Miljøprojekt
nr. 91

1988

Algetoksicitetstest

Miljøstyrelsen

Miljøprojekt

Nr. 62 : Luftforurening med kvælstofoxider i Danmark
Nr. 63 : Anvendelse af analyseresultater ved vandkontrol
Nr. 64 : Kosmetik - bivirkninger
Nr. 65 : Miljøfremmede stoffer i kommunalt spildevand
Nr. 66 : Undersøgelser af blødt aggressivt vand
Nr. 67 : Kilder til grundvandsforurening
Nr. 68 : Aktiveret iltning af ferrojern i vand fra Hvidmosen
Nr. 69 : Forbrug og forurening med chlorphenoler
Nr. 70 : Organiske opløsningsmidler
Nr. 71 : Kviksølv i havneslam
Nr. 72 : Organic solvents
Nr. 73 : Arealanvendelse og geologi - nitrat i grundvand
Nr. 74 : Kviksølv i danske ferskvandsøkosystemer
Nr. 75 : Forureningstilstanden i danske svømmebade
Nr. 76 : Nitrat og pH i drikkevand
Nr. 77 : Kviksølv i jord
Nr. 78 : Drænvandskvalitet fra pyritholdige arealer
Nr. 79 : Leptospira-bakterier i rotter ved dambrug og landbrug
Nr. 80 : Svømmebade og sygdomsrisici
Nr. 81 : Lokale forureninger og helbredseffekter
Nr. 82 : QSAR og toksikologi - en ny strategi i kemikalievurdering
Nr. 83 : Forurening fra gamle affaldsdepoter uden kemikalieaffald
Nr. 84 : Alternativ lossepladsteknologi - en litteraturgennemgang
Nr. 85 : Tilførsel af næringsstoffer til vandløb
Nr. 86 : Genanvendelse af tekstilaffald
Nr. 87 : Substitution af PVC-plast med andre plastmaterialer
Nr. 88 : Emballage til mælk og juice
Nr. 89 : Vandressourcerne og klimasvingninger
Nr. 90 : Nikkelafgivelse fra metallegeringer
Nr. 91 : Algetoksicitetstest

Algetoksicitetstest

Der er udviklet en korttidstest til undersøgelse af algetoksicitet forårsaget af kemiske stoffers hæmmende virkning på algernes fotosyntese baseret på målinger af kulstof-14-assimilation. Metoden kan bruges til kildeopsporing og miljøeffektvurderinger af spildevandsprøver eller perkolat og kontrol af sådanne. Endvidere er udarbejdet en metodeforskrift til brug for virksomheder, miljø- og levnedsmiddellaboratorier og amtskommunale miljøforvaltninger.

Miljøstyrelsen

Strandgade 29, 1401 København K. tlf. 01 57 83 10

Pris kr. 100.- (inkl. 22% moms)

ISSN nr. 0105-3094
ISBN nr. 87-503-7140-1

Miljøprojekt nr. 91

1988

Algetoksicitetstest

Udvikling og dokumentation af metode til måling af ^{14}C-assimilation

Udarbejdet af Kresten Ole Kusk og Niels Nyholm
Vandkvalitetsinstituttet

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Miljøstyrelsen vil, når lejlighed gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.
Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.
Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

0.	**Resume**	**side 5**
1.	**Indledning**	**7**
2.	**Baggrund**	**7**
3.	**Formål**	**9**
4.	**Projektplan**	**9**
5.	**Fremgangsmåde**	**13**
5.1.	Testorganismer	11
5.1.1.	*Laboratoriedyrkede alger*	
5.1.2.	*Indsamlet algeplankton*	
5.2.	Testprocedure generelt	14
5.3.	Testprocedure ved specifikke undersøgelser	16
5.3.1.	*Næringssalte*	
5.3.2.	*Iltforbrugende spildevandsprøve*	
5.3.3.	*Fotosyntesestimulerende prøver*	
5.3.4.	*Mørkefiksering*	
6.	**Databehandling**	**18**
7.	**Resultater**	**20**
7.1.	Valg af laboratoriedyrket testalge	20
7.2.	Eksponeringstidens længde	21
7.3.	Næringssalteffekter	24
7.4.	Årstidsvariation	26
7.5.	Iltforbrugende spildevandsprøver	32
7.6.	Mørkefiksering	36
7.7.	Fotosyntesestimulerende prøver	37
7.8.	Skylning af fotosyntesefiltre med HCl	45
7.9.	Test af prøver med høj alkalinitet	46
8.	**Diskussion**	**49**
8.1.	Valg af testorganismer	49
8.2.	Valg af testperiode i metodeforslaget	50
9.	**Konklusion**	**52**
10.	**Referencer**	**55**
11.	**Bilagsfortegnelse**	**59**
12.	**Registreringsblad**	**112**

0. RESUME

Det her rapporterede projekt, der er finansieret af Miljøstyrelsen og udført af Vandkvalitetsinstituttet, ATV har haft til formål at færdigudvikle en algetoksicitetstest baseret på måling af ^{14}C-assimilation, herunder at søge mindre metodemæssige problemer afklaret samt i øvrigt fremskaffe dokumentationsmateriale.

Dette er gjort ved gennemførelse af en række tests især med feltprøver indeholdende naturligt, marint algeplankton og i mindre omfang med kultiverede planktonalger. Som teststoffer er primært anvendt kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$) og pentachlorphenol (PCP); men for afklaringen af nogle mindre metodemæssige problemer er i visse tilfælde anvendt prøver af kemikalieholdigt spildevand og perkolat.

Resultaterne viste, at øget eksponeringstid gav lavere effektkoncentrationer dvs. mere følsomt respons. Ved rutinemæssige undersøgelser anbefales 6 timers testperiode, men til karakteriseringsformål anbefales tillige at anvende en testperiode på 20 timer.

Efter tilsætning af næringssalte til naturligt algeplankton blev i flere tilfælde observeret en svag nedgang i ^{14}C-assimileringen. Ved test af næringsholdige spildevandsprøver anbefales derfor at tilsætte næringssalte til algeplanktonprøven, således at der er overskud af næringssalte i såvel kontroller som i testblandinger.

Følsomheden hos naturligt algeplankton overfor toksiske stoffer varierer året igennem, fra sted til sted og fra år til år, hvilket antagelig først og fremmest skyldes de ændringer i artssammensætningen, som ligeledes finder sted.

Et lavt iltindhold kan stimulere fotosyntese. Det anbefales derfor ved 20 timers tests forud at afklare, hvorvidt en så lang eksponeringstid påvirker iltkoncentrationen væsentligt.

Det blev fundet unødvendigt forud for databehandlingen af måleresultaterne at korrigere for mørkefixering.

Nogle toksiske vandprøver kan ved lave koncentrationer have en stimulerende effekt på ^{14}C-optagelsen, hvilket muligvis skyldes mikronæringsstoffer eller evt. toksiske stoffer som fremkalder en fysiologisk ubalance.

Afvigende total CO_2-indhold i spildevandsprøver i forhold til algeplanktonprøven kan påvirke testresultatet. Det anbefales derfor generelt at måle CO_2-alkaliniteten i prøver, som indgår i ^{14}C-testen og på grundlag af måleresultatet eventuelt at foretage en korrektion.

På grundlag af de opnåede resultater og erfaringer er udarbejdet en metodeforskrift som indgår som bilag i rapporten.

Metoden anses at kunne gennemføres af virksomheder, lokale miljø- og levnedsmiddellaboratorier samt amtskommunale miljøforvaltninger, som har kendskab til primærproduktionsmålinger. Metoden vurderes derfor at kunne blive et nyttigt redskab indenfor den danske miljøforvaltning. Anvendelsesområderne omfatter både kildeopsporing samt miljøeffektvurderinger af udledninger af spildevand eller perkolat og kontrol af sådanne.

1. INDLEDNING

Det her rapporterede projekt "UDVIKLING AF STANDARDISERET ALGETOKSICITETSTEST (^{14}C-ASSIMILATION)" er finansieret af Miljøstyrelsen og gennemført af Vandkvalitetsinstituttet, ATV (VKI).

Der er de seneste år blevet meddelt en række spildevandstilladelser til industrivirksomheder, hvor der som led i virksomhedernes egenkontrol er bestemt, at der skal gennemføres en række økotoksikologiske undersøgelser, herunder fotosyntesetoksicitetstests.

Der har derfor vist sig behov for udvikling af en standardiseret undersøgelsesmetode for algetoksicitet, som kan gennemføres af virksomhederne, lokale miljø- og levnedsmiddellaboratorier samt amtskommunale miljøforvaltninger.

Både i Danmark og i udlandet anvendes biotests i stigende grad som led i miljøkontrollen med blandt andet industrispildevandsudledninger. Mange erfaringer viser /1-4/, at tests med planktonalger som generel regel er mere følsomme end korttidstests med fisk og krebsdyr og samtidig er algetestene mindre arbejdskrævende.

2. BAGGRUND

VKI har igennem nogle år rutinemæssigt anvendt en algetoksicitetstest baseret på måling af ^{14}C-kulstof assimilation efter samme princip, som benyttes ved bestemmelse af algers primærproduktion. Både naturligt plankton (recipientvandsprøver) og renkulturer af alger dyrket i laboratoriet kan benyttes. Testen er let anvendelig også til undersøgelse af komplekst spildevand som for eksempel på grund af stort iltforbrug, bakterievækst, partikelindhold eller indhold af flygtige stoffer kan give problemer ved andre typer tests.

Der eksisterer idag standardiserede metoder (ISO) eller Guidelines (OECD) for vækstundersøgelser med laboratoriedyrkede alger. Væksttests er kun udviklet for alger i renkultur og ikke med indsamlet algeplankton. Væksttesten retter sig endvidere primært mod undersøgelser af kemiske stoffer og produkter og sekundært mod undersøgelser af komplekst spildevand, og måleparameteren er en anden end i fotosyntesetesten, hvilket betyder, at de to metoder stiller helt forskellige krav til apparatur. Miljøforvaltningerne kan således ikke uden betydelige investeringer udføre væksttesten.

Ved anvendelse af indsamlet, naturligt algeplankton er der intet behov for opretholdelse af algekulturer. Indsamlet algeplankton fra en rimeligt uforurenet position i en vis nærhed af en spildevandsudledning er endvidere et økologisk relevant testobjekt. Effekt på det naturlige algeplankton i recipienten kan således sættes i direkte relation til den pågældende udledning.

Forskellige varianter af metoden ses anvendt i udlandet og herhjemme /5-13/. Også de øvrige nordiske lande har vist interesse for metoden, og en arbejdsgruppe for algetestmetodik under INSTA har i 1981 besluttet af udvikle metoden som INSTA standard. Med henblik herpå har VKI i 1981 udarbejdet et udkast til en standardiseret metodebeskrivelse /18/.

I VKI's metodeudkast påpeges imidlertid visse uafklarede spørgsmål, som anbefales undersøgt, inden et forslag til en egentlig standard-rutinemetode udarbejdes.

Siden udsendelsen af VKI's 1. udgave af metodeforslaget har der imidlertid været afholdt et INSTA-møde i Oslo med deltagere fra Finland, Norge og Sverige, hvor VKI's metodeudkast samt metodiske problemer blev diskuteret.

På grundlag af VKI's metodeforslag har NIVA udarbejdet et 2. og 3. revideret udkast. 3. udkast blev diskuteret på INSTA-mødet i København

i oktober 1986 og et 4. udkast forelå i foråret 1987.

3. FORMÅL

Nærværende projekt har haft til formål at færdigudvikle den af VKI udarbejdede præliminære metode, herunder at søge de påpegede eksisterende mindre metodemæssige problemer afklaret på et videnskabeligt grundlag, samt iøvrigt at fremskaffe dokumentationsmateriale, og medvirke til udarbejdelse af et metodeforslag til Dansk Standard og INSTA standard.

4. PROJEKTPLAN

Projektet var opdelt i følgende faser:

Fase 1
Eksperimentelt forsøgsarbejde med henblik på 1) afklaring af uløste problemer og 2) dokumentation af metoden.

Fase 2
Udarbejdelse af metodeforskrift, der kan udgives som dansk standard og INSTA standard samt opfølgende redigering og møder.

Det nærmere arbejdsindhold i de 2 faser er skitseret i det følgende:

Fase 1 - Uløste problemer samt dokumentation

a) Eksponeringstid
VKI har rutinemæssigt udført testen med en total eksponeringstid på 6 timer. ^{14}C-mærket bikarbonat tilsættes efter 4 timer, og kulstofassimilationen i løbet af de følgende 2 timer måles.

Mens 2 timer måleteknisk set er et passende tidsrum til udførelse af selve fotosynteseforsøget, eksisterer kun begrænsede erfaringer med hensyn til den totale eksponeringstids betydning. Der har været forsøgt anvendt eksponeringstider på ialt 4 timer henholdsvis 20 timer foruden de nævnte 6 timer. Ved 20 timers testen er eksponeringen i de første 16 foregået i mørke. Algerne er herefter belyst i 2 timer inden ^{14}C-HCO_3 er tilsat og belysning fortsat i yderligere 2 timer (fotosynteseforsøg). Forsøgene er udført med såvel laboratoriekulturer som med naturligt (marint) plankton.

b) <u>Specifikke problemer vedrørende indsamlet algeplankton</u>

1) Indsamlet algeplankton kan være næringsbegrænset, og ved kontakt med en spildevandsprøve indeholdende næringssalte kan der derfor formodes at ske en stimulering af kulstofassimilationen, hvorved toksiske effekter vil kunne maskeres. Som led i projektet er udført enkelte forsøg til undersøgelse af disse forhold.

2) Der kan muligvis være for stor bakterieaktivitet og indhold af organisk stof i visse spildevandsprøver, til at inkubering natten over er en praktisk gennemførlig metode. Der er gennemført et orienterende forsøg med en spildevandsprøve med højt BOD til belysning af dette forhold.

3) Sæsonvariationerne i naturligt planktons følsomhed over for toksiske stoffer er undersøgt ved tests af havvandsprøver fra 4 typiske årstider over for 2 referencematerialer.

Som referencematerialer er anvendt følgende:

1) Kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$)
2) Pentachlorophenol (PCP) (som natrium pentachlorphenol)

c) Mørkefiksering

Ved primærproduktionsmålinger korrigeres for mørkefiksering. Erfaringerne har vist, at mørkefikseringen i forgiftede alger er anderledes end i kontrollen. Det er imidlertid næppe nødvendigt at korrigere for mørkefiksering ved et toksicitetsforsøg, idet den totale kulstofassimilation kan vælges som responsvariabel. Der er udført et enkelt forsøg til dokumentation herfor. Forsøget er udført ved at inkubere to parallelle fortyndingsserier af $K_2Cr_2O_7$ med en laboratoriealgekultur i henholdsvis mørke og lys.

d) Ændringer i alkalinitet og pH

Tilsætning af visse typer prøver til såvel kulturmedier som naturlige vandprøver kan ændre pH og alkalinitet, hvorved forholdet mellem tilsat ^{14}C og naturligt ^{12}C i en fortyndingsrække ikke er konstant, hvilket påvirker måleresultaterne. Det foreslås, at der generelt justeres til recipientens/mediets pH, og at alkaliniteten måles i spildevandsprøven samt i recipientvandsprøve/-medium, hvis en beregning af alkaliniteten i dette ikke er muligt. Den resulterende alkalinitet i blandingen kan da beregnes ved de forskellige fortyndinger, og kulstofassimilationen, som estimeres ud fra den målte ^{14}C-assimilation, korrigeres under hensyntagen hertil.

Som led i projektet er anvendt materiale

fra en tidligere gennemført test til dokumentation af den foreslåede fremgangsmåde.

e) Prøver med særlig højt partikelindhold

Praktiske erfaringer har afsløret visse tekniske vanskeligheder med prøver med et meget højt partikelindhold muligvis pga. adsorption af ^{14}C til partikler, som tilbageholdes sammen med algerne ved den filtrering, der foretages efter inkubationen. Der er foreslået udført forsøg med en skylning af filtrene med svag syre (mere effektiv behandling af filtrene) før tælling end den der pt. anvendes (eksponering over rygende saltsyre i eksikator) med henblik på fjernelse af adsorberet ^{14}C.

Generelt under fase 1 har VKI i så høj grad som muligt koordineret projektarbejdet med rekvireret arbejde, og således fået et større udbytte af projektmidlerne, ligesom de erfaringer og resultater, der er opnået ved det rekvirerede arbejde i det omfang, det har været muligt, er anvendt og indgår i projektarbejdet.

Fase 2 - Metodeforskrift

Projektet er afsluttet med nærværende rapport omhandlende resultaterne af arbejdet, som er skitseret i fase 1. Herudover har VKI medvirket ved udabejdelsen af et INSTA-standardforslag, som påregnes færdigbehandlet af INSTA's algearbejdsgruppe i foråret 1988. Dette forslag forventes at blive grundlag for en tilsvarende dansk standard.

I bilag 3 er givet en dansk version af metodeforslaget med et indhold, der indeholder de danske synspunkter på denne metode og iøvrigt er udarbejdet under hensyntagen til resultaterne opnået i dette projekt.

5. FREMGANGSMÅDE

Som udgangspunkt er anvendt den i /18/ beskrevne metode. Da nogle af metodens punkter kan varieres, og da INSTA-arbejdsgruppen siden 1981 er blevet enige om visse ændringer, er fremgangsmåden i det følgende kort præciseret.

5.1. Testorganismer

5.1.1. Laboratoriedyrkede alger

Som laboratoriedyrkede testalger har generelt været anvendt den marine kiselalge Skeletonema costatum (klon fra NIVA) og ved en enkelt test, den marine kiselalge Phaeodactylum tricornutum (klon fra NIVA).

De laboratoriedyrkede alger blev dyrket ved 16 ± 1°C og ved en lysintensitet på 7 x 10^{15} quanta x sec^{-1} x cm^{-2}. Opretholdelsen af algekulturerne sker i kluyverkolber under kontinuerlig gennembobling af sterilfiltreret atmosfærisk luft.

Algemediet blev fremstillet af filtreret, varmebehandlet (kortvarigt til 80°C) og næringsberiget naturligt saltvand indstillet til 20°/∘∘ salinitet.

De tilsatte næringssaltes sammensætning var en modifikation af sammensætningen givet i bilag 3, idet der blev tilsat 240 mg/l af $NaNO_3$ i stedet for 15 mg/l af NH_4Cl og af KH_2PO_4 blev doseret 32 mg/l i stedet for 1,6 mg/l. Under tests med dyrkede alger blev som fortyndingsvand anvendt dyrkningsmedium, hvor der ikke var tilsat Fe og EDTA, idet EDTA chelaterer metaller. Ved en sådan chelatering maskeres metallernes toksicitet.

Under testen blev tilsat alger til en partikeltæthed på ca 10^4/ml. Da Skeletonema vokser i korte kæder afspejler dette partikeltal en højere celletæthed (antagelig en faktor 2-3 højere).

5.1.2. Indsamlet algeplankton

Vandprøver med et naturligt indhold af planktonalger er indsamlet på forskellige lokaliteter og underkastet tests med referencestoffer.

Det er tilstræbt gennemgående at anvende vand fra Køge Bugt og nogenlunde samtidig vand fra en anden lokalitet.

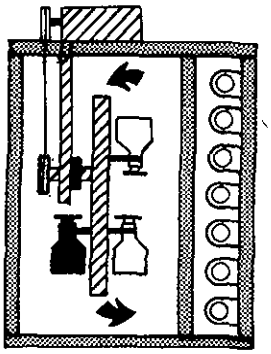
Vandprøverne er udtaget i de øvre vandlag (0,5-2 m dybde). Prøvemængden var generelt ca 25 l. I den sidste del af projektperioden blev vandprøverne filtreret gennem 100 µm net for at fjerne zooplankton og derved hindre græsning af algeplanktonet. Denne filtrering blev foretaget umiddelbart efter prøvetagningen. De filtrerede prøver blev opbevaret på 25 l plastdunke. Prøveudtagningen skete generelt dagen før, at testen blev iværksat, og prøven blev indtil igangsættelsen af testen opbevaret i klimarum i mørke ved temperaturer så nær recipienttemperaturen som muligt og med svag gennembobling af atmosfærisk luft ved hjælp af en akvarieluftpumpe.

Som fortyndingsvand i tests med naturligt algeplankton blev anvendt en GF/C-filtreret del af vandprøven. Under testene blev biomassen i de forskellige testkoncentrationer holdt konstant ved at lade 90% bestå af ufiltreret vand indeholdende algeplankton og lade resten bestå af stamopløsning med teststof (opløst i fortyndingsvand) + evt. fortyndingsvand.

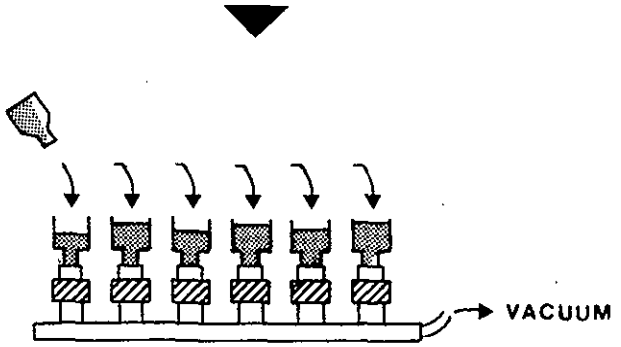
5.2. Testprocedure generelt

Fortyndingsrækker af teststof blev fremstillet i portioner à 100 ml.

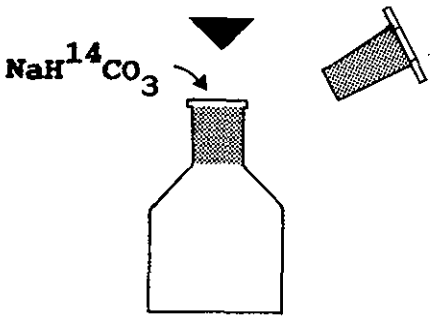
Ca. 25 ml testopløsning blev hældt på primærproduktionsflasker, som lukkedes med glasprop og anbragtes på et hjul i inkubator (se figur 1).



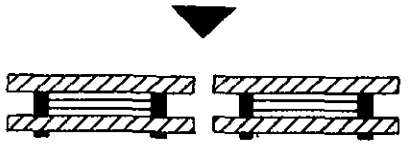
1) Inkubering med prøve (4 timer eller længere).



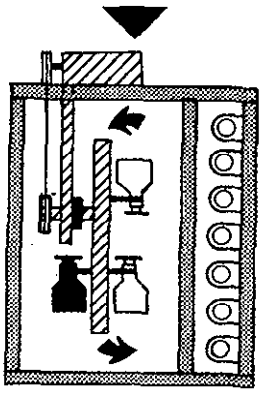
4) Filtrereing gennem 0,45 µmmembranfilter.



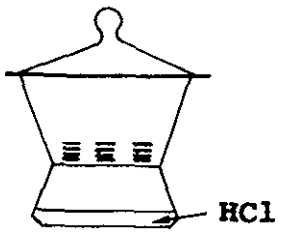
2) Tilsætning af $NaH^{14}CO_3$.



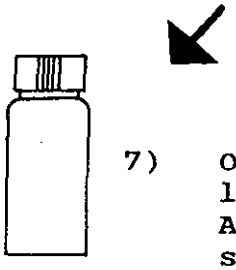
5) Samling af våde filtre i tørrekassetter.



3) Inkubering med prøve og $NaH^{14}CO_3$ (2 timer).



6) Fjernelse af uorganisk ^{14}C fra filtre ved eksponering i 5 min. over rygende saltsyre.



7) Overførsel af filter til scintillationsvial. Opløsning af filter. Aktivitetsbestemmelse ved væskescintillation.

Figur 1. Skitse til procedure for fotosyntesehæmningstest

Testtemperaturen var så nær recipient-/dyrkningstemperaturen som muligt. Lysintensiteten var 33 x 10^{15} quanta x cm^{-2} x sec^{-1} (550 μE x m^{-2} x sec^{-1}), hvilket er tilstrækkeligt til at give en lysmættet fotosyntese. Under inkubationen drejer hjulet med flasker rundt, hvorved algerne forhindres i at sedimentere.

Hver testkoncentration blev undersøgt som 3-dobbelt forsøg, mens kontrollen blev undersøgt som 3-5-dobbelt forsøg. Endvidere blev medtaget en flaske, der ikke fik lys (indpakket i staniol), som check af mørkefixeringen.

Inkubationsperiodens længde blev varieret. Totale inkubationsperioder på 4, 6 eller 20 timer blev anvendt. Ved 20 timers inkubationsperiode foregik 16 timer i mørke og 4 i lys.

^{14}C-,mærket bikarbonat blev tilsat 2 timer inden inkubationsperiodens afslutning.

En $NaH^{14}CO_3$-opløsning med en aktivitet på 20 $\mu Ci/ml$ blev anvendt.

Ved tests med laboratoriedyrkede alger blev tilsat 100 μl af $NaH^{14}CO_3$-opløsningen pr primærproduktionsflaske og ved tests med naturligt algeplankton blev generelt tilsat 200 μl.

5.3. Testprocedure ved specifikke undersøgelser

5.3.1. Næringssalte

Ved undersøgelser af betydningen af eventuel næringssaltbegrænsning for det naturlige algeplankton blev tilsat næringssalte i følgende koncentrationer:

NH_3-N	($\mu g/l$):	800
o-P	" :	73
Si	" :	500

5.3.2. Iltforbrugende spildevandsprøve

Som iltforbrugende spildevand blev forsøgt anvendt et syntetisk spildevand bestående af:

pepton	(mg/l):	16.000
kødekstrakt	" :	11.000
K_2HPO_4	" :	2.800
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	" :	400
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	" :	200

Spildevandet blev saltet op til 20°/∘∘ salinitet og pH-justeret til 8,0. BOD heraf var ca 15.000 mg/l.

Ved testen blev til planktonprøven og algekulturen tilsat 64 mg K_2HPO_4/l, således at de fortyndinger med det syntetiske spildevand, som blev testet, ikke indeholdt væsentlig større o-P-koncentrationer end kontrollen.

Da det syntetiske spildevand viste sig at inhibere fotosyntesen ved koncentrationer, hvor der ikke var noget væsentligt O_2-forbrug, er effekten af O_2-forbrug illustreret med et tidligere gennemført forsøg med sulfit, ved hvilket der dog ikke blev målt iltkoncentrationer.

5.3.3. Fotosyntesestimulerede prøver

En prøve (lossepladsperkolat) der havde vist sig at give anledning til en øget ^{14}C-optagelse ("fotosyntesestimulering") blev testet efter følgende behandlinger:

- Normal (ingen speciel for- eller efterbehandlinger)
- Forfiltreret gennem 0,45μm filter inden testen
- Kun prøve (ingen alger tilsat)

Desuden blev undersøgt virkningen af en skylning af ^{14}C-filtrene med syre. Filtrene blev efterskyllet med:

20 ml 0,1N HCl-opløsning i 20 °/∘∘ saltvand.

5.3.4. Mørkefiksering

Til belysning af mørkefikseringens betydning blev gennemført en 4 timers test med Skeletonema costatum, hvor alle flasker blev indpakket i staniol under hele testen.

6. DATABEHANDLING

Statistisk beregning af de fotosyntesehæmmende koncentrationer udføres ved lineær regressionsanalyse under antagelse af, at hæmningen kan beskrives ved en logaritmisk normalfordelingskurve. Negative hæmninger (større værdi end i kontrollen) kan pr definition ikke forekomme med den gjorte forudsætning, og sådanne værdier kan derfor ikke indgå i beregningerne, selvom de reelt forekommer evt. i form af spredning omkring kontrolværdien.

Beregningerne er udført ved hjælp af et EDB-program, som er udviklet af VKI.

Data transformationsvægtes ved beregningerne, således at der kompenseres for den ændring i variansfordelingen, som transformationen vha. den logaritmiske normalfordelingsfunktion giver anledning til.

Resultatet er, at meget små hæmninger, der i realiteten er variationer omkring kontrolværdier, indgår med mindre vægt end værdier, der klart afspejler en hæmning. På tilsvarende måde tillægges hæmninger nær 100% en mindre vægt (stor varians efter transformation).

Lejlighedsvis og typisk, når der er få hæmmende værdier, kan en ensartet vægtning af data give et mere korrekt billede af dosisresponskurven, og dermed vil de beregnede EC-værdier blive sikrere bestemt. EDB-beregningsprogrammet giver mulighed for et sådant valg af en ensartet vægtning.

For fotosyntesetests beregnes de koncentrationer, som hæmmer ^{14}C-assimilationen 10 og 50% i forhold til kontrollen (EC 10 og EC 50). EC 10-værdien anses i disse tests for at være laveste koncentration med signifikant hæmmende effekt.

I tilfælde af, at resultaterne ikke egner sig for ovennævnte databehandling (hvis data ikke passer ind i modellen dvs. i de gjorte forudsætninger), kan vælges at fremstille testresultatet grafisk ved en ikke-lineær kurve i et semilogaritmisk system.

7. RESULTATER

Primærdata for de gennemførte test er samlet i et bilag, som dog ikke er publiceret, men beror som dokumentation hos Miljøstyrelsen. En række eksempler er dog uddraget og givet som eksempler i denne rapport (bilag 2).

7.1. Valg af laboratoriedyrket testalge

De to mest almindeligt anvendte marine testalger på VKI var kiselalgerne Phaeodactylum tricornutum og Skeletonema costatum.

De to alger er begge anvendt i tests med dikromat (bilag 2.1 og 2.2) og af tabel 1 ses, at Skeletonema costatum blev hæmmet ved koncentrationer, der var ca 1/10 af de koncentrationer, som tilsvarende hæmmede Phaeodactylum tricornutum. På grund af større følsomhed er Skeletonema costatum valgt som standard laboratoriealge.

Testorganismer: Phaeodactylum tricornutum og Skeletonema costatum
Teststof: Kaliumdikromat
Testvarighed: 6 timer

Dato Testtemp.	Test-organisme	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
		(mg/l)	(mg/l)	
17/12-85 15 °C	Phaeodactylum tricornutum	10 (6-14)	54 (47-63)	2400
10/6-86 15 °C	Skeletonema costatum	1.4 (1.0-1.7)	3.6 (3.2-3.9)	11300
7/5-86 15 °C	Skeletonema costatum	1.4 (.9-1.8)	5.0 (4.1-6.1)	7500
18/2-86 15 °C	Skeletonema costatum	1.6 (1.0-2.1)	4.4 (3.7-5.3)	9500

Tabel 1: Sammenligning af **følsomhed hos to kultiverede kiselalger**, Phaeodactylum tricornutum og Skeletonema costatum.

7.2. Eksponeringstidens længde

Betydningen af eksponeringstidens længde er undersøgt med naturligt, marint algeplankton og med Skeletonema costatum ved tests af dikromat og PCP.

4, 6 og 20 timers eksponeringstid har været anvendt (se bilag 2.3, 2.4 og 2.5). Ved 20 timers eksponeringstid blev valgt at inkubere i mørke i de første 16 timer og i lys i 4 timer. Mørkeperioden blev valgt for at minimere en eventuel effekt af en biomasseforøgelse, der må antages at være væsentlig mindre i mørke end i lys.

I de følgende tabeller (2 og 3) er resultaterne vist ved test, der er udført samtidig med delprøver af samme planktonprøve og tests, der er udført med Skeletonema costatum.

Det fremgår af tabellerne, at begyndende effekter på både algeplankton og Skeletonema costatum ved tests med kaliumdikromat kunne konstateres ved væsentlig lavere koncentrationer efter 20 timers eksponering i forhold til efter 6 timers eksponering. Ved en forøgelse af eksponeringstiden fra 4 timer til 6 timer fandtes lidt lavere effektkoncentrationer.

Effektkoncentrationerne af PCP i tests med Skeletonema costatum (tabel 3) er ikke fundet væsentligt forskellige ved varierende eksponeringstid.

Dette gælder også i tests med naturligt algeplankton i tests af 6 og 20 timers varighed (tabel 2). I testen af 4 timers varighed fandtes imidlertid en relativ høj EC 50-værdi. Værdierne i 6 timers testen er imidlertid mindre godt bestemt, således at det samlede resultat af testene med PCP og naturligt algeplankton er vanskelige at tolke præcist.

Generelt kan det imidlertid konkluderes, at en forøgelse af testtiden fra 4 timer til 6 timer har givet en faktor 2-3 til forskel i de fundne EC-værdier for såvel dikromat som PCP.

En forøgelse af testtiden fra 4 til 20 timer med de i tabellerne indgåede data for dikromat betyder en faktor på maksimalt 10-20 på EC 10-værdien og 5-15 på EC 50-værdien.

For PCP er fundet en faktor på maksimalt 3.

På grundlag af disse resultater blev valgt efterfølgende at arbejde med eksponeringstiderne 4 timer og 20 timer.

Testorganisme: **Naturligt algeplankton**

Dato testtemp.	Indsaml. lokalitet	Test-varighed	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
$K_2Cr_2O_7$				(mg/l)	(mg/l)	
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	4 timer	9	1.4 (1.0-1.8)	22 (20-25)	6000
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	4 timer	9	2.3 (1.3-3.5)	25 (21-29)	6000
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	6 timer	9	1.2 (.9-1.5)	15 (13-17)	7000
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	6 timer	9	0.93 (.21-2.0)	12 (8.0-18)	7000
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	20 timer	9	0.13 (.08-.20)	4.2 (3.6-5.0)	6000
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	20 timer	9	0.10 (.06-.16)	4.5 (3.8-5.3)	6000

Dato testtemp.	Indsaml. lokalitet	Test-varighed	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
PCP				(mikrogram / L)		
12/11-85 10 °C	Kattegat	4 timer	20	13 (8-19)	195 (156-261)	800
12/11-85 10 °C	Kattegat	6 timer	20	5 (* -22)	63 (8- *)	900
12/11-85 10 °C	Kattegat	20 timer	20	13 (9-17)	67 (57-85)	850

* : Værdien har ikke kunnet beregnes.

Tabel 2: **Resultatets afhængighed af eksponeringstiden i tests med naturligt algeplankton.**

Testorganisme: **Skeletonema costatum**

Dato Testtemp.	Test-varighed	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
$K_2Cr_2O_7$			(mg/l)	(mg/l)	
18/2-86 15 °C	4 timer	20	2.9 (2.6-3.2)	5.8 (5.6-6.1)	3300
25/3-86 15 °C	4 timer	20	2.7 (2.2-3.1)	7.7 (7.2-8.4)	11000
10/6-86 15 °C	6 timer	20	1.4 (1.0-1.7)	3.6 (3.2-3.9)	11300
7/5-86 15 °C	6 timer	20	1.4 (.9-1.8)	5.0 (4.1-6.1)	7500
18/2-86 15 °C	6 timer	20	1.6 (1.0-2.1)	4.4 (3.7-5.3)	9500
18/2-86 15 °C	20 timer	20	0.13 (.08-.17)	0.50 (.42-.58)	3600

Dato Testtemp.	Test-varighed	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
PCP			(mikrogram / L)		
20/3-86 15 °C	4 timer	20	36 (33-39)	94 (90-98)	13000
20/3-86 15 °C	6 timer	20	24 (7-37)	82 (60-116)	8000
13/11-86 15 °C	20 timer	20	26 (11-39)	>60	10400

Tabel 3: **Resultatets afhængighed af eksponeringstiden i tests med** Skeletonema costatum.

7.3. Næringssalteffekter

På tidspunkter af året, hvor man kunne forvente næringssaltbegrænset algeplanktonvækst, dvs. efter forårsmaksimum og i sensommeren, er indsamlet plankton i Køge Bugt. Dette er anvendt i tests med kaliumdikromat henholdsvis uden og med tilsætning af ekstra næringssalte (NH_3-N, o-P og Si).

Næringssaltindholdet i de indsamlede vandprøver er målt og resultaterne heraf er vist i tabel 4. Heraf ses, at indholdet af uorganisk N ved specielt de to første målinger var lavt. På baggrund heraf er der således grund til at antage, at der som ventet på de pågældende tidspunkter har været næringssaltbegrænset (dvs. N-begrænset) vækst.

Indsaml.sted **Køge Bugt**		19/9-85	8/4-86	18/8-86	17/9-86	Tilsatte ekstra nær. salte.
NH_3-N	(µg/l) :	4	7	18	28	800
NO_2+NO_3-N	(µg/l) :	2,5	5	8	7	0
o-P	(µg/l) :	17	23	34	40	73
Total-N	(µg/l) :	288	250	445	330	-
Total-P	(µg/l) :	34	41	69	69	-

Tabel 4: Koncentration af næringssalte i vandprøver (med naturligt algeplankton) anvendt til toksicitetstests.

I tabel 5 (og bilag 2.6 og 2.7) er vist toksicitetstestresultaterne henholdsvis uden og med tilsætning af næringssalte. Heraf ses, at der ikke er væsentlige forskelle på de effektkoncentrationer, der er opnået og som parvis kan sammenlignes.

Næringssalttilsætning (N,P,Si)
Indsamlingssted: Køge Bugt

Dato Testtemp	Nærings-tilsætn.	Test-varighed	Salinitet o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100µl ^{14}C-opl
$K_2Cr_2O_7$				(mg/l)	(mg/l)	
19/9-85 15 °C	-	4 timer	9	1.4 (1.0-1.8)	22 (20-25)	6000
19/9-85 15 °C	+	4 timer	9	2.3 (1.3-3.5)	25 (21-29)	6000
8/4-86 9 °C	-	4 timer	9	3.2 (2.4-3.9)	39 (35-44)	8500
8/4-86 9 °C	+	4 timer	9	3.6 (2.5-4.7)	46 (39-55)	8500
18/8-86 15 °C	-	4 timer	9	25 (15-31)	>60	6800
18/8-86 15 °C	+	4 timer	9	13 (7.8-19)	>60	5800
17/9-86 15 °C	-	4 timer	10	16 (13-19)	54 (50-61)	9600
17/9-86 15 °C	+	4 timer	10	10 (0-19)	63 (41-400)	7800
19/9-85 15 °C	-	6 timer	9	1.2 (.9-1.5)	15 (13-17)	- *)
19/9-85 15 °C	+	6 timer	9	0.93 (.21-2.0)	12 (8.0-18)	7000
19/9-85 15 °C	-	20 timer	9	0.13 (.08-.2)	4.2 (3.6-5.0)	6000
19/9-85 15 °C	+	20 timer	9	0.10 (.06-.16)	4.5 (3.8-5.3)	6000
8/4-86 9 °C	-	20 timer	9	0.54 (.32-.76)	5.0 (3.9-6.8)	7000
8/4-86 9 °C	+	20 timer	9	1.3 (1.0-1.7)	4.7 (4.2-5.3)	7000
18/8-86 15 °C	-	20 timer	9	0.41 (.20-.65)	7.4 (5.4-11)	7300
18/8-86 15 °C	+	20 timer	9	0.62 (.29-1.0)	7.8 (5.6-12)	6900

*)Målt værdi: 11800; anvendt værdi: 7000

Tabel 5: **Oversigt over testtidspunkter m.v. og testresultater opnået honholdsvis med og uden næringssalttilsætninger.**

Bemærkelsesværdigt er det, at der ved flere lejligheder er konstateret en væsentlig forskel i det gennemsnitlige kontrol-DPM pr 100 µl ^{14}C-

mærket bicarbonatopløsning, idet dette ved næringssalttilsætning ofte lå lavere end når næringssaltene ikke blev tilsat. Årsagen kan muligvis skyldes, at algerne anvender en del af den ved fotosyntesens lysprocesser dannede energi på at optage og oplagre de næringssalte, som nu er tilstede, i stedet for at udnytte energien i fotosyntesens mørkeprocesser (CO_2-assimilering).

Det er muligt at næringssalttilsætning i andre tilfælde (anden fysiologisk status hos phytoplanktonet eller andre tilsatte koncentrationer) vil kunne have en stimulerende effekt på optagelsen af ^{14}C.

Ved tests af spildevandsprøver (som indeholder næringssalte) anbefales det at tilsætte næringssalte til algeplanktonprøven, for at modvirke, at næringssaltindholdet i spildevandet skal medføre en ændret ^{14}C-assimilation i forhold til kontrollen, idet en sådan ændret assimilation kunne tolkes som en toksisk effekt. Ved tests af prøver uden næringssaltindhold tilsættes <u>ikke</u> ekstra næringssalte.

7.4. Årstidsvariation

Årstidsvariationen i algeplanktonets følsomhed overfor de to anvendte referencestoffer er undersøgt i en række tests med algeplankton fra Køge Bugt og andre lokaliteter. I tabel 6 er vist EC 10- og EC 50-værdierne, som er fundet i en række sammenlignelige tests. De fleste tests er udført med kaliumdikromat i 4 timers tests (tabel 6A). Af denne tabel ses, at en betydelig variation i følsomheden kan forekomme på forskellige årstider. Der er en faktor 30 til forskel mellem laveste fundne EC 10-værdi (0,81 mg/l) og højeste fundne (25 mg/l). For EC 50-værdierne er faktoren 9.

En medvirkende årsag til spredningen på EC 10-værdierne kan dog også være den, større usikkerhed, hvormed EC 10 beregningsmæssigt bestemmes

i forhold til den beregningsmæssige usikkerhed på EC 50-værdierne.

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **Kaliumdikromat**
Testvarighed: **4 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.-lokalitet	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
			(mg/l)	(mg/l)	
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	9	1.4 (1.0-1.8)	22 (20-25)	6000
8/4-86 9 °C	Køge Bugt	9	3.2 (2.4-3.9)	39 (35-44)	8500
23/4-86 8 °C	Køge Bugt	9	0.81 (.49-1.2)	10 (8.7-12)	2100
24/4-86 8 °C	Gilleleje	17	1.9 (1.2-2.6)	18 (16-21)	1300
6/6-86 12 °C	Køge Bugt	10	1.9 (1.1-2.2)	>60 (87$)	2000
12/6-86 12 °C	Lillebælt	24	4.3 (1.9-6.9)	41 (34-53)	3000
15/8-86 15 °C	Stigsnæs	12	2.2 (1.5-3.0)	25 (22-28)	8000
18/8-86 15 °C	Køge Bugt	9	25 (15-31)	>60 (93$)	6800
17/9-86 15 °C	Køge Bugt	10	16 (13-19)	54 (50-60)	9600

$: Den beregnede værdi er større end højeste undersøgte koncentration.

Tabel 6A: Oversigt over resultater opnået med ét teststof (K_2Cr_2O7) og fast eksponeringstid (4 timer) af naturligt algeplankton.

For de øvrige udførte tests af 6 og 20 timers varighed med kaliumdikromat (tabel 6B og C) og for tests med PCP (tabel 6 D og F) er maksimalt

fundet forskelle på en faktor 6 mellem laveste og højeste EC-værdi.

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **Kaliumdikromat**
Testvarighed: **6 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.-lokalitet	Salinit. o/oo	EC10 (mg/l)	EC50 (mg/l)	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
2/11-84 15 °C	Køge Bugt	15	1.9 (0.9-2.9)	14 (9.0-26)	3600
29/11-84 12 °C	Køge Bugt	17	1.0 (0.3-1.8)	>10 (16$) (11-38)	1100
10/9-85 15 °C	Gilleleje	19	2.0 (1.2-2.8)	23 (19-29)	2300
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	9	1.2 (.9-1.5)	15 (13-17)	7000
20/11-85 10 °C	Kattegat	19	5.4 (1.7-12)	35 (15-230)	300
23/4-86 8 °C	Køge Bugt	9	1.4 (0.8-2.0)	9.1 (7.7-11)	1800
6/6-86 12 °C	Køge Bugt	10	2.8 (1.8-3.9)	54 (45-67)	2000

$: Den beregnede værdi er større end højeste undersøgte koncentration.

Tabel 6B: Oversigt over resultater opnået med ét **teststof (K_2Cr_2O7) og fast eksponeringstid (6 timer)** af naturligt algeplankton.

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **Kaliumdikromat**
Testvarighed: **20 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.- lokalitet	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
			(mg/l)	(mg/l)	
19/9-85 15 °C	Køge Bugt	9	0.13 (.08-.2)	4.2 (3.6-5.0)	6000
8/4-86 9 °C	Køge Bugt	9	0.54 (.32-.76)	5.0 (3.9-6.8)	7000
18/8-86 15 °C	Køge Bugt	9	0.41 (.20-.65)	7.4 (5.4-11)	7300

Tabel 6C: Oversigt over resultater opnået med ét teststof (K_2Cr_2O7) og fast eksponeringstid (20 timer) af naturligt algeplankton.

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **PCP**
Testvarighed: **4 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.- lokalitet	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
			(mikrogram / L)		
12/11-85 10 °C	Kattegat	20	13 (8-19)	195 (156-261)	800
23/4-86 8 °C	Køge Bugt	9	3.8 (2.6-5.1)	34 (29-42)	2100
24/4-86 8 °C	Gilleleje	17	22 (* -47)	>100	1300
6/6-86 12 °C	Køge Bugt	10	13 (11-16)	>100 (131$)	2000
12/6-86 12 °C	Lillebælt	24	8.6 (2.1-16)	56 (37-93)	3000

$: Den beregnede værdi er større end højeste undersøgte koncentration.
* : Værdien kan ikke beregnes.

Tabel 6D: Oversigt over resultater opnået med ét teststof (PCP) og fast eksponeringstid (4 timer) af naturligt algeplankton.

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **PCP**
Testvarighed: **6 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.- lokalitet	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
			(mikrogram / L)		
10/10-85 15 °C	Rungsted	14	6 (2-11)	36 (25-46)	22000
12/11-85 10 °C	Kattegat	20	5 (* -22)	63 (8- *)	900

* : Værdien kan ikke beregnes.

Tabel 6E: Oversigt over resultater opnået med ét teststof (PCP) og fast eksponeringstid (6 timer) af naturligt algeplankton.

Det er ikke muligt ud fra de opnåede resultater at finde generelle tendenser for årstidsvariationen. F.eks. ses, at algeplankton indsamlet 19/9-85 i Køge Bugt var væsentlig mere følsomt end algeplankton indsamlet samme sted 17/9-86. Af tabel 7, som viser nogle specielt udvalgte resultater af tests udført næsten samtidig ses endvidere, at der ikke kun er en variation igennem året og fra år til år, men også fra lokalitet til lokalitet.

At en sådan variation kunne forekomme var ventet, fordi algeplanktonets artssammensætning varierer igennem året. I bilag 1 er givet oversigt over de væsentligste grupper af algearter i plankton anvendt i slutningen af 1985 og 1986.

Algeplanktonet indsamlet i Køge Bugt 23/4-86 og ved Gilleleje 24/4-86 (tabel 7 og bilag 1) ses at være helt forskelligt mht. dominerende hovedgrupper. Køge Bugt-planktonet var domineret af kiselalger og Gilleleje-planktonet af flagel-

later, der var noget mindre følsomme end kiselalgerne fra Køge Bugt (bilag 2.8 og 2.9).

Testorganismer: **Naturligt algeplankton**
Teststof: **Kaliumdikromat og PCP**
Testvarighed: **4 timer**

Dato Testtemp.	Indsaml.-lokalitet	Salinit. o/oo	EC10	EC50	Kontrol-DPM /100 ul ^{14}C-opl.
			(mg/l)	(mg/l)	
23/4-86 8 °C	Køge Bugt	9	0.81 (.49-1.2)	10 (8.7-12)	2100
24/4-86 8 °C	Gilleleje	17	1.9 (1.2-2.6)	18 (16-21)	1300
23/4-86 8 °C	Køge Bugt	9	3.8 (2.6-5.1)	34 (29-42)	2100
24/4-86 8 °C	Gilleleje	17	22 (* -47)	>100	1300

* : Værdien kan ikke beregnes.

Tabel 7: Resultater opnået med **naturligt algeplankton udtaget på samme tidspunkt** men på **forskellige lokaliteter.**

Det er imidlertid ud fra artssammensætningen vanskeligt at korrelere denne til følsomheden. F.eks. ses algeplankton fra Stigsnæs indsamlet 15/8-86 (bilag 1) at være domineret af dinoflagellater og samtidig have en følsomhed overfor dikromat omtrent som plankton fra Køge Bugt indsamlet 8/4-86, der var domineret af kiselalger.

For en vurdering af algeplanktonets følsomhed ved tests af afløbsvand synes det derfor hensigtsmæssigt at medtage nogle få koncentrationer af et referencestof og eventuelt supplere med et skøn over planktonets gruppemæssige artssammensætning.

7.5. Iltforbrugende spildevandsprøver

For en vurdering af om inkubation af iltforbrugende spildevandprøver natten over (dvs. 16 timer i mørke) er praktisk muligt, er gennemført tests med spildevandsprøver med stort BOD-indhold.

Et lossepladsperkolat, som havde givet stimuleringer, blev først taget i anvendelse, men ved præliminære undersøgelser viste spildevandet intet signifikant iltforbrug ved 20 timers inkubation.

Derefter blev anvendt en syntetisk spildevandsprøve med et højt BOD-indhold, men i løbet af 20 timer faldt iltindholdet kun 10-15%, og samtidig var prøven mod forventning toksisk overfor algerne ved koncentrationer, hvor der ikke var et signifikant iltforbrug.

Med henblik på at vurdere betydningen af en faldende iltkoncentration er i stedet valgt at vise resultatet af en test med sulfit (tabel 8 og figur 1) (udført som led i en rekvireret opgave).

Af figur 1 ses, en stimulering af fotosyntesen ved koncentrationer fra 2-50 mg SO_3^{--}/l på 20-30%. Ved højere koncentrationer fandtes en hæmmende effekt. Ved testen blev iltindholdet ikke målt, men det er kendt, at sulfit hurtigt oxideres i havvand, og resultaterne tyder derfor på, at fotosyntesen stimuleredes af et lavt indhold af ilt i testopløsninger. Ilt (O_2) er algernes "affaldsstof" ved fotosyntesen, og et lavt iltindhold i det omgivende vand gør, at dette hurtigere kan diffundere ud i det omgivende, vand og at fotosynteseprocesserne derved kan forløbe hurtigere.

Eksemplet viser, at fotosyntesen kan stimuleres ved lavt iltindhold. Det er imidlertid ikke afklaret, hvorvidt algerne vil reagere på et lavt iltindhold i en mørkeperiode.

Da spildevandet testes i fortyndinger og inkuberes i flasker med en luftboble, vil antage-

lig kun meget stærkt iltforbrugende prøver give et betydende fald i iltindhold. Ved 20 timers tests må det imidlertid anbefales ved en præliminær inkubation uden alger at undersøge, hvorvidt iltindholdet falder væsentligt ved de koncentrationer, som ønskes undersøgt ved fotosyntesetesten.

Hæmning af fotosyntesen hos naturligt algeplankton fra Køge Bugt

med stoffet:

sulfit (SO3--) (mg / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	6241.0	-
Kontrol 2	5891.0	-
Kontrol 3	6423.0	-
Kontrolgennemsnit :	6185.0	0
2.0	7082.0	0.0
2.0	7375.0	0.0
2.0	7698.0	0.0
5.0	7398.0	0.0
5.0	7409.0	0.0
5.0	7743.0	0.0
10.0	7778.0	0.0
10.0	8368.0	0.0
10.0	7964.0	0.0
20.0	7843.0	0.0
20.0	8158.0	0.0
20.0	8060.0	0.0
50.0	7926.0	0.0
50.0	7548.0	0.0
50.0	7604.0	0.0
100.0	6145.0	0.6
100.0	5515.0	10.8
100.0	6152.0	0.5
200.0	2901.0	53.1
200.0	2972.0	51.9
200.0	4751.0	23.2
500.0	2308.0	62.7
500.0	2348.0	62.0
500.0	2114.0	65.8

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 9

EC 10 værdi : 140 95 % konfidensinterval : (71: 199)
EC 50 værdi : 335 95 % konfidensinterval : (236: 671)

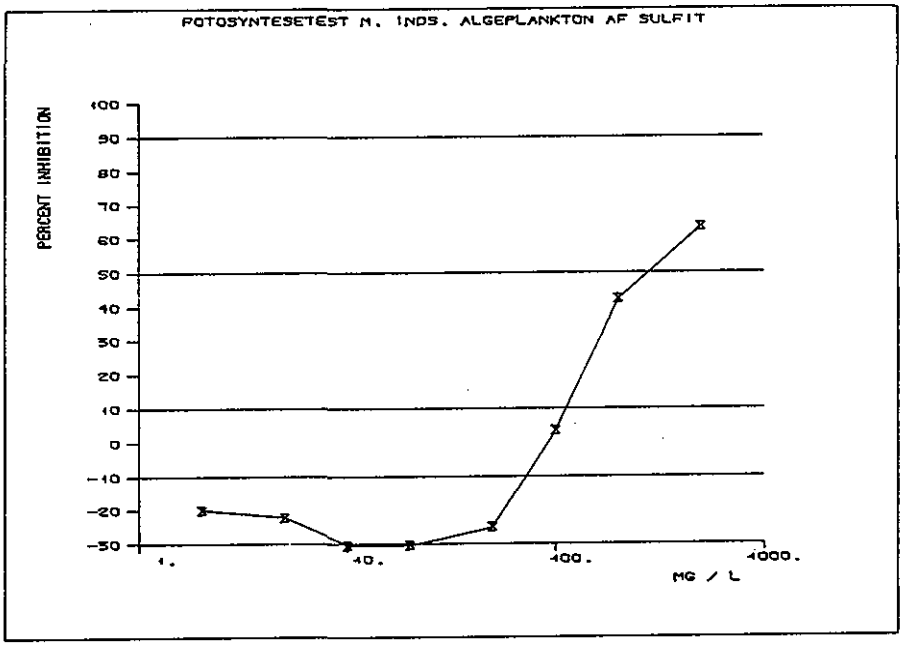
Korrelation : 0.86

Vægtfaktorerne er:

1	1.00000	6	1.00000
2	1.00000	7	1.00000
3	1.00000	8	1.00000
4	1.00000	9	1.00000
5	1.00000		

MiddelW = 1.00000

Tabel 8: Resultat af fotosyntesetesten af sulfit med naturligt algeplankton fra Køge Bugt som testorganismer samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Figur 2: Ulineær dosis-responskurve for fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Køge Bugt af teststoffet sulfit.

7.6. Mørkefiksering

Mørkefixering af ^{14}C har intet med fotosyntese at gøre, og alle organismer er i stand til at optage CO_2 i mørke. Ved inkubation af Skeletonema costatum i mørke i 4 timer eksponeret for en fortyndingsrække af dikromat er undersøgt mørkefikseringens betydning i relation til fikseringen i lys (fotosyntesen) ved de toksiske koncentrationer.

I tabel 9 er vist resultatet af den gennemførte undersøgelse. Det målte kontrol-DPM i lys var 3330 (bilag 2.3.) Det vil sige, at mørkefikseringen var 1,4% af lysfikseringen og derfor må anses for ubetydeligt.

Ved databehandlingen var det således unødvendigt at korrigere for mørkefikseringen.

I specielle tilfælde kan mørkefikseringen dog være væsentlig større /16/. P-begrænsede og især N-begrænsede algekulturer er vist at have en mørkefiksering på henholdsvis ca 5 % og ca 38 %. Dette er udtryk for en faldende fotosyntese frem for en kvantitativt større mørkefiksering. Også kraftig bakterievækst kan give anledning til en betydelig mørkefiksering /16/. Ved test af spildevand må det derfor anses for en fordel, hvis prøven inden testen har været dybfrosset, hvorved mange bakterier dræbes, og eventuelt tillige filtreret, hvilket kan være nødvendigt for overhovedet at filtrere testfortyndingerne ved afslutningen.

Generelt vil en korrigering for mørkefikseringen være unødvendig. En mørkefixering på f.eks. 10 % vil ikke påvirke EC-værdierne i noget væsentligt omfang.

Hæmning af mørkefixeringen hos kiselalgen Skeletonema costatum

med stoffet:

kaliumdikromat, 4 timer i mørke (mg / l)

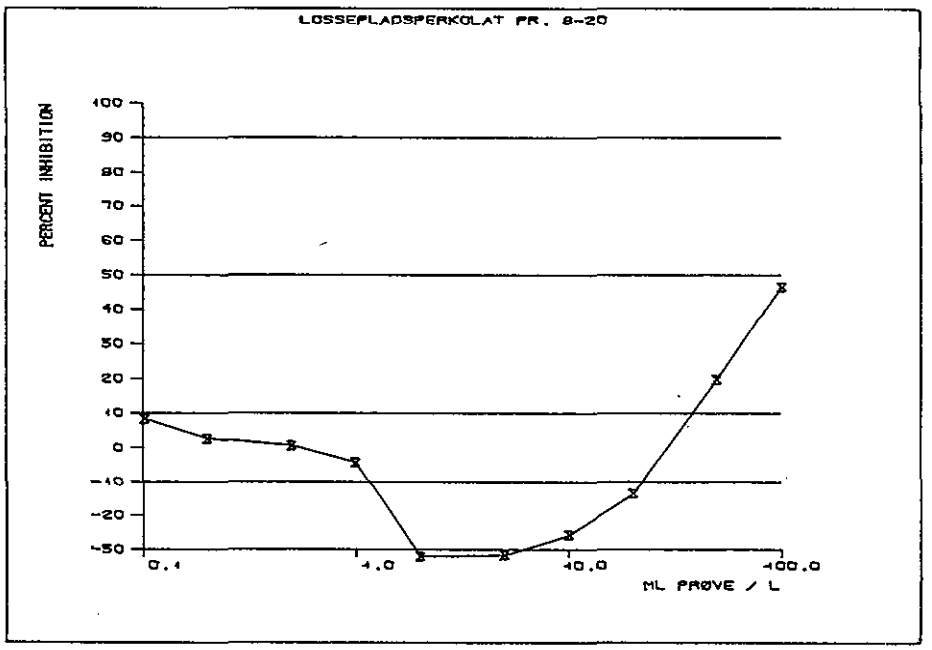
Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ mørkefixering	Hæmning i procent
Kontrol 1	76.0	-
Kontrol 2	35.0	-
Kontrol 3	64.0	-
Kontrol 4	62.0	-
Kontrol 5	21.0	-
Kontrol 6	19.0	-
Kontrolgennemsnit :	46.2	0
0.2	27.0	41.5
0.2	22.0	52.3
0.2	22.0	52.3
0.5	26.0	43.7
0.5	18.0	61.0
0.5	22.0	52.3
1.0	31.0	32.9
1.0	25.0	45.8
1.0	24.0	48.0
2.0	23.0	50.2
2.0	24.0	48.0
2.0	20.0	56.7
3.0	26.0	43.7
3.0	32.0	30.7
3.0	26.0	43.7
6.0	19.0	58.8
6.0	23.0	50.2
6.0	13.0	71.8
10.0	14.0	69.7
10.0	15.0	67.5
10.0	19.0	58.8
20.0	16.0	65.3
20.0	16.0	65.3
20.0	20.0	56.7

Tabel 9: **Mørkefiksering af ^{14}C i Skeletonema costatum i test med kaliumdikromat.**

7.7. Fotosyntesestimulerende prøver

En prøve af lossepladsperkolat, som havde vist stimulerende effekt ved lave koncentrationer overfor naturligt algeplankton fra Kattegat (figur 2) blev valgt som testobjekt for denne undersøgelsesdel.



Figur 3: Ulineær dosis-responskurve af testresultat af fotosyntesete med lossepladsperkolat (ufiltreret) og naturligt algeplankton.

Følgende forhold blev anset for potentielle årsager til stimuleringen:

a) Et højt næringssaltindhold som stimulerede fotosyntesen hos næringssaltbegrænset plankton.

b) Et iltforbrug af prøven, som forårsagede et lavt iltindhold ved nogle utoksiske koncentrationer, ved hvilke fotosyntesen derefter kunne forløbe hurtigere.

c) Et højt indhold af partikler, på hvilke ^{14}C-mærket carbonat kunne adsorberes/udfældes. Adsorberet/udfældet bicarbonat vil blive tilbageholdt på filtrene sammen med algerne

ved filtreringen og derefter talt ved scintillationstællingen tillige med det af algerne optagne ^{14}C-mærkede kulstof.

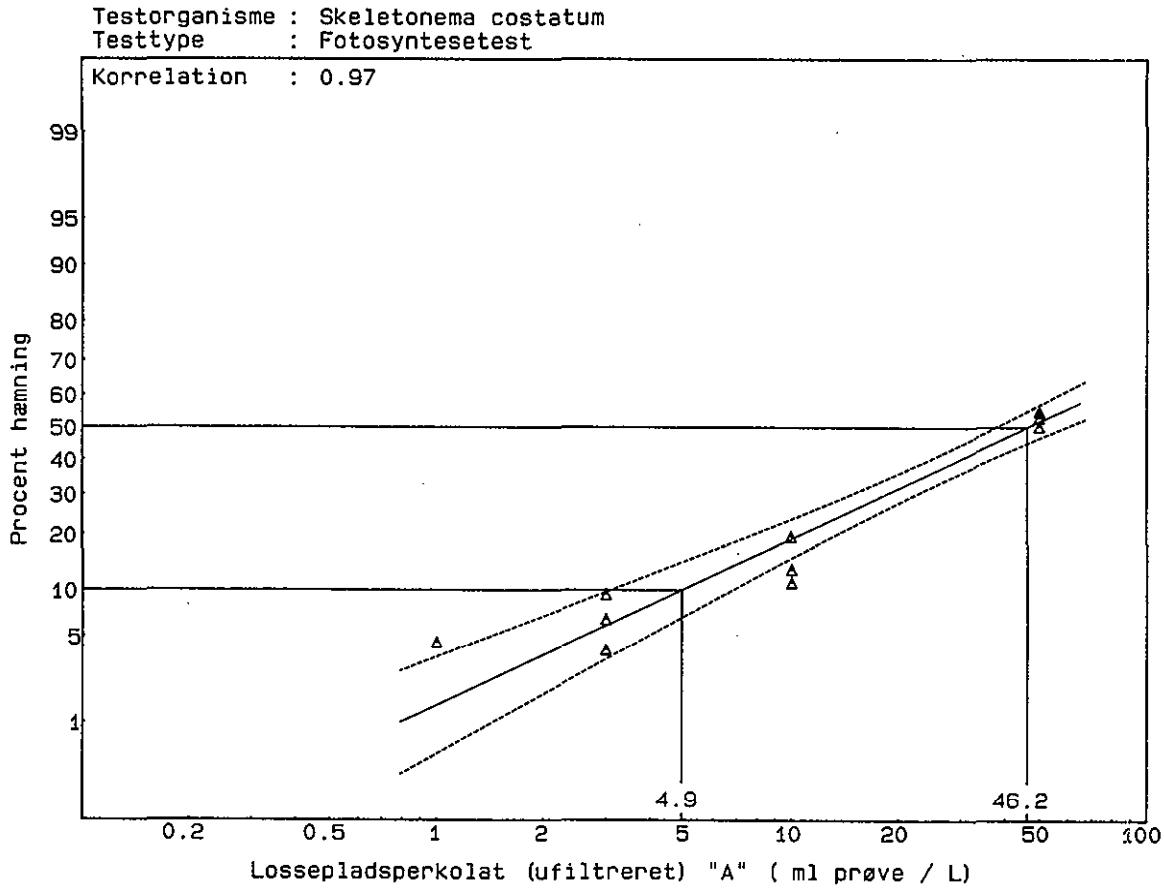
ad a: Der har ikke kunnet konstateres en øget fotosyntese ved tilsætning af næringssaltene Si, N og P til naturligt algeplankton, som blev anset for næringssaltbegrænset. Det vurderes derfor som mindre sandsynligt, at det er næringssalte, som har forårsaget den observerede stimulering.

ad b: Perkolatets iltforbrug blev undersøgt ved inkubation i fotosynteseinkubatoren i 20 timer. Ved denne inkubationsform kunne ikke konstateres noget iltforbrug. Den observerede stimulering var således ikke forårsaget af prøvens iltforbrug.

ad c: Perkolatet viste sig at have et meget højt indhold af partikler. Prøven blev herefter underkastet følgende tests med Skeletonema costatum som testorganisme:

- Normal behandling (dvs. pH-justering til 8,0)
- Forfiltrering gennem 0,45µm filter (og pH-justering)
- Test, hvor ingen alger blev tilsat.

Resultatet af algetestene med ufiltreret og filtreret prøve er vist i tabel 11 og 12 og i figur 3 og 4. Det ses heraf, at der ved de undersøgte koncentrationer ikke kunne konstateres nogen stimulering, hvilket muligvis skyldes en større følsomhed hos Skeletonema end hos det i første omgang anvendte plankton fra Kattegat (vurderet på basis af tests med kaliumdikromat- se bilag 2.10 og tabel 1). Desuden ses den filtrerede prøve at være lidt mindre toksisk (højere EC 50-værdi) end den ufiltrerede prøve.



Figur 4: Dosis-responskurve samt 95% konfidensintervaller for fotosyntesetesten med kiselalgen Skeletonema costatum af ufiltreret lossepladsperkolat.

Hæmning af fotosyntesen hos Skeletonema costatum

med stoffet:

Lossepladsperkolat (ufiltreret) "A" (ml prøve / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i ml prøve / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	9505.0	-
Kontrol 2	8088.0	-
Kontrol 3	8746.0	-
Kontrol 4	8143.0	-
Kontrol 5	9355.0	-
Kontrolgennemsnit :	8767.4	0
1.0	8372.0	4.5
3.0	8195.0	6.5
3.0	8420.0	4.0
3.0	7942.0	9.4
10.0	7613.0	13.2
10.0	7047.0	19.6
10.0	7793.0	11.1
50.0	4116.0	53.1
50.0	4358.0	50.3
50.0	3952.0	54.9

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 10

EC 10 værdi : 4.9 95 % konfidensinterval : (3.1: 6.8)
EC 50 værdi : 46.2 95 % konfidensinterval : (37.7: 59.1)

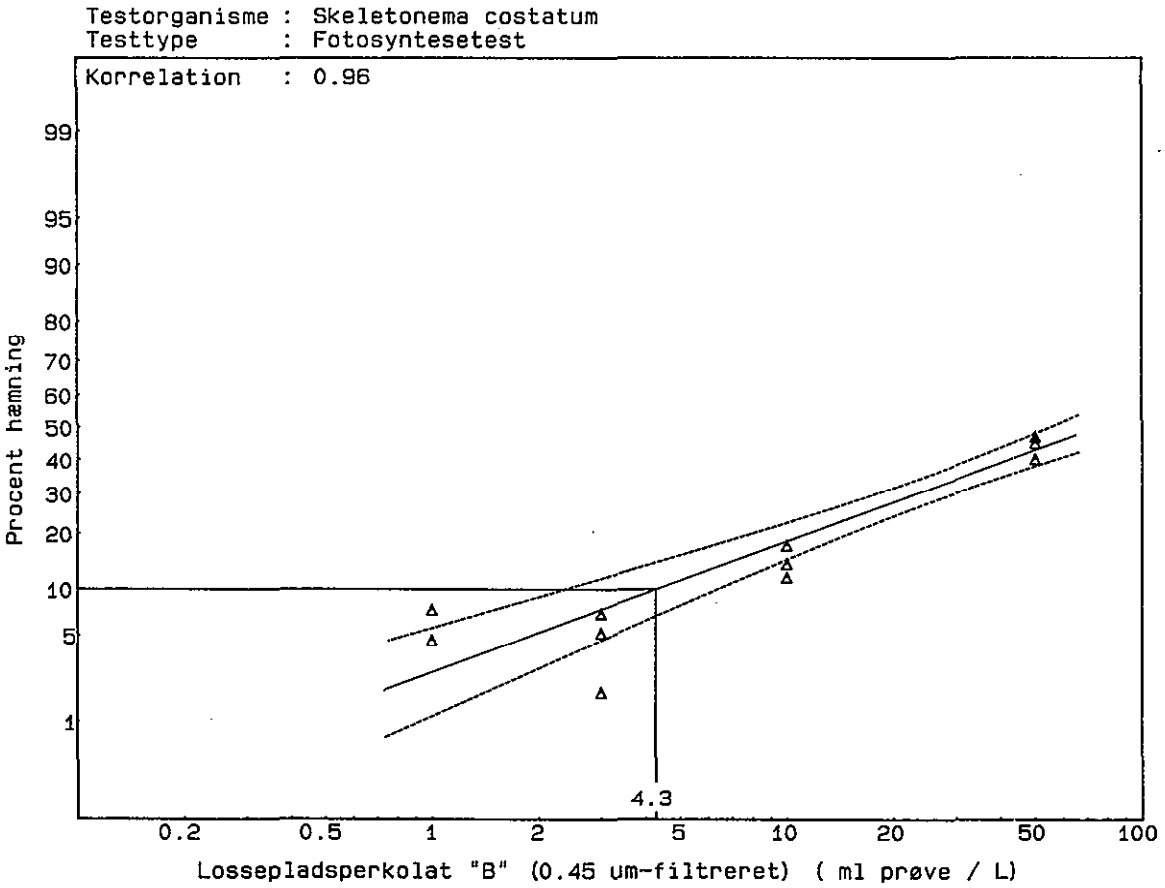
Korrelation : 0.97

Vægtfaktorerne er:

1	0.12991
2	0.23328
3	0.10485
4	0.40618
5	0.65642
6	1.10416
7	0.51688
8	2.28550
9	2.29886
10	2.26397

MiddelW = 0.06923

Tabel 11: **Resultat af fotosyntesetesten af ufiltreret lossepladsperkolat med kiselalgen Skeletonema costatum samt statistisk behandling af forsøgsdata.**



Figur 5: Dosis-responskurve samt 95% konfidensintervaller for fotosyntesetesten med kiselalgen Skeletonema costatum af **0,45 µm-filtreret lossepladsperkolat.**

Hæmning af fotosyntesen hos Skeletonema costatum

med stoffet:

Lossepladsperkolat "B" (0.45 um-filtreret) (ml prøve / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i ml prøve / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	9505.0	-
Kontrol 2	8088.0	-
Kontrol 3	8746.0	-
Kontrol 4	8143.0	-
Kontrol 5	9355.0	-
Kontrolgennemsnit :	8767.4	0
1.0	8365.0	4.6
1.0	8114.0	7.5
3.0	8609.0	1.8
3.0	8313.0	5.2
3.0	8151.0	7.0
10.0	7229.0	17.5
10.0	7733.0	11.8
10.0	7538.0	14.0
50.0	4799.0	45.3
50.0	4630.0	47.2
50.0	5233.0	40.3

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 11

EC 10 værdi : 4.3 95 % konfidensinterval : (2.4: 6.4)

Korrelation : 0.96

Vægtfaktorerne er:

1	0.14930
2	0.31907
3	0.03173
4	0.18106
5	0.29218
6	1.07552
7	0.63035
8	0.80093
9	2.53687
10	2.56036
11	2.42263

MiddelW = 0.06185

Tabel 12: Resultat af fotosyntesetesten af 0,45 µm-filtreret lossepladsperkolat med kiselalgen Skeletonema costatum samt statistisk behandling af forsøgsdata.

Ved testen, som blev udført uden alger (tabel 13) kunne ikke konstateres forøgelse af tælletallene ved koncentrationer, hvor partikelindholdet var højt. Der er således intet, der tyder på, at partikelindholdet har givet en metodisk fejl i form af højere tælletal.

Årsagen til prøvens stimulerende effekt er således ikke klarlagt. Efter de foretagne undersøgelser må det antages, at stimuleringen var reel og ikke skyldes et metodemæssigt artefact.

Det kan herefter konkluderes, at stimuleringen skyldes et indhold af opløste stoffer i prøven. Disse kunne være mikronæringsstoffer, som de, der tilsættes til dyrkningsmediet for Skeletonema, hvilket kunne forklare, at prøven ingen stimulerende effekt havde på denne testorganisme. Det kan dog ikke med sikkerhed fastslås på det nuværende grundlag, om stimuleringen skyldes mikronæringsstoffer, eller om der er tale om en toksisk påvirkning, som giver anledning til en kortvarig øget fotosyntese betinget af fysiologisk ubalance.

Hæmning af fotosyntesen hos Test uden alger

med stoffet:

Lossepladsperkolat (ufilreret) "C" (ml prøve / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i ml prøve / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	42.0	-
Kontrol 2	34.0	-
Kontrol 3	43.0	-
Kontrolgennemsnit :	39.7	0
10.0	35.0	11.8
10.0	20.0	49.6
10.0	28.0	29.4
50.0	22.0	44.5
50.0	24.0	39.5
50.0	10.0	74.8

Tabel 13: Undersøgelse af ^{14}C-fixering på partikler (gennemført uden alger).

7.8. Skylning af fotosyntesefiltre med HCl

Efterskylning af ^{14}C-filtre med 20 ml 0,1N HCl-opløsning i 20 °/₀₀ saltvand blev anset for en mulig løsning af et eventuelt metodemæssigt problem med partikelholdige afløbsprøver. En eventuel yderligere fordel kunne være, at brugen af formalin kunne undgås.

I tabel 14 er vist resultatet af kontroltests henholdsvis uden og med HCl-skylning af både naturligt algeplankton og den laboratoriedyrkede kiselalge Skeletonema costatum. Det fremgår af tabellen, at ved skylningen med syre tabes 20-30% af aktiviteten.

Undersøgelsen af fotosyntesen hos naturligt algeplankton fra Lillebælt uden HCl-skylning

Kontrol 1:	6716
Kontrol 2:	7210
Kontrol 3:	7128
Kontrol 4:	7228
Kontrol 5:	7628
Kontrol 6:	7930
Kontrol 7:	6493
Kontrol 8:	6745
Kontrol 9:	7386
Kontrol 10:	7092
Kontrol 11:	7543
Kontrol 12:	7294
Kontrolgennemsnit:	7199

Undersøgelsen af fotosyntesen hos naturligt algeplankton fra Lillebælt med HCl-skylning

Kontrol 1:	5564
Kontrol 2:	4787
Kontrol 3:	5412
Kontrol 4:	5096
Kontrol 5:	4746
Kontrol 6:	5082
Kontrol 7:	5105
Kontrol 8:	5384
Kontrol 9:	4920
Kontrol 10:	4867
Kontrol 11:	4971
Kontrol 12:	5795
Kontrolgennemsnit:	5144

Undersøgelsen af fotosyntesen hos Skeletonema costatum uden HCl-skylning

Kontrol 1:	9505
Kontrol 2:	8088
Kontrol 3:	8637
Kontrol 4:	8143
Kontrol 5:	9355
Kontrolgennemsnit:	8746

Undersøgelsen af fotosyntesen hos Skeletonema costatum med HCl-skylning

Kontrol 1:	7808
Kontrol 2:	6897
Kontrol 3:	7189
Kontrol 4:	6929
Kontrol 5:	6359
Kontrolgennemsnit:	6844

Tabel 14: **Effekt af saltsyre-skylning (HCl-skylning)** af fotosyntesefiltre fra kontrolmålinger med naturligt algeplankton og kiselalgen Skeletonema costatum.

En HCl-skylning, som den afprøvede, er derfor ikke en egnet fremgangsmåde. Muligvis kan en svagere syre anvendes, men på nuværende tidspunkt må anbefales, at anvende normalproceduren, dvs. at lægge filtrene over 40% formalin i ca 2 min og derefter ca 5 min over rygende HCl før de lægges i tørreeksikator.

7.9. Test af prøver med høj alkalinitet

Alkaliniteten (CO_2+HCO_3+CO_3^{--}) i en vandprøve vil være afgørende for den resulterende specifikke aktivitet ved tilsætning af ^{14}C-mærket bicarbonat.

Alkaliniteten i oceanvand (35°/∘∘) er nær 2,5 mmol/l og i saltvand med 15°/∘∘ salinitet er alkaliniteten 1,1 mmol /14/. (Alkaliniteten målt i 20°/∘∘ algemedium fremstillet af Kattegatvand er målt til 2,1 mmol/l).

Ved test af spildevand, hvis alkalinitet afviger fra det saltvand, som anvendes i testen, vil der ved testkoncentrationerne være en afvigende alkalinitet i forhold til kontrollen. Dette får direkte indflydelse på målingen af ^{14}C-optagelsen, da algerne optager $^{14}CO_2$ og $^{12}CO_2$ i det forhold, disse er til stede ved den pågældende spildevandskoncentration.

Da spildevand kun undtagelsesvis testes i koncentrationer højere end 100 ml/l dvs. en 10% opløsning, er problemet af mindre betydning, hvis alkaliniteten er lavere i prøven end i saltvandet, da forskellen mellem kontrollen og højeste koncentration (100 ml/l) da højst kan blive 10% ved en alkalinitet på 0 mmol/l i spildevandet.

Alkaliniteten i spildevandet kan imidlertid blive flere gange større end i saltvand, og i så fald vil der ved testkoncentrationerne være en større alkalinitet end i kontrollen, og ved ^{14}C-tilsætning vil den specifikke aktivitet af ^{14}C falde med stigende spildevandskoncentration, hvilket vil betyde et fald i ^{14}C-assimileringen

med stigende koncentration. Et sådant fald vil kunne forveksles med en toksisk effekt.

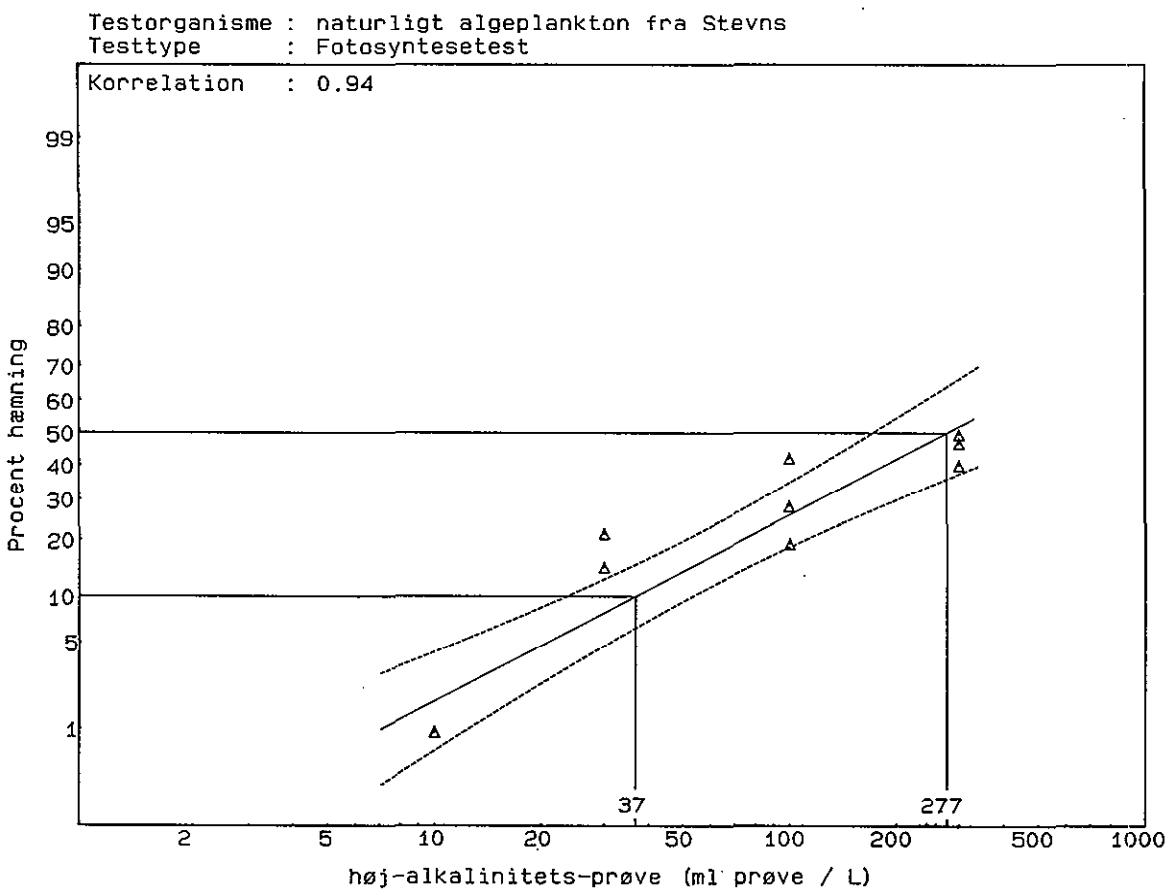
Et eksempel herpå er vist i figur 5, hvor der tilsyneladende er en signifikant hæmmet fotosyntese ved 37 ml prøve/l og en halvering af fotosyntesen ved 277 ml prøve/l.

Den testede vandprøves alkalinitet var 5,0 mmol/l, og den anvendte saltvandsprøve med algeplankton havde en salinitet på 15 °/∘∘ (alkalinitet: 1,1 mmol/l). Den resulterende alkalinitet ved 277 ml/l bliver da 2,2 mmol/l, og ved 37 ml/l bliver alkaliniteten 1,25 mmol/l. Den specifikke aktivitet af ^{14}C-bicarbonat ved de nævnte koncentrationer bliver da henholdsvis 50% og 88% af aktiviteten i kontrollen. Den nedsatte ^{14}C-assimilering kan således fuldtud tilskrives spildevandsprøvens høje alkalinitet, og prøven kan anses for at være uden toksisk effekt ved fotosyntesetesten.

Eksemplet viser, at det er muligt at korrigere for en afvigende alkalinitet i spildevandsprøver, og det må anbefales generelt at måle alkalinitet i de prøver, som underkastes en fotosyntesetest med anvendelse af ^{14}C-mærket bicarbonat, og på grundlag af dette måleresultat eventuelt at foretage en korrektion.

Ovennævnte alkalinitetsberegning er for havvand baseret på tabelopslag. Erfaringerne viser imidlertid, at det er hensigtsmæssigt tillige at måle alkaliniteten i saltvandsprøven med algeplankton og ikke basere på alkalinitetsbestemmelsen på tabelopslag, da dette specielt for vand udtaget kystnært kan medføre fejl /15/.

Det anbefales således rutinemæssigt at måle alkalinitet i såvel feltprøve/algemedium som i den undersøgte vandprøve.



Figur 6: Toksicitetstest af spildevandsprøve med høj alkalinitet med naturligt algeplankton

8. DISKUSSION

8.1. Valg af testorganismer

Ved en sammenligning af testresultaterne af kaliumdikromat opnået med henholdsvis Skeletonema costatum (tabel 3) og med naturligt algeplankton (tabel 6 B) ses, at variationen på de fundne EC-værdier er mindre for den laboratoriedyrkede alge (6 timers EC 10: 1,4-1,6 mg/l; 6 timers EC 50: 3,6-5,0 mg/l) end for den naturlige algepopulation (6 timers EC 10: 1,0-5,4 mg/l; 6 timers EC 50: 9,1-54 mg/l).

Den større variation hos den naturlige algepopulation skyldes, at der her optræder flere arter med forskellige genetiske egenskaber herunder forskellige reaktioner på påvirkning af toksisk stof. Fotosynteseprocessens følsomhed hos forskellige arter i den naturlige population kan således være meget forskellige, dvs. at de koncentrationer, ved hvilke hæmninger indtræder, kan være væsentlig forskellige for de enkelte arter. Tillige er genpuljen hos de enkelte naturligt forekommende arter muligvis ikke så ensartet som hos laboratoriedyrkede algearter, der holdes i en mere eller mindre konstant (vegetativ) vækst under konstante betingelser. Da endvidere artssammensætningen af algerne varierer igennem året, findes der ikke overraskende en større spredning på resultaterne opnået med naturligt algeplankton end med den laboratoriedyrkede Skeletonema costatum.

Den større ensartethed af genpuljen hos laboratoriedyrkede alger betyder tillige, at algecellerne i en kultur begynder at hæmmes ved næsten samme koncentration, hvilket betyder af forskellen på EC 10-værdier og EC 50-værdier generelt vil være relativt noget mindre end hos blandpopulationer af alger (stejlere dosisresponskurve hos de dyrkede alger).

Brugen af naturligt algeplankton i en spildevandskontrolsituation betyder således, at man får et resultat, som er mere direkte relaterbart til recipienten end ved brugen af en algekultur. Sammenligningen af testresultater fra gang til gang kan imidlertid være vanskelig, fordi artssammensætningen kan ændres, også selvom et referencestof hver gang medundersøges, idet man ikke kan regne med, at en ændring i artssammensætningen af algeplanktonet vil afspejles på samme måde af spildevandets indhold af stoffer og af referencestoffet.

Ved anvendelsen af en kulturalge vil resultaterne fra gang til gang i højere grad være sammenlignelige og dermed vil tolkningen af en evt. overskridelse af kravværdier kunne gøres mere sikkert end med naturligt algeplankton.

Der vil således med begge typer af testorganismer være nogle informationer, man opnår med den ene type testorganismer, men ikke med den anden.

Ved valg af testorganismer til et kontrolprogram bør man derfor på forhånd gøre sig klart, om man er mere interesseret i en informationstype end i en anden og ud fra disse overvejelser foretage sit valg af testorganismer.

8.2. Valg af testperiode i metodeforslaget

Af tabel 6 A fremgik, at der på 4 timers EC 10-værdier for kaliumdikromat opnået med naturligt algeplankton kunne være op til en faktor 30 til forskel mellem lavest fundne og højest fundne værdi. På 4 timers EC 50-værdierne kunne være en faktor på ca 9 til forskel. På de tilsvarende 6 timers EC-værdier (tabel 6B) fandtes faktorerne til henholdsvis 5 og 6.

Hensynet til ved kontrol af vandprøver at opnå så lille variation på resultaterne som muligt taler således for at anvende en testvarig-

hed på 6 timer også selv om sammenligningsgrundlaget for ovennævnte faktorer ikke er identisk.

De rent praktiske forhold omkring testens afvikling taler ikke specielt for anvendelse af en 4 timers testvarighed, idet indsamling af feltprøve og gennemførelse af en 4 timers test kun sjældent vil kunne gennemføres indenfor en normal arbejdsdags længde. Det vil som regel være nødvendigt at indsamle feltprøven dagen før testens afvikling, og i så fald kan en 6 timers test gennemføres uden en væsentlig forlængelse af arbejdsdagen, når blot forberedelserne er gjort i forvejen.

Derfor anbefales det ved rutinetests at foretage indsamling af feltprøve og gøre forberedelse til testen dagen før dennes afvikling og at gennemføre testen som en 6 timers test.

Ved karakterisering af vandprøver kan tillige anvendes en længere testperiode, og det anbefales her at indsamle feltprøve og starte testen samme dag og afslutte den følgende dag efter en testvarighed på ialt 20 timer, hvoraf de første 14 timer foretages i mørke og de sidste 6 timer i lys. Mørkeperioden vil sikre, at biomassen i kontrollen og ikke-hæmmende koncentrationer vil være af nogenlunde samme størrelse ved testens slutning som i hæmmende koncentrationer trods en eventuel varierende biomasseforøgelse i lysperioden.

I det udarbejdede metodeforslag er 6 og 20 timer således angivet som de testperioder, der kan anvendes ved henholdsvis normal rutinekontrol og ved karakterisering af vandprøver.

9. KONKLUSION

På grundlag af de gennemførte undersøgelser kan konkluderes følgende:

- Eksponeringstider på 4 timer giver EC-værdier, der er mindre end en faktor 2 til forskel fra de EC-værdier, som findes efter 6 timers eksponering.

- En forøgelse af eksponeringstiden fra 4 til 20 timer (16 timer i mørke efterfulgt af 4 timer i lys) giver lavere EC-værdier (mere følsomt respons). Ved test af dikromat var forskellen en faktor 5-20, mens forskellen maksimalt var 3 ved test af pentachlorphenol (PCP).

- En 6 timers testvarighed ved rutineundersøgelser er valgt frem for en 4 timers testperiode for herved at reducere variationen på resultater opnået med naturligt algeplankton.

- Ved karakterisering af vandprøver kan anbefales tillige at anvende en 20 timers testperiode, idet der herved ofte vil kunne opnås et mere følsomt respons.

- Tilsætning af næringssalte til algeplankton, som kunne formodes at være næringssaltbegrænset (kvælstof), havde ingen betydning for de fundne effektgrænser. En svag nedgang i kontrollens ^{14}C-assimilation blev observeret i flere tilfælde. Det anbefales derfor ved tests af spildevandsprøver, som indeholder næringssalte, at tilsætte næringssalte til algeplanktonprøven for at modvirke en ændret ^{14}C-assimilering (i forhold til kontrollen) forårsaget af spildevandets næringssaltindhold.

- Der er observeret en variation i naturligt algeplanktons følsomhed overfor toksiske stoffer. Variationen er observeret igennem året, fra sted til sted og fra år til år.

- Det har ikke været muligt at påpege enkelte faktorer som årsag til variationen i følsomhed. For at vurdere naturligt algeplanktons følsomhed ved tests af spildevand anbefales derfor tillige at teste et referencestof, f.eks. dikromat.

- Ved forsøg med forskellige spildevandsprøver var ingen så iltforbrugende, at der skete et væsentligt fald i iltindholdet ved de undersøgte koncentrationer. Et lavt iltindhold er imidlertid vist at kunne stimulere algernes fotosyntese. Ved 20 timers tests (hvor algerne inkuberes i mørke i 16 timer) anbefales at undersøge, ved en præliminær inkubation uden alger, hvorvidt iltindholdet falder væsentligt ved de koncentrationer, som ønskes undersøgt ved fotosyntesetesten.

- Ved en undersøgelse af mørkefiksering blev fundet, at denne var 1,4% af lysfikseringen. Ved databehandling af forsøgsdata er det således unødvendigt at korrigere for mørkefikseringen.

- Ved undersøgelse af en fotosyntesestimulerende prøve med et højt partikelindhold, kunne den observerede stimulering hverken tilskrives partikelindholdet eller et iltforbrug ved de undersøgte koncentrationer. Prøvens næringssaltindhold (N, P og Si) blev ligeledes vurderet som værende uden betydning for forsøgsresultatet. Det blev derfor vurderet, at der antagelig var tale om en reel stimulering og ikke

et metodemæssigt artefact. Stimuleringen skyldtes opløste stoffer, muligvis mikronæringsstoffer eller evt. toksiske stoffer, som kan tænkes kortvarigt at fremkalde en fysiologisk ubalance med øget fotosyntese til følge.

- En skylning med 0,1 N HCl af filtrene med de frafiltrerede alger, som erstatning for behandling af filtre over formalin og rygende HCl, viste, at 20-30% af aktiviteten gik tabt. Den afprøvede procedure var derfor ikke en egnet fremgangsmåde.

- Det er vist, at det er muligt at korrigere for en afvigende alkalinitet i en spildevandsprøve i forhold til algeplanktonprøven. Det anbefales generelt at måle alkaliniteten i prøver, som indgår i ^{14}C-testen og på grundlag af måleresultatet eventuelt at foretage en korrektion.

Med det gennemførte projektarbejde anses dokumentationen for metoden tilvejebragt, og der er dermed basis for udarbejdelse af en færdig metodeforskrift. Et forslag til en sådan er givet i bilag 3.

10. REFERENCER

/1/ Walsh, G.D., Bahner, L.H., Horning, W.B.: "Toxicity of Textile Mill Effluents to Freshwater and Estuarine Algae, Crustaceans and Fishes". -Environmental Pollution (series A) 21, 169-179.

/2/ Walsh, G.E., Duke, K.M., Foster, R.B.: "Algae and Crustaceans as Indicators of Bioactivity of Industrial wastes". - Water Res. 16, 879-883. 1982.

/3/ Vandkvalitetsinstituttet, ATV (1979) (P. Rand): "Vandkvalitetsundersøgelser i Køge Bugt 1977/78". Delrapport 5: Toksiske effekter af spildevand. - Udført for Hovedstadsrådet

/4/ NORDFORSK (1982): "Ecotoxikologiska Metoder för Akvatisk Miljö. - Miljøvårdsserien. Publikation 1982:2

/5/ Giddings, J.M. Steward, A.J., O'Neill, R.V., and Gardner, R.H.: "An Efficient Algal Bioassay on Short-Term Photosynthetic Response". - Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium. ASTM STP 802, E.E. Bishop, R.D. Cardwell, and B.B. Heidolph, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia 1983, pp. 445-459

/6/ Lee, K. Nakwajko, C., Jack, T.R.: "Effects of Vanadium on Freshwater Algae". - Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, Nov. 7-9, 1987. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. 862, 297-310. 1979.

/7/ Granmo, Å., Kristinebergs Marinbiologiska Station. Statens Naturvårdsverk, Sverige. - (Personlig kommunikation).

/8/ Jensen, L., Pedersen, S.M., Nielsen, G.Æ.: "The Effect of Aromatic Hydrocarbons on the Productivity of Various Marine Algae". - (Manuskript)

/9/ Kusk. K. O.: "Comparison of the Effects of Aromatic Hydrocarbons on a Laboratory Alga and Natural Phytoplankton". - Botanica Marina XXIV, 611-613, 1981.

/10/ Hutchinson, T.C., Hellebust, J.A., Macky, D., Tam, D., Kauss, P.: "Relationsship of Hydrocarbon Solubility to Toxicity in Algae and Cellular Membrane Effects". - Symp. Oil Spill Control and Prevention, API-EPA, Los Angeles, 1979.

/11/ Kamp-Nielsen, L., Wium-Andersen, S.: "The Effect of Deleterious Concentrations of Copper on the Photosynthesis of Chlorella pyreniodisa. - Physiol. Plant. 1121-1133. 1969.

/12/ Källqvist, T., Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA). - (Personlig kommunikation)

/13/ Lee, D.R.: "Reference Toxicants in Quality Control og Aquastic Bioassays".- Aquatic Invertebrate Bioassays. ASSTM STP 715. A.L. BNuikema, Jr., and John Cairns, Jr., Eds., American Society for Testing and Materials 188-199 (1980).

/14/ Riley, J.P. & Skirrow, G.: - Chemical Oceanography, 2. edition, Vol. 1, Academic Press (1975).

/15/ Borum, J. & Sand-Jensen, K.
En almindelig fejl ved bestemmelse af marine planktonalgers primærproduktion. - Vand & Miljø 2/1986. Pp. 74-75.

/16/ Steemann-Nielsen, E.
Dark fixation of CO_2 and measurements of organic productivity. With remarks on chemo-synthesis. - Physiol. Plant. 13: 348-357. 1960.

/17/ Healy, F.P.
Short-term responses of nutrient-deficient algae to nutrient addition. - J. Phycol. 15, 289-299 (1979).

/18/ Vandkvalitetsinstituttet, ATV (Nyholm, N., Kusk, K.O. & Damgaard, B.M.).
Toksicitetstest baseret på måling af planktonalgers kulstofassimilation. (1. udkast). 1981.08.20.

11. BILAGSFORTEGNELSE

BILAG 1.

Oversigt over artssammensætninger (algehovedgrupper) i vandprøver anvendt i fotosyntesetests.

BILAG 2.

Eksempler på forsøgsresultater og dosisresponskurver.

BILAG 3.

Metodebeskrivelse:
Vandundersøgelse:
Toksicitetstest baseret på måling af planktonalgers kulstofassimilation

B I L A G 1

Oversigt over artssammensætninger (algehovedgrupper) i vandprøver anvendt i fotosyntesetests.

Dato	Kiselalger	Dinoflagellater	Småflagellater	Grønalger
18/11-85 Køge Bugt	Skeletonema (5%)	Enkelte (20 %)	Mange (70-80%)	-
8/4-86 Køge Bugt	Skeletonema Melosira Chaetoceros Coscinodiscus (90 %)	Enkelte (5 %)	Enkelte (5 %)	+
23/4-86 Køge Bugt	Chaetoceros sp. Chaetoceros teres Chaetoceros diaema Skeletonema Fragillara sp. Thallassionema nitzschioides Asterionella sp. Nitzschia longissima (95 %)	Gymnodium sp. (3 %)	Gule og farveløse (1-2 %)	+ (1 %)
24/4-86 Gilleleje	Gomphonema sp. Bacillaria (paradoxa) Rhizosolenia (10 %)	Notilluc Dinophysis aculata Katodinium Pteridinium (50 %)	(Farveløse) Bodo sp. Actimonas/Pteridomonas (40 %)	
29/5-86 Lillebælt	Skeletonema (90 %) Chaetoceros Coscinodiscus Biddulphia (5 %)	Enkelte (2-3 %)	Enkelte (2-3 %)	
6/6-86 Køge Bugt	Bacillaria (1 %)	Katodinium sp. Peridinium (80 %)	(Farveløs) Bodo (5 %)	Carteria Euglena (15 %)
15/8-86 Stigsnæs	- (0 %)	Protocentrum minimum (85 %) Gymnodium sp. Peridinium sp. Cryptomonas sp. Pyramimonas sp. (5 %)	Enkelte (10 %)	-
18/8-86 Køge Bugt	Rhizosolenia sp Nitzschia sp. Asterionella (10 %)	Protocentrum minimum (40-50 %) Peridinium sp. Cryptomonas sp. (20-30 %)	Enkelte (10 %)	Euglena (2 %)
Desuden observeret: Silicoflagellater Brunalgetråde				
17/9-86 Køge Bugt	- (0 %)	Protocentrum minimum (95 %)	Paraphysomonas sp Farveløs: Bodo sp. (5 %)	-

B I L A G 2

Eksempler på forsøgsresultater og dosis-respons-kurver.

Hæmning af fotosyntesen hos kiselalgen Skeletonema costatum

med stoffet:

kaliumdikromat 6 timer (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	11392.0	-
Kontrol 2	11071.0	-
Kontrol 3	12308.0	-
Kontrol 4	12430.0	-
Kontrolgennemsnit :	11800.2	0
1.0	10926.0	7.4
2.0	11336.0	3.9
5.0	3659.0	69.0
5.0	3895.0	67.0
5.0	3828.0	67.6
10.0	643.0	94.6
10.0	579.0	95.1
10.0	759.0	93.6
20.0	100.0	99.2
20.0	141.0	98.8
20.0	122.0	99.0

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 11

EC 10 værdi :	1.4	95 % konfidensinterval :	(1.0: 1.7)
EC 50 værdi :	3.6	95 % konfidensinterval :	(3.2: 3.9)
EC 90 værdi :	8.9	95 % konfidensinterval :	(7.9: 10.6)

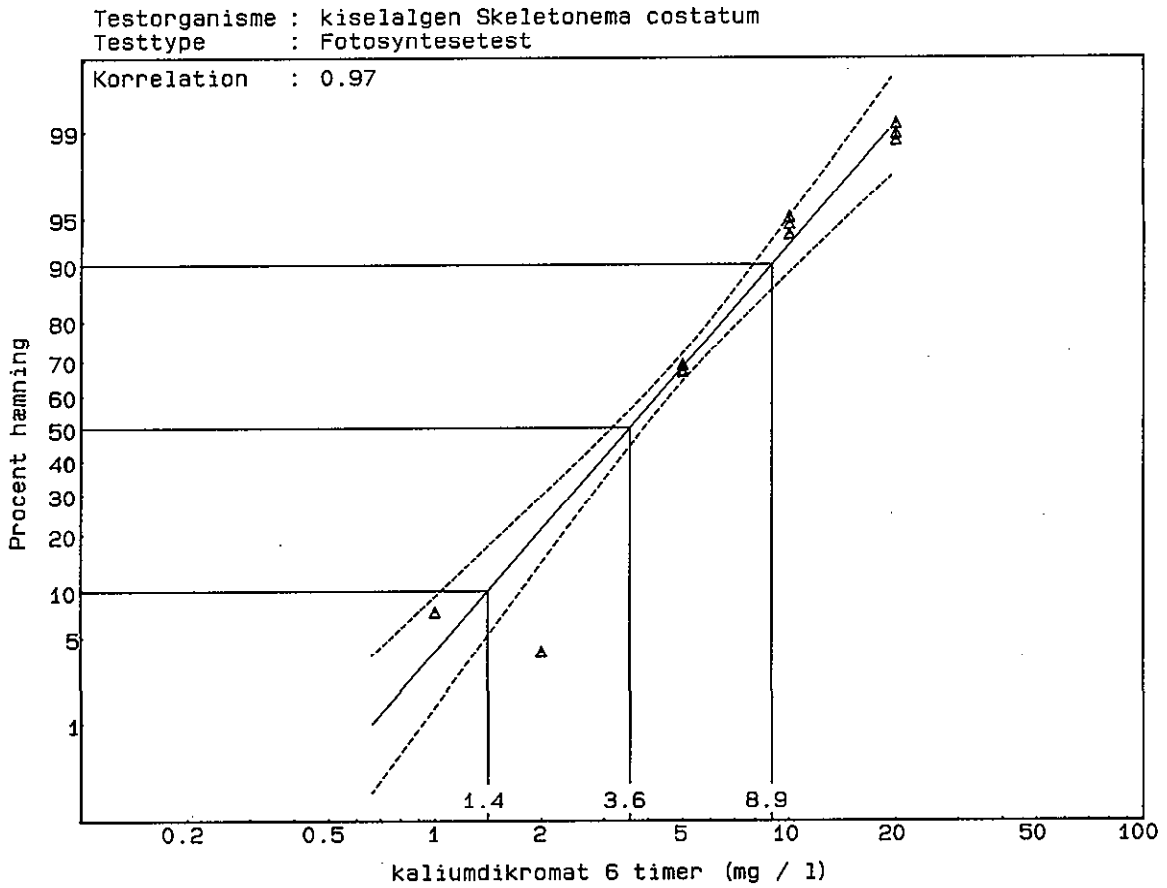
Korrelation : 0.97

Vægtfaktorerne er:

1	0.47589
2	0.17462
3	3.02932
4	3.19053
5	3.14587
6	0.29649
7	0.24931
8	0.38350
9	0.01286
10	0.02333
11	0.01827

MiddelW = 0.04110

Bilag 2.1 A: Resultat af 6 timers fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** samt0 statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.1 B: Dosis-responskurve for 6 timers fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos kiselalgen Phaeodactylum tricornutum

med stoffet:

kaliumdikromat, 6 timer (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	2518.0	-
Kontrol 2	2477.0	-
Kontrol 3	2374.0	-
Kontrol 4	2475.0	-
Kontrol 5	2500.0	-
Kontrolgennemsnit :	2468.8	0
1.0	2390.0	3.2
3.0	2420.0	2.0
3.0	2551.0	0.0
3.0	2427.0	1.7
10.0	2454.0	0.6
10.0	2466.0	0.0
10.0	2380.0	3.6
30.0	1686.0	31.7
30.0	1772.0	28.2
30.0	1715.0	30.5
60.0	1097.0	55.6
60.0	1130.0	54.2
60.0	1065.0	56.9

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 11

EC 10 værdi : 10 95 % konfidensinterval : (6: 14)
EC 50 værdi : 54 95 % konfidensinterval : (47: 63)

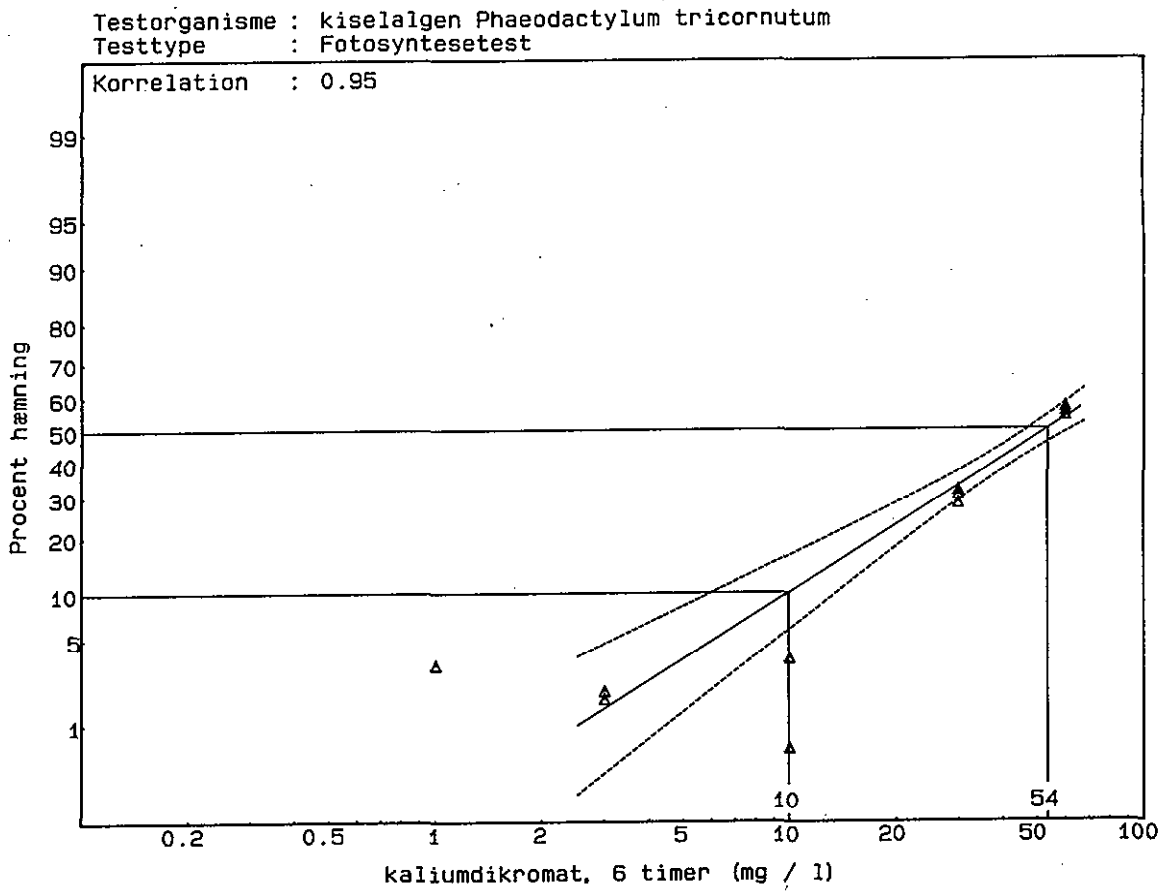
Korrelation : 0.95

Vægtfaktorerne er:

1	0.06611
2	0.02943
3	0.02267
4	0.00372
5	0.08115
6	1.64692
7	1.48148
8	1.59418
9	2.02602
10	2.04299
11	2.00531

MiddelW = 0.07703

Bilag 2.2 A: Resultat af 6 timers fotosyntesetesten med Phaeodactylum tricornutum og referencestoffet kaliumdikromat samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.2 B: Dosis-responskurve for 6 timers fotosyntesetesten med **Phaeodactylum tricornutum** og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos kiselalgen Skeletonema costatum

med stoffet:

kaliumdikromat, 4 timer (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	3418.0	-
Kontrol 2	3374.0	-
Kontrol 3	3198.0	-
Kontrolgennemsnit :	3330.0	0
2.0	3206.0	3.7
3.0	2983.0	10.4
3.0	3055.0	8.3
6.0	1573.0	52.8
6.0	1554.0	53.3
10.0	597.0	82.1
10.0	598.0	82.0
10.0	344.0	89.7
20.0	36.0	98.9
20.0	41.0	98.8

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 10

EC 10 værdi :	2.9	95 % konfidensinterval : (	2.6:	3.2)
EC 50 værdi :	5.8	95 % konfidensinterval : (	5.6:	6.1)
EC 90 værdi :	11.6	95 % konfidensinterval : (	10.9:	12.6)

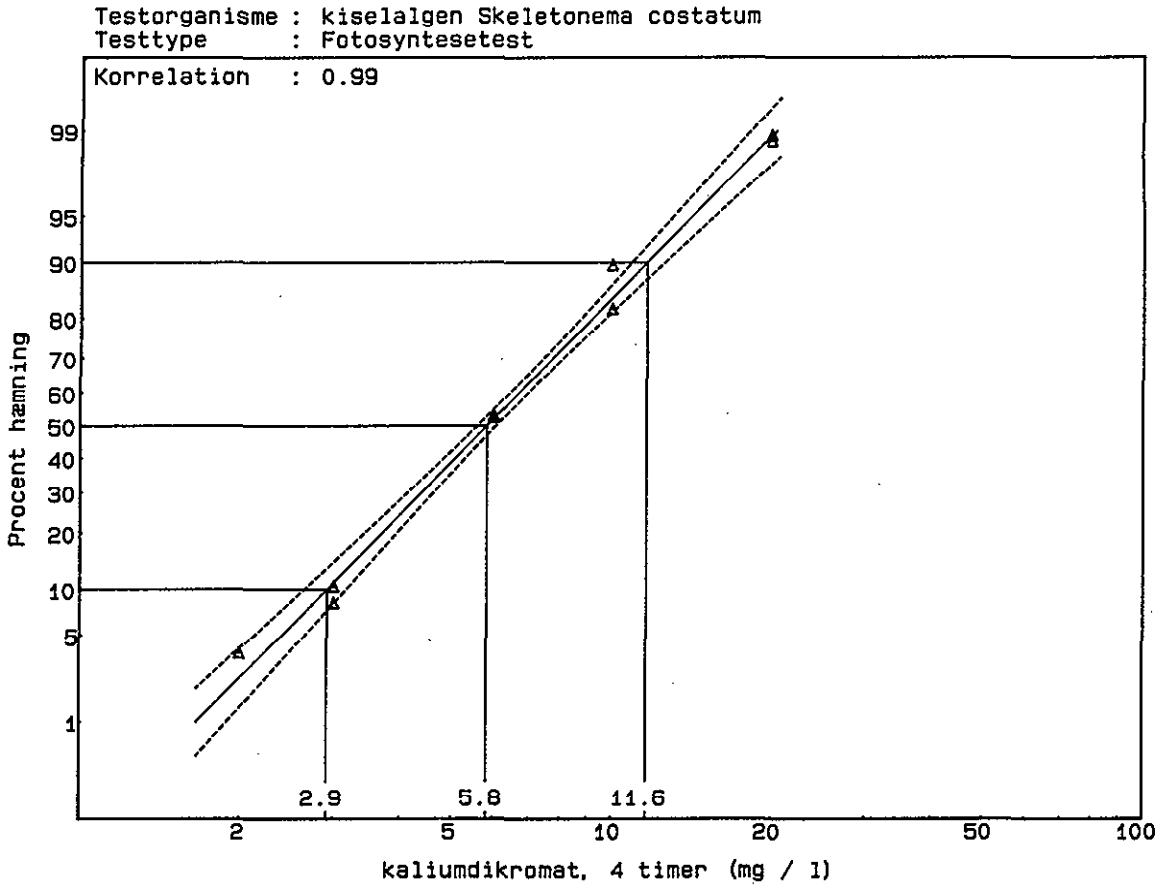
Korrelation : 0.99

Vægtfaktorerne er:

1	0.11982
2	0.59258
3	0.42073
4	2.88162
5	2.87530
6	1.24439
7	1.24710
8	0.58526
9	0.01483
10	0.01836

MiddelW = 0.05497

Bilag 2.3 A: Resultat af 4 timers fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.3 B: Dosis-responskurve for **4 timers** fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos indsamlet algeplankton i Køge Bugt

med stoffet:

kaliumdikromat, 6timer, uden ekstra næringssalte (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	13753.0	-
Kontrol 2	13481.0	-
Kontrol 3	13952.0	-
Kontrolgennemsnit :	13728.7	0
1.0	12624.0	8.0
3.0	11000.0	19.9
10.0	7685.0	44.0
30.0	4858.0	64.6
60.0	3389.0	75.3

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 5

EC 10 værdi : 1.2 95 % konfidensinterval : (0.9: 1.5)
EC 50 værdi : 14.6 95 % konfidensinterval : (12.9: 16.5)

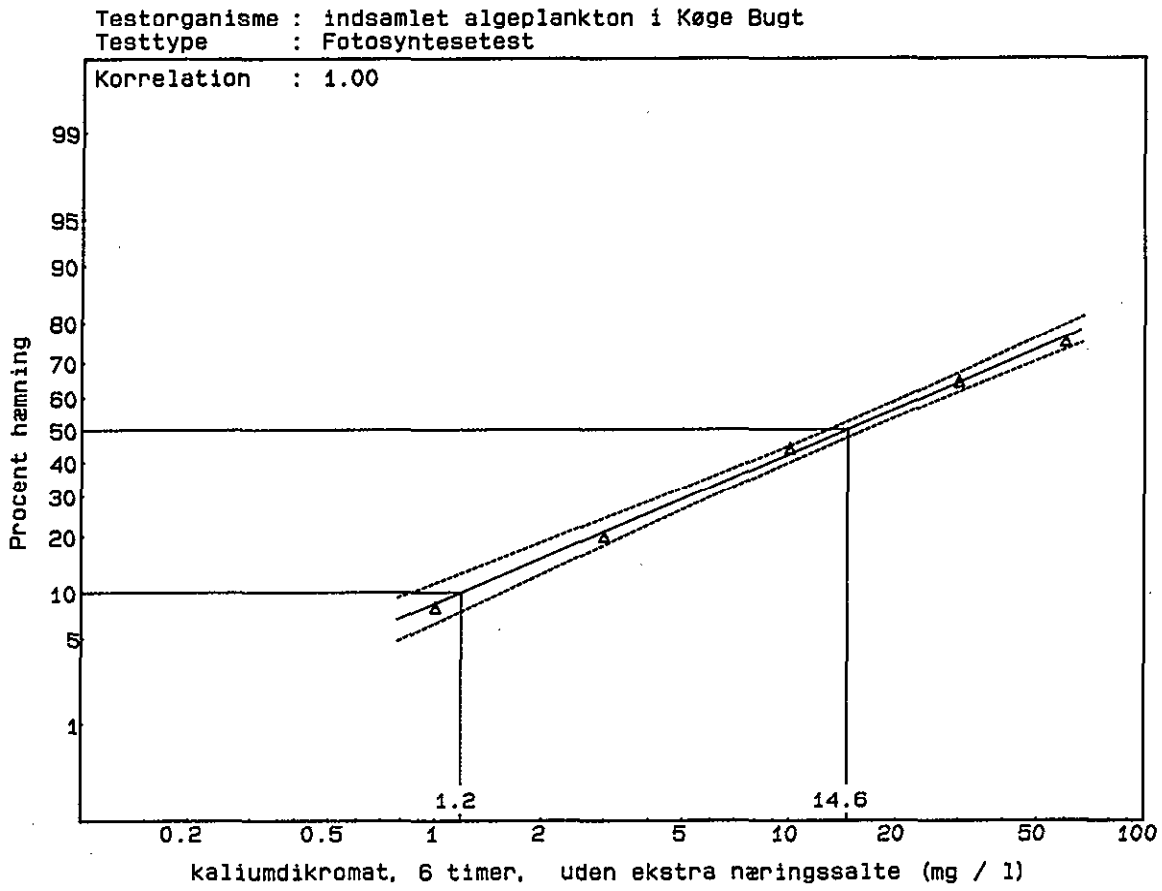
Korrelation : 1.00

Vægtfaktorerne er:

1	0.22571
2	0.78690
3	1.57705
4	1.40125
5	1.00909

MiddelW = 0.09866

Bilag 2.4 A: Resultat af 6 timers fotosyntesetesten <u>uden</u> ekstra næringssalttilsætning med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet kaliumdikromat samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.4 B: Dosis-responskurve for 6 timers fotosyntesetesten **uden** ekstra **næringssalttilsætning** med **naturligt algeplankton** fra Køge Bugt og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos kiselalgen Skeletonema costatum

med stoffet:

kaliumdikromat 20 timer (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	4469.00	-
Kontrolgennemsnit :	4469.00	0
0.05	4609.00	0.0
0.10	4567.00	0.0
0.20	3520.00	21.2
0.20	3175.00	29.0
0.30	3229.00	27.7
0.60	2789.00	37.6
0.60	2005.00	55.1
1.00	844.00	81.1
1.00	902.00	79.8
1.00	923.00	79.3
2.00	129.00	97.1
2.00	283.00	93.7
2.00	228.00	94.9
3.00	95.00	97.9
3.00	102.00	97.7
3.00	41.00	99.1
6.00	70.00	98.4
6.00	61.00	98.6
6.00	57.00	98.7

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 17

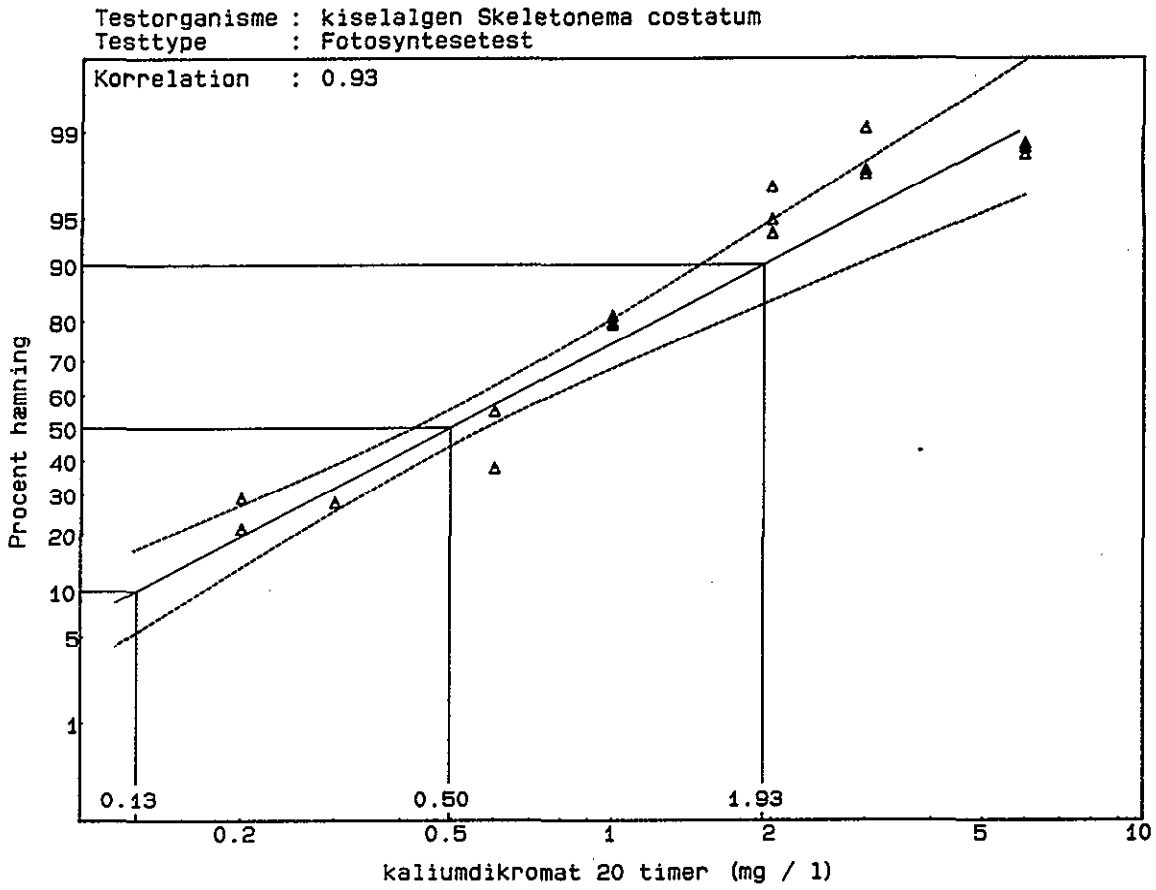
EC 10 værdi :	0.13	95 % konfidensinterval : (	0.08: 0.17)
EC 50 værdi :	0.50	95 % konfidensinterval : (	0.42: 0.58)
EC 90 værdi :	1.93	95 % konfidensinterval : (	1.46: 2.90)

Korrelation : 0.93

Vægtfaktorerne er:

1	1.61089	11	0.20896
2	2.23873	12	0.04917
3	2.14989	13	0.05591
4	2.75725	14	0.01156
5	2.99721	15	0.02920
6	1.39779	16	0.02328
7	1.51460	17	0.02056
8	1.55758		
9	0.08317	MiddelW =	0.05222
10	0.29425		

Bilag 2.5 A: Resultat af **20 timers** fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.5 B: Dosis-responskurve for **20 timers** fotosyntesetesten med **Skeletonema costatum** og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos Indsamlet algeplankton i Køge Bugt

med stoffet:

kaliumdikromat, 20 timer (med ekstra næringssalte) (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	14368.00	-
Kontrol 2	15438.00	-
Kontrol 3	14441.00	-
Kontrol 4	16240.00	-
Kontrol 5	13530.00	-
Kontrolgennemsnit :	14803.40	0
0.10	15172.00	0.0
0.20	15008.00	0.0
0.50	14832.00	0.0
1.00	14336.00	3.2
2.00	12026.00	18.8
2.00	12160.00	17.9
2.00	11638.00	21.4
6.00	6318.00	57.3
6.00	6409.00	56.7
6.00	4941.00	66.6

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 7

EC 10 værdi : 1.3 95 % konfidensinterval : (1.0: 1.7)
EC 50 værdi : 4.7 95 % konfidensinterval : (4.2: 5.3)

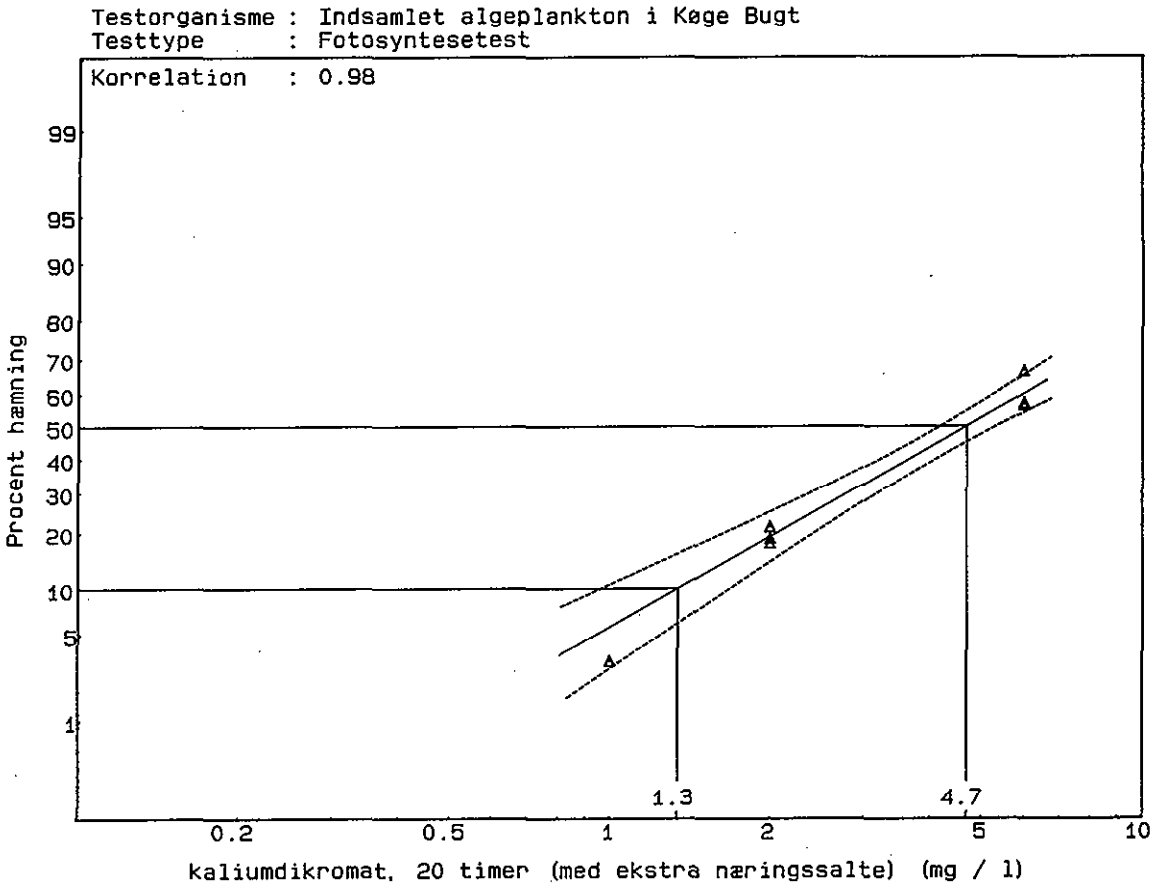
Korrelation : 0.98

Vægtfaktorerne er:

1	0.05219
2	0.75547
3	0.70983
4	0.88442
5	1.60463
6	1.61348
7	1.37998

MiddelW = 0.09586

Bilag 2.6 A: **Resultat af 20 timers fotosyntesetesten med ekstra næringssalttilsætning med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet kaliumdikromat samt statistisk behandling af forsøgsdata.**



Bilag 2.6 B: Dosis-responskurve for 20 timers fotosyntesetesten **med ekstra næringssalttilsætning** med **naturligt algeplankton** fra Køge Bugt og referencestoffet **kaliumdikromat** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos Indsamlet algeplankton i Køge Bugt

med stoffet:

kaliumdikromat, 20 timer (uden ekstra næringssalte) (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	14748.00	-
Kontrol 2	15082.00	-
Kontrol 3	14007.00	-
Kontrol 4	15769.00	-
Kontrol 5	14005.00	-
Kontrolgennemsnit :	14722.20	0
0.10	13599.00	7.6
0.20	13759.00	6.5
0.50	14114.00	4.1
0.50	14311.00	2.8
0.50	13053.00	11.3
1.00	12925.00	12.2
1.00	12040.00	18.2
1.00	12924.00	12.2
2.00	10395.00	29.4
2.00	11412.00	22.5
2.00	11564.00	21.5
6.00	6536.00	55.6
6.00	6008.00	59.2
6.00	6028.00	59.1

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 14

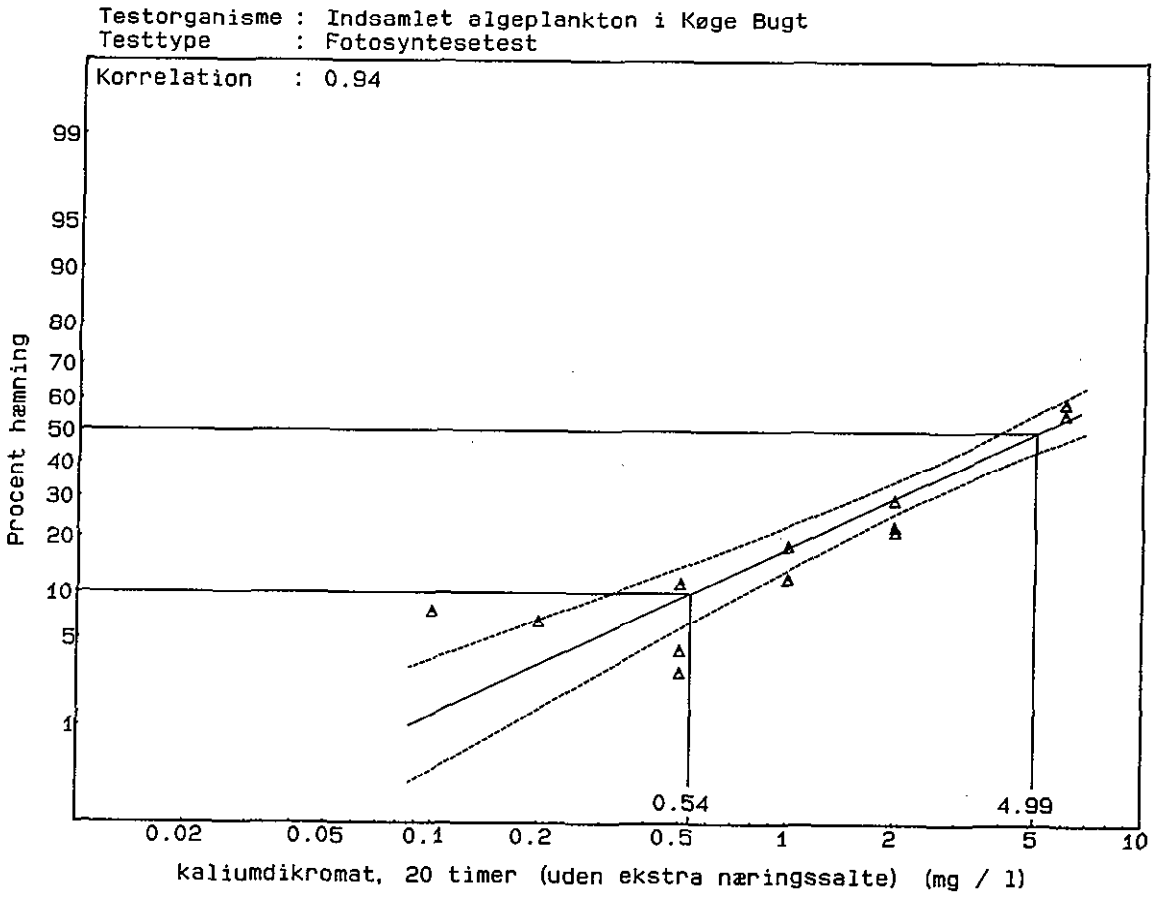
EC 10 værdi : 0.54 95 % konfidensinterval : (0.32: 0.76)
EC 50 værdi : 4.99 95 % konfidensinterval : (3.93: 6.82)

Korrelation : 0.94

Vægtfaktorerne er:

1	0.28994	9	1.67975
2	0.22960	10	1.27130
3	0.11005	11	1.20555
4	0.05804	12	2.21039
5	0.52227	13	2.13604
6	0.57879	14	2.13951
7	0.98953		
8	0.57924	MiddelW =	0.07058

Bilag 2.7 A: **Resultat af 20 timers fotosyntesetesten <u>uden</u> ekstra næringssalttilsætning med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet kaliumdikromat samt statistisk behandling af forsøgsdata.**



Bilag 2.7 B: **Dosis-responskurve for 20 timers fotosyntesetesten <u>uden</u> ekstra næringssalttilsætning med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet kaliumdikromat med angivelse af de beregnede EC-værdier.**

Hæmning af fotosyntesen hos Indsamlet algeplankton i Køge Bugt

med stoffet:

pentachlorphenol, 4 timer (mikrogram / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mikrogram / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	2756.0	-
Kontrol 2	4675.0	-
Kontrol 3	4725.0	-
Kontrol 4	4506.0	-
Kontrol 5	3112.0	-
Kontrolgennemsnit :	3954.8	0
1.0	3762.0	4.9
2.0	3736.0	5.5
3.0	3640.0	8.0
6.0	3393.0	14.2
10.0	3202.0	19.0
20.0	2466.0	37.6
50.0	1468.0	62.9
100.0	1138.0	71.2

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 8

EC 10 værdi : 3.8 95 % konfidensinterval : (2.6: 5.1)
EC 50 værdi : 34.4 95 % konfidensinterval : (28.9: 41.8)

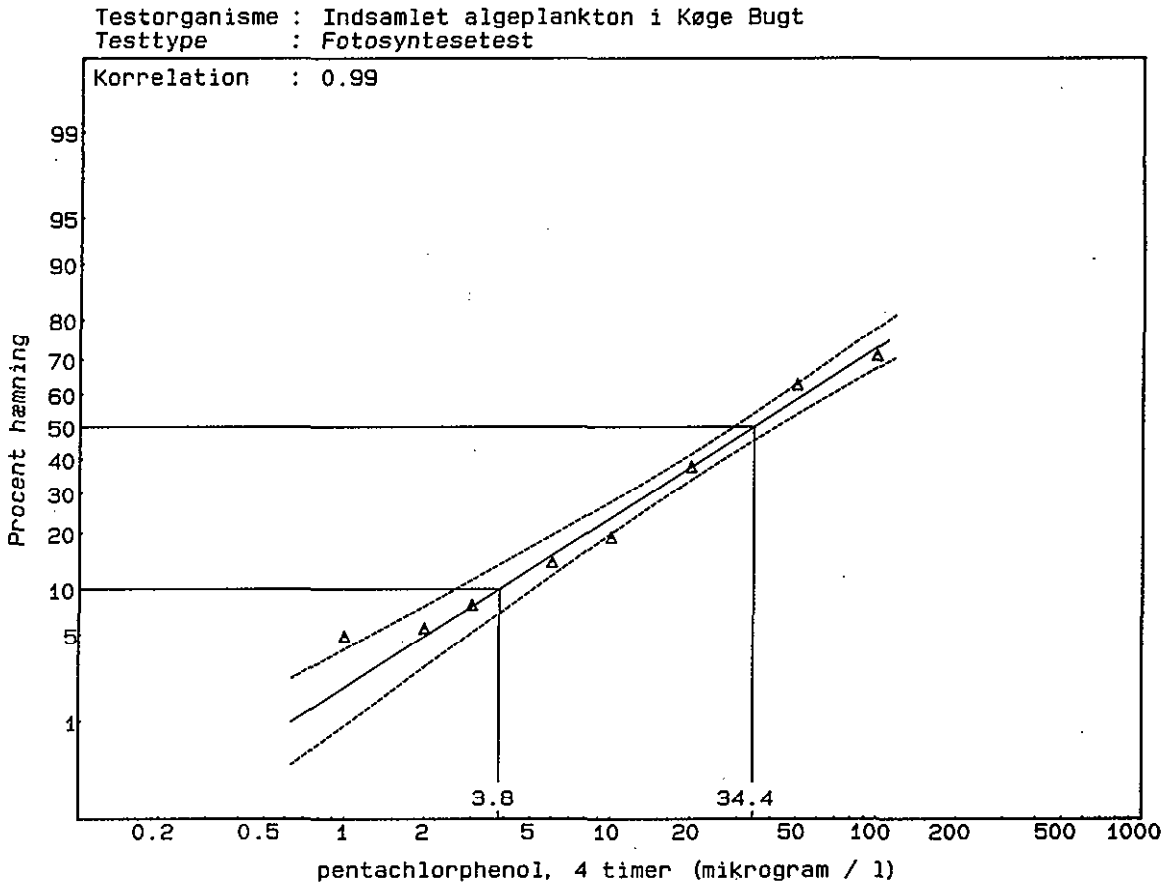
Korrelation : 0.99

Vægtfaktorerne er:

1	0.14189
2	0.17458
3	0.30622
4	0.70514
5	1.03106
6	2.01650
7	1.99836
8	1.62625

MiddelW = 0.07147

Bilag 2.8 A: Resultat af 4 timers fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet pentachloropenol samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.8 B: Dosis-responskurve for 4 timers fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Køge Bugt og referencestoffet pentachlorophenol med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos Indsamlet algeplankton, Gilleleje

med stoffet:

pentachlorphenol, 4 timer (mikrogram / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mikrogram / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	2581.0	-
Kontrol 2	2229.0	-
Kontrol 3	2570.0	-
Kontrol 4	2458.0	-
Kontrol 5	2147.0	-
Kontrolgennemsnit :	2397.0	0
1.0	2530.0	0.0
2.0	2239.0	6.6
3.0	2679.0	0.0
6.0	2594.0	0.0
10.0	2547.0	0.0
20.0	2504.0	0.0
50.0	2123.0	11.4
50.0	1806.0	24.7
50.0	1929.0	19.5
100.0	1564.0	34.8
100.0	1692.0	29.4
100.0	1649.0	31.2

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 6

EC 10 værdi : 22 95 % konfidensinterval : (0: 42)

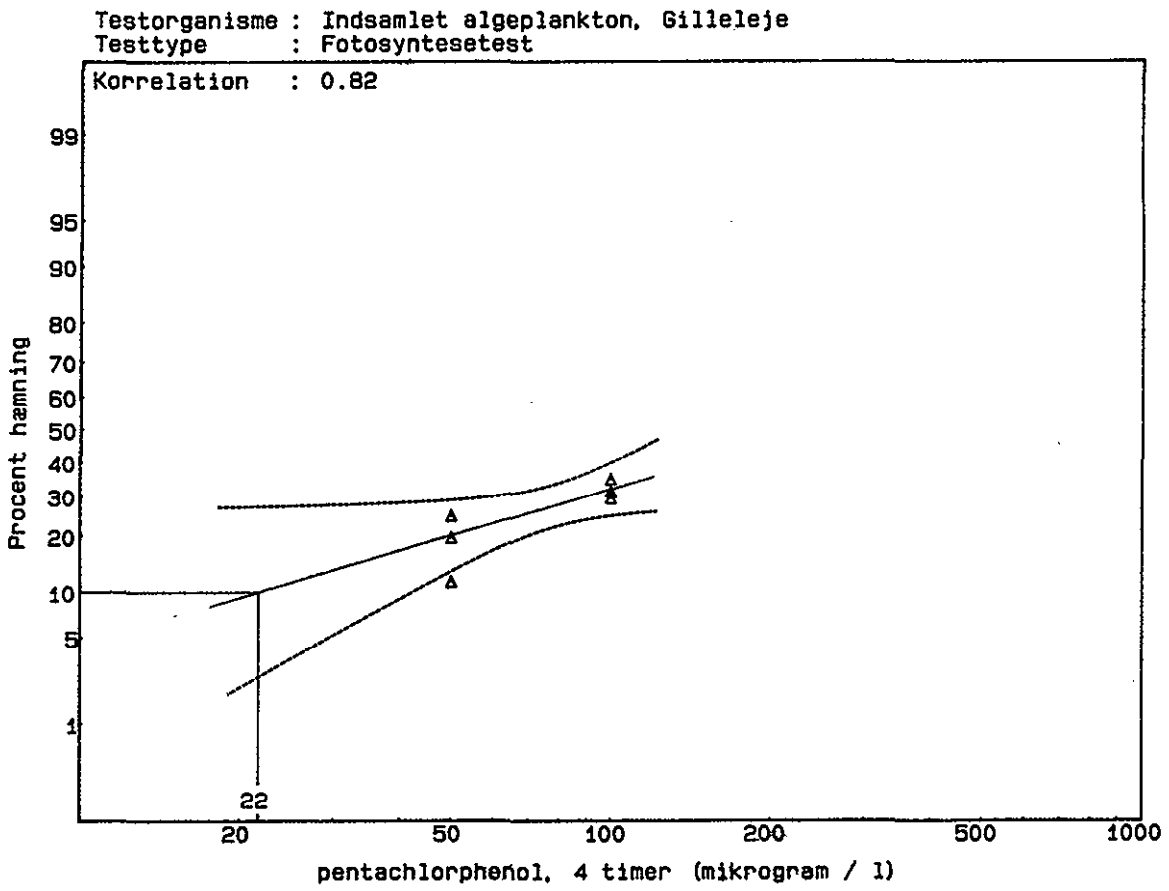
Korrelation : 0.82

Vægtfaktorerne er:

1	0.37760
2	1.00604
3	0.76875
4	1.38076
5	1.20039
6	1.26646

MiddelW = 0.09883

Bilag 2.9 A: Resultat af 4 timers fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Kattegat ved Gilleleje og referencestoffet pentachloropenol samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.9 B: Dosis-responskurve for **4 timers** fotosyntesetesten med **naturligt algeplankton** fra **Kattegat ved Gilleleje** og referencestoffet **pentachlorophenol** med angivelse af de beregnede EC-værdier.

Hæmning af fotosyntesen hos indsamlet algeplankton (Kattegat)

med stoffet:

kaliumdikromat, 6 timer (mg / l)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i mg / l	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	680.0	-
Kontrol 2	624.0	-
Kontrol 3	644.0	-
Kontrol 4	652.0	-
Kontrol 5	607.0	-
Kontrolgennemsnit :	641.4	0
1.0	633.0	1.3
3.0	632.0	1.5
10.0	445.0	30.6
30.0	348.0	45.7
60.0	245.0	61.8

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 5

EC 10 værdi : 5.4 95 % konfidensinterval : (1.7: 11.9)
EC 50 værdi : 35.1 95 % konfidensinterval : (15.3: 227.8)

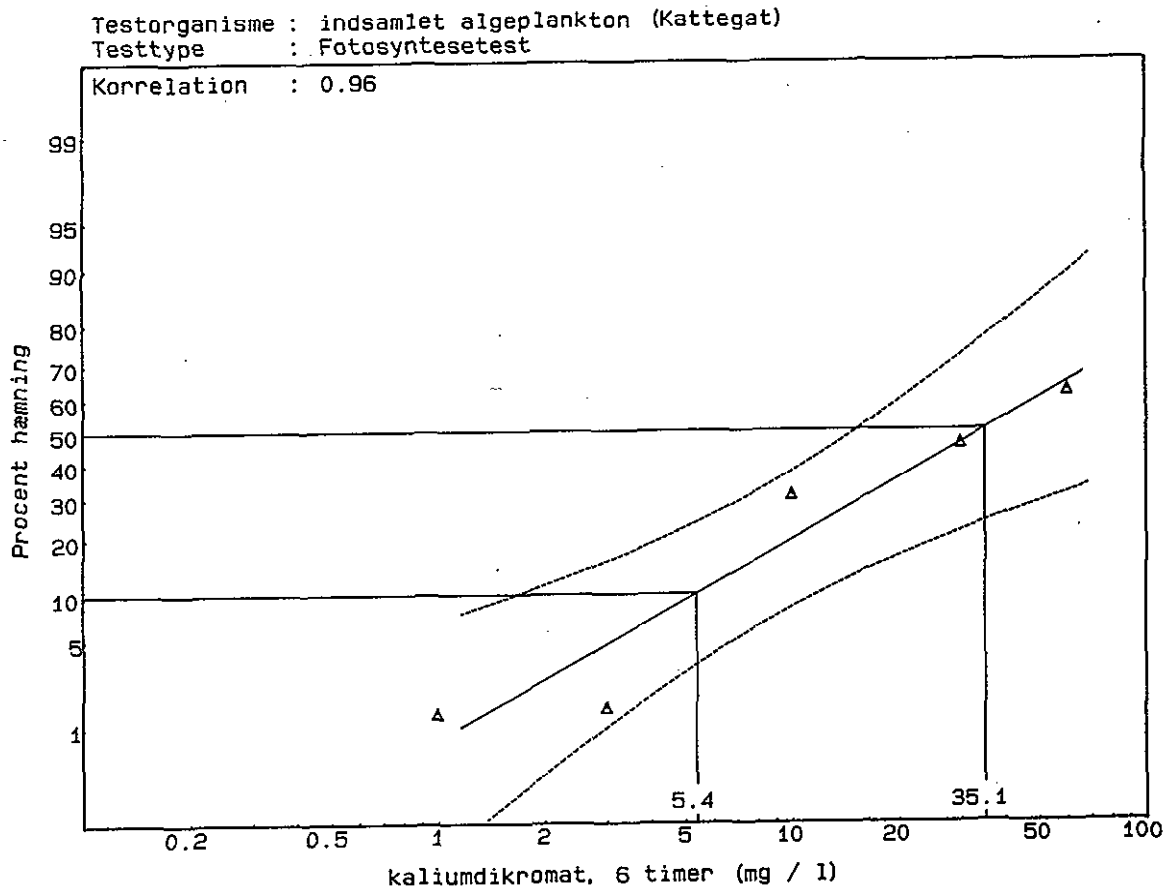
Korrelation : 0.96

Vægtfaktorerne er:

1	1.00000
2	1.00000
3	1.00000
4	1.00000
5	1.00000

MiddelW = 1.00000

Bilag 2.10 A: Resultat af 6 timers fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Kattegat ved Gilleleje og referencestoffet kaliumdikromat samt statistisk behandling af forsøgsdata.



Bilag 2.10 B: Dosis-responskurve for 6 timers fotosyntesetesten med naturligt algeplankton fra Kattegat ved Gilleleje og referencestoffet kaliumdikromat med angivelse af de beregnede EC-værdier.

B I L A G 3

Metodeforskrift for:

VANDUNDERSØGELSE:

TOKSICITETSTEST BASERET PÅ MÅLING AF PLANKTONALGERS KULSTOFASSIMILATION

Udarbejdet af:

lic.scient. K. Ole Kusk
Forskningschef, lic.techn. Niels Nyholm
(1987.10.02)

TOKSICITETSTEST BASERET PÅ MÅLING AF PLANKTONALGERS KULSTOFASSIMILATION

1. ORIENTERING

Nærværende metode beskriver en korttidstest med planktonalger, hvor man registrerer et kemisk stofs eller en stofblandings hæmmende virkning på algers fotosyntese udtrykt som kulstofassimilation. Kulstofassimilationen måles som den optagne mængde af ^{14}C tilsat som $H^{14}CO_3^-$ under standardiserede inkuberingsbetingelser.

Testen udføres med laboratoriedyrkede alger eller med naturligt algeplankton fra marine områder eller søer. Testen udføres normalt i laboratoriet i en inkubator med mulighed for kontrol af lys og temperatur under inkuberingen på en tilsvarende måde, som det sker ved primærproduktionsmålinger. Det er dog også muligt at gennemføre inkuberingen i felten ved udhæng af testflaskerne i vandsøjlen på tilsvarende måde som ved feltprimærproduktionsmålinger.

Organismers følsomhed overfor toksiske stoffer kan variere betydeligt fra art til art på grund af forskelle i metabolisme og levevis. Nærværende metode giver oplysninger om kemiske stoffers og stofblandingers akut toksiske effekt på naturligt algeplankton eller på laboratoriekulturer af mikroalger. De opnåede resultater bør ikke ekstrapoleres til andre organismer, og resultater af denne toksicitetstest alene er ikke tilstrækkelig til en forudsigelse af de økologiske effekter af kemiske stoffer og stofblandinger i en recipient. En serie af tests med organismer fra forskellige økologiske niveauer og med forskellig levevis er et væsentlig bedre grundlag for bedømmelsen af økologiske effekter. Tests udført med dette formål for øje bør tillige i så høj grad som muligt simulere forholdene i recipienten og eventuelt suppleres med feltundersøgelser.
Planktonalger er generelt en organismegruppe, som er følsom overfor miljøfremmede stoffer og tungmetaller, hvorfor de er velegnede til økotoksikologiske undersøgelser.

I Danmark er det ikke muligt at udføre feltundersøgelser eller indsamle organismer på alle årstider. Det er derfor hensigtsmæssigt at opretholde laboratoriekulturer af organismer, som derved kan anvendes i økotoksikologiske tests året rundt.

Laboratoriekulturer er som regel bedre egnet til sammenlignende undersøgelser af kemiske stoffers toksicitet på grund af større reproducerbarhed end naturlige populationer, der ofte har varierende følsomhed, men til gengæld i højere grad er repræsentative for recipientens organismer og derved bedre egnet til at give et realistisk øjebliksbillede af akut toksiske effekter.

Nærværende metodeforslag er baseret på resultater opnået i et projekt støttet af Miljøstyrelsen til dokumentationen for egnetheden af toksicitetstests baseret på planktonalgers kulstofassimilation /2/ samt på et tidligere udarbejdet metodeudkast /3/.

2. PRINCIP

Ved fotosyntese assimilerer alger uorganisk kulstof fra vandet, og denne proces kan hæmmes ved tilstedeværelse af toksiske stoffer. Optagelsen kan måles ved tilsætning af ^{14}C-mærket bikarbonat (kulstof-14-metoden). Ved testen eksponeres algerne for forskellige koncentrationer (en fortyndingsrække) af teststof eller vandprøve. Eksponeringen er opdelt i to faser, en præinkuberingsfase, hvor algerne kun er inkuberet med stof eller prøve, og en 2 timers målefase, hvor algerne desuden er inkuberet med ^{14}C. Præinkuberingsfasens varighed er normalt 4 timer, således at algerne ialt eksponeres i total 6 timer i lys. Eksponeringstiden kan udvides med en længerevarende præinkuberingsfase i mørke på f.eks. 14 timer, således at varigheden ialt bliver 20 timer (14 timer i mørke + 4 timer i lys + 2 timer i lys efter ^{14}C-tilsætning). Den mængde ^{14}C, som optages af algerne under målefasen, bestemmes efter frafiltrering af algerne på membranfiltre og efterfølgende måling af ^{14}C-aktiviteten på filtrene. Hæmningen af ^{14}C-optagelsen i prøver med teststof/-prøve i forhold til kontrollerne beregnes som funktion af prøvekoncentrationen, hvorefter en koncentrations-effekt-kurve (dosis-responskurve) kan fremstilles og eksempelvis EC 10- og EC 50-værdierne (koncentrationer med 10% og 50% hæmmende effekt) findes.

3. ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden kan anvendes til undersøgelse af den hæmmende virkning af

- kemiske stoffer og produkter
- spildevand fra eksempelvis industrivirksomheder og byer
- andre vandtyper med formodet indhold af toksiske stoffer f.eks. perkolat fra lossepladser, forurenede industrigrunde, grundvand eller overfladevand.

Ved anvendelse af naturligt algeplankton som testorganismer er metoden særlig egnet til undersøgelse af effekter af spildevandstilledninger til en specifik recipient.

Ved anvendelse af laboratoriekulturer af alger som testorganismer er de opnåede resultater i højere grad sammenlignelige fra gang til gang (variation typisk en faktor ca. 1,5 på 6 timers EC 50-værdier) end hvis naturligt algeplankton anvendes (for kaliumdikromat er fundet en variation på en faktor 6 for 6 timers EC 50-værdien /2/).

Hvis definerede kemiske stoffer eller produkter skal testes, skal disse være vandopløselige eller under forsøgsperioden kunne bringes på opløst form ved hjælp af egnede metoder (f.eks. tilsætning af organisk opløsningsmiddel, dispergering vha. ultralyd etc.). Metoden er specielt velegnet til undersøgelse af flygtige stoffers toksicitet, fordi inkuberingen foregår i lukkede flasker.

Ved undersøgelse af forurenet vand må det i hvert tilfælde overvejes om prøven skal forbehandles (filtreres, dekanteres, pH-justeres, etc.). Hvorvidt prøven skal forbehandles afhænger af prøvens karakter og af formålet med testen. Ofte er pH-justering nødvendig, da afvignede pH i testopløsningerne påvirker selve testsystemet. Tilsvarende kan en forfiltrering eller centrifugering være nødvendig for ved testens afslutning at kunne filtrere testopløsningerne.

4. INTERFERENSER

Der skal tages højde for, at tilsætning af prøve til inkubationsmediet (algemedium eller feltprøve) ikke signifikant ændrer dettes pH. Ændringer i pH kan markant påvirke algernes fotosyntese, og forrykker desuden forholdet mellem komponenterne i bicarbonatsystemet - H_2CO^3, HCO_3^- og CO_2. Ved pH lavere end 7,5 undviger CO_2. En fordobling af den tilgængelige mængde karbonat (fordobling af alkaliniteten) vil eksempelvis føre til en halvering af den assimilerede mængde ^{14}C, fordi den specifikke aktivitet heraf halveres. Problemet er størst ved testning med plankton i vand med lav alkalinitet (blødt ferskvand) eller ved testning af prøver med meget høj alkalinitet. Det er dog muligt at foretage en korrektion for ændringer i alkalinitet. I bilag 1 er givet et eksempel på en sådan korrektion. Opmærksomheden henledes endvidere på, at i prøver med højt indhold af respirerende bakterier kan mængden af tilgængeligt kuldioxyd øges.

Hvis tilsætning af testprøven medfører en forøgelse af vandets indhold af næringssalte (N, P og evt. Si og Fe) kan dette afhængigt af algernes næringsstatus ved kort inkuberingstid medvirke til en reduktion og ved lang inkuberingstid medvirke til en forøgelse af karbonassimilationen.

I nogle tilfælde kan koncentrationen af aktivt, toksisk stof ændre sig under selve testperioden, f. eks. gennem adsorption til glas og organisk stof, som enten er til stede i testprøven eller i inkubationsmediet (f.eks. testalgerne) eller som udskilles af algerne. Også kemisk nedbrydning og (i mindre omfang) biologisk nedbrydning kan ændre testkoncentrationerne.

Alment gælder for fotosyntesemålinger, at følgende forhold kan indvirke på de målte resultater:

- respirationstab af assimileret ^{14}C under testperioden
- ekskretion af fotosynteseprodukter med indbygget ^{14}C
- interferenser i testflaskerne forårsaget af zooplankton (i tests med naturligt algeplankton)

Sidstnævnte forhold kan delvis elimineres ved filtrering af den indsamlede feltprøve gennem et 80-100 µm-planktonnet.

5. REAGENSER

Alle anvendte kemikalier skal være af analyseren kvalitet.

5.1. Biologisk materiale

Naturligt algeplankton

Som testorganismer kan benyttes algekulturer eller naturligt algeplankton fra marine områder, indsøer eller åer. Algetætheden, målt som klorofyl-a bør være over ca. 5 µg/l. Der kan delvis kompenseres for lavere algetæthed ved brug af højere ^{14}C-aktivitet (se afsnit 5.1.5). I vintermånederne vil algebiomassen dog normalt være for lav til at naturligt algeplankton kan anvendes.

Prøver af naturligt algeplankton (i det følgende betegnet feltprøven) kan tages med vandhenter (ikke-toksisk) og overføres til rene beholdere af glas eller ikke-toksisk plastmateriale (f.eks. polyethylen eller polypropylen), som opbevares mørkt eller i svagt lys. Prøvebeholderne må ikke fyldes helt og skal under transport opbevares i termokasse eller ved temperaturer nær vandtemperaturen på prøvetagningstidpunktet. Et luftvolumen øverst i vandbeholderen giver bedre mulighed for omrøring i vandet, således at algeplanktonet ikke sedimenterer.

Testen bør startes så hurtigt som muligt og ikke senere end 24 timer efter udtagningen af algeplanktonprøven. Ved længere tids opbevaring sker ændringer i planktonpopulationens artssammensætning og prøvens repræsentativitet for den aktuelle recipient mindskes derved. Betydningen af ændret artssammensætning for testsystemets følsomhed for toksisk påvirkning er ikke undersøgt og kan ikke umiddelbart forudsiges.

Zooplankton i feltprøven kan fjernes ved filtrering gennem et planktonnet med maskevidde på ca. 80-100µm. Ved længere tids transport bør filtrering altid foretages. Det skal dog påpeges, at store alger eller alger, som danner aggregater, også kan blive elimineret ved filtrering. Anvendes prøven umiddelbart efter ud-

tagningen anbefales at vurdere behovet for filtrering efter undersøgelse af prøven for zooplanktonindhold.

Prøven må ikke udsættes for stærkt lys, som kan skade algerne. Temperaturen holdes så konstant som muligt på eller lidt under udtagningstemperaturen.

Laboratoriedyrkede alger

Algekulturer, som anvendes til tests bør være i eksponentiel vækst. Tætheden af algerne i testsuspensionen afhænger af algernes størrelse og dermed af arten, men typisk anvendes 10^5 celler/ml af små alger og 10^3 celler/ml af store arter. Normalt kan anvendes en tæthed på 10^4 celler/ml (Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema costatum, Nitzschia palea).

5.2. $Na^{14}CO_3$-opløsning

Færdigfremstillede ampuller med ^{14}C-mærket bikarbonat kan købes komercielt i Danmark. Koncentrationen bør være 2-5 mM $NaHCO_3$/l og aktiviteten 4-50 µCi/ml. Almindeligvis anvendes 20 µCi/ml-ampuller.

5.3. Scintillationsvæske

Til opløsning og tælling af den på membranfiltrene opsamlede ^{14}C kan anvendes en række forskellige scintillationsvæsker, f.eks. "Ready-Solv HP", "Scint HEI 3", "Filtercount" eller "Optiscint".

5.4. Membranfiltre

Velegnede membranfiltre er "Sartorius"-filtre type 11307 med porestørrelse 0.2 µm (cellulosenitratfiltre).

5.5. Saltsyre (HCl)

Koncentreret (rygende) HCl til efterbehandling af membranfiltre og 0,1 N HCl til pH-justering i testopløsninger.

5.6. Natriumhydroxyd (NaOH).

0,1 N NaOH til pH-justering af testopløsninger.

5.7. Organiske opløsningmidler

Organiske opløsningsmidler f.eks. acetone, methanol, ethanol, dimethylsulfoxid (DMSO) til opløsning af stoffer med lav vandopløselighed. (Bør ikke anvendes i resulterende koncentrationer i testopløsningerne på over 0,5 ml/l.

6. UDSTYR

6.1. Feltudstyr

- Vandhenter (ikke-toksisk)
- Prøvebeholder (ikke-toksisk)
- Termometer
- Lystæt termokasse

6.2. Laboratorieudstyr

- Filtreringsudstyr
- Vakuumpumpe (oliepumpe eller vandstrålepumpe) med manometer
- Filtre 0,2 mm membranfiltre
- Filtre (glasfiberfiltre [GF/F] og/eller membranfiltre [0,45 µm cellulosenitratfiltre] samt støttefiltre af papir)
- Justerbar mikropipette (0,1-1 ml)
- pH-meter
- Prøveflasker (primærproduktionsflasker med et volumen på ca 30 ml)
- Diverse alm. laboratorieglasudstyr
- Ledningsevnemåler (til måling af salinitet)
- Titreringsudstyr til alkalinitetsbestemmelse
- Inkubator (se figur 1 side 13)

Prøverne inkuberes for måling af ^{14}C-assimilationen i et termostateret rum eller vandbad (± 0,5 °C) med belysning fra lysstofrør (Philips fluorescensrør TL 18 W/33 eller Osram hvidt H 18 W er egnede typer). Lysintensiteten bør normalt være 25-35 x 10^{15} quanta x cm^{-2} x sec^{-1} (≈ 415-580 µE x m^{-2} x sec^{-1} ≈ 100 - 140 x W x m^{-2} [bølgelængdeområde 400-700 nm]) i prøveflaskernes afstand fra lyskil-

den. Denne belysningsintensitet er standard ved primærproduktionsmålinger i henhold til DS 293 (Planktonalgers kulstofassimilation i inkubator med ^{14}C-metoden). Det er vigtigt, at lysintensiten er ens over hele fladen, hvor prøverne skal placeres. Prøveflaskerne anbringes på et roterende hjul med plads til flasker på begge sider. En skitse af en egnet inkubator er vist i figur 1.

- 1 tætsluttende beholder (eksikatorer) med saltsyre (koncentreret)

- Membranfilterholdere, O-ringe af gummi, elastikker, pincet med flade (ikke-spidse) ender, O-ringe af pap passende til forsendelsesbeholdere

- Evt. væskescintillationstæller (tællinger kan foretages flere steder på danske laboratorier)

- Evt. Geiger-Müller-tællerør (kan erstatte væskescintillationsmåling, men er ikke så eksakt)

7. FREMGANGSMÅDE

7.1. Inkubation

7.1.2 Temperatur

Temperaturen i inkubatoren skal være den samme som dyrkningstemperaturen respektive feltprøvens temperatur (± 1 °C). Inkubatorens termostat indstilles i så god tid, at den ønskede temperatur er opnået inden testen startes. Testtemperaturen anføres i testrapporten.

7.1.2 Belysning

Belysningsintensiteten bør være høj nok til at lysmættet fotosyntese opnås. For høj intensitet kan på den anden side være skadelig for algerne. En lysintensitet på 25-35 x 10^{15} quanta x cm^{-2} x sec^{-1} ≈ 415-580 μE x m^{-2} x sec^{-1} ≈ 100-140 W m^{-2} (bølgelængdeområdet 400-700 nm) er normalt passende, når der anvendes naturligt algeplankton, jvf. /1/ Erfaringsmæssigt sikrer denne belysnings-

intensitet, at lysmætning opnås. Hos laboratoriedyrkede arter kan det for enkelte arter være nødvendigt at reducere lysintensiteten. Det er teknisk muligt at udføre toksicitetstesten også ved lavere lysintensiteter end den her angivne, f. eks. ved 100 $\mu E \times m^{-2} \times sec^{-1}$, men der foreligger ikke undersøgelser over i hvilken grad brug af lavere lysintensitet kan påvirke testresultaterne.

Belysningsintensiteten skal angives i testrapporten.

7.2. Fremstilling af testopløsninger

Al håndtering af algerne før og efter testen skal foregå i dæmpet belysning. Temperaturen bør under håndteringen ændres mindst muligt. Fortyndingsvand og stamopløsning/forurenet vandprøve tempereres først til samme temperatur som feltprøven.

Som fortyndingsvand i testen anvendes algemedium (ved tests med laboratoriealger) eller en GF/F-filtreret eller 0.45 μm membranfiltreret del af feltprøven indeholdende algeplankton, som herved filtreres fra.

Ved testning af stoffer med lav vandopløselighed fremstilles først en stamopløsning af stoffet i et egnet organisk opløsningsmiddel. Koncentrationen af dette må i tests maksimalt være 0,5 ml/l.

Under testen er det væsentligt, at biomassen i de forskellige koncentrationer er ens. I 100 ml målekolber fremstilles en fortyndingsrække af teststoffet/testprøven. Laboratoriealger tilsættes til en tæthed på 10^3-10^5 celler/ml. Ved tests med naturligt algeplankton tilsættes samme mængde af ufiltreret feltprøve til alle kolber. Summen af filtreret feltprøve (minus algeplankton) og testprøve udgør eksempelvis 10 % (10 ml), hvorefter der fyldes op til stregen med ufiltreret feltprøve. Kontrolprøver uden teststof/-prøve, men med filtreret vandprøve (eksempelvis 10%) inkluderes (se tabel 1).

Sædvanligvis anvendes en geometrisk fortyndingsrække med en konstant faktor mellem koncentrationerne f. eks. 1 3,2 10 32 100 osv. (faktor $10^{0,5}$) eller 1 1,8 3,2 5,6 10 18 osv. (faktor $10^{0,25}$; ofte anvendes koncentrationerne tilnærmet hertil som f.eks.

1 2 5 10 20 osv. eller 1 2 3 6 10 20 osv. - [se tabel 1]).

Serien bør omfatte såvel koncentrationer

- som ikke har hæmmende effekt og
- koncentrationer med kraftig effekt.

Ved undersøgelser af helt ukendte stoffer/stofblandinger/vandprøver tilrådes først at gennemføre en præliminær test med store spring mellem de fortyndinger, som testes.

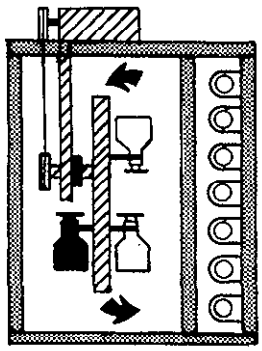
Nedenfor er vist et eksempel på fremstillingen af en fortyndingsserie af en spildevandsprøve.

Slutkonc. ml/L	Spv.prøve ml/100 ml	Filtreret vand ml	Planktonprøve ml
0	0	10	90
0	0	10	90
1	0,1	9,9	90
2	0,2	9,8	90
3	0,3	9,7	90
6	0,6	9,4	90
10	1,0	9,0	90
20	2,0	8,0	90
30	3,0	7,0	90
60	6,0	4,0	90
100	10,0	0	90

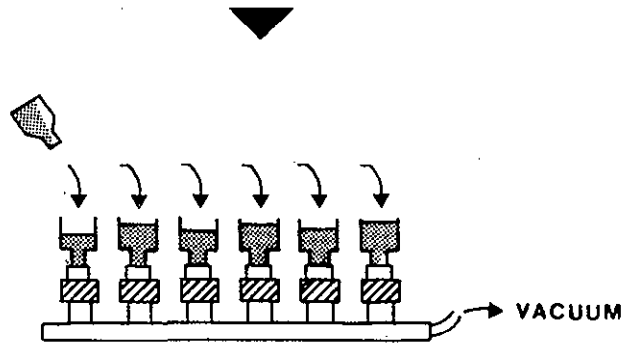
Tabel 1. Eksempel på fortyndingsrække, hvor biomassen holdes konstant.

Man bør ikke med naturlige planktonprøver teste koncentrationer af vandprøver højere end 200 ml prøve/l, idet feltprøven ikke bør fortyndes mere end 20%.

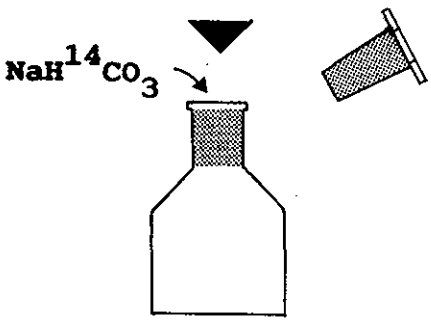
Hvis der er stor forskel mellem alkalinitet i planktonprøve/algemedium og den vandprøve, der skal undersøges, bør højeste koncentration ikke være højere end 100 ml prøve/l.



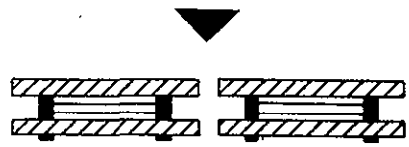
1) Inkubering med prøve (4 timer eller længere).



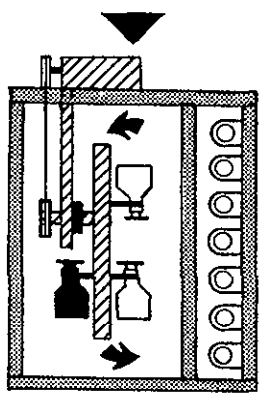
4) Filtrereing gennem 0,45 µmmembranfilter.



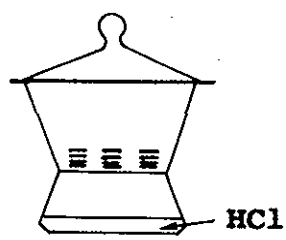
2) Tilsætning af $NaH^{14}CO_3$.



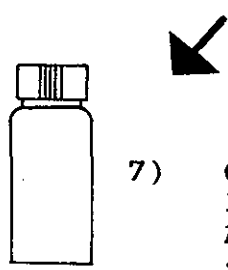
5) Samling af våde filtre i tørrekassetter.



3) Inkubering med prøve og $NaH^{14}CO_3$ (2 timer).



6) Fjernelse af uorganisk ^{14}C fra filtre ved eksponering i 5 min. over rygende saltsyre.



7) Overførsel af filter til scintillationsvial. Opløsning af filter. Aktivitetsbestemmelse ved væskescintillation.

Figur 1: Procedure for fotosyntesehæmningstest.

Ved tests med laboratoriekulturer udelades tilsætning af Fe og EDTA til fortyndingsvandet.

Ved tests med naturligt algeplankton af vandprøver med gødende effekt anbefales at tilsætte N og P til feltprøven ved testens start.

7.3. Eksponering (præinkubation).

I figur 1 er i skitseform vist testforløbet fra inkubering til aktivitetsbestemmelse.

Testflaskerne (primærproduktionsflasker) mærkes på forhånd i bunden med nummer. Tre delprøver à 25-30 ml fra hver testkoncentration overføres til testflaskerne. Når proppen sættes på, skal der være et lille luftrum tilbage i flaskerne (omrøringsboble). Ved arbejde med flygtige stoffer kan flaskerne dog fyldes helt og boblen erstattes af 3 glasperler. Testteknisk er det hensigtsmæssig at medtage flere kontrolflasker f.eks. 5 stk. Kontrolsuspensionen påfyldes desuden en lystæt flaske (flaske omviklet med staniol) med henblik på at checke mørkefixeringen, som kun bør udgøre få procent af kontrolassimilationen.

Flaskerne fastgøres på flaskehjulet og nedsænkes i inkubatoren. Lyset i inkubatoren tændes, og flaskehjulets motor tændes. Der inkuberes i første omgang i normalt 4 timer (præinkubation). Tidspunkt for inkubationens start noteres. Anvendes længere præinkubationsperioder bør den samlede tid med lys begrænses til 6 timer (kan evt. opnås ved hjælp af et tænd-sluk ur), for at reducere en evt. vækst i algebiomassen, som kunne forårsage, at biomassen i kontrollen og i utoksiske koncentrationer ville blive væsentlig større end biomassen i testkoncentrationer, der påvirkede algerne. En forudgående mørkeperiode kan hensigtmæssigt være 14 timer, således at den samlede testtid bliver 20 timer (start om eftermiddagen og afslutning følgende formiddag).

7.4. Måleperiode for ^{14}C-assimilation

Efter præinkubationsperioden tages flaskehjulet op af inkubatoren, flaskerne åbnes og $NaH^{14}CO_3$-opløsning tilsættes med mikropipette. Den mængde, som skal tilsættes, afhænger af algekoncentration i

flaskerne (og dermed af årstiden ved tests med naturligt algeplankton) og af alkaliniteten. Oftest tilsættes 100 eller 200 µl af en 20 µCi/ml-opløsning. Efter tilsætningen lukkes flaskerne igen med glasprop, fastgøres på flaskehjulet og nedsænkes i inkubatoren. Herefter inkuberes 2 timer. Den samlede inkuberingstid (præinkubation + ^{14}C-assimilationsperiode) er således normalt 6 timer i lys (præinkubationsperioden kan evt. forlænges med en forudgående periode i mørke).

7.5. Filtrering

Inden inkubationstiden udløber mærkes membranfiltre svarende til det inkuberede antal flasker, og filtreringsudstyr bringes i orden og stilles parat, således at filtreringen kan foregå så hurtigt som muligt efter afsluttet inkubation.

Ved inkubationens udløb tages flaskerne af flaskehjulet og opbevares mørkt indtil filtreringen. Flaskernes indhold filtreres gennem membranfiltre som støttes på sugesiden af papirfiltre. Sugetrykket må ikke overstige 90 kPa. Filtreringstiden for den enkelte flaske må ikke overstige 20 min. (kan afgøres ved forudgående filtrering af prøve uden radioaktivitet). Filtreringstiden for alle flaskerne må ikke overstige 60 min. Disse krav kan overholdes ved at sætte flere filtreringsapparater i serie. Hvis det ikke er muligt at filtrere hele indholdet af en flaske i løbet af 20 min., kan man udtage en delmængde. I så fald skal voluminet af den filtrerede delmængde samt den ikke-filtrerede delmængde måles. Ved filtrering af hele flaskens indhold er måling af voluminet ikke nødvendigt.

Tidspunkt for filtreringens start og afslutning noteres.

Umiddelbart efter afslutningen af filtreringen placeres de våde filtre i 5 min. over rygende saltsyre f.eks. i en eksikator. Filtrene kan herefter overføres til eksikator med silicagel (tørring) og opbevares her indtil tællingen eller forsendelse til tælling.

7.6. Aktivitetsbestemmelse

Aktiviteten på filtrene bestemmes ved væskescintillationstælling. (Alternativt kan Geiger-Müller-tælling benyttes. Denne tællemetode er dog mindre følsom og eksakt end væskescintillationstælling.)

Nummer og evt. tekst i filtrenes kant fjernes ved udstandsning eller afklipning (for at reducere quench). Filtrene opløses i passende scintillationsvæske i vials. Disse henstår mørkt i mindst 15 timer heraf de sidste 4 timer ved scintillationstællerens arbejdstemperatur. CPM (counts per minute) regnes om til DPM (disintegrations per minute). Quench-korrektion foretages f.eks. efter "internal sample channels ratio"-metoden.

Prøverne tælles hensigtsmæssigt til 3.500 counts dog maksimalt i 30 min. (ækvivalerer en tælleusikkerhed på mindre end 2%).

7.7. Fysisk-kemiske bestemmelser

7.7.1. Vandprøver med naturligt algeplankton

Hvis testen udføres med naturligt algeplankton skal de anvendte prøver karakteriseres med hensyn til væsentlige parametre.

Nødvendige parametre:

- konduktivitet (eller salinitet)
- total alkalinitet
- pH
- temperatur

Væsentlige parametre:

- dominerende hovedgrupper (evt. arter) i algeplanktonet
- koncentration af klorofyl (eller andre mål for plankton-algernes biomasse)
- koncentration af opløst, uorganisk N og P

7.7.2. Laboratoriedyrkede alger

Ved tests med laboratoriedyrkede alger skal følgende parametre være kendt:

Nødvendige parametre:

- algeart
- celletæthed (eller andet biomassemål med relation hertil)
- konduktivitet (eller salinitet)
- total alkalinitet
- pH
- dyrkningstemperatur

7.7.3. Spildevandsprøver og andre vandprøver

De undersøgte vandprøver karakteriseres som følger:

Nødvendige parametre:

- pH
- total alkalinitet

Væsentlige parametre:

- koncentration af opløst, uorganisk N og P
- koncentration af suspenderet stof
- konduktivitet

8. BEARBEJDNING AF RESULTATER

Beregn for hver koncentration:

$$Y_i = \frac{A_i - A_{bl}}{A_r - A_{bl}} \times 100\ \%$$

hvor Y_i = hæmningen i koncentrationen "i" i procent af kontrolværdien

A_i = aktivitet på filter (filtre) fra koncentrationen "i"

A_{bl} = aktivitet på filter fra prøve tilsat formalin [eller syre] (blindprøve)

A_r = aktivitet på filtre (gennemsnit) fra kontrolprøver uden testprøvetilsætning (reference)

Der kan evt. benyttes gennemsnitstal for hver testet koncentration. De benyttede aktiviteter skal være baggrundskorrigerede og quenchkorrigerede, og det er således mest hensigtsmæssigt at beregne aktiviteten i Dpm.

De beregnede Y-værdier plottes som funktion af prøvekoncentrationen i et diagram. Hvis der benyttes en geometrisk koncentrationsserie, skal x-aksen være logaristmisk. Vælges en normalfordelingsakse som y-akse, vil en ret linie ofte kunne trækkes tilnærmelsesvis gennem punkterne i diagrammet. Ud fra denne koncentrations/effektkurve (dosis-respons-kurve) fastlægges den koncentration, som svarer til 50% hæmning af ^{14}C-assimilationen (EC 50). På samme vis kan koncentrationer, som giver 10 eller 20 % hæmning bestemmes (EC 10 resp. EC 20). EC-værdierne kan også bestemmes ved liniær regression efter oven nævnte transformation af data.

I bilag 2 er givet et eksempel på en dosis-respons-kurve.

9. RAPPORTERING

Rapporten skal indeholde

- Reference til nærværende standard
- Navn på laboratorium og person(er), som udfører testen
- Dato og tidspunkt for testens udførelse
- Navn for art af laboratoriealge

eller - indsamlingssted og -tidspunkt og temperatur for naturligt algeplankton

- Forsøgstemperatur
- Belysningsintensitet
- Varighed af inkubationsperioder uden og med ^{14}C-tilsætning (f.eks. 4 og 2 timer)
- Beskrivelse af undersøgte vandprøvers oprindelse og udtagning

eller - Navn og data for det undersøgte kemiske stof/produkt

- Resultater af kemisk karakterisering af spildevandsprøve og prøve med naturligt algeplankton (pH, alkalinitet og evt. andet)
- Angivelse af analysemetoder anvendt ved kemisk karakterisering
- Eventuelle afvigelser fra nærværende metode
- Eventuelle andre relevante oplysninger
- Koncentrations-effekt-kurve for påvirkning
- EC 50-værdi og detektionsgrænse (EC 10- eller EC 20-værdi)

10. KOMMENTARER

10.1. Generel kommentar

Det gælder alment, at stoffers toksiske virkning afhænger af stoffernes kemiske tilstandsform, som igen bestemmes af en række faktorer som mediet hårdhed, pH, indhold af organiske opløsningsmidler, indhold af opløste stoffer med chelaterende virkning samt celletætheden af alger og indhold af andet partikulært stof. Det anbefales derfor, at karakteristiske parametre for de undersøgte vandprøver angives i rapporten.

10.2. Rensning af glasudstyr

Det er vigtigt, at glasustyr, som anvendes til blanding af testsuspensionerne og inkubering af prøverne rengøres grundigt før brug. Efter almindelig vask med detergent anbefales skylning med 10 % HCl og derefter skylning mindst tre gange i destilleret vand eller vand af tilsvarende renhed.

10.3. Sikkerhedsregler

Ved testen anvendes isotopen ^{14}C, som udsender lavenergetisk β-stråling. Anvendelse af ^{14}C forudsætter, som for andre isotoper, tilladelse fra myndighederne, og der bør opstilles specielle arbejdsregler for håndtering af radioaktive præparater og bortskaffelse af affald (evt. afbrænding).

11. REFERENCER

/1/ Dansk standard DS 293. Vandundersøgelse. Planktonalgers kulstofassimilation i inkubator med ^{14}C-metoden.

/2/ Vandkvalitetsinstituttet, ATV. (1978). (Kusk, O.K. & Nyholm, N.): Udvikling og dokumentation af standardiseret algetoksicitetstest baseret på måling af ^{14}C-assimilation. Rapport til Miljøstyrelsen.

/3/ Vandkvalitetsinstituttet, ATV. (1981). (Nyholm, N., Kusk, K.O. & Damgaard, B.M.): Toksicitetstest baseret på måling af planktonalgers kulstofassimilation. (1. udkast).

/4/ ISO

APPENDIX A

A.1 Syntetiske dyrknings- og inkubationsmedier

A.1.1 Medium for ferskvandsalger efter ISO /4/.

a)

NH_4Cl	15 mg/l^{-1}	autoklaveres (20 min, 120°C) (10 x koncentreret stamopløsning eller 5 separate 1000 x koncentrerede stamopløsninger)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12 "	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	18 "	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15 "	
KH_2PO_4	1,6 "	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	80 $\mu g/l^{-1}$	100 eller 1000 x koncentreret stamopløsning filtreret gennem 0,2 μm membranfilter
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 "	
H_3BO_3	185 $\mu g/l^{-1}$	1000 x koncentreret stamopløsning filtreret gennem 0,2 μm membranfilter
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 "	
$ZnCl_2$	3 "	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 "	
$CuCl_2 \cdot H_2O$	0,01 "	
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	7 "	

b) Efter afkøling til stuetemperatur tilsættes $NaHCO_3$ 50 mg/l^{-1}

Efter henstand med kontakt til atmosfærisk luft i ca 1 døgn eller efter gennembobling med sterilfiltreret luft bør pH være 8,3 ± 0,2.

Alle tilsætninger skal foretages sterilt. Stamopløsninger friskfremstilles når der konstateres udfældninger i flaskerne.

A.1.2 Syntetisk saltvandsmedium (efter EPA)

BASISMEDIUM

	1 l	4 l
NaCl	23,48 g	93,92 g
Na_2SO_4	3,92 g	15,68 g
$NaHCO_3$	0,19 g	0,76 g
KCl	0,66 g	2,64 g
KBr	0,10 g	0,38 g
H_3BO_3	0,03 g	0,10 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10,61 g	42,44 g
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0,04 g	0,16 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,47 g	5,88 g
H_2O til	1000 ml	4000 ml

Filtrér gennem vasket 0,45 μ membranfilter

Fortynd basismediet til ønsket salinitet som følger (4 l portioner)

SALINITET ‰	BASISMEDIUM, l	H_2O (glasdestilleret), l
35	4,00	0,00
30	3,43	0,57
24	2,74	1,26
20	2,29	1,71
16	1,83	2,17
12	1,37	2,63
8	0,91	3,09
5	0,57	3,43

Tilsæt samtidig følgende næringssalte og mikronæringsstoffer, iet der sørges for god blanding:

$NaNO_3$	102 mg/4-1 batch	(4,2 mg N/l)
K_2HPO_4	4,18 mg/4-1 batch	(0,186 mg P/l)
Na_2EDTA	1200 µg/4-1 batch	(300 µg/l)
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	40 mg/4-1 batch	(1 mg So/l)

Spormetalblanding* 4 ml/4-1 batch. Filtrér gennem 0,45 µ membranfilter, og tilsæt efter filtrering steriliseret $FeCo_3$, 384 µg/4-1 batch (33 µg Fe/l). Juster om nødvendigt pH til pH 8,0 ± 0,1.

Stamopløsninger af N, P, Fe, EDTA, spormetaller, Sr og Br kan med fordel laves i 1000 gange endelig koncentration.

Stamopløsningen af Si laves som en 200 gange koncentreret opløsning, som er gjort sur med et par dråber HCl-opløsning.

Referencemedium for Phaeodactylum tricornutum fremstilles med 20 °/₀₀ salinitet.

1.3 Saltvandsmedium baseret på naturligt havvand

Til fremstilling heraf kan anvendes samme stamopløsninger og koncentrationer, som anvendes i ferskvandsmediet. Tilsætning af Ca og Mg er dog overflødigt

1.4 Ved dyrkning af kiselalger tilsættes desuden:

$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ 10 mg/l

---

*Spormetalblandingen fremstilles således:
Tilsæt til ialt 500 ml volumen følgende:

0,0928 g H_3BO_3,
0,208 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$,
0,016 g $ZnCl_2$,
0,714 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,
0,0107 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$,
3,63 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

Spormetalkoncentratet benyttes i en koncentration på 1 ml pr. 1 medium.

APPENDIX B

Korrektion for alkalinitetsændring

BEREGNINGSEKSEMPEL

Alkalinitet i feltprøve: 1,1 mmol/L
Alkalinitet i "høj-alkalinitetsprøve": 5,0 mmol/L

Alkalinitet i koncentrationen 300 ml prøve/L:

$$\frac{700 \times 1{,}1 + 300 \times 5{,}0}{1000} \text{ mmol/L} = 2{,}3 \text{ mmol/L}$$

Dvs. at alkaliniteten i koncentrationen 300 ml prøve/L er 2,3/1,1 = 2,1 gange højere end i kontrollen og at den specifikke aktivitet af ^{14}C ved tilsætningen vil være 2,1 gange højere i kontrollen end i koncentrationen 300 ml prøve/L. Korrektionen af måleværdierne for koncentrationen 300 ml prøve/L skal derfor foretages ved multiplikation med faktorer 2,1.

For koncentrationen 100 ml prøve/L vil korrektionsfaktoren være:

Alkalinitet:

$$\frac{900 \times 1{,}1 + 100 \times 5{,}0}{1000} \text{ mmol/L} = 1{,}5 \text{ mmol/L}$$

Korrektionsfaktor:

1,5 mmol/L / 1,1 mmol/L = <u>1,4</u>

Korrektionsfaktoren for koncentrationen 100 ml prøve/L er således 1,4.

I tabel I er givet et eksempel på ukorrigeret testresultat med en "høj-alkalinitetsprøve" (alkalinitet 5,0 mmol/l).

Hæmning af fotosyntesen hos naturligt algeplankton fra Stevns

med stoffet:

høj-alkalinitets-prøve (ml prøve / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i ml prøve / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	376.0	-
Kontrol 2	421.0	-
Kontrol 3	371.0	-
Kontrol 4	379.0	-
Kontrol 5	369.0	-
Kontrol 6	470.0	-
Kontrolgennemsnit :	397.7	0
10.0	394.0	0.9
10.0	394.0	0.9
10.0	394.0	0.9
30.0	340.0	14.5
30.0	313.0	21.3
100.0	231.0	41.9
100.0	322.0	19.0
100.0	286.0	28.1
300.0	201.0	49.5
300.0	212.0	46.7
300.0	239.0	39.9

STATISTISK BEHANDLING AF FORSØGSDATA:

Data er testet efter LOGARITMISK NORMALFORDELING.

Antal værdier: 11

EC 10 værdi : 37 95 % konfidensinterval : (24: 53)
EC 50 værdi : 277 95 % konfidensinterval : (172: 583)

Korrelation : 0.94

Vægtfaktorerne er:

1	1.00000
2	1.00000
3	1.00000
4	1.00000
5	1.00000
6	1.00000
7	1.00000
8	1.00000
9	1.00000
10	1.00000
11	1.00000

MiddelW = 1.00000

Tabel I: Resultat af fotosyntesetest af <u>høj-alkalinitetsprøve</u> med naturligt algeplankton fra Øresund ved Stevns samt statistisk behandling af <u>ukorrigerede</u> forsøgsdata.

I tabel II er resultatet korrigeret i overensstemmelse med beregningseksemplet.

Hæmning af fotosyntesen hos naturligt algeplankton fra Stevns

med stoffet:

høj-alkalinitets-prøve (korrigerede måleværdier) (ml prøve / L)

Forsøgsresultater:

Stofkoncentration i ml prøve / L	Relativ fotosyntese	Hæmning i procent
Kontrol 1	376.0	-
Kontrol 2	421.0	-
Kontrol 3	371.0	-
Kontrol 4	379.0	-
Kontrol 5	369.0	-
Kontrol 6	470.0	-
Kontrolgennemsnit :	397.7	0
10.0	408.0	0.0
10.0	408.0	0.0
10.0	408.0	0.0
30.0	376.0	5.4
30.0	346.0	13.0
100.0	313.0	21.3
100.0	436.0	0.0
100.0	387.0	2.7
300.0	415.0	0.0
300.0	437.0	0.0
300.0	493.0	0.0

Tabel II: Resultat af fotosyntesetest af <u>høj-alkalinitetsprøve</u> med naturligt algeplankton fra Øresund ved Stevns givet som korrigerende data (korrektion som i eksemplet).

Registreringsblad

Udgiver: Miljøstyrelsen, Strandgade 29, 1401 København K.

Serietitel, nr.: Miljøprojekt, nr. 91

Udgivelsesår: 1988

Titel: Algetoksicitetstest

Undertitel: Udvikling og dokumentation af metode til måling af ^{14}C-assimilation

Engelsk titel:
Algal Toxicity Test Based on Measurements of ^{14}C-assimilation

Forfatter(e) og/eller udførende institution(er):
Kresten Ole Kusk og Niels Nyholm, Vandkvalitetsinstituttet

Resumé:
Der er udviklet en korttidstest til undersøgelse af algetoksicitet forårsaget af kemiske stoffers hæmmende virkning på algernes fotosyntese baseret på målinger af kulstof-14-assimilation.
Metoden kan bruges til kildeopsporing og miljøeffektvurderinger af spildevandsprøver eller perkolat og kontrol af sådanne.
Endvidere er udarbejdet en metodeforskrift til brug for virksomheder, miljø- og levnedsmiddellaboratorier og amtskommunale miljøforvaltninger.

Standardiserede emneord (efter MDS-liste):
alger, analysemetode, fotosyntese, standardisering

Frie emneord:
akvatisk toksikologi, kulstofassimilation, økotoksikologi

ISBN: 87-503-7140-1

ISSN: 0105-3094

Pris (inkl. moms): 100,- kr.

Format: A4

Sideantal: 112

Md./år for redaktionens afslutning: oktober 1987

Oplag: 500

Andre oplysninger:

Tryk: Scantryk, København