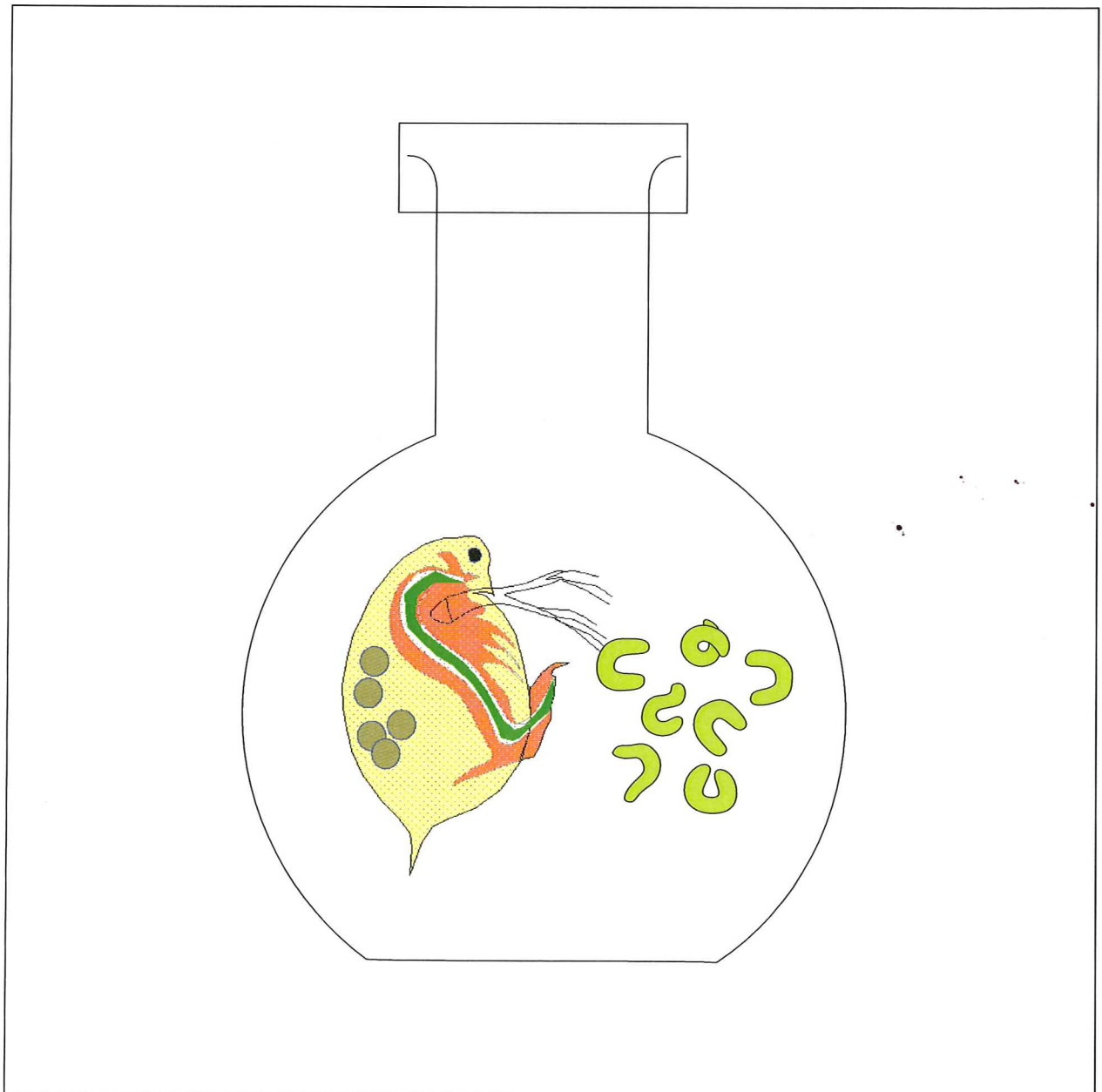


RAPPORT LNR 4224-2000

**Økotoxikologisk
undersøkelse av
prosessavløpsvann fra
Brødr. Sunde AS**



Hovedkontor

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

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 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 30 22 51

Akvaplan-niva

9296 Tromsø
Telefon (47) 77 75 03 00
Telefax (47) 77 75 03 01

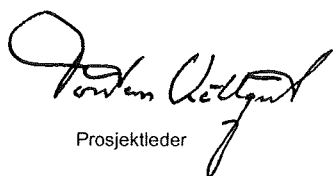
Tittel Økotoksikologisk undersøkelse av prosessavløpsvann fra Brødr. Sunde AS	Løpenr. (for bestilling) 4224-2000	Dato 18.04.2000
	Prosjektnr. Undernr. O-20066	Sider Pris 36
Forfatter(e) Torsten Källqvist	Fagområde Økotoksikologi	Distribusjon
	Geografisk område Møre og Romsdal	Trykket NIVA


Oppdragsgiver(e) Brødr. Sunde AS	Oppdragsreferanse
-------------------------------------	-------------------

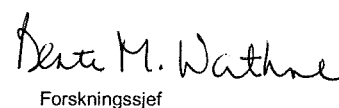
Sammendrag

Prosessavløpsvann fra produksjon av polystyren ved Brødr. Sunde AS i Spjelkavik er blitt undersøkt mht. toksiske effekter på alger og dafnier, samt innhold av potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser. Toksitetestene med grønnalgen *Selenastrum capricornutum* viste at veksten ble hemmet ved konsentrasjoner over ca. 3.2%. EC₅₀-verdien var ved 9.2% avløpsvann. Vannloppen *Daphnia magna* var mindre følsom med EC₅₀-verdi ved 41% avløpsvann. Innholdet av potensielt bioakkumulerbare forbindelser ble undersøkt ved tynnsjikt-kromatografering og gasskromatografi. Det ble påvist ca. 1 mg/l stoff med log P_{ow}>3.8. Det ble konstatert at den potensielt bioakkumulerbare fraksjonen inneholdt bromerte forbindelser, trolig hexabromcyklododecan som brukes som flammehemmer ved produksjonen av polystyren. Sammenligning mellom filtrert og ufiltrert prøve viste at de bromerte og bioakkumulerbare organiske forbindelsene var knyttet til den partikulære fraksjonen av avløpsvannet.

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Industriavløpsvann 2. Toksisitet 3. Bioakkumulerbarhet 4. Brom 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Industrial wastewater 2. Toxicity 3. Bioaccumulation 4. Bromine
---	--


Prosjektleder


Forskningsleder
ISBN 82-577-3846-8


Forskningsjef

**Økotoksikologisk undersøkelse av
prosessavløpsvann fra Brødr. Sunde AS**

Forord

En kjemisk karakterisering av prosessavløpsvannet fra Brødr. Sunde AS ble foretatt i 1999. Analysene viste et innhold av 2.9 mg/l organiske bromforbindelser som stammer fra tilsatskjemikalier i produksjonen av ekspanderbar polystyren. For å få fastslått om avløpsvannet, som følge av persistente organiske bromforbindelser er giftig med tanke på helse-og miljørisiko, medfør skade på renseanlegg eller om de gjør slammet uegnet til forskjellig bruk, har Statens Forurensningstilsyn (SFT) pålagt bedriften å gjennomføre en toksisitetstest og bioakkumulerbarhetstest av avløpsvannet. Brødr. Sunde henvendte seg i januar 2000 til NIVA for å få utført en slik undersøkelse. En prøve av prosessavløpsvannet (J. nr. 14/129) ble mottatt NIVA 17.02.2000 og undersøkelsen ble gjennomført i løpet av februar-mars 2000.

Ved NIVA har Åse Gudmunsen Rogne og Torgunn Sætre utført analyser av bioakkumulerbare forbindelser, Randi Romstad og Torsten Källqvist har gjort toksisitetstester med hhv. *Daphnia* og alger.

Oslo, 18.04. 2000

Torsten Källqvist

Innhold

Sammendrag	5
Summary	6
1. Program for undersøkelsen	7
1.1 Økotoksikologisk karakterisering	7
1.1.1 Toksisitetstester	7
1.1.2 Bioakkumulerbarhet	8
2. Resultat	8
2.1 Toksisitetstester	8
2.2 Bioakkumuleringspotensiale	9
3. Kommentarer	10
4. Referanser	11
Vedlegg A.	12
Vedlegg B.	19

Sammendrag

Avløpsvann fra produksjon av polystyren (Sunpor SE) ved Brødr. Sunde AS i Spjelkavik er blitt undersøkt mht. toksisitet og innhold av potensielt bioakkumulerbare organiske stoffer. Toksiske effekter ble undersøkt med alger (*Selenastrum capricornutum*) og vannlopper (*Daphnia magna*). Avløpsvannet hadde hemmende virkning på veksten av *Selenastrum capricornutum* ved konsentrasjoner over 3.2% konsentrasjon. EC₅₀-verdien (den konsentrasjon som gir 50% reduksjon av veksthastigheten sammenlignet med kontrollen) ble beregnet til 9.2% konsentrasjon. *Daphnia magna* var mindre følsom med en EC₅₀-verdi for immobilisering etter 48 timers eksponering ved konsentrasjonen 41%.

Den relativt høye giftigheten for alger (sammenlignet med *Daphnia*) kan ha sammenheng med innholdet av bromerte forbindelser. Fra tidligere undersøkelser er det kjent at hexabromcyclododecan (HBCD) som brukes som flammehemmer ved produksjonen av polystyren er giftig for alger (EC₅₀-verdi ca. 10 µg/l for den marine kiselalgen *Skeletonema costatum*).

Innholdet av potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser i avløpsvannet ble undersøkt ved ekstraksjon med heksan og fraksjonering av ekstraktet med tynnsjikt-kromatografi (TLC). Fra tynnsjikt-platen ble fraksjoner med ulik lipofilitet separert for kvantifisering med gasskromatografi (GC). Det organiske ekstraktet inneholdt 2.9 mg/l. Av dette ble ca. 1 mg/l gjenfunnet i fraksjonene med log P_{ow}>3.8. Disse forbindelsene regnes som potensielt bioakkumulerbare. På grunn av utfelling i oppkonsentrering av ekstrakter kan konsentrasjonene av organisk stoff ha vært enda høyere.

Det organiske ekstraktet inneholdt 640 µg/l brom og av dette ble 54 µg/l gjenfunnet i fraksjonen med log P_{ow} mellom 3.8 og 5.7. En parallell test med en løsning av HBCD viste at denne forbindelsen også endte opp i fraksjonen med log P_{ow} mellom 3.8 og 5.7.

En sammenligning av analyser av filtrert og ufiltrert prøve viste at de potensielt bioakkumulerende og bromerte organiske forbindelsene var knyttet til den partikulære fasen i avløpsvannet. Observasjonen indikerer at bedre separasjon av partikler fra avløpsvannet er en egnet metode for å redusere utslippet av disse stoffene.

Summary

Title: Ecotoxicological investigation of waste water from Brødr. Sunde AS

Year: 2000

Author: Torsten Källqvist

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3846-8

Wastewater from production of expandable polystyrene at Brødr. Sunde AS in western Norway has been investigated. A previous investigation showed that the wastewater contained 2.9 mg/l of bromated organic compounds, stemming from the use of bromated flame retardants in the production of polystyrene.

A sample of the wastewater was tested for toxicity on the alga *Selenastrum capricornutum* and the crustacean *Daphnia magna*. The growth of *Selenastrum capricornutum* was reduced at concentrations of the wastewater above 3.2% and the EC₅₀-value for inhibition of growth rate was at 9.2% concentration. The *Daphnia* were less affected with an EC₅₀ for immobilisation at 41% concentration.

The content of potentially bioaccumulative compounds was investigated by extraction of organic compounds with heksane. The extract was fractionated with Thin Layer Chromatography (TLC). From the TLC-plate, fractions with different log P_{ow}-ranges were taken for gass chromatography analysis (GC) and analysis of bromine. The analyses showed that the wastewater contained at least 1 mg/l of organic compounds with log P_{ow} >3.8. The fraction with log P_{ow} between 3.8 and 5.7 contained 54 µg/l total bromine. Comparison between filtered and unfiltered samples showed that most of the potentially bioaccumulative and bromated compounds were associated with the particulate phase of the wastewater.

1. Program for undersøkelsen

Prøvetakingen ble gjennomført av bedriften etter retningslinjer avtalt med SFT. En prøve av prosessavløpsvannet ble tatt ut som blandprøve i løpet av ett døgn. Prøven ble tatt ut i tidsrommet 14.02.2000 kl. 09:30 til 15.02.2000 kl. 10:30. En slangepumpe ble aktivert 15 min. hver time for å få en representativ døgnprøve, som ble samlet i en 10 l glassflaske. Prøven, merket 14/129 ble mottatt på NIVA 17.02.2000. Vannprøven hadde et høyt innhold av partikulært materiale i form av et hvitt bunnfald. Mengden suspendert tørrstoff ble bestemt til 486 mg/l. pH-verdien var ca. 4.6. Delprøver til analyse av bioakkumuleringspotensiale ble tatt ut og frosset ned. Prøver til toksisitetstester ble oppbevart i kjølerom inntil testene ble gjennomført.

1.1 Økotoksikologisk karakterisering

Økotoksikologisk karakterisering av industriavløpsvann blir utført for å finne ut om de inneholder komponenter som kan ha miljøskadelige effekter. Avgjørende egenskaper i denne forbindelse er giftighet eller toksisitet, nedbrytbarhet og bioakkumuleringspotensial. Biologiske tester er utviklet for å undersøke disse egenskaper hos kjemikalier og sammensatte avløpsvann (Se f. eks. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 1981).

Ved karakterisering av avløpsvann er det vanlig å kombinere biologiske tester med en kjemisk karakterisering. Omfanget av test-og analyseprogrammet må vurderes i hvert enkelt tilfelle og er avhengig av type industri, utslippets størrelse og resipientforhold. I dette tilfelle er karakteriseringen begrenset til en undersøkelse av toksisitet og innhold av potensielt bioakkumulerende organiske forbindelser.

1.1.1 Toksisitetstester

Avløpsvannenes toksisitet ble undersøkt med to ulike testorganismer; alger og krepsdyr (dafnier). Testmetodene er de samme som blir brukt til klassifisering/merking av kjemikalier m.h.t. miljøfarlighet, og gir et grovt mål på stoffers generelle giftighet for vannlevende organismer.

Toksisitetstestene utføres ved at testorganismene eksponeres for en konsentrasjonsserie av teststoffet (en kjemikalie eller et avløpsvann) fortynnet i et kontrollvann. Testorganismenes respons (f. eks. vekst eller dødelighet) blir så målt over en viss tid. Resultatene kan tegnes opp i et konsentrasjon/responsdiagram, som viser hvordan gifteffekten endres med konsentrasjonen av teststoffet. Fra responsdiagrammet kan den konsentrasjon som gir 50% effekt på den målte responsen avleses. Denne konsentrasjon betegnes LC_{50} , hvis den målte respons er dødelighet (letalitet) eller EC_{50} , hvis andre responser enn dødelighet, s.k. subletale responser blir undersøkt (f. eks. vekst). EC står her for "effect concentration".

Analogt med LC_{50} og EC_{50} representerer LC_{10} og EC_{10} de konsentrasjoner som gir 10% dødelighet eller effekt på testorganismene.

Toksisitetstesten med ferskvannsalger ble utført i henhold til OECD Guideline 201 og ISO/DIS 8692 "Algal growth inhibition test", med *Selenastrum capricornutum* som testorganisme. Avløpsvannet ble dekantert for å unngå interferens av partikkelinnhold med algenes vekst og ved telling av alger. pH-verdien ble justert til ca. 8.0. En konsentrasjonsserie av prøven i et algevekstmedium ble podet med aktivt voksende testalger fra en stamkultur og inkubert ved ca. 20 °C på et gyngebord med kontinuerlig belysning (ca. $70 \mu E m^{-2} s^{-1}$).

Veksten i kulturene ble fulgt ved telling av algeceller etter 24, 48 og 72 timer med hjelp av en elektronisk partikkelteller (Coulter Multisizer). På grunn av interferens av partikler ved telling av

alger ble det også gjort målinger av algenes in-vivo fluorescens med en Cytofluor 2300. 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 var mindre enn 24 timer gamle ble eksponert i en fortyningsserie av avløpsvannet. Det ble benyttet tre enheter med ca. 40 ml volum med 6-8 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.

1.1.2 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 kjemikaliet i fiskekjøttet undersøkes ved analyser. P.g.a. at bioakkumulerbarheten av organiske stoffer mest avhenger av stoffets fettløselighet (lipofilitet) har man imidlertid utviklet screening-metoder for undersøkelse av potensiell bioakkumulerbarhet, som er basert på undersøkelse av fasefordelingen mellom oktanol og vann (P_{ow}). P_{ow} -bestemmelse for rene kjemikalier blir som oftest utført med en kromatografisk metode (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 $P_{ow} > 1000$ ($\log P_{ow} > 3$).

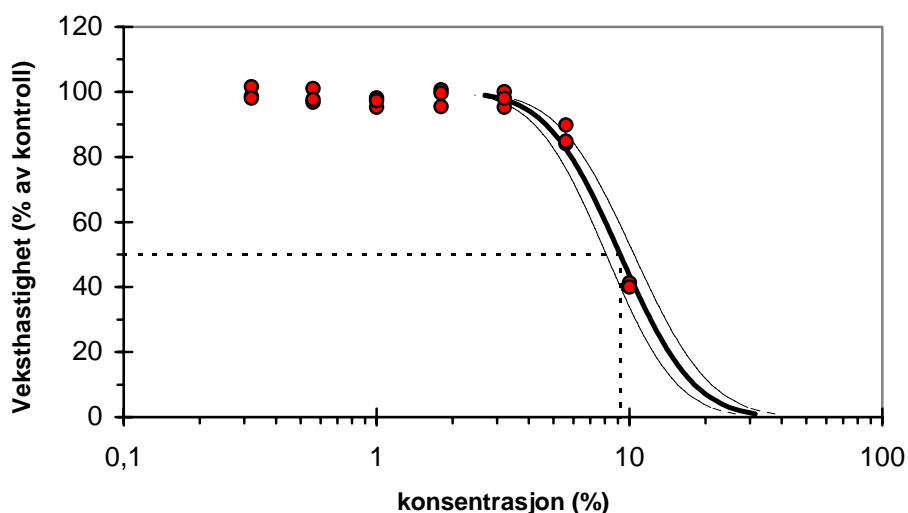
Bioakkumulerbarhetstesten ble utført med en tynnsjikt-kromatografisk metode. En delprøve av avløpsvannet ble ekstrahert med heksan. Heksanekstraktet ble satt av på en tynnsjiktplate for separering av komponenter med forskjellig lipofilitet. Fra tynnsjiktplate ble fraksjoner tilsvarende ulike P_{ow} -intervaller skrapet av for kvantifisering med GC/FID-analyse. P_{ow} -intervallene blir identifisert m.h.a. referenkestoff med kjente P_{ow} -verdier.

Analyse av potensielt bioakkumulerbare forbindelser ble utført på filtrert og ufiltrert prøve for å se hvorvidt forbindelsene var knyttet til den partikulære fraksjonen. Til filtrering ble det benyttet glassfiberfilter (Wathman GF/C).

2. Resultat

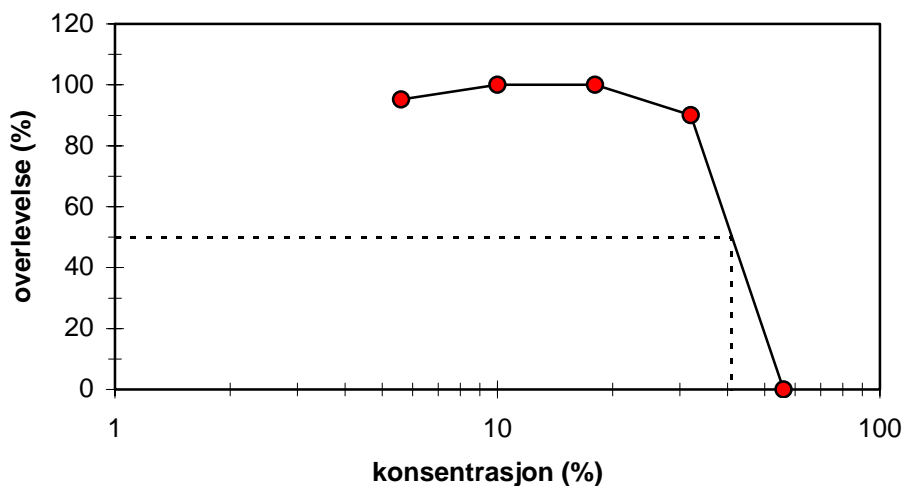
2.1 Toksisitetstester

Utførlige rapporter av testene med alger og *Daphnia* fins i vedlegg A. Toksisitetstesten med alger ble utført i konsentrasjoner opp til 10% avløpsvann. Det ble ikke påvist veksthemming opp til 3.2% konsentrasjon. Ved 5.6 og 10% ble det observert en markert hemming av algeveksten, særlig det første døgnet. I 10% var veksten redusert, men ikke helt inhibert gjennom hele testen (3 døgn). EC_{50} -verdien for effekt på algenes veksthastighet ble beregnet til 9.2% konsentrasjon. Konsentrasjon/responskurven er vist i **Figur 1**.



Figur 1. Effekt av prosessavløpsvann på veksthastigheten av algen *Selenastrum capricornutum*. Stiplet linje angir EC_{50} -verdien (9.2%).

Vannloppene (*Daphnia magna*) var mindre følsomme enn algene for avløpsvannet. Ved konsentrasjoner opp til 18% ble det ikke registrert dødelighet eller immobilisering av forsøksorganismene. Ved 32% konsentrasjon var 10% av dyrene immobilisert etter 48 timer og ved 56% var samtlige døde eller immobiliserte. EC_{50} -verdien for immobilisering av *Daphnia magna* etter 48 timers eksponering er beregnet til 41% konsentrasjon. Konsentrasjon/responskurven for *Daphnia*-testen er vist i **Figur 2**



Figur 2. Effekt av prosessavløpsvann på immobilisering av *Daphnia magna*. Stiplet linje angir EC_{50} -verdien (41 %).

2.2 Bioakkumuleringspotensiale

Testrappport fra analysene av potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser fins i vedlegg B. Innholdet av ekstraherbare organiske forbindelser var mye høyere i det ufiltrerte vannet enn i det filtrerte (se **Tabell 1**). Ved inndampingen av ekstraktet fra den ufiltrerte prøven ble det en utfelling

som måtte filtreres fra. Også i ekstraktet fra sone 3 på tynnsjiktspalten ($\log P_{ow}$ mellom 3.8 og 5.7) ble det en utfelling når prøven ble oppkonsentrert for GC analyse. Konsentrasjonene angitt i tabellen er derfor minimumsverdier når det gjelder den ufiltrerte prøve.

Tabell 1. Total mengde organisk stoff i heksan-ekstrakt fra avløpsvann og etter fraksjonering på tynnsjiktspalte i ulike intervaller av P_{ow}

Prøve	Kons. før TLC fraksjonering (mg/l)	Fraksjon 1 applikasjons-sone mg/l)	Fraksjon 2 $\log P_{ow} > 5.7$ (mg/l)	Fraksjon 3 $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$ (mg/l)	Fraksjon 4 $\log P_{ow} < 3.8$ (mg/l)
ufiltrert	2.89	0.89	0.22	0.79	0.05
filtrert	1.14	n.d*	0.02	0.3	0.02

- ikke påvist

En prøve av 1,2,5,6,9,10-hexabromcyclododecane som benyttes som flammehemmer i produksjonen av polystyren ble analysert parallellt med avløpsvannsprøvene. Ved tynnsjikt-kromatografering av denne komponenten ble den påvist i sone 3: $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$. Ut i fra retensjonstiden i GC-kromatogrammet ble den samme komponenten påvist i den ufiltrerte vannprøven. I den filtrerte vannprøven ble denne komponenten ikke påvist.

I analysene av brom i ekstraktene og i fraksjon 3 fra tynnsjikt-kromatograferingen ble det bare funnet brom i det ufiltrerte avløpsvannet. Konsentrasjonen var $640 \mu\text{g Br}$ i heksan-ekstraktet og $54 \mu\text{g/l}$ i fraksjon 3. (Alle konsentrasjonene er omregnet til konsentrasjoner i avløpsvannet).

3. Kommentarer

Resultatene av toksisitetstestene viser at avløpsvannet har en hemmende effekt på veksten av alger ved konsentrasjoner over ca. 3 %. Det betyr at det må fortynnes ca. 30 ganger for å fjerne gifteffekten. Forskjellen i giftighet overfor alger og dafnier tyder på at avløpsvannet inneholder stoffer som er spesielt giftige for alger. Det er kjent at hexabromcyclododecan (HBCD) har høy giftighet for noen alger. Walsh et al (1987) bestemte EC_{50} -verdien for effekt på den marine kiselagen *Skeletonema costatum* til ca. $10 \mu\text{g/l}$. Ut fra konsentrasjonen av brom i fraksjon 3 i TLC- testen, som er den fraksjon hvor HBCD ventes å havne, kan innholdet av HBCD i den ufiltrerte prøven ha vært ca. $75 \mu\text{g/l}$. Konsentrasjonen av HBCD ved EC_{50} -konsentrasjonen for alger (9.2%) blir således ca. $7 \mu\text{g/l}$. På grunn av problemene med utfelling ved oppkonsentrering av ekstrakter i bioakkumulerbarhetstesten er det mulig at noe av bromforbindelsene ikke har blitt kvantifisert, slik at det egentlige innholdet av HBCD kan ha vært høyere. Testen med alger ble imidlertid utført etter dekantering av avløpsvannet slik at mesteparten av det partikulære materialet var fjernet. Resultatene av bioakkumulerbarhetstesten tyder på at HBCD og andre bromerte forbindelser var knyttet til partikkefraksjonen. Dette bør ha bidratt til at konsentrasjonen av bromforbindelser i algetesten har vært lavere enn i det opprinnelige avløpsvannet. Sammenfatningsvis kan det ikke sikkert konkluderes at toksisiteten skyldes HBCD, men de beregnede konsentrasjonene ligger i et område som gjør det sannsynlig.

I en risikovurdering av HBCD utført i henhold til EU direktiv 1488/94, er den beregnede null-effekt-konsentrasjonen (PNEC) for ferskvannsmiljø $0.031 \mu\text{g/l}$. I dette dokumentet er det også rapportert forventet konsentrasjon av HBCD i avløpsvann fra produksjon av polystyren og ekspanderbar polystyren. Beregningen, som er utført med modellen USES, viser en forventet konsentrasjon på $7.4 \mu\text{g/l}$, som med antatt 10 gangers fortynning i resipienten gir en "predicted environmental concentration", $PEC = 0.74 \mu\text{g/l}$. Risikoanalysen viser at virksamheten medfører miljørisiko ($PEC/PNEC > 1$). Denne undersøkelsen, og de tidligere utførte analysene av organiske

bromforbindelser tyder på at konsentrasjonene i utslippet fra produksjonen av polystyren ved Brødr. Sunde er høyere enn de som er beregnet i EUs risikovurdering.

Bioakkumuleringstestene i filtrert og ufiltrert avløpsvann viste at de potensielt bioakkumulerbare stoffene var knyttet til den partikulære fasen. At disse stoffene kunne ekstraheres fra partiklene tyder på at de var adsorbent eller løst, og ikke fast bundet, i den partikulære fasen. Stoffene bør derfor kunne være tilgjengelige for akkumulering i organismer som kommer i kontakt med materialet. Innholdet av brom i den organiske fraksjonen viser at noe av de potensielt bioakkumulerbare stoffene er bromerte organiske forbindelser, og HBCD ble positivt påvist i GC-analysen av det ufiltrerte avløpsvannet.

Det bør påpekes at de påviste mengdene av potensielt bioakkumulerbare forbindelser (ca. 1 mg/l med $\log P_{ow} > 3.8$) er forholdsvis lave, men de ligger likevel over den grenseverdi for vurdering av begrensningstiltak på 0.5 mg/l, som praktiseres av det svenske Naturvårdsverket (1992). Med tanke på at de potensielt bioakkumulerbare stoffene i avløpsvannet er bromerte organiske stoffer som kan antas å være tungt nedbrytbare bør derfor konsekvensene av utslippet vurderes. I denne sammenhengen er det naturligvis viktig å ta hensyn til den totale mengden som blir sluppet ut og ikke bare konsentrasjonen i avløpsvannet.

At bromerte og potensielt bioakkumulerende organiske forbindelser til en stor del ble fjernet ved filtrering tyder på at en bedre separasjon av partikulært materiale fra avløpsstrømmen kan være en effektiv måte å redusere utslippet av disse stoffene.

4. Referanser

Naturvårdsverket 1992: Utslipp av stabila organiska ämnen från kemiindustrin. Rapport 4103.

Walsh, G.E., Yoder, M.J., McLaughlin, L.L. and Lores, E.M. 1987: Responses of marine unicellular algae to brominated organic compounds in six growth media. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol. 14, no. 3, pp. 215-222.

Vedlegg A.

Testerapporter – Toksisitetstester

Teststoff: Avløpsvann **Lab. kode:** B389/1
Kunde: Brødr. Sunde AS **Prøve mottatt:** 17.02.2000
Adresse: Postboks 8115, Spjelkavik 6022 Ålesund

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: 28.02.2000
Forbehandling av prøve: Avløpsvannet ble dekantert og tilsatt ISO 8692 vekstmedium
Konsentrasjoner: 0.18, 0.32, 0.56, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6 og 10 %
Tillaging av testløsninger: Avløpsvann fortynnet i testmedium, pH justert til ca. 8.0 og podet med testalger (5.5×10^6 celler l^{-1})
Test medium: ISO 8692
Inkuberingsutstyr: Gyngebord
Dyrkingsflasker: 100 ml ståkolber med 50 ml medium
Lys: ca. $75 \mu E m^2 s^{-1}$, kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur: 20.3 – 20.9 °C
pH i kontroll: Start: 8.0 Slutt: 8.2
pH i høyeste konsentrasjon: Start : 7.9 Slutt: 7.9
Vekstmåling: Partikkel telling 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. Middelveier for kontroller og ulike konsentrasjoner av avløpsvann er listet lengst ned på skjemaet. Vekstkurver for hver konsentrasjon av avløpsvannet 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	%	9.2	8.1 – 10.4	4.7	4.2 – 5.2	3.2

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

** NOEC = Høyeste testede konsentrasjon uten signifikant effekt

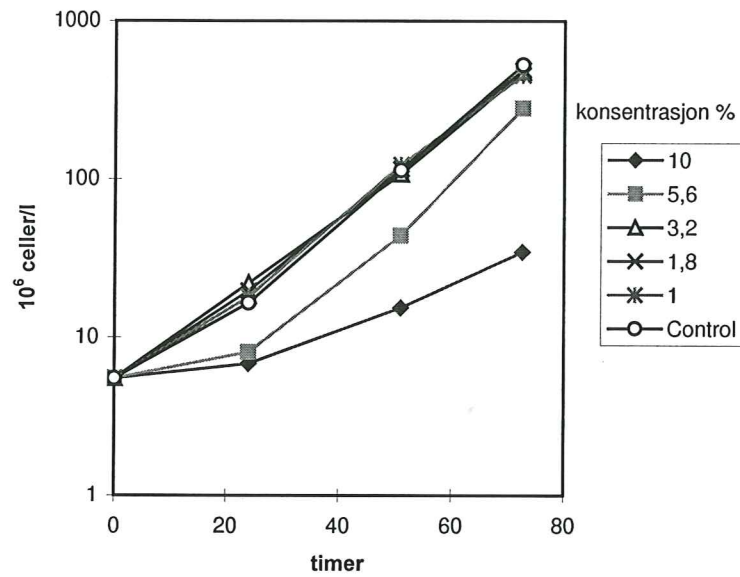


Fig. 1. Vekstkurver for *Selenastrum capricornutum* i ulike konsentrasjoner av avløpsvann fra Brødr. Sunde AS.

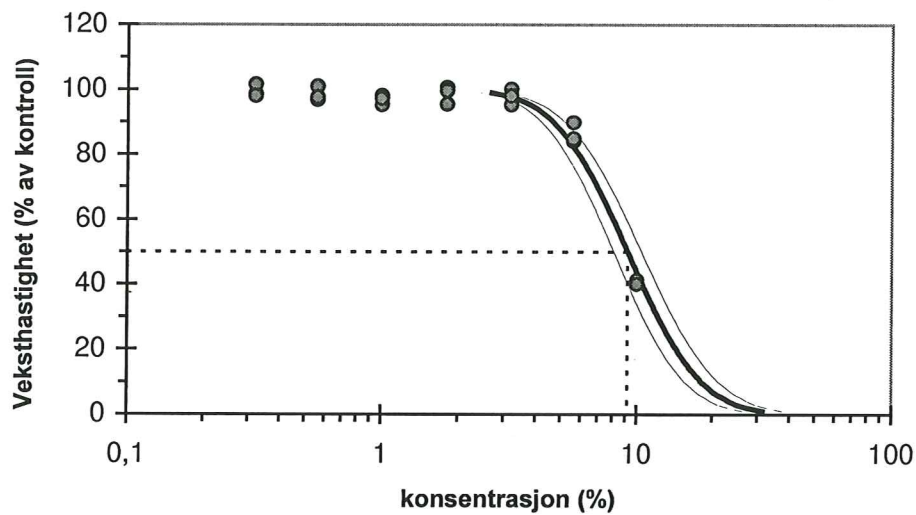
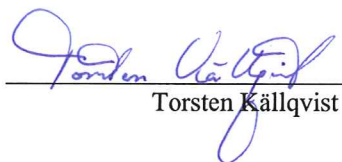


Fig. 2. Effekt av avløpsvann fra Brødr. Sunde AS på veksthastigheten til *Selenastrum capricornutum*.

Oslo 02.03.00

Utført av: Torsten Källqvist

Testansvarlig:



Torsten Källqvist

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.

TEST: ISO 8692

Dato: 28.2.00

TESTSTOFF: Avløpsvann, Brødr. Sunde AS

Lab. kode: B389/1

TESTALGE: *Selenastrum capricornutum*

Medium: ISO 8692

INOKULUM: 5,50 mill. celler/l

		Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast.%
Kons.	Timer: %	24 mill/l	51 mill/l	72,5 mill./l				
10	"	5,6	15	34	539	6	0,60	40
10	"	9,3	17	36	704	8	0,62	41
10	"	5,6	14	34	515	6	0,60	40
5,6	"	6,5	47	328	4499	53	1,35	90
5,6	"	8,4	41	253	3595	42	1,27	84
5,6	"	9,3	44	262	3788	45	1,28	85
3,2	"	23	112	523	8592	101	1,51	100
3,2	"	22	92	420	6974	82	1,44	95
3,2	"	21	118	477	8192	96	1,48	98
1,8	"	22	130	536	9143	107	1,52	101
1,8	"	15	84	424	6645	78	1,44	95
1,8	"	22	132	511	8923	105	1,50	100
1	"	18	113	479	8016	94	1,48	98
1	"	14	91	421	6757	79	1,44	95
1	"	22	165	460	9175	108	1,47	97
0,56	"	14	85	450	6923	81	1,46	97
0,56	"	22	123	546	9081	107	1,52	101
0,56	"	18	117	468	7995	94	1,47	98
0,32	"	13	92	490	7497	88	1,49	99
0,32	"	21	148	562	9833	116	1,53	102
0,32	"	16	97	478	7566	89	1,48	98
Kontroll		17,0	132	554	9257	109	1,53	101
		13,0	74	439	6513	77	1,45	96
		17,0	99	445	7285	86	1,45	97
		21,0	164	657	11243	132	1,58	105
		16,0	118	588	9258	109	1,55	103
		15,0	94	479	7479	88	1,48	98

MIDDELVERDIER

%

10,00 Mv:	6,83	15,33	34,67	586	6,89	0,61	40,44
St. d.	1,74	1,25	0,94	84	0,98	0,01	0,59
5,60 Mv:	8,07	44,00	281,00	3961	46,57	1,30	86,28
St. d.	1,17	2,45	33,44	388	4,57	0,04	2,53
3,20 Mv:	22,00	107,33	473,33	7919	93,11	1,47	97,80
St. d.	0,82	11,12	42,13	688	8,09	0,03	1,98
1,80 Mv:	19,67	115,33	490,33	8237	96,84	1,48	98,55
St. d.	3,30	22,17	48,00	1129	13,28	0,03	2,22
1,00 Mv:	18,00	123,00	453,33	7982	93,85	1,46	96,91
St. d.	3,27	31,03	24,14	987	11,61	0,02	1,18
0,56 Mv:	18,00	108,33	488,00	7999	94,05	1,48	98,48
St. d.	3,27	16,68	41,67	881	10,36	0,03	1,83
0,32 Mv:	16,67	112,33	510,00	8299	97,57	1,50	99,47
St. d.	3,30	25,30	37,09	1085	12,76	0,02	1,56
Control Mv:	16,50	113,50	527,00	8506	100,00	1,51	100,00
St. d.	2,43	29,05	79,71	1588	18,67	0,05	3,28
Variasjonskoeffisient i kontroller (%):				18,67		3,28	

TEST: ISO 8692

Dato: 36584

TESTSTOFF: Avløpsvann, Brødr. Sunde AS

Lab. kode: B389/1

TESTALGE: Selenastrum capricornutum

Medium: ISO 8692

INOKULUM: 5,5 mill. celler/l

Kons.	Timer: %	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Areal	Areal%	V.hast.	V.hast.%
		24 mill/l	51 mill/l	72,5 mill./l				
0,18	"	24	171	587	10736	126	1,55	103
0,18	"	17	93	469	7398	87	1,47	98
0,18	"	16	97	592	8792	103	1,55	103
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
"	"							
Kontroll		17	132	554	9257	109	1,53	101
		13	74	439	6513	77	1,45	96
		17	99	445	7285	86	1,45	97
		21	164	657	11243	132	1,58	105
		16	118	588	9258	109	1,55	103
		15	94	479	7479	88	1,48	98

MIDDELVERDIER

%

0,18 Mv:	19,00	120,33	549,33	8975	105,52	1,52	101,03
St. d.	3,56	35,86	56,84	1369	16,10	0,04	2,37
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.	16,50	113,50	527,00	8506	100,00	1,51	100,00
St. d.	2,43	29,05	79,71	1588	18,67	0,05	3,28
Variasjonskoeffisient i kontroller (%):				18,67		3,28	

TESTRAPPORT

Norsk
Institutt
for
Vannforskning

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

Akutt toksisitet
Daphnia magna
NIVA metode K9



Teststoff: Prosessavløpsvann
Kunde: Brødrene Sunde AS
Adresse: Postboks 8115 Spjelkavik
6022 ÅLESUND

Lab. kode: B389/1
Prøve mottatt: 17.02.00

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 nærings saltløsning. Alder ved teststart < 24 timer.

Testperiode 18.02 – 20.02.2000

Forbehandling av prøve pH justert med 10M NaOH

Fortynningsmedium ISO

Testkonsentrasjoner 5,6, 10, 18, 32, 56 %

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 – 20.6°C

pH i kontroll Start: 7.8 Slutt: 7.7

pH i høyeste kons. Start: 7.8 Slutt: 7.3

Oksygenmetning, 48 t Kontroll: 8.58 ppm 56%: 6.81 ppm

Beregning av EC₅₀ * 24 timer: Probit-analyse (SNV-probit), 48 timer: manuell beregning

Referankestoff: Kaliumdikromat: 24t EC₅₀ = 1.38 mg/l

Resultater:

Parameter	Enhet	24 timer			48 timer		
		EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀	EC ₅₀	95% konf. int.	EC ₁₀
Immobilisering	%	49	34 - 111	28	41	-	32

*EC₅₀ = Den konsentrasjon som gir 50% immobilisering av forsøksdyrene.

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

Konsentrasjon	Antall dyr	Immobiliserte 24 tim.	Immobiliserte 48 tim.
5.6 %	21	1	1
10 %	20	0	0
18 %	20	0	0
32 %	20	2	2
56 %	20	14	20
Kontroll	20	0	0

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

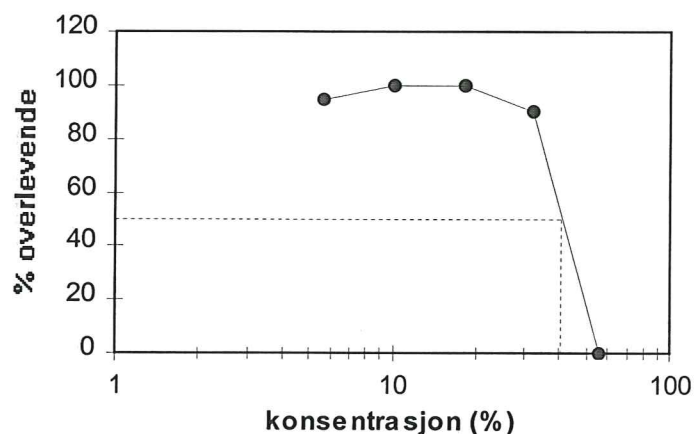


Fig. 1. Effekt av prosessavløpsvann på overlevelse av *Daphnia magna* etter 48 timer.

Oslo, 21.02.00

Utført av: Randi Romstad Testansvarlig:


Torsten Kälfqvist

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., *Hydrobiol.*, 23, 82-198.

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

Vedlegg B.

Testrapport - Bioakkumuleringspotensial

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

Test komponent: Avløpsvann
Oppdragsgiver Brødrene Sunde as
Adresse

Lab kode: B 389/1
Prøve mottatt: 170200
Test periode mars 00

Bestemmelse av potensielt bioakkumulerbart materiale i vannprøve før og etter filtrering

Potensielt bioakkumulerbart materiale skulle bestemmes i en vannprøve før og etter filtrering i et surt ekstrakt (tynnsjiktskromatografi og fingerprint på gaskromatograf med flamme ionisasjonsdetektor).

Analysemetode:

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

Prøve B389-1 før filtrering:

Prøven før filtrering er testet ufortynnet.

I prøven før filtrering viser GC-kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 1.11 mg/l for $\log P_{OW} > 5.7$ (fraksjon 1 + fraksjon 2) og 0.79 mg/l for $3.8 < \log P_{OW} < 5.7$ (fraksjon 3).

Prøve B389-1 etter filtrering:

Prøven etter filtrering er testet ufortynnet.

I prøven etter filtrering viser GC kromatogrammene komponenter i det bioakkumulerbare området beregnet til 0.02 mg/l for $\log P_{OW} > 5.7$ (fraksjon 1 + fraksjon 2) og 0.30 mg/l for $3.8 < \log P_{OW} < 5.7$ (fraksjon 3).

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, $3.8 < \log P_{ow} < 5.7$ (mg/l)	Kons i fraksjon 4 $\log Pow < 3.8$ (mg/l)
Prøve før filtrering	2.89	0.89	0.22	0.79	0.05
Prøve etter filtrering	1.14	n.d.*	0.02	0.30	0.02

* ikke påvist

I vannprøven var det mye partikler. Ved å teste avløpsvannet både før og etter filtrering, var det mulig å danne seg et bilde over hvor mye potensielt bioakkumulerbart materiale som var bundet til partiklene og hvor mye som var løst i vannet. Resultatene viser at en betydelig del av det potensielt bioakkumulerbare materialet var bundet til partiklene. Ved inndamping av ekstraktet fra den ufiltrerte prøven, ble det en utfelling. Denne utfellingen ble filtrert fra ekstraktet før tynnsjiktskromatografi og GC kromatografi. Det var derfor mer materiale som lot seg ekstrahere ut av vannprøvene enn det som er gitt uttrykk for i resultatene. I ekstraktet fra sone 3 ble det også en utfelling når prøven ble oppkonsentrert før GC analyse. Denne utfellingen ble filtrert fra.

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

Test komponent: Avløpsvann
Oppdragsgiver: Brødrene Sunde as
Adresse:

Lab. Kode: B 389-1
Mottatt: 170200
Test periode: mars 00

I tillegg til vannprøvene ble det også analysert 1,2,5,6,9,10-hexabromcylcododecane, som det er opplyst at det blir benyttet i produksjonen. Ved tynnsjikt-kromatografering av denne komponenten, ble den påvist i sone 3; $3.8 < \log P_{OW} < 5.7$. Det vil si at stoffet er potensielt bioakkumulerbart. Ut i fra retensjonstiden i GC kromatogrammet ble den samme komponenten påvist i den ufiltrerte vannprøven. I den filtrerte vannprøven var det imidlertid ikke mulig å påvise denne komponenten ved bruk av GC med flammeionisasjonsdetektor. Det indikerer at 1,2,5,6,9,10-hexabromcyclo-dodecane sitter knyttet til partiklene i avløpsvannet.

I den ufiltrerte prøven ble det ekstrahert ut mye mer materiale enn i den filtrerte prøven. Dette indikerer av mye av komponentene i avløpsvannet sitter bundet til partiklene.

Ekstraktene både av filtrert og ufiltrert prøve før tynnsjikt-kromatografi og ekstraktene av avskrapene fra sone 3 ble analysert med nøytronaktivering for bestemmelse av Br.

Prøve merket	Br $\mu\text{g/l}$
389-1 ufiltrert før TLC	640
389-1 ufiltrert sone 3	54
389-1 filtrert før TLC	<1
389-1 filtrert sone 3	<0.1

Disse resultatene viser også at Br følger partiklene i vannet. Den store forskjellen i nivået på ufiltrert prøve før TLC og ufiltrert prøve, sone 3 kommer tildels fra at det ble utfelling i ekstraktet fra tynnsjikt-platen som ble filtrert fra før prøvene ble analysert på GC. Det var det samme ekstraktet som ble sendt til nøytronaktivering for bestemmelse av Br. Det er også et tap i forbindelse med ekstraksjonen fra tynnsjikt-platene.

NIVA 030400


Torgunn Sætre

Vedlegg

METODE FOR BESTEMMELSE AV POTENSIELT BIOAKKUMULERBARE SUBSTANSER.

pH på vannprøven ble justert til ca 2 med 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:

I Fraksjon: Applikasjons sone
II Fraksjon: $P_{ow} > 10^{5.7}$
III Fraksjon: $10^{3.8} < P_{ow} < 10^{5.7}$
IV Fraksjon: $P_{ow} < 10^{3.8}$

Lipofile eller potensielt bioakkumulerbare organiske forbindelser ble bestemt ved tynnsjiktskromatografi av et surt heksan ekstrakt av en vannprøve. Substanser med en fordelingskoeffisient oktanol/vann $> 10^3$ blir regnet som potensielt bioakkumulerbare. Fraksjonene ble skrapet av tynnsjiktspalten, tilsatt indre standard og ekstrahert med heksan 2 ganger. Hvert av ekstraktene ble analysert med gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor, GC/FID. Arealet til de enkelte toppene ble relatert til en standard, som ga et mål for mengden organiske kromatograferbare forbindelser. Med kromatograferbare forbindelser menes i dette tilfellet organiske substanser med en molekylvekt opp til ca 500, som kan analyseres gasskromatografisk uten noen form for videre opparbeiding. Ved beregning ble det antatt at de detekterte forbindelsene har samme respons som standarden. Dette er en grov tilnærming, da erfaring har viset at responsen på en FID detektor for ulike organiske forbindelser kan variere med opptil 50 %. Dette betyr at metoden må betraktes som semi kvantitativ. Ved avskraping av tynnsjiktspaltene og ekstraksjon av avskrapet, vil ekstraksjonsutbyttet av de enkelte komponentene variere avhengig av hvor godt de sitter på tynnsjiktspalten. Blindprøve er kjørt parallelt med prøvene.

Testbetingelser ved GC analysen:

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

Program:

Starttemp. 60 °C, henstand 2 min

Oppvarmingshastighet 5 °C/min

Sluttemp. 280 °C, henstand 8 min.

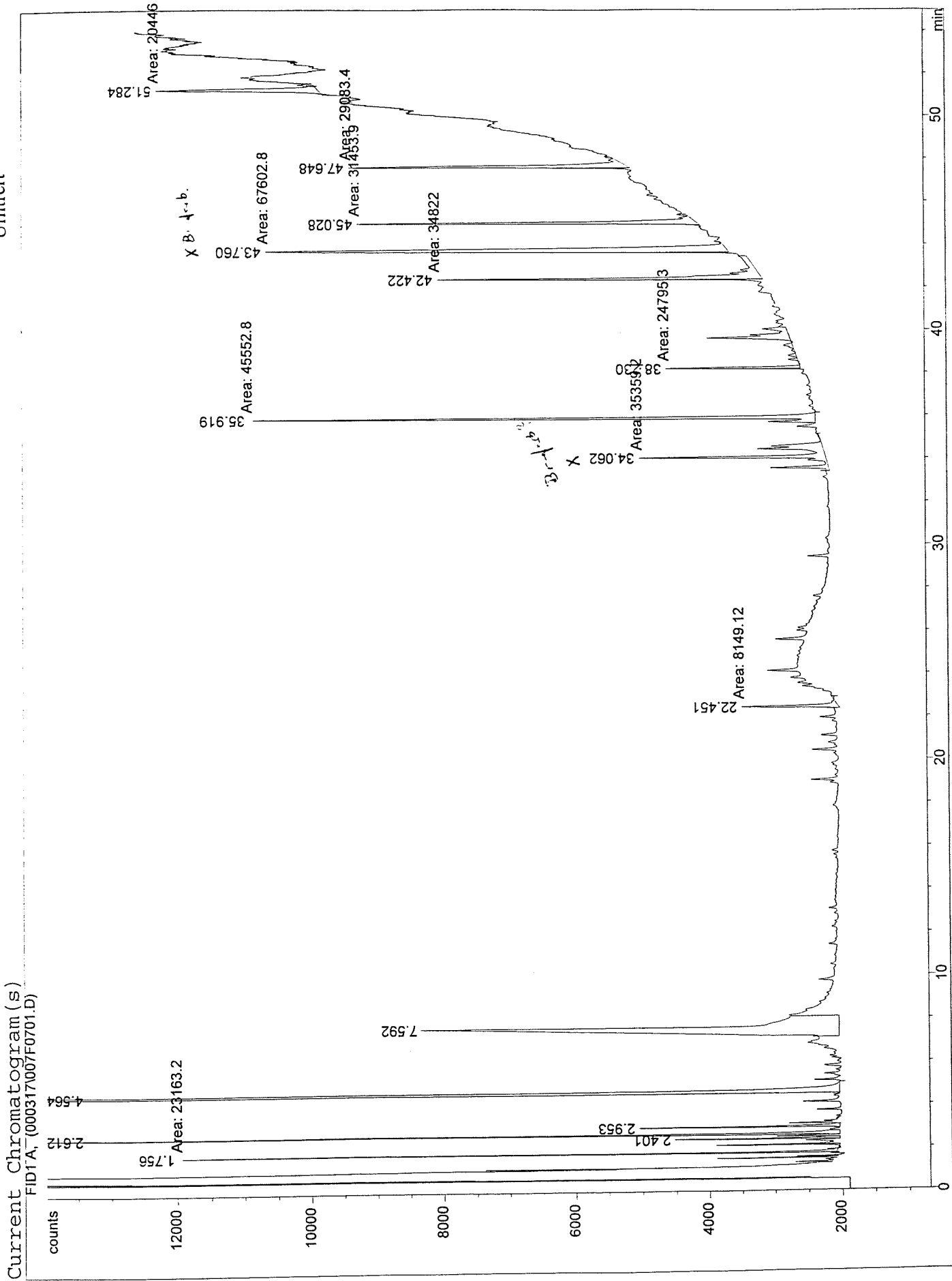
Injektor temperatur: 260 °C

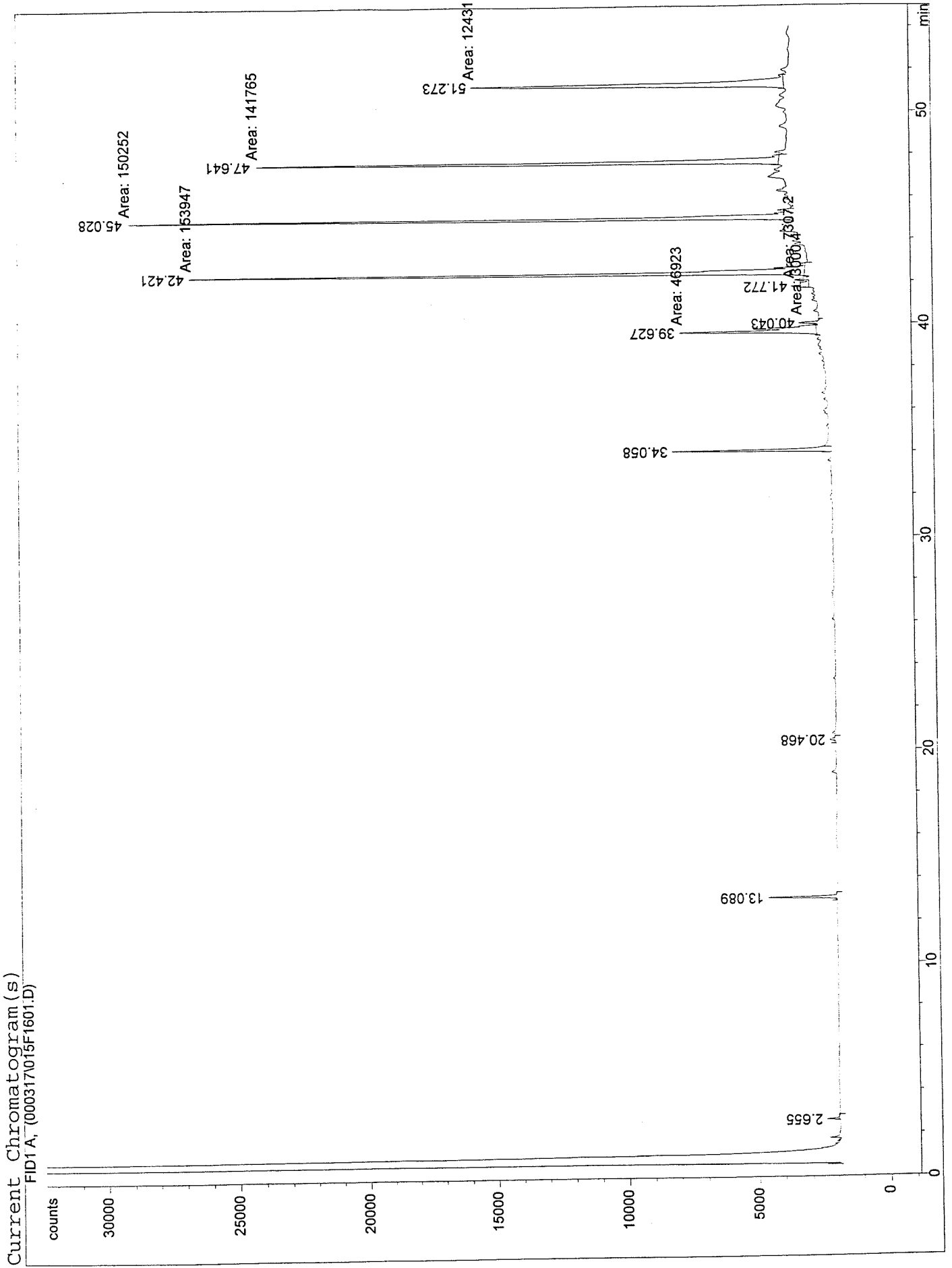
Detektor temperatur: 350 °C

Ytre standard n-C₂₄H₅₀

Indre standard n-C₁₄H₃₀

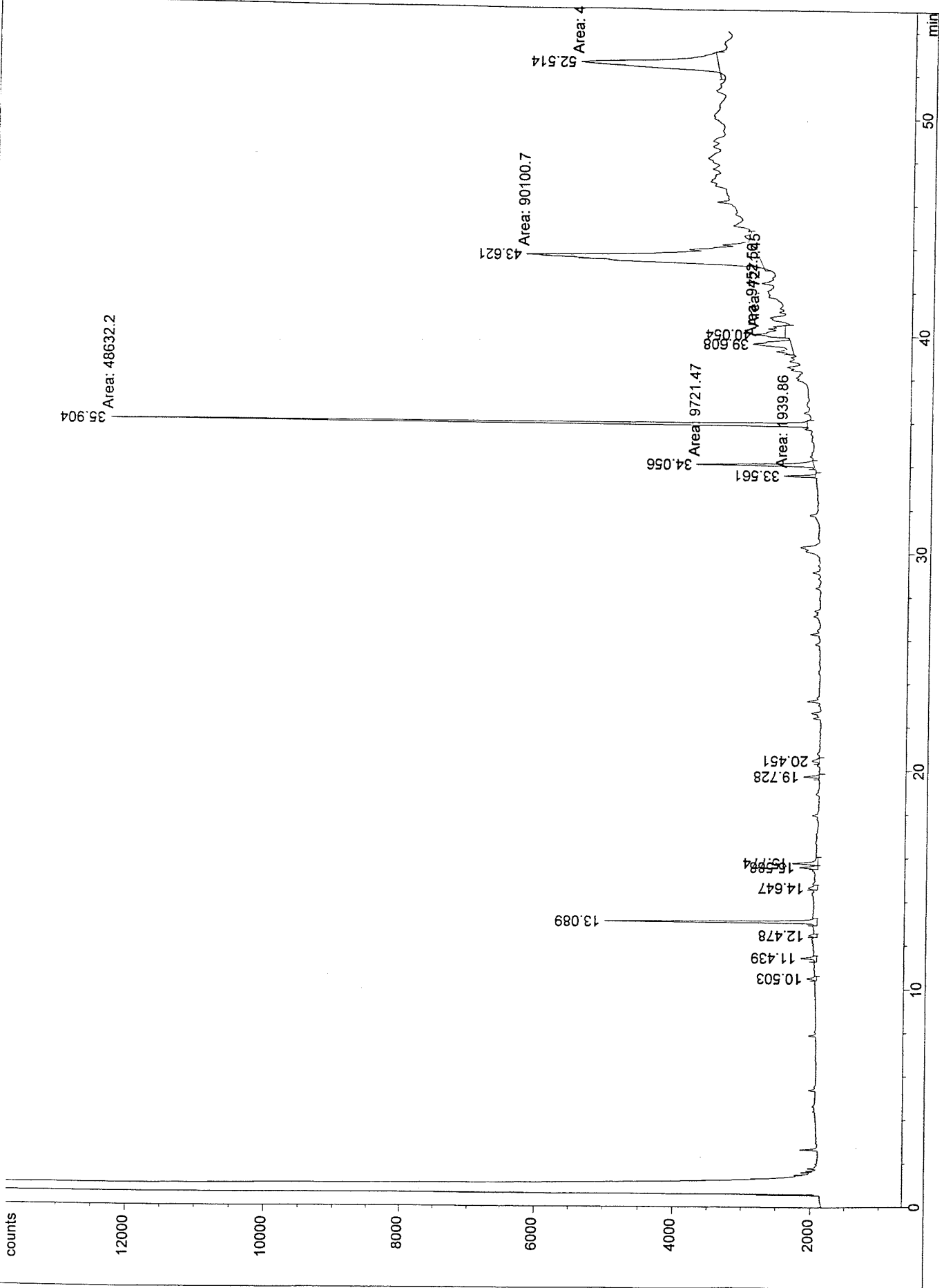
Referanse: Bengtsson, B-E., Björklund, I og Wahlberg C.; "Effluents from the Chemical Industry - Program for Characterization of Persistence and Effects (The Stork Project)", Ver. 3 1989.

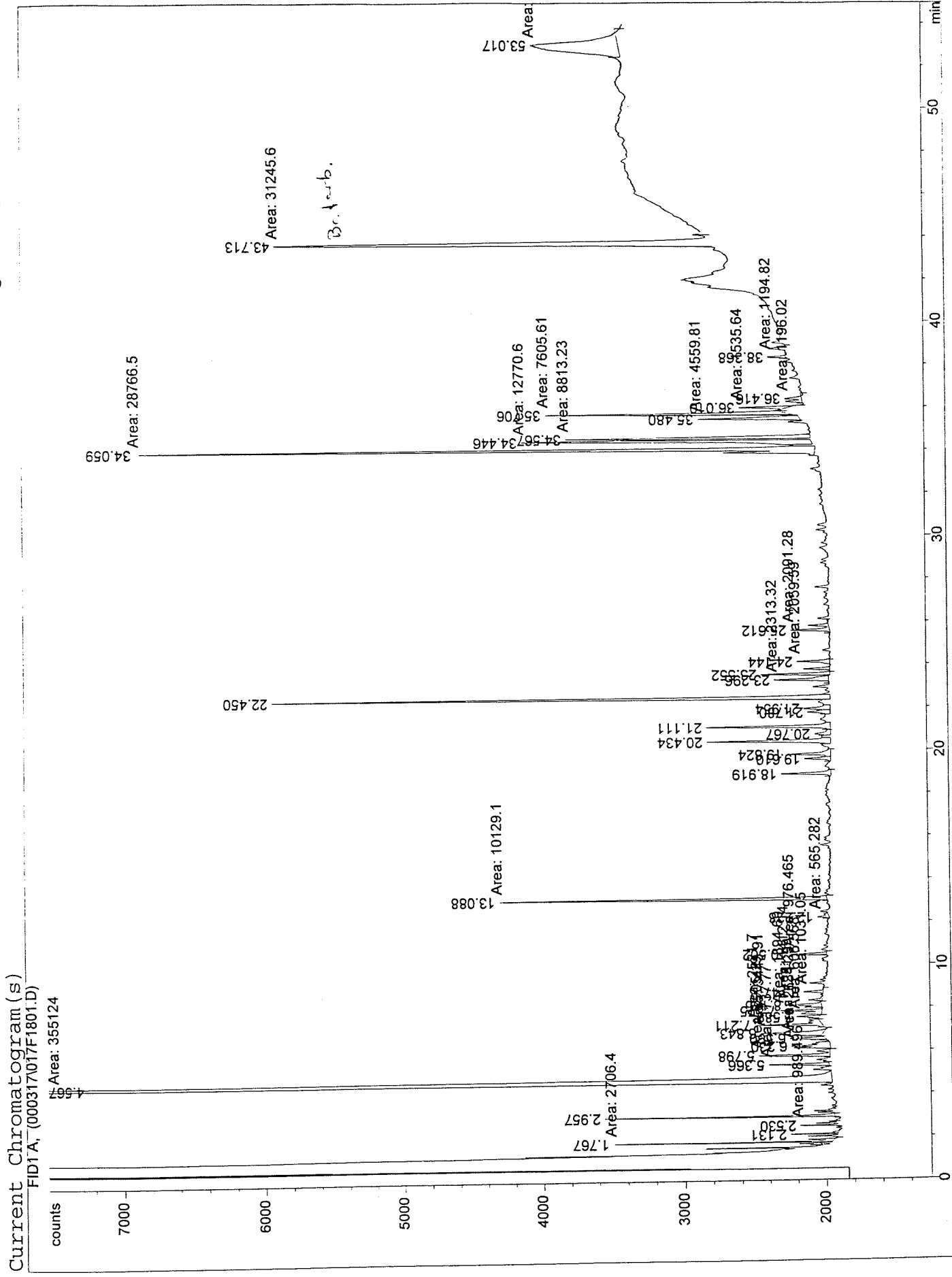


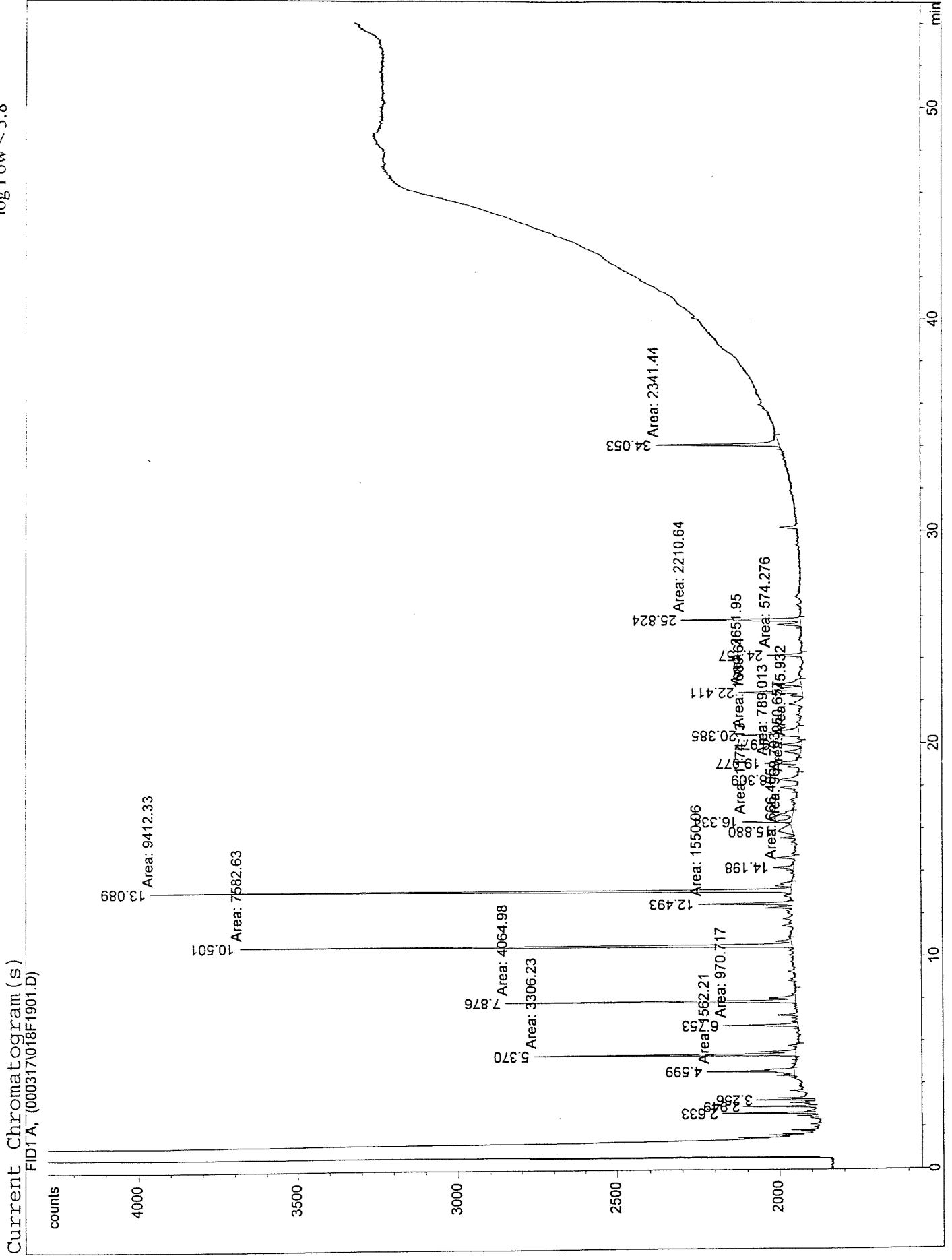


Unfiltered
log Pow > 5.7

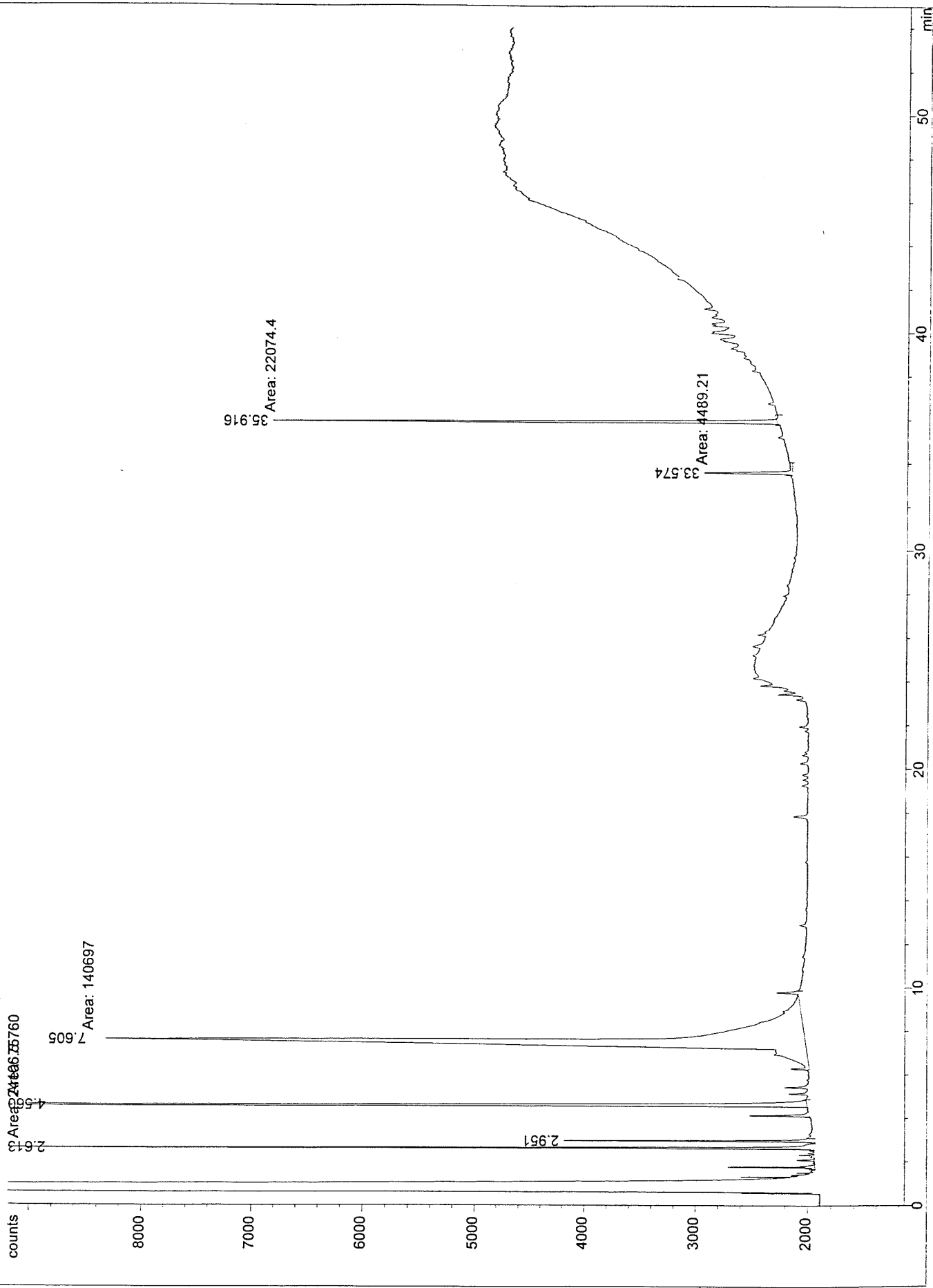
Current Chromatogram (s)
FID1A, (000317016F1701.D)

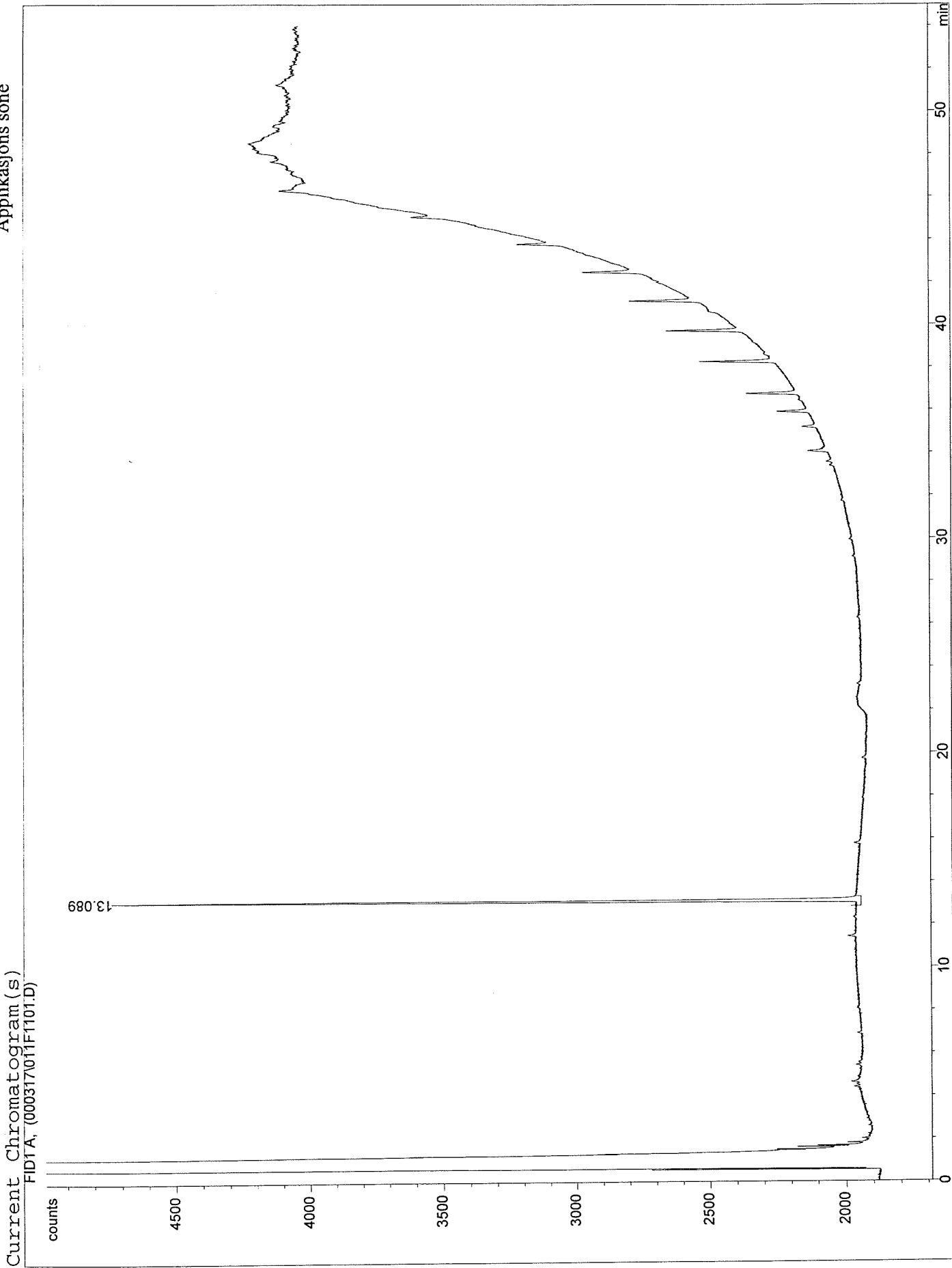




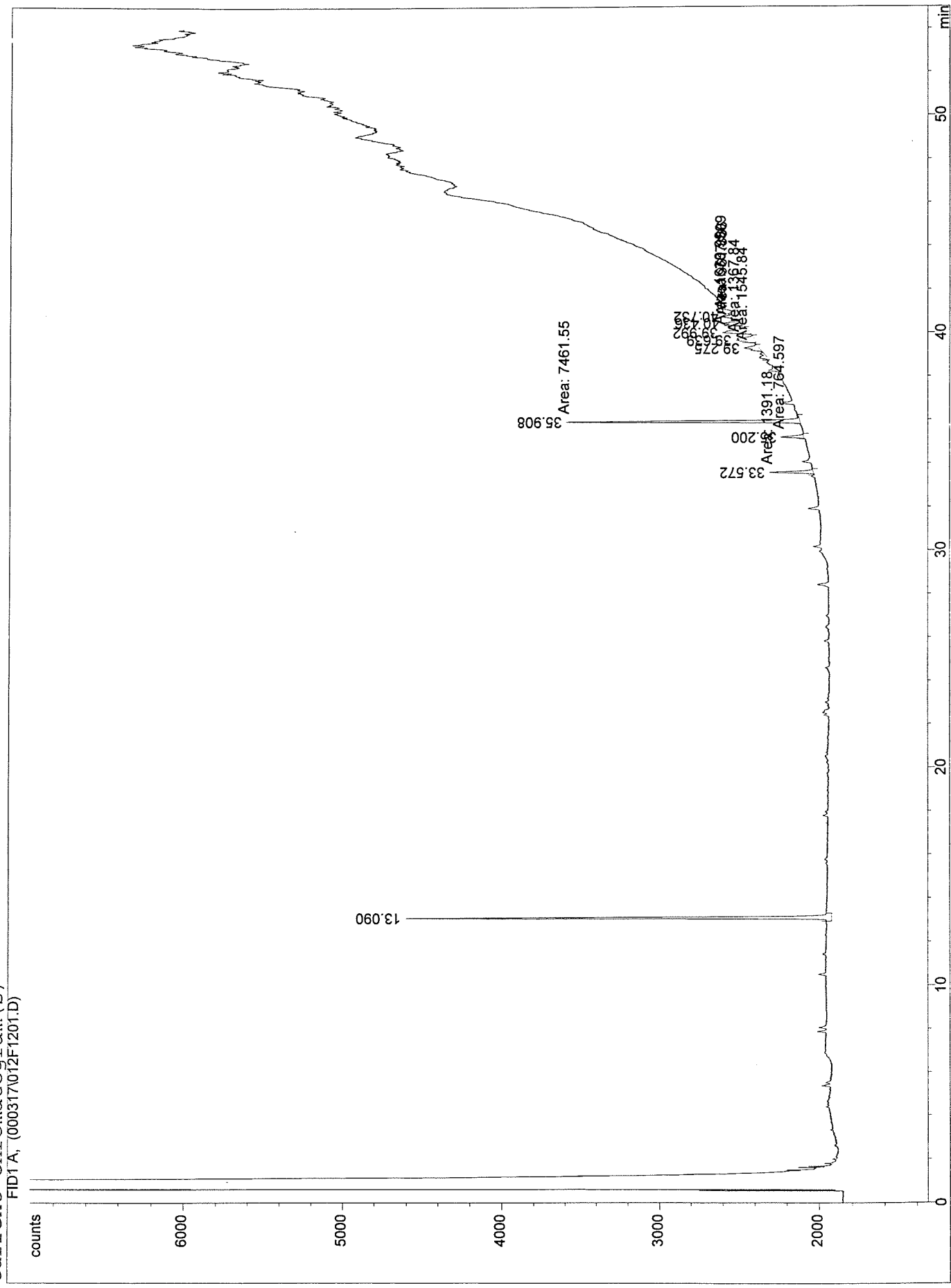


Current Chromatogram (s)
FID1A, (000317006F0601.D)

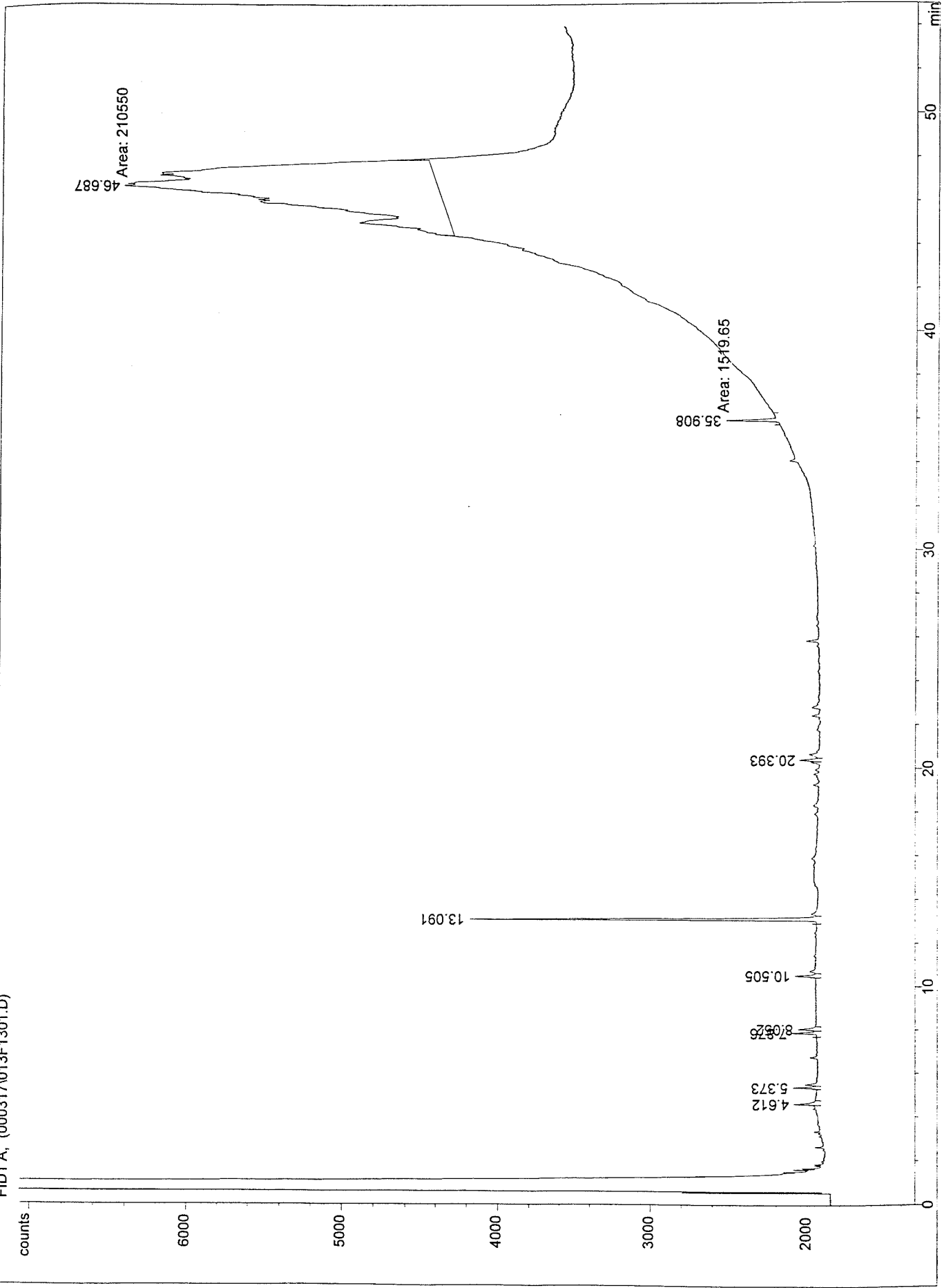


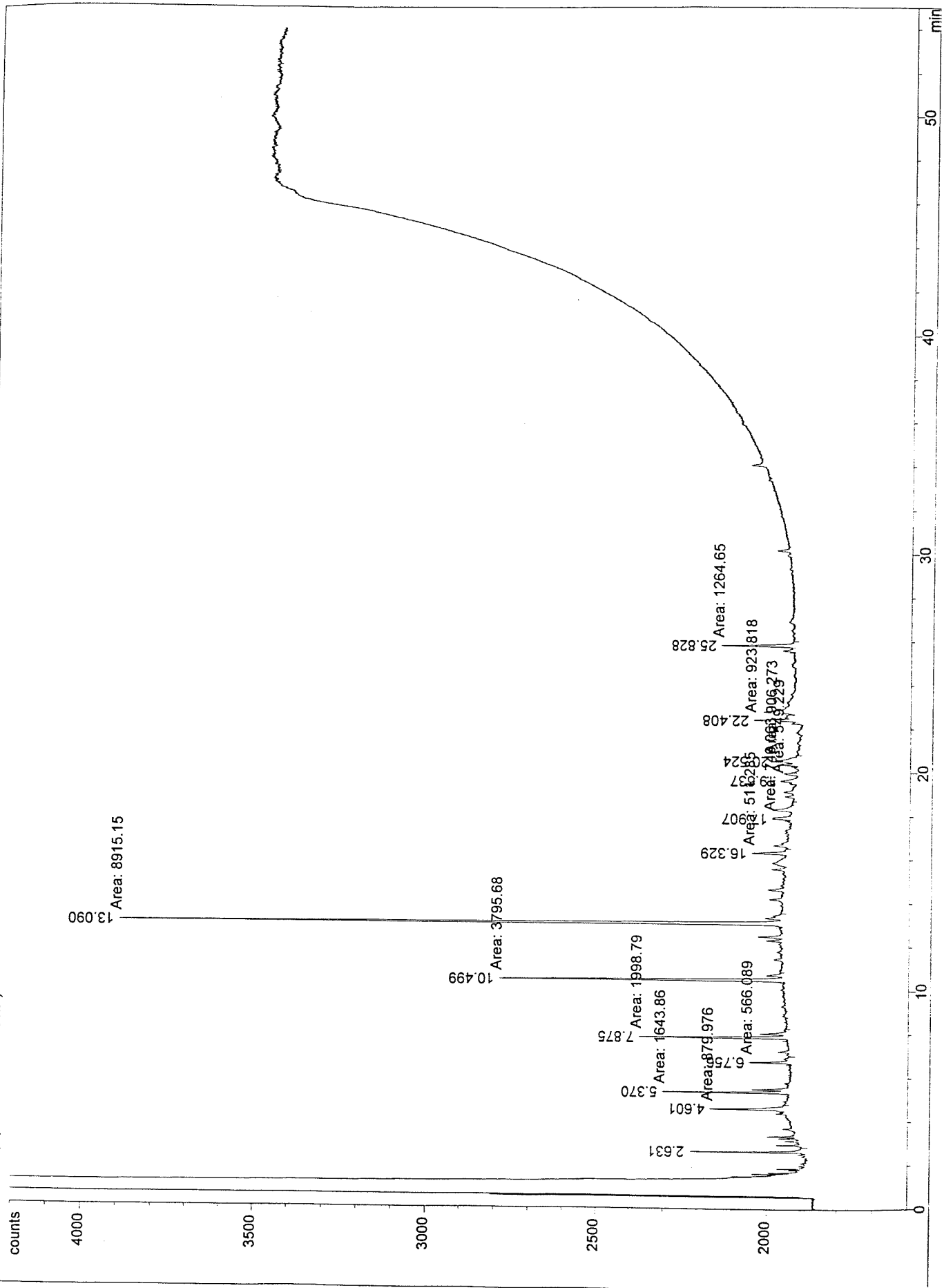


Current Chromatogram(s)
FID1A, (000317A012F120T.D)

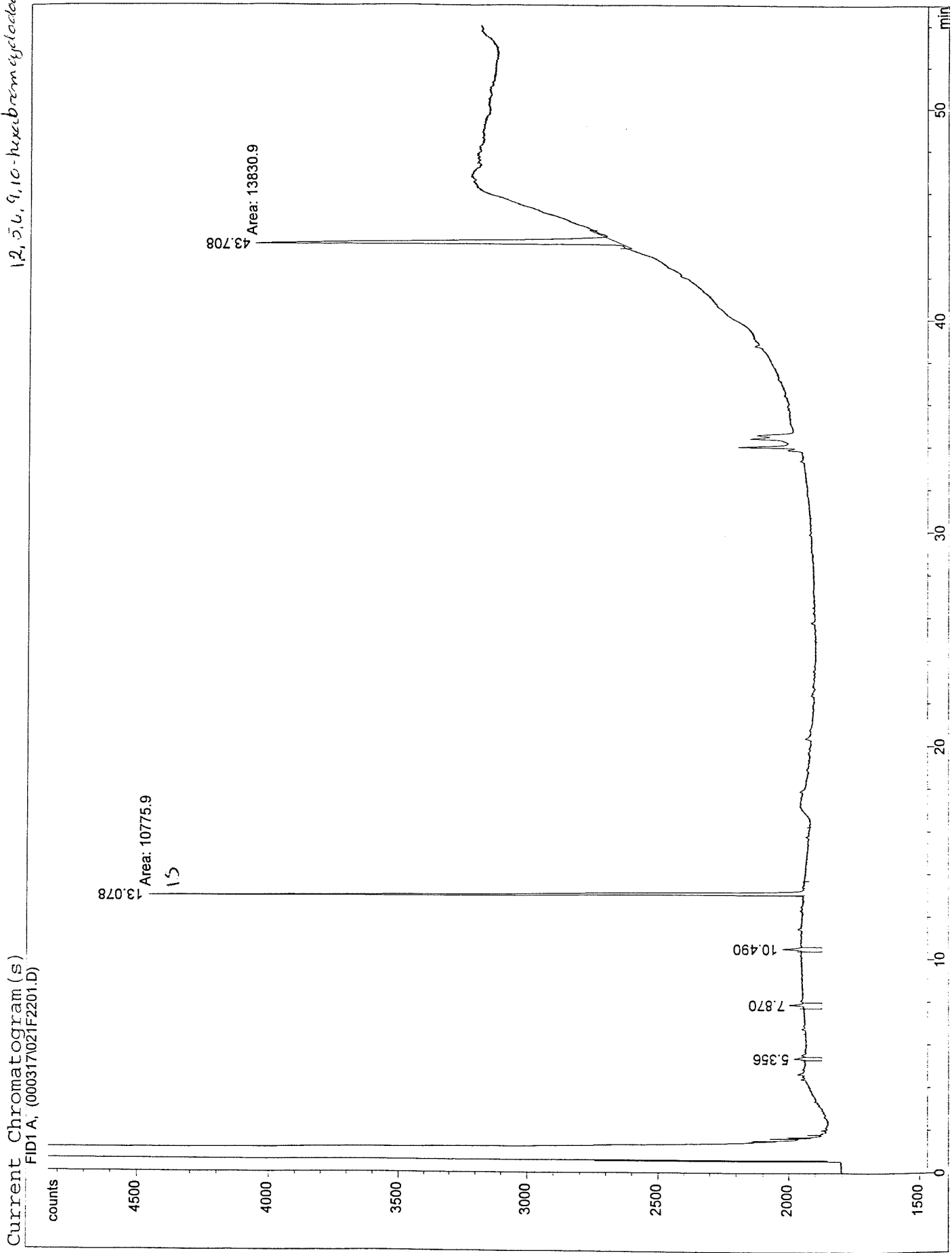


Current Chromatogram(s)
FID1 A, (000317013F1301.D)

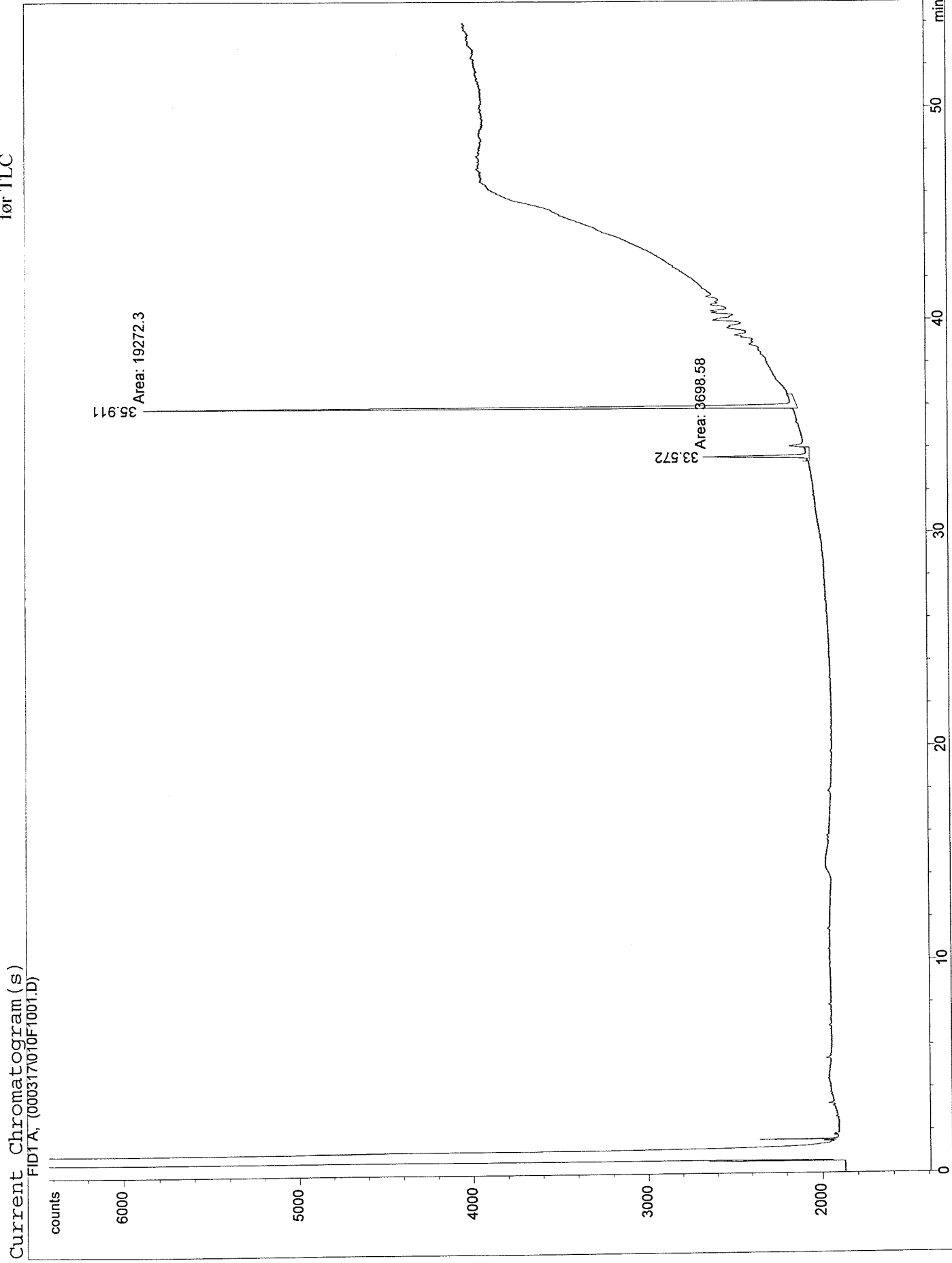




12, 5, 6, 9, 10-hexabromocyclohexane



Blind
for TLC



Blind prøve
Applikasjons sone

