

IVL

Reflex

INSTITUTET FÖR VATTEN- OCH LUFTVÅRDSFORSKNING

HÅLSINGEGATAN 43
STEN STUREGATAN 42

BOX 21060
BOX 5207

100 31 STOCKHOLM
402 24 GÖTEBORG

TEL. 08-24 96 80
TEL. 031-81 02 80

TELEX 15581 IVL S
TELEX 21400 IPKIVLG S

Projekt:

"Miljövänlig tillverkning av blekt massa"

Delprojekt 1: Yttre miljö

BLEKERIAVLOPPSVATTENS INVERKAN PÅ FORTPLANTNING
OCH TIDIG YNGELUTVECKLING HOS FISK

Delrapport 7: Effekter på fortplantningen hos
zebrafisk av totalt fabriksavlopp
före och efter behandling i luftad
damm

Av Tomas Viktor

INSTITUTET FÖR VATTEN-
OCH LUFTVÅRDSFORSKNING
Biblioteket

B-658
Stockholm
juli
1982

Fyll bara i en sida. Bifoga om möjligt ett ex av rapporten !

Organisation Institution eller avdelning Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning Adress Box 21060 100 31 STOCKHOLM Telefonnr (även riktnr) 08/24 96 80	REGISTRERINGSUPPGIFT		RAPPORT	
	Ifyllnadsdatum		Ärendebeteckning (diariernr)	
	Bilaga <input type="checkbox"/> Ett ex av rapporten bifogas		Kontraktnr (anslagsgivares)	
	Projekttitel och ev SERIX projektnr Miljövänlig tillverkning av blekt massa			
Rapportförfattare (efternamn, tilltalsnamn) Viktor, Tomas		Anslagsgivare för projektet SCPF STU IVL:s programbudget		

Rapportens titel och undertitel (originalspråk samt ev översättning till svenska och/eller engelska)

BLEKERIAVLOPPSVATTENS INVERKAN PÅ FORTPLANTNING OCH TIDIG YNGELUTVECKLING HOS FISK
 Delrapport 7: Effekter på fortplantningen hos zebrafisk av totalt fabriksavlopp före och efter behandling i luftad damm.

Sammanfattning av rapport (fakta med huvudvikt på resultatet)

Undersökningen av ett totalt fabriksavlopp före och efter behandling i en fullstor luftad damm gav följande resultat:

- Den akuta toxiciteten mot fisk uppskattades till 58 % för ingående avloppsvatten och 100 % för avloppsvatten som lämnar dammen. TEFx20-värdena beräknades till 10 700 för ingående avloppsvatten och 6 200 för utgående avloppsvatten. TEF-värdet för det obehandlade avloppsvattnet ligger på samma nivå som tidigare erhållits vid tester med avloppsvatten från liknande produktion. TEF-värden för fabriksavlopp efter behandling i luftad damm ligger i allmänhet omkring 3 000.
- Vid exponering för föräldrafiskar för 5%-iga avloppsvattenlösningar under 12 dygn för senare undersökning av deras fortplantningsresultat kunde följande effekter konstateras.

- De ägg som producerades av fiskar för ingående avloppsvatten uppvisade en förhöjd dödlighet under första dygnet då nära 35 % av äggen ej överlevde. Motsvarande värden för fiskar exponerade för utgående avloppsvatten och kontrollfiskar var 20 %.
- Övriga störningar som registrerats var en tydligt minskad stresstolerans hos de yngel som producerats av fiskar exponerade för ingående avloppsvatten både vid jämförelse mot kontroll och yngel från fiskar som exponerats för utgående avloppsvatten. Ingen skillnad i stresstolerans kunde fastställas mellan yngel från fisk exponerade för utgående avloppsvatten och kontroll-individer.
- Behandlingen av avloppsvattnet i luftad damm resulterar således i att mängden toxiska ämnen som orsakar reproduktionsstörningar hos fisk (sena effekter) minskar till mindre än hälften jämfört med obehandlat avloppsvatten.

Förslag till nyckelord samt ev anknytning till geografiskt område, näringsgren eller vattendrag

Zebrafisk, reproduktionsstörningar, fabriksavlopp, luftad damm, akut toxicitet

Övriga bibliografiska uppgifter (t ex rapportserie, nr, år eller tidskrift, volym, år, sid)

IVL B-publ nr B-658

ISSN

ISBN

Beställningsadress för rapporten (om annan än ovan)

Språk

Svenska

Antal sid inkl bil

Pris (exkl moms)

Fylls i av miljödatanämnden	IRS	CIS	GEO	VAT	NAR
	Nyckelord				
	Inrapportör	Dokumenttyp	Projektnummer	Rapportnummer	

ABSTRACT

The examination of the total effluent from a kraft pulp mill before and after treatment in an aerated lagoon gave the following results:

- The acute toxicity to rainbow trout expressed as LC_{50} (96 h) was found to be 58 % vol/vol for the incoming water and 100 % after treatment in the aerated lagoon. The toxicity expressed as TEF values will be 10 700 for the untreated water and 6 200 for the effluent after treatment.

The TEF values for untreated water are of the same order as those found in earlier studies.

Treatment in an aerated lagoon normally results in effluent with a TEF value around 3 000.

- Adult zebrafisk (*Brachydanio rerio*) were exposed to a 5 % vol/vol concentration of both effluents during 12 days and their reproduction then studied.

Eggs produced by fish exposed to untreated effluent show a higher initial mortality compared with eggs from the control group. No such effect could be detected for eggs from fish exposed to the treated effluent. Larvae from fish exposed to the untreated effluent was less tolerant to stress than those in the control group.

The stress tolerance of larvae produced from fish exposed to treated effluent was comparable to that of control larvae.

The effluent from the aerated lagoon showed diminished toxicity to fish and contained a lowered concentration of substances that caused disturbances of fish reproduction.

Keywords: Zebrafish, acute toxicity, reproductive disturbances, kraftpulp mill effluent, aerated lagoon.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

	<u>Sid</u>
Sammanfattning	
1. Inledning	1
2. Testade avloppsvatten	2
3. Kemisk karakterisering	3
4. Metodbeskrivning, biologiska tester	5
4.1 Akut toxicitet mot vuxna zebrafiskar	5
4.2 Exponering av blivande föräldrafiskar	6
4.3 Kläckningsförsök med ägg	6
4.4 Överlevnadstester med yngel	7
5. Resultat av de biologiska testerna	9
5.1 Akut toxicitet mot vuxna zebrafiskar	9
5.2 Äggproduktion	10
5.3 Äggtester i rent vatten	11
5.4 Äggtester i avloppsvatten	12
5.5 Yngeltester i avloppsvatten	14
5.6. Yngelöverlevnad i rent vatten	15
6. Sammanfattande diskussion	16
Bilagor 1 och 2	

Arbetet som ligger till grund för denna rapport har utförts av följande personer:

Biologiska tester:

Leif Sörensen
Anders Tärnholm
Tomas Viktor

Ansvarig för kemiska analyser:

Annmari Låth

Analys av klorfenoler:

Bengt Westöö

Analys av totalt organiskt klor:

Kristina Gustafsson, STFI

Sammanställning:

Tomas Viktor

Försöksledare:

Lars Landner

SAMMANFATTNING

Undersökningen av ett totalt fabriksavlopp före och efter behandling i en fullstor luftad damm gav följande resultat:

- Den akuta toxiciteten mot fisk uppskattades till 58 % för ingående avloppsvatten och 100 % för avloppsvatten som lämnar dammen. TEFx20-värdena beräknades till 10 700 för ingående avloppsvatten och 6 200 för utgående avloppsvatten. TEF-värdet för det obehandlade avloppsvattnet ligger på samma nivå som tidigare erhållits vid tester med avloppsvatten från liknande produktion. TEF-värden för fabriksavlopp efter behandling i luftad damm ligger i allmänhet omkring 3 000.
- Vid exponering för föräldrafiskar för 5%-iga avloppsvattenlösningar under 12 dygn för senare undersökning av deras fortplantningsresultat kunde följande effekter konstateras.
- De ägg som producerades av fiskar för ingående avloppsvatten uppvisade en förhöjd dödlighet under första dygnet då nära 35 % av äggen ej överlevde. Motsvarande värden för fiskar exponerade för utgående avloppsvatten och kontrollfiskar var 20 %.
- Övriga störningar som registrerats var en tydligt minskad stresstolerans hos de yngel som producerats av fiskar exponerade för ingående avloppsvatten både vid jämförelse mot kontroll och yngel från fiskar som exponerats för utgående avloppsvatten. Ingen skillnad i stresstolerans kunde fastställas mellan yngel från fisk exponerade för utgående avloppsvatten och kontroll-individer.
- Behandlingen av avloppsvattnet i luftad damm resulterar således i att mängden toxiska ämnen som orsakar reproduktionsstörningar hos fisk (sena effekter) minskar till mindre än hälften jämfört med obehandlat avloppsvatten.

1. INLEDNING

Vid tidigare försöksomgångar har effekter av enskilda bleksteg, totala blekeri- resp. fabriksavlopp från konventionell barrsulfatblekning undersökts. Vidare har vissa externa reningsmetoder såsom Billerud-Uddeholmsprocessen och Ultrasepmetodens effektivitet att avskilja toxiska och reproduktionsstörande substanser undersökts.

I denna rapport redovisas resultat från en undersökning rörande effekter på fiskreproduktion av totalt fabriksavlopp, före och efter behandling i luftad damm.

Den metodik som använts för utförandet av testerna överensstämmer med den som ingående beskrivits i delrapport 5, om inget annat anges. Avloppsvattnen har även karakteriserats kemiskt med de traditionella parametrarna BOD₇, COD, TOC och färg. Vidare har avloppsvattnens innehåll av klorerade fenoler, klorat och totalt organiskt klor analyserats.

2. TESTADE AVLOPPSVATTEN

Vid denna försöksomgång har det totala fabriksavloppet från ett pappersbruk testats. Fabriksavloppet som innehåller avlopp från renseri, sulfatfabrik, blekeri, halvkemisk fabrik och pappersbruk har undersökts dels obehandlat och dels efter behandling i den befintliga luftade dammen.

Provtagningen av det ingående avloppsvattnet till dammen utfördes 1980-10-20 och prov av det utgående avloppsvattnet uttogs 4 dygn senare.

Det totala avloppsflödet intill dammen uppmättes till $2800 \text{ m}^3/\text{h}$, varav $800 \text{ m}^3/\text{h}$ från blekeriet. Det här angivna värdet på avloppsflödet till dammen var ett momentanvärde, det normala dygnsmedelsvärdet är $2300 \text{ m}^3/\text{h}$. Det normala ingående flödet har använts vid beräkning av uppehållstiden i dammen och för bestämning av uttagstillfället för det utgående avloppsvattnet. Dygnsproduktionen i blekeriet uppgick till 180 t_{90} .

Den ingående massan till blekeriet bestod av 80 % barrmassa och 20 % lövmassa. Massan blektes enligt sekvensen C/D E C/D ED och avloppsflödet från blekeriet uppmättes till $105 \text{ m}^3/\text{t}_{90}$. Den ingående massan hade ett kappatal på 31 och massakoncentrationen in till blekeriet var 3,5 %. Kemikaliesatsning och betingelser i varje steg redovisas i tabell 1. Den färdigblekta massan hade en viskositet på $950 \text{ dm}^3/\text{kg}$ och slutljushet på 89,5 (ISO).

Tabell 1. Blekbetingelser och kemikaliesatsningar

	C/D	E	C/D	E	D
Cl_2 kg/ t_{90}	79		22		
ClO_2 kg/ t_{90} (aktivt klor)	4,7		3,9		21
NaOH kg/ t_{90}		40		15	
Temp $^{\circ}\text{C}$	26	57	45	70	72
Tid min	35	60	90	60	300
Restklor mg/l	0,09		70		100

3. KEMISK KARAKTERISERING

Det obehandlade resp. behandlade totala fabriksavloppet har analyserats med avseende på de traditionella parametrarna (BOD₇, COD, TOC och färg), resultaten framgår av tabell 2. Analyser av avloppsvattens innehåll av klorerade fenoler och TOCl i fyra fraktioner har även utförts. Resultaten av dessa analyser redovisas i tabell 3 och 4.

Tabell 2. Konventionella parametrar

Avloppsvatten	BOD ₇ _____	COD mg/l	TOC _____	Färg mgPt/l
Ing.	230	900	190	770
Utg.	39		140	770
Reduktion % ca	80		30	0

Tabell 3. Klorerade fenoler och guajakoler (µg/l)

Avlopps- vatten	klorfenoler				klorguajakoler			
	2,4	2,4,6	2,4,5	2,3,4,6	3,4,5	4,5,6		
	di	tri	tetra	penta	tri	tetra		
Ing.	10	10	<0,3	1,2	<0,2	52	10	16
Utg	3,2	7,3	<0,1	1,3	<0,2	24	3,8	11
Reduktion % ca	70	30	-	0	-	50	60	30

Tabell 4. Organiskt bunden klor

Avlopps- vatten	TOCl	MV		MV < 1000		pH7		klo-	
		> 1000	< 1000	pH2 eter	H ₂ O	eter	H ₂ O	rat	kloro-
		_____	_____	lösł. mmol	lösł. Cl/l	lösł.	lösł.	lösł.	lösł. mmol
Ing.	0,62	0,49	0,13	0,07	0,06	0,03	0,10	0,17	0,12
Utg.	0,46	0,40	0,06	0,06	0	0,02	0,04	0,07	0,01
Reduktion % ca	25	20	50	15	100	30	60	60	90

De kemiska analyserna i tabell 2 visar att reningsanläggningen vid provtagningstillfället reducerade avloppsvattnets innehåll av syreförbrukande substans mätt som BOD_7 med ca 80 %. Denna reduktion måste betraktas som mycket god. Reduktionen av organiskt kol och färg var måttlig respektive obefintlig. Analysen av COD på det utgående avloppsvattnet gav ett orimligt lågt värde, vilket inte stämmer överens med alla tidigare resultat. Efter kontakt med bruket beslöts att denna siffra skulle strykas. Reduktionen av klorerade fenoler och guajakoler (tabell 3) uppgick vid detta provtagningstillfälle till mellan 30-70 %. Endast tetraklorfenol tycks ej reduceras. Klorerade fenoler och guajakoler utgör endast en liten del av den totala mängden organiskt bunden klor. Den totala mängden organiskt bundet klor reducerades med ca 25 % i och med avloppsvattnets passage genom dammen. Den högmolekylära delen ($M_v > 1000$) reduceras med ca en femtedel medan fraktionen med molvikt < 1000 halveras genom behandlingen. De eterlösliga föreningarna elimineras i betydligt mindre utsträckning än de vattenlösliga. Detta gäller både den sura och neutrala fraktionen. Klorat och kloroformhalterna reduceras med 60 respektive 90 %. Den totala mängden organiskt klor som släpps ut från dammen uppskattas till 1,7 kg/ton₉₀.

4. METODBESKRIVNING, BIOLOGISKA TESTER

Följande biologiska tester har utförts:

- a) Akut toxicitet mot vuxna zebrafiskar med de båda avloppsvattnen.
- b) Undersökning av hur olika spädningar av avloppsvattnen påverkar kläckningsfrekvensen hos zebrafiskägg.
- c) Uppskattning av nykläckta zebrafiskyngels överlevnad vid exponering för olika koncentrationer av avloppsvatten och i rent vatten.
- d) Exponering av blivande föräldrafiskar för subletala koncentrationer under 12 dygn.
- e) Undersökning av äggproduktionens storlek samt äggens kvalitet efter exponering enligt d)
- f) Samma som b) och c) men med ägg och yngel från exponerade fiskar.

4.1 Akut toxicitet mot vuxna zebrafiskar

Akut-toxicitetstesterna med zebrafisk (*Brachydanio rerio*) utfördes med vuxna individer ca ett år gamla.

Försöksfiskarna - 10 st zebrafiskar exponerades i 25-liters glasakvarier med 10 liter testlösning. Testlösningarna byttes var 24:e timme genom att samtliga levande fiskar i varje akvarie snabbt överflyttades till nyberedda lösningar. Antalet försökskoncentrationer var 5 för det ingående avloppet och 3 för det utgående avloppsvattnet.

Temperaturen hölls konstant vid $23,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

4.2 Exponering av blivande föräldrafiskar

Exponeringen utfördes med ~200 fiskar per grupp som fick vistas i 12 dygn i 5%-ig avloppsvattenkoncentration av respektive avloppsvatten. Dessa fiskar betecknas i fortsättningen efter det avloppsvatten det exponerats för. Fiskar exponerade för ingående avlopp betecknas In och motsvarande Ut för de fiskar som exponerats för utgående avlopp.

~200 fiskar användes till kontrollfiskar och dessa vistades följaktligen i rent vatten.

Exponeringen utfördes i 110 l glasakvarier med 100 liter testlösning i varje.

Avloppsvattenlösningarna förnyades till 75 % var 48e timme.

Temperaturen under exponeringsperioden var $23,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

De exponerade fiskarna sattes till lek i rent vatten.

4.3 Kläckningsförsök med ägg

Syftet med äggtesterna var att undersöka hur kläckningsförmågan hos ägg från zebrafiskar påverkas av föräldrarnas exponering mot avloppsvatten samt att undersöka om det förelåg någon skillnad i känslighet hos ägg från olika föräldrar vid test mot olika avloppsvattenkoncentrationer.

I dessa försök har de olika fiskgrupperna uppdelats på 10 lektrattar, 4 trattar för kontrollfiskar och 3 trattar var för de exponerade föräldrarna.

Tabell 6. Uppläggnings av kläckningsförsök med zebrafiskägg

Föräldra- typ	Försöks- omgång	Test- substans	Antal konc volym %	Antal replikat x antal ägg/ replikat
IN	1	rent vatten		4 x 25
UT	"	"		"
KO	"	"		"
IN	2	"		4 x 50
UT	"	"		"
KO	"	"		"
IN	3	ing avl	100, 60, 40, 25	å 50 per konc
UT	"	"	-"-	"
KO	"	"	-"-	"
KO	"	utg avl	-"-	"

4.4 Överlevnadstester med yngel

Vidare har toxicitetstester utförts med yngel från de olika föräldragrupperna. Uppläggningsen av yngeltesterna framgår av tabellen nedan.

Tabell 7. Uppläggnings av yngeltester

Förändra- typ	Testsubstans	Antal försöks- koncentrationer	Antal yngel/försöks- koncentrationer
IN	Ing avl	30, 18, 10, 5, 0	50
UT	"	"	"
KO	"	"	"
KO	utg avl	"	"

Exponeringen skedde i petriskålar och 2x25 yngel per koncentration och grupp testades.

Testlösningarna förnyades var 24:e timme genom att samtliga levande yngel överfördes till nyberedda lösningar. Avläsningar skedde samtidigt som testlösningarna förnyades. Testen pågick till dess att alla yngel dött. Ur mortalitetsdata beräknades sedan MST-värden ^{x)} för varje koncentration.

Vidare har yngelöverlevnaden i rent vatten studerats. Vid dessa tester placerades ~200 ägg från respektive föräldragrupp i 25 liters akvarier med 5 liter vatten. Akvarierna genomluftades kontinuerligt genom glaskapillärer. Avläsningar skedde var 24:e timme, då även ynglens status noterades. Byte av vattnet gjordes ej, endast en kompensering för avdunstad volym tillsattes var 3:e dag. För ytterligare detaljer om metoderna, se delrapport 5.

^{x)} (median survival time = Medianöverlevnadstid)

5. RESULTAT AV DE BIOLOGISKA TESTERNA

5.1 Akut toxicitet mot vuxna zebrafiskar

Resultaten från testerna av avloppsvattnens akuta toxicitet redovisas i tabell 8 där LC_{50} -värdena för 1, 2 och 4 dygn exponering uppskattats.

Tabell 8. Akut toxicitet mot vuxna fiskar

Avlopps- vatten	LC ₅₀ -värden i % avloppsvattenkoncentration efter exponering under		
	1 dygn	2 dygn	4 dygn
totalt fabriks avl före luftad damm	79	71	58 (62-54) ^{x)}
d:o efter luftad damm	>100	>100	>100

x) 95 % konfidensintervall

Det obehandlade totala fabriksavloppet visade sig vara akut toxiskt mot fisk. LC_{50} (96 h) uppskattades i detta fall till 58 %, dvs vid 58 % avloppsvattenkoncentration har hälften av försöksfiskarna dött efter 96 timmars exponering. Den akut-toxiska verkan för ingående avloppsvattnet kan betecknas som låg. Efter behandling i den luftade dammen elimineras avloppsvattnets akuta toxicitet helt. Ingen dödlighet uppstår hos fiskar exponerade för outspätt avloppsvatten, dvs 100 %. Beräkning av TEFx20 ger 10700 för avloppsvattnet före behandling samt <6200 för det behandlade vattnet, såvida beräkningen baseras på den totala avloppsvolymer i fabriken (310 m³/t blekt massa). Baseras i stället kalkylen, något oegentligt, på enbart avloppsvattenmängden från blekeriet (105 m³/t) erhålles ett värde på 3600 för det ingående avloppsvattnet och motsvarande <2100 för det avloppsvatten som lämnar dammen.

5.2 Äggproduktion

Alla producerade ägg från de olika lektrattarna räknades. Ur detta material beräknades sedan medelproduktionen av ägg per tratt och dygn. Resultaten av dessa beräkningar redovisas i tabell 9.

Tabell 9. Äggproduktion

Föräldra- typ	Medelproduktion per tratt och dygn under					
	1:a dygnet		2:a dygnet		3:e dygnet	
	\bar{x}	S.D	\bar{x}	S.D	\bar{x}	S.D
IN	301	102	299	180	292	77
UT	196	242	113	44,1	113	29,4
KO	279	112	142	35,8	179	82,7

Äggproduktionens storlek skilde sig ej signifikant mellan de olika grupperna. Detta behöver dock inte betyda att antalet ägg som utvecklats normalt är detsamma. För att belysa detta har vi utfört en beräkning på antalet döda (läs obefruktade, döda eller skadade) ägg av det totala antalet producerade ägg. Resultatet från dessa beräkningar redovisas i tabell 10.

Tabell 10. Frekvensen "döda" ägg av det totala antalet

Föräldra- typ	Frekvens "döda" ägg av det totala antalet ägg under			
	1:a dygnet	2:a dygnet	3:e dygnet	\bar{x} 3 dygn
IN	8,5	4,9	7,7	7,0
UT	9,4	0,53	6,6	5,5
KO	3,9	1,3	6,1	3,8

Vid beaktande av de medelvärden som presenteras i tabell 10 framgår att äggdödligheten direkt i lektrattarna var nära dubbelt så hög för de ägg som producerats av fiskar exponerade för ingående avlopp jämfört med kontroll. Kvaliteten

hos ägg producerade av fiskar exponerade för det utgående avloppsvattnet var något bättre än motsvarande från fisk exponerade för ingående avloppsvatten. Dessa siffror bör betraktas som ungefärliga då en relativt kraftig spridning förekommer i materialet.

5.3 Äggtester i rent vatten

Resultaten av kläckningsförsöken med zebrafiskägg i rent vatten redovisas i tabell 11.

Tabell 11

Föräldra- typ	Försöks- omgång	Kläckningsfrekv i % av det totala antalet ägg	av det totala antalet exkl initial- dödlighet	Initial- dödlig- het i %	Median kläck- nings- tid (dygn)	Median livs- tid för yngel (dygn)
IN	1	69	100	31	3,8	5,4
UT	1	77	100	23	4,0	6,0
KO	1	81	99	18	3,8	6,6
IN	2	78	98	21	3,6	6,5
UT	2	88	99	11	3,6	7,4
KO	2	82	95	14	3,7	6,8

Yngelöverlevnaden i rent vatten följde i stort sett kläckningsfrekvensen och en viss skillnad kan påvisas i försöksomgång 1. Vid den andra försöksomgången visade det sig att KO-yngel och yngel från fisk exponerade för IN hade ungefär samma överlevnad. Yngel från UT-fiskar uppvisade vid denna test en längre medellivstid än de båda övriga grupperna. Det samlade resultatet från de båda försöksomgångarna antyder sålunda att ingen tydlig avvikelse från kontrollen förekom.

5.4 Äggtester i avloppsvatten

Resultaten av äggtesterna utförda i olika koncentrationer av respektive avloppsvatten redovisas i tabell 12.

Tabell 12.

Föräldra- typ	Avlopps- vatten	Konc:er vol %	Kläcknings- frekvens i % av det av det tot. ant. ägg	Initial- dödlig- tid tot. ant. exkl initi- aldödl.	Median kläck- nings- tid (dygn)	Median livs- tid för yngel	
IN	IN	100	10	14	28	2,0	0
"	"	60	44	56	22	3,1	0,4
"	"	40	66	89	26	3,2	1,1
"	"	25	70	100	30	3,3	1,8
UT	"	100	8	10	20	2,2	0
"	"	60	46	53	14	3,0	0,8
"	"	40	60	75	20	3,0	1,0
"	"	25	80	93	14	3,0	2,7
KO	"	100	2	2,5	20	3,0	0
"	"	60	28	30	12	2,8	0,6
"	"	40	92	100	8	3,1	1,0
"	"	25	88	98	10	3,0	2,7
"	UT	100	92	98	6	3,7	5,4
"	"	60	78	95	18	3,8	6,4
"	"	40	80	95	16	4,0	6,9
"	"	25	82	95	14	3,8	8,5

Kläckningsutfallet i outspätt ingående avlopp var klart reducerat. Resultaten varierade mellan 2-10 % för de olika grupperna. En klar reduktion av kläckningen kunde även påvisas vid 60 % avloppskoncentration. I dessa fall varierade kläckningen mellan 28 - 46 %. Det bör framhållas att kontrollen påverkades kraftigast vid 100 och 60 %-nivåerna.

Testerna utförda med 40 och 25 % avloppskoncentration visar att någon påverkan på kontrollägg ej kan påvisas. Kläckningsutfallet för ägg från exponerade fiskar visar att en kläckningsreduktion uppstår vid 40 %-nivån. Vid tester utförda mot 25 % avloppskoncentration uppstår ingen påvisbar kläckningsreduktion vid tester med ägg från fiskar exponerade för in och utgående avloppsvatten från dammen. Testerna visar dock att ägg från fiskar exponerade för ingående avlopp har en större initialdödlighet och följaktligen erhålles en lägre kläckningsfrekvens. Den initiala dödligheten som enligt vår erfarenhet är helt oberoende av den direkta exponeringen som äggen utsätts för indikerar att skador uppstått på könscellerna hos de vuxna fiskarna. Medelvärden av den initiala dödligheten presenteras i tabell 13.

Tabell 13. Initialdödlighet

	Initialdödlighet i % för ägg från fiskar som exponerats för					
	IN		UT		KO	
	\bar{x}	S.D	\bar{x}	S.D	\bar{x}	S.D
Avloppsvatten- tester	26,5	3,42	17	3,46	13	4,89
Renvatten- tester (tabell 11)	26		17		16	
Renvatten- tester (tabell 15)	28		17		13,5	

Den initiala dödligheten var i medeltal dubbelt så hög för de ägg som producerats av fisk som exponerats för ingående avlopp vid jämförelse mot kontroll. Ägg från fisk som exponerats för utgående avlopp erhåller något högre värde än motsvarande kontroll. Någon signifikant skillnad vid jämförelse mot kontroll föreligger dock inte.

De få yngel som kläcks vid 100 % avloppskoncentration av det ingående avloppsvattnet dör i det närmaste omedelbart (tabell 12). Medellivslängden för ynglen vid 60 och 40 % avloppskoncentration uppskattades till mellan 0,4-0,8 resp 1,0-1,1 dygn. Vid 25%-nivån erhöles ett resultat som visar att yngel från IN fiskar dog i medeltal nära ett dygn tidigare än UT och kontroll yngel. En intressant iakttagelse var också att exponering av ägg för det ingående avloppsvattnet medförde att kläckningstiden tidigareläggs nära 1 dygn. Vad detta betyder i realiteten är för närvarande oklart. Det utgående avloppsvattnet påverkade ej äggkläckningen i outspätt tillstånd, dvs 100 %. En minskning av yngelöverlevnaden kunde endast konstateras på 100%-nivån. Kontrollöverlevnaden uppgick till 6,6 dygn, (se tabell 11).

5.5 Yngeltester i avloppsvatten

Resultaten av testerna med 1-3 dygn gamla yngel i de olika avloppsvattnen redovisas i tabell 13 och i bilaga 1.

Tabell 13. Resultat av yngeltester

Föräldratyp	Avloppsvatten	MST - uttryckt i dygn vid exponering för följande konc:er (%)				
		30	18	10	5	0
IN	IN	2,2	2,8	3,5	7,7	9,2
UT	"	2,1	3,0	5,9	8,7	9,8
KO	"	2,1	3,1	5,8	8,5	10,1
"	UT	8,8	8,5	9,4	9,5	10,1

Det ingående avloppsvattnet påverkar yngelöverlevnaden kraftigt vid 30 och 18 % avloppskoncentration. Vid 10%-nivån medför exponering fortfarande en kraftigt försämrad överlevnad hos IN-yngel. KO och UT-yngel överlever drvot

2 dygn längre än yngel från IN-fisk. Även vid 5 % avloppskoncentration kan en klar skillnad i överlevnad påvisas mellan IN-yngel och UT och KO-yngel.

En tydlig skillnad i yngelöverlevnad kan även påvisas i rent vatten. Exponeringen av fisk för det ingående avloppsvattnet har med andra ord medfört att ynglen klarar den stress som en avloppsvattenexponering utgör sämre än kontroll-yngel. Denna effekt kan ej spåras hos de yngel som producerats av fisk som exponerats för utgående avloppsvatten. Testerna utförda med kontroll-yngel mot det utgående avloppsvattnet ger ett resultat som visar att en liten försämring av överlevnaden kan spåras vid 30 och 18 %. Vid 10- och 5%-nivåerna kan dock ingen tydlig effekt spåras.

5.6 Yngelöverlevnad i rent vatten

Överlevnaden i rent vatten för de yngel som kläcktes från de 200 testade äggen redovisas i tabell 15 och i bilaga 2.

Den initiala dödligheten framgår av tabell 13 och kläckningen uppgick till 70 % för ägg från fiskar exponerade för ingående avloppsvatten. För ägg från UT respektive KO-fiskar uppskattades kläckningen till 82 respektive 84 % av det totala antalet undersökta ägg.

Tabell 15. Yngelöverlevnad i rent vatten

Yngel från fisk som exponerats för	Yngeldödlighet i % efter antal dygn efter <u>äggläggningen</u>			
	10	12	14	16
In	11	20	37	84
UT	1,8	5,5	12	67
KO	7,4	14	21	63

6. SAMMANFATTANDE DISKUSSION

Vid testerna av avloppsvattnets akuttoxiska effekt mot fisk visade det sig att det ingående avloppsvattnet hade ett LC_{50} -(96 h) på 60 %. Efter behandlingen i luftad damm eliminerades den akuta giftigheten mot fisk helt.

Exponeringen av blivande föräldrafiskar utfördes vid 5 %, dvs 20 ggr utspädning av avloppsvattnen, en utspädningsgrad som kan anses realistisk för närrecipienten. Den utförda exponeringen före leken gav följande effekter på fortplantningen:

Om äggdödligheten i lektrattarna (tabell 10) adderas med den initiala dödligheten (tabell 13) erhålles ett mått på hur stor del av äggen som ej överlever det första dygnet. Av de ägg som producerades av IN-fiskar var nära 35 % ej tillräckligt livskraftiga för att överleva det första dygnet. Motsvarande värde för ägg från UT-fiskar uppskattades till drygt 20 %. Kontrollfiskarnas bortfall i äggproduktionen under första dygnet uppskattades till knappt 20 %.

Det tyder på att det ingående avloppsvattnet påverkar föräldradjurens könsceller så att äggens vitalitet sänks. Denna effekt kan ej spåras hos fiskar exponerade för det utgående avloppsvattnet. Vid direkt exponering av ägg mot det ingående avloppsvattnet erhålles kläckningsreduktion vid koncentrationer över 40 %. Det utgående avloppet påverkade ej kläckningsfrekvensen vid tester av den direkta toxiciteten. Yngel från ej exponerade fiskar erhöll en försämrad överlevnad vid tester mot det ingående avloppet ned till 5 % avloppsinblandning. Motsvarande resultat för det utgående avloppsvattnet kunde spåras ned till 18 % avloppskoncentration. Avkomman som producerats av exponerade fiskar uppvisade en något sämre kläckningsfrekvens vid tester mot avloppsvatten. En viss kläckningsreduktion kunde i dessa spåras ned till koncentrationer i intervallet 40-25 %.

Medellivslängden för yngel som producerats av IN-fiskar förkortades markant både vid tester med avloppsvatten och i rent vatten. Dessa yngel har alltså en lägre stress-tolerans mot avloppsvattenexponering. Vidare visar den försämrade överlevnaden i rent vatten att skador inducerats i föräldradjurens könsceller och som manifesterar sig först i den kommande generationen.

Yngel från fisk exponerade för utgående avlopp uppvisade ingen förändrad överlevnad i jämförelse med kontroll.

De TEF-20-värden som redovisats i 5.1, visar sig vara högre än de som erhålles vid beräkning från reproduktionstesten. För det ingående avloppsvattnet kan inget exakt värde beräknas. Resultaten från reproduktionstesterna ger oss endast ett svar på att $TEF > 6200$. Det värde som akut-toxicitetstesterna gav, 10 700, verkar dock vara ett rimligt värde. Det skulle betyda att reproduktionsstörningar på fisk uppstår vid exponering för ned till ca 3 % avloppsvattenkoncentration.

Det utgående avloppsvattnets TEF uppskattades till < 6200 vid beräkning från akuta toxicitetsvärden, med applikationsfaktorn 20.

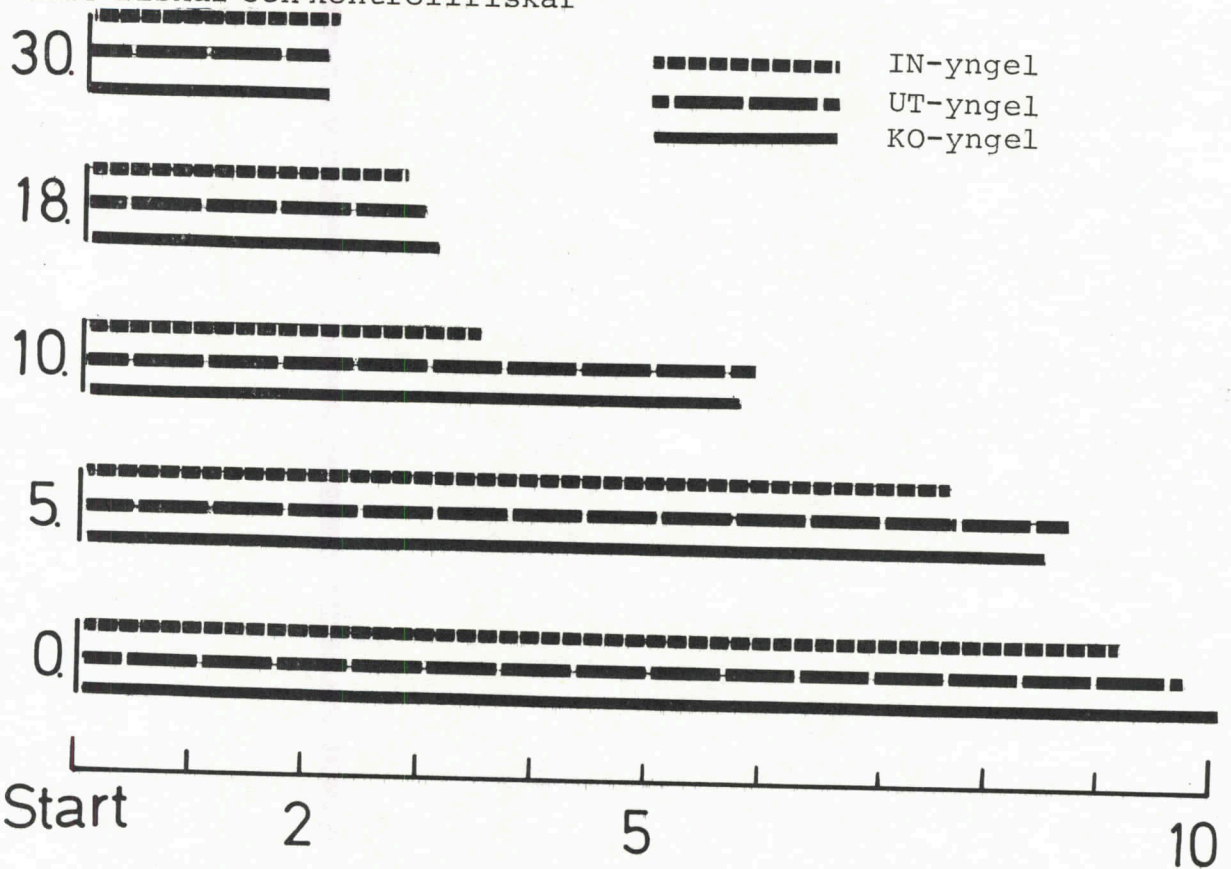
Resultaten från reproduktionstesten visar att $TEF < 6200$. Vid direkt exponering av det känsligaste embryostadiet (yngel) erhålles ett TEF på 1700. Detta värde bör betecknas som lågt, då det inte är uteslutet att effekter på reproduktionen kan uppstå vid exponering av föräldrafiskar för högre avloppsvattenkoncentration än den här använda, t ex 10 %. Det troliga värdet ligger någonstans mellan 1700 och 3000.

En viktig slutsats från undersökningen är att behandlingen av avloppsvattnet i luftad damm resulterar i att mängden av toxiska ämnen som orsakar reproduktionsstörningar hos fisk (främst s k sena effekter) drastiskt minskar, troligen till mindre än hälften jämfört med obehandlat avloppsvatten.

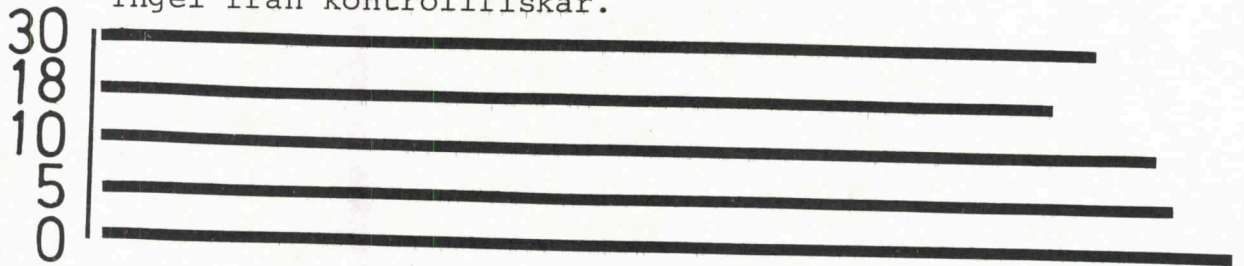
Medellivslängd i dygn för
nykläckta yngel från olika
föräldradyr

Bilaga 1

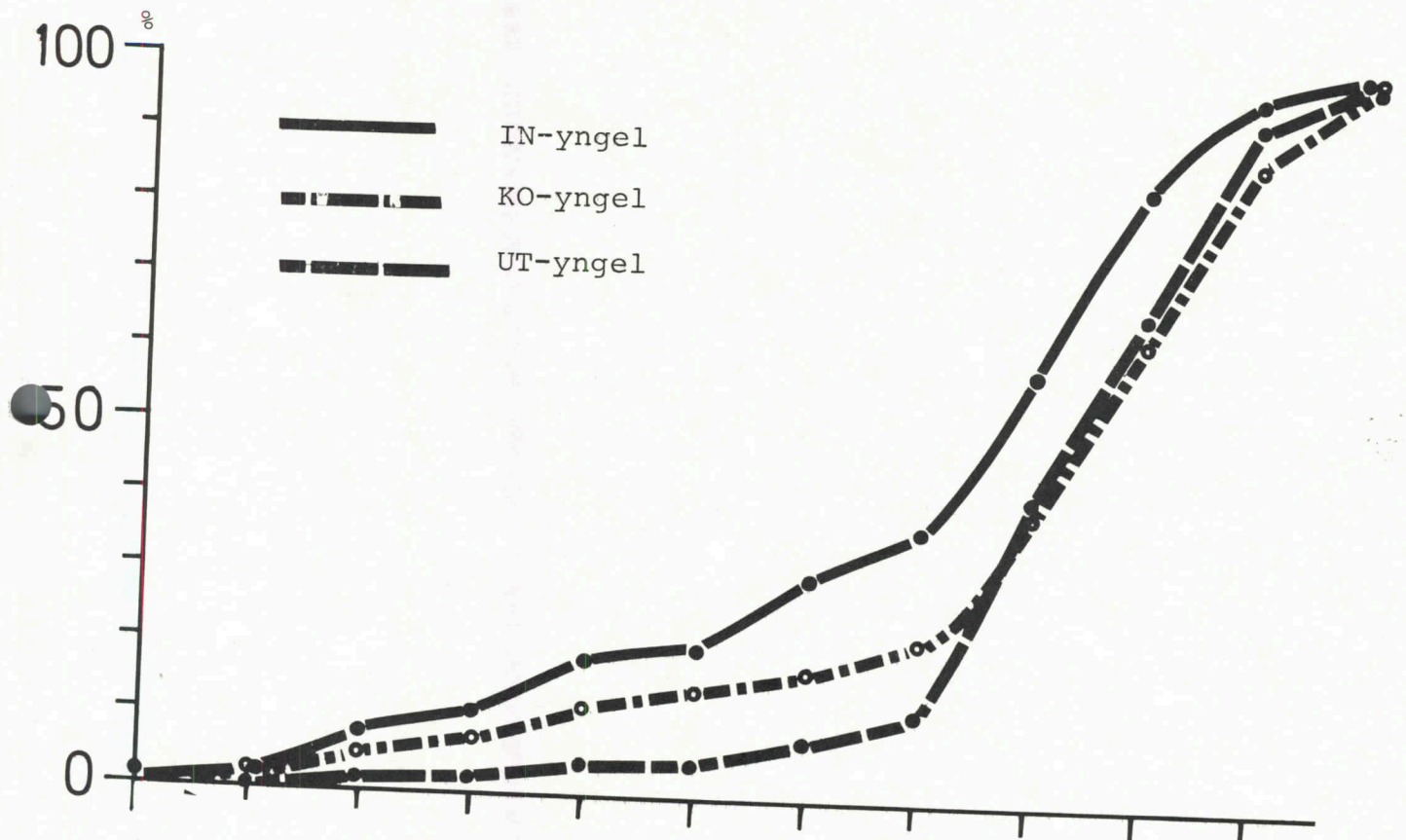
Tester mot ingående avloppsvatten med yngel från exponerade fiskar och kontrollfiskar



Tester mot utgående avloppsvatten.
Yngel från kontrollfiskar.



Yngeldödlighet i %
i rent vatten



Beteckningar som ovan

