



ORKUSTOFNUN
Jarðhitadeild

Jón Benjamínsson

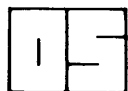
KENNIEFNI

Um notkun flúrefnanna rhódamíns WT og
flúoresceins við ferlunar- og streymisathuganir

Heimildakönnun

OS-84076/JHD-14

Reykjavík, október 1984



ORKUSTOFNUN
Grensásvegi 9, 108 Reykjavík

Jón Benjamínsson

KENNIEFNI

Um notkun flúrefnanna rhódamíns WT og flúoresceins við ferlunar- og streymisathuganir

Heimildakönnun

OS-84076/JHD-14

Reykjavík, október 1984

ÁGRIP

Skýrslan er áfangi fyrirhugaðra rannsókna á notkun kenniefna við athuganir á streymi vatns í berglögum og á yfirborði. Fjallað er um efna- og eðliseiginleika kenniefnanna rhódamíns WT og flúoresceins og þau borin saman. Niðurstaðan er sú að heppilegra sé að nota rhódamín WT þar sem ljóss og lífrænna efna gæti en flúorescein henti betur við könnun á rennsli um ólífræn berglög þar sem ljóss gætir ekki.

EFNISYFIRLIT

	Bls
ÁGRIP	2
EFNISYFIRLIT	3
MYNDASKRÁ	4
TÖFLUSKRÁ	5
1 INNGANGUR	6
2 EITURVERKUN	9
3 MÆLITÆKI	11
4 GRUNNLJÓMUN	15
5 HITASTIG	16
6 BIRTUÁHRIF	17
7 SÝRUSTIG	19
8 SELTA	21
9 UPPTAKA Í LÍFRÆN EFNI OG STEINEFNASAMBÖND	23
10 ÍSETNING	25
11 STADALLAUSNIR OG MÆLING	28
12 SAMANTEKT	31
HEIMILDIR	34
VIÐAUKI: Þýðing á texta eftir Smart & Laidlaw	37

MYNDASKRÁ

	Bls.
1 Helstu einingar flúrmælis (fluorometer) og flúrrofsmælis (spectrofluorometer)	11
2 Hámarksísog og geislun fyrir flúorescein og rhódamín WT .	13
3 Útslag virkjunar og geislunar fyrir flúorescein á Turner 111 flúrmæli ásamt heppilegum ljóssíum	13
4 Samanburður á komutíma kenniefnis milli þriggja söfnunaraðferða	14
5 Hitastigsleiðrétting fyrir kenniefni	16
6 Upptaka ljóss og útgeislun flúrljómunar	17
7 Áhrif geislunartíma á styrk flúrljómunar	18
8 Áhrif sýrustigs á ljómun kenniefnanna	19
9 Áhrif ýmissa sýra á flúrljómun	20
10 Áhrif natríumklóríðs á flúrljómun rhódamíns WT	21
11 Samanburður á ásogi kenniefnanna á kaolinite-set	23
12 Samanburður á ásogi kenniefnanna á lífrænan jarðveg	23
13 Ásog flúoresceins og rhódamíns WT á lífrænu efnin sag og beitleyng og steinefnin bentonite, leirstein og kvarssandstein .	24
14 Þynning í staðallausn	28
15 Dæmi um tvenns konar merki kenniefnis	30

TÖFLUSKRÁ

	Bls.
1 Afleidd nöfn og önnur á litar-kenniefnum	7
2 Verðhlutfall kenniefna	7
3 Upplýsingar um meðhöndlun flúoresceins og rhódamíns WT ...	10
4 Næmi, lágmarks greinanleiki, hámarksörvun og geislun sem og heppilegustu ljóssíur notaðar fyrir Turner III flúrmæli	12
5 Ljóskeyfnistuðull flúoresceins og rhódamíns WT	18
6 Hlutfallsleg áhrif natríumklóríðs á kenniefni	21

1 INNGANGUR

Allmörg ár eru liðin síðan farið var að blanda vatnsleysnu efni út í straumvötn og mæla styrk þess og komutíma á ákveðnum stöðum. Hefur þessi aðferð gefist vel og er nú vel þekkt við allskonar streymismælingar bæði á yfirborði og í berglögum. Efni þetta (tracer) sem ýmist er nefnt kenniefni eða ferlunarefni þarf að hafa þá eiginleika að vera vatnsleysið og helst ekki koma fyrir í náttúrunni, auk þess að vera mælanlegt í mjög litlu magni og vera ódýrt.

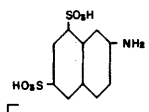
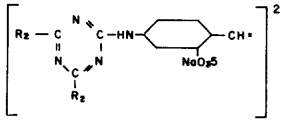
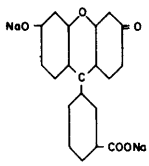
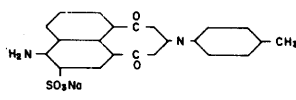
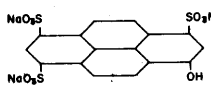
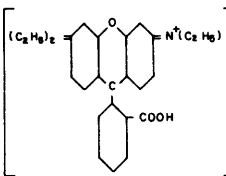
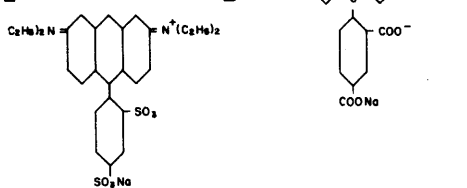
Ýmis efnasambönd eru notuð, en hér á eftir verður fyrst og fremst fjallað um flúrljómandi litarefni (fluorescent dyes) (sjá töflu 1, Smart & Laidlaw 1977). Þau hafa þann eiginleika að soga í sig ljós af ákveðinni bylgjulengd og geisla ljósorkunni, hér eftir nefnt flúrljómun eða ljómun, sem ljósi af lengri bylgjulengd. Flúrljómandi efni hafa meðal annars verið notuð við rannsókn á eftirtöldum þáttum:

- Rennsli grunnvatns
- Rennsli yfirborðsvatns
- Rennsli í pípum
- Strauma í úthöfum
- Blöndun framan við ósa eða frárennsli
- Rennslistíma skolvatns í borun
- Vatnsupptöku plantna
- Blóðstreymi í dýrum
- Við könnun á olíusvæðum
- Streymi undir ís
- Athugun á táraframleiðslu
- Einnig við ýmisskonar lekaleit og fleira í þeim dúr.

Flúrljómandi efni hafa þann kost að vera mælanleg í litlu magni, vera vatnsleysin og ódýr, og einfalda mælitækni þarf til að nema ljómunina. Í þessari skýrslu verða einkum borin saman tvö þeirra, flúorescein og rhódamín WT.

Flúorescein hefur verið notað frá því í lok síðustu aldar (Dole 1906) en vegna þess hve óstöðugt það er í sólarljósi var á sjötta áratugnum farið að nota rhodamine B við ferlun yfirborðsvatns (Pritchard & Carpenter 1960). Þegar í ljós kom hve auðveldlega rhodamine B ásogast seti komst sulpho rhodamine B í gagnið. Hinsvegar reyndist það frekar dýrt efni svo að á sjöunda áratugnum varð til efni sérstaklega þróað til prófana á vatnsstreymi, rhódamín WT. Verðhlutfall þessara efna var fyrir nokkrum árum eins og sýnt er í töflu 2. Samkvæmt þeim upplýsingum sem nú liggja fyrir þá kostaði flúorescein í 1 kg pakkningum 65 svissneska franka í maí 1981 en það eru um 225 kr á núgildandi verðlagi. Rhódamín WT kostar í 1 lítra pakkningum frá Bandaríkjunum US\$ 16 sem gera um 480 krónur (uppl. 1984).

TAFLA 1 Afleidd nöfn og önnur á litarkenniefnum
(tracer dyes) ásamt efnafræðilegu mynstri

Nafn	Litartala	Afleidd nöfn	Önnur nöfn	Efnabindingar
Bláljómandi				
flúrlitur:				
Amino G acid (a,d)			7-amino 1,3 naphthaleni disulphonic acid	
Photine Cu (b)		CI fluorescent brightener 1.5		
Grænljómandi				
flúrlitur:				
Flúorescein	45350	CI acid yellow 73	Flúorescein LT (c) Uranine (d,f) Sodium flúorescein	
Lissamine FF	56205	CI acid yellow 7	Lissamine yellow FF (c) Brilliant sulpho flavine FF (e) Brilliant acid yellow 8G (d)	
Pyranine	59040	CI solvent green 7	Pyranine (g) D&C green 8 (f)	
Rauðgulljómandi				
flúrlitur:				
Rhodamine B (c,d,f,h)	45170	CI basic violet 10	Pontacil brilliant pink* B (h) Lissamine red 4 B (c) Kiton rhodamine B (f) Acid rhodamine (d)	
Sulpho rhodamine B (e,i)	45100	CI acid red 52		

* Aflagt

Allar litartölur eru úr 3. útg. af Colour Index (1971).

Tilvísanirnar að ofan eiga við eftirtalda framleiðendur:

- a. L.B. Holiday Ltd. b. Hickson and Welch Ltd. c. ICI limited.
d. Allied Chemical Corporation (Specialty Chemicals Division).
e. Farbwerke Hoechst A.G. f. CIBA-Geigy U.K. Ltd.
g. Farbenfabriken Bayer A.G. h. Du Pont de Nemours and Co. Ltd.
i. GAF Corporation. j. H. Kohnstanns and Co. Inc.

TAFLA 2 Verðhlutfall árið 1966 í USA (A) (skv. Wilson 196 og í Englandi árið 1975 (B) (Smart & Laidlaw 1977) fjögurra flúrljómandi kenniefna miðað við hlutfalls töluna 1 fyrir flúorescein

	Flúorescein		Rhodamine B		Sulpho rhodamine B		Rhódamín WT	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Einingarverð	1	1	2	1,3	6	2,1	4	1,6
Verð miðað við næmi 1			2		14		4	

Einu flúrefnin sem notuð hafa verið við ferlunarprófanir hér á landi eru flúorescein og amido rhodamine. Bæði efnin voru notuð við lekaleit í Sigöldulóni sumurinn 1980, 1981 og 1982, en með misjöfnum árangri þar sem 80-90% af flúorescein skila sér, en af amidorhodamine einungis um 10% (Electrowatt/Virkir 1980, 1981A, 1981B, 1982). Einnig voru gerðar streymisrannsóknir í Hrauneyjarfosskurði með flúorescein sumarið 1982 (Isler 1982). Leiðir grunnvatnsstrauma í Mývatnssveit voru kannaðar með natrium flúorescein árin 1981 og 1982 og var því safnað í viðarkol og mælt á Hafrannsóknastofnun af Jóni Ólafssyni (1983). Flúorescein var á vegum Jarðhitadeildar OS sett í Urriðavatn niður um ís vorið 1983 (Jón Benjamínsson & Sigmundur Einarsson 1983) og ljómunin mæld á mælitæki Landsvirkjunar. Í kafla 10 er nokkru nánar fjallað um notkunarmöguleika kenniefna við ferlunarprófanir hér á landi.

Á vegum Jarðhitadeildar Orkustofnunar er fyrirhuguð notkun kenniefnanna flúoresceins og rhódamíns WT og í köflunum hér á eftir er notkunarhæfni efnanna borin saman. Verkið er áfangi í umfangsmeiri könnun sem m.a. fæli í sér eigin tilraunir stofnunarinnar og efnagreiningar á rannsóknarstofu í því sambandi.

2 EITURVERKUN

Til þess að litarefni sé nothæft við ferlunarprófanir á heitu og köldu neysluvatni þurfa eiturverkanir þess að vera neðan marka sem ákveðin eru af alþjóðlegum heilbrigðisstofnunum. Eru þau fengin með tilraunum á dýrum og sú niðurstaða yfirfærð á mannskepnuna.

Smart & Laidlaw (1977) tóku saman úr ýmsum birtum heimildum niðurstöður eituráhrifa flúrefna og vegna mikilvægis þessa þáttar er sá kafli birtur þýddur og óstytur í viðauka með skýrslunni. Helstu niðurstöður úr grein þeirra, sem snerta efni þessarar skýrslu eru þær að flúrefnin rhódamín WT, flúorescein og photine CU hafa tiltölulega litla eiturverkan, minni heldur en önnur flúrlitarefni. Ennfremur geta þeir þess að leyfilegt hámark í Bandaríkjunum til stöðugar neyslu á rhódamín WT séu 0,75 mg/dag og að Jarðfræðistofnun Bandaríkjanna mælist til þess að lokastyrkur lausnar fari ekki yfir 10 µg/l við streymisrannsóknir. Sé gert ráð fyrir að einstaklingurinn drekki 5 lítra af vatni á dag yrði vatnið að innihalda 0,15 mg/l til að ná hámarksneyslumörkum (0,75 mg/dag) en það þýðir um 115 sinnum sterkari lausn en sem nemur mælingarnæmi á rhódamín WT sem talin er 13 ng/l. Mælingarnæmi flúorescein er talin 290 ng/l. Geta má þess að liturinn er auðsær í 0,1 mg/l lausn þannig að litur vatnsins ætti að geta sagt til um neysluhæfni þess.

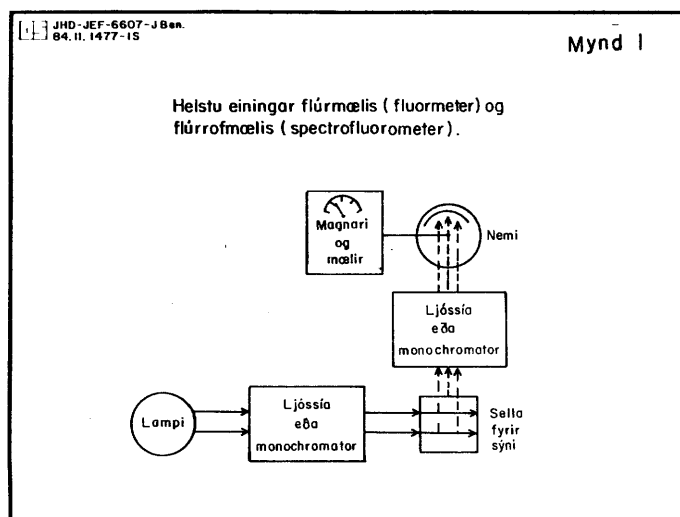
Nestmann o.fl. (1980) gerðu athuganir með áhrif litar frá rhodamine B og flúorescein litartöflum á Salmonella typhimurum, en töflur þessar eru seldar á almennum markaði erlendis. Í ljós komu miklar erfðabreytingar hjá Salmonella typhimurum í rhodamine B vökvanum, en engar breytingar komu fram í sterkustu flúorescein lausninni sem var 100 g/l. Af grein Smart & Laidlaw (1977) má ráða að allnokkur flúrlitur frá flúorescein eða rhódamín WT þurfi að sjást á vatni áður en það hefur eiturverkun á vatnafiska og að þeir þoli meiri litarstyrk í skamman tíma. Benda má á, að auk notkunar í litarefni, lyf og snyrtivörur eru rhódamín WT og flúorescein notuð sem kenniefni við blóðstreymisrannsóknir á lifandi dýrum. U.S. Department of Labor hefur gefið umsögn um skaðsemi og meðferð efnasambanda og tafla 3 er unnin upp úr umsögn þeirra.

Tafla 3 Upplýsingar um meðhöndlun flúoresceins og rhódamíns WT frá framleiðendum

Efnafræðilegt heiti eða framleiðsluheiti	Flúorescein disodium salt	Intracid rhódamín WT liquid
Framleiðandi	Eastman Kodak Company	Crompton & Knowles Corporation
Efnasambönd sem hættulegt er að blanda við		Natríum hýdroxíð (mjög brennandi)
Eldslökkviefni	CO ₂ þurrefni	Vatn
Skaðsemismörk	Ekki sett nein af A.C.G.I.H.	Ekki sett nein
Áhrif mikillar snertingar eða inntöku	Lítið heilsu-spillandi	Mikil inntöku-áhrif á rottur
Neyðarráðstafanir	Virðast óþarfar	Dauðaskammtur 25 g/kg Snerting við hörund: þvottur með sápu og vatni. Snerting við augu: Skola augun með vatni í a.m.k. 15 mín. Hafa samb. við lækni
Stöðugleiki	Stöðugt	Stöðugt
Hættuleg fjölliðun	Gerist ekki	Gerist ekki
Það sem þarf að gera ef efnið fer óvart út úr íláti.	Fjarlægja alla í-kveikjuvalda. Fara í varnarklæðnað, sópa efninu upp á pappír. Setja í plastílát. Brenna. Þvo svæðið vandl. úr sápuvatni.	Þrifa eins mikið og mögulegt er með pappírspurrku. Hlutleysa leifarnar með veikri ediksýru. Skola svæðið með miklu vatni.
Verndun öndunarfæra	Nota síu ef notkun er mikil	
Loftræsting	Vifta	Vifta
Verndun handa	Gúmmíhanskar	Gúmmíhanskar
Verndun augna	Öryggisgleraugu	Öryggisgleraugu
Sérstakar varúðarráðstafanir		Geyma í lokuðu íláti við stofuhita. Forðast beina snertingu. Þvo sér vandlega eftir meðhöndlun.

3 MÆLITÆKI

Flúrljómunarefni er hægt að mæla bæði með litmælingu (colorimetrically) og flúrljómunarmælingu (fluorometrically). Hægt er að mæla t.d. flúorescein á litmæli (colorimeter) allt niður í 5 µg/l með því að draga það út (extract) úr 1-2 lítra sýni og meðhöndla á réttan hátt fyrir mælingu. Aftur á móti krefst mæling á flúorescein með flúrljómunaraðferð (fluorimetric) einungis nokkurra millilíttra sýnis og við bestu skilyrði er litarefnið mælanlegt niður í 40 ng/l (Feuerstein & Sellick 1963). Aðferðin er því hentugri bæði hvað varðar undirbúningsvinnu og mælinákvæmni. Tvær gerðir mælitækja eru aðallega notaðar, þ.e. flúrmælir (fluorometer) og flúrrófsmælir (spectrofluorometer). Í aðalatriðum byggja þessi mælitæki á sömu lögmálum og á mynd 1 er sýnd uppröðun mikilvægustu eininga tækjanna. Geislun frá við-



eigandi lampa (kvikasílfurs eða xenon) fer gegnum ljóssíu eða monochromator og sellu með sýninu. Frá sýninu er flúrljómun í allar áttir en best er að mæla hana undir réttu horni. Flúrljómunin fer síðan gegnum aftari ljóssíu eða monochromator á nemann (detector; getur verið photomultiplier) og breytt í mælanlegt útslag með magnara (amplifier) í samræmi við styrk flúrljómunarinnar. Munurinn á flúrmæli og flúrrófsmæli liggur í því að með flúrmæli eru notaðar við-eigandi ljóssíur en monochromator í flúrrófsmæli. Flúrrófsmælir er því viðameiri og samkvæmt Skoog & West (1971) allt að tíu sinnum dýrari. Góður flúrmælir er þó í allflestum tilvika jafngildur flúrrófsmæli til mælinga á flúrljómun.

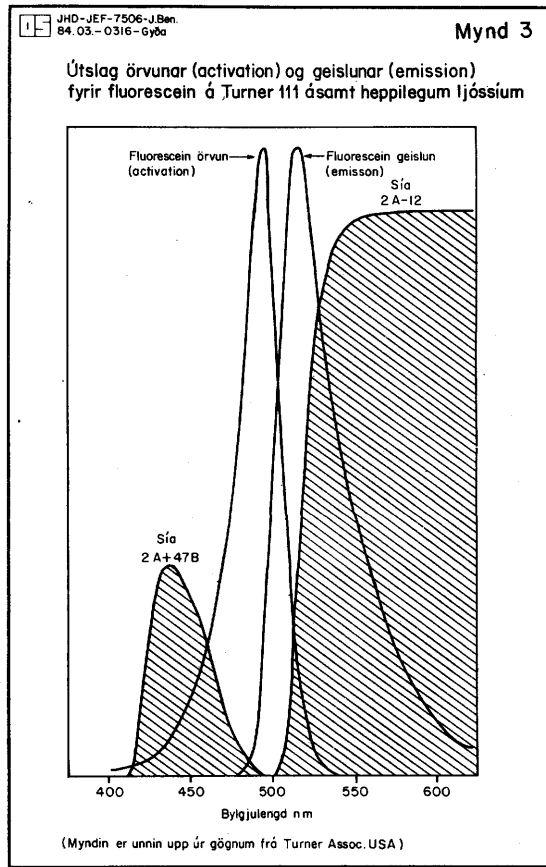
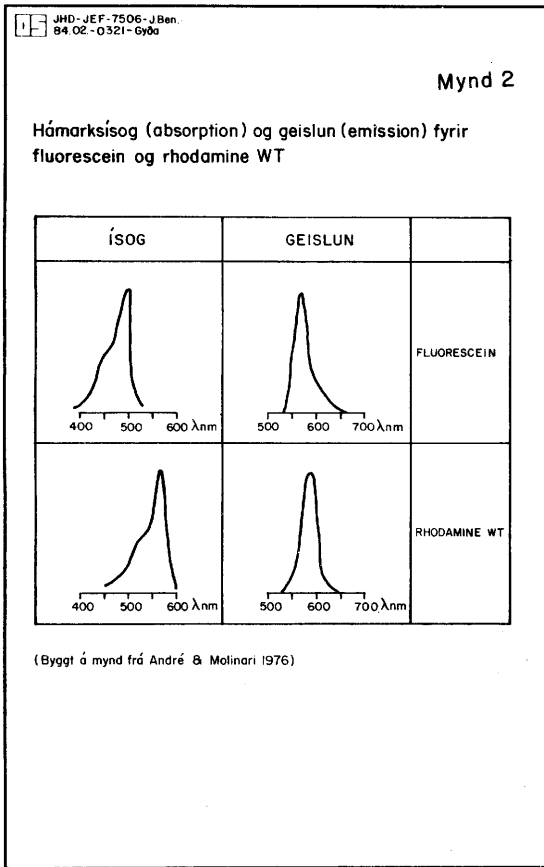
Smart & Laidlaw (1977) könnuðu næmi (sensitivity) og greinanleika (detectability) flúrefna í eimuðu vatni við 21°C og sýrustig 7,5 pH mælt á Turner 111 flúrmæli. Þá var einnig könnuð hámarks ljósörvun (excitation) og hámarks geislun (emission) við pH 7,0 auk athugunar á heppilegum ljóssíum, en val á þeim er mjög mikilvægt. Niðurstöður þessara athugana eru í töflu 4.

TAFLA 4 Næmi, lágmarks greinanleiki, hámarks örvun og geislun sem og heppilegustu ljóssíur fyrir Turner 111 flúrmæli.

Næmi	Grunn- ljómun Aflestur á skala	Lágmarks greinan- leiki	Hámarks örvun	Hámarks geislun	Fremri sía	Kvika- silfurs lína	Aftari sía
ng/l	0-100	ng/l	nm	nm		nm	
Flúore- scein	110	26,5	290	490	520	Kodak Wratten 98	436 55
Rhóda- mín WT	13	1,5	13	555	580	Corning 2x/-60 + Wratten 61	Corning 4-97 + 3-66

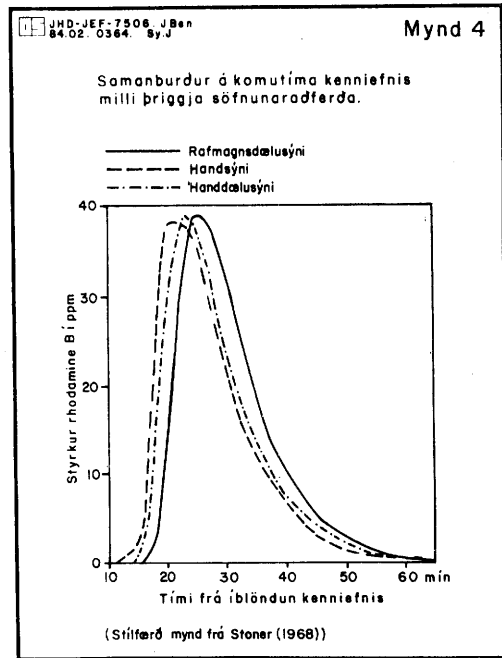
André & Molinari (1976) gerðu úttekt á þeim eðlis- og efnafræðilegu þáttum sem hafa áhrif á flúrljómandi kenniefni og er mynd 2 lítið breytt frá þeim komin en hún sýnir á myndrænan hátt útslag geislunar og ísogs (absorption) fyrir flúorescein og rhódamín WT. Þeir gefa ennfremur upp ísogs- og geislunarhámark við pH 12 á 489 nm og 515 nm bylgjulengdum. Jones o.fl. (1979) gefur upp ísogshámark á 488 nm og hámarksgeislun á 509 nm við notkun natríum flúorescein og að ísogs- og geislunarlínur skerist við 499 nm.

Leitað hefur verið upplýsinga um flúrmælingatæki hér á landi og fara þær upplýsingar hér á eftir, en óvíst hvort þær eru tæmandi: Við tilraunastöð Háskólans á Keldum er til Turner 111 flúrmælir og gamall Turner 111 (Astro Thomas) er til hjá Hjartavernd. Hafrannsóknastofnunin á mjög fjölhæft og fullkomið tæki af gerðinni Perkin Elmer 650-105 Fluorescence Spectrophotometer. Landsvirkjun á Perkin Elmer 204S Fluorescence Spectrophotometer með photomultiplier. Var hann meðal annars notaður við lekaleit á Sigöldu en þar var flúorescein-
styrkur mældur allt niður í 20 ng/l (Electrowatt/Virkir 1980). Ennfremur var hann notaður til mælinga á sýnum frá niðursetningunni í Urriðavatn. Á Orkustofnun er til Turner 111 flúrmælir. Mynd 3 er unnin upp úr fylgigögnum með Turner 111 frá Turner Assoc., Palo Alto, California, en hún sýnir útslag örvunar (activation) og geislunar (emission) fyrir flúorescein ásamt heppilegum ljóssíum með Blue T-5 (110-853) lampa. Varúðar þarf að gæta við val á síum í Turner 111 en vegna nálægðar við ljósið er hætta á að þær hitni of mikið.



Turner Assoc., USA framleiðir mæliáhalð sem mælir flúrljómun vatns þegar það streymir í gegnum mæliskynjara, svo nefnda flæðisellu (flow-cell). Stoner (1968) bar saman mæligildi sýna sem safnað var á þrjá mismunandi vegu við kenniefnisprófun í Green-Duwamish ánni í Bandaríkjunum. Í fyrsta lagi var notast við handsýni, í öðru lagi var dælt með handdælu í gegnum flæðisellu og í þriðja lagi var notuð rafmagnsdæla til að dæla í gegnum flæðiselluna en þau mæligildi birtust á skrifara.

Mynd 4 sýnir mældan styrk þessara sýna á móti tíma. Þar sést að nokkur tímamunur er á merkjunum. Fyrst verður vart við merki frá handsýni og síðast verður vart við merkið á skrifara í sýni frá rafmagnsdælu. Tímamunurinn er 4-5 mínútur. Sennilega stafar hann af dvalartíma vatnsins í leiðslunni og/eða flæðisellunni. Dvalartími er líklega hinn sami hvort sem merkis er að vanta eftir hálf tíma eða hálfan dag. Í síðara tilvikinu skiptir þessi munur ekki máli í útreikningum og er innan fráviksmarka en samkvæmt þessum niðurstöðum Stoner (1968) fæst ekki marktækur komutími sé um stuttan tíma að ræða ef notuð er flæðisella með rafmagnsdælu.



Vert er að geta þess að Frungel og Koch (1976) greina frá því að með tæki sem heitir Variosens, og mikið er notað í hafrannsóknum, geti þeir mælt rhodamine B og flúorescein niður í 10^{-12} g/l styrk, það er pg/l (pico-). Þetta er þúsundsínum meira næmi heldur en hjá þeim tækjum sem til eru hérlendis en vegna þess hve "fjarlægur" Variosens er, verður ekki frekar fjallað um greiningar með honum í þessari skýrslu.

Í ljós hefur komið að eðlis- og efnafræðilegir eiginleikar vatnsins skipta miklu hvað varðar mæliniðurstöður og verður vikið að þeim í köflunum hér á eftir.

4 GRUNNLJÓMUN

Við mælingar á flúrljómun kemur fram grunnljómun, sem er misjöfn eftir gerð litarefnis. Þekkt er að grunnljómun litarefna á grænni og blárri bylgjulengdum er miklu hærri heldur en litarefna á rauðgulri bylgjulengd auk þess sem þar er meira frávik. Þá er og vitað að mismunandi vatn hefur mismikla grunnljómun er sums staðar má rekja til svifagna í vatninu. Tilraunir til að aðskilja grunnljómun frá flúrljómuninni með eðlis- og efnafræðilegum aðferðum hafa reynst árangurslausar vegna þess hve efnafræðilegar ástæður fyrir grunnljómun og flúrljómun litarefna eru áþekkar. Smart & Laidlaw (1977) komust að raun um að grunnljómun yfirborðsvatns er yfirleitt hærri og sveiflukenndari heldur en vatns úr borholu og telja það stafa af meiri svifþörungum og svifaur auk áhrifa frá ræktun lands. Grunnljómun samkvæmt Smart & Laidlaw (1977) er sýnd í töflu 4. Grunnljómun vatnsins við Sigöldu hefur aukist á lekastöðum síðastliðin ár (Páll Theódórsson 1982) sennilega vegna þess að litarefni situr eftir í botnleðjunni frá ári til árs og skolast hægt út.

5 HITASTIG

Styrkleiki (intensity) flúrljómunar er háður hitastigi lausnarinnar. Feuerstein & Selleck (1963), Wilson (1968) og Moser & Neumaier (1969) könnuðu áhrif hita á flúrljómun og eftir einföldun á niðurstöðunum má segja að styrkleiki flúoresceins ljómunar breytist um 0,36 %/°C en ljómun frá rhódamín WT um 2,6 %/°C. Á mynd 5 hafa viðeigandi ferlar verið dregnir upp. Smart & Laidlaw (1977) fengu svipaða niðurstöðu og telja að ferli línanna megi lýsa með líkingunni:

$$F = F_0 \exp nt$$

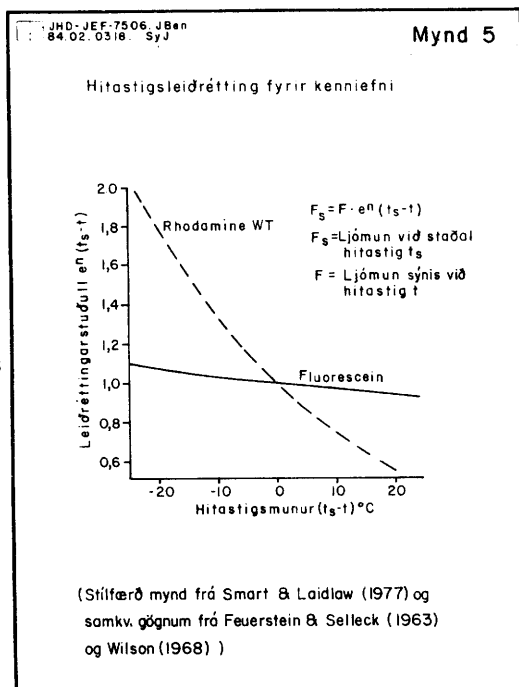
F = mæld ljómun við hitastigið t

F₀ = ljómun við 0°C

n = stuðull viðeigandi flúrefnis
- 0,0036 flúorescein

exp =

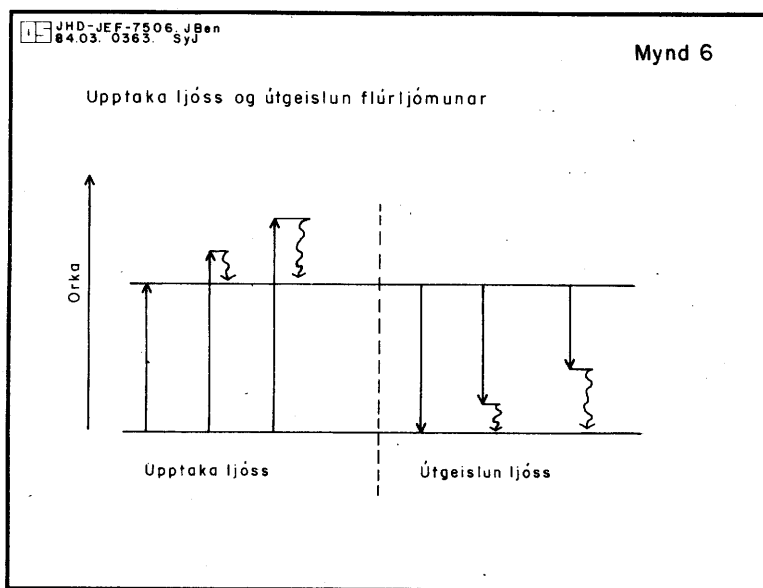
- 0,027 rhódamín WT



Af ofansögðu er því ljóst að æskilegast er að mæla öll sýni við sama hitastig.

6 BIRTUÁHRIF

Þegar efnasambönd taka upp ljósorku hlaðast sameindir og bæta við sig orkuskömmtum (komast á hærra orkustig). Flúrljómun verður hinsvegar þegar sameindir missa orkuskammta (detta á lægra orkustig) og geisla þá frá sér ljósorku (sjá mynd 6). Á hinu háa orkustigi gerast efna-



breytingar frekar heldur en í venjulegu ástandi efnis og þannig er með flúrsambönd sem oft brotna niður vegna oxunar og annara efnahvarfa. Hraði þessara breytinga er háður orku ljósgeislans. Þar af leiðandi er ljósefnafræðileg klofnun (photochemical) háð bæði styrk ljóss og bylgjulengd. Útfjólublátt ljós til dæmis veldur hraðari klofnun heldur en ljós af lengri bylgjulengdum. Gerðar hafa verið athuganir með áhrif birtu á flúrljómandi efni og þannig fundinn ljóskleyfni-
stuðull af völdum ljóss og klofnun fundin með líkingunni:

$$F_I = F \exp - kt$$

F_I = flúrljómun við tímann t

F = upphafleg flúrljómun

k = kleyfnistuðull

t = tímalengd

Tafla 5 er fengin frá Smart & Laidlaw (1977) og sýnir ljóskleyfni-
stuðul (photochemical decay coefficient) fyrir flúorescein og rhódamín
WT.

TAFLA 5 Ljóskeyfnistuðull flúoresceins og rhódamíns

Heimild og ljósskilyrði	Flúorescein	Rhódamín WT

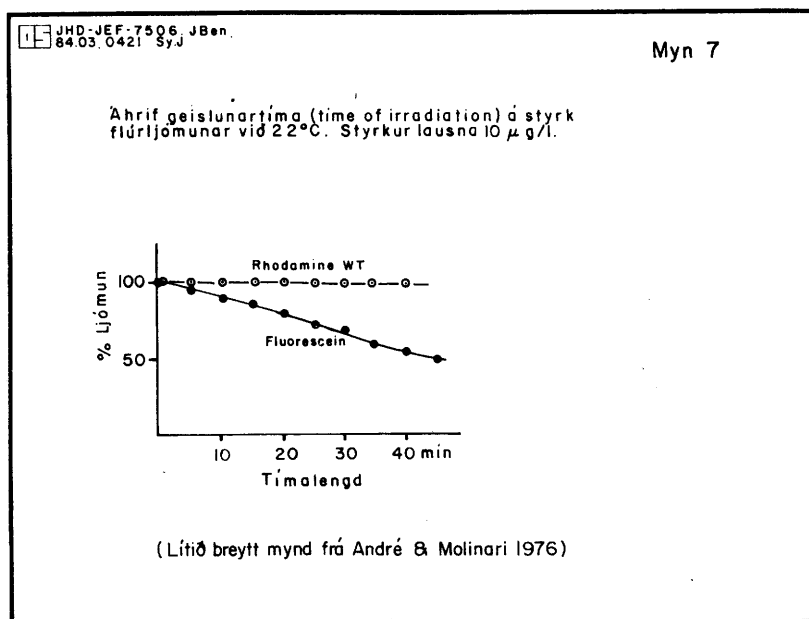
Feuerstein & Selleck (1963)		
skýjað	$5,1 \times 10^{-2}$	
sólskin	$2,6 \times 10^{-1}$	

Abood o.fl. (1969)		
sólskin		$1,5 \times 10^3$
6 klst sólskin 100 $\mu\text{g/l}$ *	$9,5 \times 10^{-2}$	$< 1,0 \times 10^4$
6 " undir 60w lampu 100 $\mu\text{g/l}$ *	$1,3 \times 10^{-2}$	$< 1,0 \times 10^4$

* Gefinn upp helmingur klofnunar til mótvægis við 12 klst. myrkurs á meðan athugun stóð yfir.

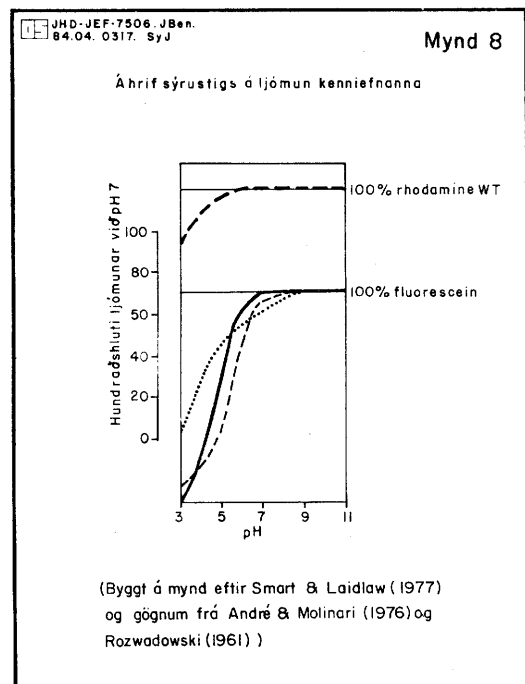
Klofnunarhraðinn er skv. töflunni mjög hár fyrir flúorescein sem missir flúrljómunina auðveldlega í miklu sólskini. André & Molinari (1976) komust að svipaðri niðurstöðu og er mynd 7 fengin frá þeim. Þar sést að eftir 50 mínútur hefur styrkleiki (intensity) flúrljómunar minnkað um helming en lítil sem engin breyting orðið á rhódamín WT.

Taka þarf tillit til þessara breytinga við geymslu og geyma sýni í dökkum ílátum og þau í dökkum kassa og/eða annari geymslu þar sem sólarljóss gætir ekki.



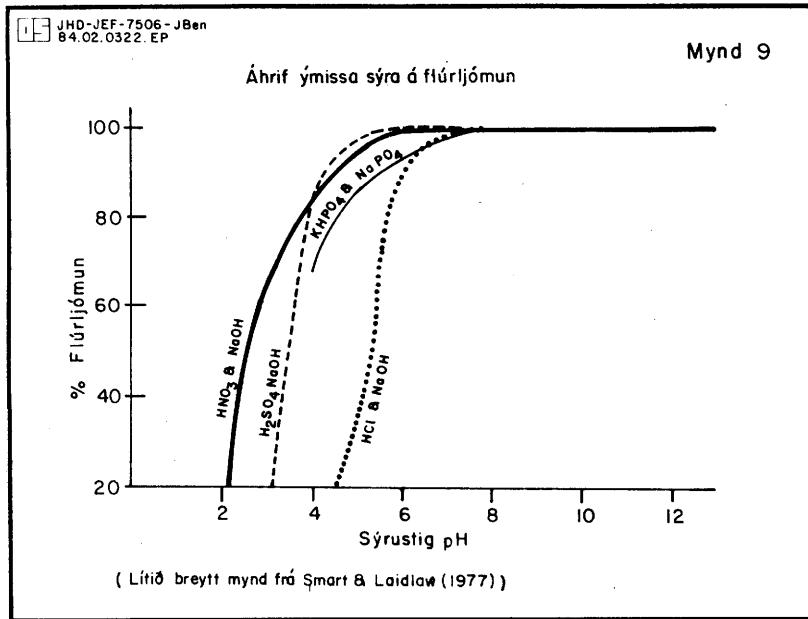
7 SÝRUSTIG

Lindqvist (1960) gerði m.a. rannsóknir á áhrifum sýrustigs á flúorescein ljómun en af niðurstöðum hans má ráða að ljómunin sé hvað stöðugust milli pH 8,5 og 10,5. Feuerstein & Selleck (1963) bentu á að flúrljómun væri mest og stöðugust við sýrustig milli pH 5 og 11 en dofnaði mjög hratt, væri farið út fyrir þau mörk. Smart & Laidlaw (1977) gerðu athuganir á ljómun flúrefna við mismunandi sýrustig. Notuðu þeir dúatöflur (buffer) fyrir pH 4,0, pH 7,0 og pH 9,2 og svo saltsýru og natríum hydroxíð. Mynd 6 er dregin upp út frá niðurstöðum þeirra. Þar kemur í ljós að ljómun frá flúorescein dofnað að líkindum mjög hratt þegar sýrustig lausnar verður lægra heldur en pH 7. Ljómun frá rhódamín WT virðist aftur á móti ekki byrja að dofna fyrir en fyrir neðan pH 6. André & Molinari (1976) telja hinsvegar að stöðugleiki flúoresceinljómunar náist ekki fyrir en við $\text{pH} \geq 9$ og eru niðurstöður þeirra sýndar sem slitin lína á mynd 8. Ennfremur benda niðurstöður þeirra til að rhódamín WT dofni mjög hratt þegar sýrustig nálgast pH 11 og fer þar yfir. Ljómun flúoresceins hafði ekki breyst við pH 12 sem var hæsta melda pH gildi í athugun þeirra. Punktalínan á mynd 6 er túlkun höfundar á niðurstöðum Rozwadowski (1961) sem kannaði áhrif sýrustigs á flúrljómun flúoresceins í eimuðu vatni með saltsýru, brennisteinssýru og saltpéturssýru. Fékk hann nær sömu útkomu fyrir báðar fyrirtölu sýrurnar, en telur flúrljómun í saltpéturssýrulausn háðari hitastigi lausnarinnar.



Í leiðbeiningabæklingi með Turner III flúrmæli (Turner Assoc. Palo Alto, Calif.) er ráðlagt að nota fosfat-dúa við flúorescein mælingar. Rezek o.fl. 1979 telja fosfat-dúa ekki hæfa fyrir grunnvatn auðugt af kalsíum, magnesíum eða öðrum söltum og sýna fram á ágæti borax-dúa en benda einnig á hydroxy-methyl-aminomethane sem hæfan dúa í þessu tilviki. Smart & Laidlaw (1977) könnuðu áhrif saltsýru, brennisteinssýru og saltpéturssýru á flúrljómun rhódamíns WT og auk þess áhrif fosfat-dúa við mismunandi hitastig. Mynd 9 sýnir niðurstöður þessara athugana. Athuga ber að niðurstöður þessar eru fengnar með notkun

eimaðs vatns og gætu hugsanlega verið aðrar fyrir ómeðhöndlað jarðhitavatn með pH 9-10.



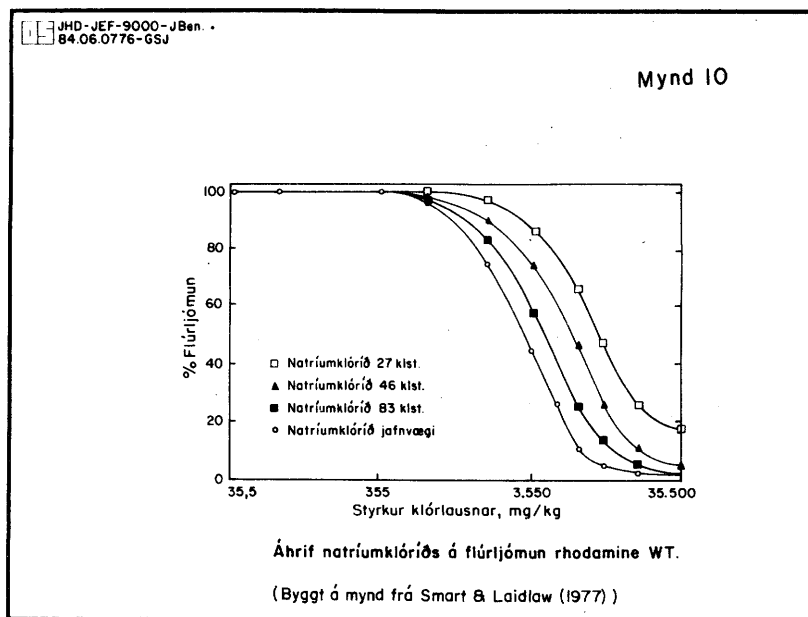
8 SELTA

Eins og áður hefur komið fram eru flúrljómandi kenniefni mikið notuð til könnunar á sjávarstraumum. Þar er fyrst og fremst verið að kanna dreifingu og hraða, fremur en styrk. Collins (1968) og André & Molinari (1976) telja að flúrljómun dofni í söltu vatni og lesa má annars staðar að aðrar niðurstöður þar um séu mótsagnakenndar. Smart & Laidlaw (1977) könnuðu áhrif natriumklóríðlausnar af styrkleikanum 3600 mg/l og 17800 mg/l (svipað og er í sjó) og eru niðurstöður í töflu 6 og er hámarksljómun (100%) sú sama og í eimuðu vatni.

TAFLA 6 Áhrif natriumklóríðs á kenniefni.
Miðað er við hámarksljómun í eimuðu vatni.

Styrkur NaCl-lausnar		
Litar-	3600 mg/l	17800 mg/l
Flúorescein	100 %	100 %
Rhódamín WT	97 %	92 %

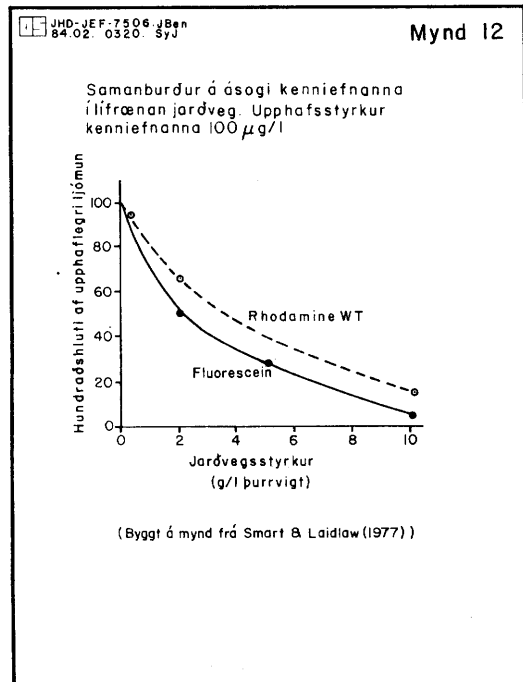
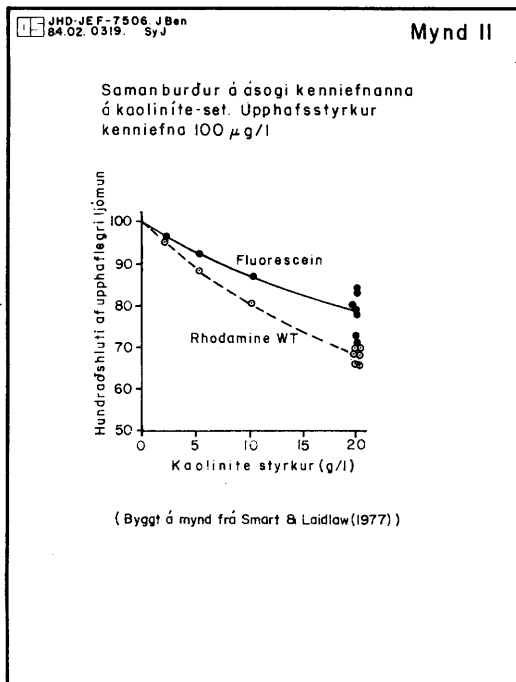
Ljóst er af þessum athugunum að ljómun rhódamíns WT dofnar í mjög söltu vatni (seltukeimur finnst við um 300 mg/l). Smart & Laidlaw (1977) geta ekki um hvernig staðið var að þessari tilraun en birta niðurstöður úr fyrri athugunum á áhrifum seltu á rhódamín WT (sjá mynd 10). Enga skýringu gefa þeir á mismuninum sem kemur fram milli



Þessara athugana, en geta þess að tilraunirnar hafi verið gerðar með nokkurra ára millibili í ólíkum rannsóknastofum með efni frá sitt hvorum framleiðandanum. Af mynd 10 má ráða að bæði tímabátturinn og styrkur natriumklóriðlausnarinnar ráði lækkun á ljómun rhódamíns WT. Þeir félagar Smart & Laidlaw (1977) vísa í grein eftir Deaner (1973) og benda á að hann hafi komist að þeirri niðurstöðu að minnkandi ljómun rhódamíns WT í klórlausn sé óháð styrk litarefnisins en aftur á móti háð klórstyrk og tíma. Ennfremur benda þeir Smart & Laidlaw (1977) á að samkvæmt niðurstöðum Deaner (1973) megi búast við dofnun ljómunar frá rhódamín WT þegar um er að ræða lengri tíma heldur en 2 klst við aðstæður þar sem klórleifarstyrkur er 22 mg/l og 40 mg/l.

9 UPPTAKA Í LÍFRÆN EFNI OG STEINEFNASAMBÖND

Oft kemur fyrir að litarefnið skilar sér ekki allt. Varð mönnum snemma ljóst að þetta tap stafaði af ásogi á svifagnir í vatninu og gerðu tilraunir þar að lútandi svo sem Dole (1906) og Feuerstein & Selleck (1963). Smart & Laidlaw 1977) athuguðu ásog flúrljómandi kenniefna á kaolinite-set og lífrænan jarðveg og eru myndir 11 og 12 frá þeim komnar, lítillega breyttar, og mynd 11 dregin upp eftir niðurstöðum úr grein þeirra. Greinilegt er að flúorescein ásogast



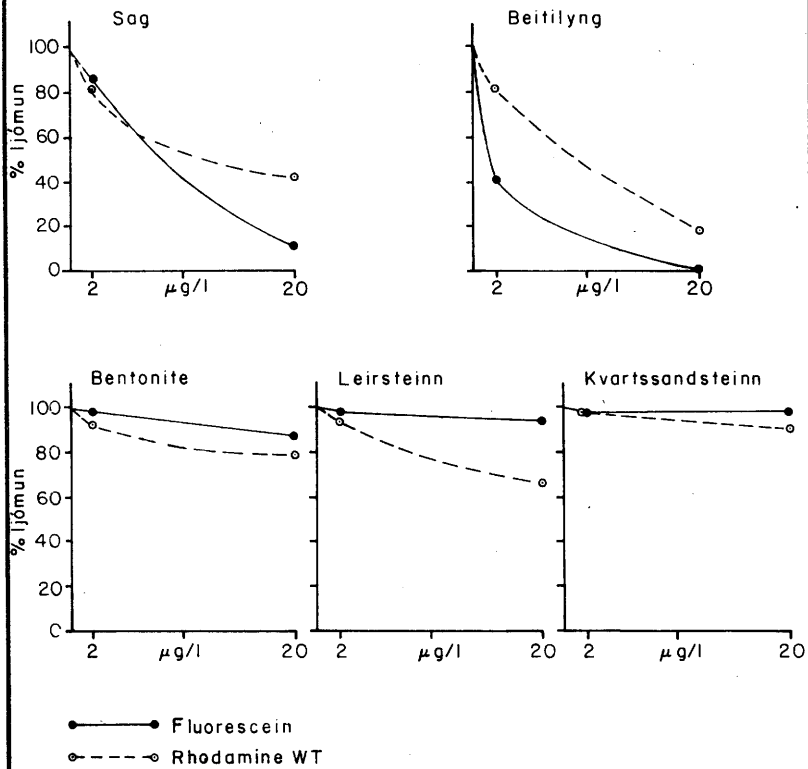
ekki jafnmikið á steinefnasambönd og rhódamín WT gerir. Bæði efnin sýna mikið ásog á lífræn sambönd og flúorescein meira heldur en rhódamín WT. Minnst ásog á bæði steinefnasambönd og lífræn sambönd í heildina séð sýndu flúrefnin pyramine og amino G sýra, en lissamine FF og sulpho rhodamine B sýndu minna ásog á lífræn efni. Í þeim heimildaritum sem til eru á Orkustofnun er ekki varað við ásogi á gler- eða plastílát, nema að rhodamine B, sem er katjóna-litur, ásogast á glerílát.

Geta má þess að við ferlunarprófanir í Sigöldulóni varð fljótlega vart við að litarefnin skiluðu sér ekki fullkomlega, einkum voru lélegar heimtur á amidorhodamine en skástar á flúorescein (Electrowatt/Virkir, 1980). Sennilega má rekja þetta til ásogs á svifaur og botnleir.

JHD-JEF-6607.JBen.
84.03.0362.SyJ

Mynd 13

Ásog fluoresceín og rhodamíne WT á lífrænu efnin
sag og beittilyng og steinefnin bentonite, leirstein
og kvarssandstein



(Byggt á gögnum frá Smart & Lgidlaw (1977))

10 ÍSETNING

Í inngangi er getið um nokkra rannsóknabætti þar sem kenniefni eru notuð. Þær rannsóknir á Orkustofnun sem hagkvæmt gæti verið að nota kenniefni til eru rennsli yfirborðsvatns og grunnvatns, rennsli í jarðlögum t.d. á milli borhola við niðurdælingu, athugun á skolvatns-tíma við borun og rennsli í pípum. Hér á eftir verður stuttlega fjallað um þessa bætti. En á undan er rétt að geta þess að æskilegt er að hámarksstyrkur lokalausnar (merkisins) fari ekki yfir 10 µg/l. Eins er rétt að benda á hagkvæmni þess að láta þann aðila sem blandar lausnina fyrir notkun einnig sjá um blöndun stofnstaðals (sjá kaflann um staðallausnir og mælingu). Þessi aðili má helst ekki umgangast aðra rannsóknarmenn og alls ekki koma á sýnatökustaðinn eða þangað sem sýnið er mælt. Varkárni í þessum efnum er aldrei of mikil. Vegna þessara takmarkana er jafnframt heppilegt að sami aðili sjái einnig um ísetningu kenniefnisins. Helsta notkun kenniefnis í yfirborðsvatni er íblöndun í straumvatn. Einnig er það notað til að kanna útbreiðslu og/eða dreifingu úrgangsvatns þar sem það fellur í sjó eða stöðuvatn.

Ísetning kenniefnis í straumvatn getur verið með tvennu móti þ.e. snögg (allt sett í einu) eða hæg (jöfn blöndun um einhvern tíma).

Í grein eftir Cobb (1968) er lýsing á þremur aðferðum sem gefa stöðuga og jafna íblöndun, það er með Aerofeed-einingu, Floating siphon-einingu og Mariotte-einingu. Af þessum einingum er Mariotte-einingin meðfærilegust í flutningum og einföldust í notkun en hún skammtar stöðugt rennsli sama magns af kenniefnislausn. Þessi aðferð er viðhöfð ef mæla á t.d. blöndunarpátt þ.e. útbreiðslu ákveðins strengs í fljóti svo að eitthvað sé nefnt. Einnig er hægt að mæla heildarrennsli. Þá er tekið eitt sýni á þeim stað og tíma þar sem kenniefnið er fullkomlega blandað í straumvatnið og styrkur þess mældur. Þá fæst heildarrennsli Q samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$Q = \frac{C_1}{C_2} q$$

q = rennsli kenniefnislausnar
 C_1 = styrkur kenniefnislausnar
 C_2 = styrkur kenniefnis í sýni

Sé öllu kenniefninu dembt úti í einu, er ágætt að brjóta glerílát með kenniefninu í undir vatnsyfirborði með töng. Ísetningarstaðinn þarf að velja þennig að efnið nái að blandast jafnt um allt vatnið áður en það rennur hjá sýnatökustaðnum. Sýni eru svo tekin yfir ákveðinn tíma. Tímalengdin sem sýnataka þarf að standa í er fundin samkvæmt formúlunni:

$$T = \frac{\sigma}{\bar{u}} \quad \begin{array}{l} T_s = \text{tímalengd} \\ \sigma = \text{vegalengd frá íblöndunarstað til sýnatökustaðar} \\ \bar{u} = \text{meðalstraumhraði þvert yfir} \end{array}$$

Heildarmassi M yfir tímalengdina T_s þar sem rennsli er jafnt er:

$$M = QT_s \left(\frac{1}{T_s} \int_0^{T_s} C dt \right) \quad \text{eða} \quad Q = \frac{M}{\int_0^{T_s} C dt}$$

C = styrkur kenniefnis í sýni

Til hægðarauka er hægt að steypa vissu magni af öllum sýnum teknum yfir tímalengdina T_s í eina blöndu til mælingar á meðalstyrk (C_m). Þá er hægt að reikna út heildarrennslið:

$$Q = \frac{M}{C_m T_s}$$

Aðferð til að reikna út áætlað heildarmagn M kenniefnis til að fá meðalstyrk C_m er:

$$M = Q_a C_m T_s \quad Q_a = \text{áætlað heildarrennsli}$$

Áhöld geta verið um það hvenær sýnið er orðið jafnt blandað um allt straumvatnið svo hægt sé að taka marktækt sýni til mælinga. Fischer o.fl. 1979 gefa upp eftirfarandi jöfnu til að finna vegalengdina (L) sem vatnið þarf að renna til að blandast fullkomlega:

$$L = \frac{0,1 \bar{u} W^2}{\epsilon_t} \quad \begin{array}{l} W = \text{breidd straumvatns} \\ \epsilon_t = \text{þverblöndunarstuðull} \end{array}$$

Með notkun kenniefnis er hægt að mæla rennsli í pípum án þess að nokkur röskun verði á eðlilegum rekstri. Þá er gert ráð fyrir að fullkomin blöndun hafi átt sér stað á leið frá ísetningarstað að sýnatökustað. Heppilegast er að vera með samfellda inngjöf kenniefnisins í einhvern tíma.

Hægt er að mæla hraða þess skolvatns sem notað er við borun. Þá er allt kenniefnið sett út í einu og tekinn tíminn þegar það skilar sér upp. Samfelld ísetning er notuð þegar verið er að kanna hvort rennsli aukning í nærliggjandi lindum stafar af beinni íblöndun skolvatnsins eða þrýstibylgju.

Við könnun á rennsli í jarðlögum er fyrst og fremst verið að kanna hvort slíkt geti átt sér stað. Er þá til dæmis verið að kanna hvort merkið (útslagið) kemur fram á ákveðnum stöðum. Hægt er þannig að fá fram rennslisstefnu og hraða út frá tímamismun í komutíma. Að Urriðavatni í Fellum var flúorescein, blandað í saltlausn til þyngingar, sett niður um slöngu á vatnsbotninn. Litarefnið kom fram í tveimur af þremur vinnsluholum á svæðinu og sannaði þar með að leki var frá Urriðavatni niður í jarðhitakerfið.

Óráðlegt er að endurtaka ísetningu eftir skamman tíma á sama stað þar sem oft situr eitthvað af kenniefninu eftir frá fyrri ísetningu. Styrkur grunnljómunar er þá hærri heldur en áður var og eins getur komið falskt útslag þegar litur frá fyrri ísetningu losnar í meira mæli vegna utanaðkomandi áhrifa.

11 STAÐALLAUSNIR OG MÆLING

Frá framleiðanda koma kenniefnin ýmist á duftformi eða í lausn. rhódamín WT kemur t.d. yfirleitt í 20% lausn frá framleiðanda en flúorescein á duftformi. Áður hefur verið greint frá því að í Bandaríkjunum er mælt til þess að ekki sé notað meira af kenniefni en svo að hámarksstyrkur lokalausnar (þ.e. merkisins) fari ekki fram yfir 10 µg/l. Lagt er til að sömu skilmálar gildi hér á landi.

Hér á eftir fer lausleg lýsing á blöndun staðallausna og mælingu. Nota skal vatn af sama uppruna og það sem á að mæla í þynningu staðallausna ef gera á magnmælingar. Annars dugar að nota eimað vatn. Sæmi dúi er notaður í staðla og sýni. Athuga ber að aldrei skal þynna sterka lausn niður eða vigta litarefni á þeirri rannsóknastofu sem mæling á að fara fram í. Sá aðili sem sér um blöndun upphafslausna skal hvorki koma nálægt söfnun eða mælingu né nokkurri annari meðhöndlun sýnanna. Æskilegt er að "blöndunarmaður" sé af annari stofnun svo að leiðir hans og sýnatöku- og mælingamanna þurfi ekki að liggja saman.

Flúorescein

Vigta 100 mg í 1 lítra mæliflösku

Mæla 10 ml af þessari lausn í 1 lítra mæliflösku

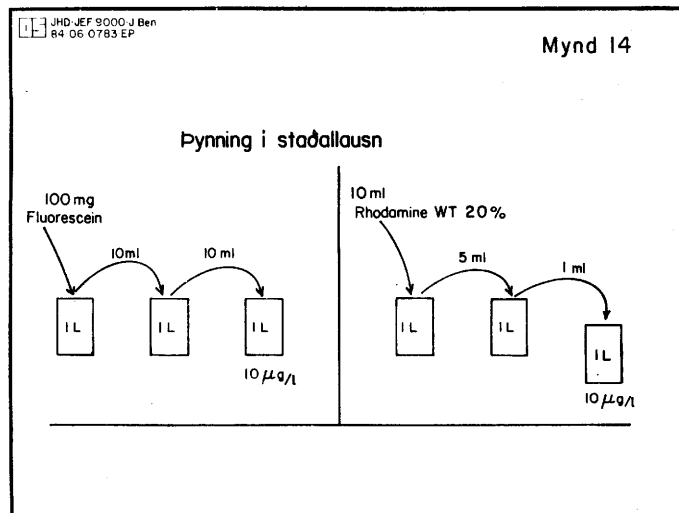
Mæla 10 ml af þessari lausn í 1 lítra mæliflösku og þá er komin 10 µg/l lausn sem hægt er að nota sem stofnlausn til frekari þynninga

Rhódamín WT

Mæla 10 ml af 20% lausn í 1 lítra mæliflösku

Mæla 5 ml af þessari lausn í 1 lítra mæliflösku

Mæla 1 ml af þessari lausn í 1 lítra mæliflösku og þá er komin 10 µg/l lausn sem hægt er að nota sem stofnlausn til frekari þynninga.



Mæling flúoresceins á Perkin Elmer 204 S
Fluorescence Spectrophotometer.

- 1) Kveikja á aflgjafa fyrir lampa (ekki kveikja á lampa)
- 2) Kveikja á mæli
- 3) Beðið í eina mínútu og þá kveikt á lampa.
- 4) Spenna á photo multiplier (P.M.Gain) sett á 3
- 5) Næmisvið (Sens. range) stillt eftir því sem við á en útslag fyrir ofan 100 er varla marktækt.

Best er að nota ferstrent mæliglas (cell) úr kvars-gleri, 10 x 45 mm og slípað á öllum hliðum. Sellan er fyrst skoluð með eimuðu vatni og síðan með sýninu. Þá eru settir 10 µl af NH₃ (1:2), til að ná réttu sýrustigi, en síðan er sýnið sett í. Grunnljómun er könnuð með því að nota 10 µl af HCl (1:2) í stað NH₃. Engin bleyta eða óhreinindi mega vera utan á sellunni. Aflestur er tekinn á fyrstu sekúndum útslags. Hagkvæmt er að nota Fin-pípettur við að setja sýnið í mæliglasið og aðrar Fin-pípettur fyrir basa og sýru en soga upp úr sellunni með lofttæmisdælu.

Hámarksörvun flúoresceins er á 490 nm og hámarksljómun á 520 nm. Heppilegur lampi sem til er á Orkustofnun fyrir Turner 111 er 110-853 en hann sendir ljós á bylgjulengdum milli 400 nm og 520 nm og eitthvað út fyrir þessi gildi. Á mynd 1 er sýnd örvun og ljómun flúoresceins og heppilegar ljóssjár 2A + 47B sem fremri sía og 2A-12 sem aftari sía, en þær eru allar til á Orkustofnun.

Mæling rhódamíns WT á Turner 111 fluorometer.

- 1) Kveikt með því að setja "power"-rofa á "on".
- 2) Lamparofa haldið upp í 3-4 sekúndur en síðan sleppt. Ef ekki kviknar á lampa er þessi liður endurtekinn.
- 3) Tækið látið hitna í 15 mínútur.
- 4) Blindrör sett í og mælir núllstilltur.
- 5) Næmisvið (sens. range) stillt eftir því sem við á.

Best er að nota ávöl glös 12 x 75 mm úr boro-silicate gleri. Tryggt þarf að vera að sýrustig sýna og staðla liggi á milli pH 6 og 11. Grunnljómun er könnuð með því að setja 10 µl af HCl (1:2) í mæliglasið á undan sýninu.

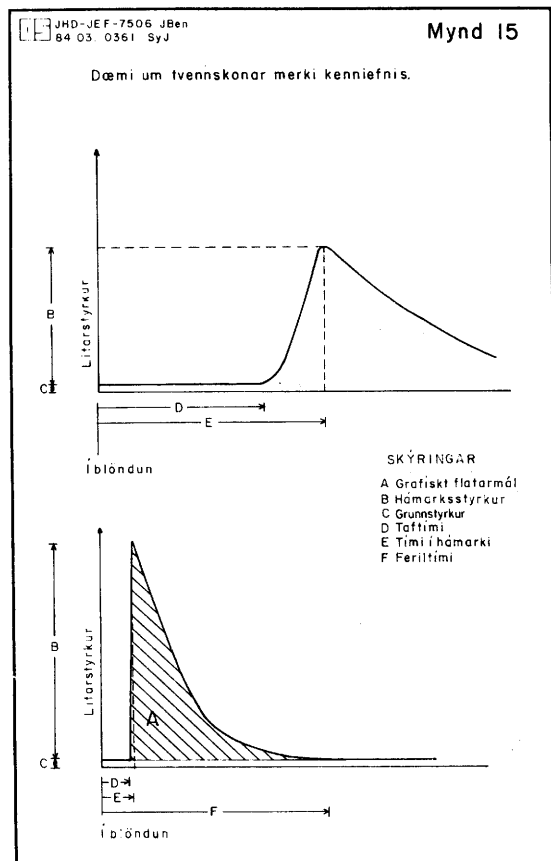
Í kafla 2 er greint frá því að hámarksörvun fyrir rhódamín WT sé á bylgjulengdinni 555 nm og hámarksljómun á 580 nm. Heppilegasti lampi sem til er á Orkustofnun í Turner lll er 110-854 en hann sendir ljós af bylgjulengdum á milli 520 nm og 560 nm og nokkuð upp fyrir og niður fyrir þessar bylgjulengdir. Hentugar ljóssíur sem til eru á Orkustofnun eru 1-60 + 58 sem fremri síur og 23A sem aftari sía.

Í kafla 4 er greint frá því hve grunnljómun getur verið mismunandi eftir því hvaða vatn er um að ræða og eins er greint frá óstöðugleika sumra grunnljómunargilda. Lítið er vitað um grunnljómun í vatni hér á Íslandi. Mælingar á styrk flúoresceins í grunn- og yfirborðsvatni við Sigöldu sem og í jarðhita- og yfirborðsvatni að Urriðavatni benda til mjög lítillar grunnljómunar miðað við þá sem mælist víða erlendis. Við Sigöldu mældist t.d. um 20 ng/l grunnljómun en um 10 ng/l að Urriðavatni.

Svifaur getur haft mjög óheillavænleg áhrif á mæliniðurstöður flúrljómunar, bæði hvað varðar ásig og sem og falskt útslag. Hið síðarnefnda er hægt að kanna með því að sýra sýnið það mikið að flúrljómun hverfi. Einnig er ráð að sía hvert sýni, en það er öllu tímafrekari og umfangsmeiri aðgerð.

Sýni sem mæla á kenniefni í er handhægt að taka á 100 ml plastflösku, fylla hana eins og hægt er, loka þéttingsfast og geyma á myrkum stað.

Merkið, það er lögun línuritsins (styrkur á móti tíma), getur verið á ýmsa vegu. Á mynd 15 eru dæmi um tvö algengustu merki kenniefnis þar sem allt kenniefnið hefur verið sett útí í einu. Neðri myndin sýnir æskilega lögun ferilsins. Efri myndin er frábrugðin á þann veg að ferillinn rís ekki eins bratt, sennilega vegna ásig og þörunga, leir o.fl. í þeim dúr. Eins er halinn lengri og gæti það stafað af slæmri dreifingu eða skolun kenniefnisins af botni eða veggjum vatnsrásarinnar.



12 SAMANTEKT

Hér að framan hefur verið fjallað um flúrljómun, einkum frá efnunum flúorescein og rhódamín WT. Niðurstöður þessarar umfjöllunar verða dregnar saman hér á eftir þannig að einungis verða bornir saman eiginleikar þessara tveggja efna en þau eru notuð á sama hátt í jarðvísindum.

Flúorescein er helmingi ódýrara heldur en rhódamín WT sé miðað við styrk.

Á móti kemur að næmi rhódamíns WT er meiri svo að heldur minna þarf af því heldur en flúorescein.

Grunnljómun er minni og stöðugri við mælingu á rhódamín WT heldur en flúorescein.

Rhódamín WT er yfirleitt selt í 20% lausn frá framleiðanda. Þetta hefur ýmsa kosti hvað meðfærileika snertir fram yfir flúorescein sem yfirleitt kemur frá framleiðanda á duftformi í 1 kg pakkningum. Flutningur á rhódamín WT er dýrari vegna fyrirferðar og þunga.

Varúðarráðstafanir varðandi meðferð efnanna eru mjög vægar en ef til vill heldur meiri við notkun rhódamíns WT.

Könnun á eiturverkan bendir til þess að hún sé svipuð fyrir bæði efnin og að varúðar sé ekki þörf fyrir heldur en liturinn fer að verða sýnilegur í lausninni.

Áhrif hitamunar eru meiri á flúrljómun frá rhódamín WT heldur en flúorescein.

Áhrif ljóss eru allveruleg á ljómun flúoresceins en allmiklu minni á rhódamíns WT.

Tilraunir benda til þess að ljómun frá flúorescein fari að dofna þegar sýrustig fer niður fyrir pH 9 en helst lítið sem óbreytt upp í pH 12. Ljómun frá rhódamín fer sennilega ekki að dofna fyrir en farið er niður fyrir pH 6 en dofna aftur á móti mjög hratt þegar sýrustig nálgast pH 11 og þar yfir.

Athuganir benda til þess að selta (natríumklóríð) hafi ekki áhrif á ljómun flúoresceins. Aftur á móti lækkar flúrljómun frá rhódamín WT í natríumklóríð-lausn og því meir sem styrkur lausnarinnar

er meiri. Einnig lækkar ljómun frá rhódamín WT í natrium-klóríð-lausun með tíma.

Bæði efnin ásogast mjög lífrænum jarðvegi og öðrum lífrænum efnum s.s. sagi og beitleyngi, flúorescein þó heldur meira.

Niðurstöður tilrauna sýna lítilsháttar lækun á flúrljómun flúoresceins á steindasambönd s.s. bentonít, leirstein og kvars-sandstein. Heldur meiri lækun verður á flúrljómun rhódamíns WT einkum í leirstein þar sem ljómunin er einungis 67% í 20 g/l lausn miðað við að 100% lausn er 100 µg/l.

Af framansögðu er ljóst að við yfirborðsathuganir þar sem ljóss og lífrænna efna gætir er hentugra að nota rhódamín WT. Við könnun á rennsli um berglög þar sem ljóss gætir ekki er hentugra að nota flúorescein.

Að lokum nokkrar gullvægar reglur sem hafa ber í heiðri við rannsóknir með kenniefnum:

Safna nokkrum lítrum af vatni á niðursetningar- og sýnatökustað til blöndunar í staðallausnir áður en kenniefni er sett úti.

Aldrei að blanda eða þynna kenniefni út í lausn á niðursetningar- eða mælingastað. Mjög sterkar lausnir eða efnið á duftformi mega ekki koma inn á þá rannsóknastofu sem mæling fer fram í.

Sá maður sem blandar íblöndunarlausn og framkvæmir niðursetninguna (íblöndunina) má alls ekki koma á sýnatökustað eða mælingastað og heldur ekki umgangast sýnatöku- eða mælingamenn.

Við sýnatöku skal fylla ílátid þannig að sem allra minnst súrefni komist að. Loka ílátinu strax og koma því sem fyrst á skuggsælan eða myrkvaðan stað. Best er að nota glerílát en 100 ml plast-flöskur eru einnig hentugar.

Aldrei að nota sama ílát aftur til sýnatöku.

Lítil hætta er á að notkun kenniefna mistakist í náttúrulega söltu vatni. Hætta er þó á að slíkt mistakist ef aðkomuefni er bætt út í til að auka saltstyrkinn.

Hrista skal flöskuna með sýninu vel eftir að sýrustigi hefur verið breytt yfir á það pH-svið sem mæla á við.

Ávallt skal hafa sama hitastig á lausnum þegar mælt er.

Taka mæliaflestur eins fljótt og auðið er til þess að koma í veg fyrir klofnun vegna örvunar ljóss frá litrófsmæli.

Geyma skal sýni á sýnaflöskum í myrkvuðum pakkningum eða geymslu. Forðast skal að hafa borð á flöskunum.

HEIMILDIR

- Abood, K.A., Lanter, J.P. & Disco, M.D. 1969: Utility of radioisotope methodology in estuary pollution control study, 1, evaluation of the use of radioisotopes and fluorescent dyes for determining longitudinal dispersion. Rep. NYO-3961-1, s. 197, U.S. At. Energy Comm., New York (Tilvitnun úr Smart & Laidlaw 1977).
- André, J.C. & Molinari, J. 1976: Mises au pint sur les différents facteurs physicochimiques influant sur la mesure de concentration de traceurs fluorescents et leurs conséquences pratiques en hydrologie. *Journal of Hydrology*, 30: 257-285.
- Cobb, E.D. 1968: Constant-rate-injection equipment for dye-dilution discharge measurements. Í: "Selected techniques in water resources investigation, 1966-77". U.S. Geol. Survey Water-Supply Paper 1892: 15-22.
- Collins, M.R. 1968: Selection of dye-injection and measuring sites for time-and-travel studies. Í: "Selected techniques in water resources investigation, 1966-67." U.S. Geol. Survey Water-Supply Paper 1892: 23-29.
- Deaner, D.G. 1973: Effect of chlorine on fluorescent dyes. V. *Water Pollut. Contr. Fed.* 45(3): 507-514. (Tilvitnun úr Smart & Laidlaw 1977).
- Dole, R.B. 1906: Use of fluorescein in the study of underground waters. Í: U.S. Geol. Surv. Water Supply Paper 160: 73-83.
- Electrowatt/Virkir 1980: Sigalda reservoir. Summary of main findings from the tracing test summer 1980. Landsvirkjun desember 1980. Electrowatt/Virkir.
- Electrowatt/Virkir 1981 a: Sigalda hydroelectric project. Reservoir sealing. Investigations campaign summer 1981. Speci Landsvirkjun, mars 1981.
- Electrowatt/Virkir 1981 b: Sigalda hydroelectric project. Reservoir sealing. Investigations campaign summer 1981. Volume report. Landsvirkjun, nóvember 1981.

- Electrowatt/Virkir 1981 c: Sigalda hydroelectric project. Reservoir sealing. Investigations campaign summer 1981. Volum Appendices A-C. Landsvirkjun nóvember 1981.
- Electrowatt/Virkir 1982: Sigalda hydroelectric project. Landsvirkjun
- Feuerstein, D.L. & R.E. Selleck 1963: Fluorescent tracers for dispersion measurements. J. Sanit. Eng. Div. Amer. Soc. Civil Eng., 89(SA4): 1-21.
- Fischer, H.B., List, E.J. Koh, R.C.Y., Imberger, J., & Brooks, N.H. 1979: Mixing in inland and coastal waters. Academic Press, London, 483 s.
- Frungel, F. & Koch, C. 1976: Practical experience with the Variosens equipment in measuring chlorophyll concentrations and fluorescent tracer substanses, like rhodamine, fluorescein and some new substances. IEEE Journal of Oceanic Engineering, Vol. OE-1, No 1 21-32.
- Islar, A. 1982: Specification for the tracing campaign, summer 1982. Í: Electrowatt/Virkir 1982: Sigalda hydroelectric project. Annex no. 3. Landsvirkjun.
- Jón Benjamínsson & Sigmundur Einarsson 1983: Tillögur um frekari íblöndun flúorescein kenniefnis í Urriðavatn. Orkustofnun, greinargerð, JBen-Se-83/01, 4 s.
- Jón Ólafsson 1983: Flúorescein greiningar. Viðauki II. Í: Þóroddur F. Þóroddsson & Guttormur Sigbjarnarson 1983: Kísiliðjan við Mývatn. Grunnvatnsrannsóknir. Orkustofnun OS-83118/VOD-10: 33-41.
- Jones D.P., Smith A.T., Sturrock, G.D. & Wright, P. 1979: Ophthalmic fluorophotometry: an improved slit-lamp fluorophotometer. Med. & Biol. Eng. & Comput., 17: 365-370.
- Lindqvist L. 1960: A flash photolysis study of fluorescein. Arkiv för Kemi, Band 16 nr 8: 79-138.
- Moser, H. & Neumaier, F. o.fl. 1969: Jahresbericht 1968, Institut für Radiohydrometrie. Gesellschaft für Strahlenforschung mbH München, G.S.F. - Bericht R-19, 86 s.

- Nestmann, E.R., Kowbel, D.V. & Ellenton, J. 1980: Mutagenicity in salmonella of fluorescent dye tablets used in water tracing. *Water Research*, Vol. 14: 901-902.
- Páll Theódórsson 1982: Tracer leakage measurements at Sigalda 1982 (Report of Science Research Institute, Reykjavík). Í *Electrowatt/Virkir* 1982: Sigalda hydroelectric project. Annex no. 6. Landsvirkjun.
- Pritchard, D.W. & J.H. Carpenter 1960: Measurement of turbulent diffusion in estuarine and inshore waters. *Bull. Int. Ass. Sci. Hydrol.*, 20: 37-50.
- Reznek, S., Hayden, W. & Lee, M. 1979: Analytical note - Fluorescein tracer technique for detection of groundwater contamination. *Journal AWWA* 71, No 10: 586-587.
- Rozwadowski, M. 1961: Effect of pH on the fluorescence of fluorescein solution. *Acta Phys. Pol.*, 20: 1005-1017.
- Skoog, D.A. & West, D.M. 1971: Principles of instrumental analysis. Holt, Rinehart and Winston, inc., New York, 710 s.
- Smart, P.L. & Laidlaw, I.M.S. 1977: An Evaluation of some Fluorescent Dyes for Water Tracing. *Water Resources* vol. 13, no 1: 15-33.
- Stoner, J.D. 1968: Comparison of results using three sampling techniques for a fluorometric dye study in a stream. Í: "Selected techniques in water resources investigation, 1966-67". U.S. Geol. Survey Water-Supply Paper 1892: 30-33.
- Wilson, J.F. 1968: Fluorometric procedures for dye tracing. Í: *Techniques of Water Resources Investigations of the U.S. Geological Survey*, vol. 3, 31 s, U.S. Geological Survey, Washington. D.C..

VIÐAUKI

Þýðing á kaflanum Toxicity úr grein Smart, P.L. & Laidlaw, I.M.S., 1977:
An evaluation of some fluorescent dyes for watertracing.
Water Resources Research Vol. 13. no 1: 15-33.

EITURVERKUN (toxicity)

Tvö atriði varðandi eituráhrif frá litarefni eru mikilvæg: Í fyrsta lagi möguleiki á skaðlegum áhrifum á vatna- og sjávarlíf og í öðru lagi þau mörk sem setja skyldi þegar um neysluvatn er að ræða. Pritchard & Carpenter (1960) skýrðu frá eituráhrifum rhodamines B á ónafngreinda fisktegund sem lifði án sjúkleika í 2 mánuði í 100 mg/l lausn. Bandt (1957) sýndi að 100 mg/l flúorescein-styrkur hafði ekki eituráhrif á silung eða rúta (roach) en Sowards (1958) uppgötvaði að sýnilegur styrkur þessa litarefnis hafði ekki áhrif á eiturverkan Pronoxfish, sem er fiskæitur fyrir nefgægi (*Rhinichthys cataractae*). Marking (1969) ákvarðaði LC50 (styrkur í lausn sem veldur 50% dauða tilraunapola eftir ákveðinn tíma), fyrir rhodamine B og flúorescein með því að nota regnbogasilung (*Salmo gairdnerii*), sundagrana (*Ictalurus punctatus*) og röðulaborra (*Lepomis machrochirus*) í 24, 48 og 96 klukkustundir við 12°C (tafla). Rhodamine B var allmiklu eitradara heldur en flúorescein og LC50 lækkaði eftir því sem á tilraunina leið. Liturinn hafði lítil áhrif á eiturverkun antimycin A, rhodamine B jók þau lítillega og flúorescein dró frekar úr þeim. Silfurlaxaseiði og Donaldson-silungsseiði hvorki drápu né sýndu öndunarörðugleika í 10 mg/l rhódamín WT lausn í 17,5 klukkustundir við 22°C og ekki heldur í 3,5 klukkustundir í viðbót þegar styrkur hafði verið aukinn í 375 mg/l (Parker 1973). Engin óeðlileg frávik í lengd eða þyngd gullfiska (*Carassius auratus*) komu fram við prófun með nokkrum stilbene triazine lýsiefnum (optical brighteners) við 10 mg/l og 20 mg/l styrk (Akamatsu & Matsuo 1973). Níutíu og sex klukkustunda LC50 ákvörðun með fjölda lýsiefna sem Keplinger o.fl. (1974) og Sturm & Williams (1975) gerðu gaf niðurstöðuna frá 32 til 474 mg/l fyrir röðulaborra (*Lepomis machrochirus*), frá 108 til 1780 mg/l fyrir regnbogasilung (*Salmo gairdnerii*), og frá 86 til 1060 mg/l styrk fyrir sundagrana (*Ictalurus punctatus*) (sbr. töflu). Akamatsu & Matsuo (1973) skýra frá LC50 allt upp í 2 g/l þótt tilrauninni sé ekki lýst í smáatriðum. Þó að styrkur lýsiefnisins hafi getað orðið hærrí í líkama gullfiska og röðulaborra heldur en í fiskabúrunum þar sem tilraunin fór fram þá féll þessi styrkur mjög hratt um leið og fiskurinn var settur í ferskvatn (Jensen & Pettersson 1971 og Ganz o.fl. 1975).

Tafla Eiturverkun rhodamines B og flúoresceins á fisk við 12°C

Litarefni	Tegund	LC50 mg/l			
		6 stundir*	24 stundir	48 stundir	96 stundir
Rhodamine B	Regnbogasilungur	736	306	217	
	Sundagrani	962	647	526	
	Röðulaborri 1176	754	700	379	
Flúorescein	Regnbogasilungur 6410	4198	3420	1372	
	Sundagrani	3828	2826	2267	
	Röðulaborri	5000	4898	3433	

* Áætlað út frá öðrum upplýsingum
Gögnin eru frá Mörking 1969

Panciera (1967) hefur sýnt að 2ja daga gamlar ostrulirfur (*Crassostrea virginica*) dóu innan 2ja daga í 100 mg/l rhodamine B lausn, og þær sýndu tímabundna vaxtarseinkun í 10 mg/l lausn en engin sjúkdómseinkenni í 1 mg/l lausn. Eins þroskuðust engin egg yfir á lirfustigið í sterkustu lausninni á meðan 27% sýndu frávik frá eðlilegum þroska í 10 mg/l lausn, en ekkert óeðlilegt kom fram í 1 mg/l lausn. Parker (1973) sýndi að egg og lirfur Kyrrahafsostru (*Crassostrea gigas*), þroskuðust eðlilega allt upp í 10 mg/l rhódamín WT lausn í 48 klukkustundir við 24°C. Fiskurinn í Kúfsskeljar-tegundinni *Mercenaria merceneraia* litaðist hratt af rhodamine B þegar lausnarstyrkur fór yfir 0,09 mg/l, en liturinn hreinsaðist auðveldlega burtu þegar skeljarnar voru settar í litarlaust vatn. Þegar styrkurinn fór yfir 8,4 mg/l komu fram flóttatilburðir hjá skeljunum og þær lituðust. Woelke (1972) komst að raun um að ígulkerjaegg (tegundin *hemicentrotus*) urðu fyrir áhrifum af 32 mg/l rhodamine B lausn en ekki í 10 mg/l lausn á meðan fóstur flóaskeljar (tegundin *mytilus*) varð fyrir áhrifum af tíu sinnum lægri lausnarstyrk. Við eiturverkana-tilraunir við 10°C á fjölda hryggleysingja sem lifa í söltu vatni s.s. vatnsflóar (*Daphnia magna*) rækju (*Gammarus zaddachi*), viðarlúsar (*Asellus aquaticus*), vorflugur (*Cloeon dipterum*) og baunaskeljar (*pisidium*) við hámarksstyrk 2000 mg/l rhódamín WT urðu engin dauðsföll hjá þessum lífverum hvorki eftir 48 klukkustundir né eina viku (J.S. Worttley & T.C. Atkinson, munnl. uppl. 1975).

Miðað við þær upplýsingar sem birst hafa er ljóst að rhodamine B hefur meiri verkun á vatnalíf heldur en bæði rhódamín WT og flúorescein, sennilega vegna þess að það ásogast auðveldlega á lifandi vefi vegna þess að það hefur katjónaverkun (Little & Lamb 1973). Engu að

síður er styrkur nægilega hár til að orsaka vandræði, svo óstöðugur við venjulega útinotkun, vegna hraðrar þynningar eftir ísetningu, að litarefnið mun ekki hafa skaðleg áhrif á vatnalíf. Með tilliti til meiri eiturverkana rhodamine B miðað við anjónalit er mælt til þess að nota ekki rhodamine B sem kenniefni í vatn. Engar sérstakar upplýsingar hafa fengist um nokkurn hinna anjónalitanna, en sennilega eru eituráhrif þeirra svipuð og þau sem greint hefur verið frá um flúorescein og rhódamín WT. LC50 gildi lýsiefna af stilbene triazine gerð eru á sama bili og hinna litarefnanna og því er líklegt að eiturverkun photine CU sé jafn lítil.

Eiturverkun efnasambanda á fólk er venjulega könnuð á tilraunadýrum; öryggismörk eru síðan dregin og er viðbótar öryggispáttur innifalinn. Rhodamine B hefur verið rannsakað af fjölda manna og er yfirleitt talið langhættulegast af "xanthene" litarefnum þar sem það sogast auðveldlega á líkamsvefi (Webb o.fl. 1962). Webb & Hansen (1961) sem rannsökuðu efnaferli þessa litarefnis í lífverum, fundu út á sama hátt og fyrir flúorescein að grunnbygging fluoran brotnaði ekki niður í líkamanum, þó að myndefni í lífverum væru augsýnilega ekki eins eitruð og upprunalega litarefnið (Webb o.fl. 1961). Uneda (1956) skýrði frá að sarkmein (sarcoma) myndast í sumum rottum eftir að rhodamine B hafði verið sprautað í þær, en þetta var miklum mun fátíðara hjá þeim sem höfðu verið sprautaðar undir húð með flúorescein. Neysla á fæðu með undir 0,2% af þessum litarefnum olli engum æxlum. Hansen o.fl. (1958) gat um 100% dánartíðni innan 42 daga eftir matargjöf með 2% rhodamine B. Litarefnið tafði vöxt og orsakaði lifrarskemmd; lifrarstækkun kom einnig í ljós eftir 90 daga hjá rottum sem fengu 1% litarefni í fóðrið. D. Donaldson (óbirt gögn 1971) kannaði áhrif rhodamine B, sulpho rhodamine B og rhódamín WT á rottur með því að setja 10 µg/l út í drykkjarvatnið. Hann skýrði frá að öll tilraunadýrin hefðu lést í samanburði við viðmiðunarhóp og að rhodamine B og sulpho rhodamine B orsökuðu mesta lifrarstækkun. Sulpho rhodamine B sem var sprautað undir húð í 50 µg skammti olli bólgusárum kringum nálarstunguna og líkamsþyngdarmissi á meðan rhódamín WT og rhodamine B ullu engum markverðum sjúkdómseinkennum eftir allt að 56 daga meðhöndlun.

Akamatsu & Matsuo (1973) hafa tekið saman yfirlit um fjölda rannsókna á eituráhrifum lýsiefna og hafa komist að þeirri niðurstöðu að mönnum stafi engin hættu af eituráhrifum þeirra jafnvel þótt notað sé óhóflegt magn. LD50, sá skammtur á einstakling (líkamsþyngdareiningu) sem veldur 50% dánartíðni hjá tilraunadýrum, var að meðaltali 7 g/kg miðað við líkamsþyngd fyrir stilbene triazine lýsiefni, meðan samfelldar fæðugjafir til músa og rotta sem tóku það inn með fæðu gefa til kynna að 60 kg maður gæti tekið inn 1-2 g/dag í dagóðan tíma án nokkurra slæmra áhrifa. Hickson and Welch Ltd. (pers.l. uppl. 1975) hafa stað-

fest að lýsiefnið sem notað er í photine CU hefur verið reynt við mjög harkalegar (acute) langtíma fæðugjafarrannsóknir sem hafa sýnt að skaðsemismörk eru ekki tiltölulega há.

Skaðsemismörk (toxicity levels) rhódamíns WT, flúoresceins og photines CU eru frekar lág, en mörkin fyrir rhodamine B og sulpho rhodamine B virðast nokkru hærri. Engin gögn eru fyrir hendi um athuganir á hinum litarefnunum, en framleiðendur hafa gefið til kynna að ólíklegt sé að nokkur óvenjuleg eitrunarhætta stafi af notkun lissamínes FF. Flúorescein og pyranine hafa verið viðurkennd af Fæðu- og lyfjaneftnd Bandaríkjastjórnar (Food and Drug Administration) til notkunar í ýmisskonar hagnýt lyf, varaliti og snyrtivörur í Bandaríkjunum, en engin umsókn um slíka viðurkenningu hefur komið fram fyrir hin litarefnin nema Rhodamine B sem missti viðurkenninguna í upphafi sjöunda áratugsins. Rhodamine B og flúorescein hafa verið flokkuð eiturfraðilega í C III af Matar- og landbúnaðarstofnunni/Alþjóða heilbrigðisstofnunni (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Í Bandaríkjunum er yfirleitt forðast að nota rhodamine B í vatn sem gæti blandast neysluvatni. Leyfileg samfelld inntökumörk (ingestion levels) fyrir rhodamine B, sulpho rhodamine B og rhódamín WT hafa verið sett við 0,75 mg/dag og er ólíklegt að farið verði fram úr þeim mörkum ef styrk við inntöku er haldið undir 370 g/l. Jarðfræðistofnun Bandaríkjanna (U.S. Geological Survey) mælist til þess að við ferlun sé stefnt að því að lokastyrkur lausnar fari ekki yfir 10 g/l og sé frekar haldið neðan þeirra marka. Þar til fleiri upplýsingar liggja fyrir um eiturvefkenningu er mælist til þess að þessi mörk séu virt og að ráðamenn á hverjum stað séu látnir vita áður en ferlun fer fram. (Þessa er í reynd krafist með lögum á Stóra-Bretlandi). Vegna hins tiltölulega stutta tíma sem ferlunarprófun stendur yfir, og hve auðvelt er að mæla flúrljómandi litarefni og hinna litlu eiturvefkenningu frá sjálfu litarefninu, ættu þó engin vandræði að koma upp við notkun þessara litarefna.

Geta má þess að chlorophenol verður til þar sem ferlunarvatn getur komist í klórað neysluvatn ef litarefnissameindir eru í vatninu. Chlorophenol gefur frá sér beiskt málmbragð í vatni, jafnvel þótt styrkur þess lé lítill, og er afar óþægilegt. Wilson (1968) skýrir frá árangri bragðprófana þar sem níu smakkarar prófuðu vatn, sem í voru 0,75 mg/l af klórleif og þrjár mismunandi styrkleikar af rhodamine B. Allir níu fundu hið sérkennilega bragð við 50 µg/l, aðeins fjórir úr 10 µg/l og enginn við 5 µg/l.

Bragðpróf voru gerð á anjóna-litarefnum með því að nota fjóra óvana smakkarar. Sýnin voru útbúin í krana vatni í Sheffield þar sem klórleifarstyrkur var lítill. Ekkert chlorophenol eða annað bragð fannst í nokkru sýni við styrkleikann 10 og 100 µg/l. Styrkleiki 10000 µg/l

í sýninu olli lítt merkjanlegu bragði, en ekki voru allir smakkararnir látnir prófa þann styrk. Við 100 µg/l styrkleika er liturinn auðsær og er þessvegna sennilegt að vatnsliturinn sé mikilvægari til takmörkunar á styrkleika heldur en bragðið. Þröskuldsgildi bragðsins getur þó verið lægra ef klórleifarstyrkur er hár. Þar sem blá-flúrljómandi litarefni ásogast á útfjólubláum bylgjulengdum eru þau litarlaus í lausn þar til styrkur verður mikill (0,1-1,0 g/l) en þá eru þau mælanleg sem blá-flúrljómandi bjarmi. Í tilvikum þar sem um blæfegurð vatnsins er að ræða geta þessir eiginleikar komið að góðum notum.

Tilvitnanir:

- Akamatsu. K., & M. Matsuo 1973: Safety of optical whitening agents (in Japanese). *Senryo To Yakuhin*.18(2): 2-11. (English translation). Transl. Programme RTS9415, Brit. Libr., Boston Spa, Yorkshire, England June 1975)
- Bandt, H.J. 1957: Giftig oder ungiftig für Fische? *Deut. Fisch. Rundsch.*, 4(6): 170-171.
- Hansen, W.H., O.G. Fitzhugh. & M.A. Williams 1958: Subacute oral toxicity of nine D & C coal tar colours. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 122: 29A.
- Jensen, S., & O. Pettersson, 1971: 2, 5-di-(benzoxazole-2-yl)-thiophine. An optical brightener contaminating sludge and fish. *Environ. Pollut.*,2: 145-155.
- Keplinger, M.L., O.E. Fancher, F.L.Lyman. & J.C. Calandra, 1974: Toxicological studies of four fluorescent whitening agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 27: 494-506.
- Little, L.W., & J.C. Lamb, 1973: Acute toxicity of 46 selected dyes to Fathead minnow (*Pimephales promelas*). Í: *Dyes and the Environment*, vol.1. Chap. 5. American Dye Manufacturers Institute, New York.
- Marking, L.L., 1969: Toxicity of rhodamine B and fluorescein sodium to fish and their compatibility with antimycin A. *Prog. Fish Cult.*, 31: 139-142.
- Pancieria. M., 1967: Toxicity of Rhodamine B. to eggs and larvae of *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellfish Ass.*, 58: 7-8.
- Parker, G.G., 1973: Tests of Rhodamine WT dye for toxicity to oysters and fish. *J.Res. U.S. Geol. Surv.*, 1(4): 499.

- Pritchard, D.W. & J.H. Carpenter, 1960: Measurement of turbulent diffusion in estuarine and inshore waters. *Bull. Int. Ass. Sci. Hydrol.*, 20: 37-50.
- Sowards, C.L., 1958: Sodium fluorescein and the toxicity of Pronofish. *Prog. Fish Cult.*, 20(1): 20.
- Sturm, R.N., & K.E. Williams, 1975: Fluorescent whitening agents: Acute fish toxicity and accumulation studies. *Water Res.*, 9: 211-219.
- Umeda, M., 1956: Experimental study of xanthene dyes as carcinogenic agents. *Gann*, 47: 51-78.
- Webb, J.M., & W.H. Hansen, 1961: Studies of the metabolism of Rhodamine B. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 3(1): 86-95.
- Webb, J.M., W.H. Hansen, A. Desmond, & O.G. Fitzhugh, 1961: Biochemical and toxicological studies of Rhodamine B and 3,6-diaminofluoran. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 3(6): 696-706.
- Webb, J.M., M. Fonda, & E.A. Brouwer, 1962: Metabolism and excretion patterns of fluorescein and certain halogenated fluorescein dyes in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 137(2): 141-147.
- Wilson, J.F., 1968: Fluorometric procedures for dye tracing. *Techniques of Water Resources Investigations of the Geological Survey*, vol 3, 31 pp., U.S. Geological Survey, Washington, D.C.
- Woelke, C.E., 1972: Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hr Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Tech. Rep. 9*, Wash. Dep. Fish.