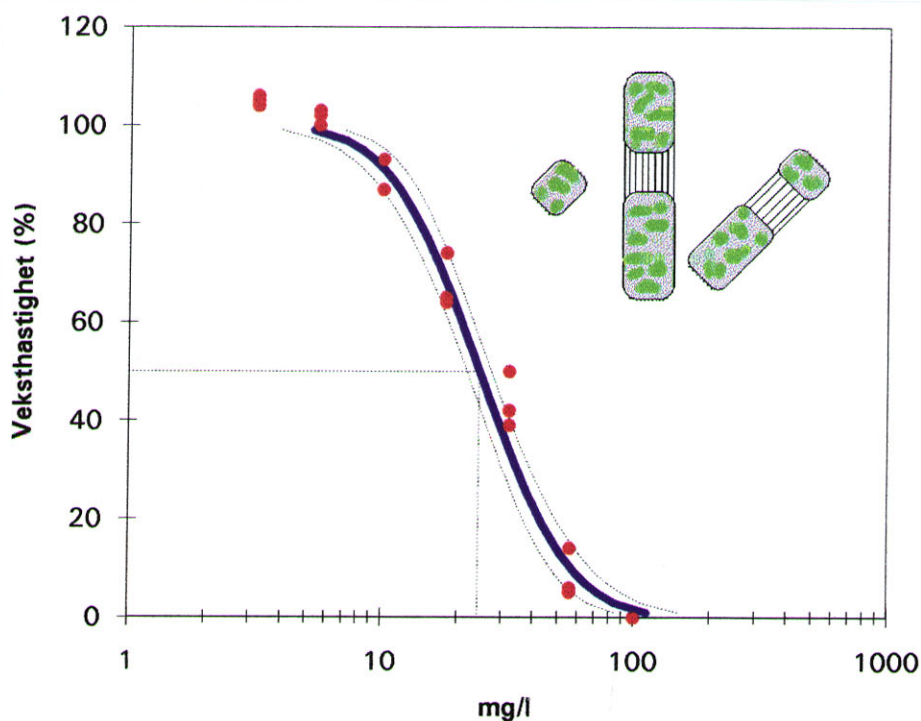



O-94118

Toksisitetstesting av oljedispergeringsmidler

Utprøving av en metode med marine alger
(*Skeletonema costatum*)



NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Prosjektnr.:	Undernr.:
O-94118	
Løpenr.:	Begr. distrib.:
3128	

Hovedkontor	Sørlandsavdelingen	Østlandsavdelingen	Vestlandsavdelingen	Akvaplan-NIVA A/S
Postboks 173, Kjelsås	Televeien 1	Rute 866	Thormøhlensgt 55	Søndre Tollbugate 3
0411 Oslo	4890 Grimstad	2312 Ottestad	5008 Bergen	9000 Tromsø
Telefon (47) 22 18 51 00	Telefon (47) 37 04 30 33	Telefon (47) 62 57 64 00	Telefon (47) 55 32 56 40	Telefon (47) 77 68 52 80
Telefax (47) 22 18 52 00	Telefax (47) 37 04 45 13	Telefax (47) 62 57 66 53	Telefax (47) 55 32 88 33	Telefax (47) 77 68 05 09

Rapportens tittel:	Dato:	Trykket:
Toksisitetstesting av oljedispergeringsmidler - Utprøving av en metode med marine alger (<i>Skeletonema costatum</i>)	1.8.94	NIVA 1994
	Faggruppe:	
	Økøtoksikologi	
Forfatter(e):	Geografisk område:	
Torsten Källqvist		
	Antall sider:	Opplag:
	28	40

Oppdragsgiver:	Oppdragsg. ref.:
Statens Forurensningstilsyn, Oljevernavdelingen, Horten	Kontrakt nr. 94209

Ekstrakt:
I forbindelse med revisjon av godkjenningsordningen for oljedispergeringsmidler er det foretatt en vurdering av en toksisitetstest med marine alger (<i>Skeletonema costatum</i> , ISO/DP 10253). 14 oljedispergeringsmidler er testet med den aktuelle metoden. EC ₅₀ -verdiene varierte fra 3.7 - 470 mg/l for de ufortynnede dispergeringsmidlene. For standardfortynnede bruksløsninger var variasjonen 8.2 - 2800 mg/l. På grunnlag av resultatene er det gitt anbefalinger for utforming av kriterium for algetoksisitet basert på tester med <i>S. costatum</i> .

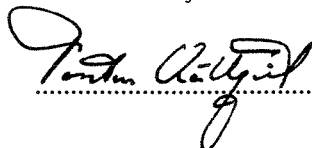
4 emneord, norske

1. Oljedispergeringsmidler
2. Toksisitet
3. Alger
4. Godkjenning

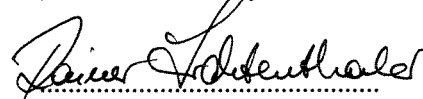
4 emneord, engelske

1. Oil dispersants
2. Toxicity
3. Algae
4. Approval

Prosjektleder


.....

For administrasjonen


.....

ISBN82-577-2600-1

Norsk Institutt for Vannforskning

O-94118

Toksisitetstesting av oljedispergeringsmidler

**Utprøving av en metode med marine alger
(*Skeletonema costatum*)**

Prosjektleder: Torsten Källqvist
Medarbeidere: August Tobiesen
Randi Romstad

Forord

I forbindelse med at Statens Forurensningstilsyn ønsket å revidere godkjenningsordningen for dispergeringsmidler ble NIVA i mai 1994 kontaktet for å gjennomføre toksistetstester av et antall dispergeringsmidler og på grunnlag av resultatene foreslå hvordan en godkjenningsordning basert på alternative tester kan utformes.

Innholdsfortegnelse

Sammen drag	4
Bakgrunn	5
Materiale og metoder	6
Dispergeringsmidler	6
Toksisitetstester	6
Resultat.....	7
Konklusjoner og anbefalinger.....	11
Referenser	14
Vedlegg 1: Konsentrasjon/responskurver for dispergeringsmidlenes effekt på <i>S. costatum</i>	15
Vedlegg 2: Notat om testmetoder for dispergeringsmidler.....	23

Sammendrag

En undersøkelse av giftigheten til 14 oljedispergeringsmidler overfor den marine kiselalgen *Skeletonema costatum* er utført som grunnlag for en revisjon av nåværende godkjenningsordning for oljedispergeringsmidler til bruk i Norge. I denne kreves bl. a. en test med grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii* som grunnlag for vurdering av algetoksisitet.

Toksisitetstestene, med *S. costatum* ble utført i henhold til en internasjonal standardmetode for marine alger (ISO/DP 10253). Giftigheten uttrykkes som den konsentrasjon av dispergeringsmidlet som gir 50% hemming av algenes vekst (EC₅₀).

For de rene dispergeringsmidlene varierte EC₅₀-verdiene fra 3.7 - 470 mg/l. For standardfortynnede bruksløsninger* var variasjonen 8.2 - 2800 mg/l.

Det var ingen klar sammenheng mellom EC₅₀-verdiene for *Skeletonema* og den rapporterte giftvirkningen på *Chlamydomonas*. Den viktigste årsaken til dette er at *Chlamydomonas*-testene ble utført på dispergeringsmidler blandet med olje.

På grunnlag av resultatene anbefales at toksisitetstester med *Skeletonema costatum* brukes som grunnlag for godkjenning av oljedispergeringsmidler. Toksisiteten bør relateres til dosering ved bruk. I det nåværende systemet blir dette gjort ved at man har definert bruksløsninger som beskrevet i fotnote. Dersom denne definisjonen av bruksløsning opprettholdes anbefales det at kriteriet for godkjenning av dispergeringsmidler m.h.t. algetoksisitet utformes som:

Bruksløsningen av dispergeringsmidlet skal ha en EC₅₀-verdi på minimum 400 mg/l (ppm) for effekt på veksthastigheten til den marine kiselalgen Skeletonema costatum, testet i henhold til ISO/DP 10253.*

Med den anbefalte grenseverdien (400 mg/l) vil 3 av de 14 testede midlene kunne godkjennes. Dette vil bety en skjerping av nåværende kriterier og vil virke som et incitament til utvikling av mindre giftige produkter enn en del av de som er godkjent i dag.

Ideelt burde toksisiteten veies mot produktenes doseringbehov for å oppnå en bestemt dispergeringseffekt. Dette kan eventuelt gjøres ved å kople toksisitetskriteriet til dispergeringseffekten målt med en standardisert metode. Dette alternativ bør vurderes når et forslag om effektivitetstest foreligger.

* For dispergeringsmidler av kategorien "konsentrater" er bruksløsning definert som konsentratet fortynnet 1:10. Løsningsmiddelbaserte dispergeringsmidler regnes som bruksløsninger.

Bakgrunn

Den gjeldende godkjenningsordningen for dispergeringsmidler er fastlagt av Miljøverndepartementets "Forskrifter for sammensetning og bruk av dispergeringsmidler for bekjempelse av oljesøl", Miljøverndepartementet, Oslo 1980. Her sies det at: "Dispergeringsmidlet skal tilfredsstillende til enhver tid gjeldende krav med hensyn til akutt giftighet". I vedlegg til forskriftene er følgende krav til akutt giftighet spesifisert:

- Dispergeringsmidlet blandet med olje skal ikke være mer giftig overfor brune reker og albueskjell enn den rene oljen testet etter R.A.A. Blackman et al.'s metode beskrevet i Fisheries Research Technical Report No 39 (1977).
- Dispergeringsmidlet blandet med olje skal ha LC₅₀-verdi på minimum 200 ppm overfor den enecelledte grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii* testet etter metode til Norland et al., beskrevet i Chemosphere nr. 3 (1978): Toxicity Testing with Synchronized Cultures of the green Alga *Chlamydomonas*. Konsentrater vil bli testet i fortyning 1:10.

Kravet om toksisitetstesting med algen *Chlamydomonas reinhardtii* er spesifikt for Norge og dispergeringsmidler som er søkt godkjent har derfor måttet bli testet. Testene er utført ved den institusjon ved Universitetet i Bergen som har utviklet testmetoden. I senere år har det imidlertid vært vanskelig å få utført testen, som avviker på flere punkter fra de standardiserte tester med alger som i andre sammenhenger brukes for klassifisering og godkjenning av kjemikalier. En overgang til internasjonalt standardiserte tester som grunnlag for godkjenningen av dispergeringsmidler vil innebære flere fordeler:

- Lett tilgang til alternative testlaboratorier i mange land
- Bedre sammenlikningsgrunnlag med ulike kjemikalier
- Harmonisering med andre godkjenningsordninger (f. eks. for kjemikalier i off-shore industrien).

Standarder for toksisitetstester med alger er bl.a. utgitt av OECD og ISO. For ferskvannsalger gjelder ISO standarden nr. 8692 "Algal Growth Inhibition Test" og OECD Guidelines 201 "Alga, Growth Inhibition Test". Disse to metodene er harmonisert slik at ISO-metoden oppfyller kravene i OECD Guidelines. OECD-metoden er imidlertid mer fleksibel enn ISO standarden f. eks. med hensyn til testorganisme og medium. Den internasjonalt mest anvendte algen for tester i ferskvann er *Selenastrum capricornutum*, men ISO-metoden omfatter også *Scenedesmus acuminatus*.

ISO har også en standard for marine alger, oppbygget etter samme prinsipp som ferskvannsmetoden (ISO/DIS 10253, Marine Algal Growth Inhibition Test. ISO-standarden foreskriver to alternative testalger (*Skeletonema costatum* og *Phaeodactylum tricornerutum*). Metoden inngår i testpakken som kreves for godkjenning av off-shore kjemikalier i Nordsjøen og som er harmonisert av PARCOM. I dette tilfelle kreves at testen utføres med *Skeletonema costatum*.

Ved en revisjon av godkjenningsordningen for dispergeringsmidler synes det mest naturlig å ta utgangspunkt i de gjeldende bestemmelser for off-shore kjemikalier. Dels for at dette er utviklet med tanke på vern av marine økosystemer og dels fordi produktgruppen dispergeringsmidler har tilknytning til oljeindustrien.

Dersom testen med *Chlamydomonas reinhardtii* skal erstattes med en annen alge-test synes ISO/DIS

10253 med *Skeletonema costatum* å være det mest aktuelle alternativ. Dette krever imidlertid kjennskap til hvordan de to testene slår ut på et utvalg av dispergeringsmidler. For å skaffe til veie slik informasjon ble det gjennomført toksisitetstester med *S. costatum* på en rekke oljedispergeringsmidler hvor det fra før eksisterer data fra tester med *C. reinhardtii*.

Et viktig spørsmål ved testing av oljedispergeringsmidler er hvorvidt testene skal utføres på dispergeringsmidlet separat eller blandet med olje. De tester som til nå har vært lagt til grunn for godkjenning er utført på blandinger av dispergeringsmidler (bruksløsning) og olje i forholdet 1:1. I diskusjoner med SFT ble det forslått å teste dispergeringsmidlene alene.

Materiale og metoder

Dispergeringsmidler

15 dispergeringsmidler ble valgt ut for undersøkelsen. 12 av disse ble levert av SINTEF-IKU og et av Drew Ameroid Norge. To av de utvalgte midlene kunne ikke fremskaffes og isteden ble et dispergeringsmiddel som tidligere var testet med ferskvannsalgen *Selenastrum capricornutum* inkludert.

Følgende dispergeringsmidler har inngått i undersøkelsen

- Arrow Emulsol LW
- Corexit 9527
- Dasic Slickgone LTS
- Dispolene 36 S
- Enersperse 1037
- Enersperse 1583
- Finasol OSR-5
- Finasol OSR-12
- IKU-9
- Quell Oil C1
- Shell Dispersant VDC
- BP 1100WD
- Ameroid OSD/LT
- Biosolve

Toksisitetstester

Toksisitetstestene med *Skeletonema costatum* ble utført i henhold til ISO/DIS 10253, Marine Algal Growth Inhibition Test. Ved denne metoden måles effekten av teststoffet på algenes veksthastighet i løpet av 3 døgns eksponering. En fortyningsserie av teststoffet i naturlig sjøvann tilsatt næringssalter blir fordelt på glasskolber og podet med *S. costatum* fra en eksponensielt voksende kultur. Kolbene blir inkubert på et gyngebord med konstant belysning. Veksten måles ved å bestemme celledetthet i kulturene etter 1, 2 og 3 døgn. Øvrige testbetingelser er beskrevet nedenfor:

Organisme:	<i>Skeletonema costatum</i> NIVA BAC1
Testparameter:	Veksthastighet fra start til 72 timer
Stamkultur:	Semi-kontinuerlig i nat. sjøvann +10% Z8 vekstmedium (Staub 1961)
Test medium:	ISO DIS 10253 med Fe redusert til 33 µg/l, Zn: 15 µg/l, Na ₂ EDTA: 200 µg/l Naturlig sjøvann fra 60m i ytre Oslofjord, salinitet 34-35 g/l
Inkuberingsutstyr:	Gyngbord
Dyrkingsflasker:	100 ml ståkolber med 50 ml medium
Antall replikat	Kontroller: 6, For hver konsentrasjon: 3
Lys:	ca. 70 µE m ² s ⁻¹ , kontinuerlig fra dagslys-type lysstoffrør
Temperatur:	20 ± 1 °C
pH ved start	8.1 - 8.3
pH ved slutt (3d)	8.1 - 8.9
Vekstmåling:	Coulter Multisizer og Millipore Cytofluor 2300

Veksthastigheten (μ) i hver enkelt kultur blir beregnet fra økningen av celletettheten i løpet av inkuberingsperioden :

$$\mu = \frac{\ln(n_3) - \ln(n_0)}{3} \text{ døgn}^{-1}$$

Veksthastighetene relateres til kontrollenes veksthastighet og transformeres til Probit-verdier (Finney 1952). En responskurve med 95% konfidensintervall blir beregnet ved lineær regresjon av Probit-verdiene mot logaritmen for konsentrasjon. Fra regresjonsligningen kan de konsentrasjoner som gir 50% veksthemming (EC₅₀) og 10% veksthemming (EC₁₀) beregnes.

Testene av de ulike dispergeringsmidlene er testet fra 1-4 ganger for å få tilstrekkelig grunnlag for å beregne EC-verdiene.

For å sammenligne følsomheten for dispergeringsmidler hos *Skeletonema costatum* og *Chlamydomonas reinhardtii* ble det gjennomført screening-tester med *C. reinhardtii*. Testene ble utført på mikrottest-plater med 2 ml kulturvolum og med to paralleller for hver konsentrasjon. Som vekstmedium ble 10% Z8 (Staub 1961, Källqvist 1984) benyttet. Veksten ble målt ved fluorescensmåling etter 2 døgn inkubering ved 20±0.5 °C og kontinuerlig belysning (40 µE m⁻² s⁻¹). Effekten av dispergeringsmidlene på algenes veksthastighet ble beregnet på samme måte som for *S. costatum*.

Resultat

Resultatene av toksisitetstestene med *Skeletonema costatum* og *Chlamydomonas reinhardtii* er sammenstilt i tabell 1. I de to siste kolonnene av tabellen er også resultater fra tester med *C. reinhardtii* i forbindelse med søknad om godkjenning. Verdiene i den siste kolonnen (med olje) er altså de som har ligget til grunn for nå gjeldende godkjenning.

Konsentrasjon/respons-kurvene for dispergeringsmidlenes effekt på *S. costatum* er også vist i vedlegg 1.

Tabell 1. Resultat av toksisitetstester av oljedispergeringsmidler med *Skeletonema costatum* og *Chlamydomonas reinhardtii*. LC₅₀-verdier fra synkronkulturteter er hentet fra testrapporter fra Institutt for Mikrobiologi og Plantefysiologi, Bergen. Betegnelsene for kategori er: K=konsentrat, L=løsemiddelbasert. I kolonnene med kursiv skrift er verdier for bruksløsninger angitt.

Dispergeringsmiddel	Kategori	Skeletonema			Chlamydomonas			
		EC ₁₀	EC ₅₀	<i>bruksløsn.</i> <i>EC₅₀</i>	Screening	uten olje	med olje	
					EC ₅₀	LC ₅₀	LC ₅₀	<i>bruksløsn.</i> <i>LC₅₀</i>
Arrow Emulsol LW	K	8.4	29	290	46		70	700
Corexit 9527	K	3.2	13	130	410	575	70	700
Dasic Slickgone LTS	K	11	15	150	148		20	200
Dispolene 36 S	K	11	20	200	>1000		42	420
Enersperse 1037	K	11	13	130	149		30	300
Enersperse 1583	L	5.8	8.2	8.2	20		29	29
Finasol OSR-5	K	10	13	130	>1000	14	22	220
Finasol OSR-12	L	10	24	24	214		295	295
IKU-9	K	18	25	250	18			
Quell Oil C1	K	82	180	2800	>1000	1000	50	500
Shell Dispersant VDC	K	16	23	230	>1000	660	5.8	58
BP 1100 WD	K	23	49	490		26	23	230
Ameroid OSD/LT	L	140	470	470	>320			
Biosolve	K	2.4	3.7	37	9			

Ved toksisitetstestene med *S. costatum* ble det for de fleste dispergeringsmidlene registrert en stimulering av veksten ved lave konsentrasjoner. Når konsentrasjonen kom opp i det toksiske området økte veksthemmingen raskt med konsentrasjonen. Dette fremgår av de bratte responskurvene i området rundt EC₅₀-verdien i vedlegg 1, og de relativt små avstandene fra EC₁₀ til EC₅₀ (se tabell 1). Dette forløp var mest markert for Enersperse 1037 som til tross for at det ble testet 5 ganger ikke ga nok responser mellom 0 og 100% til at resultatene kunne behandles av beregningsmodellen. Også testen Arrow Emulsol LW måtte gjentas flere ganger for å få fastlagt responsforløpet. Her viste de enkelte testene litt ulik respons med stor spredning i observasjonene mellom 10 og 50 mg/l. Det ble observert at dette dispergeringsmidlet skilte seg i to faser og forskjellen i effekt på algene i de ulike testene kan skyldes varierende homogenitet i prøven som ble tatt ut for testing.

En annen vanlig observasjon ved testene av dispergeringsmidlene var at algeveksten i kulturer med dispergeringsmidler tok seg opp etter en markert hemming det første døgnet. For noen av midlene kunne man registrere at celletettheten sank det første døgnet for deretter å øke igjen med en hastighet som var like høy som i kontrollen. Det mest klare eksemplet på dette var Quell Oil C1 (fig. 1). Vekstkurvene viser at celletettheten ved konsentrasjoner over 100 mg/l minker det første døgnet. Deretter vokste algene like raskt som i kontrollen ved 180 mg/l, og noe langsommere enn 320 mg/l. Når veksthastigheten beregnes fra økningen i celletetthet i løpet av hele testperioden blir EC₅₀-verdien 180 mg/l, selv om denne konsentrasjonen virker fullstendig veksthemmende det første døgnet.

Den type respons som vises i fig. 1 tyder på at en viss andel av algepopulasjonen blir drept og går i oppløsning når dispergeringsmidlet tilsettes. En mindre del av bestanden overlever imidlertid og kan, i et visst konsentrasjonsområde, vokse normalt. Dette responsmønster hos alger eksponert for dispergeringsmidler er tidligere beskrevet av Norland et al. 1978.

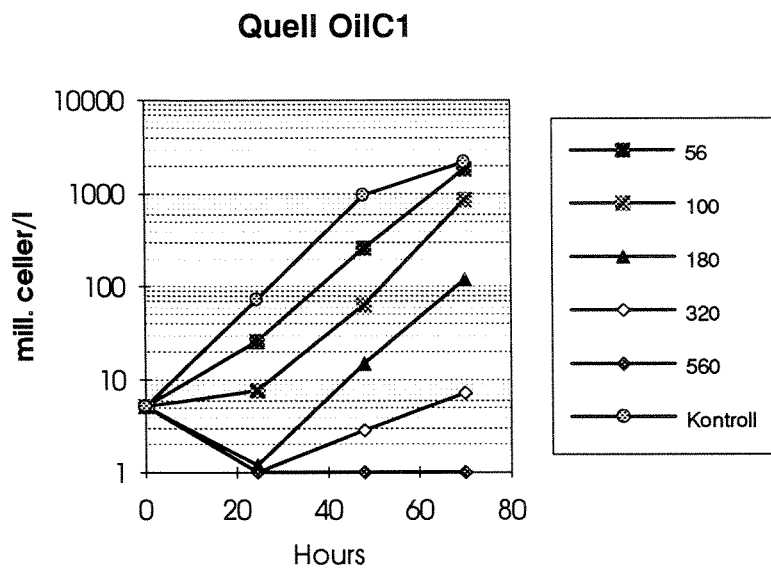


Fig. 1. Vekstkurver for *Skeletonema costatum* i ulike konsentrasjoner (mg/l) av Quell Oil C1

Fordelingen av EC_{50} -verdier for *S. costatum* er vist i fig. 2. De fleste av dispergeringsmidlene (64%) hadde EC_{50} -verdier mellom 10 og 40 mg/l.

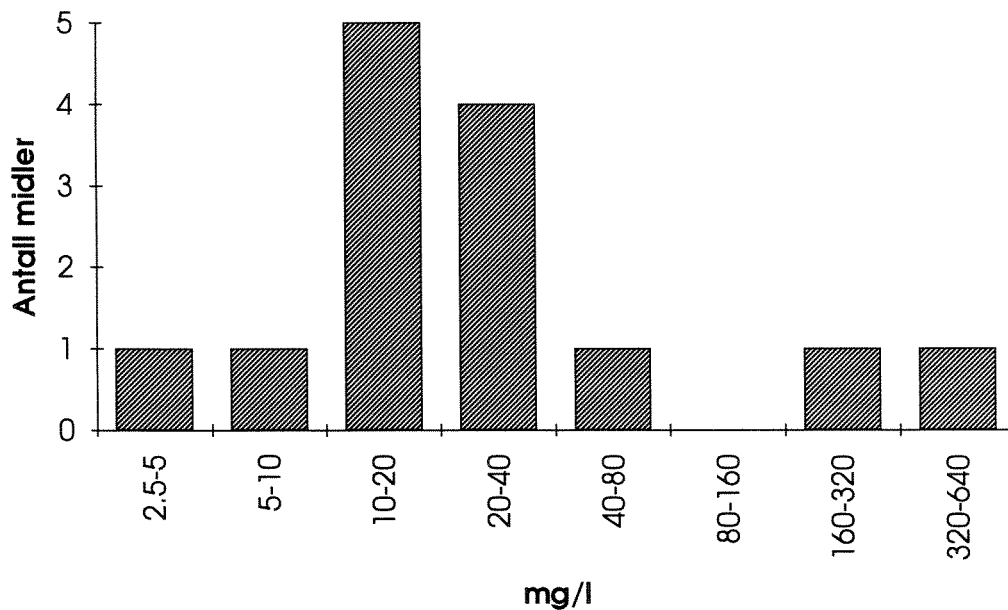


Fig. 2. Fordeling av dispergeringsmidler som funksjon av EC_{50} -verdier for effekt på *Skeletonema costatum*. (Konsentrerte produkter).

Screeningtestene med *Chlamydomonas reinhardtii* viste at den, med unntak for IKU-9 var mindre følsom for dispergeringsmidler enn *S. costatum*. I fig. 3 er EC_{50} -verdiene for de to artene sammenlignet. Figuren viser at det er et visst samsvar mellom de to testene, men det er stor spredning i EC_{50} -verdiene for *C. reinhardtii* i den gruppen midler som har EC_{50} -verdier for *S. costatum* i området 10-40 mg/l.

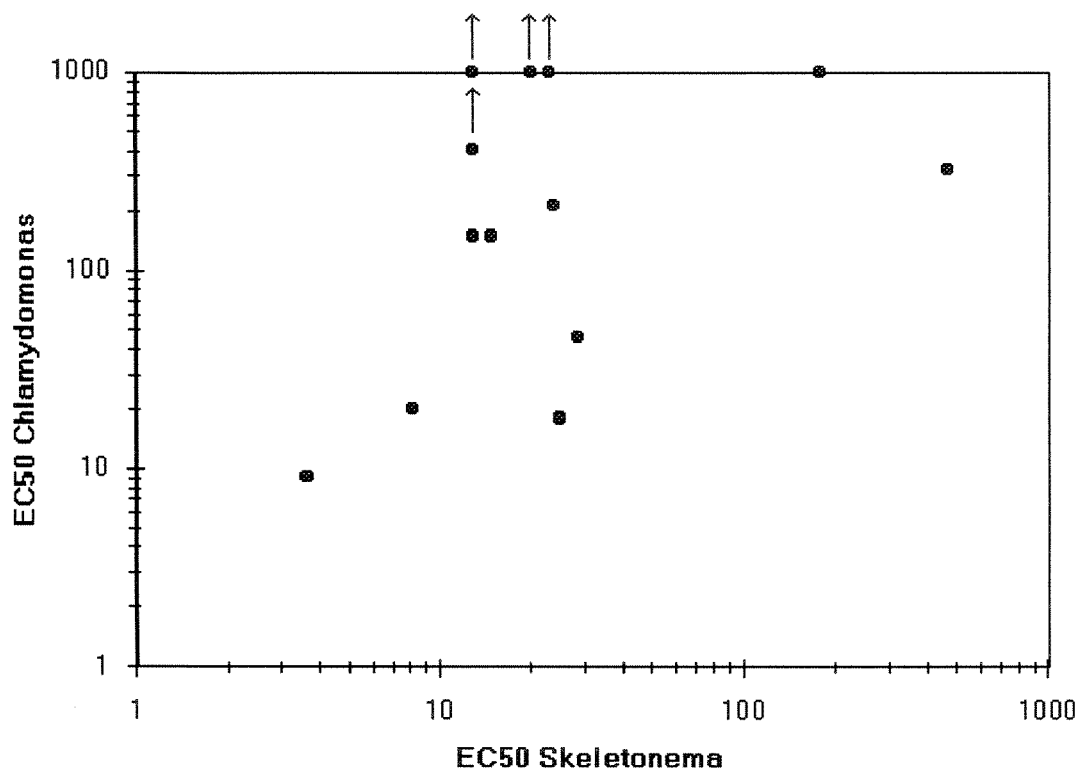


Fig. 3. Sammenligning av EC_{50} -verdier for *Skeletonema costatum* og *Chlamydomonas reinhardtii* (screeningtest). Samtlige verdier gjelder for konsentrerte produkter.

Noen av de rene dispergeringsmidlene er tidligere blitt testet med synkronkulturtesten med *C. reinhardtii*, hvor LC_{50} -verdier er blitt beregnet. EC_{50} -verdiene fra screeningtesten overensstemmer brukbart med LC_{50} -verdiene, med unntak for Finasol OSR-5 som er rapportert som betydelig mer giftig i synkronkulturtesten.

Som tidligere konstatert har dispergeringsmidler blandet med olje andre toksiske egenskaper enn de rene dispergeringsmidlene. Det er derfor ikke noen sammenheng mellom LC_{50} -verdiene for effekten av oljeblandede dispergeringsmidler på *C. reinhardtii* og EC_{50} -verdiene for de rene dispergeringsmidlene på *C. reinhardtii* eller *S. costatum*. (Se fig. 4).

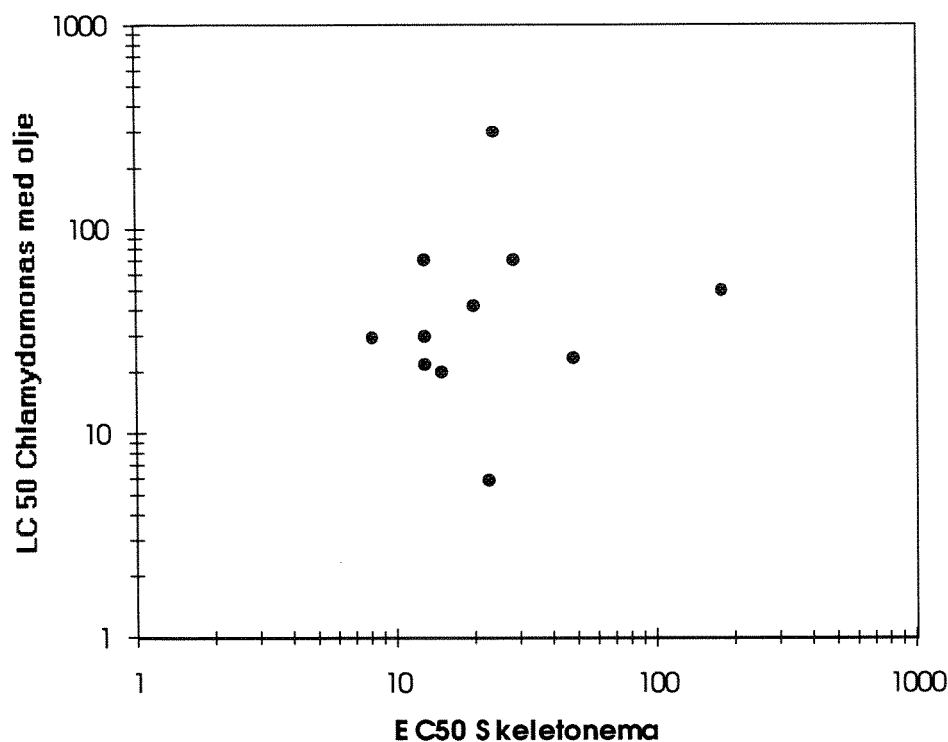


Fig. 4. Sammenligning av resultater av tester av de rene dispergeringsmidlene med *Skeletonema costatum* og synkronkulturtester av dispergeringsmidler + olje med *Chlamydomonas reinhardtii*.

Konklusjoner og anbefalinger

Testene av dispergeringsmidlene har vist at det er liten sammenheng mellom toksisiteten av de rene dispergeringsmidlene overfor *Skeletonema costatum* og LC₅₀-verdiene for *Chlamydomonas reinhardtii* som har ligget til grunn for den nåværende godkjenningen. Dette skyldes flere faktorer:

- Fysiologisk forskjeller hos de to algeartene gjør at de påvirkes forskjellig av ulike midler
- Ulike testparametre brukes ved de to testene (hemming av vekst resp. dødelighet)
- *Skeletonema*-testen utføres i sjøvann og *Chlamydomonas*-testen i ferskvannsmedium
- Testen med *Chlamydomonas reinhardtii* ble utført på dispergeringsmidde blandet med olje

Det er i flere sammenhenger dokumentert at det kan være tildels store forskjeller i følsomhet for giftige kjemikalier mellom ulike alger og at de enkelte arter ikke er generelt følsomme eller resistente (Blanck et al. 1984, Källqvist & Romstad 1994). Det betyr at en rangering av kjemikalier mht. giftighet overfor alger vil kunne bli forskjellig avhengig av hvilken alge som er brukt som testorganisme. Dersom virkningsmekanismen til de testede kjemikaliene er den samme kan imidlertid relative forskjeller i følsomhet mellom ulike alger fremkomme. For dispergeringsmidler ser det ut til at *S. costatum* generelt er mer følsom enn *C. reinhardtii*.

De ulike testparametre som blir benyttet ved *Skeletonema*-testen og synkronkulturtesten med *C. reinhardtii* gjør at EC₅₀-verdiene for *S. costatum* ikke direkte kan sammenlignes med LC₅₀-verdiene for

C. reinhardtii. Forskjellene i de to testprinsippene er diskutert i et notat fra september 1991 (Se vedlegg 2). Konklusjonen var at EC_{50} -verdien fra et *Chlamydomonas*-test vil være ca. 1.5 ggr. høyere enn LC_{50} -verdien, dersom den antatte virkningen av dispergeringsmidler er at en del av populasjonen blir slått ut og den overlevende andelen vokser normalt. Resultatene av *Skeletonema*-testene har imidlertid vist at mange dispergeringsmidler også virker hemmende på algenes veksthastighet. Dersom dette er tilfelle skulle forskjellen mellom LC_{50} og EC_{50} fra den samme testen bli mindre enn 1.5 ganger.

Betydningen av fortynningsmediets saltholdighet for dispergeringsmidlenes giftighet er ukjent, men for enkelte andre stoffer med overflateaktiv virkning er det rapportert resultater som tyder på at marine organismer er mer følsomme enn ferskvannsorganismer. Dette kan ha sammenheng med at marine organismer er mer utsatt for påvirkning av osmo-reguleringen.

Den viktigste årsaken til at det er lite samsvar mellom *Skeletonema*-testene og de tidligere utførte synkronkultur-testene med *C. reinhardtii* er at disse ble utført på dispergeringsmiddel blandet med olje, mens *Skeletonema*-testene ble gjort med bare dispergeringsmiddel. I de tilfelle det er rapportert LC_{50} -verdier for *C. reinhardtii* både på rent dispergeringsmiddel og på blanding med olje var forskjellen ofte stor. For Shell Dispersant VDC var LC_{50} -verdien for oljeblandingen over 100 ggr lavere enn for det rene dispergeringsmidlet. Som regel var giftigheten høyere (LC_{50} -verdien lavere) når dispergeringsmidlet var blandet med olje, men for Finasol OSR-5 er det rapportert lavere LC_{50} -verdi for det rene dispergeringsmidlet enn for blandingen.

Det er trolig at giftigheten av dispergeringsmiddel og olje er mer bestemt av giftige komponenter fra oljen enn fra dispergeringsmidlet. Årsaken til at det likevel er forskjeller i giftighet mellom de ulike dispergeringsmidlene når de er blandet med olje kan være at de gir ulik tilgjengelighet av de giftige oljekomponentene for algene. Midlenes effektivitet og dispergeringsegenskaper blir derfor avgjørende for giftigheten. Bratbak et al. (1982) har også påvist en sammenheng mellom dispergeringseffekt og algetoksisitet.

Det er vanskelig å avgjøre om det er mest relevant å basere godkjenningen av dispergeringsmidlene på grunnlag av giftigheten av de rene midlene eller blandet med olje. Fordi hensikten er at midlene bare skal brukes til oljebekjemping vil den normale situasjonen som organismer i miljøet opplever være eksponering til dispergeringsmiddel blandet med olje. Det er imidlertid ikke sikkert at alt dispergeringsmiddel ved praktisk bruk blir bundet til oljen, slik at også eksponering til rent dispergeringsmiddel kan forekomme. Det kan derfor være relevant at også dispergeringsmidlets giftighet legges til grunn for godkjenningen. Dette vil være i samsvar med godkjenningsordningen for kjemikalier i off-shoreindustrien som baseres på testing av de enkelte kjemikalier selv om de vil slippes ut som blandinger i miljøet. Det kan derfor anbefales at synkronkultur-testen med *C. reinhardtii* erstattes med veksthemmingstest med *S. costatum* på det rene dispergeringsmidlet.

Dersom testbatteriet for godkjenning skal revideres må også nye grenseverdier for toksisitet fastlegges. En grenseverdi for dispergeringsmidlenes giftighet for *S. costatum* kan foreslås ut fra resultatene av testene av 14 dispergeringsmidler (se tabell 1). For *Chlamydomonas*-testen gjelder det at LC_{50} -verdien for dispergeringsmidlet (bruksløsning) blandet med olje skal være minimum 200 mg/l. Bruksløsning betyr i denne sammenhengen at konsentrater fortynnes 1:10 mens løsemiddelbaserte dispergeringsmidler testes uforynnet. Som fremgår av tabell 1 klarer samtlige av de testede midlene med unntak for Enersperse 1583 og Shell Dispersant VDC denne grensen. Det er ikke mulig å sette en grense for EC_{50} i *Skeletonema*-testen som gir samme resultat.

Hvordan ulike grenseverdier vil slå ut går frem av figur 5, hvor dispergeringsmidlene er rangert etter giftighet i bruksløsninger. Dersom grensen settes ved 100 mg/l vil alle med unntak av de tre mest giftige (Enersperse 1583, Finasol OSR-12 og Biosolve) bli godkjendt. Med en grense på 200 mg/l vil halvparten av midlene bli godkjendt, mens en grense på 1000 mg/l bare klares av det minst giftige midlet (Quell Oil C1). Siden mesteparten av midlene har EC_{50} -verdier i området 100-300 mg/l bør ikke

grenseverdien legges her med hensyn til den usikkerhet som er knyttet til EC_{50} -verdiene. Midlene i denne gruppen bør enten godkjennes eller ikke godkjennes. Dette må avveies mot behovet for at disse midlene fortsatt skal være godkjendt, og hvilke alternativ som eksisterer. At tre midler har EC_{50} -verdier over 400 mg/l tyder på at det er mulig å fremstille dispergeringsmidler med lav giftighet for alger. Dersom disse midlene har en tilfredsstillende effektivitet burde grenseverdien kunne settes til 400 mg/l (bruksløsning). I annet fall anbefales grenseverdien 100 mg/l. En slik lav grenseverdi vil imidlertid ikke gi produsentene noe insitamant til utvikling av mindre giftige produkter. Ut fra foreliggende materiale anbefales derfor at grenseverdien for godkjenning settes til 400 mg/l.

I alle tilfelle bør grenseverdier for toksisitet på en eller annen måte relateres til dosering ved bruk. I den nåværende godkjenningsordningen skilles det kun mellom konsentrater og løsningsmiddelbaserte disperferingsmidler. Konsentratene fortynnes 1:10 før testing, mens de løsningsmiddelbaserte testes ufortynnet. Det tas derimot ikke hensyn til eventuelle forskjeller i anbefalt dosering. Et alternativ kan være å knytte grenseverdien for toksisitet til en effektivitetstest slik at toksisiteten kan relateres til den dose som skal til for å utføre et bestemt arbeid. Dersom man ved effektivitetstesten kan bestemme hvor stor dose som kreves for å dispergere en bestemt mengde olje kan kriteriet for toksisitet utformes som i følgende eksempel:

$$\frac{D}{EC_{50}} < T$$

Hvor T = kriterium for godkjenning mht. algetoksisitet
 og D = dose for dispergering av olje (f. eks. mg disp. middel pr. g olje)

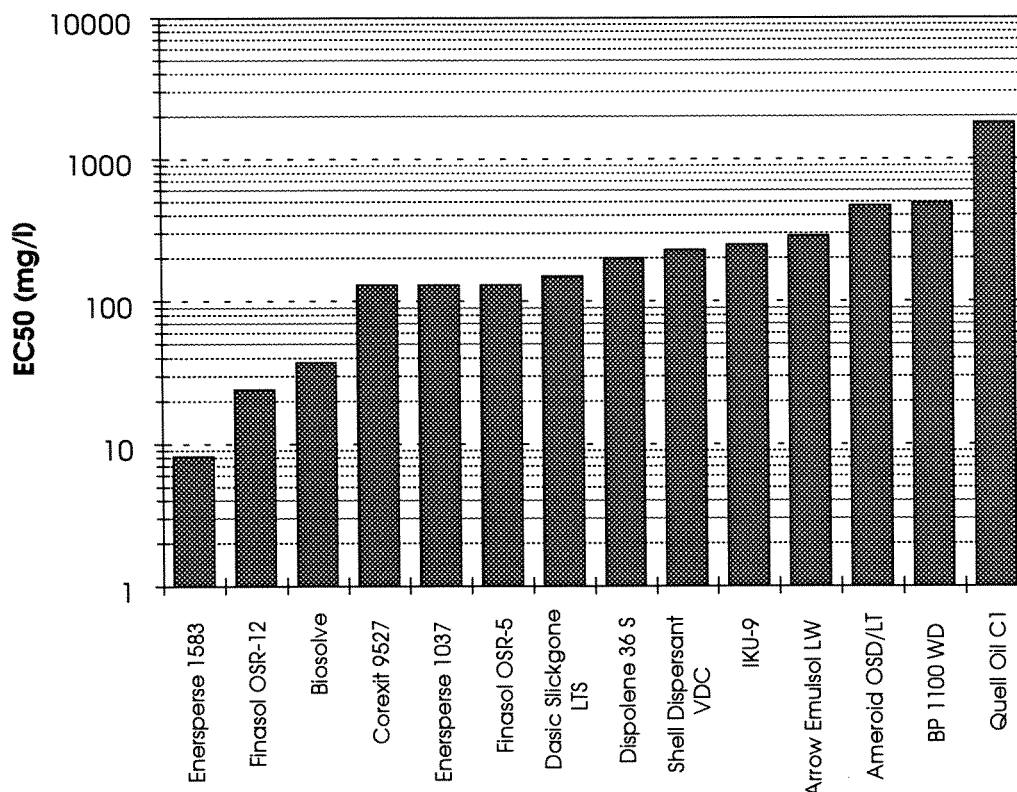


Fig. 5. Rangering av dispergeringsmidler mht. EC_{50} -verdier for bruksløsningen veksthemming av *Skeletonema costatum*. (Økende EC_{50} = minkende giftighet).

Referanser

Blanck, H., G. Wallin and S.-Å. Wängberg 1984. Species- dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8: 339-351.

Bratbak, G., M. Heldal, G. Knutsen, T. Lien and S. Norland 1982. Correlation of dispersant effectiveness and toxicity of oil dispersants towards the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 13, No. 10, pp. 351-353.

Källqvist, T. 1984: Biotetser. I: Vennerød, K. (red.) *Vassdragsundersøkelser - en metodebok i limnologi*. Universitetsforlaget, s. 252-267.

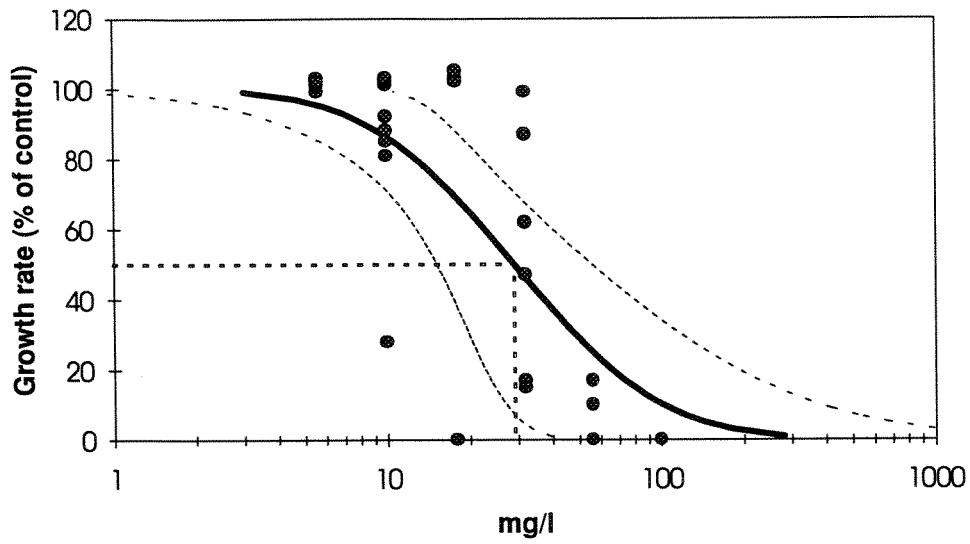
Källqvist, T. and R. Romstad 1994: Effects of agricultural pesticides on planktonic algae and cyanobacteria - examples of interspecies sensitivity variations. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. Supplement No. 13: 117-131.

Norland, S., M. Heldal and T. Lien 1978: Toxicity testing with synchronized cultures of the green alga *Chlamydomonas*. *Chemosphere* No. 3, 231-245.

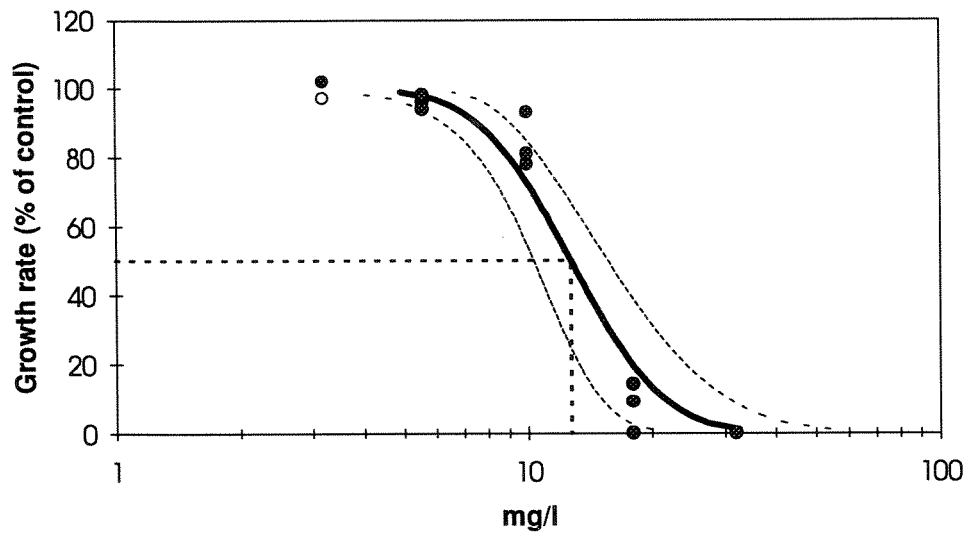
Staub, R. (1961): Ernährungsphysiologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* D.C. *Schweiz. Z. Hydrol.* 23: 82-198.

VEDLEGG 1.

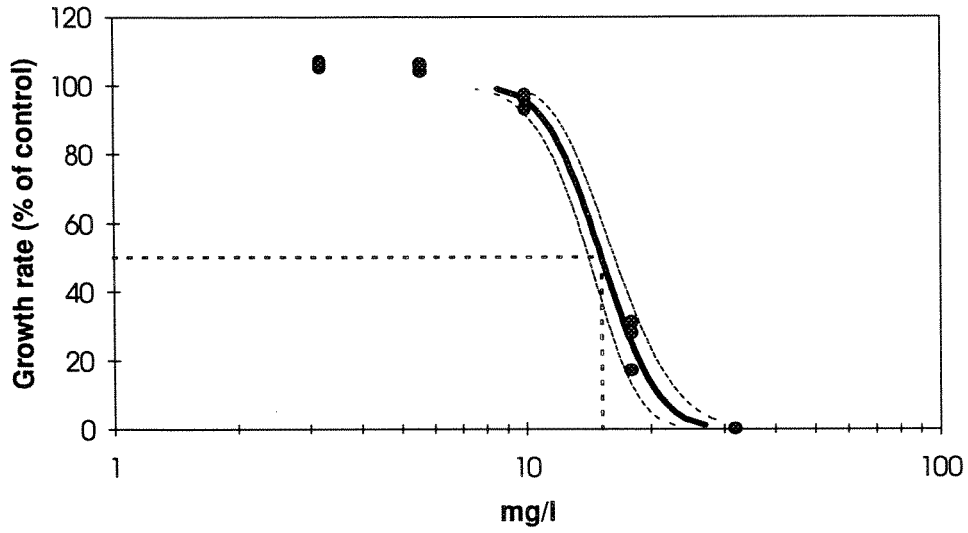
Konsentrasjon/respons-kurver for dispergeringsmidlenes effekt på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*



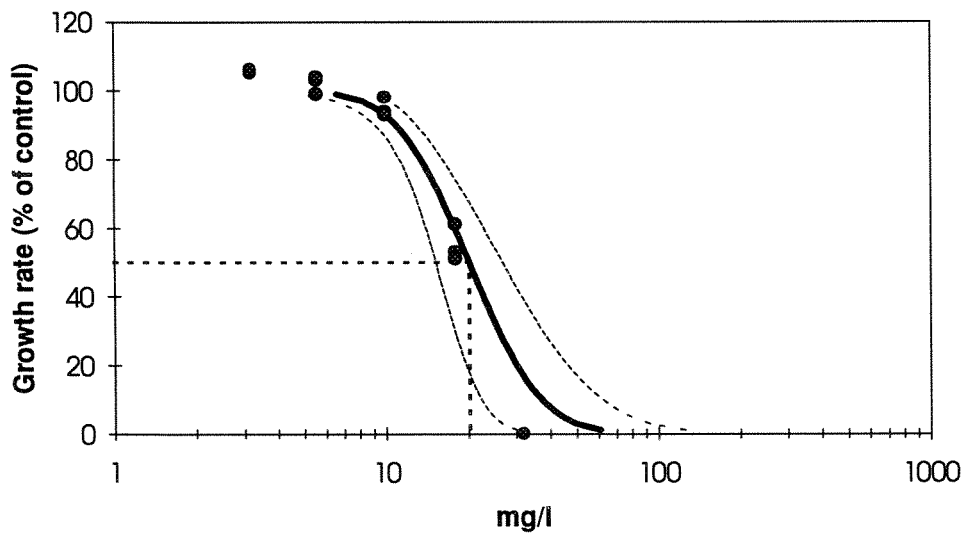
Effekt av Arrow Emulsol LW på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*. (Samlede resultater av 3 tester).



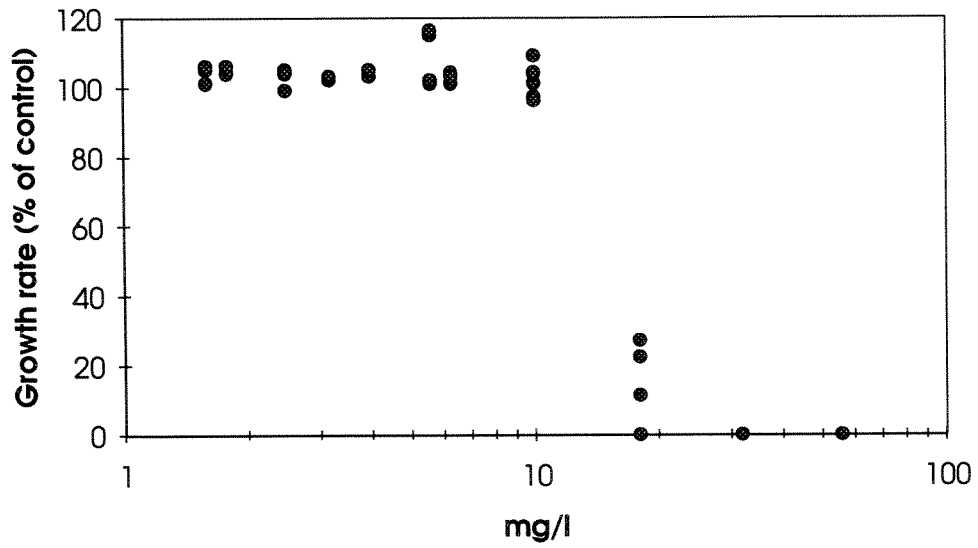
Effekt av Corexit 9527 på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



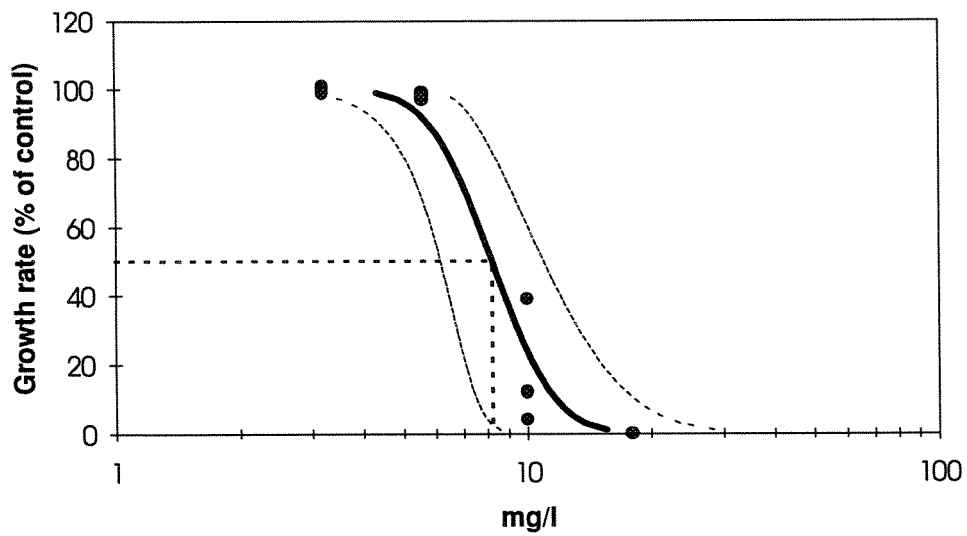
Effekt av **Dasic Slickgone LTS** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



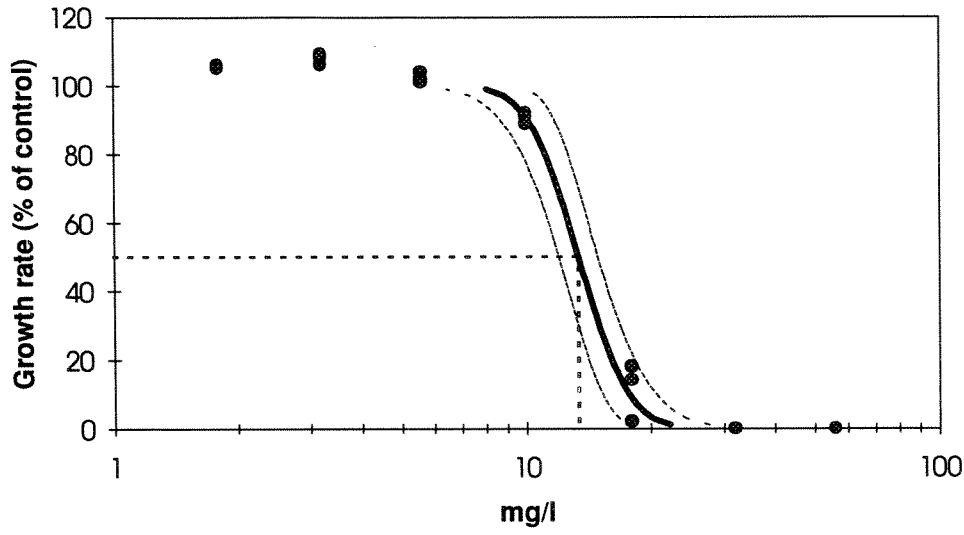
Effekt av **Dispolene 36S** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



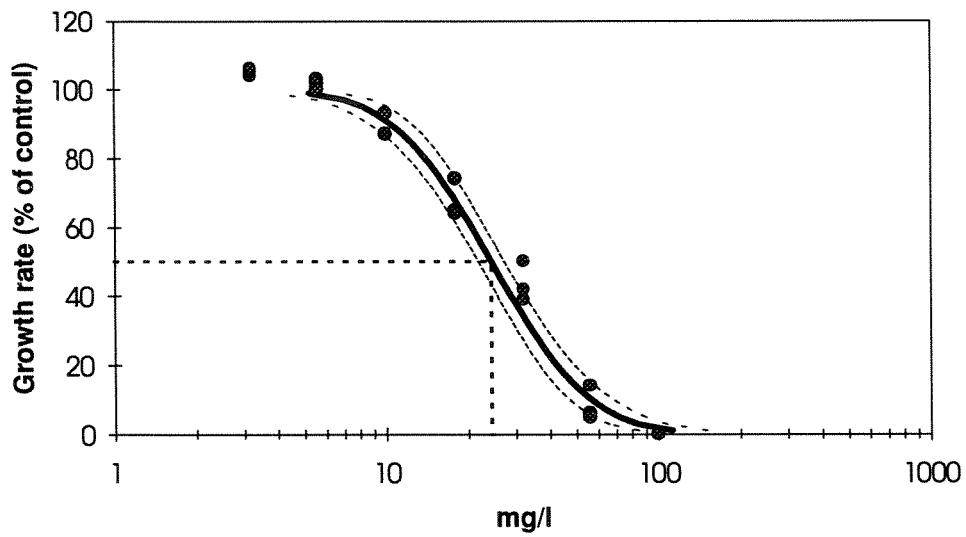
Effekt av **Enersperse 1037** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*. (Samlede resultater av 5 tester)



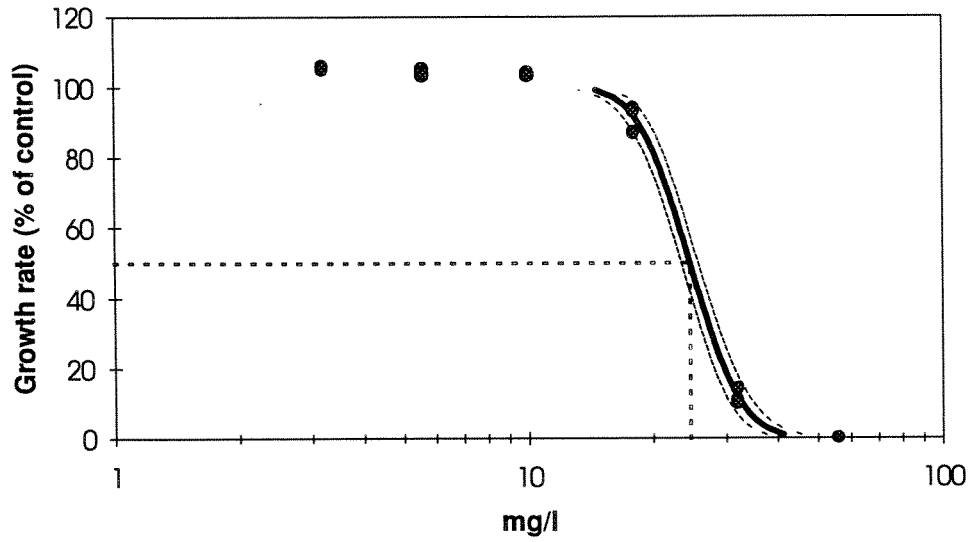
Effekt av **Enersperse 1583** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



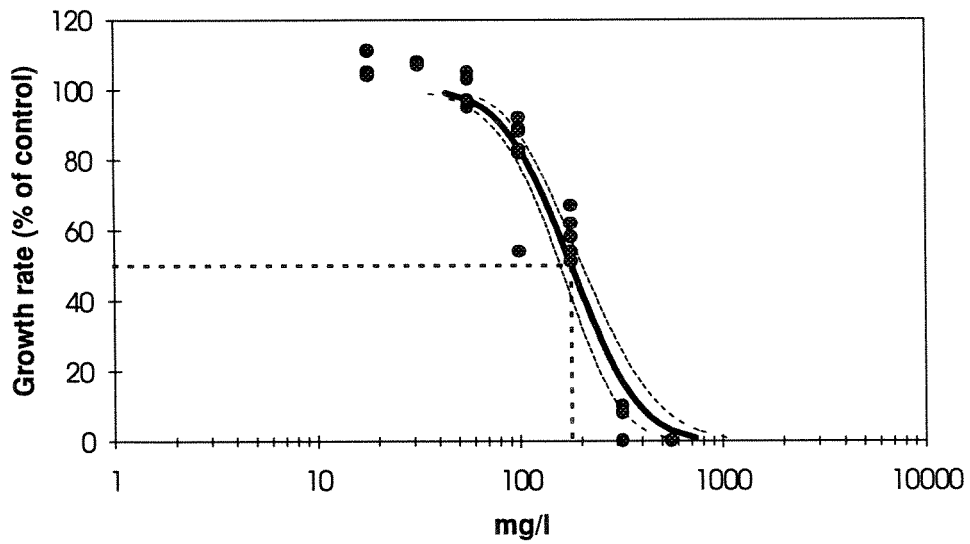
Effekt av **Finasol OSR-5** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



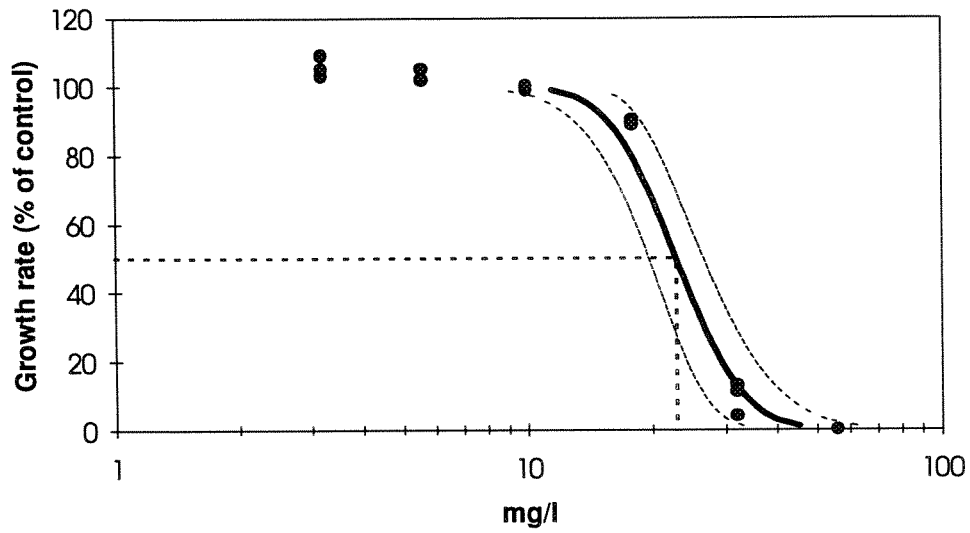
Effekt av **Finasol OSR-12** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



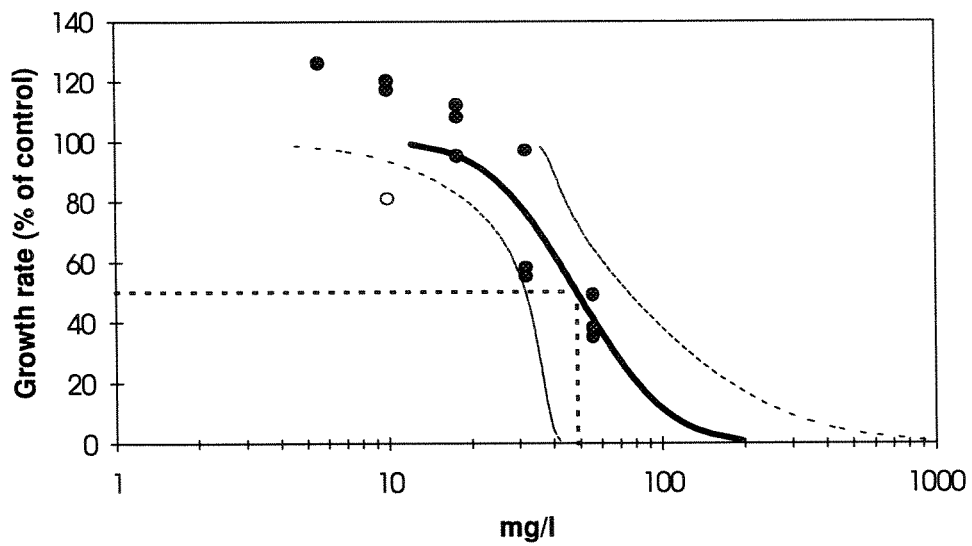
Effekt av **IKU - 9** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



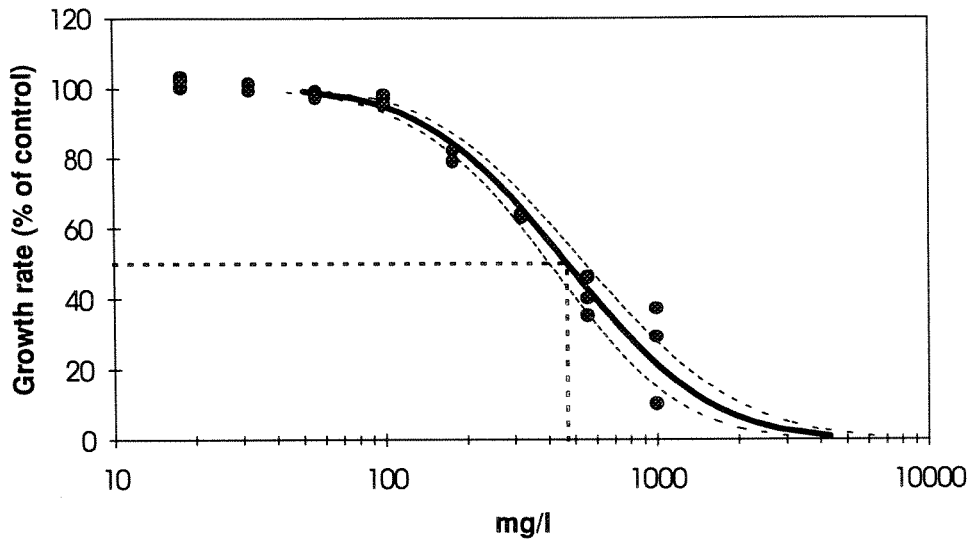
Effekt av **Quell Oil C1** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*. (Samlede resultater av 2 tester).



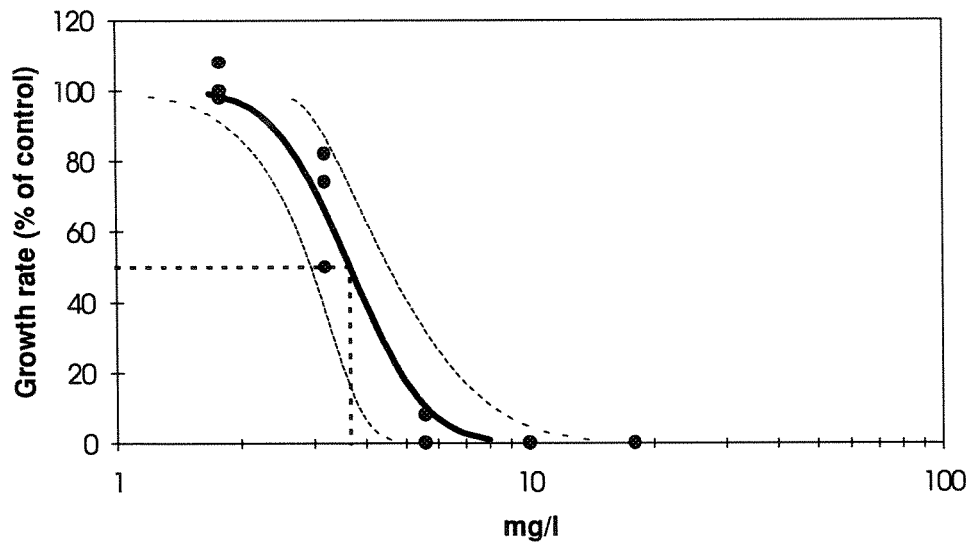
Effekt av Shell Dispersant VDC på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



Effekt av BP 1100 WD på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*. Observasjon markert med ikke fylt symbol er ikke inkludert i kurvetilpassing for bestemmning av EC₅₀.



Effekt av **OSD/LT Oil Spill Dispersant** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.



Effekt av **Biosolve** på veksthastigheten til *Skeletonema costatum*.

VEDLEGG 2.

Notat om testmetoder for dispergeringsmidler

Norsk Institutt for Vannforskning NIVA

Notat

E-88427

Toksisitetstesting av dispergeringsmidler

Oslo 6 september 1991

Torsten Källqvist
Forskningsleder

Bakgrunn

Et forskningsprosjekt om effekter av dispergeringsmidler på alger ble gjennomført ved Institutt for mikrobiologi plantefysiologi (IMP) ved Universitetet i Bergen i begynnelsen av 80-årene. Prosjektet førte bl. a. til utvikling av en prosedyre for toksisitetstest med grønnalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, som Statens Forurensningstilsyn, SFT, siden har brukt som basis for godkjenning av dispergeringsmidler for oljebekjemping. Metoden er beskrevet av Norland og medarbeidere (1978).

IMP utførte i flere år tester med sin algetestmetode på oppdragsbasis, men har nå lagt ned denne virksomheten fordi etterspørselen har vært sporadisk og kostnadene for å holde apparatet vedlike ble for store.

NIVA fikk i 1989 forespørsel om å utføre testing av to dispergeringsmidler i henhold til IMPs metode. Metoden ble innarbeidet og testene utført den gangen, men vi fikk ikke ytterligere henvendelser om testing av dispergeringsmidler på nesten 2 år. Vår bedømming er derfor den samme som IMPs, at det ikke er tilstrekkelig etterspørsel etter metoden for å forsvare at den holdes operativ. Når vi i april 1991 mottok vi et nytt dispergeringsmiddel for testing på alger, foreslo vi å bruke en internasjonal standardprosedyre (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, test nr. 201: "Algal growth inhibition test"). Siden denne standard gir åpning for bruk av forskjellige algearter, ble testen gjennomført med *Chlamydomonas reinhardtii* i tillegg til den mer benyttede *Selenastrum capricornutum*, som også tilhører ordenen grønnalger.

Når resultatene av algtester etter OECD-standarden skal tolkes i forhold til SFTs kriterier for godkjenning av dispergeringsmidler må forskjellene i testprosedyrene og konsekvensene disse har på resultatet vurderes.

Sammenligning av IMPs og OECDs algetestmetoder.

Ved IMP fant man at dispergeringsmidler hadde den effekten på *Chlamydomonas*, at en del av populasjonen døde, mens de overlevende algecellene delte seg med normal hastighet. Jo høyere konsentrasjon av dispergeringsmiddel, desto høyere var andelen av døde celler. Ved å benytte seg av synkronkulturer av algen, hvor samtlige celler deler seg tilnærmet samtidig, kan man måle hvor stor andel av cellene som deler seg normalt. I toksisitetstesten blir de som ikke deler seg regnet som døde. Ved å måle andelen levende og døde celler i en konsentrasjonsserie av dispergeringsmiddel, kan man beregne hvilken konsentrasjon som gir 50% dødelighet (letalitet), d.v.s. den s.k. LC₅₀-verdien.

I OECDs testmetode måles veksthastigheten (delingsraten) hos testalgene i en konsentrasjonsserie av teststoffet over 3 døgn. Den midlere veksthastigheten i hver konsentrasjon beregnes fra forskjellen i antall celler ved start og etter 3 døgn. I kontrollkulturen skal veksten være eksponensiell og veksthastigheten kan beregnes med formelen:

$$\mu = \frac{\ln(n_3) - \ln(n_0)}{3}$$

hvor μ = veksthastighet (døgn⁻¹)

n_0 = antall celler ved start

n_3 = antall celler etter 3 døgn

Samme formel brukes for beregning av veksthastigheten også i kulturene med teststoff, selv om det ikke er krav om at veksten i disse skal være eksponensiell gjennom hele forsøket. Avhengig av

teststoffets karakter kan veksten hemmes bare i begynnelsen eller kanskje først etter en eller flere dagers eksponering. Uansett vil dette føre til at den midlere veksthastigheten blir lavere enn i kontrollkulturer, hvor algene vokser med maksimal hastighet gjennom hele forsøket.

Ved tellingen av alger skilles det ikke mellom levende og døde alger. Den respons hos *Chlamydomonas* eksponert for dispergeringsmidler som er rapportert av IMP vil altså i en OECD-test registreres som en lag-fase, hvor antallet celler er nær konstant intill den overlevende andelen av populasjonen blir større enn den opprinnelige populasjonen. Dette er vist i figur 1. Kurve A viser økningen av algetallet i kontrollkulturen, hvor delingshastigheten er $1.6 \text{ d\o{g}n}^{-1}$. Den eksponensielle veksten gir en rett linje når celledatlet plottes på en logaritmisk akse. Med utgangspopulasjonen 5×10^6 celler/l er tettheten oppe i 607×10^6 etter 3 d\o{g}n. I en annen kultur (B) er celledettheten 55×10^6 etter tre d\o{g}n. Middelveksthastigheten over 3 d\o{g}n blir da $0.8 \text{ d\o{g}n}^{-1}$, d.v.s. halvparten av i kontrollen.

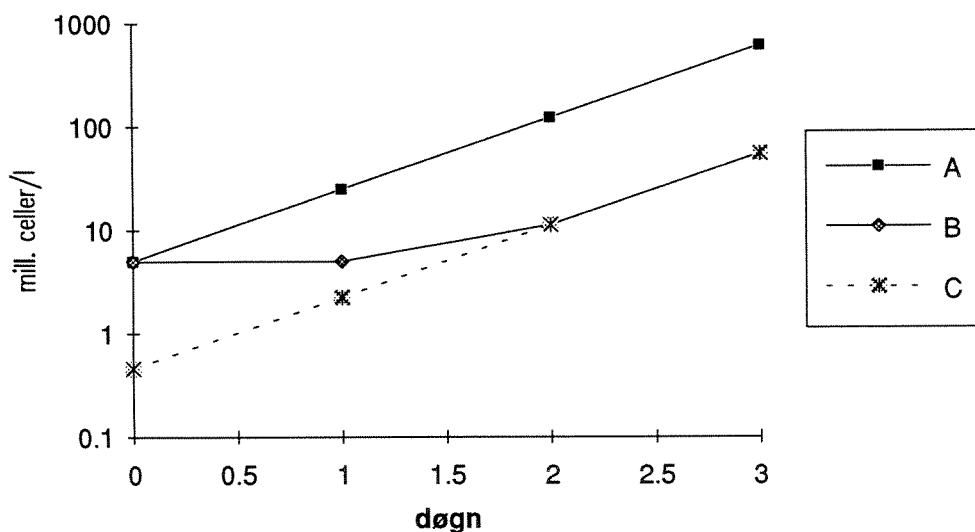


Fig. 1. Vekstkurver som viser utviklingen i celledetthet i en kontrollkultur (A) og en kultur med giftstoff i en konsentrasjon som reduserer den midlere veksthastigheten til 50% (B). Den stiplede kurven (C) viser hvor stor andel av den opprinnelige populasjonen som er d\o{d}, forutsatt at giftstoffets virkningsmekanisme er at en del av cellen drepes mens de som overlever vokser med normal veksthastighet.

Hvis teststoffets virkningsmekanisme kun er den som foresl\o{a}tt av IMP, d.v.s. at en del av populasjonen d\o{r} umiddelbart og bare en liten andel overlever og vokser med samme hastighet som i kontrollen d.v.s. $1.6 \text{ d\o{g}n}^{-1}$, kan man beregne hvor stor del av populasjonen som overlevt ved \o{a} f\o{r}e en linje parallellt med kontrollkulturens vekstkurve gjennom punkten som markerer antallet levende celler etter 3 d\o{g}n (C). Denne linjen ender p\o{a} ca. 0.45×10^6 celler/l ved dag 0. Dette inneb\o{e}rer at ca. 95% av den opprinnelige bestanden er d\o{d}e.

Sammenligningen viser at 50% reduksjon av veksthastigheten (EC_{50}) tilsvarer en d\o{d}elighet som er betydelig h\o{y}ere enn 50%. Alts\o{a} vil LC_{50} -verdien bli lavere enn EC_{50} -verdien beregnet fra samme testdata. Sammenhengen mellom % d\o{d}elighet og veksthastighet beregnet p\o{a} denne m\o{a}ten er fremstilt i figur 2. Denne viser at en reduksjon av veksthastigheten fra 1.6 (kontrollkulturens veksthastighet) til ca. 1.37, d.v.s. 24% tilsvarer 50% d\o{d}elighet i utgangspopulasjonen.

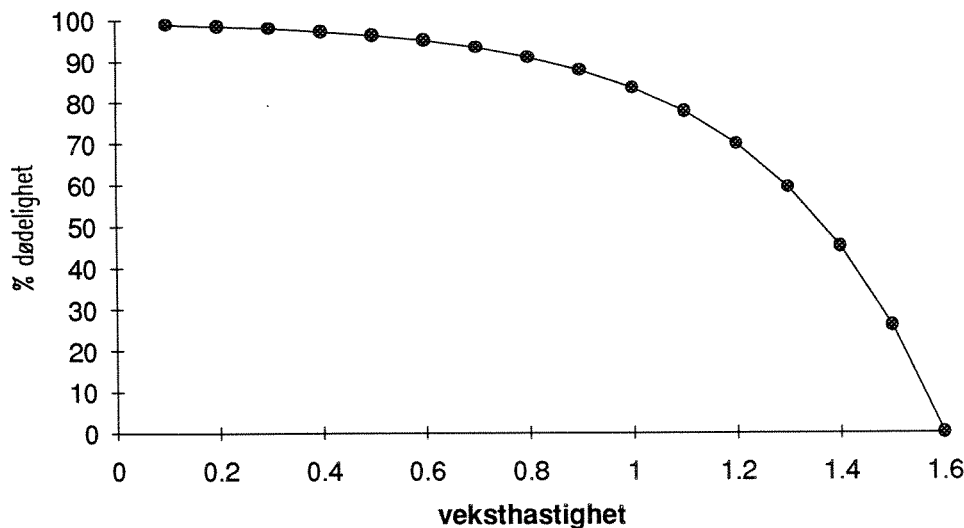


Fig. 2. Sammenhengen mellom dødelighet og midlere veksthastighet når gifteffekten kun gir partiell dødelighet av utgangsbestanden, mens veksthastigheten hos de overlevende cellene er den samme som i kontrollen, d.v.s. 1.6 døgn⁻¹.

Ut fra diskusjonen ovenfor kan man altså vente at EC_{50} -verdier for veksthastighet bestemt etter OECD-metoden er høyere en tilsvarende LC_{50} -verdi fra IMP-metoden. Såvidt kjent er det ikke foretatt noen interkalibrering av de to metodene, men det er mulig å teoretisk beregne utfallet av beregningsmetodene for EC_{50} og LC_{50} fra algetester som er utført etter OECD-metoden, dersom man forutsetter at virkningsmekanismen er den som er beskrevet av IMP, d.v.s. partiell dødelighet.

Vi har bare data fra en OECD-test av dispergeringsmiddel med *Chlamydomonas reinhardtii* (testrapporten er vedlagt). EC_{50} -verdien var i dette tilfelle 147 mg/l. LC_{50} -verdien beregnet på grunnlag av ekstrapolert dødelighet for de ulike konsentrasjonene var 89 mg/l, d.v.s. en faktor 1.65 lavere. Vekstkurvene kan tyde på at mekanismen for effekten på midlere veksthastighet har vært partiell dødelighet ved starten av eksponeringen som er beskrevet av IMP.

Samme beregning utført på 6 tilfeldig valgte datasett for *Selenastrum capricornutum* (ikke dispergeringsmidler) viste LC_{50} -verdier som var fra 1.71-1.91 ganger lavere enn EC_{50} -verdiene for veksthastighet (middelverdi 1.84). Den forholdsvis konstante forskjellen mellom EC_{50} og LC_{50} -verdier i disse eksemplene gir en indikasjon på den forskjell man kan vente mellom de to responsparametrene når de bestemmes som beskrevet ovenfor.

Beregningseksemplene ovenfor tyder på at hvis man overveier å akseptere tester etter OECD-metoden som grunnlag for godkjenning av dispergeringsmidler bør grensen for godkjenning justeres oppover med en faktor ca. 1.8. Dette forutsetter imidlertid at effektmekanismen kun er partiell dødelighet, og altså at dispergeringsmidlene ikke har noen effekt på veksthastigheten hos de algeceller som overlever. Det er imidlertid trolig at også veksthastigheten påvirkes og det vil i tilfelle føre til at forskjellen mellom LC_{50} bestemt med IMP-metoden og EC_{50} med OECD-metoden blir mindre, kanskje nærmere en faktor 1.5.

Neste spørsmål man må ta stilling til er hvorvidt man skal akseptere tester med andre alger enn *Chlamydomonas reinhardtii*. Det er kjent at følsomheten kan variere sterkt mellom ulike algearter for enkelte typer av kjemikalier. Hvorvidt dette er tilfelle også når det gjelder dispergeringsmidler kjenner jeg ikke til. Det kan være ønskelig å basere seg på en mer "standardisert" art som *Selenastrum* fordi man da får et mye større referansemateriale for å vurdere relativ giftighet av produkter. Vi har bare bestemt EC_{50} -verdien for et dispergeringsmiddel med de to artene etter

OECD-metoden. Forskjellen var i dette tilfelle marginell, (*Selenastrum*: 165 mg/l, *Chlamydomonas*: 147 mg/l). Dersom dette gjelder generelt for dispergeringsmidler skulle det bety at tester med disse to artene kunne ses på som likverdige. Det kunne imidlertid være ønskelig i en overgangsperiode å kreve tester etter OECD-metoden med begge organismene.

Grunnlaget for å anslå forskjeller i resultat fra de to metodene er som synes svært usikkert og det ville vært betryggende å foreta en sammenligning ved å teste noen av de produkter som tidligere er testet med IMPs metode også med OECD-metoden med begge algene.

Anbefalinger

Min anbefaling når det gjelder algetester for godkjenning av oljedispergeringsmidler blir derfor:

- * Gå over til krav om algetest i henhold til OECD Guidelines 201: med *Selenastrum capricornutum* som testalge.
- * Eventuelt i en overgangsperiode kreve OECD-test med *Chlamydomonas reinhardtii* i tillegg.
- * Grenseverdien for godkjenning av dispergeringsmiddel settes midlertidlig til EC₅₀ (veksthastighet) ca. 1.5 ganger høyere enn nåværende LC₅₀-verdi. (her må man finne en verdi som er rimelig avrundet).
- * Det foretas tester av noen tidligere testede dispergeringsmidler med OECD-metoden for å få et bedre grunnlag for å vurdere metodenes relative følsomhet og evt. justere grenseverdien.

Referanser:

OECD 1981: Guidelines for testing of chemicals. (OECD,Paris)

Norland, S. , M. Heldal, T. Lien og G. Knutsen (1978): Toxicity testing with synchronized cultures of the green alga *Chlamydomonas*. Chemosphere No.3, 231-245.

Vedlegg

Testrapport for OECD-test 201 av dispergeringsmiddel Gamlen OD 4000

NIVA



Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås, 0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00 Fax: 22 18 52 00

ISBN 82-577-2600-1