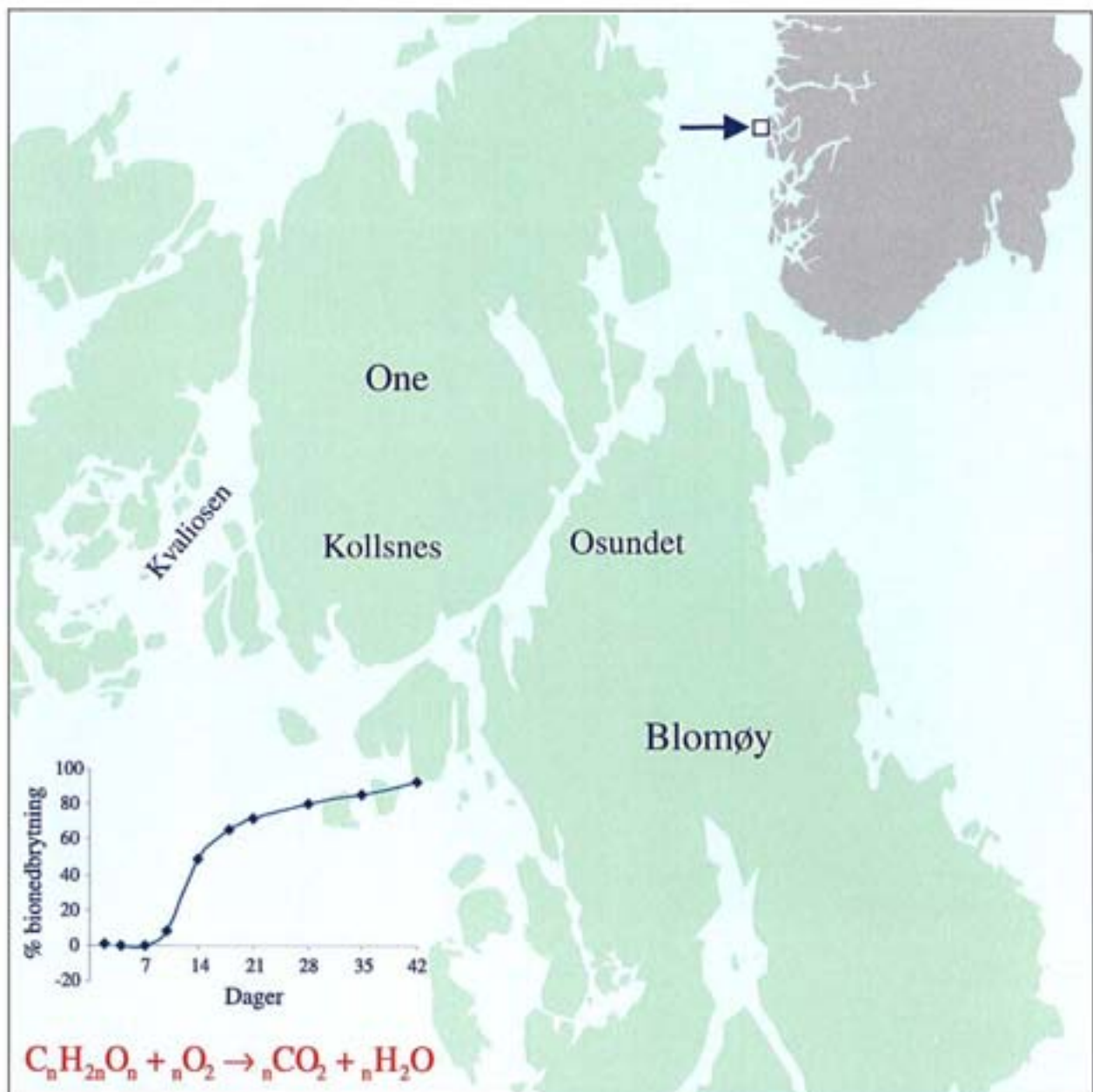


NIVA



RAPPORT LNR 4225-2000

Biologisk nedbrytning av Monoetylenglykol (MEG) og Metanol i sjøvann



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internet: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5008 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Akvaplan-niva

9296 Tromsø
Telefon (47) 77 75 03 00
Telefax (47) 77 75 03 01

Titel Nedbrytning av Monoetylglykol (MEG) og metanol i sjøvann	Løpenr. (for bestilling) 4225-2000	Dato 26. april 2000
	Prosjektnr. Undernr. 20025	Sider Pris 37
Forfatter(e) Harry Efraimsen Torsten Källqvist	Fagområde 37	Distribusjon
	Geografisk område Hordaland	Trykket NIVA


Oppdragsgiver(e) STATOIL Den norske stats oljeselskap a.s	Oppdragsreferanse 4500137021
---	---------------------------------

<p>Sammendrag</p> <p>Nedbrytning av monoetylglykol (MEG) og metanol i sjøvann er undersøkt under kontrollerte betingelser ved 5 og 15 °C. Formålet med undersøkelsen var å gi et grunnlag for vurdering av miljørisiko ved utslipp av avløpsvann til sjø fra Kollsnes gassanlegg. Sjøvann tatt fra influensområdet, Kvaliosen, ble benyttet i undersøkelsen. MEG ble raskt og fullstendig nedbrutt etter at en tilstrekkelig stor bakteriepopulasjon var etablert. I den aktive nedbrytningsfasen ble halveringstiden beregnet til 6 døgn ved 5 °C. Tilsvarende halveringstid ved 15 °C var 2,5 døgn. Metanol ble også raskt nedbrutt med halveringstid på henholdsvis 7 og 4 døgn ved 5 °C og 15 °C.</p>

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bionedbrytning i sjøvann 2. Nedbrytning av glykol 3. Nedbrytning av metanol 4. Utslipp til sjøvann 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Biodegradation in Seawater 2. Degradation of glycol 3. Degradation of methanol 4. Effluent to a Seawater recipient
---	---


Prosjektleder


Forskningsleder
ISBN 82-577-3847-6


Forskningssjef

O-20025

Biologisk nedbrytning

av

Monoetyleglykol (MEG) og Metanol

i sjøvann

Forord

Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA) fikk i februar 2000 i oppdrag av STATOIL å undersøke nedbrytningen av MEG og metanol i sjøvann ved henholdsvis 5 og 15°C. Formålet med undersøkelsen var å gi et grunnlag for vurdering av miljørisiko ved utslipp av avløpsvann til sjø fra Kollsnes gassanlegg, etter anbefaling i en tidligere undersøkelse. (Nygaard & Johnsen 1998).

Basert på data som er generert fra testene er det foretatt beregninger av nedbrytningskonstanter ved de aktuelle temperaturer for nedbrytning av stoffene.

Kontaktperson hos Statoil har vært Line Halsteinslid. Hun har vært ansvarlig for innhenting av sjøvann og forsendelse til NIVA, samt levert stoffene som er testet.

Oslo, 18. april 2000

Harry R. Efraimsen

Innhold

SAMMENDRAG.....	5
SUMMARY	6
METODE OG TESTBETINGELSER	7
RESULTATER OG DISKUSJON.....	7
MEG	7
METANOL.....	9
REFERANSER.....	10
1. VEDLEGG.....	11
BIOLOGISK NEDBRYTNING I SJØVANN AV MONOETYLENGLYKOL.....	11
2. VEDLEGG.....	25
BIOLOGISK NEDBRYTNING I SJØVANN AV METANOL	25

Sammendrag

Monoetylglykol (MEG) og metanol er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i sjøvann ved 5 °C og 15 °C. ISO/FDIS 14593, "Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels", ble benyttet ved denne undersøkelsen.

Resultatet viste at MEG ble raskt og fullstendig nedbrutt etter at en tilstrekkelig stor bakteriepopulasjon var etablert. Nedbrytningshastigheten for MEG ved 5 °C tilsvarer en halveringstid på 6 døgn under aktiv nedbrytningsfase. I laboratorietesten ble det registrert en lag-fase ved 5 °C på tilnærmet 28 døgn. I testen ved 15 °C ble det registrert en lag-fase på ca. 6 døgn, etterfulgt av en aktiv nedbrytningsfase, med en halveringstid på 2,5 døgn.

Metanol ble også raskt nedbrutt etter at en tilstrekkelig stor bakteriepopulasjon var etablert. Det ble registrert liten forskjell i lag-fase ved 5 og 15 °C. Halveringstiden ved 5 °C ble beregnet til 7 døgn og ved 15 °C til 4 døgn.

Summary

Biodegradation tests of Monoethylenglycol (MEG) and Methanol have been conducted in seawater at 5 °C og 15 °C in laboratory experiments. The method used was ISO/FDIS 14593; "Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels".

MEG was readily and completely degraded after a sufficient bacterial population was established. This happened after a 28 days lag-phase at 5 °C and approximately 6 days at 15 °C. During the most active degradation phase, the half-life of MEG was estimated at 6 days at 5 °C and 2,5 days at 15 °C.

Methanol was also readily degraded after a sufficient bacterial population was established. The lag-phase was approximately 6 days at both experimental temperatures. The half-life for methanol at 5 °C and 15 °C was calculated at 7 days and 4 days respectively.

Title: Biodegradation of Monoethylenglycol (MEG) og M ethanol i Seawater

Year: 2000-04-18

Author: Harry Efraimssen and Torsten Källqvist

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-3847-6

Metode og testbetingelser

Hensikten med denne undersøkelsen var å studere nedbrytningen av teststoffene i sjøvann med 5°C og 15°C under kontrollerte testbetingelser.

Det ble benyttet en internasjonalt anerkjent metode som er basert på måling av et sluttprodukt ved nedbrytningen, nemlig CO₂, analysert som uorganisk karbon.

Undersøkelsen ble utført i henhold til ISO/CD 16221 Water quality - Guidance for the determination of biodegradability in the marine environment, med følgende testmetode: ISO/FDIS 14593. Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

Utviklingen av CO₂ under nedbrytningen av teststoffene ble bestemt som uorganisk karbon (TIC). Testmediet ble laget i naturlig sjøvann, tilsatt mineralske saltløsninger for å øke bufferkapasiteten.

Sjøvannet ble tatt ute i Kvaliosen, ca 1-1,5 meter under overflaten, tirsdag 08.02 2000 av oppdragsgiver. Hensikten ved å benytte sjøvann fra influensområdet var å inkludere de naturlige mikroorganismer som var tilpasset miljøet. I tillegg ble sjøvann tatt fra Oslofjorden, utenfor Drøbak, også filtrert for oppsamling av mikroorganismer. Etter at partikler større enn 5 µm var fjernet fra anriket bakteriesuspensjon ble denne tilsatt for å sikre at det var tilstrekkelig antall levedyktige bakterier i testmediet.

Konsentrasjonen av teststoffene i testmediet, beregnet som karbon, var ca. 20 mg/l.

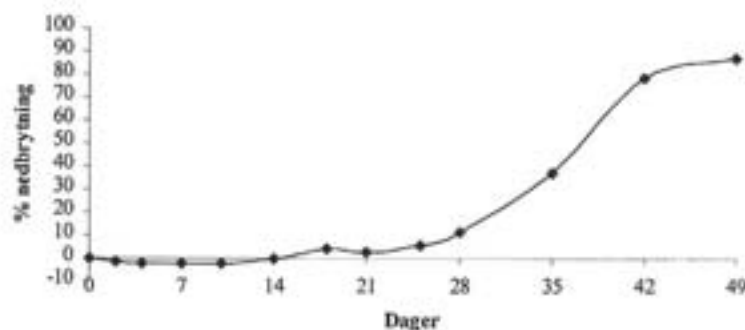
Under testperioden ble det tatt ut prøver til TIC analyser med tidsintervaller slik at nedbrytningsforløp og hastighet kunne beregnes.

Resultater og diskusjon

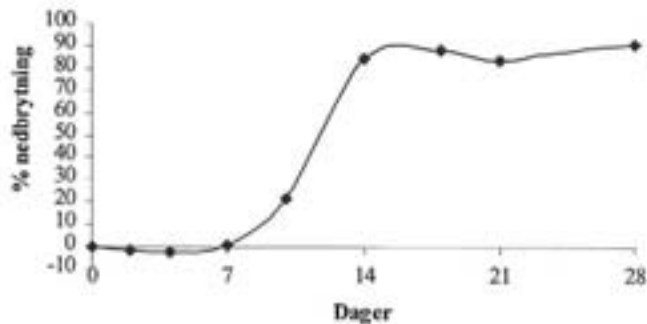
MEG

Resultatene fra undersøkelsen med MEG som teststoff er vist i vedlegg 1. Utviklingsforløpet ved de undersøkte temperaturer er vist i figur 1a og 1b.

Figur 1a) Bionedbrytning ved 5 °C



Figur 1b) Bionedbrytning ved 15 °C



For MEG ble det observert en lag-fase på nesten 28 døgn ved 5 °C. I løpet av de etterfølgende 14 døgn ble tilnærmet 80% av teststoffet omsatt til CO₂, og registrert som uorganisk karbon (TIC). Selv om nedbrytningen gikk vesentlig langsommere enn ved 15 °C, var 87 % nedbrutt etter 49 døgn.

Nedbrytningen av MEG gikk raskest ved 15 °C, hvor det etter en lag-fase på ca. 8 døgn ble registrert en rask nedbrytning som var stagnert på over 85 % etter 14 til 18 døgn. Etter 28 døgn var nedbrytningen 91 % (som TIC).

Ved å beregne nedbrytningsraten etter første-orden kinetikk, som antas å være dominerende under aerobe akvatiske miljøbetingelser, kan hastighetskonstanten (k_1) beregnes etter følgende ligning (Pedersen et al. 1999):

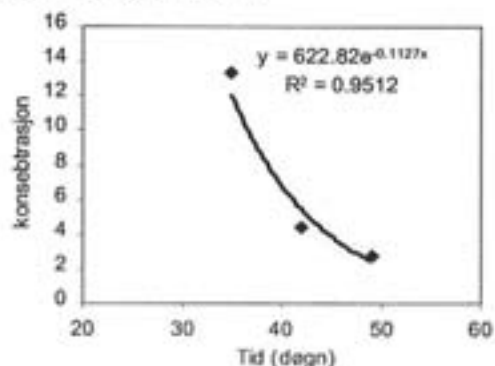
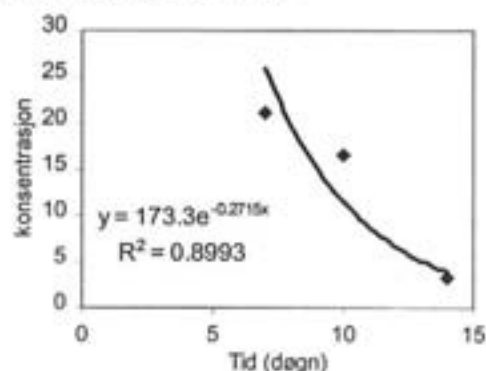
$$\ln S - \ln S_0 = -k_1 \cdot (t - t_0)$$

hvor S_0 er substratkonsentrasjonen ved tiden t_0 og S er substratkonsentrasjonen ved tidspunkt t . Halveringstiden kan beregnes som;

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1}$$

Det er stor variasjon i bakterietetthet i overflatevann og kan være i samme størrelsesorden som i tester for lett nedbrytbarhet. Struijs og van den Berg (1995) regnet med at hastighetskonstanten ved nedbrytning i overflatevann er likeverdig med konstanten i tester for lett nedbrytbarhet, (RBT); $k_{\text{vann}} = k_{\text{RBT}}$.

Beregningene av nedbrytningshastighet ble gjort ved eksponensiell regresjon av observasjonene i den mest aktive nedbrytningsfasen i hvert forsøk. Beregningene for MEG som er gjort for de to aktuelle temperaturer er vist i figur 2.

Figur 2a) k_{RBT} ved 5 °CFigur 2b) k_{RBT} ved 15 °C

Nedbrytningskonstanter og halveringstid funnet ved denne undersøkelsen blir:

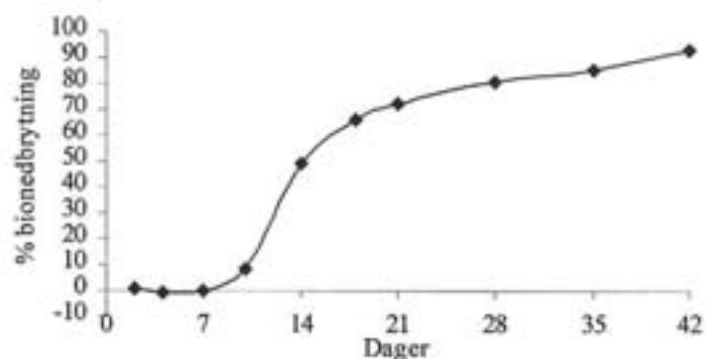
Test temperatur	Hastighetskonstant k_{vann} (pr. døgn)	Halveringstid (døgn)
Ved 5 °C	0,113	6
Ved 15 °C	0,272	2,5

De beregnede hastighetskonstanter viser at MEG nedbrytes omtrent dobbelt så raskt ved 15 °C som ved 5 °C.

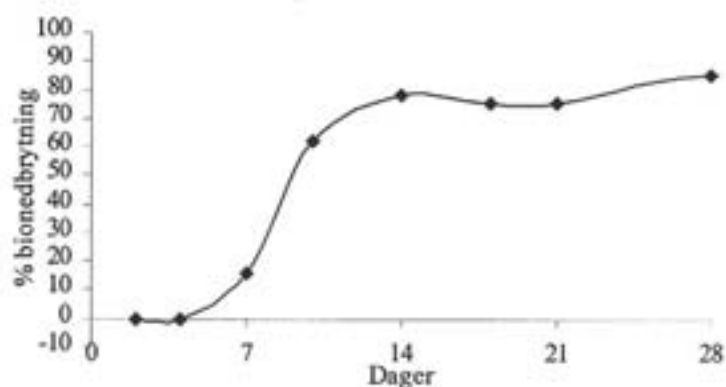
Metanol

Resultatene fra undersøkelsen med metanol som teststoff er vist i vedlegg 2. Utviklingsforløpet ved de undersøkte temperaturer er vist i figur 3a og 3b.

Figur 3a) Bionedbrytning ved 5 °C



Figur 3b) Bionedbrytning ved 15 °C



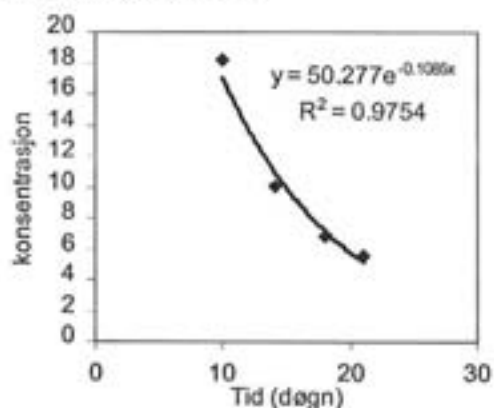
Det ble registrert relativt liten forskjell med hensyn til lengden på lag-fasen mellom de to temperaturnivåene. Ved 5 °C var den ca 10 døgn, mens den ved 15 °C var ca 6 døgn.

Nedbrytningen etter 14 døgn ved 5 °C var ca. 50% , og ca 80% etter 28 døgn. Registreringene frem til 42 døgn viste ytterligere nedbrytning til over 90 %.

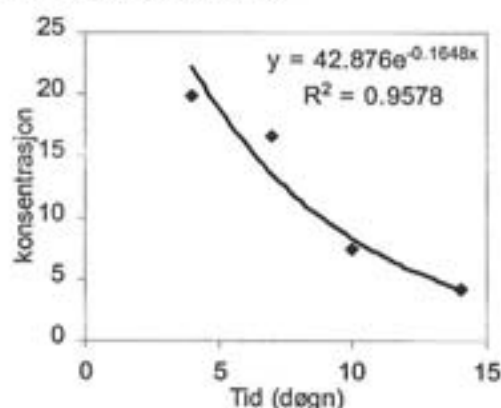
Nedbrytningen av metanol gikk noe raskere ved 15 °C, med kortere lag-fase, og deretter en rask nedbrytning som var stagnert ved ca 80 % etter 14 døgn. Ved 28 døgn ble det oppnådd en middelvei på 85 % for 6 replikater.

Beregning av hastighetskonstant for nedbrytningen av metanol ved de to aktuelle temperaturer er vist i figurene 4 a) og 4 b).

Figur 4a) k_{RBT} ved 5 °C



Figur 4b) k_{RBT} ved 15 °C



Nedbrytningskonstanter og halveringstid funnet ved denne undersøkelsen for metanol blir:

Test temperatur	Hastighetskonstant k_{vann} (pr. døgn)	Halveringstid (døgn)
Ved 5 °C	0,103	7
Ved 15 °C	0,165	4

Referanser

Federle T.W. et.al. (1997) Extrapolating mineralization rates from the ready CO₂ screening test to activated sludge, river water and soil. *Environ. Toxicology and Chemistry* **16**, 127-134.

Nygaard, E. og Johnsen, T.M. 1998: Vurdering av miljøeffekter etter akutt utslipp av ca. 2 tonn MEG til sjø fra Kollsnes gassanlegg. NIVA rapport lnr. 3788, 29 s.

Pedersen, F., Helweg, C. og Torben Madsen, Clausen, H. og Tyle, H. (1999) OECD harmonisation of classification criteria. Degradability 3rd DRAFT. Prepared by, VKI and Danish EPA. Aug. 1999.

Struijs J. and R. van den Berg (1995) Standardized biodegradability tests: Extrapolation to aerobic environments. *Wat. Res.* **29**(1), 255-262.

1. Vedlegg

Biologisk nedbrytning i sjøvann av Monoetylglykol (MEG)

Test rapport

Biologisk nedbrytning i sjøvann

av

**Monoetylenglykol
(MEG)**

NIVA STUDIE NR. B388/1

Etter metodene ISO/CD 16221 og ISO/FDIS 14593

Biologisk nedbrytning i sjøvann
av
**Monoetylenglykol
(MEG)**

NIVA STUDIE NR. B388/1

Dato for start: 14. februar 2000

Dato for avslutning: 18. april 2000

Oppdragsgivers adresse:

STATOIL
Troll gassanlegg Kollsnes
Postboks 7210
5020 Bergen
NORGE

Testing og rapportering utført av:

Harry Efraimsen
Norsk Institutt for Vannforskning
Postboks 173 Kjelsås
N-0411 OSLO

Telefon: (47) 22 18 51 00
Telefaks: (47) 22 18 52 00

Rapport utgitt 18.04.2000

GVP, i overensstemmelse med kvalitetskrav

Undertegnede bekrefter herved at denne testingen av bionedbrytbarhet er utført nøyaktig og i overensstemmelse med den anvendte metode. Data som er generert i undersøkelsen, og arbeidet som er utført er i henhold til EN 45000 og god vitenskapelig praksis (GVP).

Denne undersøkelsen er ikke utført i henhold til "Good Laboratory Practice Guideline".

Forskningsleder:



Torsten Källqvist
Forskningsleder, Økotoksikologi
Norsk Institutt for Vannforskning

Dato: 27.4.2000

Innhold

0. Innhold	3
1. Sammendrag	4
2. Innledning	4
3. Materiale og testbetingelser	4
3.1 Teststoff	4
3.2 Testbetingelser	5
3.2.1 Apparatur	5
3.2.2 Test medium	5
3.2.3 Inokulum	5
3.2.4 Preparering av testmedium	5
3.2.5 Preparering av inokulert sjøvannsmedium (blank)	6
3.2.6 Preparering av referanse medium	6
3.3 Inkubasjonsbetingelser	6
3.4 Uttak av testflasker for TIC analyse	6
3.5 TIC analyse	6
3.6 Løst organisk karbon (DOC)	7
3.7 Godkjent test	7
3.8 Beregning av analysedata	7
4. Resultater	8
4.1 Nedbrytning av MEG	8
4.2 DOC reduksjon	9
4.3 Nedbrytning av referansestoff	9
5. Referanser	10

0. Sammendrag

Monoetylenglykol (MEG) er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i sjøvann ved 5 °C og 15 °C. ISO/FDIS 14593, - "method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels", ble benyttet ved denne undersøkelsen.

Resultatet viste at MEG blir raskt og fullstendig nedbrutt når det er etablert tilstrekkelig stor bakteriepopulasjon. Lag-fasen var betydelig lengre ved 5 °C og nedbrytningen gikk noe langsommere. Etter en lag-fase på ca. 8 døgn ble MEG raskt nedbrutt ved 15 °C, hvor nedbrytningen stagnerte på over 85 % etter 14 til 18 døgn.

Det ble påvist en lag-fase på nesten 28 døgn ved 5 °C. Imidlertid ble tilnærmet 80% at teststoffet nedbrutt i løpet av de etterfølgende 14 døgn, 87% etter 49 døgn.

1. Innledning

Hensikten med denne undersøkelsen var å studere nedbrytningen av teststoffet i sjøvann med 5°C og 15°C under kontrollerte testbetingelser. Undersøkelsen ble utført i henhold til ISO/CD 16221 Water quality - Guidance for the determination of biodegradability in the marine environment, med følgende testmetode: ISO/FDIS 14593. Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

Utviklingen av CO₂ under nedbrytningen av teststoffet er anvendt som måleparameter i testen, og ble bestemt som uorganisk karbon (TIC). Testmediet ble laget i naturlig sjøvann, hentet fra det influerte området, tilsatt mineralske saltløsninger for å øke bufferkapasiteten i testmediet. De naturlige tilstedeværende mikroorganismene i sjøvann ble brukt som inokulum i testen.

Teststoffet, som eneste karbonkilde, ble tilsatt til ca. 20 mg/l karbon.

160 ml serumflasker (Weaton) ble fylt med 100 ml preparert testmedium og hermetisk lukket.

Utviklingen i nedbrytningen ble bestemt ved måling av netto økning i TIC over tid og korrigert for utviklingen i en blank (preparert sjøvannsmidiet uten teststoff). Generell inkubasjonstid er 28 dager, men forlenges opptil 60 døgn eller til stangnasjon i TIC er påvist med minst 2 påfølgende analyseserier. Bionedbrytningen blir uttrykt som prosent av teoretisk uorganisk karbon (ThIC) basert på mengde teststoff tilsatt i testmediet.

2. Materiale og testbetingelser

2.1 Teststoff

Identifikasjon	B388-1
Prøve merket	Monoetylenglykol. Merck 1.09621 p.a.
Renhet	> 99,5 %
Utseende	Klar væske
Dato mottatt	6. februar 2000
Lagringbetingelser	I mørke ved 2-4 °C

2.2 Testbetingelser

2.2.1 Apparat

Klare serumflasker, 160 ml	Fylt med 100 ml testmedium og lukket med septakork av butyl gummi, festet med aluminiumkapsel for forsegling av gassettestporsjon.
Sprøyte for gassuttak	Høy presisjon 0-1 ml med lukkeventil. (Dynatech)
Sprøyte for syre tilsetning	Standard 5 ml med 0,8x 40 mm mål.
Glassflasker	10 og 15 l
pH-meter	Orion 720
Filtreringststyr	Sartorius filterholder og membranfilter, med 0,45 µm poreåpning.
Produksjon av CO ₂ fri luft	Gassvaske flasker (500ml) med 1,0 M NaOH løsning som CO ₂ absorber.
Karbon analysator	Dohrmann DC 190 Tilsetning av 1 ml H ₃ PO ₄ /100 ml testmedium for frigivelse av CO ₂ .
Inkubatorer	2 stk Termaks KB 5410 inkubator innstilt ved 5 og 15 °C
Analysevekt	Sartorius 2001 MP2

2.2.2 Test medium

Oppdragsgiver var ansvarlig for prøvetakingen av sjøvann. Sjøvannet ble tatt ute i Kvaliosen, ca 1-1,5 meter under overflaten, tirsdag 08.02 2000. Etter mottak ved NIVA den 10.02. ble kannene oppbevart ved 15 °C i 3 døgn før vannet ble overført med hevert til glassbeholdere for å unngå sedimenterte partikler i vannet. pH ble justert til ca 6,5 med 1 M HCl før gjennomblåsing med CO₂-fri luft ble iverksatt over natten. Dette ble gjort for å senke bakgrunnnivået for oppløst CO₂ i testvannet. Etter avsluttet lufting ble surhetsgraden rejustert med 1M NaOH til pH 7,5. For å unngå utfelling i testmediet ble det tilsatt 5 ml av stamløsning a) (fosfat-bufferløsning) og 1 ml av stamløsning b) per liter testmedium. Nitrogen (som NH₄ Cl) ble tilsatt som beskrevet for metoden (1,3 mg/l N). Se vedlegg A.

2.2.3 Inokulum

Sjøvannet ble tatt fra lokaliteten for å inkludere de naturlige mikroorganismer som var tilpasset miljøet. En enkel bestemmelse ved utsåing på marin agarmedium (Difco 2216) viste lavt antall av levedyktige bakterier. 10 liter sjøvann fra Oslofjorden, tatt samme dag fra 20 m dyp utenfor NIVAs forsøksstasjon utenfor Drøbak, ble filtrert gjennom membranfiltere med 0,22 µm porestørrelse. Samlet materiale på filterne ble resuspendert opp i sjøvann og satt til kraftig risting i ca 10 minutter. Suspensjonen ble så filtrert ved bruk av et membranfilter med 5 µm porestørrelse. Dette ble gjort for å fjerne større partikkelaggregater. Av dette filtratet ble 3 ml/l tilsatt testmedium som et supplement for å øke innholdet av naturlige bakterier i sjøvannmediet. Lededyktige bakterier ved start ble dyrket på Bacto Marine Agar 2216 og antall bestemt til $5,3 \cdot 10^4$ per ml testmedium.

2.2.4 Preparering av testmedium

Til et totalvolum på 7 liter ble det tilsatt 386 mg teststoff og 21 ml supplement inokulum. Etter god blanding av (kontinuerlig omrøring på magnet rørverk) ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 60 serumflasker. 10 flasker ble tilsatt inhibitor og anvendt som fysisk/kjemisk kontroll ved de valgte temperaturer. Flaskene ble umiddelbart forseglet. Halve antallet av flaskene ble inkubert ved henholdsvis 5 og 15 °C.

2.2.5 Preparering av inokuler t sjøvannsmedium (blank)

Til et totalvolum på 5 liter ble det tilsatt 15 ml supplement inokulum. Etter god blanding (kontinuerlig omrøring på magnet rørverk) ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 60 serumflasker. Halve antallet av flaskene ble inkubert ved henholdsvis 5 og 15 °C.

5 flasker ble tilsatt inhibitor og analysert for TIC og benyttet som bakgrunnskonsentrasjon ved start. Flaskene ble umiddelbart forseglet.

2.2.6 Preparering av referans e medium

Natriumbenzoat ($C_7H_5O_2Na$), MW =144,1, ble preparert til en stamløsning på 400 mg/100 ml destillert vann.

Til et totalvolum på 2 liter testmedium ble det tilsatt 20 ml referanse stamløsning og 6 ml supplement inokulum. Etter god blanding av ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 20 serumflasker. Flaskene ble umiddelbart forseglet. 12 flasker ble inkubert ved 15 °C fordi denne temperatur ble ansett som mest egnet som gyldighetskontroll for testen. 8 flasker ble inkubert ved 5 °C for å registrere utviklingen av TIC ved lavest testtemperatur.

2.3 Inkubasjonsbetingels er

Testflaskene ble plassert liggene i plastkasser. Flaskene ble manuelt ristet to ganger hver arbeidsdag og en gang per dag lørdag og søndag til og med 21 inkubasjonsdag. I etterfølgende tidsperiode ble det foretatt en manuell risting per dag. Dette ble gjort for å bedre oksygendiffusjonen til væskefasen. For temperaturvalg; 5 °C varierte temperaturen mellom 4,5 til 5,9 °C under inkubasjonsperioden. For temperaturvalg; 15 °C varierte temperaturen mellom 14,8 til 15,4 °C under inkubasjonsperioden. Det ble påvist et kort temperaturavvik ved begge inkubatorene pga strømbrudd. Det ble vurdert til ikke å ha påvirket nedbrytningsforløpet av teststoffene i påviselig grad.

pH i alle ferdig preparert testmedier var 7,5 ved start. Ved endt inkubasjon ble det observert en reduksjon til pH 6,5 ved begge testtemperaturer. I blank flaskene var pH 7,0. Dette er forårsaket av utviklingen av CO_2 som har ført til senking av pH. Det er ikke grunn til å anta at dette har påvirket nedbrytningen.

2.4 Uttak av testflasker for TIC analyse

Ved hvert prøveuttak under inkubasjonstiden ble testflasker (antall fremgår av tabellene 2 og 3) tilsatt 1 ml konsentrert fosforsyre gjennom seprum ved sprøyte. De flaskene som ikke ble analysert samme dag, ble oppbevart ved 2-4 °C, inntil rasjonell analyse ble utført. Alle flasker ble temperert i vannbad til 20°C og satt på ristemaskin, med frekvens 140 sykluser per min. i minst en time. Denne behandlingen ble utført for å oppnå likevekt av CO_2 mellom gass- og væskefase.

2.5 TIC analyse

TIC analyser ble utført på Dohrmann DC 190 instrument. Én ml CO_2 -holdig gass ble tatt fra hver enkelt testflaske og injisert. Ved hver analysering ble det preparert kontrolløsninger som dekket det aktuelle konsentrasjonsområdet. En stamløsning av Na_2CO_3 (Merck nr. 6392), på 200 mg IC/l ble fortynnet i TIC-fritt avionisert vann til konsentrasjonsserier fra 1 til 40 mg TIC per l. Disse standardløsningene ble fylt i serumflasker og forseglet, tilsatt fosforsyre og behandlet likt med testflaskene.

Korrelasjonslikning fra standardkurve ble anvendt for beregning av TIC konsentrasjon i hver enkelt testflaske.

2.6 Løst organisk karbon (DOC)

Som en tilleggsinformasjon ble løst organisk karbon (DOC) i sjøvann ved start og i testmediene ved angitt slutt, analysert med Dohrmann DC 190. (Forbrenning ved 680 °C, med platina som katalysator, TC/TOC analyser).

Det anvendte testmedium ble filtrert gjennom membranfilter (0,45 µm) ved start og ved slutt. Prøvene ble konserverte med 4 M H₂SO₄, 1 ml/100 ml prøve, og lagret ved 2-4 °C før analyse.

2.7 Godkjent test

Den prosentvise bionedbrytningen av referankestoffet skal være minst 60 % etter 14 døgn ved 20 til 25 °C. I denne testen hvor det er benyttet en lavere temperatur, 15 °C, kan det aksepteres noe lavere nedbrytningsgrad.

2.8 Beregning av analyse data

Ved 100 % nedbrytning av teststoffet er teoretisk mengde uorganisk karbon (ThIC) lik mengde total organisk karbon tilsatt gjennom teststoffet ved start av testen. ThIC = TOC.

Total TIC i testflasken blir: TIC = (mg C i væskefasen + mg C i gassfasen).

$$\text{eller TIC} = (V_L \cdot C_L) + (V_H \cdot C_H)$$

hvor

- V_L er volum i liter av væske i testflasken
- C_L er konsentrasjon av TIC i væskefasen (mg C/l)
- V_H er volum i liter i gassfasen
- C_H er konsentrasjon av TIC i gassfasen (mg C/l).

Ved surgjøring til pH < 3 etableres det en likevekt i konsentrasjon av TIC i gass og væskefase. Det er derfor tilstrekkelig å analysere i gassfasen fordi; C_L = C_H.

Beregning av prosentlig bionedbrytning D_t ved hvert trinn blir:

$$D_t = \frac{\text{TIC}_t - \text{TIC}_b}{\text{TOC}_i} \times 100$$

Hvor

- TIC_t er TIC i mg i testflasken ved tid t;
- TIC_b er middel TIC i mg i blank flaskene ved tid t;
- TOC_i er TOC i mg tilsatt ved start i testflaskene.

Nedbrytningen av referankestoffet er beregnet på tilsvarende måte.

Beregningen av middelverdier for utviklingen av TIC under inkubasjonen er utført i Microsoft EXCEL som vist i tabell 2.

Statistisk beregning av 95 % konfidensintervall er utført ved bruk av Microsoft Excel Descriptive Statistics.

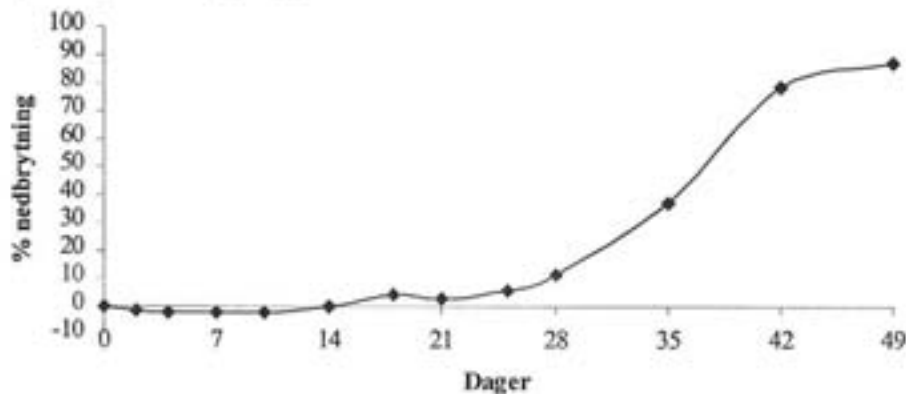
3. Resultater

3.1 Nedbrytning av MEG

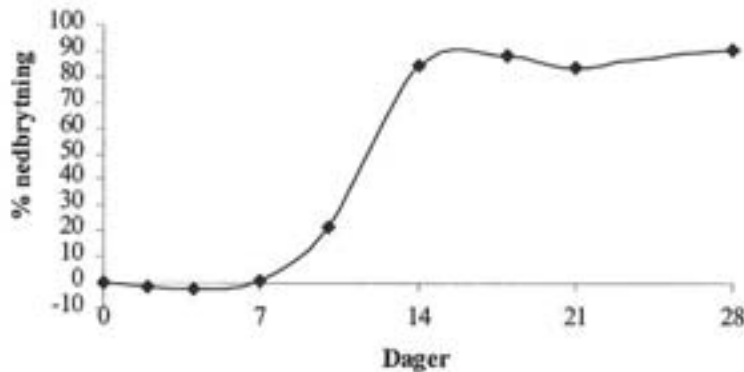
Den samlede oversikten over testresultatene og generert data er vist i tabellene 2 og 3.

Figur 1, viser utviklingen i nedbrytningen av teststoffet ved a) 5 °C og b) ved 15 °C.

Figur 1 a) Bionedbrytning ved 5 °C



Figur 1 b) Bionedbrytning ved 15 °C



Nedbrytningen av MEG gikk raskest ved 15 °C, hvor det etter en lag-fase på ca. 8 døgn foregikk en rask nedbrytning som var stagnert på over 85 % etter 14 til 18 døgn. Etter 28 døgn ble det oppnådd en middelvei på 91 % for 6 replikater, med 95 % konfidensintervall på 1,8 % enheter.

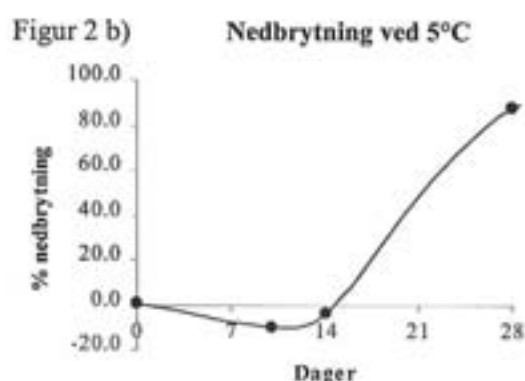
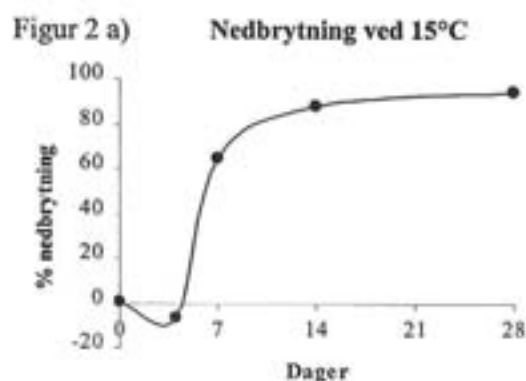
Nedbrytningen av MEG utviklet seg langsomt ved 5 °C og viste en lag-fase på nesten 28 døgn. I løpet at de etterfølgende 14 døgn ble tilnærmet 80% at teststoffet nedbrutt. Selv om nedbrytningen gikk vesentlig langsommere enn ved 15 °C, var 87% nedbrutt etter 49 døgn. 6 replikater analysert ved endt inkubasjon viste tilfredsstillende variasjon, med avvik som resulterte i et 95 % konfidensintervall på 5,4 % enheter.

3.2 DOC reduksjon

Resultatene viser en DOC-reduksjon på 94 % ved 15 °C etter 28 døgns inkubasjon. Dette samsvarer godt med resultatet fra målingene gjort med TIC som parameter. Også ved 5 °C, hvor analysene ble tatt etter 49 døgns (stagnert nedbrytning) viste resultatene god overensstemmelse. Vanligvis vil DOC reduksjon være noe høyere enn TIC, fordi organisk karbon vil være bundet i dannet biomasse.

3.3 Nedbrytning av referansestoff

Figur 2, a) og b) viser nedbrytningen av natriumbensoat ved 15 og ved 5 °C. Det er resultatet ved 15 °C som tillegges størst vekt som kriterium for godkjent gjennomføring av testen.



Ved inkubasjonstemperatur på 15 °C ble det oppnådd minst 60 % nedbrytning allerede etter 7 døgns, mens det ved 5°C ble avslørt en lag-fase på minst 14 døgns før nedbrytningen kom igang. Dette viser at vannetemperatur har stor betydning for tilvekst av bakteriepopulasjonen, slik at omsetningen kommer igang.

4. Referanser

1. ISO/CD 16221 Water quality - Guidance for the determination of biodegradability in the marine environment.
2. ISO/FDIS 14593 Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.
3. NS-ISO 8245 Retningslinjer for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) Første utgave 1991.

Tabell 1.

Løst organisk karbon i testmediet ved start og endt forsøk, og beregnet reduksjon.

B388-1 5°C

Medium	Startverdi	49 døgn
Inokulum (Fl. 26)	1.1	1.6
Teststoff. (Fl. 80)	22.3	3.5
Korrigert (Sv.-Mv.)	21.20	1.90
DOC-reduksjon etter 49 døgn nedbrytning (%)		91

B388-1 15°C

Medium	Startverdi	49 døgn
Inokulum (Fl. 47)	1.1	2.4
Teststoff. (Fl. 107)	22.3	3.6
Korrigert (Sv.-Mv.)	21.20	1.20
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)		94

Tabell 2. Generert TIC data og beregning av bionedbryrbarhet for teststoffet og referansestoff ved 5 °C.

Medium	Dager	0	2	4	7	10	14	18	21	25	28	35	42	49
Blank (sløvann)	Fl.nr:	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L
	1	12.47	16.89	17.19	17.45	17.71	17.58	16.65	17.13	17.20	17.24	17.47	17.78	17.79
	til	12.52	17.22	17.49		18.34					17.88	17.52	17.52	17.72
		12.39				17.35					17.96		17.49	18.87
	50													18.59
	snitt	12.5	17.1	17.3	17.4	17.7	17.8	16.7	17.1	17.2	17.7	17.5	17.6	18.3
Produkt B-374-2	51	12.47	16.79	16.91	17.05	17.29	17.54	17.51	17.57	18.92	20.14	24.06	34.91	36.44
	til	12.52	16.86	16.94		17.98			17.84	17.97	19.50	26.59	33.83	37.19
		12.39				17.90					19.91		34.10	38.76
											20.61			36.06
	80													35.62
	snitt	12.5	16.8	16.9	17.1	17.3	17.8	17.5	17.7	18.4	20.0	25.3	34.3	36.8
BL korreksjon		0.0	-0.2	-0.4	-0.4	-0.4	0.0	0.9	0.6	1.2	2.3	7.8	16.7	18.5
Biodeg. %		0	-1	-2	-2	-2	0	4	3	6	11	37	79	87

Dager	0	10	14	28	49
Referanse Na-benzoat	12.5	12.55	13.8	31.01	35.98
IC i sjøvann korr.	12.5	12.6	13.8	31.0	36.0
BL korreksjon	0.0	-2.1	-0.9	16.4	20.8
Biodeg. %	0.2	-9.7	-4.0	77.4	97.9

Tabell Tabell 3. Generert TIC data og beregning av bionedbrytbarhet for teststoffet og referansestoff ved 15 °C.

Medium	Dager	0	2	4	7	10	14	18	21	28	49
Blank (sjøvann)	FLnr:	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L
	27	12.47	16.89	17.19	17.45	17.71	17.58	16.65	17.13	17.24	17.79
	til	12.52	17.22	17.49			18.34			17.88	17.72
		12.39					17.35			17.96	18.87
	50										18.59
	snitt	12.5	17.1	17.3	17.4	17.7	17.8	16.7	17.1	17.7	18.3
Produkt B 374-2	86	12.47	16.89	16.80	17.65	21.94	35.67	36.51	34.50	37.25	38.78
	til	12.52	16.63	17.04		22.78	35.51	34.22	35.23	37.37	39.40
		12.39					35.76		34.72	36.84	38.50
										36.49	37.57
	113									36.90	38.72
	snitt	12.5	16.8	16.9	17.7	22.4	35.6	35.4	34.8	36.9	38.6
Bl.korreksjon		0.0	-0.3	-0.4	0.2	4.7	17.9	18.7	17.7	19.2	20.3
Biodeg. %		0	-1	-2	1	22	84	88	83	91	96

Referanse	Dager	0	4	7	14	28
Na-benzoat		12.53	12.89	27.76	32.73	34.69
	snitt		12.81	28.1	34.52	34.25
IC i sjøvann		12.5	12.8	27.9	33.2	34.5
	snitt		12.8	27.9	33.2	34.5
Bl. korreksjon		0.1	-1.4	13.6	18.6	19.9
	snitt		-1.4	13.6	18.6	19.9
Biodeg. %		0	-7	68	93	99

Vedlegg A.

Stamløsninger tilsatt sjøvann

- Løsning a)**
- | | |
|---|-----------|
| Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4), | 8,5 g/l |
| Dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4) | 21,75 g/l |
| Dinatriumhydrogenfosfat heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 33,4 g/l |
| (Alternativt dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 22,2 g/l) | |
| Ammoniumklorid (NH_4Cl) | 0,5g/l |
- Løs kjemikaliene i destillert vann i en målekolbe og fyll til 1000 ml
- Løsning b)** Løs 0.25 g jern(III)klorid heksahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) i ca. 700 ml vann, tilsettes et par dråper konsentrert svovelsyre for å forhindre utfelling, og fyll til 1000 ml.

For hver liter sjøvann tilsett normalt 10 ml av løsning a) og en ml av løsning b).
NB! Den relativt høye tilsetningen av fosfater fra løsning b) gir lett utfelling i sjøvann med salinitet på 33‰ og høyere. Redusert tilsetning av a) kan være nødvendig.

2. Vedlegg

Biologisk nedbrytning i sjøvann av Metanol

Test rapport

Biologisk nedbrytning i sjøvann

av

Metanol

NIVA STUDIE NR. B388/2

Etter metodene ISO/CD 16221 og ISO/FDIS 14593

Biologisk nedbrytning i sjøvann
av
Metanol

NIVA STUDIE NR. B388/2

Dato for start: 14. februar 2000

Dato for avslutning: 18. april 2000

Oppdragsgivers adresse:

STATOIL
Troll gassanlegg Kollsnes
Postboks 7210
5020 Bergen
NORGE

Testing og rapportering utført av:

Harry Efraimsen
Norsk Institutt for Vannforskning
Postboks 173 Kjelsås
N-0411 OSLO

Telefon: (47) 22 18 51 00
Telefaks: (47) 22 18 52 00

Rapport utgitt 18.04.2000

GVP, i overensstemmelse med kvalitetskrav

Undertegnede bekrefter herved at denne testingen av bionedbrytbarhet er utført nøyaktig og i overensstemmelse med den anvendte metode. Data som er generert i undersøkelsen, og arbeidet som er utført er i henhold til EN 45000 og god vitenskapelig praksis (GVP).

Denne undersøkelsen er ikke utført i henhold til "Good Laboratory Practice Guideline".

Forskningsleder:



Torsten Källqvist
Forskningsleder, Økotoksikologi
Norsk Institutt for Vannforskning

Dato: 27.4.2000

0. Innhold

0. Innhold	3
1. Sammendrag	4
2. Innledning	4
3. Materiale og testbetingelser	4
3.1 Teststoff	4
3.2 Testbetingelser	5
3.2.1 Apparatur	5
3.2.2 Test medium	5
3.2.3 Inokulum	5
3.2.4 Preparering av testmedium	5
3.2.5 Preparering av inokulert sjøvannsmiddel (blank)	6
3.2.6 Preparering av referanse medium	6
3.3 Inkubasjonsbetingelser	6
3.4 Uttak av testflasker for TIC analyse	6
3.5 TIC analyse	6
3.6 Løst organisk karbon (DOC)	7
3.7 Godkjent test	7
3.8 Beregning av analysedata	7
4. Resultater	8
4.1 Nedbrytning av metanol	8
4.2 DOC reduksjon	9
4.3 Nedbrytning av referansstoff	9
5. Referanser	10

1. Sammendrag

Metanol er testet med hensyn til biologisk nedbrytning i sjøvann ved 5 °C og 15 °C. ISO/FDIS 14593, - "method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels", ble benyttet ved denne undersøkelsen.

Resultatet viste at metanol blir raskt og fullstendig nedbrutt når det er etablert tilstrekkelig stor bakteriepopulasjon. Lag-fasen er noe lengre ved 5 °C, og nedbrytningen gikk noe langsommere enn ved 15 °C. Det ble registrert ca. 50 % nedbrytning etter 14 døgn og 80% etter 28 døgn.

Etter en lag-fase på ca. 6 døgn ble teststoffet rask nedbrutt og stagnerte på 80 % reduksjon etter 14 døgn ved 15 °C.

2. Innledning

Hensikten med denne undersøkelsen var å studere nedbrytningen av teststoffet i sjøvann med 5°C og 15°C under kontrollerte testbetingelser. Undersøkelsen ble utført i henhold til ISO/CD 16221 Water quality - Guidance for the determination of biodegradability in the marine environment, med følgende testmetode: ISO/FDIS 14593. Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

Utviklingen av CO₂ under nedbrytningen av teststoffet er anvendt som måleparameter i testen, og ble bestemt som uorganisk karbon (TIC). Testmediet ble laget i naturlig sjøvann, hentet fra det influerte området, tilsatt mineralske saltløsninger for å øke bufferkapasiteten i testmediet. De naturlig tilstedeværende mikroorganismene i sjøvann ble brukt som inokulum i testen.

Teststoffet, som eneste karbonkilde, ble tilsatt til ca. 20 mg/l karbon.

160 ml serumflasker (Weaton) ble fylt med 100 ml preparert testmedium og hermetisk lukket.

Utviklingen i nedbrytningen ble bestemt ved måling av netto økning i TIC over tid og korrigert for utviklingen i en blank (preparert sjøvannsmidiet uten teststoff). Generell inkubasjonstid er 28 dager, men forlenges opptil 60 døgn eller til stangnasjon i TIC er påvist med minst 2 påfølgende analyseserier. Bionedbrytningen blir uttrykt som prosent av teoretisk uorganisk karbon (ThIC) basert på mengde teststoff tilsatt i testmediet.

3. Materiale og testbetingelser

3.1 Teststoff

Identifikasjon	B388-2
Prøve merket	Metanol p.a.
Renhet	> 99,5 %
Utseende	Klar væske
Dato mottatt	6. februar 2000
Lagringbetingelser	I mørke ved 2-4 °C

3.2 Testbetingelser

3.2.1 Apparat

Klare serumflasker, 160 ml	Fylt med 100 ml testmedium og lukket med septakork av butyl gummi, festet med aluminiumkapsel for forsegling av gasstett testporsjon.
Sprøyte for gassuttak	Høy presisjon 0-1 ml med lukkeventil. (Dynatech)
Sprøyte for syre tilsetning	Standard 5 ml med 0,8x 40 mm mål.
Glassflasker	10 og 15 l
pH-meter	Orion 720
Filtreringutstyr	Sartorius filterholder og membranfilter, med 0,45 µm poreåpning.
Produksjon av CO ₂ fri luft	Gassvaske flasker (500ml) med 1,0 M NaOH løsning som CO ₂ absorber.
Karbon analysator	Dohrmann DC 190 Tilsetning av 1 ml H ₃ PO ₄ /100 ml testmedium for frigivelse av CO ₂ .
Inkubatorer	2 stk Termaks KB 5410 inkubator innstilt ved 5 og 15 °C
Analysevekt	Sartorius 2001 MP2

3.2.2 Test medium

Oppdragsgiver var ansvarlig for prøvetakingen av sjøvann. Sjøvannet ble tatt ute i Kvaliosen, ca 1-1,5 meter under overflaten, tirsdag 08.02 2000. Etter mottak ved NIVA den 10.02. ble kannene oppbevart ved 15 °C i 3 døgn før vannet ble overført med hevert til glassbeholdere for å unngå sedimenterte partikler i vannet. pH ble justert til ca 6,5 med 1 M HCl før gjennomblåsing med CO₂-fri luft ble iverksatt over natten. Dette ble gjort for å senke bakgrunnnivået for oppløst CO₂ i testvannet. Etter avsluttet lufting ble surhetsgraden rejustert med 1M NaOH til pH 7,5. For å unngå utfelling i testmediet ble det tilsatt 5 ml av stamløsning a) (fosfat-bufferløsning) og 1 ml av stamløsning b) per liter testmedium. Nitrogen (som NH₄ Cl) ble tilsatt som beskrevet for metoden (1,3 mg/l N). Se vedlegg A.

3.2.3 Inokulum

Sjøvannet ble tatt fra lokaliteten for å inkludere de naturlige mikroorganismer som var tilpasset miljøet. En enkel bestemmelse ved utsåing på marin agarmedium (Difco 2216) viste lavt antall av levedyktige bakterier. 10 liter sjøvann fra Oslofjorden, tatt samme dag fra 20 m dyp utenfor NIVAs forsøksstasjon utenfor Drøbak, ble filtrert gjennom membranfiltere med 0,22 µm porestørrelse. Samlet materiale på filtrene ble resuspendert opp i sjøvann og satt til kraftig risting i ca 10 minutter. Suspensjonen ble så filtrert ved bruk av et membranfilter med 5 µm porestørrelse. Dette ble gjort for å fjerne større partikkelaggregater. Av dette filtratet ble 3 ml/l tilsatt testmedium som et supplement for å øke innholdet av naturlige bakterier i sjøvannmediet. Lededyktige bakterier ved start ble dyrket på Bacto Marine Agar 2216 og antall bestemt til $5,3 \cdot 10^4$ per ml testmedium.

3.2.4 Preparering av testmedium

Til et totalvolum på 7 liter ble det tilsatt 372 mg teststoff og 21 ml supplement inokulum. Etter god blanding av (kontinuerlig omrøring på magnet rørverk) ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 60 serumflasker. 10 flasker ble tilsatt inhibitor og anvendt som fysisk/kjemisk kontroll ved de valgte temperaturer. Flaskene ble umiddelbart forseglet. Halve antallet av flaskene ble inkubert ved henholdsvis 5 og 15 °C.

3.2.5 Preparering av inokulert sjøvannsmedium (blank)

Til et totalvolum på 5 liter ble det tilsatt 15 ml supplement inokulum. Etter god blanding (kontinuerlig omrøring på magnet rørverk) ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 60 serumflasker. Halve antallet av flaskene ble inkubert ved henholdsvis 5 og 15 °C.

5 flasker ble tilsatt inhibitor og analysert for TIC og benyttet som bakgrunnskonsentrasjon ved start. Flaskene ble umiddelbart forseglet.

3.2.6 Preparering av referanse medium

Natriumbenzoat ($C_7H_5O_2Na$), MW =144,1, ble preparert til en stamløsning på 400 mg/100 ml destillert vann.

Til et totalvolum på 2 liter testmedium ble det tilsatt 20 ml referanse stamløsning og 6 ml supplement inokulum. Etter god blanding av ble det tatt ut porsjoner på 100 ml i 20 serumflasker. Flaskene ble umiddelbart forseglet. 12 flasker ble inkubert ved 15 °C fordi denne temperatur ble ansett som mest egnet som gyldighetskontroll for testen. 8 flasker ble inkubert ved 5 °C for å registrere utviklingen av TIC ved lavest testtemperatur.

3.3 Inkubasjonsbetingelser

Testflaskene ble plassert liggene i plastkasser. Flaskene ble manuelt ristet to ganger hver arbeidsdag og en gang per dag lørdag og søndag til og med 21 inkubasjonsdag. I etterfølgende tidsperiode ble det foretatt en manuell risting per dag. Dette ble gjort for å bedre oksygendiffusjonen til væskefasen. For temperaturvalg; 5 °C varierte temperaturen mellom 4,5 til 5,9 °C under inkubasjonsperioden. For temperaturvalg; 15 °C varierte temperaturen mellom 14,8 til 15,4 °C under inkubasjonsperioden. Det ble påvist et kort temperaturavvik ved begge inkubatorene pga strømbrudd. Det ble vurdert til ikke å ha påvirket nedbrytningsforløpet av teststoffene i påviselig grad.

pH i alle ferdig preparert testmedier var 7,5 ved start. Ved endt inkubasjon ble det observert en reduksjon til pH 6,5 ved begge testtemperaturer. I blank flaskene var pH 7,0. Dette er forårsaket av utviklingen av CO_2 som har ført til senking av pH. Det er ikke grunn til å anta at dette har påvirket nedbrytningen.

3.4 Uttak av testflasker for TIC analyse

Ved hvert prøveuttak under inkubasjonstiden ble testflasker (antall fremgår av tabellene 2 og 3.) tilsatt 1 ml konsentrert fosforsyre gjennom seprum ved sprøyte. De flaskene som ikke ble analysert samme dag, ble oppbevart ved 2-4 °C, inntil rasjonell analyse ble utført. Alle flasker ble temperert i vannbad til 20°C og satt på ristemaskin, med frekvens 140 sykluser per min. i minst en time. Denne behandlingen ble utført for å oppnå likevekt av CO_2 mellom gass- og væskefase.

3.5 TIC analyse

TIC analyser ble utført på Dohrmann DC 190 instrument. Én ml CO_2 -holdig gass ble tatt fra hver enkelt testflaske og injisert. Ved hver analysering ble det preparert kontrolløsninger som dekket det aktuelle konsentrasjonsområdet. En stamløsning av Na_2CO_3 (Merck nr. 6392), på 200 mg IC/L ble fortynt i TIC-fritt avionisert vann til konsentrasjonsserier fra 1 til 40 mg TIC per l. Disse standardløsningene ble fylt i serumflasker og forseglet, tilsatt fosforsyre og behandlet likt med testflaskene.

Korrelasjonslikning fra standardkurve ble anvendt for beregning av TIC konsentrasjon i hver enkelt testflaske.

3.6 Løst organisk karbon (DOC)

Som en tilleggsinformasjon ble løst organisk karbon (DOC) i sjøvann ved start og i testmediene ved angitt slutt, analysert med Dohrmann DC 190. (Forbrenning ved 680 °C, med platina som katalysator, TC/TOC analyser).

Det anvendte testmedium ble filtrert gjennom membranfilter (0,45 µm) ved start og ved slutt. Prøvene ble konserverte med 4 M H₂SO₄, 1 ml/100 ml prøve, og lagret ved 2-4 °C før analyse.

3.7 Godkjent test

Den prosentvise bionedbrytningen av referankestoffet skal være minst 60 % etter 14 døgn ved 20 til 25 °C. I denne testen hvor det er benyttet en lavere temperatur, 15 °C, kan det aksepteres noe lavere nedbrytningsgrad.

3.8 Beregning av analyse data

Ved 100 % nedbrytning av teststoffet er teoretisk mengde uorganisk karbon (ThIC) lik mengde total organisk karbon tilsatt gjennom teststoffet ved start av testen. ThIC = TOC.

Total TIC i testflasken blir: TIC = (mg C i væskefasen + mg C i gassfasen).

$$\text{eller TIC} = (V_L \cdot C_L) + (V_H \cdot C_H)$$

hvor

- V_L er volum i liter av væske i testflasken
- C_L er konsentrasjon av TIC i væskefasen (mg C/l)
- V_H er volum i liter i gassfasen
- C_H er konsentrasjon av TIC i gassfasen (mg C/l).

Ved surgjøring til pH < 3 etableres det en likevekt i konsentrasjon av TIC i gass og væskefase. Det er derfor tilstrekkelig å analysere i gassfasen fordi; C_L = C_H.

Beregning av prosentlig bionedbrytning D_t ved hvert trinn blir:

$$D_t = \frac{\text{TIC}_t - \text{TIC}_b}{\text{TOC}_i} \times 100$$

Hvor

- TIC_t er TIC i mg i testflasken ved tid t;
- TIC_b er middel TIC i mg i blank flaskene ved tid t;
- TOC_i er TOC i mg tilsatt ved start i testflaskene.

Nedbrytningen av referankestoffet er beregnet på tilsvarende måte.

Beregningen av middelveier for utviklingen av TIC under inkubasjonen er utført i Microsoft EXCEL som vist i tabell 2.

Statistisk beregning av 95 % konfidensintervall er utført ved bruk av Microsoft Excel Descriptive Statistics.

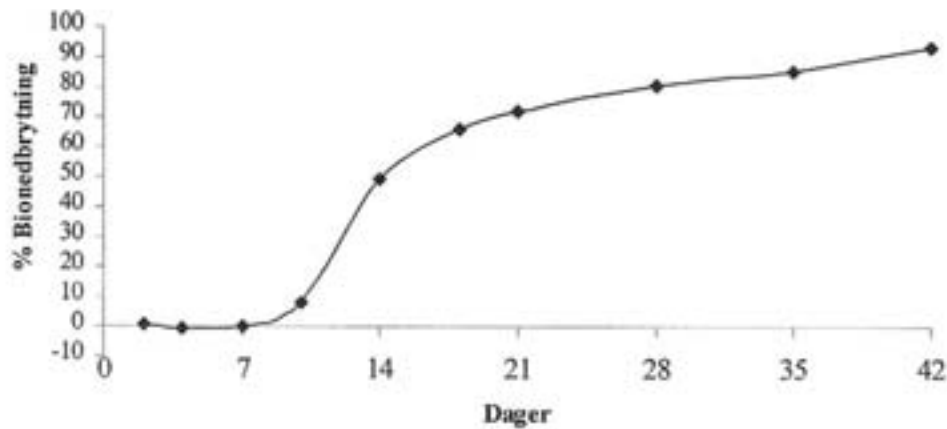
4. Resultater

4.1 Nedbrytning av meta nol

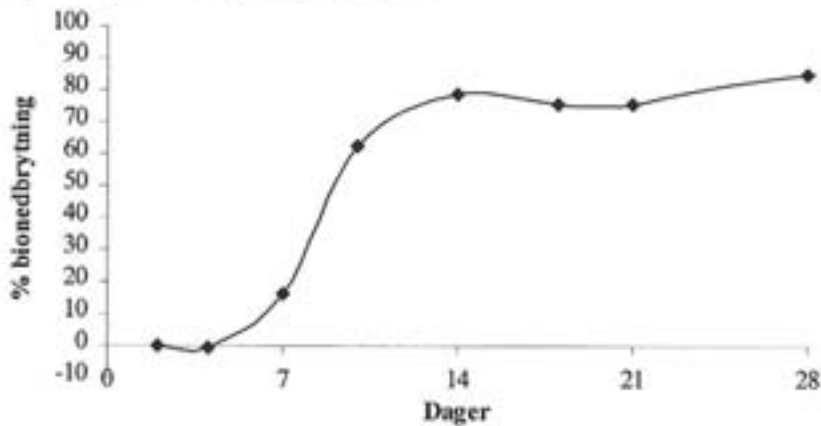
Den samlede oversikten over testresultatene og generert data er vist i tabellene 2 og 3.

Figur 1, viser utviklingen i nedbrytningen av teststoffet ved a) 5 °C og b) ved 15 °C.

Figur 1 a) Bionedbrytning ved 5 °C



Figur 1 b) Bionedbrytning ved 15 °C



Det har vært nødvendig å korrigere blank verdiene fordi testmediet for teststoffet og blank mediet ble preparert fra forskjellige beholdere med ulik behandling av sjøvannet for reduksjon av TIC ved start. Dette har ikke påvirket forløp eller nedbrytningsgrad.

Nedbrytningen av metanol gikk raskest ved 15 °C, hvor det etter en lag-fase på ca. 6 døgn foregikk en rask nedbrytning som var stagnert på 80 % etter 14 døgn. Etter 28 døgn ble det oppnådd en middelvei på 85 % for 6 replikater, med 95 % konfidensintervall på 3,2 % enheter.

Nedbrytningen av metanol ved 5 °C viste en lag-fase på 10 døgn. Nedbrytningen gikk noe langsommere enn ved 15 °C, med ca. 50% etter 14 døgn og 80% etter 28 døgn. En av fem replikater viste noe avvik som resulterte i et 95 % konfidensintervall på 10,5 % enheter.

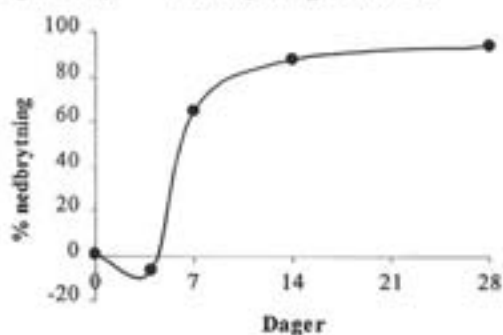
4.2 DOC reduksjon

Resultatene er vist i tabell 1, og viser en DOC-reduksjon på henholdsvis 94 og 99 % ved 5 og 15 °C, og understøttet resultatene som det er redegjort for med TIC som parameter. Vanligvis vil DOC reduksjon være noe høyere enn TIC, fordi organisk karbon vil være bundet i dannet biomasse.

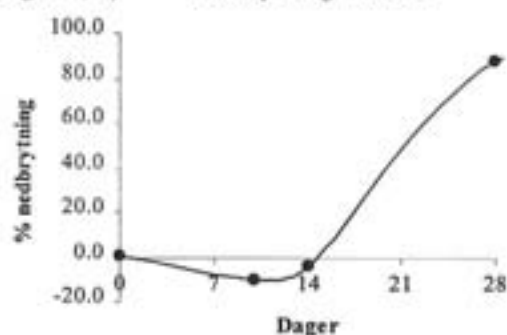
4.3 Nedbrytning av referansestoff

Figur 2, a) og b) viser nedbrytningen av natriumbensoat ved 15 og ved 5 °C. Det er resultatet ved 15 °C som tillegges størst vekt som kriterium for godkjent gjennomføring av testen.

Figur 2, a) Nedbrytning ved 15°C



Figur 2, b) Nedbrytning ved 5°C



Ved inkubasjonstemperatur på 15 °C ble det oppnådd minst 60 % nedbrytning allerede etter 7 døgn, mens det ved 5°C ble avslørt en lag-fase på minst 14 døgn før nedbrytningen kom igang. Dette viser at vanntemperatur har stor betydning for hvor raskt tilvekst av bakterier kommer igang, og dermed omsetningen av organisk materiale.

Tabell 1. Løst organisk karbon i testmediet ved start og endt forsøk, og beregnet reduksjon.

B388-2 5°C

Medium	Startverdi	28 døgn
Inokulum (Fl. 26)	1.1	1.6
Teststoff. (Fl. 136)	20.96	2.7
Korrigert (Sv.-Mv.)	19.86	1.10
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)		94

B388-2 15°C

Medium	Startverdi	28 døgn
Inokulum (Fl. 47)	1.1	2.4
Teststoff. (Fl. 164)	20.96	2.5
Korrigert (Sv.-Mv.)	19.86	0.10
DOC-reduksjon etter 28 døgn nedbrytning (%)		99

5. Referanser

1. ISO/CD 16221 Water quality - Guidance for the determination of biodegradability in the marine environment.
 2. ISO/FDIS 14593 Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds - method by the analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.
 3. NS-ISO 8245 Retningslinjer for bestemmelse av totalt organisk karbon (TOC) Første utgave 1991.
-

Tabell 2. Generert TIC data og beregning av bionedbrytbarhet for teststoffet og referansestoff ved 5 °C.

Medium	Dager	0	2	4	7	10	14	18	21	28	35	42	49
Blank (sjøvann)	Fl.nr.	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L
	1	12.47	16.89	17.19	17.45	17.71	17.58	16.65	17.13	17.24	17.47	17.78	17.79
	til	12.52	17.22	17.49			18.34			17.88	17.52	17.52	17.72
		12.39				17.35				17.96		17.49	18.87
	26												18.59
	snitt	12.5	17.1	17.3	17.4	17.7	17.8	16.7	17.1	17.7	17.5	17.6	18.3
Produkt B 388-2	116	12.47	9.40	9.42	9.67	11.53	18.44	21.93	23.33	26.86	25.89	28.45	27.89
	til	12.52	9.39	9.48			21.01		24.16	26.89	27.39	28.11	28.24
		12.39					19.80		23.52	26.77			
	142									22.96			
	snitt	12.5	9.4	9.5	9.7	11.5	19.8	21.9	23.7	25.9	26.6	28.3	28.1
IC i sjøvann	korr.		7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
BI korreksjon		0.0	0.1	-0.1	0.0	1.6	9.8	13.1	14.3	16.0	16.9	18.5	17.6
Biodeg. %		0.0	0.7	-0.4	0.1	8.2	49.3	65.9	72.2	80.5	85.3	93.1	88.4

Referanse	Dager	0	10	14	28
Na-benzoat	1	12.5	12.55	13.8	31.01
IC i sjøvann	snitt	12.5	12.6	13.8	31.0
BI korreksjon	korr.	3.1	3.1	3.1	3.1
Biodeg. %		0.0	-2.1	-0.9	17.5
		0.2	-10.4	-4.3	87.9

Tabell Tabell 3. Generert TIC data og beregning av bionedbrytbarhet for teststoffet og referansestoff ved 15 °C.

Medium	Dager	0	2	4	7	10	14	18	21	28	49
Blank (sjøvann)	Fl.nr:	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L	TIC mg/L
	27	12.47	16.89	17.19	17.45	17.71	17.58	16.65	17.13	17.24	17.79
	til	12.52	17.22	17.49			18.34			17.88	17.72
		12.39					17.35			17.96	18.87
	50										18.59
	snitt	12.5	17.1	17.3	17.4	17.7	17.8	16.7	17.1	17.7	18.3
Produkt B 388-2	143	12.47	9.42	9.67	13.02	22.30	25.67	23.40	24.19	27.05	29.35
	til	12.52	9.46	9.64		22.73	25.82	24.64	23.57	27.28	29.44
		12.39					25.78		25.97	27.34	29.45
	168									27.27	
	snitt	12.5	9.4	9.7	13.0	22.5	25.8	24.0	24.6	27.0	29.4
IC i sjøvann	korr.		7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
BI.korreksjon		0.0	0.0	-0.1	3.2	12.4	15.6	15.0	15.0	16.9	18.7
Biodeg. %		0.0	-0.1	-0.4	16.0	62.5	78.5	75.4	75.8	85.0	94.1

Referanse	Dager	0	4	7	10	14	28
Na-benzoat	169	12.53	12.89	27.76	28.03	32.73	34.69
	til		12.81	28.10		34.52	34.25
	180					32.50	34.68
	snitt	12.5	12.8	27.9	28.0	33.2	34.54
IC i sjøvann	korr.	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
BI.korreksjon		0.1	-1.1	13.7	13.7	18.6	19.9
Biodeg. %		0.3	-5.5	68.5	68.4	93.2	99.4

Vedlegg A.

Stamløsninger tilsatt sjøvann

Løsning a)	Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4),	8.5 g/l
	Dikaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4)	21.75 g/l
	Dinatriumhydrogenfosfat heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	33,4 g/l
	(Alternativt dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 22,2 g/l)	
	Ammoniumklorid (NH_4Cl)	0,5g/l
	Løs kjemikaliene i destillert vann i en målekolbe og fyll til 1000 ml	

Løsning b) Løs 0.25 g jern(III)klorid heksahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) i ca. 700 ml vann, tilsettes et par dråper konsentrert svovelsyre for å forhindre utfelling, og fyll til 1000 ml.

For hver liter sjøvann tilsett normalt 10 ml av løsning a) og en ml av løsning b).

NB! Den relativt høye tilsetningen av fosfater fra løsning b) gir lett utfelling i sjøvann med salinitet på 33‰ og høyere. Redusert tilsetning av a) kan være nødvendig.
