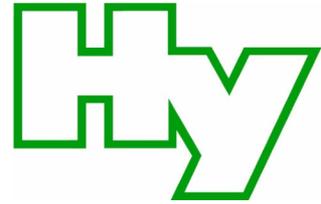


Hygiene-Institut des Ruhrgebiets

Institut für Umwelthygiene und Toxikologie

Direktor: Dr. Thomas-Benjamin Seiler

Träger: Verein des Hygiene-Instituts des Ruhrgebiets e.V.



HYGIENE-INSTITUT · Postfach 10 12 55 · 45812 Gelsenkirchen

Allegro Capital, Logistics
Services & More GmbH
Klosterhofweg 64
41199 Mönchengladbach

Besucher-/Paketanschrift:
Rotthaus Str. 21, 45879 Gelsenkirchen

Zentrale (0209) 9242-0
Durchwahl (0209) 9242-350
Telefax (0209) 9242-333
E-Mail s.bien@hyg.de
Internet www.hyg.de

Unser Zeichen: A-384176-24-Bi
Ansprechpartner: Herr Bien

Gelsenkirchen, den 06.02.2024

Seite 1 von 12

Produkt "SORB® XT"

hier: Bestimmung der aquatischen Toxizität

Ihr Auftrag vom 12.01.2024; Herr Torsten Narawitz

Sehr geehrte Damen und Herren,

im Rahmen der v.g. Auftragserteilung beauftragte uns die Allegro Capital, Logistics Services & More GmbH das Ölbindemittel mit der Bezeichnung „SORB® XT“ auf der Basis von organischem Sediment, welches unserem Haus am 18.01.2024 postalisch überstellt wurde, ökotoxikologischen Prüfungen zu unterziehen. Die durchgeführten Untersuchungen orientieren sich an den Vorgaben der CLP-Verordnung (EG-Nr. 1272-2008) für die Einstufung von Stoffen und Gemischen als ggf. gewässergefährdend und im vorliegenden Fall die Prüfung der Toxizität gegenüber Fischen (96 h LC50) gemäß OECD-Richtlinie 236 bzw. EG Nr. 440/2008 C.49*.

Zur Beurteilung und zur Einstufung von Stoffen und Gemischen als gewässergefährdend sind die im Anhang 1 der CLP-Verordnung, Kapitel 4.1.3. „Einstufung für Gemische“ benannten Kriterien maßgeblich.

Die Akkreditierung gilt für die in der Anlage zur Akkreditierungsurkunde aufgeführten Prüfverfahren (<http://www.hyg.de>). Nicht akkreditierte Prüfungen sind gekennzeichnet [*]. Die Ergebnisse unserer Prüfungen und die Bewertungen gelten für die untersuchten Prüfgegenstände und die zu diesem Zeitpunkt gültigen gesetzlichen Regelungen. Dieses Dokument darf ohne unsere ausdrückliche schriftliche Genehmigung nur in vollständiger und unveränderter Form verwendet werden. Es gelten unsere AGB (<http://www.hyg.de>).



Träger: Verein des Hygiene-Instituts des Ruhrgebiets e.V., Vereinsregister: VR 519 Amtsgericht Gelsenkirchen, USt.-ID: DE125018356 Vorstand: Prof. Dr. Jürgen Kretschmann (Vorsitzender), Stadträtin Andrea Henze, Joachim Löchte, Dr. Frank Obenaus, Dr. Thomas-Benjamin Seiler (geschäftsführ. Vorstand), Dr. Dirk Waider

Neben den Einstufungskriterien für die akute aquatische Toxizität kann auch anhand der in Kapitel 4.1.3.3.2 benannten Kriterien die Notwendigkeit einer Einstufung der chronischen aquatischen Toxizität überprüft werden.

Aus den dortigen Vorgaben kann zitiert werden, dass die experimentell ermittelten LC/EC/IC₅₀-Werte für die Wirkungskonzentrationen auf die aquatischen Modellorganismen Fische, Daphnien und Algen > 100 mg/l oder oberhalb der Wasserlöslichkeit liegen müssen und die NOEC (No Observed Effect Concentration) oberhalb von 1 mg/l liegen müssen, so dass eine Einstufung als gewässergefährdend nicht erforderlich ist.

Auf dieser Grundlage wurde vereinbart, zur grundsätzlichen Beurteilung der Produkteigenschaften, Prüfdaten zur aquatischen Toxizität gemäß der OECD-Richtlinie 236 (Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 26 July 2013) zu ermitteln, um eine produktbezogene Aussage über eine mögliche aquatische Toxizität treffen zu können.

Da es sich bei dem hier zu untersuchenden Produkt um einen Feststoff mit einer insgesamt nur äußerst geringen Wasserlöslichkeit handelt, konnte der oben benannte Toxizitätsversuch nur auf „indirekte“ Weise durchgeführt werden. Zur Untersuchung schlecht löslicher Produkte wird als Probenvorbereitungsschritt daher auf die Herstellung von Auslaugungen bzw. Prüfeluaten zurückgegriffen. Die so erhaltenen Lösungen stellen eine „water-accomodated fraction“ (WAF) im Sinne des OECD Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (OECD, 2019) dar, welche die maximal wasserlöslichen Anteile des Prüfmusters enthält.

Die hier zusammengestellten Untersuchungen an aquatischen Testorganismen (Fischeiern) wurden daher an Auslaugungs-Eluaten durchgeführt, die gemäß dem o.g. OECD Guidance Document in Anlehnung an die DIN 38414 („S4“) mittels kontinuierlichem Rührens über einen Zeitraum von 72 Stunden in den folgenden Feststoff-Wasserverhältnissen hergestellt wurden:

- 10 mg / 1,0 Liter
- 100 mg / 1,0 Liter
- 1.000 mg / 1,0 Liter
- 10.000 mg / 1,0 Liter
- 100.000 mg / 1,0 Liter

An den so erhaltenen Eluaten aus dem eingangs genannten Produktmuster waren die im Folgenden benannten ökotoxikologischen Prüfungen durchzuführen:

- Toxizität gegenüber Fischembryonen gemäß OECD 236

Die Untersuchungsergebnisse werden nachfolgend unter kurzer Skizzierung des angewandten Untersuchungsverfahrens und der gewählten Testbedingungen beschrieben.

Untersuchungsergebnisse

Bestimmung der akuten Toxizität auf Zebrafisch-Embryonen

Die akute Toxizität von Chemikalien und Prüfsubstanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisch (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan) wird gemäß der OECD Richtlinie 236 (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test) bzw. gemäß der analogen Methode C.49 aus Verordnung (EG) Nr. 440/2008 bestimmt.

Frisch befruchtete Eier von Zebrafisch werden der Prüflösung über einen Zeitraum von 96 Stunden ausgesetzt. In Abständen von 24 Stunden werden bis zu vier apikale Beobachtungen als Letalitätsindikatoren protokolliert: Koagulation der befruchteten Eier, fehlende Somitenbildung, fehlende Abtrennung der Schwanzknospe vom Dottersack und fehlender Herzschlag. Am Ende des Expositionszeitraums wird die akute Toxizität basierend auf einem positiven Ergebnis bei einer der vier protokollierten apikalen Beobachtungen bestimmt und die LC₅₀ berechnet.

Ablauf der Prüfung

Probeneingang:	18.01.2024
Registrierung:	22.01.2024
Interne Prüfnummer:	A2024 – 1312 bis – 1316
Standardarbeitsanweisung:	SOP 9.34-A1 (002/12.2020)
Beginn der Prüfung:	29.01.2024
Ende der Prüfung	02.02.2024
Erstellung des Prüfberichts:	06.02.2024

Prüfverfahren

Prüfsystem

Die Prüfungen wurden mit Eiern des Zebraäbrblings (*Danio rerio*, Hamilton 1822) durchgeführt. Die Testorganismen werden im Rahmen der institutseigenen Hälterung gezüchtet.

Für die Durchführung dieses Verfahrens steht ein Laborraum zur Verfügung, der ausschließlich der Fischhälterung und der Bebrütung der Fischeier dient. Eine vollständige Abdunkelung zur Einhaltung des konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 :12 Stunden ist gewährleistet. Die Elterntiere werden in Glasaquarien mit mind. 54 l Volumen gehältert.

Das Hälterungswasser wird mindestens wöchentlich auf die Parameter Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-), pH-Wert (pH), Gesamthärte (GH) und Karbonathärte (KH) überprüft und die Messergebnisse entsprechend dokumentiert.

Täglich erfolgt eine Kontrolle der Wassertemperatur ($26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) sowie eine optische Überprüfung der Elterntiere auf Krankheitsanzeichen oder sonstige Besonderheiten.

Durchführung

Für die Durchführung des Tests ist eine Eigewinnung und Differenzierung notwendig.

Eigewinnung

Zur Eigewinnung werden vor Beleuchtungsbeginn Laichschalen mit Gitter und Pflanzenattrappen in das Becken der Elterntiere eingesetzt. 30 Minuten nach dem Einschalten der Aquarienbeleuchtung können die Schalen in der Regel wieder entnommen werden.

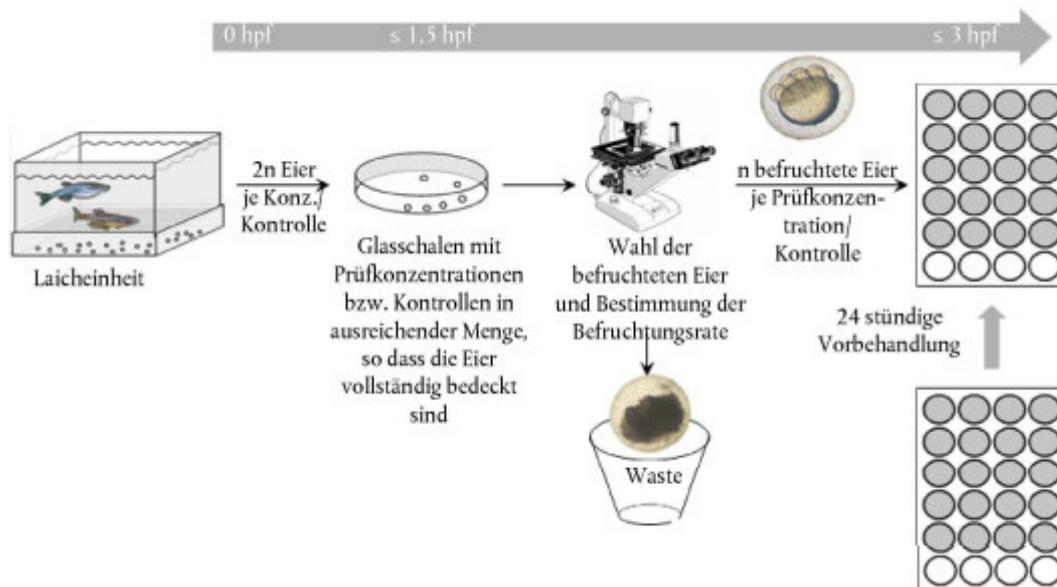


Abbildung 1: Schema der Toxizitätsprüfung an Zebraäbrblingen gemäß Methode C.49 aus Verordnung (EG) Nr. 440/2008

Differenzierung

Noch vor der Differenzierung wird eine geeignete Anzahl an Eiern (> 20) zur Vorexposition in die jeweiligen Verdünnungsstufen gegeben. Die Differenzierung befruchteter und unbefruchteter Eier ist innerhalb der ersten 60 Minuten nach Eiablage vorzunehmen. Sie erfolgt unter dem Stereomikroskop auf dunkler Unterlage. Bei befruchteten Eiern setzt bei 26°C nach etwa 15 Minuten die erste Zellteilung ein. Ab dem 4-Zell-Stadium sind befruchtete Eier eindeutig zu erkennen.

Das Prinzip der Methode beruht wie bereits dargestellt darauf, die Störung der Embryonalentwicklung bei Zugabe der Testsubstanzen gegenüber einem nicht toxischen Kontrollansatz zu ermitteln.

Über den Verlauf von 96 Stunden wird die mittlere letale Konzentration (LC_{50}) rechnerisch bzw. graphisch ermittelt. Dabei werden die befruchteten Eier des Zebraäbrblings gegenüber den verschiedenen Verdünnungsstufen der Testsubstanz bzw. Applikationslösungen exponiert und deren Embryonalentwicklung in den verschiedenen Testansätzen über die genannte Testdauer von 96 Stunden begutachtet.

Die Applikationslösungen des Prüfgegenstands wurden wie folgt hergestellt:

Genau einwaagen mit 10 mg/l, 100 mg/l, 1 000 mg/l, 10 000 mg/l und 100 000 mg/l des Originalmaterials des Prüfgegenstands „**SORB® XT**“ wurden in je 1 Liter Hälterungswasser suspendiert und 72 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührer gerührt. Die so erhaltenen Lösungen stellen eine „water-accomodated fraction“ (WAF) im Sinne des OECD Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (OECD, 2019) dar. Die mittels Sedimentation des ungelösten Materials über 24 Stunden hergestellte Applikationslösungen enthält jeweils die maximal wasserlöslichen Anteile von „**SORB® XT**“ pro Liter. Der Kontroll-Ansatz wurde ebenfalls mit Hälterungswasser durchgeführt.

Die zu untersuchenden Proben werden vor der Durchführung des Tests auf ca. 26 °C temperiert. Der pH-Wert wird ermittelt und ggf. auf $\text{pH } 7 \pm 0,2$ eingestellt. Dies geschieht mit 0,1 mol/l NaOH bzw. 0,1 mol/l HCl unter Vermeidung einer Neutralpunkt-Überschreitung.

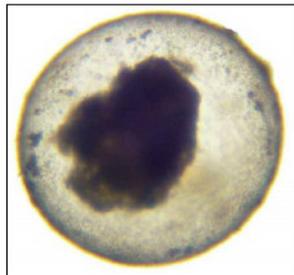
Vom Probenmaterial werden im Regelfall mit Standard-Verdünnungswasser Verdünnungsstufen angesetzt. Die Verdünnungsstufen sollten so gewählt werden, dass der LC_{50} bestimmt werden kann. Im Idealfall kann bei der höchsten Verdünnungsstufe keinerlei Letalität ($\text{NOEC} / \text{LC}_0$) und in der niedrigsten Verdünnungsstufe eine vollständige Letalität (LC_{100}) nachgewiesen werden.

Als Positivkontrolle, im Sinne einer vollständigen Letalwirkung, wird eine 3,4-Dichloranilin-Lösung (4 mg/l) verwendet. Als Negativkontrolle dient das unbehandelte Standard-Verdünnungswasser.

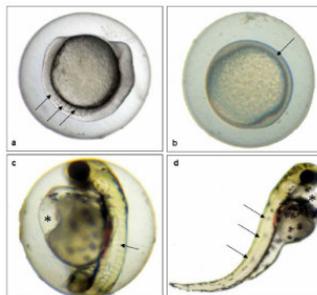
Die verwendeten Zellkulturplatten mit den befruchteten Fischeiern werden im Brutschrank bei einer Temperatur von 26 ± 1 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden für eine Dauer von 96 Stunden inkubiert.

Die Fischeier werden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden auf die Entwicklung der Embryonen hinsichtlich folgender Letalkriterien untersucht:

- Koagulation:



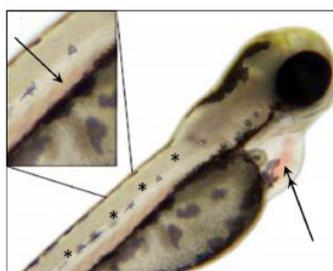
- Keine Bildung von Somiten:



- Keine Ablösung des Schwanzes vom Dotter:



- Kein Herzschlag (ab 48h):



Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung gemäß OECD 236 für das Prüfmuster „SORB® XT“ sind nachfolgend aufgeführt:

Konzentration der Originalsubstanz in mg/l	Überlebensrate in %
10	95
100	80
1 000	95
10 000	75
100 000	10
Negative control	90
Positive control	25

Tabelle 1: Ergebnisse FET – Überlebensraten

Konzentration der Originalsubstanz in mg/l	10	100	1 000	10 000	100 000
Anzahl der toten Embryonen in %	5	10	5	25	90

Tabelle 2: Ergebnisse FET – Letalitätsraten

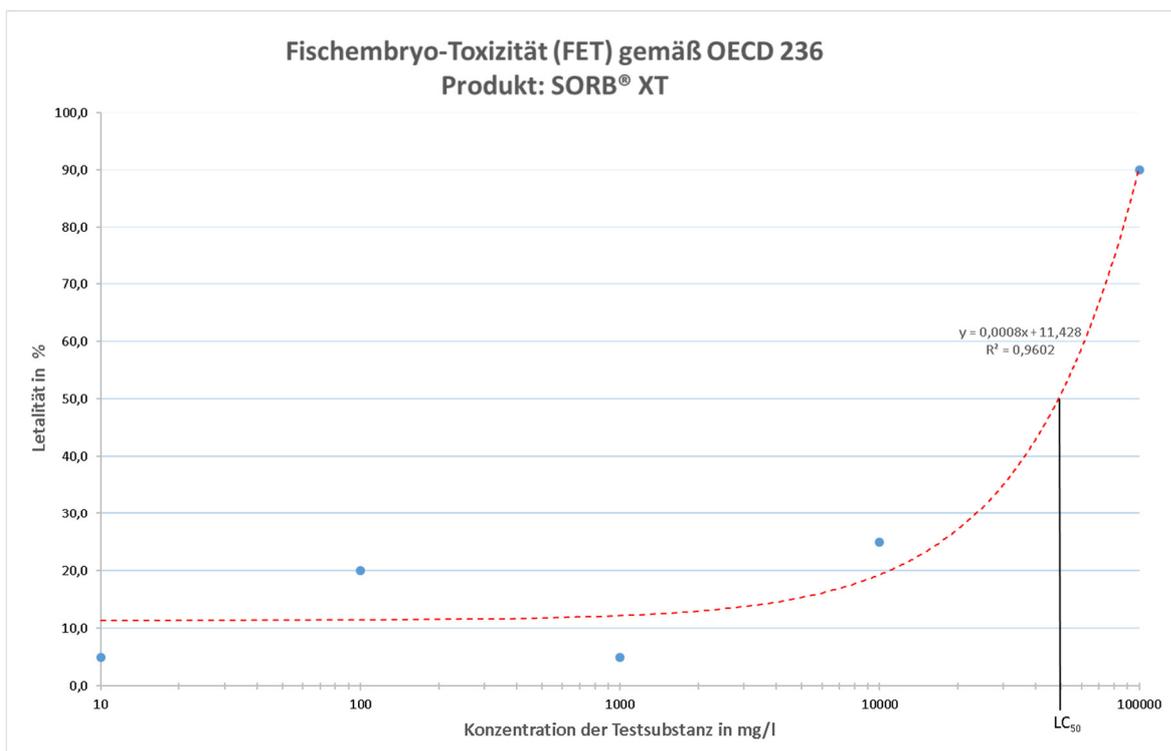


Abbildung 2: Graphische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Aus den Versuchsergebnissen lassen sich die nachfolgenden mittleren Wirk- bzw.

Letalkonzentration für das Prüfmuster „**SORB® XT**„ ermitteln:

LC ₀ / NOEC	(96 h)	=	1000	mg/l
LC₅₀	(96 h)	=	50000	mg/l
LC ₁₀₀	(96 h)	=	> 100000	mg/l

Als NOEC (No Observed Effect Concentration) kann – unter Berücksichtigung der parallel durchgeführten Negativkontrolle – die hier verwendete Testkonzentration von 1000 mg/l (1 g/l) ausgewiesen werden. Als LC₅₀ (statistisch errechnete Konzentration einer Substanz, die voraussichtlich bei 50 % der exponierten Tiere innerhalb des Untersuchungszeitraums zum Tode führt.) konnte eine Konzentration von 50000 mg/l (50 g/l) ermittelt werden.

Die Ergebnisse der mitgeführten Messungen der pH-Werte, der elektrischen Leitfähigkeit und der Sauerstoffgehalte sowie der Gesamthärte in dem höchstdosierten Testansatz von „**SORB® XT**“ mit 100000 mg/l und in der Negativkontrolle (NK) sind exemplarisch in Tabelle 3 dargestellt.

Parameter	Einheit	Beginn des Tests (T = 0)	Ende des Tests (T = 96 Stunden)
pH (100 g/l)		3,57	3,57
pH (NK)		7,54	7,82
O ₂ (100 g/l)	mg/l	9,14	7,97
O ₂ (NK)	mg/l	11,04	7,90
elektrische Leitfähigkeit (100 g/l)	μS/cm	724	719
elektrische Leitfähigkeit (NK)	μS/cm	692	690

Tabelle 3: pH-Werte, Leitfähigkeit und Sauerstoffgehalte in dem Testansatz mit 100000 mg/l „**SORB® XT**“ und in der Kontrollgruppe - Fischtoxizität

Prüfung der Kriterien für die Validität der Prüfergebnisse

Die Gültigkeitskriterien der OECD Richtlinie gelten als erfüllt, wenn

- in der Negativkontrolle eine Embryoletalität von $\leq 10\%$ der eingesetzten Embryonen und
- in der Positivkontrolle eine Sterblichkeit von mindestens 30 % der Embryonen

festgestellt werden kann. Bei dem hier durchgeführten Test zeigte die Negativkontrolle eine Letalitätsrate von 10% und die Positivkontrolle einen Anteil toter Embryonen von 75 %, sodass der durchgeführte Test als gültig beurteilt werden kann und die hier übermittelten Testergebnisse als normkonform deklariert werden können.

Diskussion der Prüfergebnisse

Die Prüfergebnisse lassen erkennen, dass der experimentell ermittelte **LC₅₀-Wert** für die Toxizität der Prüfsubstanz „**SORB® XT**“ gegenüber Fischembryonen bei ca. **50000 mg/l** liegt und, dass als **NOEC** (No observed effect concentration) eine Größenordnung von **1000 mg/l** dokumentiert werden konnte.

Literatur

OECD Guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Adopted on 26. July 2013.

OECD 2019: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. , ENV/JM/MONO(2000)6/REV1, 16 May 2019 OECD.

Zusammenfassung

Im Rahmen der o.g. Auftragserteilung beauftragte uns die Allegro Capital, Logistics Services & More GmbH das Ölbindemittel „**SORB® XT**“ zur Beurteilung der „Gewässerverträglichkeit“ entsprechenden ökotoxikologischen Prüfungen zu unterziehen.

Methode	NOEC	Wirk-Größe / Einheit	Toxizitäts-Werte / Prüfdaten
Fischembryotest – FET – OECD 236	1000 mg/l	LC ₅₀	50000 mg/l

Tabelle 4: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Orientiert an dem Anwendungsbereich (Ölschadensbekämpfung) und an den Einstufungskriterien von Stoffen und Gemischen als akut oder chronisch gewässergefährdend aus dem Anhang 1 der CLP-Verordnung (EG-Nr. 1272-2008) wurde die Toxizität gegenüber Fischembryonen labortechnisch überprüft.

Die hier experimentell ermittelten Prüfdaten (LC₅₀-Wert) liegen deutlich oberhalb der in der zitierten Verordnung festgelegten 50%-Wirkungskonzentrationen für Fische, Daphnien und Algen von > 100 mg/l und die aus den Prüfdaten abgeleiteten NOEC (no observed effect concentrations) liegen oberhalb von 1 mg/l, so dass nach unserer Auffassung damit eine Einstufung des Produktes „**SORB® XT**“ als gewässergefährdend nicht erforderlich ist und davon ausgegangen werden kann, dass es durch den Einsatz des Ölbindemittels nicht zu einer relevanten negativen Beeinflussung der belebten Umwelt kommt.

Mit freundlichen Grüßen
Der Direktor des Instituts
i.A.

Dipl.-Umweltwiss. Sebastian Bien
stellv. Abteilungsleiter der
Abteilung Umwelt- und Verbraucherschutz