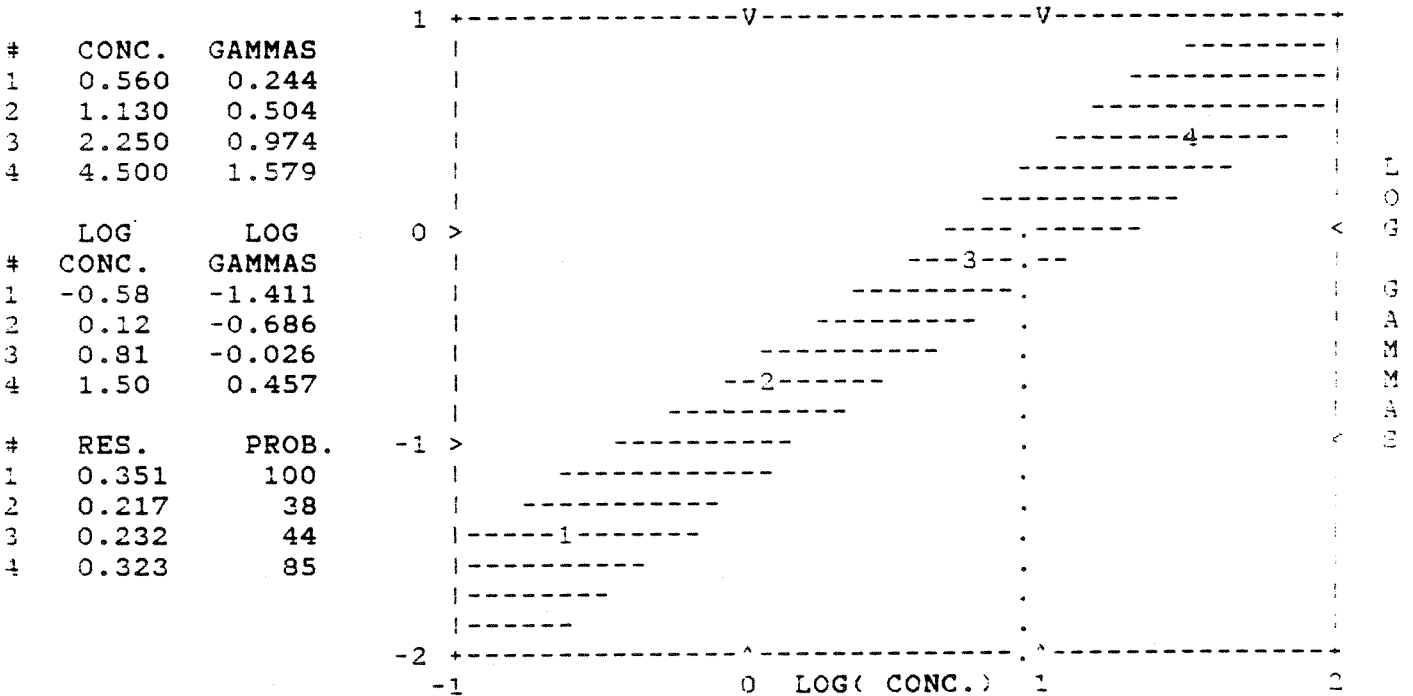
Berol Nobel, ukeprøve, Stenungsund, Fort. 1:10, 15min. 26/6-90

PAIR #	CONC.	Io/It	G-OBS	G-EST
1	0.560	86.7/ 63.7	0.244	0.257
2	1.130	87.2/ 53.0	0.504	0.484
3	2.250	86.4/ 40.0	0.974	0.901
4	4.500	83.8/ 29.7	1.579	1.685

BLANK Bo/Bt= 84.8 / 77.5
 BLANK RATIO= 0.9139

EC 50 = 2.516 (1.988 TO 3.184)
 EC 20 = 0.548 (0.388 TO 0.773)
 EC 80 = 11.559 (6.620 TO 20.183)

R = 0.99632 SLOPE = 1.0999 INTERCEPT = +0.9226



MICROTOX is a Registered Trade Mark of the Microbics Corporation.

100% - lysføring

DATE	10/0 - 90
FØLSOMHET	x 1
BATCH	910
KJØRTAV	1040

PRØVE	Blank Nobel eller nedbr. stengningsv.
UL	SL
pH i UL	_____
med	Korr. tLL _____

Jos	Js
87.5	77.3
76.1	77.2
73.2	74
\bar{X}_{015}	\bar{X}_5
78.9	76.1
T ₅	A ₅
	3.5%

Jos	J ₁₅
86.0	75.2
81.8	74.8
78.8	71
\bar{X}_{015}	\bar{X}_{15}
T ₁₅	A ₁₅

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 Berol Nobel, Stenungsund, blandprov 9/4 - 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: 5.6, 10, 18, 32, 56 og 90 %

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. 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 ₅₀ :	1.4%	0.46 %
95 % koinf. lim.	1.2 - 1.6 %	0.37 - 0.57 %
NOEC	<0.32 %	<0.32 %

EC₅₀ (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:>> ISO/DIS 8692

Dato>>> 18.6.90

TESTSTOFF>>>> Berol Nobel Stenungsund

TESTALGE>>>> Selenastrum capricornutum

Medium> ISO

INOKULUM>>>>>

10 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 %	10	28	45	15	1332	4	0.14	8
		21	42	14	1080	3	0.11	6
		26	35	20	1104	3	0.23	13
Kons.2 %	5.6	34	37	28	1440	4	0.34	19
		32	36	28	1368	4	0.34	19
		32	36	28	1368	4	0.34	19
Kons. 3 %	3.2	34	35	34	1464	4	0.41	23
		33	35	34	1440	4	0.41	23
		34	23	38	1224	4	0.45	25
Kons. 4 %	1.8	42	44	60	2184	6	0.60	34
		41	49	58	2256	6	0.59	33
		42	50	54	2256	6	0.56	32
Kons. 5 %	1	43	62	92	3024	9	0.74	42
		48	62	92	3144	9	0.74	42
		48	69	130	3768	11	0.85	48
Kons. 6 %	0.56	52	120	425	8628	25	1.25	70
		51	127	562	10416	30	1.34	76
		50	131	576	10656	31	1.35	76
Kons. 7 %	0.32	50	212	1380	22248	64	1.64	93
		59	280	1460	25056	72	1.66	94
		53	266	1410	23976	69	1.65	93
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

10.00 Mv:	25.00	40.67	16.33	1172.00	3.36	0.16	8.98
St. d.	2.94	4.19	2.62	113.56	0.33	0.05	2.90
5.60 Mv.	32.67	36.33	28.00	1392.00	3.99	0.34	19.34
St. d.	0.94	0.47	0.00	33.94	0.10	0.00	0.00
3.20 Mv.	33.67	31.00	35.33	1376.00	3.94	0.42	23.68
St. d.	0.47	5.66	1.89	107.93	0.31	0.02	0.98
1.80 Mv.	41.67	47.67	57.33	2232.00	6.40	0.58	32.78
St. d.	0.47	2.62	2.49	33.94	0.10	0.01	0.82
1.00 Mv.	46.33	64.33	104.67	3312.00	9.49	0.78	43.84
St. d.	2.36	3.30	17.91	326.14	0.93	0.05	3.06
0.56 Mv.	51.00	126.00	521.00	9900.00	28.37	1.31	74.07
St. d.	0.82	4.55	68.12	904.76	2.59	0.05	2.59
0.32 Mv.	54.00	252.67	1416.67	23760.00	68.08	1.65	93.03
St. d.	3.74	29.32	33.00	1156.49	3.31	0.01	0.44
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

Berol Nobel, Stenungsund Senastrum, vekstkurver

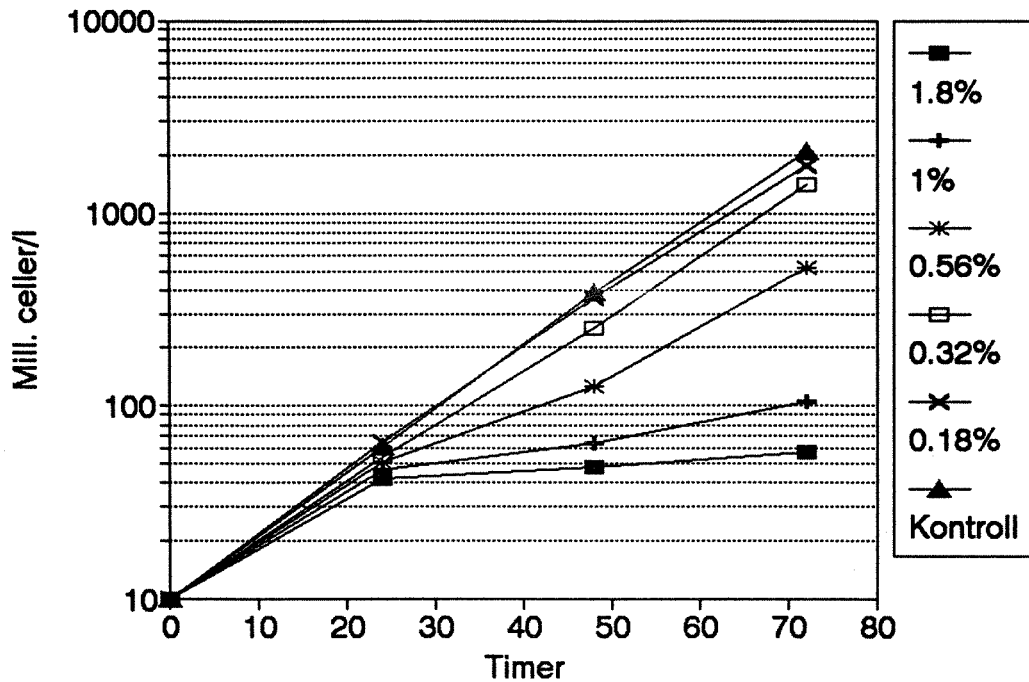


Fig. 1. Vekstkurver for *Senastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann.

Berol Nobel, Stenungsund Senastrum, veksthastighet

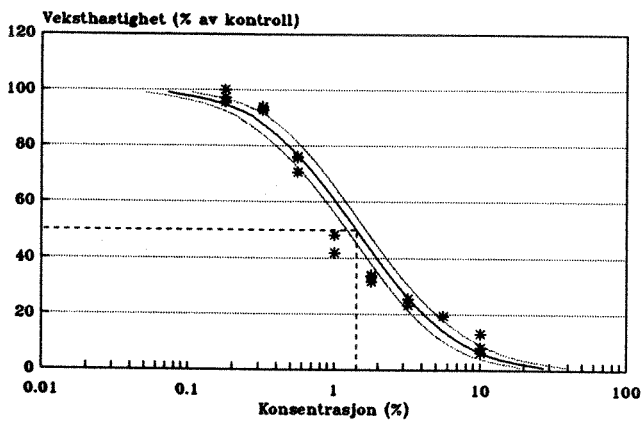


Fig. 2. Effekt av avløpsvann på veksthastigheten hos *Senastrum capricornutum*

Berol Nobel, Stenungsund Senastrum, areal under vekstkurve

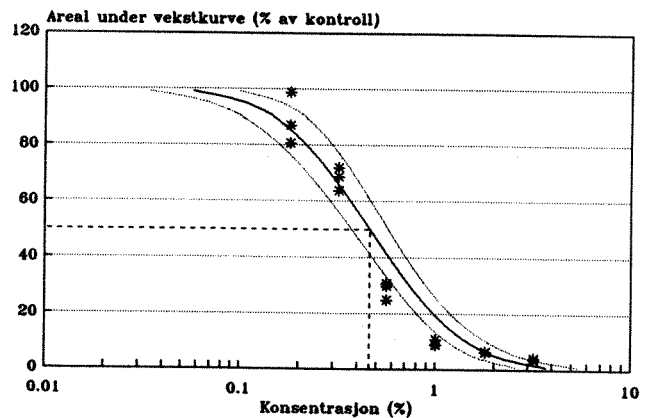


Fig. 3. Effekt av avløpsvann på areal under vekstkurve for *S. capricornutum*

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TOKSISITETSTEST MED ALGER

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

Prøve: Avløpsvann fra Berol Nobel, Stenungsund, blandprov 9/4 - 12/6 1990. etter nedbrytbarhetstest, fortynnet 1:3.33.

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: 18, 32, 56, 90 % (av fortynnet avløpsvann 1:3.33).

Inku- 50 ml kulturer i 100 ml rundkolber. Inkubert på gyngebord
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: Partikkeltelling med
Coulter Multisizer

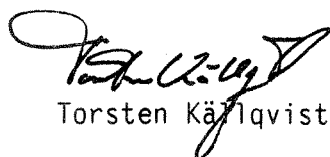
Resultat: Tabell 1 viser celletetthet ved hvert målepunkt, beregnet areal under vekstkurven og veksthastighet i hver kolbe. Middelerverdier for hver konsentrasjon og for kontrollene er listet nederst i tabellen. Vekstkurvene for hver konsentrasjon er vist i figur 1. Konsentrasjon/respons-kurver for veksthastighet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

	Veksthastighet	Areal under vekstkurve
EC ₅₀ :	41 %	25 %
95 % koinf. lim.	36 - 47 %	21 - 30 %
NOEC	17 %	17 %

EC₅₀ (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 Kärlqvist

TEST:>> ISO/DIS 8692

Dato>>> 6.8.90

TESTSTOFF>>>> Berol, Stenungsund, etter nedbrytning

TESTALGE>>>>> *Selenastrum capricornutum* Medium> ISO

INOKULUM>>>>> 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 *27% (90% fortynnet)	38	150	506	9864	38	1.25	80
	44	166	463	9876	38	1.22	78
	47	198	524	11448	44	1.26	81
Kons. 2 *16.8% (56% fortynnet)	56	372	1410	26472	102	1.59	102
	57	348	1090	22080	85	1.50	96
	57	378	1290	25200	97	1.56	100
Kons. 3 *9.6% (32% fortynnet)	64	510	1620	32496	126	1.64	105
	66	480	1670	32424	125	1.65	105
	65	467	1540	30528	118	1.62	104
Kons. 4 *5.4% (18% fortynnet)	70	481	2130	38064	147	1.73	111
	70	477	1960	35928	139	1.70	109
	68	491	2280	40056	155	1.75	112
Kons. 5							
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

*27%	Mv.	43.00	171.33	497.67	10396.00	40.22	1.24	79.52
	St. d.	3.74	19.96	25.59	743.89	2.88	0.02	1.11
*16.8%	Mv.	56.67	366.00	1263.33	24584.00	95.11	1.55	99.32
	St. d.	0.47	12.96	131.99	1845.18	7.14	0.04	2.28
*9.6%	Mv.	65.00	485.67	1610.00	31816.00	123.09	1.63	104.61
	St. d.	0.82	18.01	53.54	911.23	3.53	0.01	0.71
*5.4%	Mv.	69.33	483.00	2123.33	38016.00	147.08	1.72	110.49
	St. d.	0.94	5.89	130.72	1685.59	6.52	0.02	1.32
0.00	Mv.							
	St. d.							
0.00	Mv.							
	St. d.							
0.00	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

Berol Nobel, etter nedbrytning Senastrum, vekstkurver

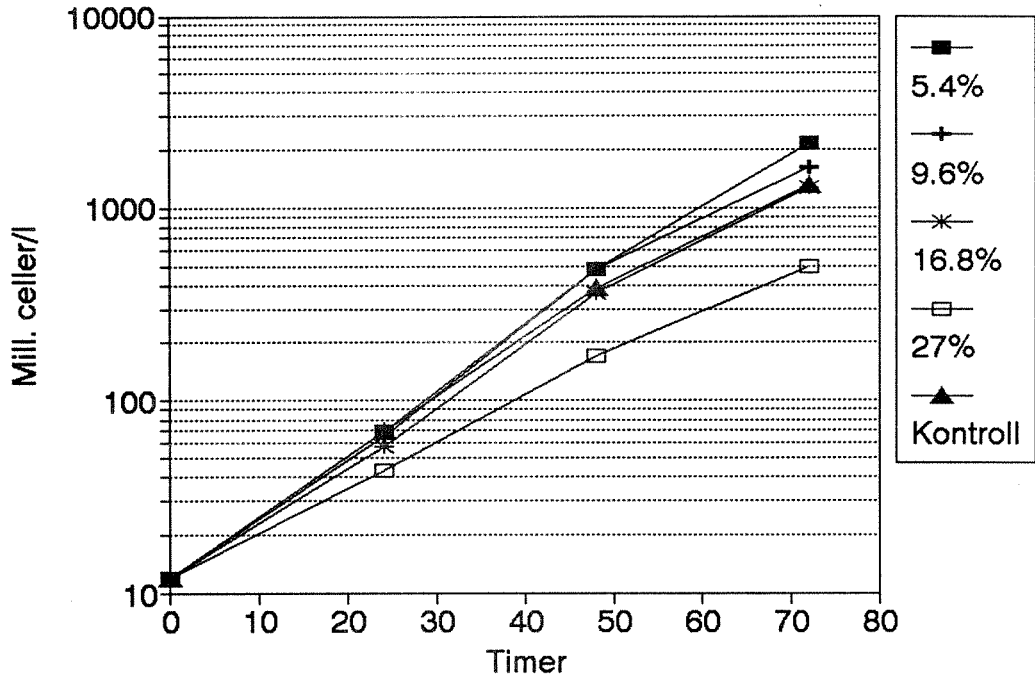


Fig. 1. Vekstkurver for *Senastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann.

Berol Nobel etter nedbrytning Senastrum, veksthastighet

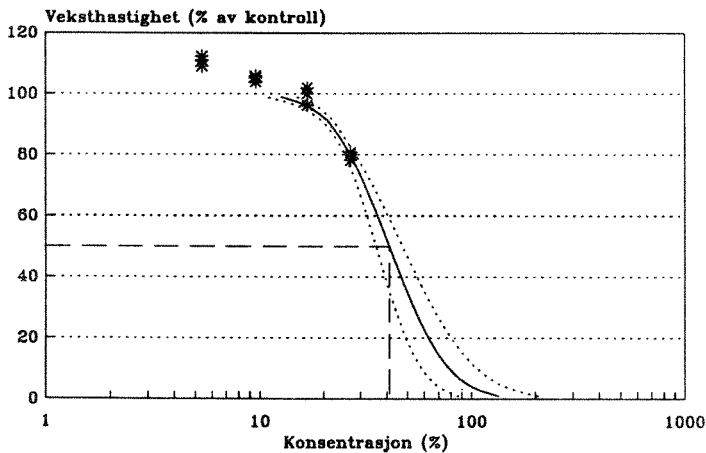


Fig. 2. Effekt av avløpsvann på veksthastigheten hos *Senastrum capricornutum*

Berol Nobel, etter nedbrytning Senastrum, areal under vekstkurve

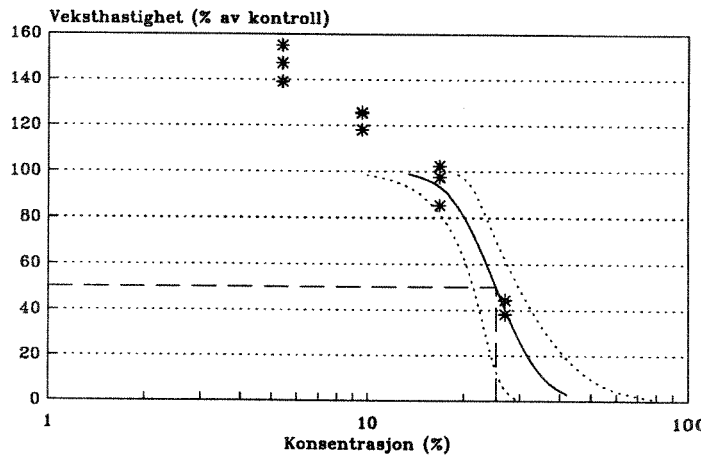


Fig. 3. Effekt av avløpsvann på areal under vekstkurve for *S. capricornutum*

APPENDIX 7

Toxicitetstester 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 B₁₂ 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

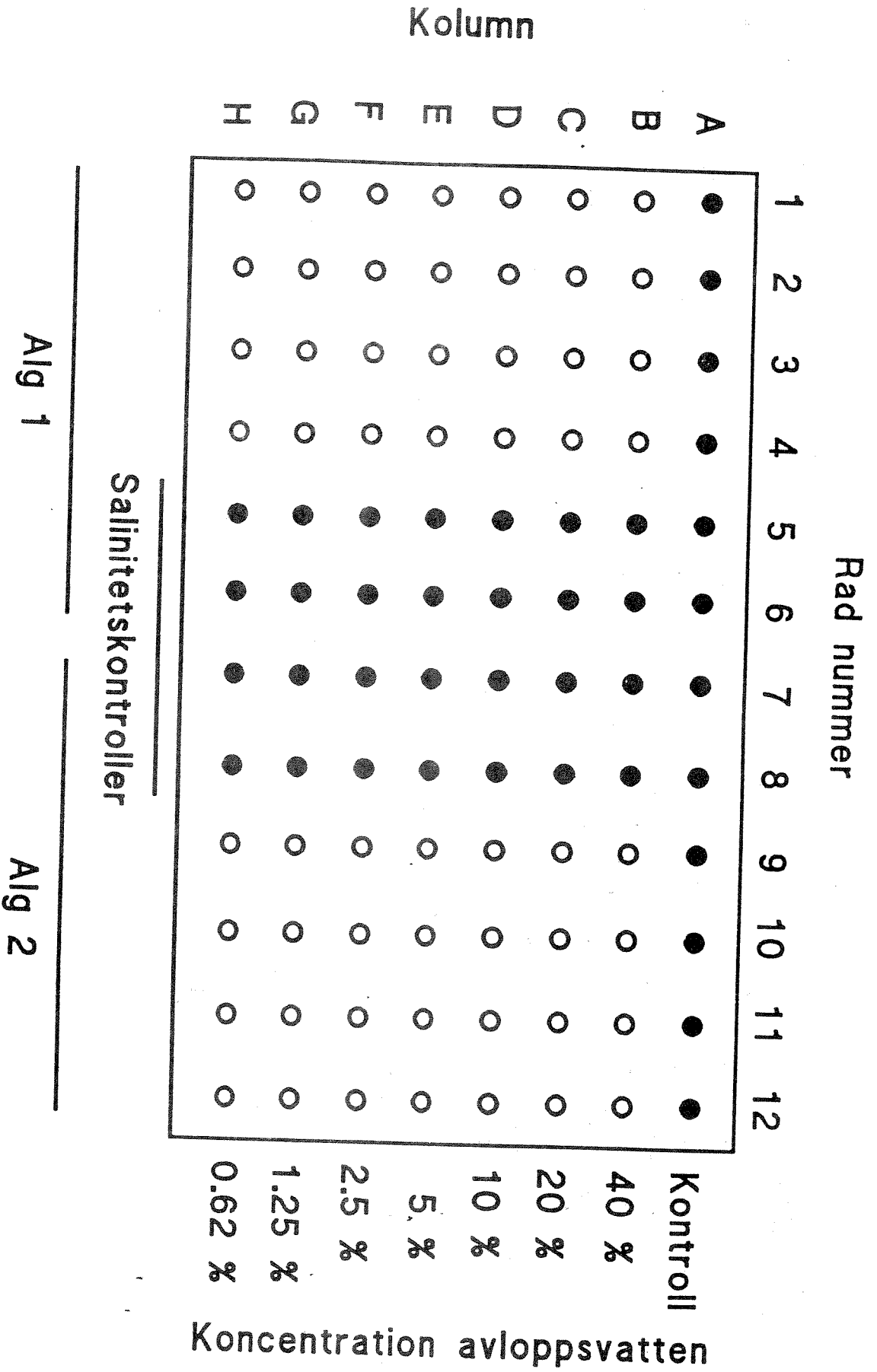
En sammanställning av resultaten ges i Tabell 1. Något förvånande visade det sig att åldringen av vatten inte minskade toxiciteten, snarare ökade den i flera fall. För att kontrollera att detta inte var något misstag reproducerades testen med vattnen från Neste och Statoil för två alger (Phaeodactylum 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.

Figur 1



Tabell 1

5-dagars avläsning ECO (%)		
	Berol	åldrat *
	Färskt	
Dunaliella bioculata	20	5
Platymonas subcordiformis	0.62	10
Tetraselmis sp.	2.5	10
Emiliana huxleyi	0.62	20
Prorocentrum minimum	-	-
Porphyridium cruentum	2.5	2.5
Phaeodactylum tricornutum	2.5	10
Hymenomonas carterae	0.62	5
geom.medel	1.851	7.430
range	0.62-20	2.5-20
5-dagars avläsning EC100		
	Berol	åldrat
	Färskt	
Dunaliella bioculata	40	>
Platymonas subcordiformis	>	>
Tetraselmis sp.	40	>
Emiliana huxleyi	>	40
Prorocentrum minimum	-	-
Porphyridium cruentum	10	40
Phaeodactylum tricornutum	10	>
Hymenomonas carterae	>	40
geom.medel	36.229	59.440
range	10->	40->
12-dagars avläsning ECO		
	Berol	åldrat
	Färskt	
Dunaliella bioculata	20	20
Platymonas subcordiformis	>	5
Tetraselmis sp.	2.5	10
Emiliana huxleyi	1.25	20
Prorocentrum minimum	1.25	5
Porphyridium cruentum	0.62	2.5
Phaeodactylum tricornutum	2.5	5
Hymenomonas carterae	5	5
geom.medel	3.532	7.071
range	0.62->	2.5-20
12-dagars avläsning EC100		
	Berol	åldrat
	Färskt	
Dunaliella bioculata	>	>
Platymonas subcordiformis	>	>
Tetraselmis sp.	>	>
Emiliana huxleyi	>	40
Prorocentrum minimum	10	10
Porphyridium cruentum	>	>
Phaeodactylum tricornutum	10	>
Hymenomonas carterae	>	40
geom.medel	47.568	51.874
range	10->	10->

* OBS. Koncentrationerna av åldrat vatten är inte korrigerade för den utspädning som gjordes vid nedbrytbarhetstesten (30%). De angivna koncentrationerna skall alltså multipliceras med 0.3 för att representera det ursprungliga avloppsvattnet.

APPENDIX 8

Akutt toksisitetest, *Nitocra spinipes*

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: BEROL 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.: 5-6.

Testtemperatur: 20 ± 0,5 °C pH: 7,8 - 7,9 Oksygen metn.% = > 93

Testkonsentrasjoner: 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10 og 18 %

Testperiode: 02.07 -06.07.1990

Kontrollstoff: Kaliumdikromat, 96 t $EC_{50} = 48,0$ mg/L

RESULTATER:

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

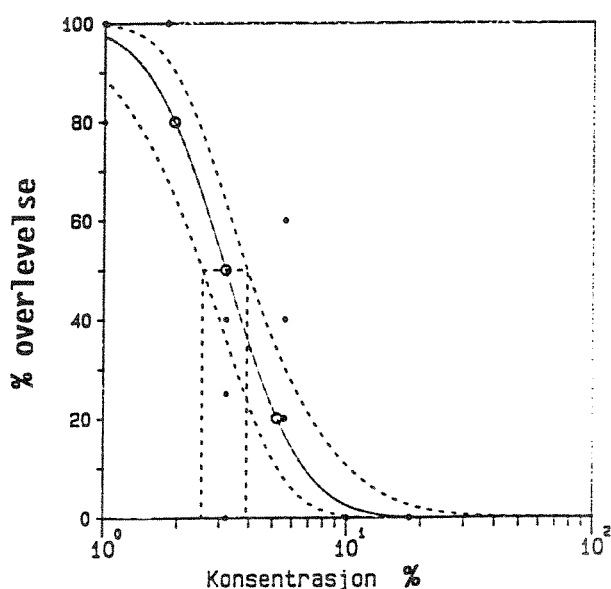
96 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

Verdier		95 % konfidens-
Avl.vann %		intervall
LC ₅₀	3,2	2,5 - 3,9
LC ₂₀	1,9	
LC ₈₀	5,2	

Kommentarer:

Normal dose-respons kurve, med akutt respons over et smalt konsentrasjonsområde.

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: BEROL Stenungsund. Avløpsvann. Etter bionedbrytning BOD_{35} .

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.: 5-6.

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

Testkonsentrasjoner: Konsentrert testprøve (30% avl.a.), og 56 % testprøve.
Testperiode: 02.08 -06.08.1990

Kontrollstoff: Kaliumdikromat, 96 t $EC_{50} = 29,0$ mg/L

RESULTATER:

% dødlighet (immobilitet) i kontrollene: 96t = 0
96 timers eksponering: LC-verdier med 95 % konfidensintervall

Dose-respons diagram:

Kan ikke optegnes

Kommentarer:

Ingen dødlighet ble observert etter 96 timer eksponering.
(30 % avløpsvann etter BOD_{35})

APPENDIX 9

Reproduksjonstest, *Nitocra spinipes*

TESTRAPPORT**REPRODUKSJONSTEST MED NITOCRA SPINIPES**

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

TESTSTOFF: BEROL 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: 0.56, 1.0 og 1.8 %

Testperiode: 03.08 -17.08.1990

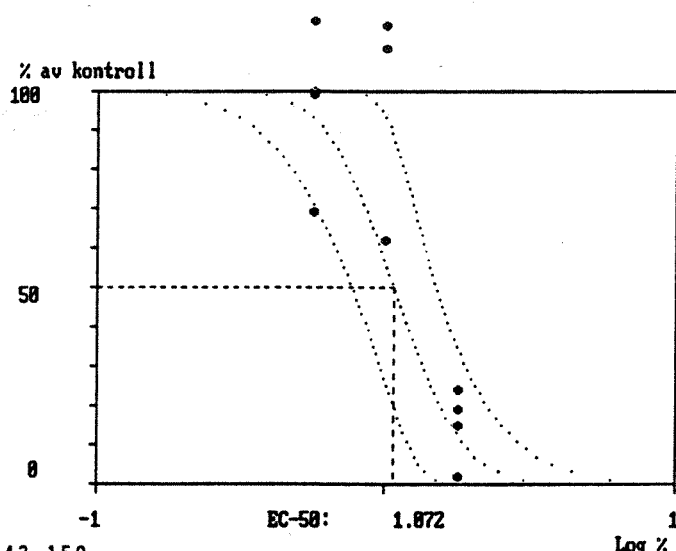
RESULTATER:

Kons.	Antall Glass	Foreldre		Antall avkom			Copepod. Nauplier	
		Individ	Lev. 14 d	Totalt	Snitt/gl	SD	snitt/glass	
Kontroll	4	5	18	317	79	18	22	57
0.56 %	4	5	17	416	104	19	26	78
1.0 %	4	5	18	496	124	41	34	90
1.8 %	4	5	9	64	16	9	3	13

EC₅₀-verdi = 1 % 95 % konf. int. 0.8 - 1.5 % avløpsvann.

Kommentarer:

Relativ stor variasjon i avkom fra individ i de enkelte testglass, spesielt ved 1 % testkonsentrasjon. Relativt lav utviklingsgrad av copepoditter ved denne testserie, også i kontrollen.

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: BEROL Stenungsund. Avløpsvann, Etter nedbrytning.

TESTORGANISMENS OPPRINNELSE: Stamme fra VKI Danmark

FØRINGSBETINGELSER: Dyrket etter metodeforslag fra VKI, 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 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: 5.4, 9.6 og 16.8 % avløpsvann. (Konsentrasjonene korrigert for fortynning ved nedbrytbarhetstesten)

Testperiode: 18.09. -1.10.1990

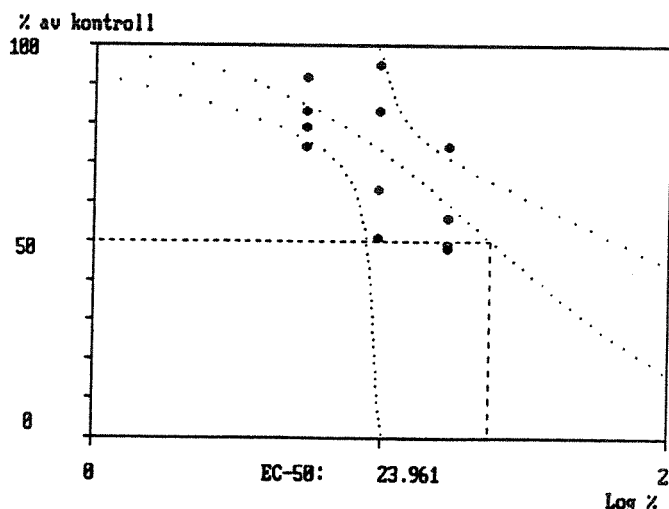
RESULTATER:

Kons.	Antall Glass	Foreldre		Antall avkom			Copepod. Nauplier	
		Individ	Lev. 14 d	Totalt	Snitt/g/l	SD	snitt/glass	
Kontroll	4	5	18	901	225	34	112	113
5.4 %	4	5	20	738	185	15	97	88
9.6 %	4	5	20	658	165	38	64	101
16.8 %	4	5	20	511	128	24	42	86

EC₅₀-verdi = 24 % 95 % konf. int. 9 - 65 % avløpsvann.

Kommentarer:

Ufortynnet testløsning etter nedbrytning gir ikke tilstrekkelig effekt til at god dose/responskurve kan beregnes (ekstrapolering). Utviklingen fra nauplier til copepoditter er tydelig påvirket ved 16.8 %.

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) *Studier*

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/.

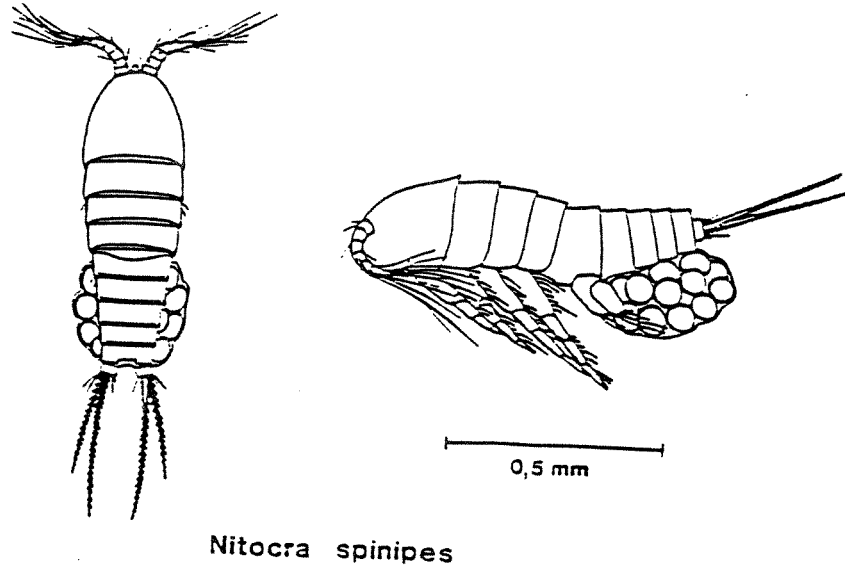
Som andre krebsdyr vokser N. spinipes kun ved hudskifter. Larverne gennemgår således adskillige stadier (figur 2), der adskilles af hudskifter. Under selve hudskiftet antages det, at dyrene er særligt følsomme. Der er 6 naupliestadier og 5 copepodstadier inden voksenstadiet nås.

3. KULTIVERING AF NITOCRA SPINIPES

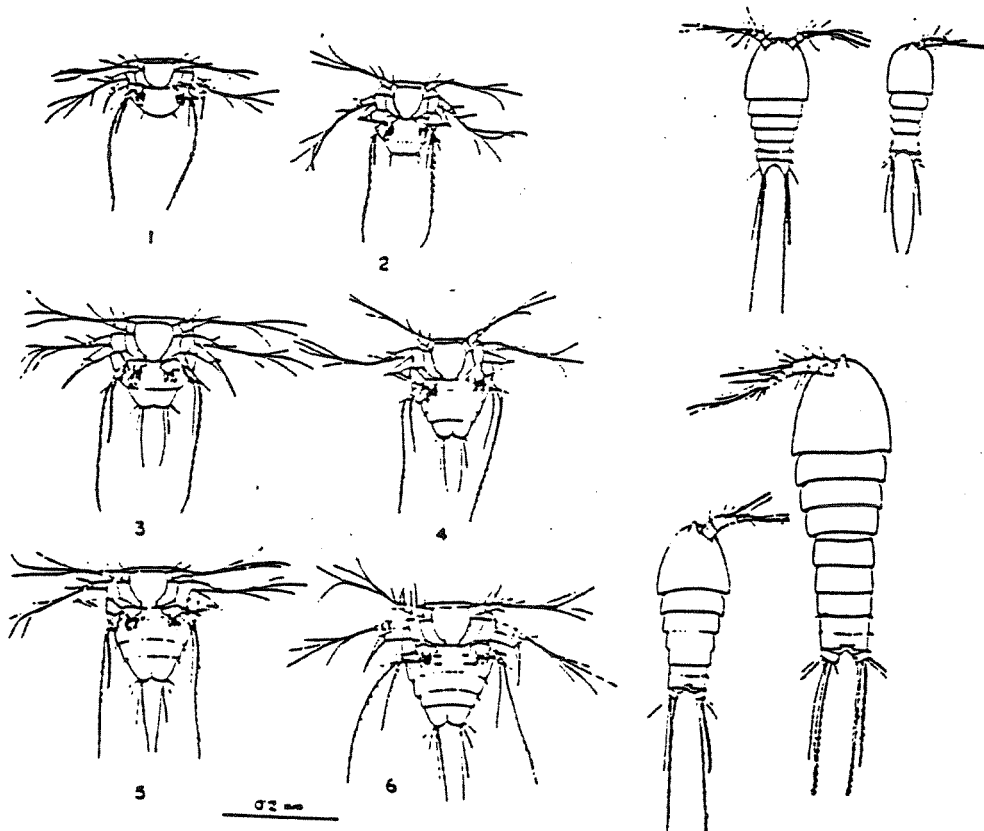
N. spinipes har været holdt i laboratoriet siden 1975 /2/. På VKI har den været holdt siden 1981.

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.



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/.

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 aflases.

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 holdes 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

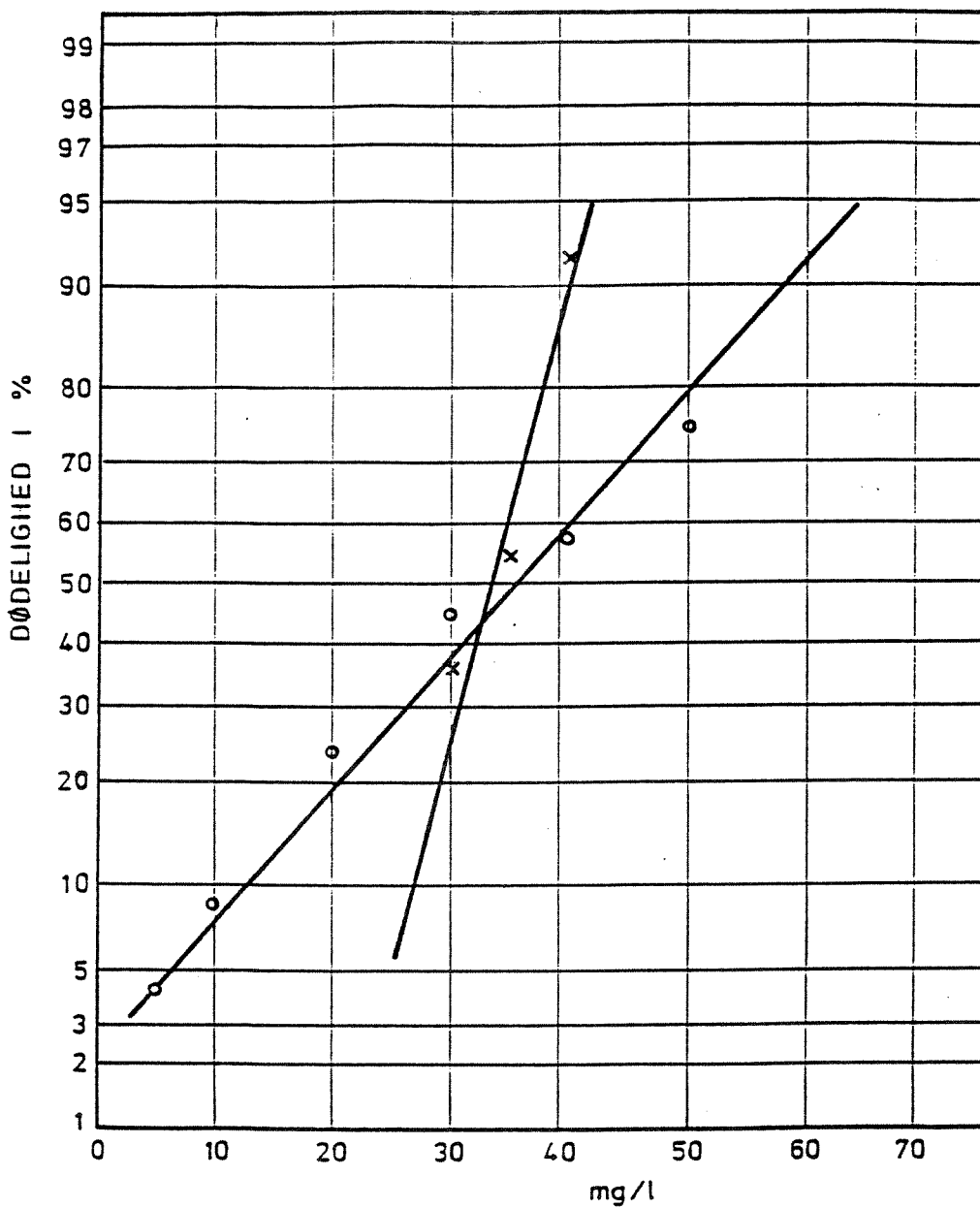
Resultat af preliminær test efter 96 timers eksponering:

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	Y	JEND
1	0	20	0
2	0	20	0
3	0	24	1
4	10	23	3
5	30	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

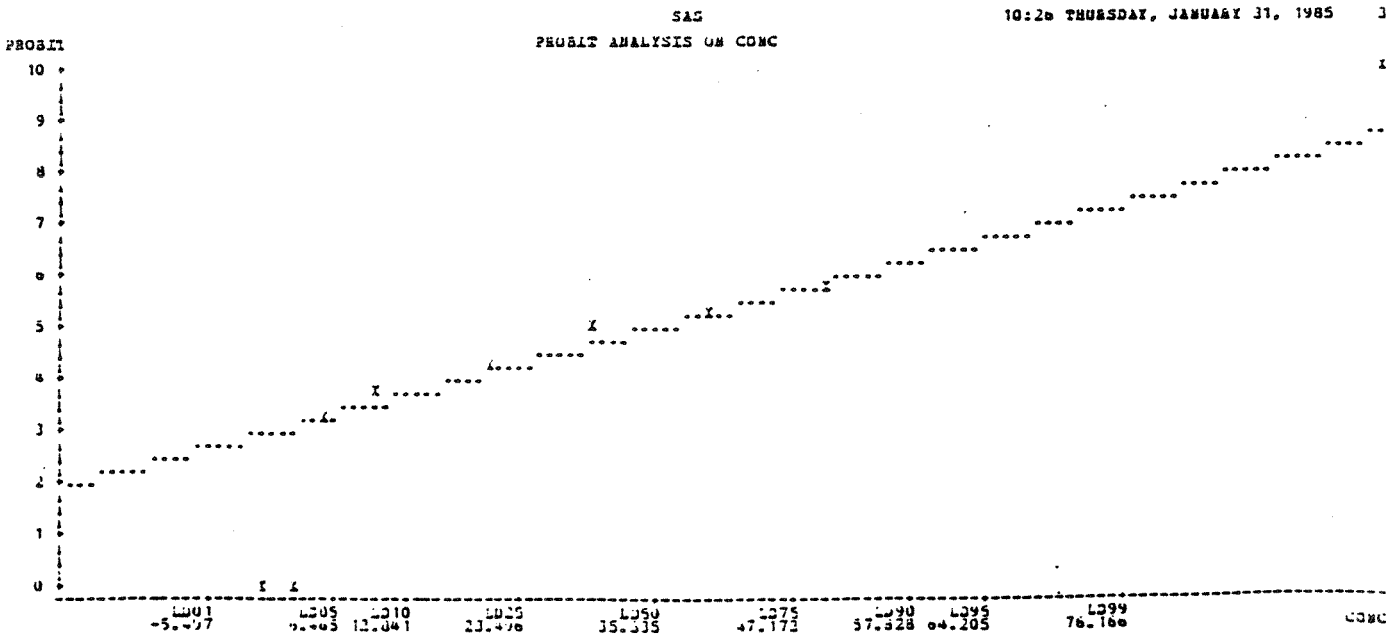
PROBIT ANALYSIS ON CONC

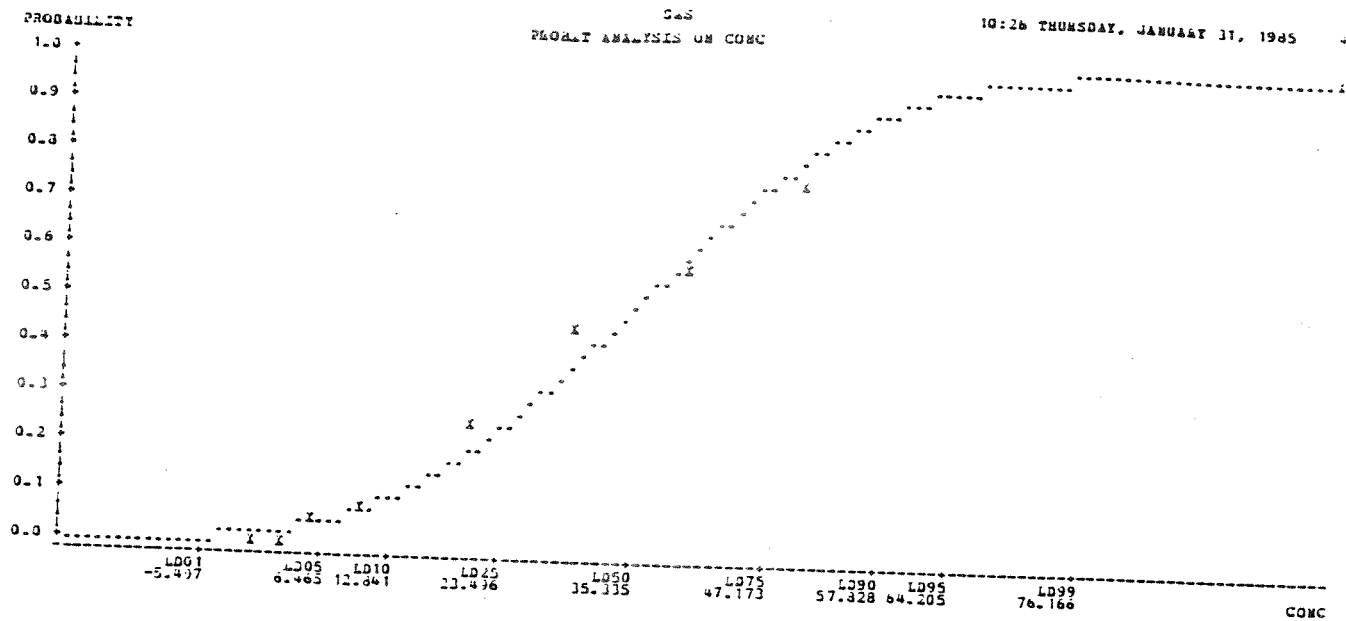
ITERATION	INTERCEPT	SLOPE	MU	SIGMA
0	3.14594763	0.05297550	35.37583312	18.87885194
1	2.7441772	0.02674927	35.11228278	17.82117239
2	2.98883718	0.05897354	35.11469990	17.55208448
3	2.98882902	0.05897430	35.13471983	17.55177289

COVARIANCE MATRIX		INTERCEPT	SLOPE	COVARIANCE MATRIX		MU	SIGMA
INTERCEPT		3.08271621	-0.00171023	MU		5.7518055	2.51124797
SLOPE		-0.00171028	0.00006155	SIGMA		2.51124797	5.34096948

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
0.00000	-5.49803705	-18.75423036	2.53086568
0.00001	-0.71221458	-12.34354670	6.44109791
0.00002	2.32345762	-3.24803529	8.94469324
0.00003	4.60707556	-1.30271472	10.84336648
0.00004	6.46462253	-0.38299129	12.39975728
0.00005	8.04568685	0.74517204	13.73456048
0.00006	9.43197693	1.06593059	14.91378782
0.00007	10.67322295	2.06796065	15.97769044
0.00008	11.80209202	2.84139678	16.95272551
0.00009	12.84121784	3.47664969	17.85727071
0.00010	17.14347640	4.92391135	21.09149354
0.00011	20.56277511	6.15261722	24.87497804
0.00012	23.49822394	7.1849387	27.73615547
0.00013	26.13056115	8.064196	30.42997594
0.00014	28.57166253	8.839654	33.04237560
0.00015	30.88802902	9.52674572	35.62629745
0.00016	33.12914047	10.14790357	38.2335183
0.00017	35.3471963	10.70677073	40.84831454
0.00018	37.54029435	11.20574331	43.34534649
0.00019	39.78141064	11.64484973	46.34279606
0.00020	42.09777714	12.02007183	49.28309410
0.00021	44.53887852	12.34484973	52.42457932
0.00022	47.17321072	12.61866673	55.90534340
0.00023	50.10666456	12.84484973	59.70811153
0.00024	53.2596327	13.0278106	64.2378457
0.00025	56.6734765	13.16978249	69.37836704
0.00026	59.9921671	13.2760833	71.37020157
0.00027	61.23746875	13.35276	72.88421076
0.00028	62.62375281	13.404967	74.55111337
0.00029	64.20481706	13.4371544	76.41523242
0.00030	66.02236411	13.4525615	78.54411032
0.00031	68.04598204	13.4555615	81.04872014
0.00032	71.18165422	13.4420044	84.13210414
0.00033	76.10624931	13.41468294	88.23379367
0.00034		13.212492	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 Ste-nungsund 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

Neste / Neste degraded

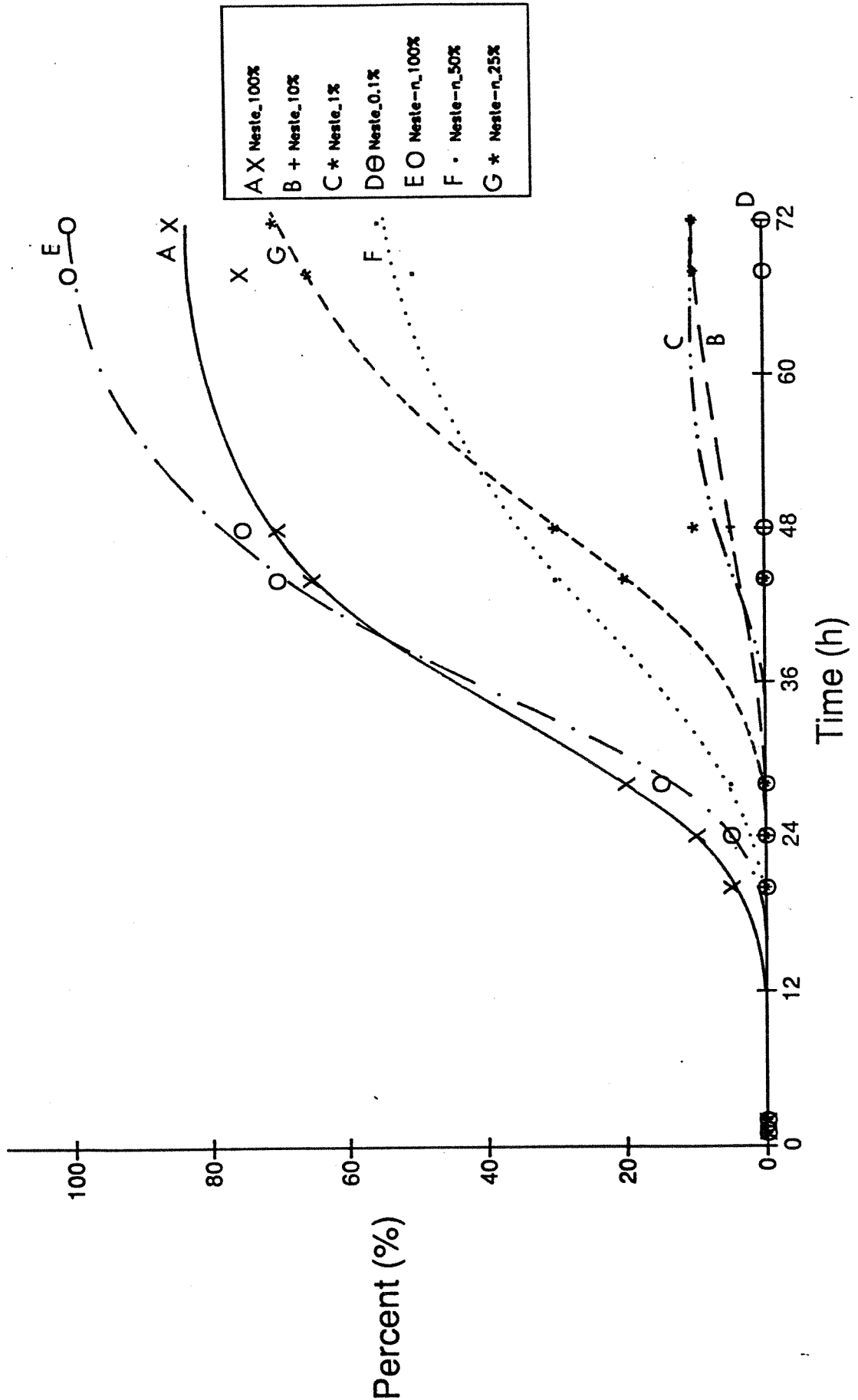


Fig. 2. Kumulativ dödlighet hos storspigg vid expo-nering för avloppsvatten från Neste Oxo AB. "Neste-n" i diagrammet betecknar avloppsvatten som genomgått nedbrytbarhetstest.

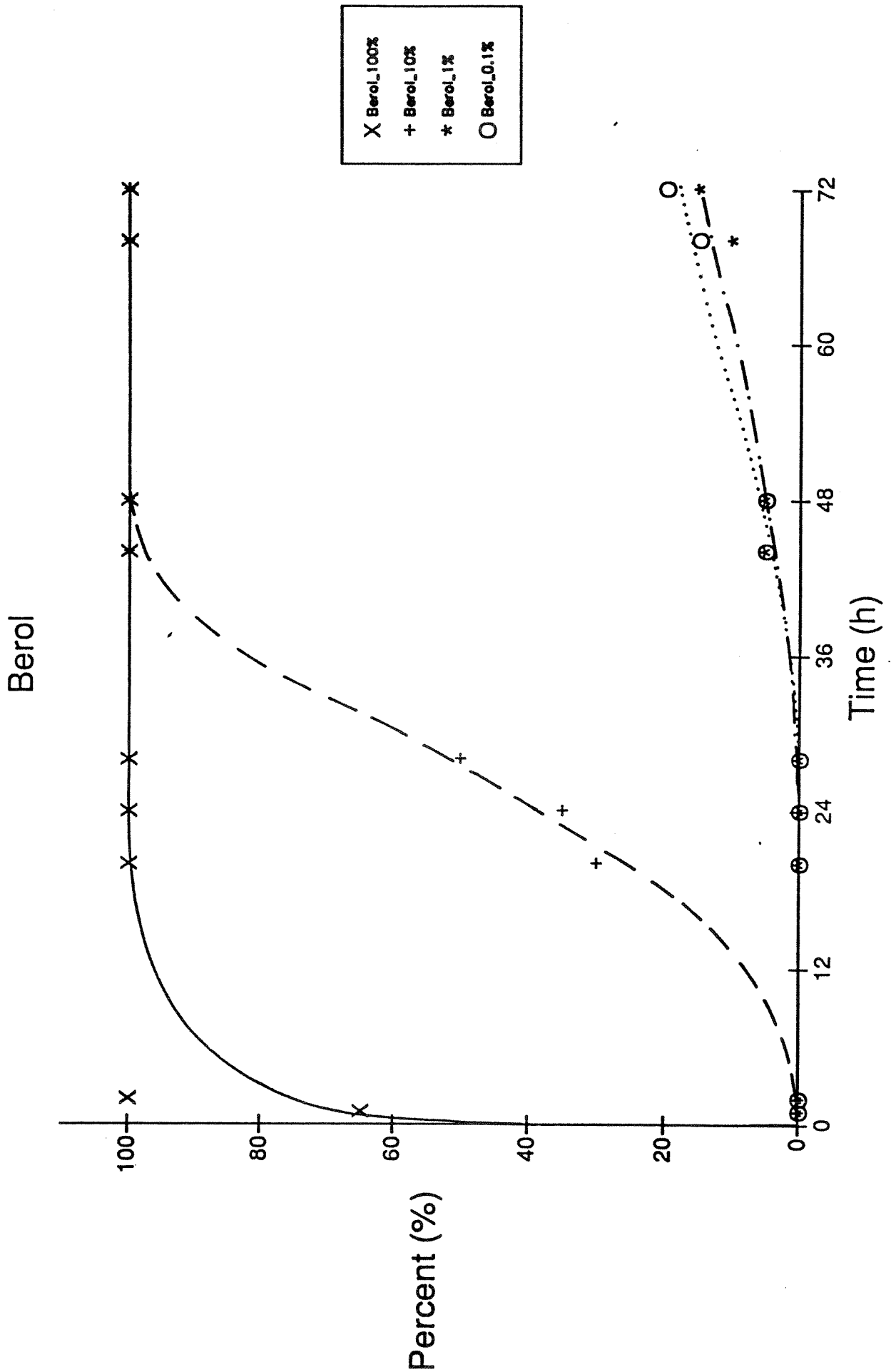


Fig. 1. Kumulativ dödlighet hos storspigg vid exponering för avloppsvatten från Berol Nobel AB.

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 inducerer leserammeforskjyvnng. TA 100 er mest følsom for mutagener som inducerer baseparsubstitusjon.

Enkelte 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 dobbling 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

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.

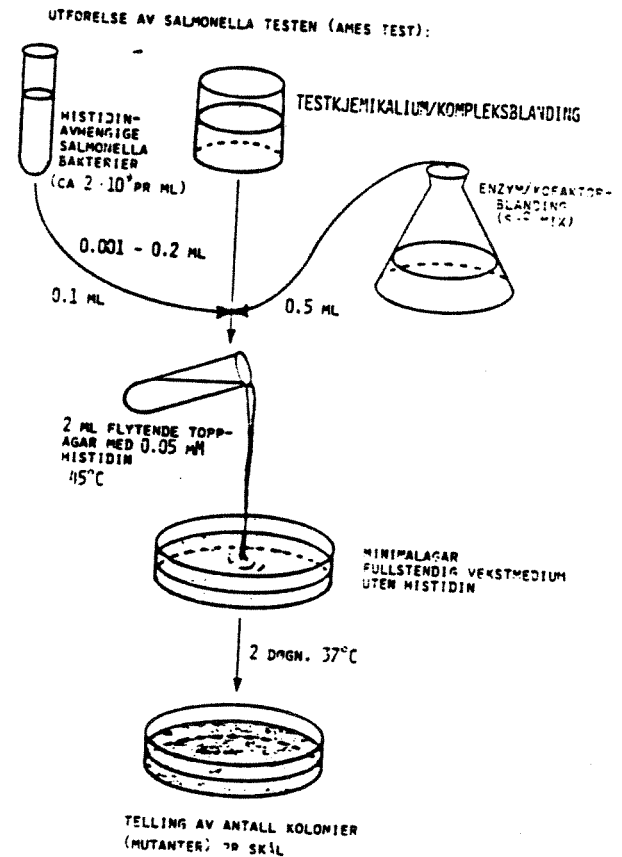


HVA ER AMES' TEST?

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 tilsatt av testsubstans. Som positive kontroller blir benzo(a)pyren (BaP) og 1-nitropyren (1NP) benyttet.

Vedlegg

BEROL NOBEL, 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		23	
	10		22	
	20	13	22	20
	50	16		tox
	1 00			tox
Etter nedbr.	5		23	
	10		29	
	20	22	24	21
	50	17		20
	1 00			13
Kontr. 0,2µg NP		20	29	18
		1800	1700	2000

Vedlegg

BEROL NOBEL, 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	Bakteriestamme Ta98+S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		23	
	10		22	
	20	26	30	17
	50	20		tox
	1 00			tox
Etter nedbr.	5		27	
	10		28	
	20	17	29	19
	50	17		22
	1 00			12
Kontr. 5µg BaP		21	27	23
		225	250	360

Vedlegg

BEROL NOBEL, 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	Bakteristamme Ta100-S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		124	
	10		110	73
	20	81	tox	tox
	50	42		tox
Etter nedbr.	5		122	
	10		124	119
	20	117	129	
	50	100		
Kontr. 2µg NP		115	120	110
		2000	1500	1600

Vedlegg

BEROL NOBEL, 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	Bakteristamme Ta100+S9		
		forsøk 1	forsøk 2	forsøk 3
Før nedbr.	5		133	
	10		105	79
	20	116		tox
	50	78		tox
Etter nedbr.	5		122	
	10		136	
	20		127	114
	50	106		
Kontr. 5µg BaP		110	125	114
		1200	1100	1100

APPENDIX 12

Nedbrytbarhetstester

Norsk institutt for vannforskning

TESTRAPPORT**NEDBRYTBARHETSTEST: REDUKSJON I LØST ORGANISK KARBON OVER 35 DØGN**

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

TESTSTOFF: Avløpsvann, BEROL Stenungsund.

TESTBETINGELSER

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

TEST-MEDIUM: Avløpsvann tilsatt saltløsninger og destillert vann til en fortykninggrad på 1:3,33 (30 %).

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

INKUBASJON: Temperatur; 20 ± 1.0 °C . Varighet: 35 dager.

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

Dato for test-start: 18.06. 1990

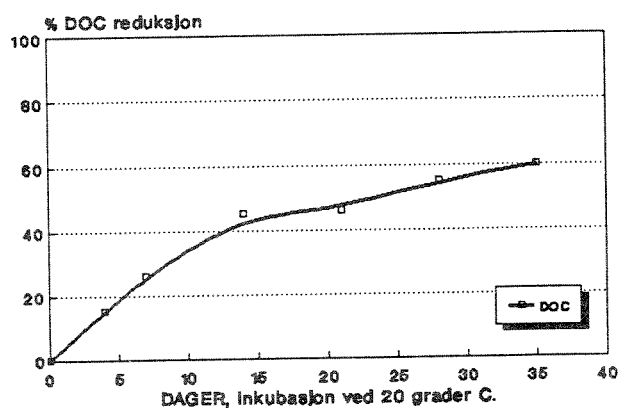
RESULTATER:**Løst organisk karbon DOC**

BEROL-Sten.	Konsentrasjon etter x dager (mg/l C)						
	0	4	7	14	21	28	35
Avl.vann 30% i dest.v.+ salter	42,8	35,9	31,3	23,3	22,7	18,9	17,1
Blank med inoc.	41,8		0,3	0,2		0,2	0,2
DOC korrigert	0,3						
	42,0	35,6	31,0	23,1	22,5	18,7	16,9

Evaluering av DOC-data

Døgn fra start	% DOC reduksjon etter x dager					
	4	7	14	21	28	35
DOC-reduksjon	15	26	45	46	55	60

Diagram:



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: BERÖL, Stenungsund. Avløpsvann

TESTAPPARATUR: Manometrisk respirometer, WtW 2001

NÆRINGSLØSNING: ISO/DIS 9408 Saltløn. 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: $4,0 \cdot 10^5$. Tilsetning: 2 ml/L testløsning.

INKUBASJON: Temperatur: $20 \pm 1^\circ \text{C}$. Varighet: 28 dager.
pH: Start 7,6 Slutt: 8,5

Testperiode: 04.07 -01.08.1990

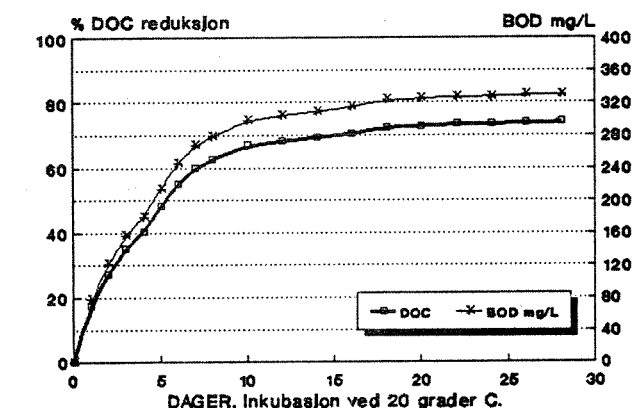
Testkonsentrasjon: 1:4 fortyning. (25% kons.) 39,5 mg/L DOC

TOC-verdiene på MF-filtrerte prøver ved start (dag₀) og etter 28 døgn bionedbrytning er ikke korrigert for DOC₀ og DOC₂₈ i blank-prøve (inoculum).

RESULTATER: BOD₂₈ = 330 mg/L DOC-reduksjon = 74 %

	Analyser, mg/L			% DOC-reduksjon
	BOD ₂₈	DOC ₀	DOC ₂₈	
Testprøve (1:4)	82,5	39,5	10,2	74 %

BOD-utvikling:



BOD, middelverdi av duplikater

Kommentarer:

Bioksidasjon viste en rask utvikling, som begynte å stagnere etter 10 døgn inkubasjon. Ca 90 % av BOD var omsatt innenfor dette tidsrom.

BOD₇ ble målt til 267 mg/L

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.

Norsk institutt for vannforskning

TESTRAPPORT**NEDBRYTBARHETSTEST: REDUKSJON I LØST ORGANISK KARBON OVER 35 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: BEROL Stenungsund. Avløpsvann, 30 % i sjøvann

TESTBETINGELSER

APPARATUR: 10 L beholder (glassflaske), med magnetrørverk.

TEST-MEDIUM: Sjøvann (fra 40 m dyp utenfor Solbergstrand forsøksstasjon) lagret i 6 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 NH₄Cl ble tilsatt.

INOKULUM: Mikroorganismer fra luftet kom. avløpsvann (NS 4749) og effluent fra Husmann enhet (OECD) lab. anlegg.
Kimtall = 4 x 10⁵ /ml. Tilsetning, 0,5 ml/L
Sjøvannets kimtall= 750/ml

INKUBASJON: Temperatur: 4-5 °C . Varighet: 35 dager.

Dato for test-start: 27.06. 1990

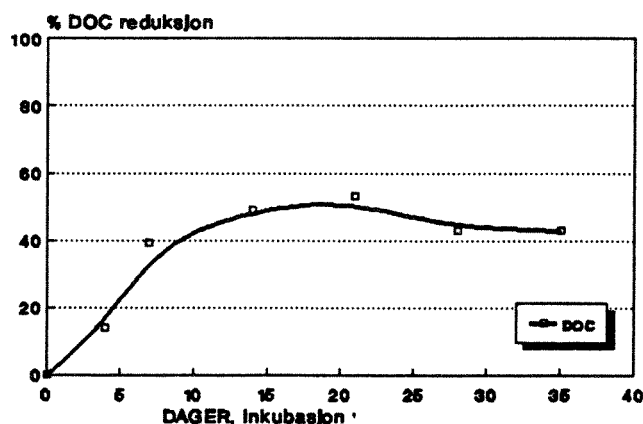
Løst organisk karbon DOC

BEROL-Sten.	Konsentrasjon etter x dager (mg/l C)						
	0	4	7	14	21	28	35
Avl.vann 30% i sjøvann+ salter	51.0	44.0	31.3	26.0	24.0	29.0	29,0

Evaluering av DOC-data

Døgn fra start	% DOC reduksjon etter x dager					
	4	7	14	21	28	35
DOC-reduksjon	14	39	49	53	43	43

Diagram:



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, BEROL 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

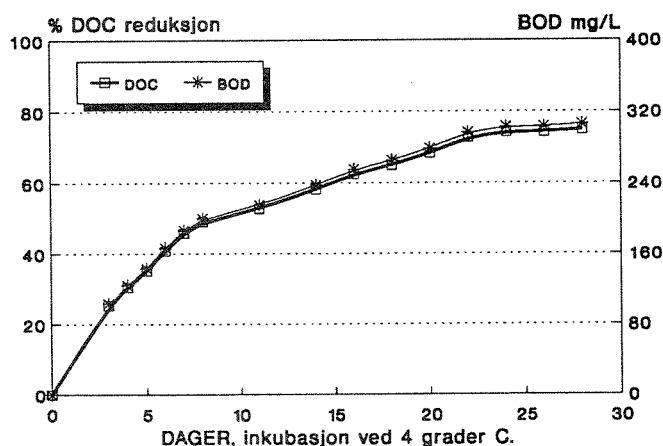
Testkonsentrasjon: 15 % avløpsvann i sjøvann 7,7 mg/L DOC

TOC-verdiene på MF-filtrerte prøver ved start (dag₀) og etter 28 døgn bio- nedbrytning er ikke korrigert for DOC₀ og DOC₂₈ i blank-prøve (inoculum).

RESULTATER: BOD₂₈ = 306 mg/L DOC-reduksjon = 16 %

	Analyser, mg/L			% DOC-reduksjon
	BOD ₂₈	DOC ₀	DOC ₂₈	
Testprøve (15 %)	46	25,5	6,5	75 %

BOD-utvikling:



BOD, middelverdi av duplikater

Kommentarer: Biooksidasjon viste en rask utvikling til etter 8 døgn, for så å avta noe. Etter 22-24 døgn stagnerte omsetningen. BOD₇ var 187 mg, som representerer 61 % av BOD₂₈.

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 utfördes 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.

Nonylfenoletoxylat

Nonylfenoletoxylat analyserades vid Berol Nobels laboratorium efter följande metod:



ANALYSMETOD

Nr 524

NF-2 i avloppsvatten (UD-prover) från EO-fabriken

Princip	NF-2 etoxilat analyseras kvantitativt genom HPLC på en "reversed-phase" kolonn. Föreningarna detekteras med hjälp av en Flourescence-detektor.
Apparatur	HPLC-system (pump, injektor-karusell, Flourescence-detektor, integrator)
Excitation - emission	230-302
Kolonn	RP18 5 um 125 x 4 mm (Lichrospher, Merck)
Elueringsmedel	Metanol: H ₂ O 80:20 (v/v)
Flöde	0.8 ml/min
Sats volym	20 ul <i>alt. 10ul</i>
Standard	Väg in 0.1 g NF-2 i en 100 ml måtkolv. Späd till märket med elueringsmedel (std A). Std B: tag 1 ml A späd till 50 ml med elueringsmedel = 20 ug/ml Std C: tag 1 ml B späd till 10 ml med elueringsmedel = 2 ug/ml Std D: tag 5 ml B späd till 10 ml med elueringsmedel = 10 ug/ml

Provberedning	Proverna filtreras genom filterpapper nr 5 (Munktell) för att få bort eventuella fasta partiklar. Ingen spädning av proverna före injicering. Anm. Alla toppar räknas som NF-2 (ej starttoppen, se bilagor). Std resp prov konc kan behöva ändras beroende på NF-2 halten i provet. Eventuell spädning göres med elueringsmedel.
Amnärkning	Fr o m 1990-04-01 används NF-2 som standard istället för Nonylfenol.

För övriga metoder hänvisas till redovisade standarder eller beskrivningar i respektive appendix