

NIVA



RAPPORT LNR 3808-98

Økotoxikologisk
karakterisering av
avløpsvann fra
Hunfos Fabrikker



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internet: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 1
4890 Grimstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5008 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 32 88 33

Akvaplan-NIVA A/S

9015 Tromsø
Telefon (47) 77 68 52 80
Telefax (47) 77 68 05 09

Tittel Økotoksikologisk karakterisering av avløpsvann fra Hunsfos fabrikker	Løpenr. (for bestilling) 3808-98	Dato 9/2 1998
	Prosjektnr. Undernr. 97169	Sider Pris 60
Forfatter(e) Harry Efraimsen Torsten Källqvist	Fagområde Økotoksikologi	Distribusjon
	Geografisk område Vest-Agder	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Hunsfos Fabrikker ASA. N-4700 Vennessla	Oppdragsreferanse Arnfinn Eidet
---	--

<p>Sammendrag</p> <p>To avløpsvannsstrømmer fra Hunsfos fabrikker i Vennessla er blitt karakterisert ved kjemiske analyser og økotoksikologiske tester, nedbrytbarhet, ekstraktive stoffer og bioakkumuleringspotensiale. Avløpsvannene inneholdt organisk materiale på henholdsvis 304 og 140 mg, målt som total organisk karbon (TOC). Nedbrytbarhetstesting viste at det oppløste organiske materialet (DOC) ble redusert med ca. 70-75 % i løpet av en 28 dogn. Toksisitetstestene med alger, krepsdyr og fisk viste at avløpsvannets akutte gifteffekter er beskjedne. Bioakkumulerbare komponenter ($P_{ow} > 3$) og ekstraktive stoffer (fettsyrer, steroler og harpikssyrer) ble effektivt nedbrutt under definerte betingelser.</p>
--

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Avløpsvann 2. Treforedling 3. Toksisitet 4. Nedbrytbarhet 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Waste water 2. Pulp and paper industry 3. Toxicity 4. Biodegation
--	--

Harry R. Efraimsen

Prosjektleder

ISBN 82-577-3384-9

Per J. Løkkehaug

Forskningsjef

**Økotoxikologisk karakterisering av avløpsvann
fra Hunsfos Fabrikker**

Forord

Hunfos Fabrikker har etter pålegg fra SFT henvendt seg til NIVA for å få utført økotoksikologisk karakterisering av 2 avløpsvannsstrømmer fra fabrikk. Et forslag til program for undersøkelsen ble utarbeidet av NIVA i februar 1997.

Prøvene ble tatt av bedriften i perioden 9.9. - 15.9. 1997, og mottatt NIVA den 16. 9. 1997. Karakteriseringen ble avsluttet i desember 1997.

Oslo, 9 februar 1998

Harry Efraimsen

Innhold

Sammendrag	5
Summary	6
1. PROGRAM FOR KARAKTERISERINGEN	7
1.1 AVLØPSVANN	7
1.2 PRØVETAKING	7
1.3 KJEMISK KARAKTERISERING	7
1.4 TOKSISITETSTESTER	8
1.4.1 Marine tester	8
1.4.2 Ferskvannstester	8
1.5 NEDBRYTBARHETSTESTER	9
1.6 BIOAKKUMULERBARHET	10
2. RESULTATER	10
2.1 DØGNPRØVER	10
2.2 UKEPRØVE	11
2.2.1 Biologisk/kjemisk karakterisering	11
2.2.2 Nedbrytbarhet	11
2.2.3 Ekstraktivstoffer	12
2.2.4 Toksisitet	13
2.2.5 Bioakkumulering	13
3. DISKUSJON	14
4. REFERANSER	16
VEDLEGG 1 Toksisitetstester med alger	17
VEDLEGG 2 Toksisitetstester med krepsdyr	30
VEDLEGG 3 Toksisitetstester med fisk	35
VEDLEGG 4 Nedbrytbarhetstester	42
VEDLEGG 5 Ekstraktivstoffer	55
VEDLEGG 6 Bioakkumulering	57

Sammendrag

Hunfos Fabrikker i Vennesla (15 km nord for Kristiansand) har samlet sine avløpsvann fra de forskjellige prosesser til to hovedutslipp, hvor hoveddelen (85%) går i en utslippsledning til Kristiansandsfjorden. Det andre utslippet går til elva Otra. Døgnprøver av de to avløpsvannene innsamlet over en arbeidsuke (uke 37) ble blandet til respektive blandprøver og preparert for fysisk/kjemisk og økotoksikologisk karakterisering. Karakteriseringen omfattet også hovedbestandelene av ekstraktive stoffer (steroler, fettsyrer og harpikssyrer).

Toksisiteten ble undersøkt med bruk av marine og ferskvannsorganismer (alger, krepsdyr og fisk). Biologisk nedbrytbarhet av organiske komponenter ble testet i henhold til OECD Guidelines 301 A og F. Innholdet av potensiell bioakkumulerbare komponenter (fordelingskoeffisient oktanol/vann, P_{ow}) ble kvantifisert ved separasjon av lipofile fraksjoner ved bruk av tynnskikt-kromatografi.

Resultatene viser at avløpsvann fra begge utslippene har et høyt innhold av oppløst organisk karbon. Nedbrytbarhetstestene viste at hoveddelen av det organiske materialet var lett nedbrytbart, med en fjerning av DOC over 28 døgn på henholdsvis 74 og 70 %. Nedbrytningen av ekstraktive stoffer var > 90 %. Utslipet til Kristiansandsfjorden inneholdt 2,55 mg/l organiske komponenter med potensiale for bioakkumulering ($\log P_{ow} > 3$). Disse komponentene ble imidlertid effektivt fjernet ved biologisk nedbrytning.

Utslipet av organisk materiale gjennom rørledningen til Kristiansandsfjorden, målt som kjemisk oksygenforbruk (COD) er beregnet til 30 tonn/døgn, og som biokjemisk oksygenforbruk (BOD_7) til 12,4 tonn/døgn. Det tilsvarende utslippet til Otra er beregnet til henholdsvis 2,52 tonn COD og 0,84 tonn BOD_7 /døgn.

Blant de brukte testorganismer var den marine copepoden *Acartia tonsa* den mest følsomme for avløpsvannet som går i ledning til fjorden. 48 timers LC_{50} ble målt til 7,8 %. Dette resultatet indikerer at akutt toksiske effekter kan forekomme i et begrenset område i fjorden etter primærfortynning av avløpsvannet.

Utslipet av avløpsvann til elva Otra er mindre giftig ovenfor ferskvannorganismer. Algen *Selenastrum capricornutum* var den mest sensitive med en EC_{50} på 40 % avløpsvann. Dette utslippet er ikke ventet å gi giftige virkninger i resipienten etter at det er fortynnet i ellevannet.

Summary

Hunfos pulp and paper factory in Kristiansand has two main effluent discharges to the river Otra and to the Kristiansandsfjord respectively. These effluents were sampled over a seven days period and a composite sample prepared for chemical and ecotoxicological characterisation. The characterisation included analysis of major constituents and extractive components (sterols, fatty acids and resin acids). Toxicity was investigated using marine and freshwater organisms (algae, crustacean and fish). The biodegradability of organic compounds was investigated according to OECD Guidelines 301 A and F. The content of potentially bioaccumulative components was quantified using separation of lipophilic fractions by thin layer chromatography.

The results show that both wastewaters had a high content of dissolved organic carbon. The biodegradation tests showed that the major portion of the organic content was readily biodegradable and the total removal of DOC during the 28 days biodegradation test was 74 and 70 % respectively. The degradation of extractive components was >90%. The wastewater discharged to the fjord contained 2,55 mg/l of organic compound with potential for bioaccumulation ($\log P_{ow} > 3$). These components were, however removed efficiently by biological degradation.

Among the tested organisms, the marine copepode *Acartia tonsa* was the most sensitive to the wastewater discharged to the fjord. The 48 h LC_{50} was 7.8 %. This observation indicates that acute toxic effects may occur in a restricted area after primary dilution of the wastewater in the fjord. The wastewater discharged to river Otra was less toxic to the freshwater species. The alga *Selenastrum capricornutum* was the most sensitive with a $EC_{50} = 40\%$. This discharge is not expected to cause any toxicity after full dilution in the river.

Title: Ecotoxicological characterisation of waste water from Hunfos pulp and paper factory

Year: 1998

Author: Harry Efraimssen and Torsten Källqvist

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3384-9

1. PROGRAM FOR KARAKTERISERINGEN

1.1 AVLØPSVANN

Avløpsvann fra de ulike enhetene ved Hunsfos Fabrikker samles til to hovedutslipp til hhv. Kristiansandsfjorden og til Otra. (Se fig. 1). Utslppsledningen til Kristiansandsfjorden munner på 55 m dyp i Austerhavn.

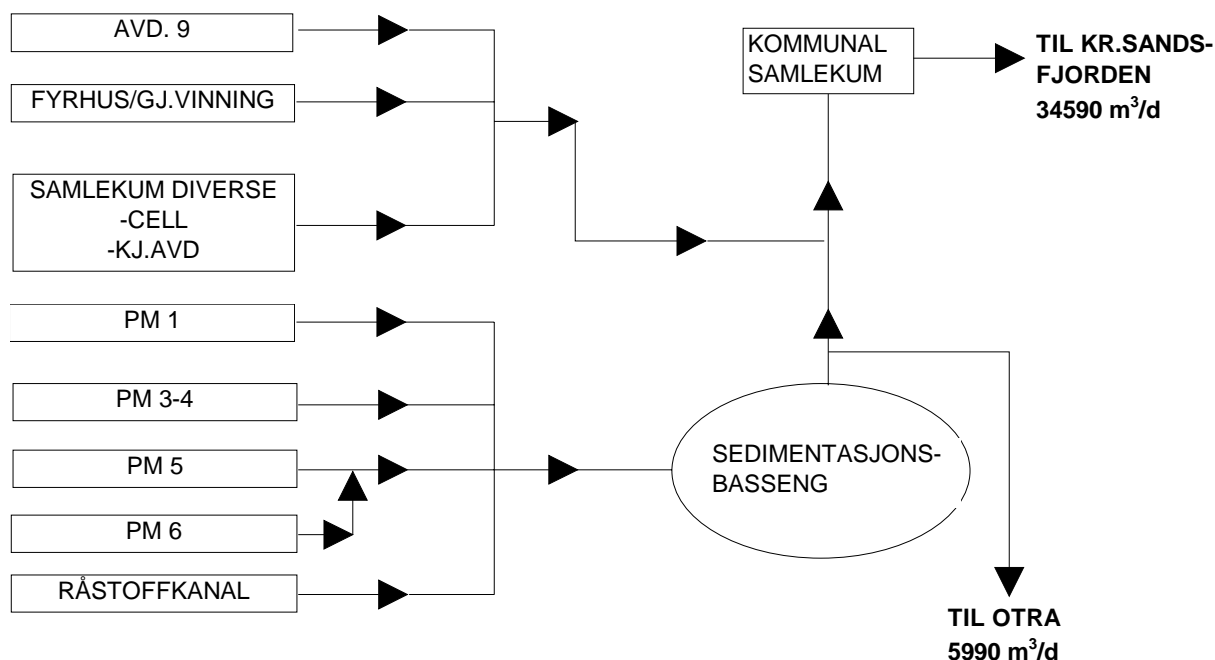


Fig. 1. Oversikt over avløpsvannstrømmer ved Hunsfos Fabrikker. Vannmengder angir gjennomsnitt i prøvetaksperioden (8-15 september 1997).

1.2 PRØVETAKING

Prøver fra de to utslppsledningene ble tatt som døgnprøver over én arbeidsuke med automatisk prøvetaker i et kvantum på 20 liter (plastkanner) og holdt ved kjøletemperatur under lagringen, mens den siste (15.9) ble tatt som stikkprøve. Selve prøvetakingen ble utført av bedriften. Døgnprøvene ble analysert med hensyn til pH og kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr}). Døgnprøvene ble blandet av NIVA til respektive blandprøver for økotoksikologisk karakterisering. Delprøver av de respektive blandprøvene som ikke kunne startes den påfølgende dag ble frosset i påvente av testing.

1.3 KJEMISK KARAKTERISERING

Den kjemiske karakteriseringen av avløpsvannet (ukeprøve) omfattet:

- pH-verdi
- konduktivitet
- kjemisk oksygenforbruk
- biokjemisk oksygenforbruk
- totalt organisk karbon (TOC)

- suspendert materiale
- total nitrogen
- total fosfor
- ekstraktivstoffer (harpikssyrer, fettsyrer, ligniner og steroler)

1.4 TOKSISITETSTESTER

Ved undersøkelse av avløpsvannenes toksisitet ble det benyttet marine testorganismer for utslippet til Kristiansandsfjorden (Prøvested 1) og ferskvannsorganismer for utslippet til Otra (Prøvested 2).

1.4.1 Marine tester

Toksisitetstesten med alger ble utført i henhold til ISO 10253 "Marine Alga growth inhibition test", med *Skeletonema costatum* som testorganisme. Avløpsvannet ble filtrert og tilsatt salter for å få tilsvarende saltholdighet i avløpsvannet som i sjøvann. En konsentrasjonsserie av avløpsvannet i sjøvann (60 m dyp i ytre Oslofjord) med tilsetning av næringssalter ble podet med aktivt voksende testalger fra en stamkultur, og inkubert med konstant belysning (ca. $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) og ved temperaturen $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Veksten i kulturene ble fulgt ved telling av algeceller etter 24, 48 og 72 timer. Fra vekstkurvene kan man se om veksten har vært hemmet i forhold til kontrollkulturene under noen del av eksponeringstiden. Algenes veksthastighet ble beregnet fra økningen i antall celler fra start til slutt (3 døgn). Veksthastighetene ved ulike konsentrasjoner av avløpsvannet blir tegnet opp i et konsentrasjon/responsdiagram. Fra dette kan EC_{50} -verdien bestemmes dersom man oppnår mer enn 50% veksthemming.

Giftighetstesten med krepsdyr (*Acartia tonsa*) ble gjort i henhold til et ISO forslag: "Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda Crustacea)" Forsøksdyr som var fra 17 til 25 døgn gamle ble eksponert i en fortyningsserie av avløpsvannet. Salter ble tilsatt avløpsvannet for å oppnå samme saltholdighet i alle prøver. Etter 24 og 48 timers eksponering ble dyrene observert og antallet dyr som var døde ble registrert. Resultatene av testen uttrykkes som LC_{50} -verdi, dvs. den konsentrasjon som dreper 50 % av krepsdyrene i løpet av testen.

Giftighetstesten med fisk (piggvar) ble utført etter en metode foreslått av PARCOM: "Acute test with juvenile turbot *Scophthalmus maximus*, A draft procedure". Denne bygger på OECD Guideline 203 "Fish acute toxicity test". Fisken var levert av Tinfos Aqua A/S og var ca. 13 uker gamle. Dødeligheten av fisken ble undersøkt over 4 døgn i ulike konsentrasjoner av avløpsvannet, fortynt i sjøvann fra 60 m dyp i ytre Oslofjord (Solbergstrand). Forsøket ble utført i akvarier med 25 L volum og med 7 fisker for hver konsentrasjon. Avløpsvannets saltholdighet ble ikke justert. Fiskene ble overført til ny testløsning hvert døgn (semistatisk metode). Testen ble utført ved ca. $14 \text{ }^\circ\text{C}$. Resultatene av fisketesten uttrykkes som LC_{50} -verdi.

1.4.2 Ferskvannstester

Toksisitetstesten med ferskvannsalger ble utført i henhold til OECD Guideline 201 og ISO/DIS 8692 "Algal growth inhibition test", med *Selenastrum capricornutum* som testorganisme. En konsentrasjonsserie av prøven i et algevekstmedium ble podet med aktivt voksende testalger fra en stamkultur og inkubert under standard betingelser på et gyngebord med kontinuerlig belysning (ca. $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) og ved temperaturen $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Veksten i kulturene ble fulgt ved telling av algeceller etter 24, 48 og 72 timer. Fra vekstkurvene kan man se om veksten har vært hemmet i forhold til kontrollkulturene under noen del av eksponeringstiden. Algenes veksthastighet ble beregnet fra økningen i antall celler fra start til slutt

(3 døgn). Veksthastighetene ved ulike konsentrasjoner av avløpsvannet ble tegnet opp i et konsentrasjon/responsdiagram. Fra dette ble EC_{50} -verdien bestemt ved probit-analyse.

Giftighetstesten med vannlopper (*Daphnia magna*) ble gjort i henhold til OECD Guideline 202 og ISO 6341 "Determination of the inhibition of the motility of *Daphnia magna*". Forsøksdyr som er mindre enn 24 timer gamle ble eksponert i en fortynningsserie av avløpsvannet. Det ble benyttet fire enheter med 5-7 dyr for hver konsentrasjon.

Testen ble utført ved 20 °C. Etter 24 og 48 timer ble antall dyr som var døde, eller som ikke var i stand til å bevege seg registrert. EC_{50} -verdien for immobilisering ble bestemt fra konsentrasjon/responskurven.

Giftighetstesten med fisk ble utført i overensstemmelse med OECD Guideline 201: "Fish acute toxicity test" og en norsk standard (NS 4717), med årsyngel av ørret (*Salmo trutta*) som testorganisme. Dødeligheten av fisken ble undersøkt over 4 døgn i ulike konsentrasjoner av prøven. Fiskene ble overført til ny testløsning hvert døgn (semistatisk metode). LC_{50} -verdien ble avlest fra konsentrasjon/responskurven.

1.5 NEDBRYTBARHETSTESTER

Ved nedbrytbarhetstester undersøkes den mikrobielle nedbrytningen av organiske forbindelser. Testene utføres i aerobt miljø, d.v.s. med oksygen tilstede, og gir indikasjoner på om avløpsvannet inneholder stabile organiske forbindelser som ikke brytes ned i miljøet.

Nedbrytbarhetstesten ble utført med en respirometrisk metode (OECD 301 F), hvor oksygenforbruket ved nedbrytning blir registrert over en 28 døgns periode ved temperaturen 20 °C. I tillegg ble konsentrasjonen av løst organisk karbon (DOC) målt ved begynnelsen og slutten av testen.

Avløpsprøvene ble fortynnet til 10% konsentrasjon for avløpsvann fra prøvested 1 og til 20% fra prøvested 2, for å få en konsentrasjon av organisk karbon som er egnet for metoden. Uorganiske næringssalter ble tilsatt og prøven inokulert med mikroorganismer fra et laboratorieaktivt slamlegg. Prøvene ble inkubert i lukkede, mørke flasker som var tilkoblet manometre. Karbondioksyd, produsert ved nedbrytningen ble absorbert i lut i en beholder inne i flasken. Utviklingen i oksygenforbruket ble lest av fortløpende på manometrene.

Ved nedbrytbarhetstester av enkeltkjemikalier er det vanlig å bruke DOC-reduksjon større enn 70% etter 28 døgn som kriterium for "lett nedbrytbart". For avløpsvann, som inneholder en blanding av stoffer er denne grenseverdi ikke uten videre anvendelig. Det kan også være behov for å undersøke hvilke stoffer (eller egenskaper) som er igjen etter nedbrytningen. Dette ble gjort ved å gjenta deler av karakteriseringen (kjemiske analyser, algetoksisitet og bioakkumulerbarhet) på vann som gjennomgått nedbrytbarhetstest.

For å få nok vann til karakteriseringen etter nedbrytning ble det parallelt med respirometer-testen satt opp en nedbrytbarhetstest (OECD 301 A: Die-Away test) med større volum. Avløpsprøvene til denne nedbrytbarhetstesten ble fortynnet til 25 % konsentrasjon for avløpsvann fra prøvested 1 og til 50 % konsentrasjon fra prøvested 2. For karakterisering av stoffer etter nedbrytning er det fordelaktig med en lav fortynning av testprøvene slik at analysenøyaktigheten blir så høy som mulig. Forbehandling, inokulering og inkubering ble foretatt på samme måte som for respirometer-testen. Nedbrytningen av organisk materiale ble fulgt ved DOC-analyser.

1.6 BIOAKKUMULERBARHET

Kjemikaliers tendens til å oppkonsentreres eller akkumuleres i levende organismer kan undersøkes med s.k. bioakkumulerbarhetstester, hvor f. eks. fisk eksponeres til lave konsentrasjoner over lang tid og konsentrasjonsøkningen av kjemikallet i fiskekjøttet undersøkes ved analyser. P.g.a. at bioakkumulerbarheten av organiske stoffer mest beror på stoffets fettløselighet (lipofilitet) har man imidlertid utviklet screening-metoder for undersøkelse av potensiell bioakkumulerbarhet, som er basert på måling av fasefordelingen mellom oktanol og vann, P_{OW} . Til dette brukes kromatografiske metoder (tynnsjikt-kromatografi eller HPLC).

Screeningmetodene for potensiell bioakkumulerbarhet kan også brukes for karakterisering av avløpsvann, ved at mengden organisk stoff i ulike P_{OW} -intervaller blir bestemt. Som potensielt bioakkumulerbart regnes stoffer med $P_{OW} > 1000$ ($\log P_{OW} > 3$).

2. RESULTATER

Testrapporter for tester av nedbrytbarhet, toksisitet og bioakkumuleringspotensiale finnes i vedlegg A. En sammenstilling av resultatene er gjort nedenfor.

2.1 DØGNPRØVER

Resultatene av analysene av døgnprøver er vist i tabell 1.

Tabell 1. Målt vannføring på prøvestedene og resultater av analyser av døgnprøver.

Dato	Prøvested 1			Prøvested 2		
	m ³ /time	pH	KOF (mg O/L)	m ³ /time	pH	KOF (mg O/L)
08.09.97	1404	6,86	521	216	6,21	367
19.09.97	1266	5,00	418	120	5,49	273
10.09.97	1482	4,94	1070	294	6,09	417
11.09.97	1512	4,90	1310	276	6,75	657
15.09.97	1542	3,93	1060	300	5,52	350
Middelverdi	1441		870	241		420

Analysene på de enkelte døgnprøver fra prøvested 1 tyder på at avløpsvannets kvalitet varierer betydelig med hensyn til innhold av organisk materiale. Døgnutslipp av avløpsvann med høye KOF-verdier (≈ 1000 mg/l) viste seg å ha høy surhetsgrad, mens døgnprøven tatt den 9.9.97 var tilnærmet nøytral. Dette indikerer at kvaliteten i organisk belastning virker sterkt inn på avløpsvannets surhetsgrad.

Avløpsvann fra prøvested 2 er vesentlig mindre surt og konsentrasjonen av organisk materiale var omtrent halvparten, sammenlignet med prøvested 1. Organiske stoff, målt som KOF, varierte mellom 270 til 660 og gir inntrykk av en stor variasjonen fra dag til dag også for dette avløpsvannet.

2.2 UKEPRØVE

2.2.1 Biologisk/kjemisk karakterisering

Resultatet av den kjemiske karakteriseringen av avløpsvannet er vist i tabell 2. Innholdet av salter og næringssalter er relativt lavt. Avløpsvannet fra prøvested 1 inneholdt omtrent halvparten av suspendert materiale, sammenlignet med prøvested 2, mens konsentrasjonen av organisk materiale, målt som COD og TOC var omtrent dobbelt så høyt.

Det forholdsvis høye forholdet mellom BOD og COD, tyder på at en betydelig del av de organiske komponentene er lett eller relativt lett nedbrytbare.

Tabell 2. Kjemiske analyser av blandprøver av de to avløpsvann

Analysevariabel	Enhet	Prøvested 1	Prøvested 2
pH			
Konduktivitet	mS/m	73	51
Suspendert tørrstoff	mg/L	56	118
BOD ₇	mg O/l	360	140
Kjemisk oksygenforbruk (COD)	mg O/l	870	420
Totalt organisk karbon (TOC)	mg/l	304	141
Løst organisk karbon (DOC)	mg/l	292	125
Totalt nitrogen (Tot. N)	mg/l	3,7	3,6
Totalt fosfor (Tot. P)	µg/l	200	150

2.2.2 Nedbrytbarhet

Resultatene fra hovedtesten for bestemmelse av nedbrytbarhet (OECD 301 F) er vist i tabell 3.

Tabell 3. Resultater av biokjemisk nedbrytning av organiske stoffer i avløpsvannene.

Parameter	BOD ₂₈ mg/l	COD _{Cr} mg/l	DOC ₀ mg/l	DOC ₂₈ mg/l	DOC- fjerning
Beregnet i prøve 1	533	867	292	77	74 %
Beregnet i prøve 2	240	430	125	37,5	70 %

Nedbrytbarhetstestene viste et raskt oksygenforbruk de første dagene for begge avløpsvannprøvene, men det etterfølgende oksygenforbruket økte langsomt gjennom resten av testperioden (28 døgn). (Se fig. 2). Den raske nedbrytningen illustreres med forholdet mellom BOD₇- og BOD₂₈-verdiene. For avløpsvannet fra prøvested 1 var 67 % av det registrerte oksygenforbruk omsatt etter 7 døgn, mens det tilsvarende tall for prøvested 2 var 58 %.

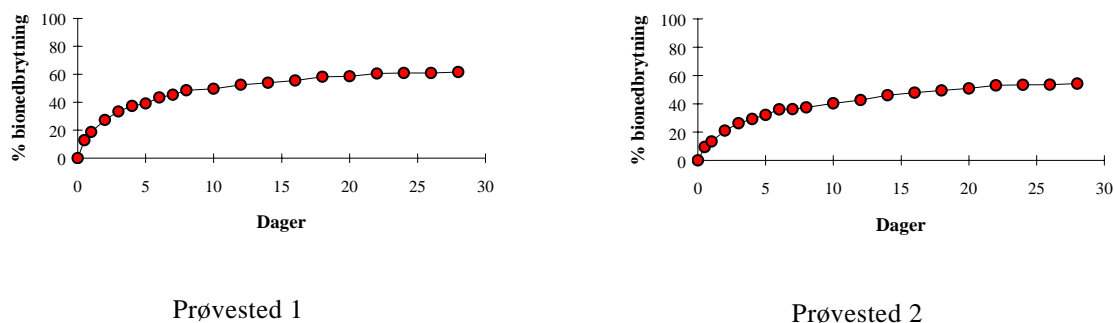


Fig. 2. Bionedbrytningskurver for organisk stoff i avløpsvann fra prøvested 1 og 2, basert på måling av biokjemisk oksygenforbruk (BOD/COD_{Cr})

BOD-verdiene i prosent av kjemisk oksygenforbruk (COD) og reduksjonen i avløpsvannenes innhold av oppløst organisk karbon (DOC) etter 28 døgn nedbrytning, viser graden av nedbrytning av organisk stoff. For avløpsvann fra prøvested 1 ble det oppnådd en nedbrytning på 62 % målt som BOD₂₈/COD forhold og en DOC-reduksjon på 74 %. De respektive verdier fra prøvested 2 var henholdsvis 56 og 70 %. Resultatene viser at vannet fra prøvested 1 inneholdt relativt sett noe mer lett nedbrytbare stoffer enn vann fra prøvested 2, uten at det bør vektlegges for sterkt.

OECD 301 A testen som ble benyttet for å få tilstrekkelig nedbrutt vann til analyse av ekstraktive stoffer, toksisitet og bioakkumulerbare stoffer etter 28 døgn bionedbrytning, viste en DOC-reduksjon som var tilnærmet identisk med det som ble oppnådd for hovedtesten for bestemmelse av nedbrytbarhet (OECD 301 F).

2.2.3 Ekstraktivstoffer

Tabell 4 Resultater av sum-parametrene for ekstraktive stoffer før og etter nedbrytning.

Avløpsvann		Prøvested 1				Prøvested 2			
analysevariabel	enhet	før nedbrytn.		etter nedbrytn.		før nedbrytn.		etter nedbrytn.	
		Totalt	Frie	Totalt	Frie	Totalt	Frie	Totalt	Frie
SUM fettsyrer	mg/l	3,68	2,09	0,32	0,29	0,44	0,26	0,16	0,04
SUM steroler	mg/l	2,01	0,75	0,04	0,01	0,27	0,1	0,04	0,01
SUM harpikssyrer	mg/l		5,73		0,43		1,48		0,07

Totalt = (frie + foresterede forbindelser)

En fullstendig oversikt over de enkelte forbindelser som inngår i benevnelsen ekstraktive stoffer, er vist i analyserapporten fra PFI i vedlegg. Total mengden fettsyrer i avløpsvann fra prøvested 1 ble nedbrutt med over 90 %, og den frie andelen ble redusert med 86 % over 28 døgn. Innholdet av steroler ble redusert med over 98 %. Summen av harpikssyrer viste også høy nedbrytningsgrad, og ble redusert med 92 % over 28 døgn.

Avløpsvann fra prøvested 2 inneholder betydelig lavere konsentrasjoner, både av fettsyrer, steroler og harpikssyrer. Ved korrigering for innhold av oksyderbart stoff er konsentrasjonene en firedel sammenlignet med prøvested 1. Innholdet av harpikssyrer var ca. 50 % basert på samme forutsetning. Det totale innholdet av fettsyrer ble redusert med 64 %, mens den frie fraksjonen ble redu-

sert med 85 % etter nedbrytning. Steroler ble redusert med 85 %, og innholdet av harpikssyrer ble redusert med 95 %.

Konsentrasjonene som er analysert etter 28 døgn nedbrytning var svært lav og er derfor beheftet med en betydelig usikkerhet. Resultatene viser at ekstraktive stoffer i avløpsvann fra de to prøvestedene nedbrytes relativt raskt under definerte testbetingelser.

2.2.4 Toksisitet

Resultatene av toksisitetstestene er sammenfattet i tabell 5.

Tabell 5. Resultater av toksisitetstester for de to avløpsvann.

Organismer	Responsparameter		Prøvested 1		Prøvested 2	
			Før nedbr.	Etter nedbr.	Før nedbr.	Etter nedbr.
Marine/Ferskvann						
<i>Skeletonema costatum</i>	veksthastighet	EC ₅₀	28 %	> 25 %		
<i>Sel.capricornutum</i>					40 %	> 50 %
<i>Acartia tonsa</i>	dødelighet	LC ₅₀	7,8 %	-		
<i>Daphnia magna</i>					> 100 %	-
Piggvar	dødelighet	LC ₅₀	42 %	-		
Ørret					> 32 %	-

Resultatene av toksisitetstestene viser at avløpsvann fra både prøvested 1 og 2 har lav akutt gifteeffekt på de testede organismene. Det ble ikke påvist veksthemming av algen *Skeletonema costatum* etter nedbrytning i det 1:4 fortynnede testløsningen av avløpsvann fra prøvested 1. Dette var heller ikke ventet da EC₅₀-verdien i ufortynnet avløpsvann var 28 %. De samlede resultatene av tilsammen tre tester med krepsdyret *Acartia tonsa* viser økende dødelighet ved konsentrasjoner over ca. 5 % og full dødelighet etter 48 timer ved 32% konsentrasjon. I disse testene var imidlertid dødeligheten i kontrollen høyere enn gyldighetskriteriet for metoden og dette kan ha ført til at LC₅₀-verdien (7,8 %) er litt for lav. Dødeligheten var betydelig lavere overfor piggvar med en LC₅₀-verdi på 42 %.

For avløpsvannet fra prøvested 2 som ble testet med ferskvannsorganismer, ble det påvist veksthemming av algen *Selenastrum capricornutum*, med en EC₅₀-verdi ved 40 % avløpsvann i testløsningen. Overfor krepsdyret *Daphnia magna* ble det ikke påvist dødelighet selv ved 100 % avløpsvann, mens toksisitetstesten med ørret ikke var praktisk å gjennomføre i høyere konsentrasjon enn 32 % avløpsvann, og hvor det ikke ble påvist dødelighet.

Toksisitetstestene av vann som hadde gjennomgått 28 døgn nedbrytbarhetstest viste en viss veksthemmende effekt på alger ved de høyeste konsentrasjonene. På grunn av fortynning av avløpsvannene ved nedbrytbarhetstesten kunne ikke EC₅₀-verdier på nedbrutt avløpsvann bestemmes, men det er klart at toksisiteten overfor alger ble redusert ved nedbrytning.

2.2.5 Bioakkumulering

Resultatene fra de tynnsjikt-kromatografiske testene av potensielt bioakkumulerbare stoffer (PBS) i avløpsvannet før og etter nedbrytning er vist i tabell 6. Verdiene er korrigert for den fortynnings-

faktor som ble benyttet ved nedbrytningstesting, henholdsvis faktor 4 for avløpsvann fra prøvested 1 og faktor 2 for prøvested 2. GC-analysen er semikvantitativ fordi responsen på den benyttede FID-detektor kan variere mellom ulike organiske forbindelser. De oppgitte konsentrasjoner er derfor approksimative.

Tabell 6. Konsentrasjonen av PBS i prøvene før og etter 28 døgn bionedbrytning.

Avløpsvann	Surt ekstrakt	Kons. før TLC fraksjonering mg/l	Kons.fraksjon 1 ved applikasjon sone TCL mg/l	Kons.fraksjon 2 Log P_{ow} >5,7 mg/l	Kons.fraksjon 3 3,2 <Log P_{ow} <5,7 mg/l
Prøvested 1	Før nedbrytning	10,1	0,004	0,79	1,76
	Etter nedbrytning	0,42	0,008	n.d.*	0,004
Prøvested 2	Før nedbrytning	2,31	0,028	0,23	0,153
	Etter nedbrytning	0,074	0,006	n.d.	0,004

For prøvested 1 er andelen PBS med $P_{ow} > 3,2$ (fraksjon 2+3) 2,55 mg/l. Dette er betydelig over den aksjonsgrense som Naturvårdsverket i Sverige praktiserer ved vurdering av utslippsbegrensninger (0,5 mg/l). Imidlertid blir PBS nedbrutt tilnærmet fullstendig etter 28 døgn under standardiserte testbetingelser til et nivå som er under Naturvårdsverkets aksjonsgrense for PBS i vann etter nedbrytning (0,1 mg/l). Dette indikerer at PBS i dette avløpsvannet vil ha et potensiale for nedbrytning i resipienten.

PBS i avløpsvannet fra prøvested 2 var vesentlig lavere, ca 0,4 mg/l for de to fraksjoner med P_{ow} over 3,2. Biologisk nedbrytning under standardiserte betingelser eliminerer PBS i avløpsvannet med over 97 %. Dette tyder på at komponentene av PBS er like i de to vannprøvene.

3. DISKUSJON

Bedriften har utslippskonsesjon av suspendert materiale (SS) som er basert på bruk av nylonfilter med porestørrelse 70 μ m. Basert på bedriftens tall er utslippet av SS gjennom rørledningen til Kristiansandsfjorden 652 kg/døgn i snitt under prøvetakingsperioden. Tilsvarende SS-verdi for utslippet til Otra var 171 kg/døgn. Bedriften bestemte også SS etter NS 4733 parallelt ved bruk av glassfiberfilter, som er den samme metoden som NIVA benyttet i denne undersøkelsen. NIVAs analyser viste et gjennomsnittlig utslipp av SS gjennom rørledningen til Kristiansandsfjorden på 1934 kg/døgn, og til Otra på 707 kg/døgn. Til sammenligning viste bedriftens målinger ca. 45 % høyere SS-verdi for utslippet direkte til Kristiansandsfjorden, mens utslippet til Otra var ca 14 % lavere enn NIVAs målinger.

Karakteriseringen viser at avløpsvann fra de to prøvestedene til Hunsfos fabrikk inneholder en betydelig del organiske restprodukter (DOC), som også gir vannet en brunlig farge. Disse stoffene er tyngre biologisk nedbrytbare, som resultatet av nedbrytbarhetstesten viser. Dette er forbindelser av ligninkarakter og som er kjent å for å nedbrytes langsomt i naturen. På bakgrunn av oppgitte vannmengder til Kristiansandsfjorden under 7 døgn perioden for prøvetaking er andelen tyngre nedbrytbart organisk materiale målt som DOC, beregnet til 2,66 tonn/døgn. Utslipp av organisk materiale, målt som kjemisk oksygenforbruk (COD) er beregnet til 30 tonn/døgn. Dette er i god overensstemmelse med de tall som bedriften har oppgitt for undersøkelsesperioden (gjennomsnitt

31 tonn/døgn). Andelen lett nedbrytbart organisk materiale, målt som BOD₇ er beregnet til 12,4 tonn/døgn. Utslippet av total nitrogen og total fosfor er beregnet til henholdsvis 128 kg/døgn og 6,9 kg/døgn. I en vurdering av effekten av utslipp til Kristiansandsfjorden (Molvær et al. 1989) ble det regnet med at KOF-utslippet ville bli 42 tonn/døgn.

Utslippet fra prøvested 2 som går til elva Otra er beregnet å gi en organisk belastning på 2,52 tonn COD/døgn, og til 0,84 tonn BOD₇/døgn. Mesteparten av det organiske materialet vil raskt bli transportert med vannstrømmen ut i Kristiansandsfjorden. Den lett omsettbare fraksjon, målt som BOD₇, vil gi bidrag til heterotrof begroing i elvevannet. Bidraget av total nitrogen er beregnet til 21.6 kg/døgn og fosfor til 0,9 kg/døgn. Med en minstevannføring på 50 m³/s som er registrert i lengre perioder både sommer og vinter (Ø. Kaste 1997) gir dette et bidrag på 5 µg N/l og 0,2 µg P/l.

Av de organismer som ble brukt i toksisitetstestene var *Acartia tonsa* mest følsom med LC₅₀ = 7,8 %. I forbindelse med en vurdering av effekter av et utslipp til Kristiansandsfjorden i 1989 ble det foretatt toksisitetstester med algen *Skeletonema costatum* på to avløpsvannsprøver fra Hunsfos (Molvær et al. 1989). Disse viste EC₅₀-verdier på ca. 1,5%. I prøven fra 1997 var EC₅₀-verdien for den samme algen 28% som tyder på at det er skjedd en vesentlig reduksjon av avløpsvannets toksisitet. Dersom den blandprøve som er karakterisert er representativ for dagens utslipp til Kristiansandsfjorden synes faren for økotoksikologiske effekter i Kristiansandsfjorden være betydelig mindre enn hva som ble antydnet i forhåndsvurderingen i 1989 (Molvær et al. 1989). En spredningsundersøkelse som ble foretatt i forbindelse med en undersøkelse av utslippets innvirkning på oksygenforholdene i Kristiansandsfjorden ble primærfortynningen i sentrum av avløpsvann-skyen beregnet til 26-63 ggr. (3,8 - 1.6 %). Disse konsentrasjonene er lavere enn hva som ga akutte toksiske effekter på *Acartia tonsa*.

Miljøstyrelsen i Danmark har foreslått retningslinjer for beregning av "null-effekt konsentrasjon" (PNEC = Predicted no effect concentration) på grunnlag av resultater fra toksisitetstester. (Pedersen et al. 1994). Når man har data fra tester med alger, krepsdyr og fisk er sikkerhetsfaktoren for PNEC_{akutt} satt til 10. PNEC_{akutt} beregnes ved å dividere den laveste E(L)C₅₀-verdien med sikkerhetsfaktoren. Sikkerhetsfaktoren tar bl.a. hensyn til forskjeller i følsomhet hos ulike organismer. For å beregne null-effekt konsentrasjonen for kroniske effekter må man i tillegg ta hensyn til at kroniske effekter vanligvis opptrer ved lavere konsentrasjoner enn akutte effekter. Miljøstyrelsen har foreslått usikkerhetsfaktoren 20 ved beregning av PNEC_{kronisk}.

For utslippet til Kristiansandsfjorden blir PNEC_{akutt} = 0,78 % og PNEC_{kronisk} = 0,39 %. Det betyr at avløpsvannet må fortynnes ca. 130 ganger for å unngå akutte toksiske effekter og ca. 260 ggr. for å unngå kronisk toksisitet i resipienten. Dette er mer enn den beregnede primærfortynningen, men området som kan tenkes å være påvirket med konsentrasjoner over PNEC er likevel forholdsvis begrenset.

Toksisitetstester med ferskvannsorganismer av utslippet til Otra tyder på at dette er mindre giftig enn det til Kristiansandsfjorden. For alger ble det registrert en begynnende veksthemming ved 18% konsentrasjon og EC₅₀ var 40%. Dette betyr at toksiske effekter på alger kan forekomme i utslippets nærrområde, men effektene kan antas å være meget begrenset. Etter fortynning i Otra ved minstevannføring (50 m³/s) er konsentrasjonen 0.13 %, d.v.s. ca. 300 ggr lavere enn EC₅₀-verdien for alger. PNEC_{akutt} for utslippet til Otra blir 4% og PNEC_{kronisk} = 2%. Dette betyr at utslippet ikke ventes gi toksiske effekter etter at det er fullt innblandet i resipienten.

Avløpsvannets totale potensiale for å gi skadevirkninger i resipienten er en funksjon av toksisitet og utslippsmengde. Som et uttrykk for dette brukes betegnelsen "Toxicity emission factor, TEF". For å beregne TEF konverteres først E(L)C₅₀-verdiene til en enhet hvor verdien er proporsjonal med toksisiteten. Denne enheten betegnes "Toxical units, TU" og beregnes:

$$TU = 100/E(L)C_{50} \quad \text{hvor } E(L)C_{50} \text{ er oppgitt som vol. \% av avløpsvann.}$$

TEF-verdien beregnes så i henhold til:

$$\text{TEF} = \text{TU} * \text{Q} \quad \text{hvor Q er utslippsmengde angitt som m}^3/\text{time}$$

TEF-verdien er egnet for vurdering av ulike utslipps betydning i en resipient eller for sammenligning av utslipp fra ulike fabrikker innen en industrikategori. TEF beregnet for den mest følsomme testorganismen for de to avløpsvannene er vist i tabell 7. Samlet TEF for utslippene fra Hunsfos er ca. 19000

Tabell 7. Beregnede TEF-verdier for de to avløpsvannene.

Avløpsvann	Organisme	TU	Q (m ³ /s)	TEF
Prøvested 1	<i>Acartia tonsa</i>	12,8	1441	18445
Prøvested 2	<i>Selenastrum capricornutum</i>	2,5	241	603

4. REFERANSER

Molvær, J, Traaen, T. Källqvist, S.T. 1989: Resipientvurdering av Otra og Kristiansandsfjorden for utslipp fra treforedlingsindustri. NIVA rapport nr. 2218, 42 pp.

Molvær, J. 1996: Avløpsvann fra treforedlingsindustri. Innvirkning på oksygenforhold i Kristiansandsfjorden. NIVA rapport nr. 3413-96, 15 pp

Kaste, Ø., Lindstrøm, E. A., Skiple, A., Aanes, K. J. Otra 1996. Tiltaksorientert overvåkning og konsekvensundersøkelse av industriutslipp. NIVA rapport nr. 3683-97, 39 pp

OECD 1992: Report of the OECD workshop on the extrapolation of laboratory aquatic toxicity data to the real environment. OECD Environment Monographs no. 59, OECD, Paris.

Pedersen, F., Kristensen, P, Damborg, A. and Christensen, H.W. 1994: Ecotoxicological evaluation of industrial wastewater. Danish Environmental Protection Agency Miljøprosjekt nr. 254.

VEDLEGG 1

Toksisitetstester med alger



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Toksisitet marine alger

Skeletonema costatum

1/3



Teststoff: Avløpsvann 1, Hunsfos
Oppdragsgiver: Hunsfos Fabrikker
Adresse: 4700 Vennesla

Lab. kode: B291/1
Mottatt: 16.09.97

Testbetingelser

Organisme: *Skeletonema costatum* NIVA BAC1
Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur: Semi-kontinuerlig i nat. sjøvann +10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato: 20.09.97
Konsentrasjoner: 10, 18, 32, 56 og 100%
Test medium: ISO 10253 med Fe redusert til 33 µg/l, Zn: 15 µg/l, Na₂EDTA: 200 µg/l. Sjøvann fra Ytre Oslofjord 40 m, salinitet 29.8 g/l.
Forbrhandling av prøve Sentrifugert og filtrert gjennom glassfiberfilter (GF/F). Tilsatt sjøsalter til salinitet 32 g/l i henhold til NS 4717
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys: Ca. 75 mE m² s⁻¹, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur: 19.5 - 19.9 °C
pH i kontroll Start : 8.2 Slutt: 8.5
pH i høyeste konsentrasjon Start : 7.4 Slutt: 8.2
Vekstmåling: Coulter Multisizer og Millipore Cytofluor
Beregning av EC₅₀ * Probit-transformering og lineær regresjon av probit-verdier mot log konsentrasjon
Beregning av NOEC * t-test (p<0.01)

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

Parameter	Enhet	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	%	28	26 - 32	16	14 - 18	<10

Oslo 30.09.97

Testet av: Torsten Källqvist

Testansvarlig:

Torsten Källqvist

* EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

* NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten endringer
Resultatene gjelder bare for den testede prøven

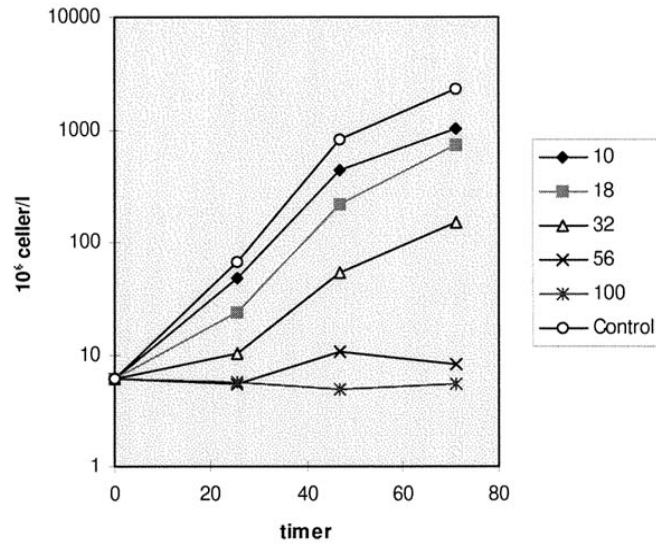


Fig. 1. Vekstkurver for *Skeletonema costatum* i ulike konsentrasjoner av Hunsfos avløpsvann 1

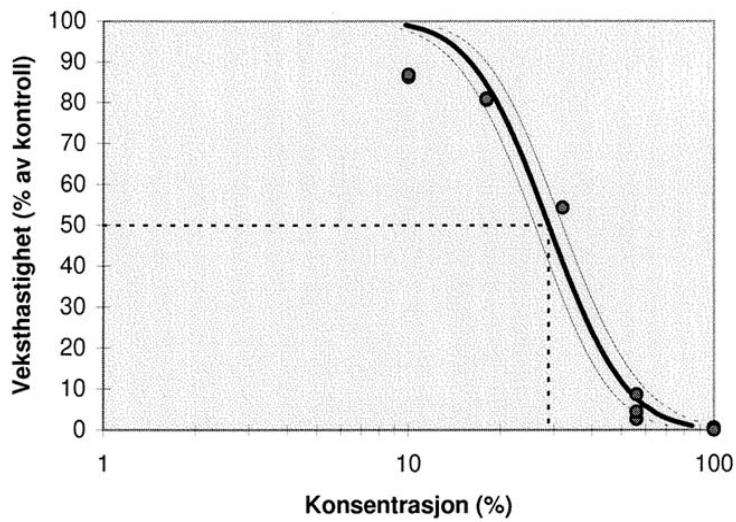


Fig. 2. Effekt av Hunsfos avløpsvann 1 på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.

Referanser:

ISO/DIS 10253 : Water quality - Marine algal growth inhibition test

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

NIVA

3/3

TEST: ISO 10253

Dato: 20.09.97

TESTSTOFF: Avløpsvann 1, Hunsfos

Lab. kode: B291/1

TESTALGE: *Skeletonema costatum*

Medium: ISO

INOKULUM: 6 mill. celler/l

	Timer:	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast.%
Kons.	%	mill/l	mill/l	mill./l				
10 "		51.0	457	1013	23402	50	1.73	86
10 "		48.0	417	1028	22601	48	1.74	86
10 "		47.0	415	1050	22796	48	1.75	87
18 "		24.0	222	742	14169	30	1.63	81
18 "		24.0	215	725	13806	29	1.62	81
18 "		23.0	219	734	13981	30	1.62	81
32 "		11.0	55	152	2984	6	1.09	54
32 "		10.0	49	151	2812	6	1.09	54
32 "		10.0	55	151	2949	6	1.09	54
56 "		6.3	11	10	169	0	0.17	9
56 "		4.7	11	7.0	95	0	0.05	3
56 "		5.1	9.2	7.8	73	0	0.09	4
100 "		6.3	5.3	6.2	-6	0	0.01	1
100 "		5.4	4.9	5.4	-46	0	-0.04	-2
100 "		5.1	4.4	5.0	-70	0	-0.06	-3
"								
"								
"								
"								
"								
Kontroll		61.0	704	2154	42948	91	1.99	99
		64.0	841	2429	49435	105	2.03	101
		67.0	787	2280	46489	99	2.01	100
		67.0	825	2280	47354	100	2.01	100
		68.0	856	2589	51791	110	2.05	102
		69.0	800	2104	44720	95	1.98	99

MIDDELVERDIER

		%						
10.00 Mv:		48.67	429.67	1030.33	22933	48.67	1.74	86.50
St. d.		1.70	19.34	15.20	341	0.72	0.00	0.25
18.00 Mv:		23.67	218.67	733.67	13985	29.68	1.62	80.79
St. d.		0.47	2.87	6.94	148	0.31	0.00	0.16
32.00 Mv:		10.33	53.00	151.33	2915	6.19	1.09	54.26
St. d.		0.47	2.83	0.47	74	0.16	0.00	0.05
56.00 Mv:		5.37	10.40	8.27	112	0.24	0.10	5.20
St. d.		0.68	0.85	1.27	41	0.09	0.05	2.51
100.00 Mv:		5.60	4.87	5.53	-41	-0.09	-0.03	-1.43
St. d.		0.51	0.37	0.50	26	0.06	0.03	1.50
Mv.		0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
St. d.		0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Mv.		0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
St. d.		0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Control Mv:		66.00	802.17	2306.00	47123	100.00	2.01	100.00
St. d.		2.71	49.66	163.54	2910	6.17	0.02	1.18
Variasjonskoeffisient i kontroller (%):					6.17	1.18		



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Toksisitet marine alger

Skeletonema costatum



1/3

Teststoff: Avløpsvann prøvested 1, etter nedbrytning **Lab. kode:** B291/1
Oppdragsgiver: Hunsfos fabrikker **Mottatt:** 16/09/97
Adresse: 4700 Vennesla

Testbetingelser

Organisme: *Skeletonema costatum* NIVA BAC1
 Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
 Stamkultur: Semi-kontinuerlig i nat. sjøvann +10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
 Start dato: 31.10.97
 Konsentrasjoner: 32%, 56%, 100% av prøven fra nedbrytbarhetstest. Det tilsvarende 8%, 14% og 25% av den opprinnelige avløpsvannsprøven
 Test medium: Sjøvann fra 40 m i Oslofjorden 23.10.97. Salinitet 31.96 g/l, tilsatt ISO 10253-medium med Fe redusert til 33 mg/l, Zn: 15 mg/l, Na₂EDTA: 200 mg/l
 Forbehandling av prøve: Filtrert 0.45 µm, tilsatt sjøvannssalt til 32 g/l. pH justert til 7.7
 Inkuberingsutstyr: Gyngebord
 Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
 Lys: Ca. 75 mE m² s⁻¹, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
 Temperatur: 19.4 - 19.7°C
 pH i kontroll: Start : 8.0 Slutt: 8.6
 pH i høyeste konsentrasjon: Start : 7.7 Slutt: 7.8
 Vekstmåling: Coulter Multisizer
 Beregning av EC₅₀ *: Probit-transformering og lineær regresjon av probit-verdier mot log konsentrasjon
 Beregning av NOEC *: t-test (p<0.01)

Resultater Celletetthet på hvert målepunkt, det beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middelerverdier for kontroller og ved ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1.

Parameter	Enhet	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	%	>25	-	<8		<8

Oslo dato: 14.11.97

Testet av: Torsten Källqvist

Testansvarlig:

Torsten Källqvist

* EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

* NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten endringer
 Resultatene gjelder bare for den testede prøven

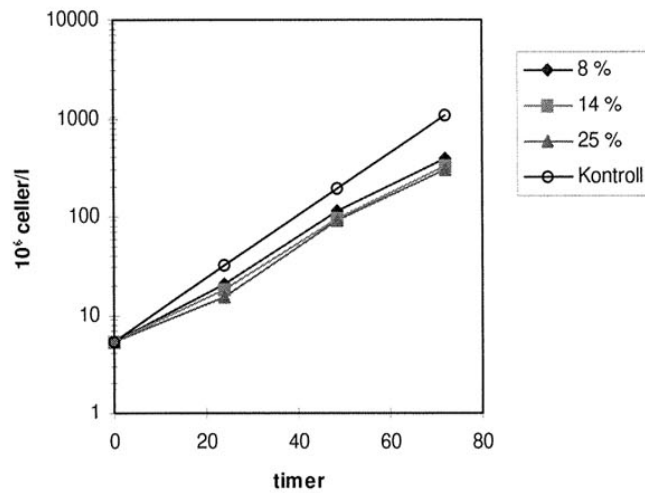


Fig. 1. Vekstkurver for *Skeletonema costatum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann prøvested 1, etter nedbrytning.

Referanser:

ISO/DIS 10253 : Water quality - Marine algal growth inhibition test

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

NIVA

3/3

TEST: ISO 10253

Dato: 31.10.97

TESTSTOFF: Avløpsvann etter nedbrytning

Lab. kode: B291/1

TESTALGE: *Skeletonema costatum*

Medium: ISO 10253

INOKULUM: 5.4 mill. celler/l

Kons.	Timer: %	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast. %
		24 mill/l	48.5 mill/l	72 mill./l				
8	"	18.0	120	413	7845	44	1.45	82
8	"	22.0	117	385	7541	42	1.42	80
8	"	21.0	109	385	7325	41	1.42	80
14	"	20.0	96	335	6401	36	1.38	78
14	"	19.0	90	351	6421	36	1.39	79
14	"	16.0	99	305	6024	34	1.34	76
25	"	17.0	93	317	6045	34	1.36	77
25	"	14.0	88	273	5335	30	1.31	74
25	"	15.0	90	291	5619	31	1.33	75
Kontroll		29.0	191	1051	17313	97	1.76	99
		34.0	203	1094	18227	102	1.77	100
		27.0	175	1009	16387	92	1.74	99
		31.0	179	1204	18871	106	1.80	102
		35.0	197	975	16709	94	1.73	98
		40.0	204	1195	19583	110	1.80	102

MIDDELVERDIER

		%						
8.00	Mv:	20.33	115.33	394.33	7571	42.42	1.43	80.91
	St. d.	1.70	4.64	13.20	213	1.20	0.01	0.62
14.00	Mv:	18.33	95.00	330.33	6282	35.20	1.37	77.55
	St. d.	1.70	3.74	19.07	183	1.02	0.02	1.10
25.00	Mv:	15.33	90.33	293.67	5666	31.75	1.33	75.33
	St. d.	1.25	2.05	18.06	292	1.63	0.02	1.15
Control	Mv:	32.67	191.50	1088.00	17848	100.00	1.77	100.00
	St. d.	4.27	11.16	86.91	1149	6.44	0.03	1.50
	Variasjonskoeffisient i kontroller (%):				6.44	1.50		



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 69 Korsvoll
0808 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Alger, veksthemmingstest
Selenastrum capricornutum
NIVA metode K4



Teststoff: Hunsfos, Prøvested 2
Kunde: Hunsfos Fabrikker
Adresse: 4700 Vennesla

Lab. kode: B 291/2
Prøve mottatt: 16.09.97

Testmetode: ISO 8692, OECD 201: Alga growth inhibition test
Organisme: *Selenastrum capricornutum* NIVA CHL1
Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur: Semi-kontinuerlig i 10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato: 20.09.97
Forbehandling av prøve: Lagret ved < 5 °C. Prøven sentrifugert og filtrert gjennom glassfiberfilter (GF/F) og tilsatt vekstmedium konsentrat ISO 8692
Konsentrasjoner: 10, 18, 32, 56 og 90 %
Test medium: ISO DIS 8692
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys: ca. 75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur: 19.5 - 19.9 °C
pH i kontroll: Start : 7.8 Slutt: 8.0
pH i høyeste konsentrasjon: Start : 7.7 Slutt: 8.1
Vekstmåling: Partikkel telling med Coulter Multisizer og fluorescensmåling med Millipore Cytofluor 2300
Beregning av EC₅₀ * Probit transformering og lineær regresjon av probit verdier mot log. konsentrasjon
Beregning av NOEC ** t-test (p<0.01)

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

Parameter	Enhet	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	%	40	36 - 43	21	19 - 23	10

Oslo 30.09.97

Testen utført av: Torsten Källqvist

Testansvarlig:


Torsten Källqvist

* EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

** NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet

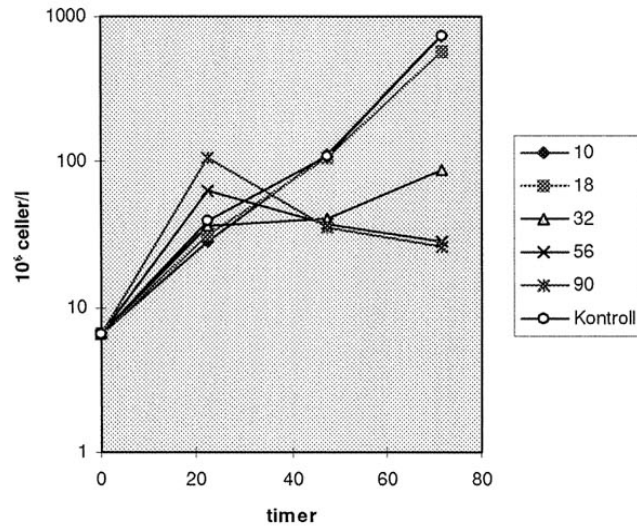


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av Hunsfos prøvested 2. Celletettheten ved konsentrasjonene 32, 46 og 90% etter 24 timer er trolig for høye som følge av partikkelinterferens ved telling.

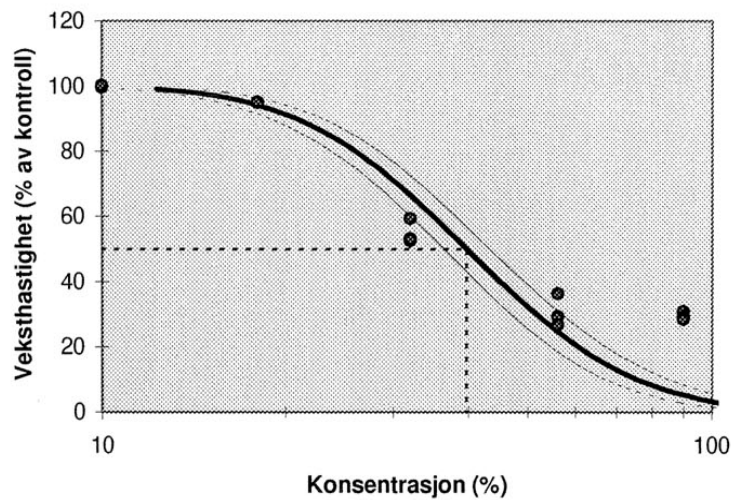


Fig. 2. Effekt av Hunsfos prøvested 2 på veksthastigheten til *Selenastrum capricornutum*. 90% konsentrasjon er ikke inkludert i kurvetilpassingen for beregning av EC_{50} -verdi.

Referanser:

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

OECD 1984: Guidelines for testing of chemicals, no. 201; Alga, growth inhibition test. OECD, Paris

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

NIVA

3/3

TEST: ISO 8692

Dato: 20.09.97

TESTSTOFF: Hunsfos Avløpsvann 2

Lab. kode: B291/2

TESTALGE: *Selenastrum capricornutum*

Medium: ISO

INOKULUM: 6.5 mill. celler/l

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast.%
Timer:	22.5	47.5	71.5				
Kons.	mill/l	mill/l	mill/l				
10 %	30.0	108	732	11751	98	1.59	100
10 "	26.0	114	719	11647	97	1.58	100
10 "	28.0	116	743	12031	100	1.59	100
18 "	33.0	129	579	10501	87	1.51	95
18 "	31.0	100	581	9767	81	1.51	95
18 "	30.0	95	577	9572	80	1.51	95
32 "	38.0	46	107	2922	24	0.94	59
32 "	35.0	36	78	2258	19	0.83	53
32 "	36.0	38	80	2354	20	0.84	53
56 "	63.0	38	26	2348	20	0.47	29
56 "	62.0	40	36	2493	21	0.57	36
56 "	62.0	35	23	2214	18	0.42	27
90 "	114	39	28	3607	30	0.49	31
90 "	103	33	26	3175	26	0.47	29
90 "	105	33	25	3211	27	0.45	28
"							
"							
"							
"							
"							
Kontroll	40.0	108	725	11904	99	1.58	100
	38.0	110	728	11942	99	1.58	100
	36.0	106	752	12084	100	1.59	100
	40.0	112	727	12026	100	1.58	100
	41.0	108	724	11916	99	1.58	100
	41.0	106	761	12311	102	1.60	101

MIDDELVERDIER

0

10.00 Mv.	28.00	112.67	731.33	11810	98.16	1.59	99.86
St. d.	1.63	3.40	9.81	162	1.35	0.00	0.28
18.00 Mv.	31.33	108.00	579.00	9947	82.68	1.51	94.93
St. d.	1.25	14.99	1.63	400	3.32	0.00	0.06
32.00 Mv.	36.33	40.00	88.33	2511	20.87	0.87	54.95
St. d.	1.25	4.32	13.22	293	2.44	0.05	3.03
56.00 Mv.	62.33	37.67	28.33	2352	19.55	0.49	30.74
St. d.	0.47	2.05	5.56	114	0.95	0.06	4.00
90.00 Mv.	107.33	35.00	26.33	3331	27.69	0.47	29.56
St. d.	4.78	2.83	1.25	196	1.63	0.02	0.99
Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Kontroll Mv.	39.33	108.33	736.17	12031	100.00	1.59	100.00
St. d.	1.80	2.13	14.67	141	1.17	0.01	0.42
Variasjonskoeffisient i kontroller (%):				1.17		0.42	



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 69 Korsvoll
0808 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Alger, veksthemmingstest
Selenastrum capricornutum
NIVA metode K4



Teststoff: Hunsfos, Prøvetsted 2, etter nedbrytning **Lab. kode:** B 291/2
Kunde: Hunsfos Fabrikker **Prøve mottatt** 16.09.97
Adresse: 4700 Vennesla

Testmetode: ISO 8692, OECD 201: Alga growth inhibition test
Organisme: *Selenastrum capricornutum* NIVA CHL1
Testparameter: Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur: Semi-kontinuerlig i 10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Start dato: 227.10.97
Forbehandling av prøve: Lagret ved < 5 °C. Prøven filtrert gjennom glassfiberfilter (GF/F) og tilsatt vekstmedium konsentrert ISO 8692
Konsentrasjoner: 100 % av prøve etter nedbrytning, tilsvarer 50% av opprinnelig prøve
Test medium: ISO DIS 8692
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml stålkolber med 50 ml medium
Lys: ca. 75 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur: 19.5 - 19.9 °C
pH i kontroll Start : 7.8 Slutt: 7.7
pH i høyeste konsentrasjon Start : 7.6 Slutt: 7.7
Vekstmåling: Partikkeltelling med Coulter Multisizer
Beregning av EC₅₀ * Probit transformering og lineær regresjon av probit verdier mot log. konsentrasjon
Beregning av NOEC ** t-test (p<0.01)

Resultater: Celletetthet på hvert målepunkt, det beregnede areal under vekstkurve og veksthastighet i hver kolbe er vist på vedlagt skjema. Middelerverdier for kontroller og ulike konsentrasjoner av teststoff er listet lengst ned på skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av teststoffet er vist i figur 1.

Parameter	Enhet	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	95% konf. int.	NOEC
Veksthastighet	%	>50	-	<50	-	<50

Oslo 30.09.97

Testen utført av: Torsten Källqvist

Testansvarlig:


Torsten Källqvist

* EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av testparameteren i forhold til kontrollkulturer

** NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet

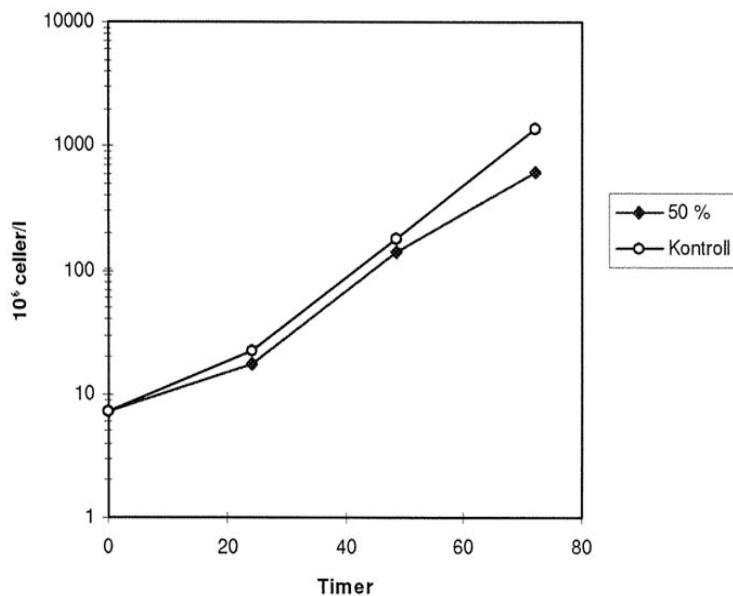


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i kontrollkultur og med 50% konsentrasjon av avløpsvann prøvested 2 etter nedbrytning.

Referenser:

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

OECD 1984: Guidelines for testing of chemicals, no. 201; Alga, growth inhibition test. OECD, Paris

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

NIVA

3/3

TEST: ISO 8692

Dato: 27.10.98

TESTSTOFF: Hunsfos prøvested 2, etter nedbrytning

Lab. kode: B291/2

TESTALGE: *Selenastrum capricornutum*

Medium: ISO

INOKULUM: 7.2 mill. celler/l

Kons.	Timer: %	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast.%
		24 mill/l	48.5 mill/l	72 mill./l				
100	"	18.0	136	606	10389	50	1.48	84
100	"	17.0	136	600	10294	50	1.47	84
100	"	18.0	149	631	10995	53	1.49	85
	"							
0	"							
0	"							
	"							
0	"							
0	"							
	"							
0	"							
0	"							
	"							
0	"							
0	"							
	"							
0	"							
0	"							
	"							
Kontroll		23.0	194	1443	21737	105	1.77	101
		23.0	187	1418	21275	102	1.76	100
		24.0	188	1398	21089	101	1.76	100
		22.0	177	1397	20764	100	1.76	100
		23.0	173	1350	20140	97	1.74	99
		21.0	167	1331	19725	95	1.74	99

MIDDELVERDIER

		%						
100.00	Mv:	17.67	140.33	612.33	10559	50.79	1.48	84.43
	St. d.	0.47	6.13	13.42	310	1.49	0.01	0.41
	Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	Mv.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
	St. d.	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00
Control	Mv.	22.67	181.00	1389.50	20788	100.00	1.75	100.00
	St. d.	0.94	9.40	38.27	681	3.27	0.01	0.53
	Variasjonskoeffisient i kontroller (%):				3.27		0.53	

VEDLEGG 2

Toksisitetstester med krepsdyr



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

1/2

Akutt toksisitet

Acartia tonsa

NIVA metode K13

Teststoff: Hunsfos, Prøvested 1
Kunde: Hunsfos Fabrikker
Adresse: 4700 Vennessla

Lab. kode: B291/1
Prøve mottatt: 16.9.97

Test metode ISO/DIS 14669 Water-Quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)

Test organisme *Acartia tonsa*, Opprinnelse: Havforskningslaboratoriet, Helsingør. Stamkultur i naturlig sjøvann, med *Rhodomonas baltica* som før

Utviklingsstadium Copepode, alder 17-2522 døgn

Testperiode 17.9.97, 23.9.97, 30.9.97 (3 tester)

Forbehandling Avløpsvannet ble tilsatt salter til 32 ‰ iflg. NS 4717

Fortynningsvann Sjøvann fra 60 m dyp i Oslofjorden ved Solbergstrand. Saliniteten justert til 32 ‰

Testkonsentrasjoner 3,2 - 56 ‰

Antall enheter 4 kar for hver konsentrasjon med 5 - 8 dyr pr. kar.

Testbeholdere 40 ml plastbegere

Temperatur 19,1 - 20,4 °C

pH i kontroll Start: 8,1 End: 8,1

pH ved høyeste kons. Start: 7,9 End: 7,8

Oksygenmetning 48 t Kontroll: 95 % Høyeste konsentrasjon: 83 %

Beregning av LC₅₀* Probit analyse (SNV Probit)

Resultater

Tid	Enhet	LC ₅₀	95% Konf. int.	LC ₁₀	0% Effekt	100% Effekt
48 t	%	7,8	6,6 - 10	-	-	56

Kommentar: Dødeligheten i kontrollene oversteg metodens gyldighetskriterium (10%)

Oslo 8. januar 1998

Utført av: Åse Bakketun

Testansvarlig:

* LC₅₀ = Konsentrasjon som gir 50% dødelighet av testorganismer.

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet

Norsk institutt for vannforskning

Tabell 1. Observert dødelighet av *Acartia tonsa* etter 24 og 48 timer

Test dato	Konsentrasjon	Antall dyr	Antall døde	Antall døde
17.9.97	0	102	11	29
	10	26	9	19
	18	23	13	21
	32	23	16	23
	56	20	16	20
	100	22	22	22
23.9.97	0	101	3	18
	3,2	29	0	11
	5,6	21	6	16
	10	27	3	18
	18	25	10	23
	32	26	15	26
30.9.97	0	92	9	17
	3,2	27	0	7
	5,6	25	4	6
	10	24	3	11
	18	26	7	20
	32	25	13	24

* Antall døde på konsentrasjoner fra 18 % og høyere var vanskelig å fastslå etter 24 timer, da dyra ikke skal forstyrres før ved siste telling etter 48 timer.

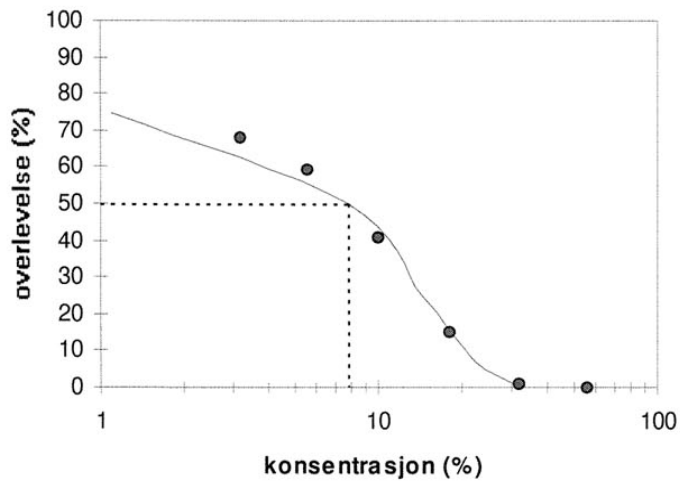


Fig. 1. Responnsdiagram for effekt av avløpsvann fra Hunsfos på overlevelse av *Acartia tonsa* etter 48 timer.



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Akutt toksisitet
Daphnia magna
NIVA metode K9



1/2

Teststoff: Prøvested 2 Blandprøve 9-15.09.97 **Lab. kode:** B291/2
Kunde: Hunsfos Fabrikker **Prøve mottatt:** 16.09.97
Adresse: 4700 Vennessla

Testmetode ISO 6341, "Water Quality - Determination of the inhibition of the motility of *Daphnia magna*" Metoden er i samsvar med OECD Guideline 202; "Daphnia sp. acute immobilization test"

Testorganisme *Daphnia magna*, stamme A. Vedlikeholdt i Elendt M7 og foret med *Selenastrum capricornutum* som er dyrket i 10% Z8 næringssaltløsning. Alder ved teststart < 24 timer.

Testperiode 17.09 - 19.09.97

Forbehandling av prøve Luftet i ca. 30 min. tilsatt salter som i ISO mediet

Fortynningsmedium ISO

Testkonsentrasjoner 32, 56, 100%

Antall enheter 4 kar for hver konsentrasjon, med 5-7 dyr pr. kar.

Testbeholdere 50 mL polystyren begere med ca. 40 mL medium

Temperatur 19.1 - 19.2°C

pH i kontroll Start: 7.8 Slutt: 7.8

pH i høyeste kons. Start: 7.7 Slutt: 7.7

Oksygenmetning, 48 t Kontroll: 8.66 ppm 100 % kons.: 7.65 ppm

Beregning av EC₅₀

Referansestoff: Kaliumdikromat: 24t EC₅₀= 1.14 mg/l

Resultater:

Parameter	Enhet	24 timer			48 timer		
		EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀
Immobilisering	%	> 100	-	> 100	> 100	-	> 100

Kommentarer:

Ved alle konsentrasjonene virket dyrene stresset og hadde nedsatt bevegelighet i forhold til kontrollen.

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet.



Norsk institutt for vannforskning

Konsentrasjon	Antall dyr	Immobiliserte 24 tim.	Immobiliserte 48 tim.
32 %	22	0	0
56 %	21	0	0
100 %	20	0	0
kontroll	20	0	0

Observerte immobiliserte *Daphnia magna* etter 24 og 48 timer i kontroller og ulike konsentrasjoner av B291/2.

Utført av: Randi Romstad

Testansvarlig:



Torsten Källqvist

Dato: 10.10.97

Baird, D. J. et al, 1991, *A Comparative Study of Genotype Sensitivity to Acute Toxic Stress Using Clones of Daphnia magna Strauss*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257 - 265.

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

Elenit, B.-P. 1990, *Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Strauss*. *Protoplasma*, 154, 25-33.

VEDLEGG 3

Toksisitetstester med fisk



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

1/3

TEST RAPPORT

Akutt toksisitet - juvenil Piggvar (Semistatisk eksponering) *Scophthalmus maximus*

Teststoff:	Prøvested 1, Hunsfos	Lab. kode:	B291/1
Kunde:	Hunsfos Fabrikker 4700 Vennesla	motatt:	16.09.97

Testmetode

Testen er utført i overensstemmelse med utkastet til PARCOM toksistets test slik det er beskrevet av Phil McWilliams, TERRA Environmental Laboratory A/S 1994 i "Draft procedure, Acute test with juvenile turbot *Scophthalmus maximus*", testen bygger på "OECD Guidelines for testing of chemicals" (No. 203; Fish, acute toxicity test).

Testorganisme

Juvenile Piggvar (*Scophthalmus maximus*), med middelvekt 11.0 g og middel lengde 8.4 cm. Fisken var hentet fra Tinfos Aqua A/S i Rogaland. Godkjennelse av bruk og transport av piggvar ble gitt April 1997 av Torill Malmstrøm, Fylkesvetrinæren for Oslo, Akershus og Østfold.

TEST BETINGELSER

Test metode:	Draft PARCOM test Akutt test på juvinile piggvar
Test organisme:	Piggvar <i>Scophthalmus maximus</i>
Test parameter:	Mortalitet observert hvert døgn i 4 døgn.
Opprinnelse av fisk:	Tinfos Aqua, Piggvar klekket i uke 50
Ankomst Solbergstrand:	Piggvar ankom Solbergstrand april 1997
Start dato:	22.09.97
Test konsentrasjoner:	32 og 56 % løsning av Prøvested 1 Hunsfos
Tillagning av testløsninger	Avløpsvannet ble fortynt med 60m vann fra Drøbak ved hjelp av måleylindre og målekolber. Testløsningsvolumet var 25l.
Test medium:	60 m sjøvann fra Drøbak
Test beholdere:	36 l glass akvarium plassert i et gjennomstrømnings vannbad
Test betingelser	
Lys:	12h lys : 12 h mørke med dagslys type lysstoffrør
Temperatur:	Målt daglig med termometer, høyeste temperatur var 15.8 °C og laveste temperatur var 15.1 °C.
pH:	kontroll: start: pH 8.20 slutt: pH 8.14, høyeste konsentrasjon: start: pH 6.22 slutt: pH 7.45
Oksygen:	På grunn av høyt innhold av organisk stoff ble det antatt at potensiale for høyt oksygenforbruk var stort. Alle kar ble derfor luftet. Det ble målt >70% metning i alle kar under hele forsøket.
Salinitet i kontroll:	i kontroll: 3.19 % S, i høyeste konsentrasjon: 1.51 % S
Calculation of LC ₅₀ *	Kumulativ prosent mortalitet er plottet mot log konsentrasjon på log papir. LC50 beregnes grafisk eller statistisk med Probit metoden når mulig.
Calculation of NOEC **	t-test (p<0.05)

*LC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% dødelighet av testorganismen

** NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

Denne rapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endring.
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet.



Test materiale

Avløpsvannet fra rensesanlegg ved Hunsfos fabrikker ble levert i 25 l plastkanner. Prøvematerialet ble oppbevart kjølig ved 4°C inntil bruk. Avløpsvannet var brunlig og meget turbid og luktet tre/kloakk. På grunn av liten prøvemengde kunne kun 2 konsentrasjoner testes. Det er uansett ikke vanlig å teste ferskvannsløsninger i konsentrasjoner >56 % i marine tester.

Utførelse

Forsøket ble utført i glassakvarier med 25 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon. Konsentrasjoner testet var 32 og 56 % løsning av avløpsvann i sjøvann. Testfiskene ble overført til ny løsning hvert døgn (semistatisk metode) og forsøket pågikk i 4 døgn. Fiskemengden i forsøket var på 3.1 g fisk per liter. Dette er >1.0 g fisk per liter som er foreskrevet i standarden. Ettersom det ble benyttet lufting under testen vil forhøyet fiskemengde neppe ha påvirket testresultatet. Konsentrasjonen av løst oksygen ved vannskift var >70 % av metningskonsentrasjonen. Fisken ble observert hvert døgn og død fisk ble notert og fjernet. Temperaturen ble målt hver dag med termometer. Jevn temperatur ble sikret ved at akvariene sto i sirkulert vann fra 40m.

Resultater

I tabell 1 er dødeligheten oppført for hver konsentrasjon av testmaterialet. Fisk eksponert for 32 % og 56 % avløpsvann viste alle tydelig sliming etter 24 timer og videre utover. Etter 72 timer døde alle fiskene ved 56 %.

Avvik fra protokoll

Fiskemengden per liter testløsning er over 1g/l. Men lufting av testløsninger sikrer at oksygenmangel ikke påvirker resultatet.

Tabell 1. Kumulativt antall (%) døde fisk ved forskjellig eksponeringstid og konsentrasjon av "Prøvested 1 Hunsfos". LC50 og NOEC ved ulike tidspunkt angitt nederst i tabellen.

Konsentrasjon (%)	Timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
56	0	0	7	7
32	0	0	0	0
LC50 %	>56	>56	42	42
NOEC %	>56	>56	32	32

**Konklusjon**

Testresultatene er summert i tabell 2. LC50 etter 96 timer er i dette forsøket beregnet til 42 %. NOEC med hensyn på dødelighet etter 96 timer er 32 %. Men fisken var svært slimete ved både 32 % og 56 % etter 24 timer og ut forsøksperioden. NOEC med hensyn til toksiske symptomer er derfor <32 %.

Tabell 2. Testresultater med "Prøvested 1 Hunsfos" etter 96 timer.

Test parameter	Benevnelse	LC50	NOEC*
Mortalitet	%	42	>32

*med hensyn til mortalitet

Testen utført av: August Tobiesen

Testansvarlig:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "August Tobiesen".
August Tobiesen



TEST RAPPORT

Akutt toksisitet - fisk
Salmo trutta
NIVA metode K15



Teststoff:	Prøvested 2,Hunsfos	Lab. kode:	B291/2
Kunde:	Hunsfos Fabrikker 4700 Vennesla	Motatt:	16.09.97

Testmetode

Testen er utført i overensstemmelse med "OECD Guidelines for testing of chemicals" (No. 203; Fish, acute toxicity test) og en noe modifisert Norsk Standard, NS 4717; "Bestemmelse av kjemiske produkters og avløpsvanns akutte toksisitet for ferskvannsfisk - semistatisk metode". Forholdet fiskevekt/vannvolum var (0.73 g/l) i overensstemmelse med fiskebelastning på <1.0 g/l anbefalt i OECD 203.

Testorganisme

Årsyngel (0+) av ørret (*Salmo trutta*), med middelvekt 0.73 g og middellengde 4.3 cm. Fisken var hentet fra OFAs oppdrettsanlegg i Sørkedalen 2 uker før testoppstart. Fisk ble ikke foret innen 1 døgn før teststart.

Test detaljer

Test organisme:	Bekkeørret (<i>Salmo trutta</i>)
Test parameter:	Mortalitet observert hver dag i 4 dager.
Opprinnelse av fisk:	Oslo Fiskeadministrasjon Oppdrettsanlegg i Sørkedalen
Inntak av fisk:	Fisk ankom NIVA 3 september 1997
Dato for oppstart:	16 september 1997
Test konsentrasjoner:	5.6, 10, 18, 32 og 56 % løsning av "Prøvested 2 Hunsfos"
Tillagning av løsninger:	Test avløpsvannet ble målt opp i målesylinder og fortynt i målekolbe
Test Medium:	Fortynningsvann fra Maridalsvannet.
Test system:	36 l glass akvarier fylt med 10 l testløsning

Test betingelser

Lys:	16 timer lys 8 timer mørke
Temperatur:	Målt daglig i kontroll akvariet. Maksimum temperatur var 15.1 °C og minimum var 14.0 °C.
pH:	Målt før og etter vannskift hver dag. Kontroll start 6.6, slutt 6.7, Høyeste konsentrasjon start 6.5 slutt 6.6
Oksygen:	Daglig måling før vannskift. Laveste måling 52 % oksygen metning høyeste måling 78 % oksygen metning.
Beregning av LC50	Kumulativ prosent mortalitet er plottet mot logaritmen til konsentrasjonen. LC50 er grafisk bestemt.
NOEC	Høyeste konsentrasjon uten toksiske effekter.

Denne rapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endring.
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet.



Utførelse

Forsøket ble utført i glassakvarier med 10 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon av avløpsvann. Konsentrasjoner testet var 5.6, 10, 18, 32 og 56 % avløpsvann "Prøvested 2", avløpsvannet hadde et grumset utseende, med karakteristisk treforedlings lukt. Det var mye partikler i vannet. Avløpsvannet ble målt opp i målesylinder og fortynnet i målekolber med Maridalsvann til ønsket konsentrasjon. Testfiskene ble overført til ny løsning hvert døgn (semistatisk metode) og forsøket pågikk i 4 døgn. Konsentrasjonen av løst oksygen ved vannskift var 52-78 % av metningskonsentrasjonen. Fisken ble observert hvert døgn med hensyn til toksiske symptomer og død fisk ble notert og fjernet. Vannkvaliteten i det benyttede fortynningsvannet fremgår av tabell 1. Vannet er et typisk norsk overflatevann, bløtt, svakt surt og med relativt lite innhold av løste organiske stoffer. Temperaturen under forsøkene var 14.0-15.1 °C.

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

pH		ca. 6.7
Konduktivitet	mS/m 25 °C	2.94
TOC	mg/l	2.33
Ca	mg/l	2.57

Resultater

I tabell 2 er oppført dødeligheten i hver konsentrasjon av avløpsvann. Mer enn 50% mortalitet ble kun observert ved høyeste konsentrasjon av avløpsvann. Det ble ikke observert toksiske symptomer på overlevende fisk. NOEC er basert på høyeste konsentrasjon uten observerbare toksiske effekter. Et sammendrag av resultatene er gjengitt i tabell 3. For at mortaliteten skal være gyldig krever testprotokollen (se avvik fra protokoll nedenfor) at oksygenmetningen ikke skal være under 60 %. Det er derfor ikke anledning til å beregne en nøyaktig LC50 verdi for denne testen. Man kan bare antyde at LC50 etter 96 timer er >32 %.

$$\text{LC50 (96 timer)} = >32 \%$$

Avvik fra protokoll

Oksygen: Det er krav om at oksygenmetningen ikke skal være under 60 %. Dette er ikke tilfredstillt for den de høyeste konsentrasjonene på 56 % og 32 %. Den lave oksygenmetningen skyldes oksygenforbruket i avløpsvannet. Mortalitet ved disse konsentrasjonene kan derfor ikke aksepteres som gyldige.



Tabell 2. Kumulativt antall døde fisk (% i parentes) ved forskjellig eksponeringstid og konsentrasjon av "Prøvested 2 Hunsfos". LC50 og NOEC ved ulike tidspunkt er angitt nederst i tabellen.

Konsentrasjon %	Timer			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
5.6	0	0	0	0
10	0	0	0	0
18	0	0	0	0
32	0	0	0	0
56	0	0	3 (43 %)	4 (57 %)
LC50	>56 %	>56 %	>32 %	>32 %
NOEC	>56 %	>56 %	>32 %	>32 %

Konklusjon

Testresultatene for "Prøvested 2 Hunsfos" er summert opp i tabell 3. Selv om det ble observert >50 % mortalitet ved høyeste konsentrasjon kan ikke dette benytte til å beregne en mer nøyaktig LC50 fordi oksygenmetningen var under validitetsgrnsen på 60 % oksygenmetning.

Tabell 3. Sammendrag av resultater for toksisitetstest med "Prøvested 2 Hunsfos" på fisk (*Salmo trutta*).

	Observasjons tidspunkt			
	24 timer	48 timer	72 timer	96 timer
LC50 (%)	>56	>56	>32	>32
NOEC (%)	>56	>56	>32	>32
100 % Dødelighet (%)	>56	>56	>56	>56

Testen utført av: August Tobiesen

Testansvarlig:

August Tobiesen

VEDLEGG 4

Nedbrytbarhetstester



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Nedbrytbarhet

OECD 301F

NIVA metode L3



Test stoff: Avløpsvann, prøvested 1 **Lab. kode:** B 291/1

Kunde: Hunsfos fabrikker
4700 Vennesla

Prøve mottatt: 16.09.97 **Lagringsbetingelser:** Fryserom -20 °C.

Test periode: 22. sept. til 20. okt. 1997.

Test betingelser:

Apparatur: Manometrisk respirometer, WTW 2001

**Nærings-
løsning:** OECD 301 Standard mineral saltløsninger. Ammonia: 1.3 mg N/l i preparert test-
løsning.

Inkubasjon: Mikroorganismer fra laboratorieprodusert biologisk aktivt slam (Husmann unit)
dyrket i OECD syntetisk kloakk, supplert med kommunalt kloakkvann dosert over 6
døgn før teststart. Slammet ble sentrifugert (2500 G i 10 min.) og resuspendert i
næringsløsning for "utvasking" av løste stoffer. Etter gjentatt sentrifugering ble
slammet resuspendert i næringsløsning til 6,1 g/l STS.
Inokulumkonsentrasjon i testmediet: $2,1 \cdot 10^7$ CFU/l, 30 mg/l STS.

pH: Start 7,5 Slutt: 7,00

Referense: Anilin, 20 mg C/l. Lag-fase: 3 døgn.

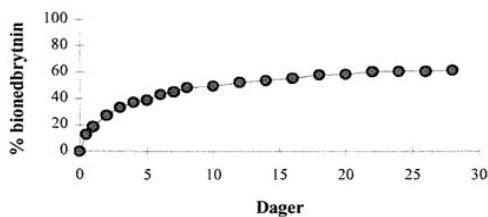
**Giftighets-
kontroll:** Anilin, 20 mg C/l tilsatt ved 1 : 10 fortyning av avløpsvannet.

**Konsentrasjon
av testprøve:** Avløpsvannet ble fortynt i næringsløsning til 10 % konsentrasjon i testmediet.
3 parallelle testflasker ble benyttet for bestemmelse av biokjemisk oksygenforbruk
(BOD), og duplikater for løst organisk karbon (DOC).
Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr}) ble analysert ved 50 % konsentrasjon.

Resultater:

Parameter	BOD ₂₈	COD _{Cr}	DOC ₀	DOC ₂₈	DOC-fjerning
Beregnet i prøven	533 mg/l	867 mg/l	292 mg/l	77 mg/l	74 %

Bionedbrytningskurve:



Bionedbrytbarhet:

$$\frac{BOD_{28}(\text{mg/l}) \cdot 100}{COD_{Cr}(\text{mg/l})} = 62 \%$$

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.
Testresultatet gjelder kun for den prøve som er testet.

ANALYSER OG RESULTATER:**Teststoff:** Avløpsvann, prøvested 1**Lab. kode:** B 291/1

Løst organisk karbon (DOC) mg/l:

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
Inokulum	C1	0.6	1.1
"	C2	0.6	1.5
"	Cmv.	0.60	1.30
Prøve (Fl. 6)	A1	29.1	9.3
" (Fl. 9)	A2	30.4	8.6
"	Amv.	29.75	8.95
Prøve korrigert (Amv.-Cmv.)		29.15	7.65
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)			74

Kjemisk oksygenforbruk:

Konsentrasjon i testprøve	Replikater	COD _{Cr} mg/l
Ufortynnet	1	867
1:2 fortytning	1	433

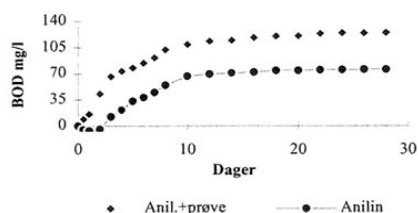
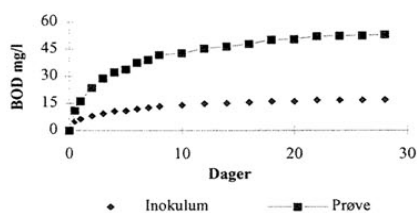
Biokjemisk oksygen forbruk: mg/l

Antall dager	5	7	14	21	28	BOD ₂₈ /COD
BOD mg/l Repl. 1	34,6	41,1	50,4	54,7	56,3	0,65
Repl. 2	34,7	38,7	45,2	49,8	51,9	0,60
Repl. 3	32,4	38,9	44,5	50,6	51,9	0,60

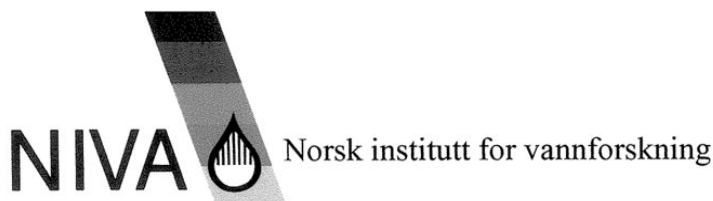
Bionedbrytning av referankestoffet (anilin) etter 14 døgn (BOD₁₄ · 100/ ThOD): = 89 %

Testprøve og blank, snittverdier:

Toksisitets kontroll: Testet ved 1:10 fortytning

**Test prinsipp**

Testprøven er inkubert i et bufret mineral næringssløsning over normalt 28 døgn ved 20 ± 1 °C. Testen utføres i lukkede flasker koblet til et manometer. Nedbrytningsproduktet karbondioksid (CO₂), som dannes under inkubasjon, absorberes i noen dråper av 10 mol KOH som er holdt i en spesiell kopp, ("sealing cup"). Det undertrykk som etableres i flasken blir registrert og transformert til BOD verdier.



Test prøve: Avløpsvann, prøvested 1

Lab. kode: B 291/1

BOD verdiene blir så korrigert for oksygenforbruket som skyldes nitrifikasjon, basert på analyser av nitrat ved start og ved endt inkubasjon.

Graden av bionedbrytning er uttrykt som biokjemisk oksygen forbruk (BOD) målt ved endt inkubasjon (normalt 28 døgn) som prosent av kjemisk oksygen forbruk (COD).

150 ml avløpsvann ble blandet med ca. 1300 ml næringsløsning og tilsatt mineral saltløsninger som kompensasjon for avløpsvannets andel. Etter pH kontroll ble 7,35 ml inokulumsuspensjon tilsatt. Til slutt ble det etterfylt med næringsløsning til 1500 ml markert. Etter omhyggelig blanding av testmediet ble 250ml porsjoner fordelt i testflaskene med bruk av målekolbe.

Inokulum

Podematerialet (inokulum) ble produsert i en biologisk aktivslam simuleringsenhet (OECD, Husmann unit), dyrket på syntetisk kloakkvann (ISO 9887), periodisk forsynt med kommunalt avløpsvann. Biologisk aktivt slam ble sentrifugert ved 2500 G i ti minutter og supernatanten ble fjernet. Det partikulære materialet ble resuspendert i næringsløsning og sentrifugert på nytt. Etter gjentatt resuspending i næringsløsning ble slammet gjort klart til bruk ved en konsentrasjon på 6.1 g/l STS. 4,9 ml suspensjon ble brukt per liter testmedium.

Antall heterotrofe bakterier i inokulum ble bestemt etter NS 4791, innstøpningsteknikk. Agarplatene ble inkubert i 3 døgn ved 20 ± 1 °C, før telling.

Referanse substans

Anilin ble brukt som referansesubstans, ved en konsentrasjon på 20 mg/l karbon. Gyldig BOD resultat skal være minst 60 % av teoretisk oksygenforbruk (ThOD) etter 14 døgn.

Giftighetskontroll

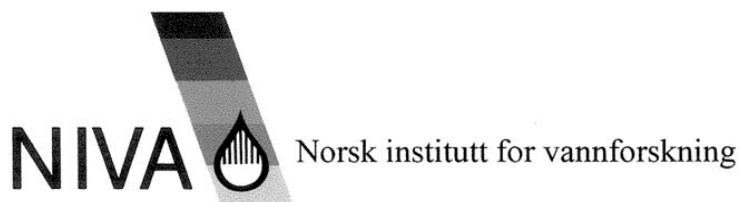
Anilin, 20 mg C/l, tilsatt avløpsvann ved 1:10 fortynning i næringssaltløsning ble anvendt for påvisning av giftighet. Det ble ikke påvist hemningseffekt ved anvendt testkonsentrasjon.

Måling av oppløst oksygen

Oppløst oksygen ble bestemt ved hjelp av et WTW OXI 2000 oksygen instrument. Avlesing ble foretatt i utvalgte testflasker ved start og i hver enkelt flaske etter inkubasjon. BOD-forløpet ble registrert ved manometeravlesing under inkubasjon. Verdien fra manometeravlesingen ble kalibrert mot oksygenverdien målt med elektrode etter 28 døgn.

Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr})

Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr}) ble analysert på uforynnet og 1:2 fortynt prøve i destillert vann. Prøvene ble konserverte med 1 ml 4M svovelsyre / 100 ml, og lagret ved 2-4 °C før analyse.



Test prøve: Avløpsvann, prøvested 1

Lab. kode: B 291/1

Løst organisk karbon (DOC)

Løst organisk karbon (DOC) i testmediet ble analysert med Dohrmann DC 190 etter forbrenning ved 680 °C, med platina som katalysator (TC/TOC analyzer).

Nitrat

NO₃-N konsentrasjon ble analysert i henhold til NS 4745 (Autoanalyzer metode). Nitrat blir redusert til nitritt ved hjelp av kopper-impregnert kadmium i en bufferløsning ved pH 8.0 - 8.5. Dannet nitritt reagerer med sulfanilamid i sur løsning, og med tilstedeværelse av N-(1-naphthyl)-etylen diamin dannes et rødlig azo-fargesstoff. Absorbansen blir så målt spektrofotometrisk ved 540 nm.

Oslo, den 5. januar 1998

Testet av: Harry Efraimsen

Forskningsleder: 
Torsten Källqvist

REFERANSER:

1. OECD Guideline for testing of chemicals. 301F Manometric Respirometry. Adopted July 1992.
2. NS-EN ISO 9408 Bestemmelse av fullstendig aerob biologisk nedbrytbarhet av organiske forbindelser i akvatisk medium. Metode ved bestemmelse av oksygenforbruket i et lukket respirometer. 1. utgave 1993.
3. NS-ISO 8245 Retningslinjer for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) Første utgave 1991.
4. NS 4748 Bestemmelse av kjemisk oksygenforbruk. Oksidasjon av dikromat (COD_{Cr}). 2. utgave 1991.
5. NS 4745 Bestemmelse av summen av nitritt- og nitrat-nitrogen Spectrophotometric method. 2. utgave 1991.
6. NS 4791 Heterotrofe bakterier. Innstøpningsteknikk 1. utgave 1990



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Nedbrytbarhet

OECD 301F

NIVA metode L3



Test stoff: Avløpsvann, prøvested 2 **Lab. kode:** B 291/2
Kunde: Hunsfos fabrikker
 4700 Vennesla
Prøve mottatt: 16.09.97 **Lagringsbetingelser:** Fryserom -20 °C.
Test periode: 22. sept. til 20. okt. 1997.

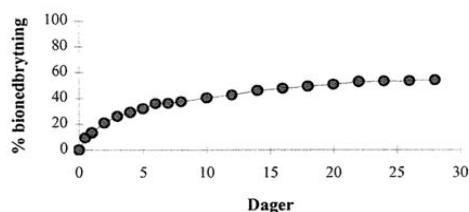
Test betingelser:

Apparatur: Manometrisk respirometer, WTW 2001
**Nærings-
løsning:** OECD 301 Standard mineral saltløsninger. Ammonia: 1.3 mg N/l i preparert test-
løsning.
Inkubasjon: Mikroorganismer fra laboratorieprodusert biologisk aktivt slam (Husmann unit)
dyrket i OECD syntetisk kloakk, supplert med kommunalt kloakkvann dosert over 6
døgn før teststart. Slammet ble sentrifugert (2500 G i 10 min.) og resuspendert i
næringsløsning for "utvasking" av løste stoffer. Etter gjentatt sentrifugering ble
slammet resuspendert i næringsløsning til 6,1 g/l STS.
 Inokulumkonsentrasjon i testmediet: $2,1 \cdot 10^7$ CFU/l, 30 mg/l STS.
pH: Start 7,5 Slutt: 7,00
Referense: Anilin, 20 mg C/l. Lag-fase: 3 døgn.
**Giftighets-
kontroll:** Anilin, 20 mg C/l tilsatt ved 1 : 10 fortykning av avløpsvannet.
**Konsentrasjon
av testprøve:** Avløpsvannet ble fortyknet i næringsløsning til 20 % konsentrasjon i testmediet.
3 parallelle testflasker ble benyttet for bestemmelse av biokjemisk oksygenforbruk
(BOD), og duplikater for løst organisk karbon (DOC).
Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr}) ble analysert ved 100 % konsentrasjon.

Resultater:

Parameter	BOD_{28}	COD_{Cr}	DOC_0	DOC_{28}	DOC-fjerning
Beregnet i prøven	240 mg/l	430 mg/l	125 mg/l	37,5 mg/l	70 %

Bionedbrytningskurve:



Bionedbrytbarhet:

$$\frac{BOD_{28}(\text{mg/l}) \cdot 100}{COD_{Cr}(\text{mg/l})} = 56 \%$$

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.
 Testresultatet gjelder kun for den prøve som er testet.

ANALYSER OG RESULTATER:

Teststoff: Avløpsvann, prøvested 2

Lab. kode: B 291/2

Løst organisk karbon (DOC) mg/l:

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
Inokulum	C1	0.6	1.1
"	C2	0.6	1.5
"	Cmv.	0.60	1.30
Prøve (Fl. 12)	A1	26.1	9
" (Fl. 14)	A2	25.1	8.6
"	Amv.	25.60	8.80
Prøve korrigert (Amv.-Cmv.)		25.00	7.50
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)			70

Kjemisk oksygenforbruk:

Konsentrasjon i testprøve	Replikater	COD _{Cr} mg/l
Ufortynnet	1	440
- "-	1	420

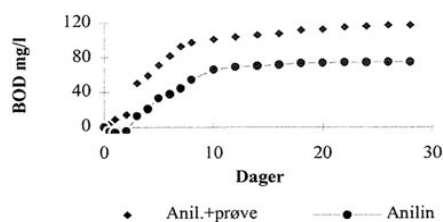
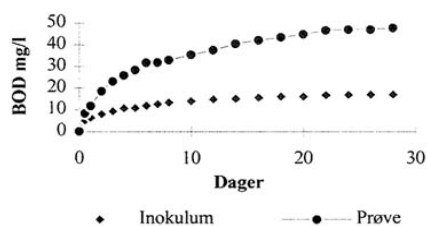
Biokjemisk oksygen forbruk: mg/l

Antall dager	5	7	14	21	28	BOD ₂₈ /COD
BOD mg/l Repl. 1	29,8	32,4	40,6	45,7	47,3	0,55
Repl. 2	26,1	29,5	38,5	43,1	45,4	0,53
Repl. 3	29,3	34,2	42,9	48,8	51,0	0,59

Bionedbrytning av referankestoffet (anilin) etter 14 døgn (BOD₁₄ · 100/ ThOD):= 89 %

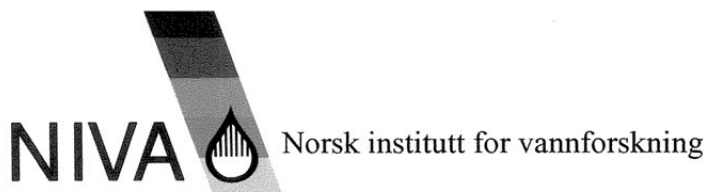
Testprøve og blank, snittverdier:

Toksisitets kontroll: Testet ved 1:5 fortyning



Test prinsipp

Testprøven er inkubert i et bufret mineral næringsløsning over normalt 28 døgn ved 20 ± 1 °C. Testen utføres i lukkede flasker koblet til et manometer. Nedbrytningsproduktet karbondioksid (CO₂), som dannes under inkubasjon, absorberes i noen dråper av 10 mol KOH som er holdt i en spesiell kopp, ("sealing cup"). Det undertrykk som etableres i flasken blir registrert og transformert til BOD verdier.



Test prøve: Avløpsvann, prøvested 2

Lab. kode: B 291/2

BOD verdiene blir så korrigert for oksygenforbruket som skyldes nitrifikasjon, basert på analyser av nitrat ved start og ved endt inkubasjon.

Graden av bionedbrytning er uttrykt som biokjemisk oksygen forbruk (BOD) målt ved endt inkubasjon (normalt 28 døgn) som prosent av kjemisk oksygen forbruk (COD). I tillegg analyseres løst organisk karbon (DOC) ved start og slutt for å beregne prosentlig DOC reduksjon.

300 ml avløpsvann ble blandet med ca. 1100 ml næringsløsning og tilsatt mineral saltløsninger som kompensasjon for avløpsvannets andel. Etter pH kontroll ble 7,35 ml inokulumsuspensjon tilsatt. Til slutt ble det etterfylt med næringsløsning til 1500 ml merket. Etter omhyggelig blanding av testmediet ble 250 ml porsjoner fordelt i testflaskene med bruk av målekolbe.

Inokulum

Podematerialet (inokulum) ble produsert i en biologisk aktivslam simuleringsenhet (OECD, Husmann unit), dyrket på syntetisk kloakkvann (ISO 9887), periodisk forsynt med kommunalt avløpsvann.

Biologisk aktivt slam ble sentrifugert ved 2500 G i ti minutter og supernatanten ble fjernet. Det partikulære materialet ble resuspendert i næringsløsning og sentrifugert på nytt. Etter gjentatt resuspending i næringsløsning ble slammet gjort klart til bruk ved en konsentrasjon på 6.1 g/l STS. 4,9 ml suspensjon ble brukt per liter testmedium.

Antall heterotrofe bakterier i inokulum ble bestemt etter NS 4791, innstøpningsteknikk. Agarplatene ble inkubert i 3 døgn ved 20 ± 1 °C, før telling.

Referanse substans

Anilin ble brukt som referansesubstans, ved en konsentrasjon på 20 mg/l karbon. Gyldig BOD resultat skal være minst 60 % av teoretisk oksygenforbruk (ThOD) etter 14 døgn.

Giftighetskontroll

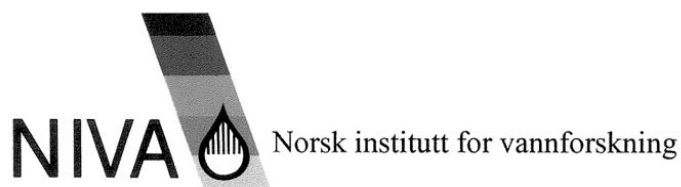
Anilin, 20 mg C/l, tilsatt avløpsvann ved 1:10 fortykning i næringssaltløsning ble anvendt for påvisning av giftighet. Det ble ikke påvist hemningseffekt ved anvendt testkonsentrasjon.

Måling av oppløst oksygen

Oppløst oksygen ble bestemt ved hjelp av et WTW OXI 2000 oksygen instrument. Avlesing ble foretatt i utvalgte testflasker ved start og i hver enkelt flaske etter inkubasjon. BOD-forløpet ble registrert ved manometeravlesing under inkubasjon. Verdien fra manometeravlesingen ble kalibrert mot oksygenverdien målt med elektrode etter 28 døgn.

Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr})

Kjemisk oksygenforbruk (COD_{Cr}) ble analysert på uforynnet prøve. Prøvene ble konserverte med 1 ml 4M svovelsyre / 100 ml, og lagret ved 2-4 °C før analyse.



Test prøve: Avløpsvann, prøvested 2

Lab. kode: B 291/2

Løst organisk karbon (DOC)

Løst organisk karbon (DOC) i testmediet ble analysert med Dohrmann DC 190 etter forbrenning ved 680 °C, med platina som katalysator (TC/TOC-analyser).

Nitrat

NO₃-N konsentrasjon ble analysert i henhold til NS 4745 (Autoanalyser metode). Nitrat blir redusert til nitritt ved hjelp av kopper-impregnert kadmium i en bufferløsning ved pH 8.0 - 8.5. Dannet nitritt reagerer med sulfanilamid i sur løsning, og med tilstedeværelse av N-(1-naphthyl)-etylen diamin dannes et rødlig azo-fargesstoff. Absorbansen blir så målt spektrofotometrisk ved 540 nm.

Oslo, den 5. januar 1998

Testet av: Harry Efraimsen

Forskningsleder:



Torsten Källqvist

REFERANSER:

1. OECD Guideline for testing of chemicals. 301F Manometric Respirometry. Adopted July 1992.
2. NS-EN ISO 9408 Bestemmelse av fullstendig aerob biologisk nedbrytbarhet av organiske forbindelser i akvatisk medium. Metode ved bestemmelse av oksygenforbruket i et lukket respirometer. 1. utgave 1993.
3. NS-ISO 8245 Retningslinjer for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) Første utgave 1991.
4. NS 4748 Bestemmelse av kjemisk oksygenforbruk. Oksidasjon av dikromat (COD_{Cr}). 2. utgave 1991.
5. NS 4745 Bestemmelse av summen av nitritt- og nitrat-nitrogen Spectrophotometric method. 2. utgave 1991.
6. NS 4791 Heterotrofe bakterier. Innstøpningsteknikk 1. utgave 1990



Norsk
Institutt
for
Vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

TEST RAPPORT

Nedbrytbarhet

OECD 301 A

NIVA metode L5



Test stoff: Avløpsvann, prøvested 1 **Lab. kode:** B 291/1
Avløpsvann, prøvested 2 **Lab. kode:** B 291/2

Kunde: Hunsfos fabrikk
4700 Vennesla

Prøve mottatt: 16.09.97 **Lagringsbetingelser:** Fryserom -20 °C.

Test periode: 22. sept. til 20. okt. 1997.

Test betingelser:

Apparatur: 5 l glassflasker med stor åpning, magnetrørverk og 8 cm teflonbelagte magnetstaver
Nærings-
løsning: OECD 301 Standard mineral saltløsninger. Ammonia: 1.3 mg N/l i preparert test-løsning.
Inkubasjon: Mikroorganismer fra laboratorieprodusert biologisk aktivt slam (Husmann unit) dyrket i OECD syntetisk kloakk, supplert med kommunalt kloakkvann dosert over 6 døgn før teststart. Slammet ble sentrifugert (2500 G i 10 min.) og resuspendert i næringsløsning for "utvasking" av løste stoffer. Etter gjentatt sentrifugering ble slammet resuspendert i næringsløsning til 6,1 g/L STS.
Inokulumkonsentrasjon i testmediet: $2,1 \cdot 10^7$ CFU/L, 30 mg/L STS.

pH: B291/1 Start 7,3 Slutt: 7,0
B291/2 " 7,6 " 7,1

Konsentrasjon av testprøve: Prøve B291/1: Fortynnet i næringsløsning til 25 % konsentrasjon i testprøven.
Prøve B291/2: Fortynnet i næringsløsning til 50 % konsentrasjon i testprøven.

2 parallelle testflasker ble benyttet for hver testprøve til bestemmelse av løst organisk karbon (DOC).

Resultater:

Testprøve	Parameter	DOC ₀	DOC ₂₈	DOC-fjerning
B291/1	I ufortynnet prøve	251 mg/l	64,3 mg/l	74 %
B291/2	"	114 mg/l	31,3 mg/l	73 %

Oslo, den 5. januar 1998

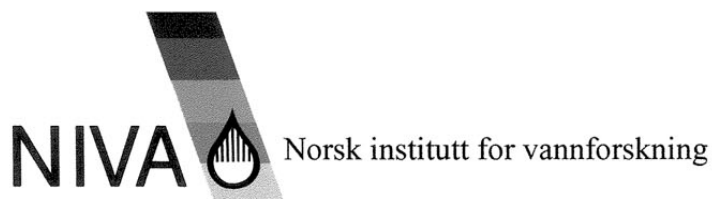
Testet av: Harry Efraimsen

Forskningsleder:

Torsten Källqvist

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.
Testresultatet gjelder kun for den prøve som er testet.

Side 1 av 2



ANALYSER OG RESULTATER:

Teststoff: **Avløpsvann, prøvested 1**
Avløpsvann, prøvested 2

Lab. kode: **B 291/1**
 Lab. kode: **B 291/2**

B291/1: Løst organisk karbon (DOC) mg/l:

Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
Inokulum	C1	0.6	1
"	C2	0.6	1
"	Cmv.	0.60	1.00
Prøve (Fl. a)	A1	63	17.15
" (Fl. b)	A2	63.8	17
"	Amv.	63.40	17.08
Prøve korrigert (Amv.-Cmv.)		62.80	16.08
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)			74

B291/2: Løst organisk karbon (DOC) mg/l:

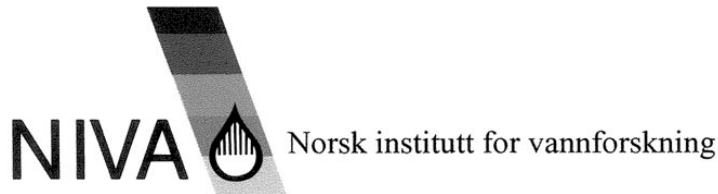
Medium	Flaske	Startverdi	28 døgn
Inokulum	C1	0.6	1
"	C2	0.6	1
"	Cmv.	0.60	1.00
Prøve (Fl. a)	A1	59.2	16.45
" (Fl. b)	A2	56	16.85
"	Amv.	57.60	16.65
Prøve korrigert (Amv.-Cmv.)		57.00	15.65
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)			73

Bionedbrytning av referankestoffet (anilin) etter 14 døgn ($BOD_{14} \cdot 100 / ThOD$):= 89 %
 (Målt som oksygenforbruk i respirometertest, OECD 301F)

Test prinsipp

Testprøven er inkubert i et bufret mineral nærløsningsmedium over normalt 28 døgn ved 20 ± 1 °C. Testen utføres i 5 liters glass flasker hvor testmediet holdes under kontinuerlig omrøring ved hjelp av en magnetstav og magnetrørverk. Flaskeåpningen holdes tildekket med aluminiumsfolie for å redusere fordampningen. Væsketap ved fordampning ble erstattet med destillert vann umiddelbart før testen ble stoppet. Løst organisk karbon (DOC) ble analysert ved start og ved endt testperiode.

Graden av bionedbrytning er uttrykt som reduksjon i DOC målt ved start og etter endt inkubasjon (normalt 28 døgn).



Teststoff:	Avløpsvann, prøvested 1	Lab. kode:	B 291/1
	Avløpsvann, prøvested 2	Lab. kode:	B 291/2

Preparering

B291/1: Til hver testflaske ble 1000 ml avløpsvann blandet med ca. 2,8 l næringsløsning og tilsatt mineral saltløsninger som kompensasjon for avløpsvannets andel. Etter pH kontroll ble 16,6 ml inokulumsuspensjon tilsatt. Til slutt ble det etterfylt med næringsløsning til 4 l merket.

B291/2: Til hver testflaske ble 2000 ml avløpsvann blandet med ca. 1,8 l næringsløsning og tilsatt mineral saltløsninger som kompensasjon for avløpsvannets andel. Etter pH kontroll ble 16,6 ml inokulumsuspensjon tilsatt. Til slutt ble det etterfylt med næringsløsning til 4 l merket.

En 8 cm lang magnetstav ble lagt i hver testflaske før de ble plassert på magnetrørverk for å holdes under kontinuerlig omrøring under inkubasjonsperioden. Ca 100 ml prøvemedium ble tatt ut fra hver flaske for DOC-analyser ved start.

Inokulum

Podematerialet (inokulum) ble produsert i en biologisk aktivslam simuleringsenhet (OECD, Husmann unit), dyrket på syntetisk kloakkvann (ISO 9887), periodisk forsynt med kommunalt avløpsvann. Biologisk aktivt slam ble sentrifugert ved 2500 G i ti minutter og supernatanten ble fjernet. Det partikulære materialet ble resuspendert i næringsløsning og sentrifugert på nytt. Etter gjentatt resuspending i næringsløsning ble slammet gjort klart til bruk ved en konsentrasjon på 6.1 g/L STS. 4,9 ml suspensjon ble brukt per liter testmedium.

Antall heterotrofe bakterier i inokulum ble bestemt etter NS 4791, innstøpningsteknikk. Agarplaten ble inkubert i 3 døgn ved 20 ± 1 °C, før telling.

Referanse substans

Anilin ble brukt som referansesubstans, ved en konsentrasjon på 20 mg/L karbon. Gyldig BOD resultat skal være minst 60 % av teoretisk oksygenforbruk (ThOD) etter 14 døgn.

Løst organisk karbon (DOC)

Løst organisk karbon (DOC) i testmediet ble analysert med Dohrmann DC 190 etter forbrenning ved 680 °C, med platina som katalysator (TC/TOC analyser).

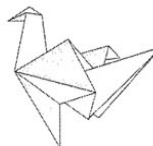
REFERANSER:

1. OECD Guideline for testing of chemicals. 301F Manometric Respirometry. Adopted July 1992.
2. NS-EN ISO 7827 Vurdering av fullstendig aerob biologisk nedbrytbarhet av organiske forbindelser i vann. Metode ved analyse av løst organisk karbon. ISO: 1994.
3. NS-ISO 8245 Retningslinjer for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) Første utgave 1991.
4. NS 4791 Heterotrofe bakterier. Innstøpningsteknikk 1. utgave 1990

VEDLEGG 5

Analyserapport

Ekstraktivstoffer

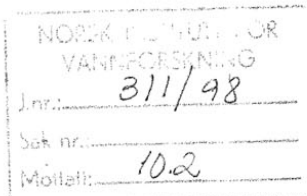


Besøk / Visiting: (EFR)
Forskningsveien 3
Post:
Box 24 Blindern
0313 OSLO, Norway
Telefon / Phone:
(+ 47) 22 14 00 90
Telefax:
(+ 47) 22 46 80 14
Bank:
Sparebanken NOR
Konto nr.: 1600 42 53950

NIVA
Postboks 173 Kjelsås

0411 OSLO

Att.: Harry Efraimsen



Oslo, 1998-02-09
21587/GJ/jh

ANALYSERAPPORT

Ekstraktivbestemmelse

Dato for prøvemottak: 97.10.31.

Parameter	Resultat			
	291-1		291-1 etter BOD	
	Totalt (frie + forestrede)	Frie	Totalt (frie + forestrede)	Frie
Pinolensyre, mg/l	0,43	0,25	n.d.	n.d.
Linolsyre, mg/l *	1,28	0,64	0,20	0,18
Oljesyre, mg/l	1,98	1,18	0,12	0,11
SUM Fettsyrer, mg/l	3,68	2,09	0,32	0,29
Pimarsyre, mg/l		1,08		0,07
Sandaracopimarsyre, mg/l		0,16		spor
Isopimarsyre, mg/l		0,44		0,04
Palustrinsyre, mg/l		n.d.		n.d.
Levopimarsyre, mg/l		n.d.		n.d.
Dehydroabietinsyre, mg/l		2,15		0,21
Abietinsyre, mg/l		1,90		0,11
Neoabietinsyre, mg/l		n.d.		n.d.
SUM Harpiksyrer, mg/l		5,73		0,43
Kampesterol, mg/l **	0,22	0,12	spor	spor
β -sitosterol, mg/l **	1,39	0,51	0,04	0,01
β -sitostanol, mg/l **	0,40	0,12	spor	spor
SUM Steroler, mg/l	2,01	0,75	0,04	0,01

Side 1 av 2

Parameter	Resultat			
	291-1		291-1 etter BOD	
	Totalt (frie + forestrede)	Frie	Totalt (frie + forestrede)	Frie
Pinolensyre, mg/l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linolsyre, mg/l *	0,22	0,11	0,10	spor
Oljesyre, mg/l	0,22	0,15	0,06	0,04
SUM Fettsyrer, mg/l	0,44	0,26	0,16	0,04
Pimarsyre, mg/l		0,11		spor
Sandaracopimarsyre, mg/l		0,02		spor
Isopimarsyre, mg/l		0,09		0,01
Palustrinsyre, mg/l		0,02		spor
Levopimarsyre, mg/l		n.d.		n.d.
Dehydroabietinsyre, mg/l		0,65		0,04
Abietinsyre, mg/l		0,59		0,02
Neoabietinsyre, mg/l		n.d.		n.d.
SUM Harpiksyre, mg/l		1,48		0,07
Kampesterol, mg/l **	0,02	0,01	spor	spor
β -sitosterol, mg/l **	0,23	0,08	0,04	0,01
β -sitostanol, mg/l **	0,02	0,01	spor	spor
SUM Steroler, mg/l	0,27	0,10	0,04	0,01

Analysene er utført på GC-MS

Målesikkerhet: 20 %

Andre merknader: * Beregnet ut fra kalibreringsevne av heptadekansyre.
* Beregnet ut fra kalibreringsevne av kolesterol.

Resultatene gjelder kun analyser av tilsendte prøver.

Med hilsen
PAPIRINDUSTRIENS FORSKNINGSINSTITUTT



Kjell Johnsen
Gruppeleder



Gerd Jørgensen
Oppdragsansvarlig

Rapporten skal ikke gjengis i utdrag, kun hele rapporten kan gjengis uten skriftlig godkjenning.

VEDLEGG 6

Bioakkumuleringstester

Vedlegg

METODE FOR BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER.

I denne bestemmelsen er det testet på vannprøver før og etter nedbrytbarhetstest. pH på vannprøvene ble justert til ca. 2 med konsentrert svovelsyre og deretter ekstrahert med 2 x 10 ml heksan. Emulsjon ble fjernet ved utsalting med natrium klorid. Ekstraktene ble kombinert og volumet justert til 2.0 ml. Ekstraktet ble analysert gasskromatografisk og videre fraksjonert på tynnsjikt i tre fraksjoner:

Fraksjon 1: Applikasjonszone
 Fraksjon 2: $P_{ow} < 10^{5.7}$
 Fraksjon 3: $10^{3.8} < P_{ow} < 10^{5.7}$

Lipofile eller potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser ble bestemt ved tynnsjiktskromatografi av heksan ekstrakt av en vannprøve. Fraksjonene ble skrapet av tynnsjiktsplaten, tilsatt indre standard og ekstrahert med heksan 2 ganger. Hver av ekstraktene ble analysert med gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor, GC/FID. Arealet til de enkelte toppene ble relatert til en ytre eller indre standard som ga et mål for mengden organisk kromatograferbare forbindelser. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfellet organiske substanser med en molekylvekt opp til ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk. Ved beregning ble det antatt at de detekterte forbindelsene har samme respons som den indre eller ytre standarden. Dette er en grov tilnærming, da erfaring har vist at responsen på en FID for ulike organiske forbindelser kan variere med opptil 50 %. Dette betyr at metoden må betraktes som semi kvantitativ. Blindprøve er kjørt parallelt med prøvene.

Testbetingelser ved GC analysen:

Kappilærkolonne, Rtx 5
 l = 30 m, i.d. = 0.25 mm

Program:

Starttemperatur 60 °C, henstand 2 min
 Oppvarmingshastighet 5 °C/min
 Sluttemperatur 280 °C, henstand 8 min.
 Ytre standard n-C₂₄H₅₀
 Indre standard n-C₁₄H₃₀

Referanse: Renberg, L og A-C Rosén-Olofsson: Karakterisering av potensielt bioakkumulerbare substanser i industrielle avloppsvatten. Statens naturvårdsverk, Sverige, rapport 82-03.



TEST RAPPORT

Bioakkumulering TLC-GC/FID metode

Norsk
Institutt
for
Vannforskning

P. Boks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Tel: 22 18 51 00
Fax: 22 18 52 00

Oppdragsgiver: Hunsfoss Fabrikker

Test komponent: Avløpsvann

Lab. kode: B291 1-2

Prøve mottatt: 160997 Lagrings betingelser: Fryser

Test periode: nov 97

Bestemmelse av potensielt bioakkumulerbart materiale i vannprøve før og etter nedbrytbarhetstest.

Potensielt bioakkumulerbart materiale skulle bestemmes i vannprøver før og etter nedbrytbarhetstest i surt ekstrakt (tynnsjikt-kromatografi og fingerprint på gasskromatograf med flamme ionisasjonsdetektor).

Analysemetode:

Prøvene er ekstrahert ved pH 2 og TLC fraksjonert i tre fraksjoner, applikasjonssonen, $P_{ow} > 10^{5.7}$ og $10^{3.8} < P_{ow} < 10^{5.7}$. Resultatene er gjengitt i tabell 1.

Prøve B291-1:

Prøven før nedbrytning er testet uforynnet. Prøven etter nedbrytning er testet i en fortyning 1:4. I prøven før nedbrytning viser GC-kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 0.79 mg/l for $\log P_{ow} > 5.7$ (fraksjon 1 + fraksjon 2) og 1.76 mg/l for $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$ (fraksjon 3). I den samme prøven etter nedbrytning viser GC kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 0.008 mg/l for $\log P_{ow} > 5.7$ (Fraksjon 1 + fraksjon 2) og 0.004 mg/l for $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$ (fraksjon 3).

Prøve B291-2:

Prøven før nedbrytning er testet uforynnet. Prøven etter nedbrytning er testet i en fortyning 1:2. I prøven før nedbrytning viser GC kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 0.24 mg/l for $\log P_{ow} > 5.7$ (fraksjon 1 + fraksjon 2) og 0.15 mg/l for $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$ (fraksjon 3). I den samme prøven etter nedbrytning viser GC kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 0.004 mg/l for $\log P_{ow} > 5.7$ (fraksjon 1 og fraksjon 2) og 0.004 mg/l for $3.2 < \log P_{ow} < 5.7$ (fraksjon 3).

Denne testrapport får kun kopieres i sin helhet og uten noen form for endringer.
Testresultatene gjelder kun for den prøve som er testet.

Norsk Institutt for Vannforskning

Surt ekstrakt	Kons. før TLC fraksjonering (mg/l)	Kons. fraksjon 1 ved applikasjonsone TLC (mg/l)	Kons i fraksjon 2, log $P_{ow} > 5.7$ (mg/l)	Kons i fraksjon 3, $3.2 < \log P_{ow} <$ 5.7 (mg/l)
Prøve før nedbrytning B291-1	10.1	0.004	0.787	1.76
Prøve etter nedbrytning B291-1	0.424	0.008	n.d.*	0.004
Prøve før nedbrytning B291-2	2.31	0.028	0.227	0.153
Prøve etter nedbrytning B292-2	0.074	0.004	n.d.	0.004

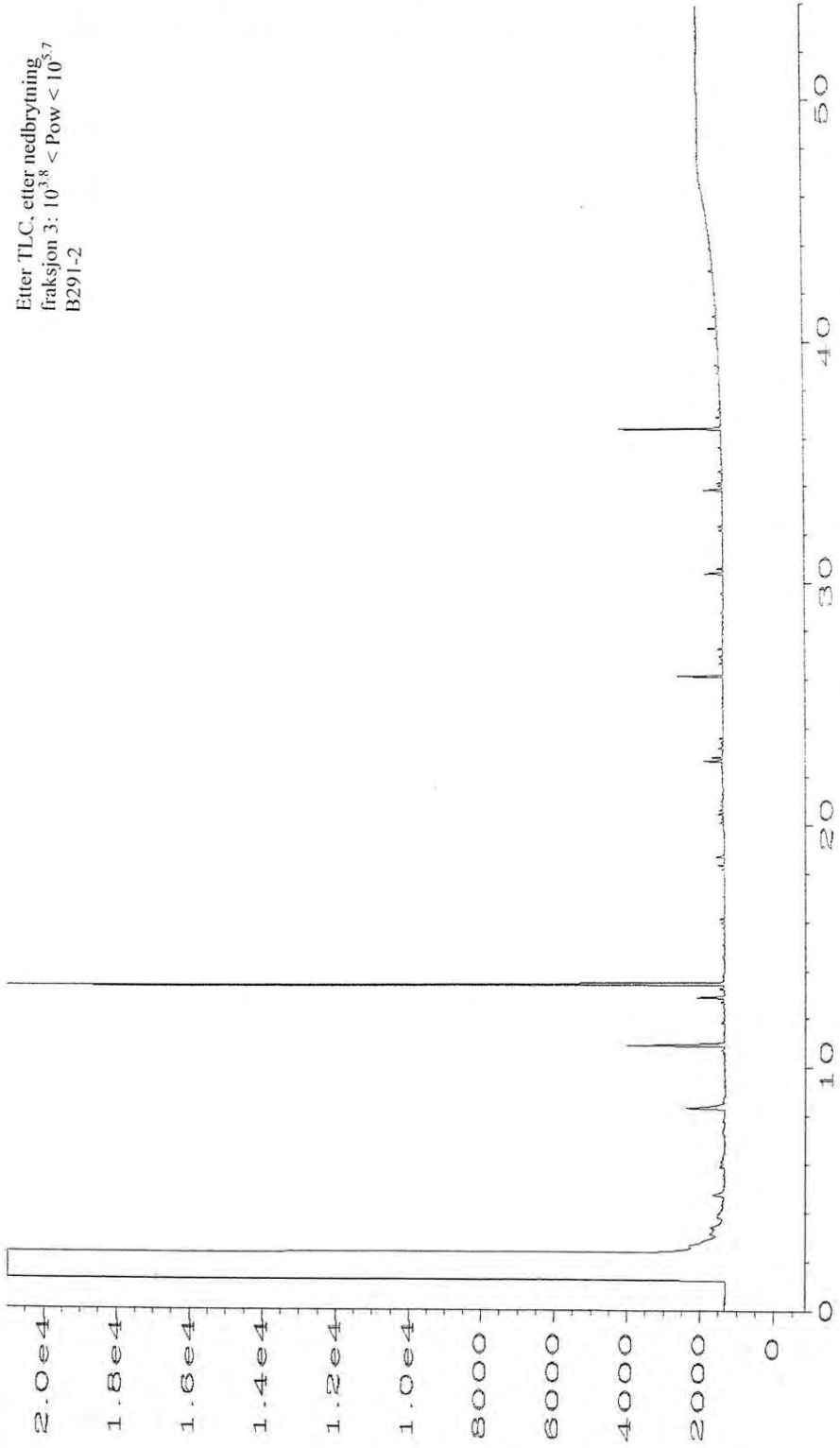
* ikke påvist

NIVA 270198

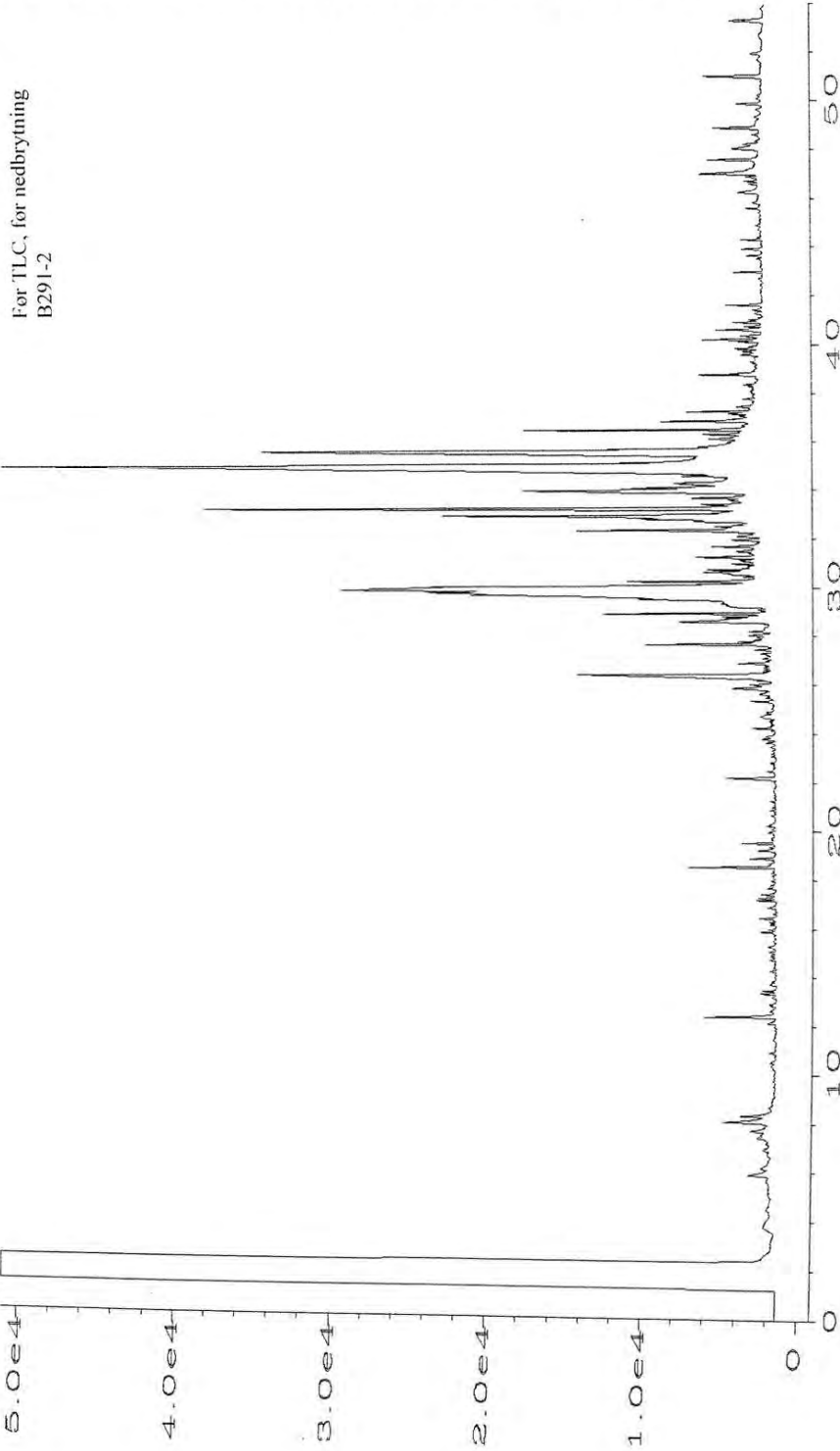


Torgunn Sætre

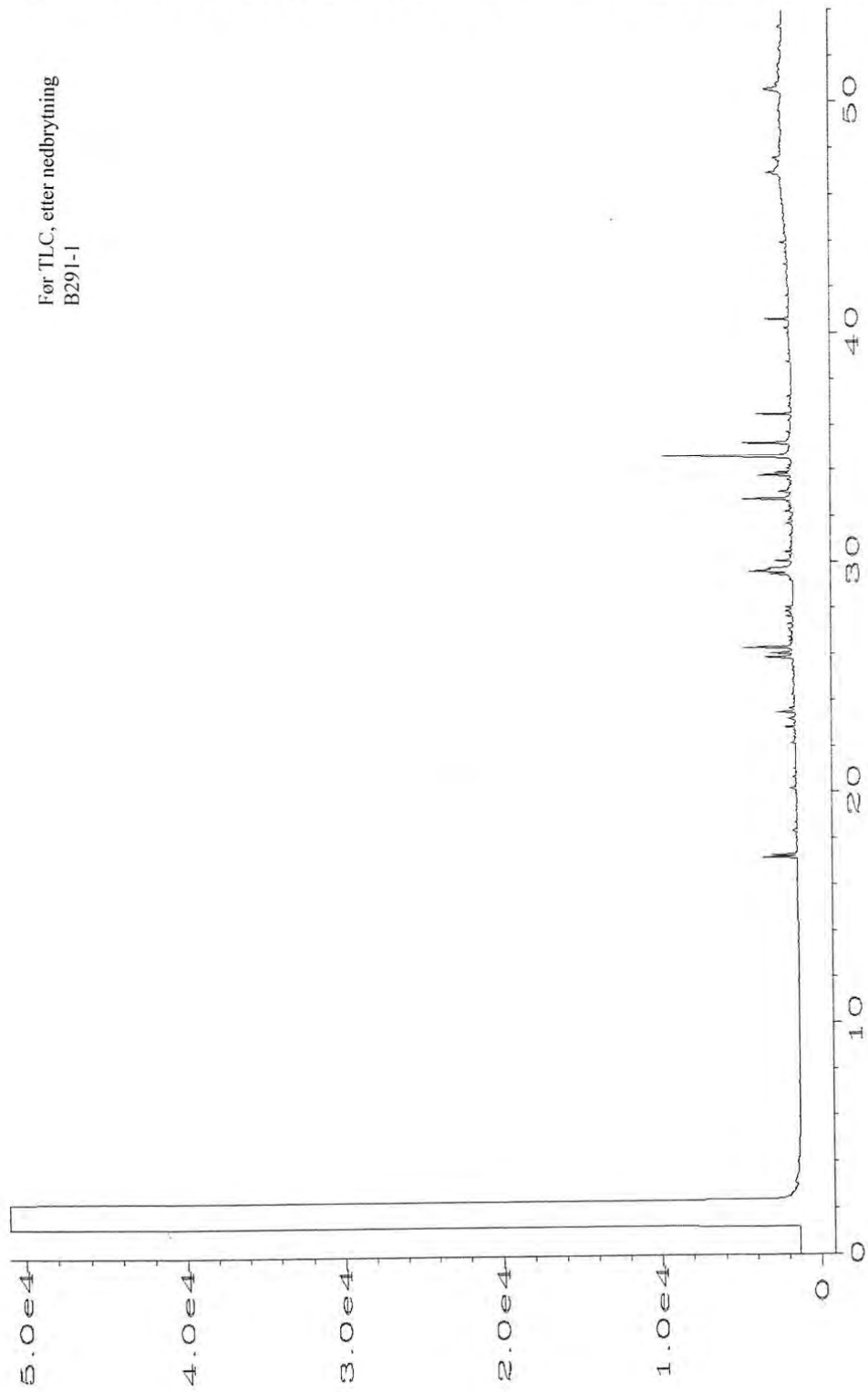
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\036F0601.D



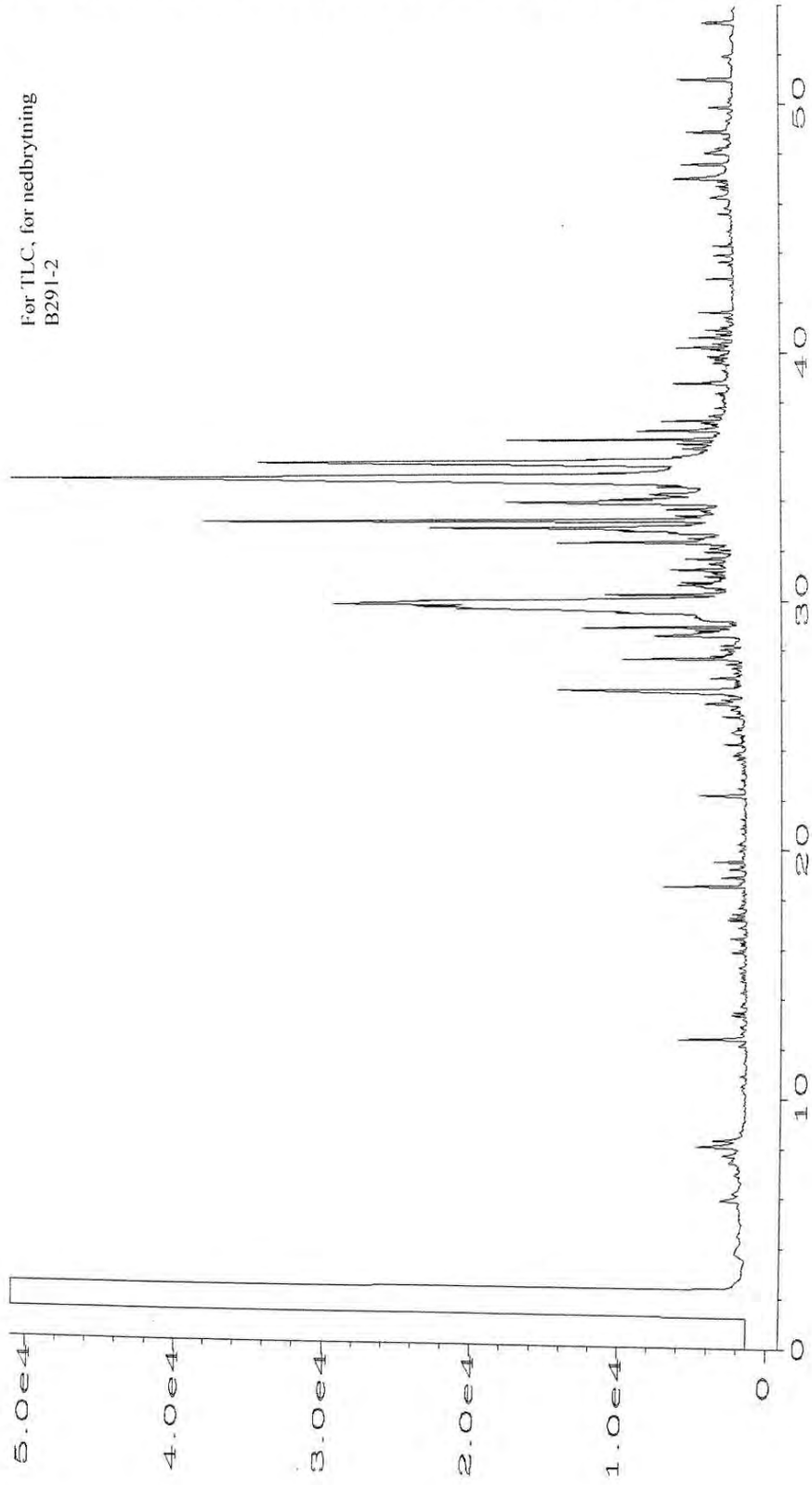
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\033F0701.D



C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\030F0701.D

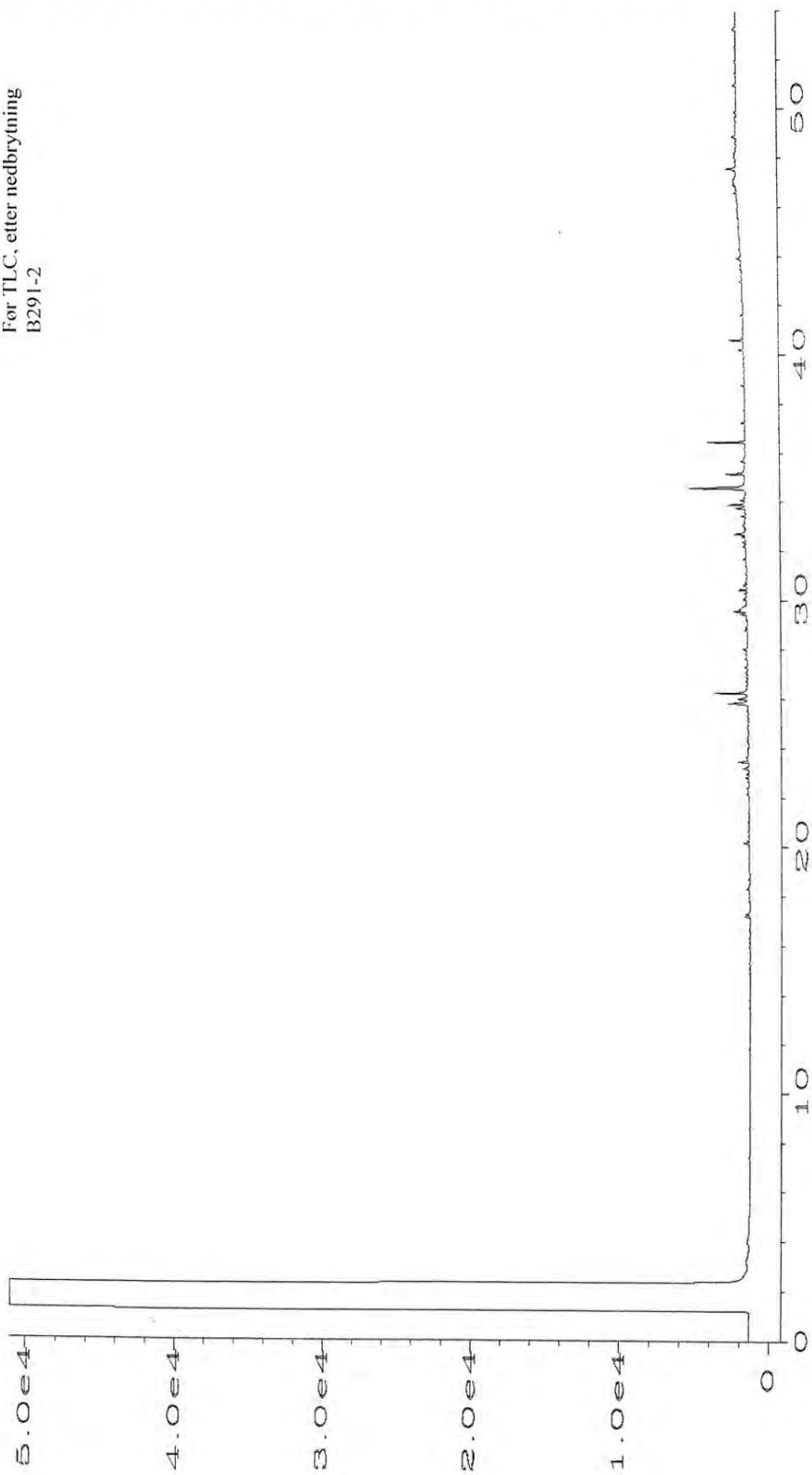


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\033F0701.D



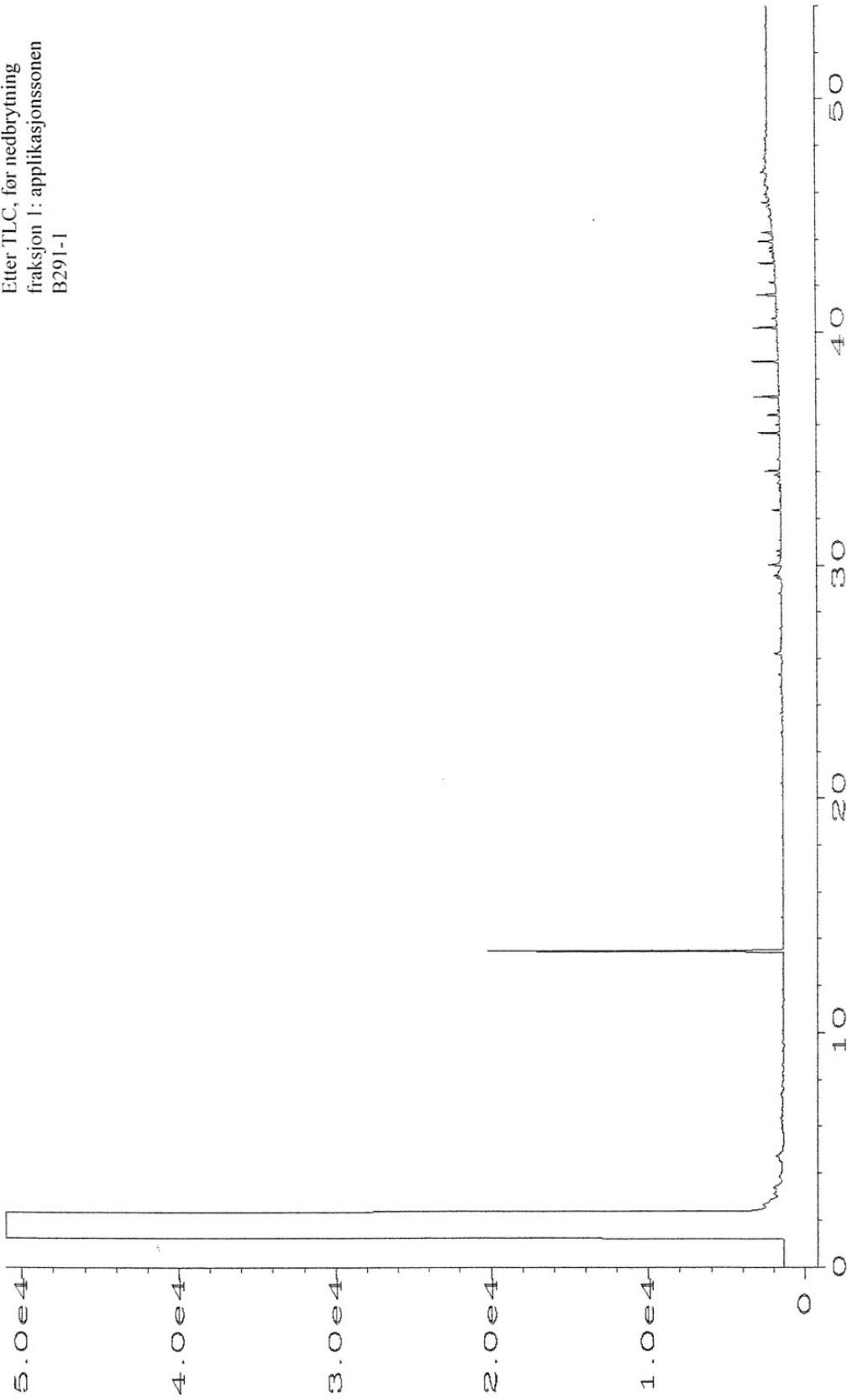
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\032F0701.D

Før TLC, etter nedbrytning
B291-2



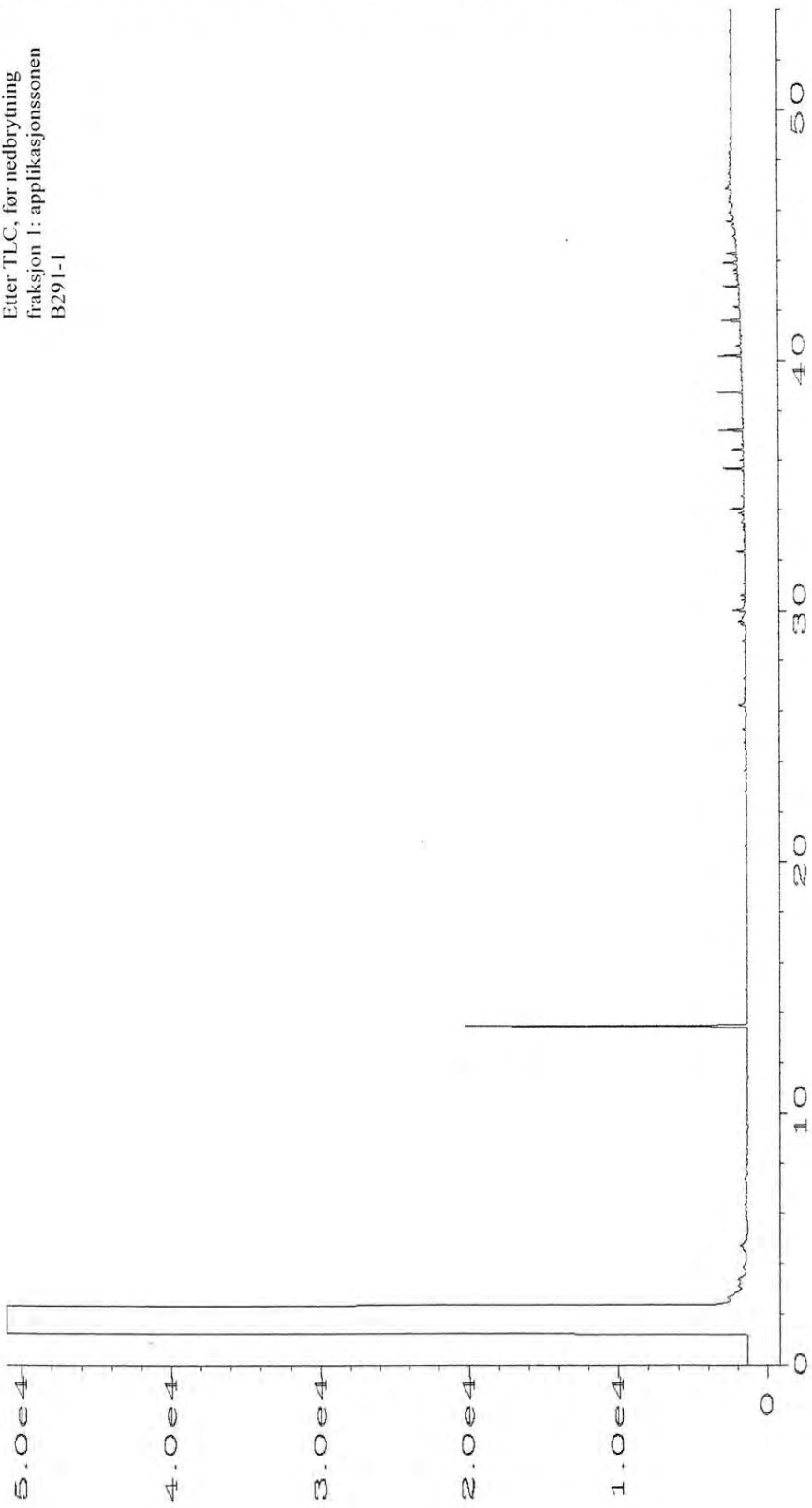
\\HPCHEM\2\DATA\971104T\009F0501.D

Etter TLC, for nedbrytning
fraksjon 1: applikasjonsonen
B291-1

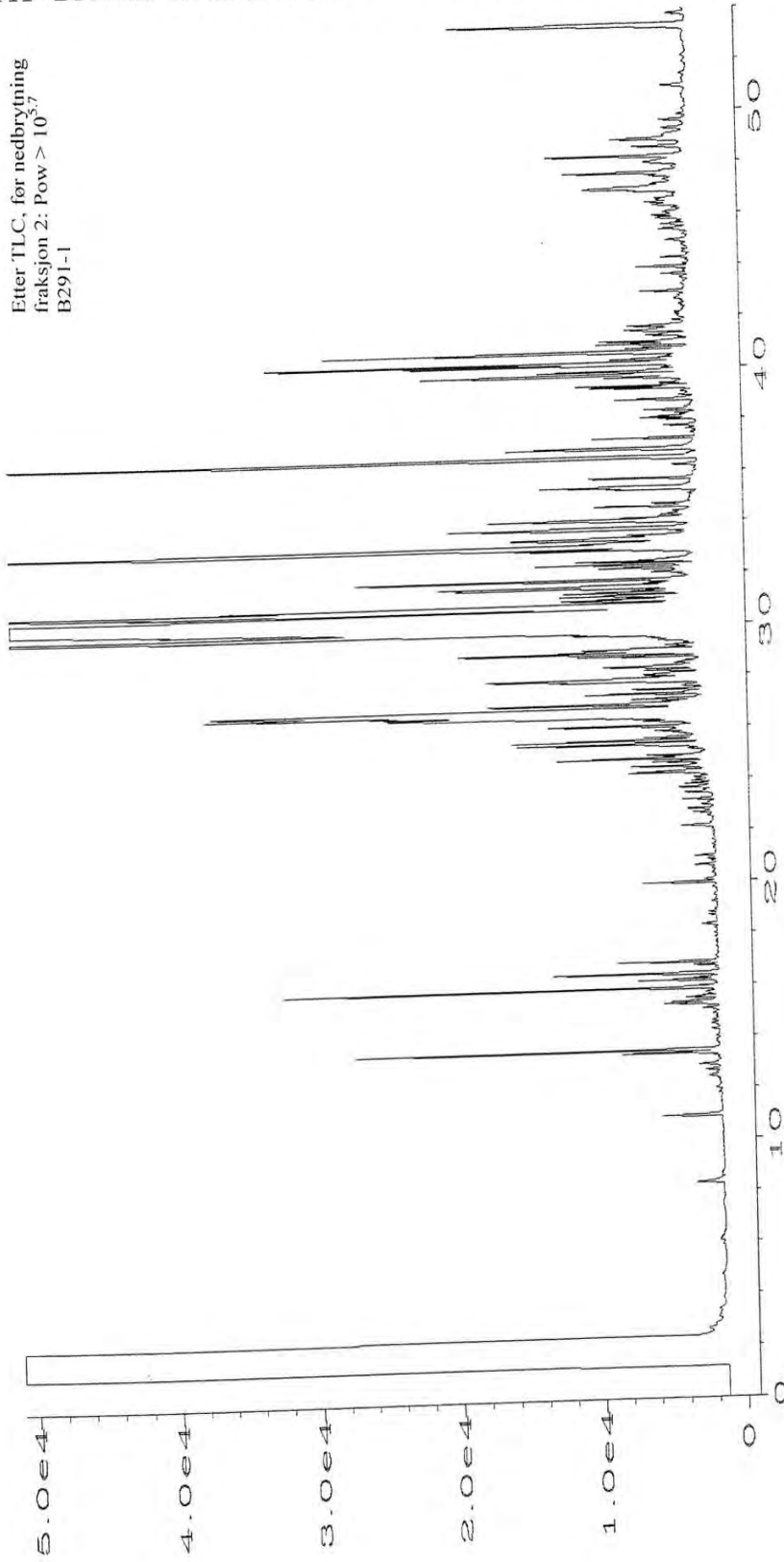


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\009F0501.D

Etter TLC, for nedbrytning
fraksjon 1: applikasjonsonen
B291-1

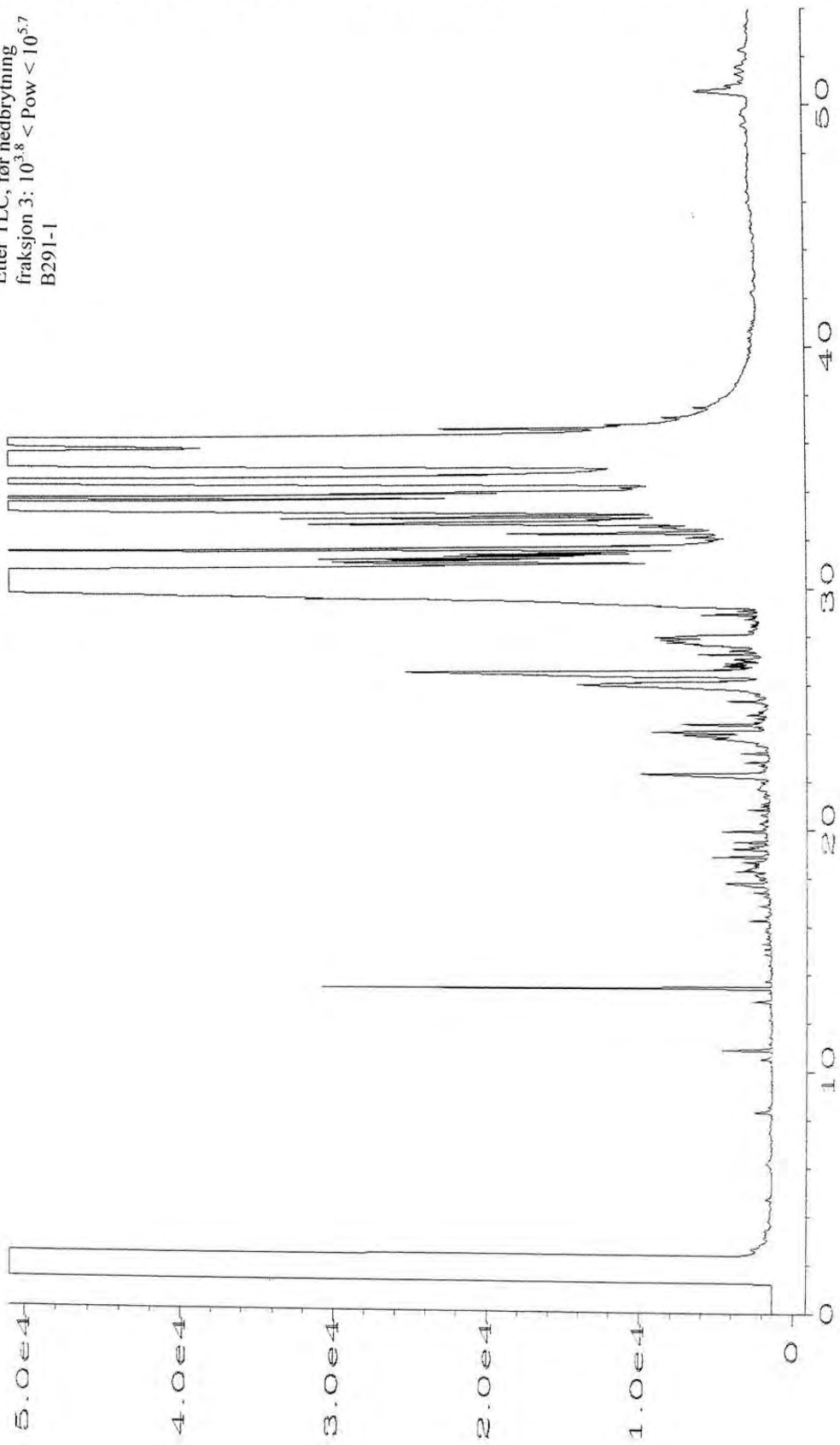


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\010F0501.D



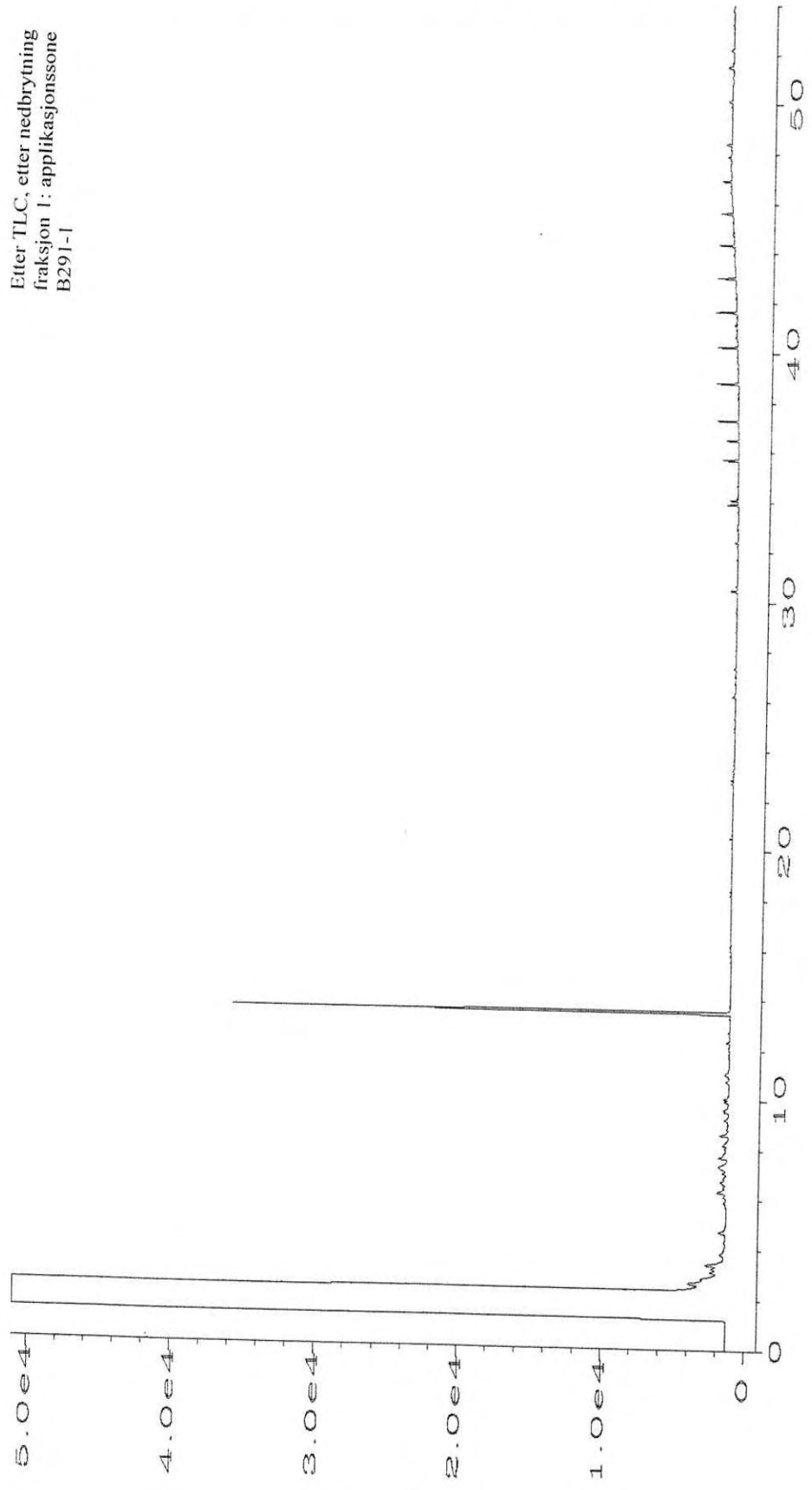
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\011F0501.D

Etter TLC, for nedbrytning
fraksjon 3: $10^{3.8} < \text{Pow} < 10^{5.7}$
B291-1



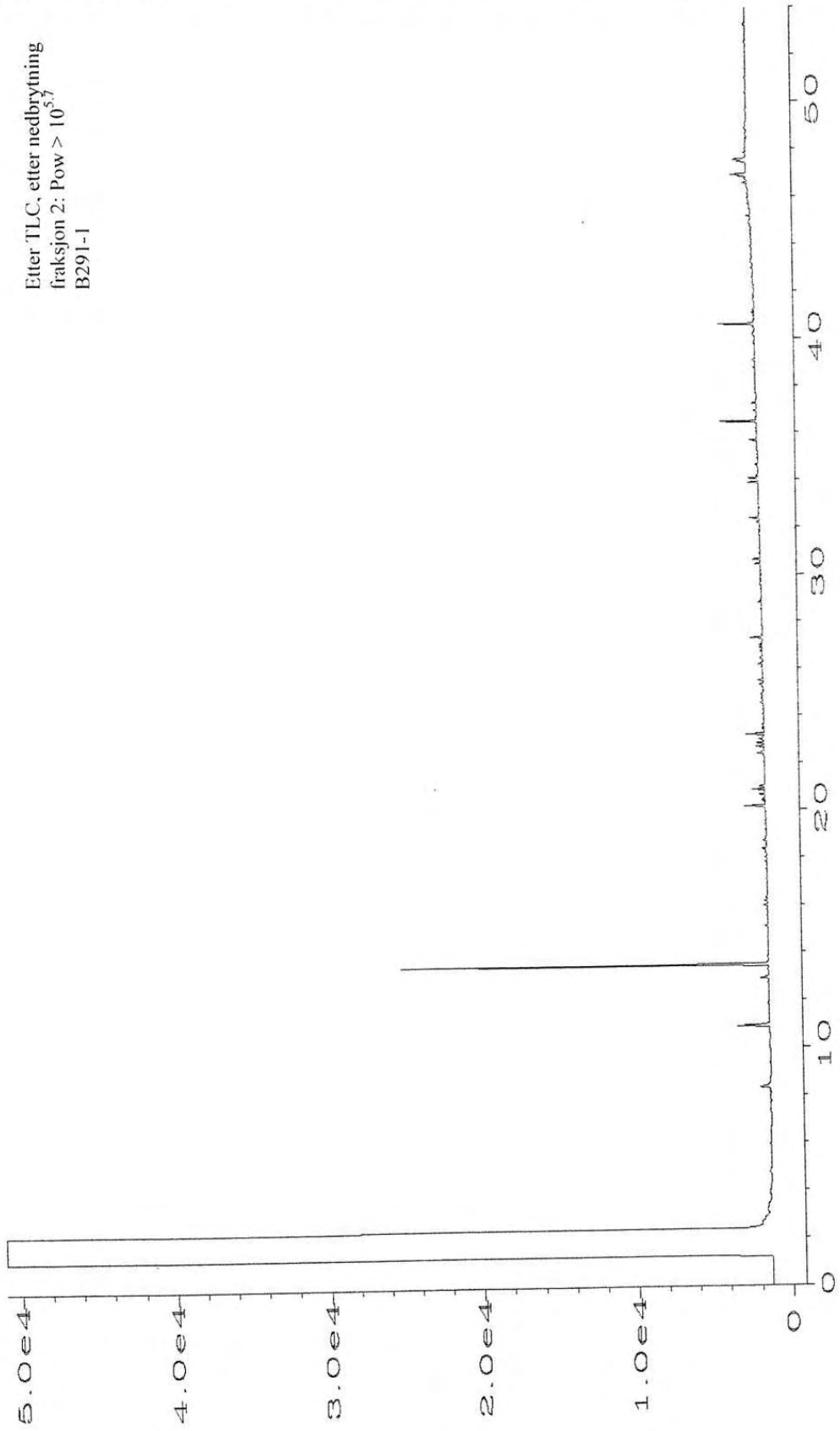
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\022F0501.D

Etter TLC, etter nedbrytning
fraksjon 1: applikasjonsone
B29|1-1



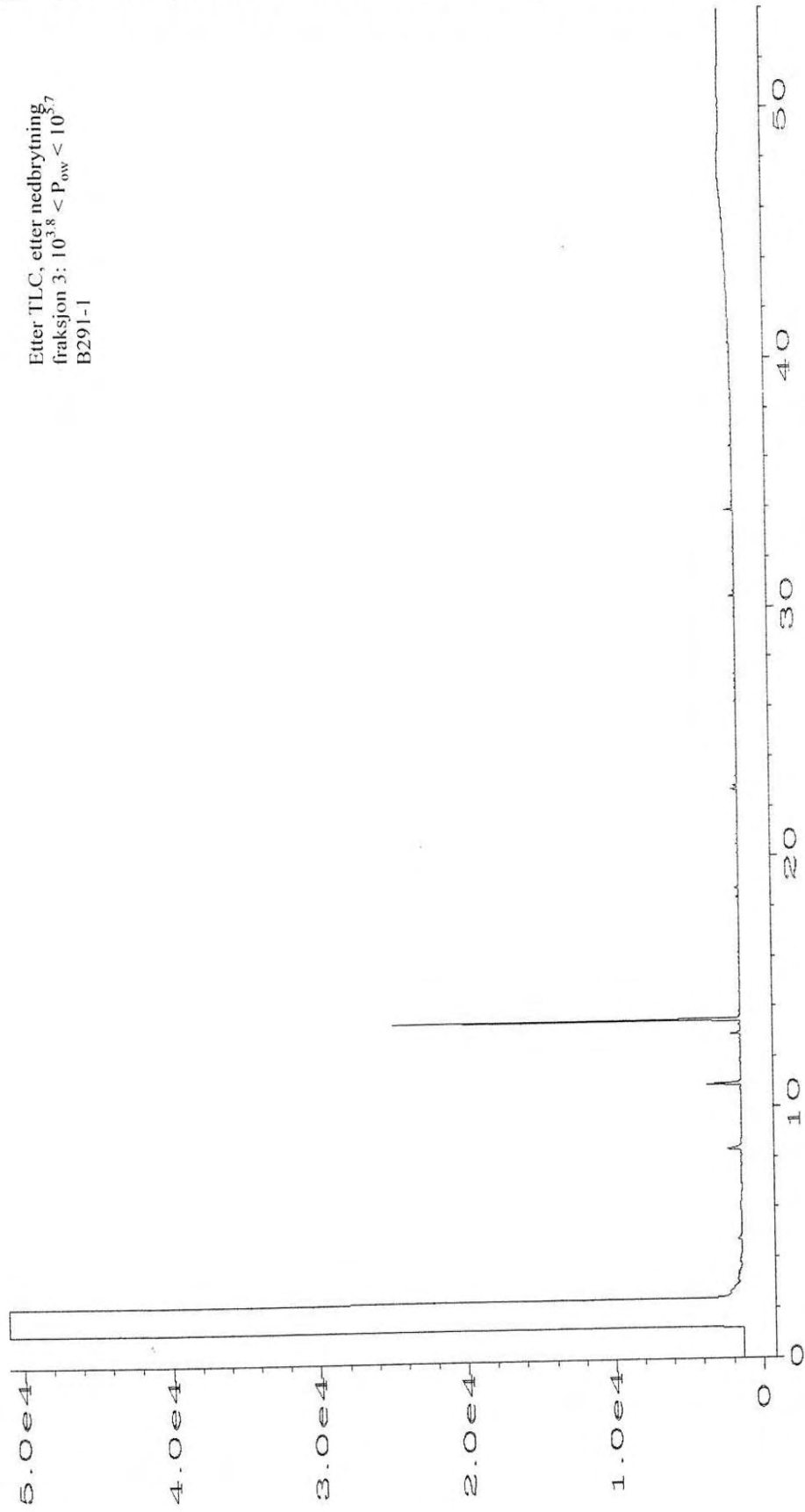
C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\023F0501.D

Etter TLC, etter nedbrytning
fraksjon 2: Pow > 10^{5.7}
B291-1

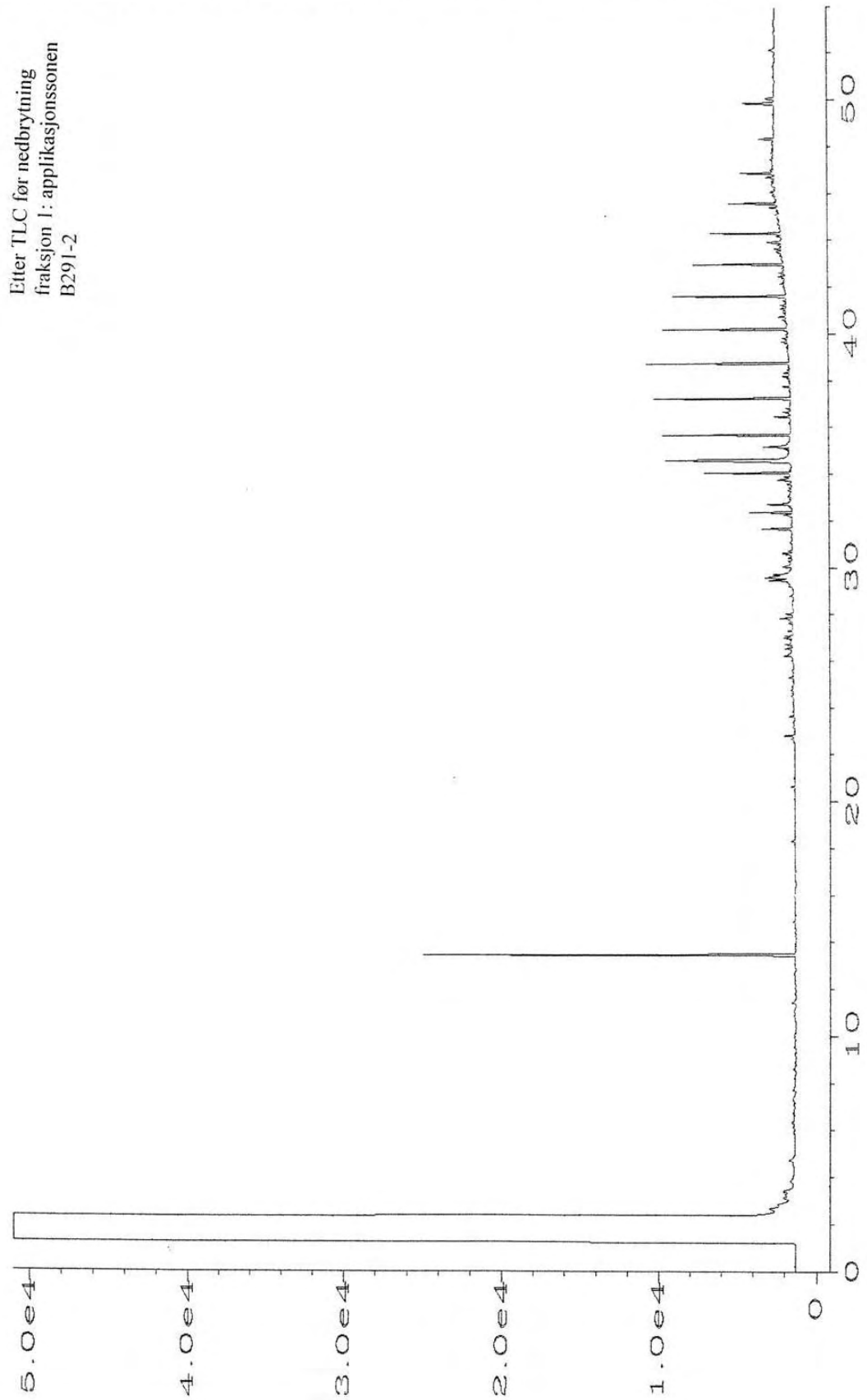


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\024F0501.D

Etter TLC, etter nedbrytning,
fraksjon 3: $10^{3.8} < P_{ow} < 10^{3.7}$
B291-1

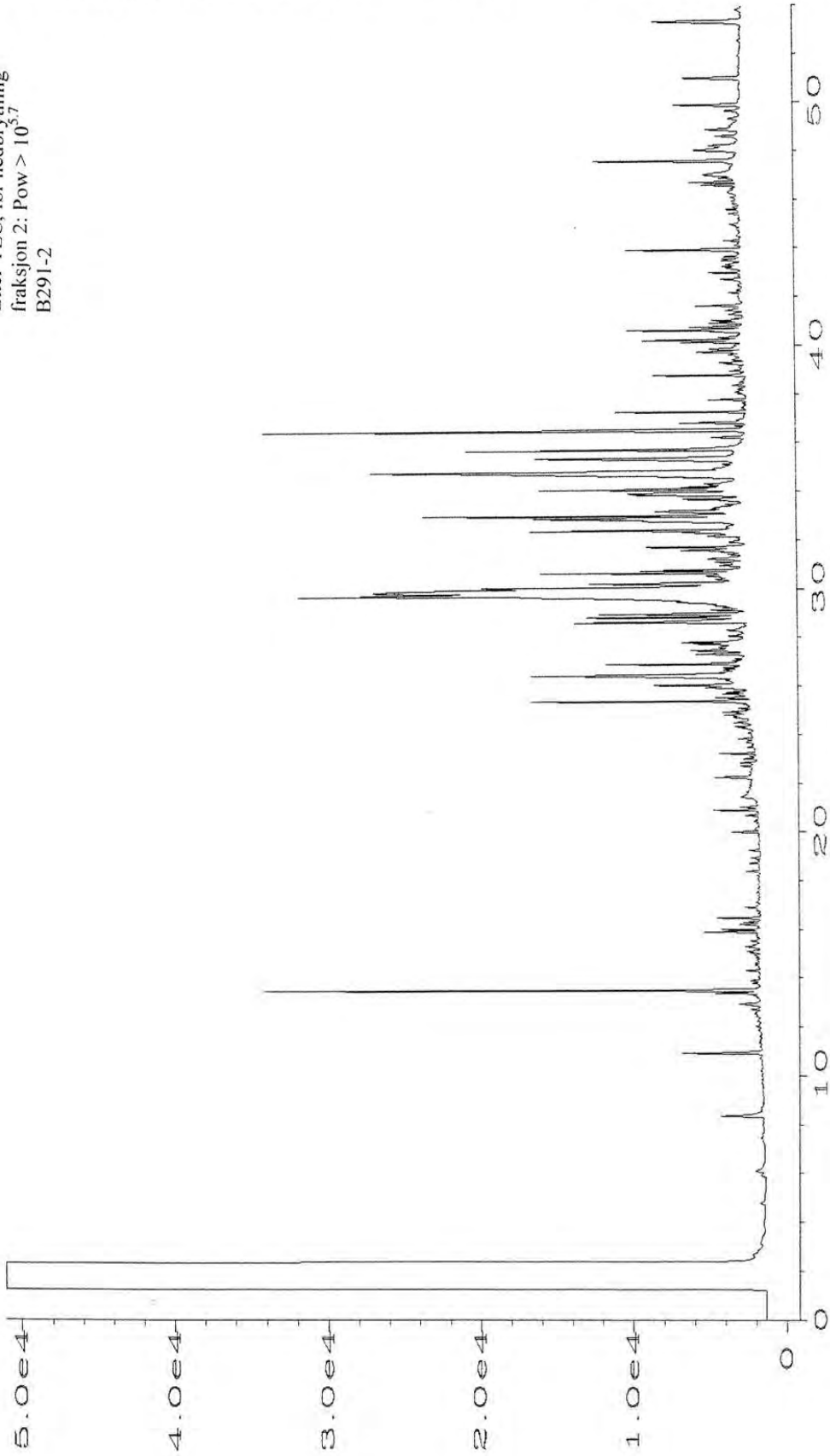


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\013F0501.D

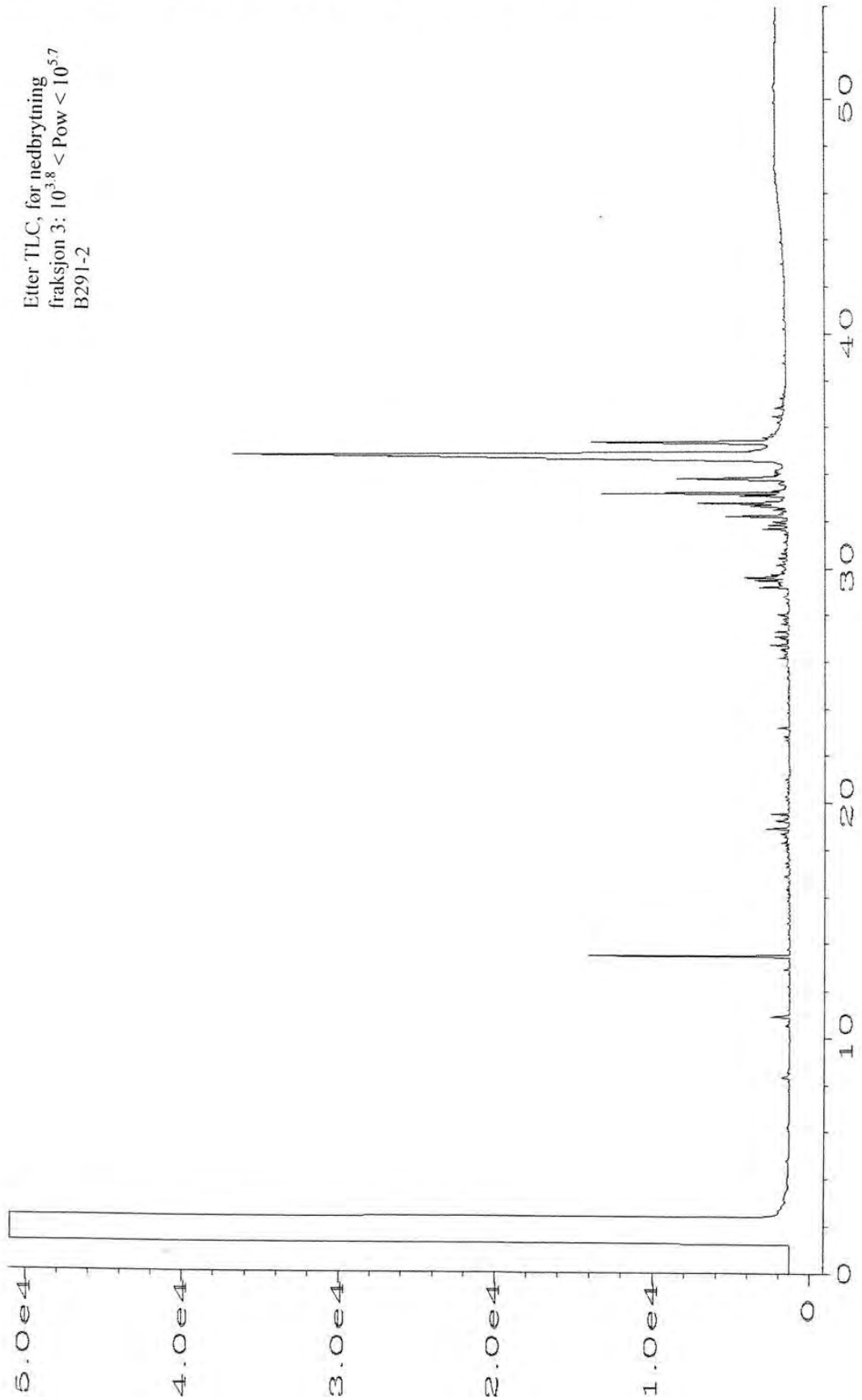


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\014F0501.D

Etter TLC, for nedbrytning
fraksjon 2: Pow > 10^{5.7}
B291-2

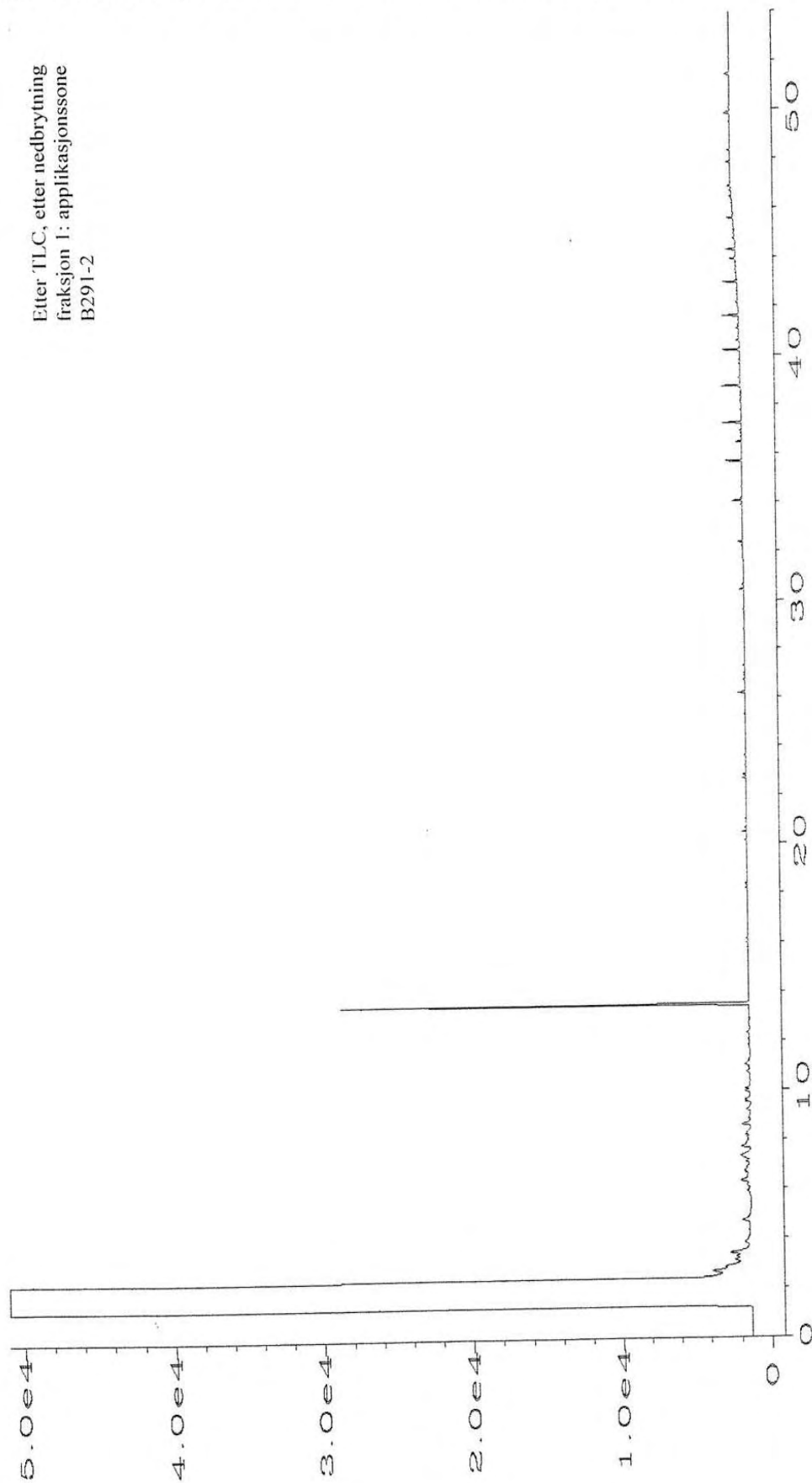


C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\016F0501.D



C:\HPCHEM\2\DATA\971104T\026F0501.D

Etter TLC, etter nedbrytning
fraksjon 1: applikasjonsone
B291-2



Etter TLC, etter nedbrytning
fraksjon 2: $P_{ow} > 10^{5.7}$
B291-2

