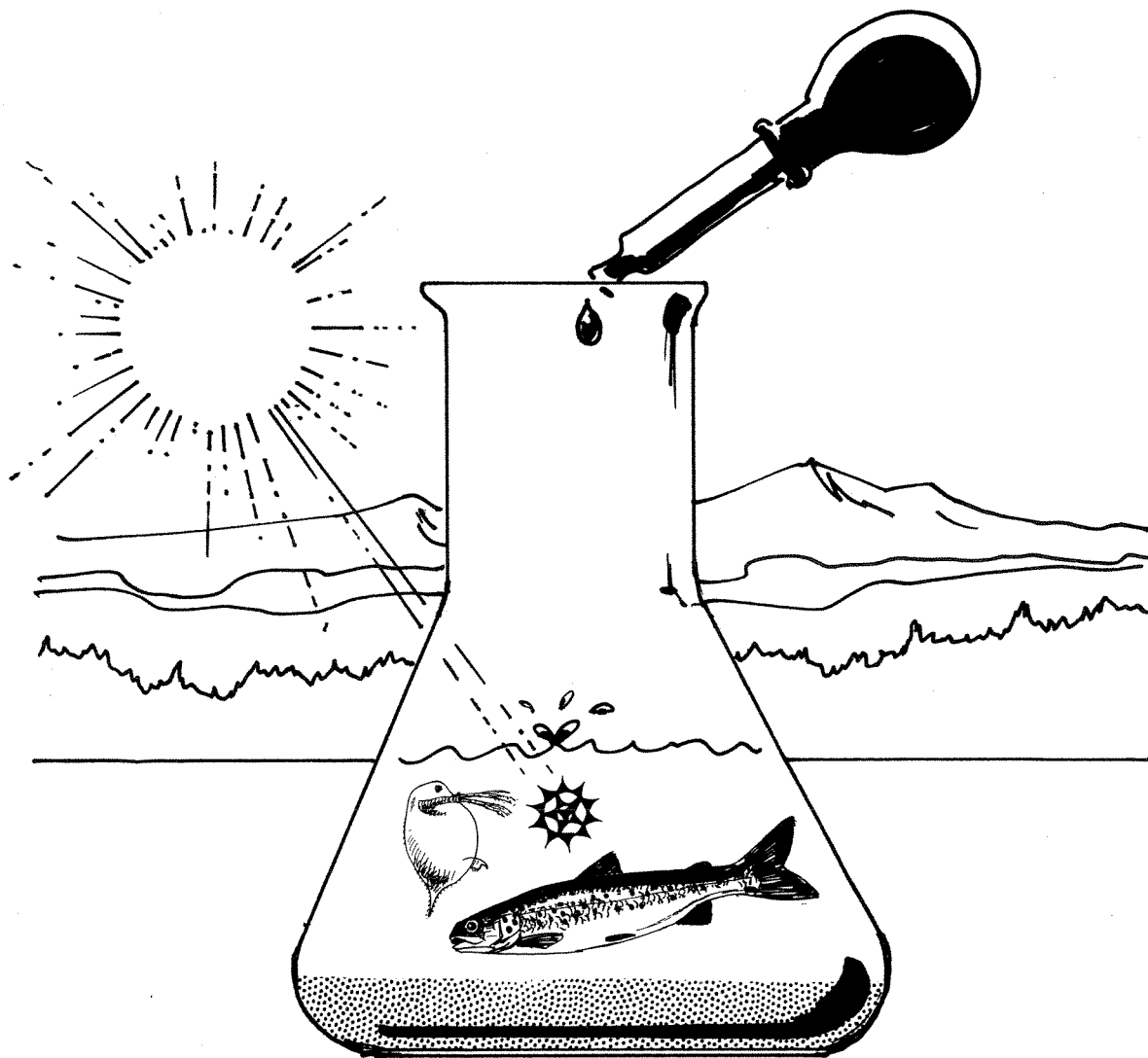


O - 89176

Økotoksikologisk testing av emulgator



Norsk institutt for vannforskning



NIVA

NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Hovedkontor
Postboks 33, Blindern
0313 Oslo 3
Telefon (02) 23 52 80
Telefax (02) 39 41 29

Sørlandsavdelingen
Grooseveien 36
4890 Grimstad
Telefon (041) 43 033
Telefax (041) 42 709

Østlandsavdelingen
Rute 866
2312 Ottestad
Telefon (065) 76 752

Vestlandsavdelingen
Breiviken 5
5035 Bergen - Sandviken
Telefon (05) 95 17 00
Telefax (05) 25 78 90

Prosjektnr.: O-89176
Undernummer:
Løpenummer: 2298
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel: Økotoksikologisk testing av emulgator	Dato: 27.10.89
	Prosjektnummer: O-89176
Forfatter (e): Torsten Källqvist	Faggruppe: Analyse
	Geografisk område: Generelt
	Antall sider (inkl. bilag):

Oppdragsgiver: Norsk Hydro A/S	Oppdragsg. ref. (evt. NTNf-nr.):
--	----------------------------------

Ekstrakt: <p>En emulgator for bruk i offshore-industrien er blitt testet m.h.t. økotoksikologiske egenskaper. Testene omfattet undersøkelse av toksisitet overfor alger, krepsdyr, og fisk. Produktets biologiske nedbrytbarhet ble også undersøkt. Samtlige tester ble utført i sjøvann. Resultatene viser at produktets hovedkomponenter var lett nedbrytbare (BOD/COD > 80% etter 5 døgn). Akutte gifteffekter på fisk og alger ble funnet ned til ca. 3 mg/l. Ingen giftvirkning ble registrert ved konsentrasjoner opp til 40 mg/l etter 28 døgns nedbrytning. Utslipp kan gi gifteffekter lokalt men ventes ikke føre til oppkonsentrering i miljøet.</p>

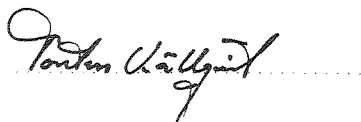
4 emneord, norske:

1. **Emulgator**
2. **Toksisitet**
3. **Biologisk nedbrytbarhet**
4. **Oljeindustri**

4 emneord, engelske:

1. **Emusifier**
2. **Toxicity**
3. **Biodegradability**
4. **Oil industry**

Prosjektleder:



For administrasjonen:



ISBN 82-577-1600-6

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

ØKOTOKSIKOLOGISK TESTING AV EMULGATOR

0-89147

Saksbehandler: Torsten Källqvist

Medarbeidere: Harry Efraimsen
Magne Grande
Sigbjørn Andersen
Randi Romstad
Henry Hovde (Balanus
test system)

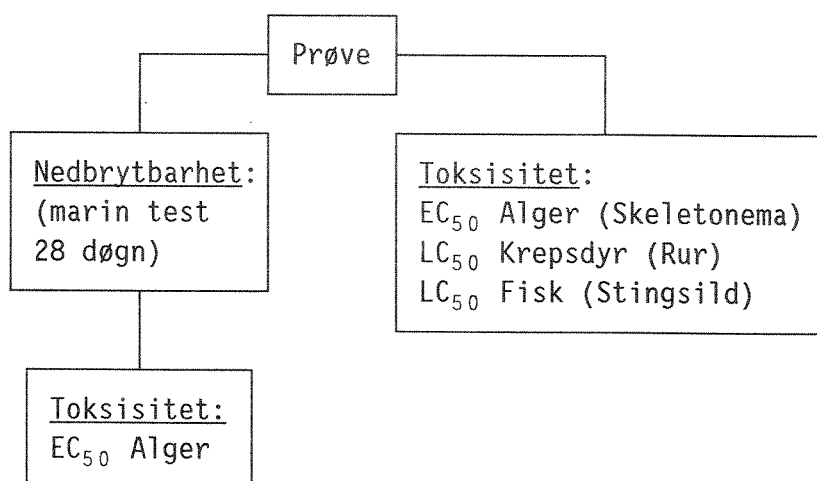
Bakgrunn

Norsk Hydro A/S henvendte seg i august 1989 til NIVA for å få utført økotoksikologiske tester av en emulgator til bruk ved oljeboring. Et program for testene ble utarbeidet (NIVA Jnr. 2543/89). Programforslaget ble akseptert av Norsk Hydro 21 august 89 (Bestilling PR9-24601.01). En prøve av emulgatoren merket "Emulgator konsentrat II 4/7,89" ble oversendt til NIVA.

Program for testing

Testprogrammet ble utformet etter samme prinsipper som i OECDs Guidelines for Testing of Chemicals (OECD 1982), men tilpasset marint miljø. Karakteriseringen omfattet emulgeringsmidlets biologiske nedbrytbarhet og toksisitet. Toksisiteten ble undersøkt ved korttidstester med alger (effekt på veksthastigheten til Skeletonema costatum, ISO DP 10253), krepsdyr (effekt på utvikling av rur, Balanus improvisus) og fisk (dødelighet av stingsild, Gasterosteus aculeatus). Algetesten og rurtesten ble utført med samme organismer som blir benyttet i SFTs program for godkjenning av boresalm.

Nedbrytbarheten ble undersøkt ved inkubering med et mikroorganismesamfunn i sjøvann i 28 døgn (ISO DIS 9408). Nedbrytbarhetstester av sammensatte produkter har begrenset verdi isolert fordi de bare gir informasjon om hvor mye organisk stoff som er omsatt, men ikke hva slags stoffer som blir igjen. En toksisitetstest med alger ble utført etter nedbrytbarhetstesten for å undersøke om giftvirkningen var persistent. Hele testprogrammet er skissert nedenfor.



Resultat

Resultatene av de ulike testene er rapportert i vedlegg 1-4. En oppsummering er gitt i tabellen nedenfor.

Test	Benevning	
Nedbrytbarhet 28 døgn	% av DOC	=>87
Alger, vekst 48 t. før nedbrytning ¹	EC ₅₀ mg/l	4.1
Alger, vekst 48 t. etter -"- ¹	EC ₅₀ mg/l	>40
Rur, utvikling	EC ₅₀ mg/l	15
Stingsild, dødelighet 96 timer	LC ₅₀ mg/l	2.5

¹ De resultater som er oppgitt for alger gjelder effekt på algenes veksthastighet. Metoden foreskriver også beregning av effekt på areal under vekstkurve. Disse verdiene er oppgitt i vedlegg 1. Areal under vekstkurve vil som følge av beregningsmåten alltid være en mer følsom parameter enn veksthastighet og således gi lavere EC₅₀-verdier. Vi velger å legge mest vekt på veksthastigheten fordi vi anser den for å være en mer relevant parameter.

Kommentarer

Emulgatorens hovedbestandtdeler kan karakteriseres som lett nedbrytbare. Forholdet BOD/COD viste over 80% nedbrytning etter 5 døgn. Etter 28 døgns nedbrytning var >87% av organisk karbon omsatt. Det ble ikke registrert noen gifteffekter på alger ved konsentrasjoner opp til 40 mg/l etter 28 døgns nedbrytning. Høyere konsentrasjoner kunne ikke testes. Dette viser at den/de toksiske komponenten(e) i emulgatoren ikke er persistente.

Akutte toksiske effekter på fisk og alger ble funnet ned til ca. 3 mg/l. På grunn av stoffets nedbrytbarhet vil de viktigste miljøeffektene sannsynligvis være akutte toksiske effekter i utslippsområdet ved kortvarige utslipp og akutte og kroniske toksiske effekter ved kontinuerlige utslipp. Oppkonsentrering i miljøet av produktets hovedkomponenter kan ikke ventes.

Vedlegg:

1. Resultat av toksisitetstest med algen Skeletonema costatum
2. Resultat av toksisitetstest med rur (Balanus improvisus)
3. Resultat av toksisitetstest med stingsild (Gasterosteus aculeatus)
4. Resultat av nedbrytbarhetstest

VEDLEGG 1

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TOKSISITETSTEST MED ALGER

Testmetode: ISO/DP 10253: Water quality - Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*

Teststoff: Emulgatorkonsentrat II 4/7,89 (Norsk Hydro PR9-24601.01)

Test organisme: *Skeletonema costatum*, isolert fra Oslofjorden. Klon nr. BAC-1 i NIVAs kultursamling. Kulturen blir vedlikeholdt i semikontinuerlig kultur i naturlig sjøvann tilsatt 10% Z8 (Staub 1961).

Testdata:

Tidsrom for test: 3-5.7.89

Testkonsentrasjoner: 1, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 mg/l

Testmedium: Naturlig sjøvann (ytre Oslofjord 40 m)+ ISO vekstmedium

Testoppsett: 50 ml kulturer i 100 ml ståkolber inkubert på gyngbord. 3 parallelle kulturer for hver konsentrasjon og 6 kontrollkulturer.

Lys: 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fra Osram "hvit" lysstoffrør

Temperatur: 20 °C

pH i vekstmedium ved start: 8.0, ved slutt: 8.4

Biomassebestemming: Telling av celletall med Coulter Multisizer

Resultat:

Effekten på algenes vekst er beregnet etter to fremgangsmåter: dels som veksthastighet fra start til slutt (72 timer), dels som areal under vekstkurvene (et integrert mål på biomasseproduksjonen i løpet av 72 timer). Resultatene er plottet i konsentrasjons/responsdiagram. Ur dette kan EC_{50} -verdiene for veksthastighet og areal under vekstkurve beregnes.

"No effect concentration (NOEC)" er beregnet som den høyeste testede konsentrasjon hvor det ikke ble funnet signifikant avvik fra kontrollkulturene.

	EC_{50} (mg/l)	NOEC (mg/l)
Veksthastighet	4.1	3.2
Areal under vekstkurve	3.0	3.2 ¹

¹ For konsentrasjonene 1.8 og 1.0 mg/l var arealet under vekstkurven signifikant høyere enn kontrollen.

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TOKSISITETSTEST MED ALGER

Testmetode: ISO/DP 10253: Water quality - Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*

Teststoff: Emulgatorkonsentrat II 4/7,89 (Norsk Hydro PR9-24601.01) etter nedbrytbarhetstest (ISO/ DP9408)

Test organisme: *Skeletonema costatum*, isolert fra Oslofjorden. Klon nr. BAC-1 i NIVAs kultursamling. Kulturen blir vedlikeholdt i semikontinuerlig kultur i naturlig sjøvann tilsatt 10% Z8 (Staub 1961).

Testdata:

Tidsrom for test: 3-5.7.89

Testkonsentrasjoner: 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/l. (Opprinnelige konsentrasjoner før nedbrytning).

Testmedium: Naturlig sjøvann (ytre Oslofjord 40 m)+ ISO vekstmedium

Testoppsett: 50 ml kulturer i 100 ml ståkolber inkubert på gyngebord. 3 parallelle kulturer for hver konsentrasjon og 6 kontrollkulturer.

Lys: 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fra Osram "hvit" lysstoffrør

Temperatur: 20 °C

pH i vekstmedium ved start: 8.0, ved slutt: 8.4

Biomassebestemming: Telling av celletall med Coulter Multisizer

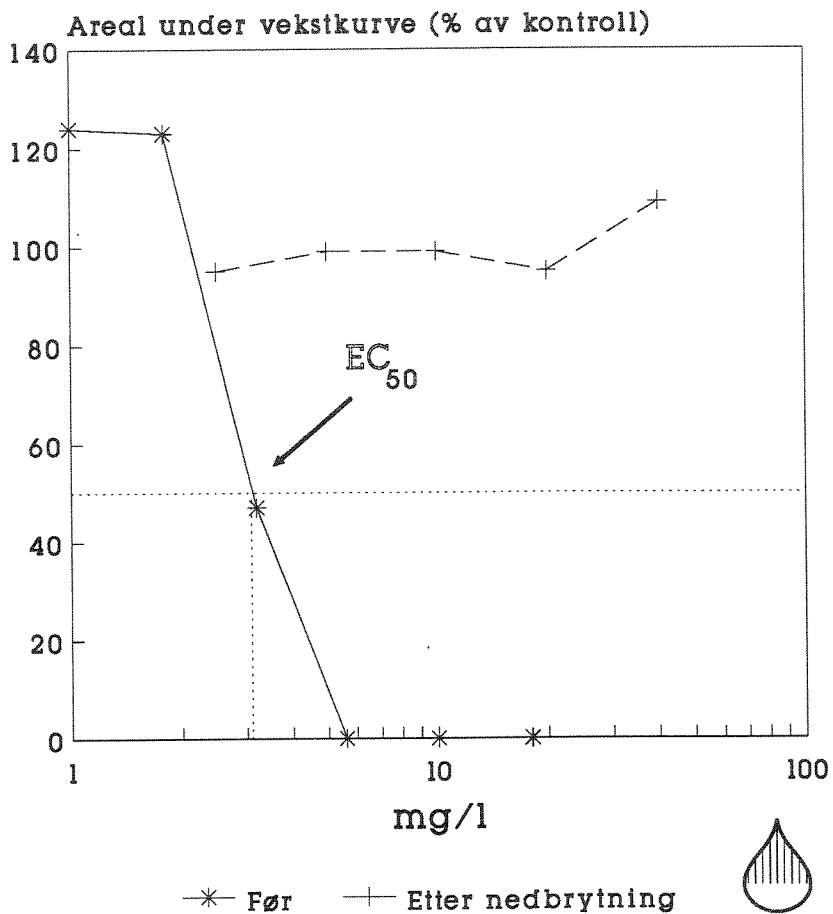
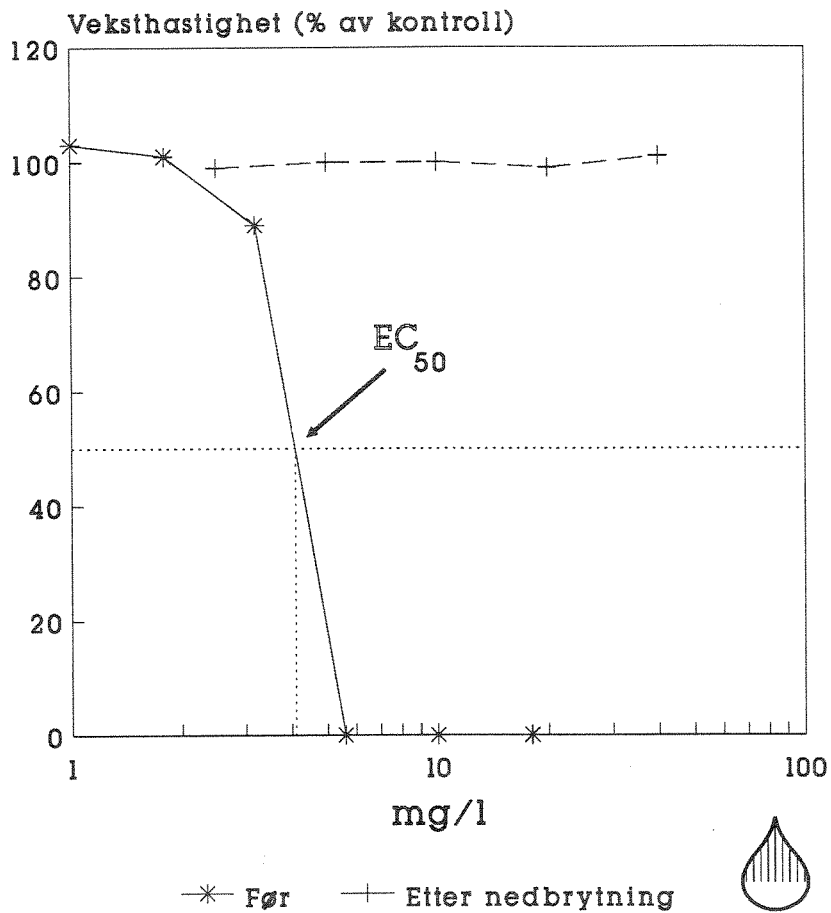
Resultat:

Effekten på algenes vekst er beregnet etter to fremgangsmåter; dels som veksthastighet fra start til slutt (72 timer), dels som areal under vekstkurvene (et integrert mål på biomasseproduksjonen i løpet av 72 timer). Resultatene er plottet i konsentrasjons/responsdiagram. Ur dette kan EC_{50} -verdiene for veksthastighet og areal under vekstkurve beregnes.

"No effect concentration (NOEC)" er beregnet som den høyeste testede konsentrasjon hvor det ikke ble funnet signifikant avvik fra kontrollkulturene.

	EC_{50} (mg/l)	NOEC (mg/l)
Veksthastighet	>40	>40
Areal under vekstkurve	>40	>40

Toksisitetstest med alger *Skeletonema costatum*



VEDLEGG 2

BALANUS TOX TEST SYSTEM

Henry Hovde

Laboratorium:
 Biologibygget, rom 4617
 Universitetet i Oslo
 Telefon: 45 513



Kontor og postadr.:
 Haugmannsveien 22
 0586 Oslo 5
 Telefon: 220467

BALANUS IMPROVISUS (RUR) - HEMMING AV BUNNSLÅING OG METAMORFOSE

1. PRINSIPP

Larver på cyprisstadiet suspenderes i naturlig sjøvann, og utviklingen av larvene følges i testprøver uten (kontroll) og med teststoff tilsatt i økende konsentrasjoner. Etter 10 døgn ved 22°C i kontinuerlig lys, registreres utviklingen av larvene i prøvene: antall larver som er bunnslått og utviklet til normale, voksne individer, samt antall av og tilstanden til de larver som ikke er bunnslått. Frekvens normalt utviklede larver i testprøvene beregnes som prosent av tilsvarende i kontrollprøvene. Konsentrasjonen for 50% hemming, EC₅₀-verdien, bestemmes med 95% konfidensintervall.

2. TESTORGANISME

Balanus improvisus DARWIN (Crustacea, Cirripedia) - skipsrur

B. improvisus er en vanlig forekommende marin og estuarin art i Vest-Europa og Atlantisk Nord-Amerika. Etter gyting/frigjøring fra foreldrenes "eggmasser" gjennomløper larvene seks planktoniske naupliestadier frem til de ikke spisende cyprider som etter noen tid bunnslår seg og metamorfoserer (forvandler seg) til den voksne, fastsittende form.

For herværende formål blir dyr vanligvis hentet fra Indre Oslofjord. I laboratoriet blir store antall (opp til 50.000) forsøksdyr (cypris) fremskaffet ved oppdrett av larver (klekket ut fra gytemodne fosterlameller utdissekert fra kjønnsmodne dyr) i fem liters begerglass gjennom de seks naupliestadier ved bruk av diatoméen Skeletonema costatum (GREVILLE) CLEVE som fôr. Optimal temperatur for oppdrett er 17-18°C, og passende medium er filtrert naturlig sjøvann med saltholdighet 33-34‰.

Når cyprisstadiet er nådd, kan bunnslåingen til de dyr ikke umiddelbart brukt i tester forhindres ved oppbevaring av dyrene mørkt og kaldt (÷1°C), og et stock reservoar av cypris kan på denne måte lagres som velegnede forsøksdyr gjennom flere måneder.

B	T
T	S

Minimumskrav for testing:

- Alder til cypris minimum 4 dager
- Tilstandskrav til cypris er at minst 90% av dyrene i kontrollforsøkene gjennomløper normal bunnslåing, metamorfosering, videre utvikling og fremdeles er aktive (cirrebevegelse) 3 uker etter igangsettelsen av et forsøk (uten foring underveis).

3. TESTLØSNING

Som testløsning benyttes naturlig sjøvann (pumpet opp fra 40 m dyp ved Drøbak for å sikre jevn kvalitet). Vannet sterilfiltres før bruk med Sartorius 0.2 μm biologisk inerte cellulose-nitrat membranfilter (SM 113 07). Foruten teststoffet selv foretas ingen ytterligere tilsetninger til testløsningen.

4. TESTUTSTYR

Testen kjøres stillestående, lukket og statisk i glassbeholder (fullstendig væskefylt, med siliconkork lukket prøveglass (dramsglass) nr 16 = 67 ml).

5. TESTBETINGELSER

Testen kjøres ved 22°C gjennom 10 døgn under kontinuerlig belysning (75 W glødetråd ca 1 m avstand).

6. PREPARERING AV TESTSTOFF

Teststoffet innveies i testløsningen, det hele rystes kraftig og får stå til likevektsinnstilling mørkt i 45 timer ved 10°C. Vann-ekstraktet sifoneres så av og filtreres gjennom dobbelt filteringspapir slik at hverken flytestoffer eller sedimentert stoff kommer med.

Testkonsentrasjonene velges fra en logaritmisk konsentrasjons-serie; eks. x 1.78 (100, 178, 317, 564 .. osv.), x 1.334 eller evt. x 1.155. Den utveide mengde teststoff gir beregnet og oppgitt konsentrasjon i ppm (vekt/vekt).

7. PREPARERING AV TESTPRØVER

Sifonert ekstrakt av hver utveid testporsjon tilsettes minimum 30 cyprider. Dyrene spiser ikke i cypridstadiet, og hele forsøket kjøres uten noen form for foring. Testkarene lukkes og

settes til inkubering. Det kjøres først en innledende test over et stort konsentrasjonsområde, deretter en endelig test med minimum 6 testkonsentrasjoner og minst 2 paralleller pr. testkonsentrasjon.

8. MÅLINGER

Etter 10 døgn telles antall normalt utviklede testorganismer i hver testprøve. Normal utvikling er fullstendig bunnslåing med fastsementering til bunnssubstratet, med tilhørende/påfølgende normal metamorfosering (forvandlig) til den voksne form, med normal utvikling og aktivitet. I tillegg registreres antall av og tilstanden til de individer som ikke har oppført seg normalt, f.eks. svømme/gå-aktiviteten til ikke bunnslåtte individer, bunnslåtte individer med unormal cirral aktivitet, og dødeligheten ved de forskjellige stadier under testtiden. Etter endt testtid måles pH i alle testprøvene.

9. BEREGNINGER

Frekvens individer med normal utvikling beregnes for hver testprøve som prosent av tilsvarende antall i kontrollprøver uten teststoff. Resultatene fra denne beregning brukes til beregning av testkonsentrasjonen for 50% hemming av responsparameteren, EC_{50} -verdien, med tilhørende 95% konfidensintervall.

10. SPESIELLE KONTROLLTESTER

Følsomhetskontroll

Testorganismens følsomhet kontrolleres ved å måle dens respons ovenfor en kontrollsubstans med kjent virkning. Middelerdien for EC_{50} -verdiene fra mange tester med kontrollsubstans er beregnet, og responsintervallet for denne middelerdi er bestemt. For hver ny serie av tester inkluderes en testprøve med et innhold av kontrollsubstansen lik den nevnte middelerdi. Gir denne testprøve respons innen det normale responsområdet, har testorganismen normal følsomhet. Hvis ikke, må hele testserien repeteres. Som kontrollsubstans benyttes 3,5-diklorfenol. Middelerdien for

EC₅₀ fra mange tester med dette stoff er funnet å være 2.61 mg/kg (7 tester med variasjonsområde 2.07-3.03 mg/kg). Denne testkonsentrasjon (middelverdien) er funnet å gi respons innen området 21-78% av normal bunnslåing og metamorfosering (dvs. av den funnet i de kontrollforsøkene som kjøres uten belastning).

pH-kontroll

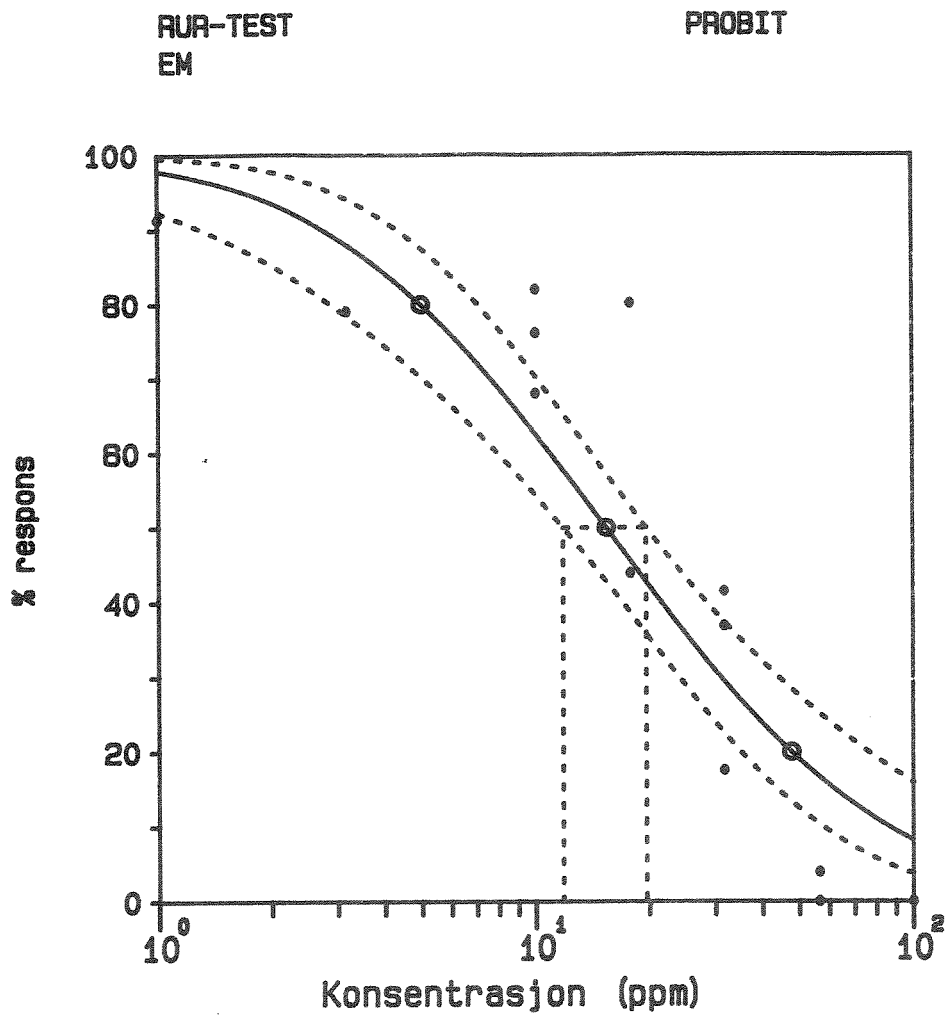
Viser det seg at noen av testløsningene har pH-verdi utenfor testorganismens toleranseområde, vurderes om resultatene fra disse testprøvene har betydning for fastleggelsen av EC₅₀-verdien. Er resultatene av betydning, gjentas testen med regulering av pH i de berørte testprøvene. Begge sett resultater tas i betraktning ved vurdering av resultatene.

11. RESULTATER

Resultatene fra prosessen bunnslåing og metamorfose rapporteres som EC₅₀-verdi med tilhørende 95% konfidensintervall. I tillegg illustreres resultatene i form av et konsentrasjons/respons diagram.

Observasjonsresultatene for individer med unormal utvikling gis som kommentarer.

Alle avvik fra den her beskrevne metode angis som kommentarer i rapporten.



Figur 1. Dose respons diagram for emulgator konsentrat testet på bunnslåing og metamorfose hos ruren Balanus improvisus.

VEDLEGG 3

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TOKSISITETSTEST MED FISK

Testmetode: Testen er utført i overensstemmelse med "OECD Guidelines for Testing of Chemicals" (No. 203 - Fish, acute toxicity test) og en noe modifisert Norsk Standard, NS 4717; "Bestemmelse av kjemiske produkters og avløpsvanns akutte toksisitet for saltvannsfisk".

Teststoff: Emulgator konsentrat II 4/7, 89.

Testorganisme: Som forsøksfisk ble benyttet trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) med middelvekt 0.5 gram, lengde 4.0 cm hentet i Oslofjorden (Bestumkilen) 14 dager tidligere og tilvendt forholdene i laboratoriet i 14 dager.

Utførelse: Forsøkene ble utført i glassakvarier med 10 l vann og 7 fisk i hver konsentrasjon av kjemikaliet som ble testet. Av testsubstansen ble laget en stamløsning i destillert vann (1000 mg/l) og doseringen foregikk fra denne. Vannet i akvariene ble skiftet hvert døgn (semistatisk metode) og forsøket pågikk i 4 døgn. Fisken ble observert minimum to ganger pr. døgn og døde fisk ble notert og fjernet. Det ble benyttet sjøvann fra ytre Oslofjord (Solbergstrand). Middelttemperaturen i vannet var 11.3 °C med høyeste verdi 13.1 (en observasjon) og laveste 10.9 (6 observasjoner).

Resultater: I tabell 1 er dødeligheten oppført for hver av de benyttede konsentrasjonene.

Tabell 1. Kummulativt antall (%) døde fisk etter forskjellig eksponeringstid (* = parallell).

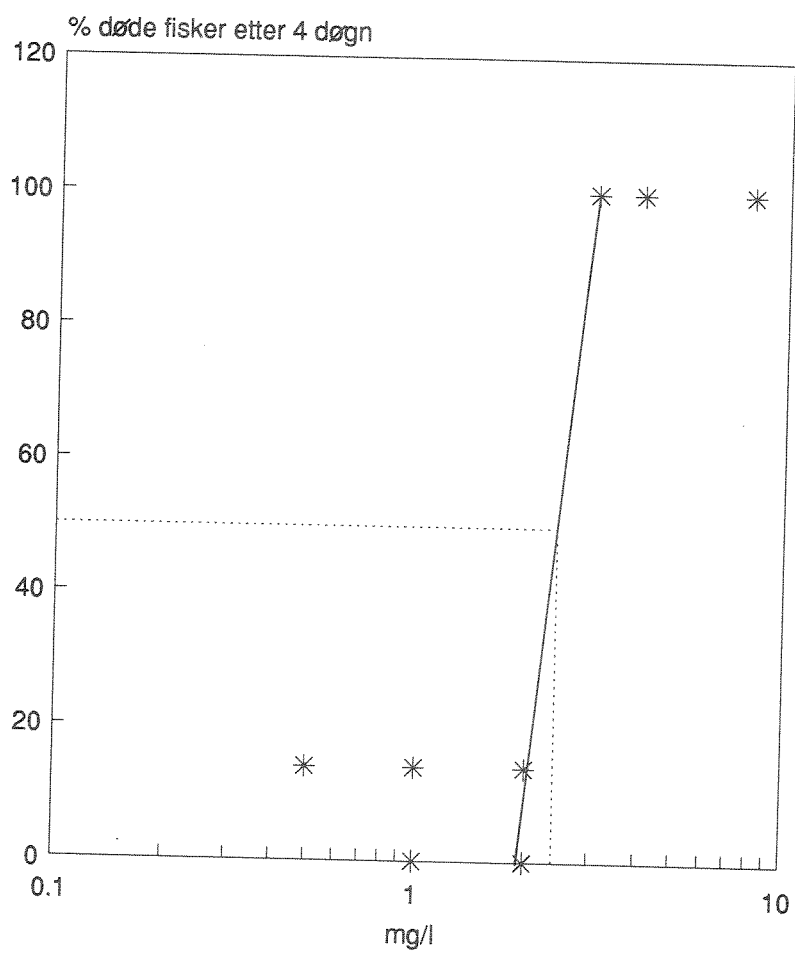
Test- substans mg/l	Eksponeringstid, timer				
	6	24	48	72	96
0			1 (14)	1 (14)	1 (14)
0*					1 (14)
0.5					
1.0				1 (14)	1 (14)
1.0*					
2.0				1 (14)	1 (14)
2.0*					
3.0		5 (71)	7 (100)		
4.0	6 (86)	7 (100)			
8.0	7 (100)				

Alle fiskene døde i løpet av 48 timer i 3 mg/l eller høyere konsentrasjoner av testsubstansen. I de lavere konsentrasjonene døde én eller ingen i løpet av 96 timer. En fisk døde i kontrollen (av 14 fisk) hvilket er akseptabelt. Det samme var tilfelle i konsentrasjoner t.o.m. 2 mg/l.

Resultatene er også fremstilt i figur 1, hvor 4d-LC₅₀ verdien (konsentrasjonen som dreper 50% av forsøksdyrene i løpet av 4 døgn) er avsatt. Denne kan fastsettes til 2.5 mg/l.

Emulgator konsentrat II 4/7,89

Virkning på trepigget stingsild



VEDLEGG 4

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

TESTRAPPORT: BIOOKSIDASJON AV ORGANISK STOFF I SJØVANN

TESTSTOFF: Emulgator konsentrat II

TESTBETINGELSER

TESTAPPARATUR: Manometrisk respirometer, WTW

NÆRINGSLØSNING: ISO/DP 9408 i sjøvannsmedium (49,5 mS/cm 25⁰ C).
Testløsn. A, 1 ml/L (11,6 mg P/L, og 1,3 mg N/L)

INOKULUM: Biologisk aktivslam dyrket på OECD syntetisk kloakkvann, og bakterieisolat fra aktivslam anlegg (kommunalt). Slammet ble sentrifugert og resuspendert (2 ganger) i saltløsning. Slamkonsentrasjon i testprøven: 29 mg/L STS

INCUBASJON: Temperatur; 20± 0.5⁰ C . Varighet: 28 dager.

REFERANSE-STOFF: Na-benzoat, 20 mg C/L Lag-fase: 0 døgn
 $\frac{BOD_n \times 100}{ThOD}$ % nedbrytning etter 7 døgn= 76 (krav >40)
 % nedbrytning etter 14 døgn= 85 (krav >60)

Preparering av prøven:

Stamløsning for preparering av testprøver: 100 mg/ 100 ml.

Konsentrasjon av teststoff i testløsningen: 20 mg/L.

Testprøven ble testet som duplikater, og middelveidier er presentert i oksidasjons-kurven.

RESULTATER:

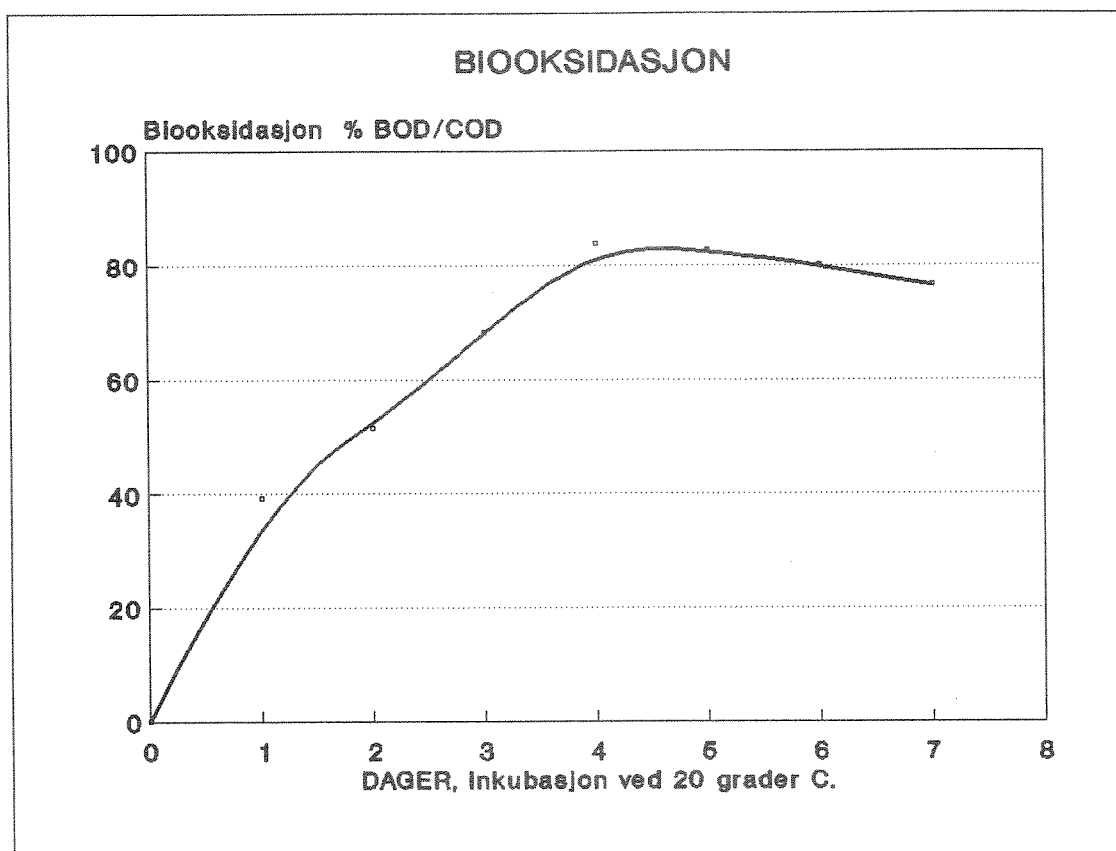
Kjemisk oksygenforbruk, COD: 1,1 mg/mg.

Nedbrytbarhet: $BOD_5/COD = 83 \%$
 $BOD_{14}/COD = \geq 83 \%$
 $BOD_{28}/COD = \geq 83 \%$

DOC i testløsning ved start: 3,9 mg/L % DOC reduksjon:
 DOC i testløsning etter 28 d: < 0,5 mg/L (3,4/3,9)100 = > 87
 Reduksjon: > 3,4 mg/L

Kommentarer:

Biooksidasjonskurven viser avtakende utvikling etter 5 døgn inkubasjon Dette forklares med at oksygenforbruket til beiteorganismene (ciliater og rotifers) som er tilstede i inokulum, innvirker på det totale oksygenforbruk. Denne BOD subtraheres fra under beregningen av BOD for selve teststoffet. Innvirkningen er relativt sett størst når teststoffet må testes ved lav konsentrasjon, for å unngå hemning pga giftvirkning. BOD-verdiene viser at stoffet nedbrytes raskt. Reduksjonen i DOC (dissolved organic carbon) er over 87 % etter 28 døgn inkubasjon.



Test-ansvarlig:
Harry Efraimsen

REFERANSE: 1. ISO/DIS 9408 Water Quality- Evaluation in a aqueous medium of the "ultimate" biodegradability of organic compounds. Method by determining the oxygen demand in closed respirometer.