

Bioforsk Rapport

Vol. 5 Nr. 21 2010

Miljøgiftighet av nanosilane

Undersøkelse av økotoksikologiske virkninger på
meitemark og collemboler

Erik J. Joner

Bioforsk Jord og Miljø





Hovedkontor
Frederik A. Dahls vei 20,
1432 Ås
Tlf: 03 246
Fax: 63 00 92 10
post@bioforsk.no

Bioforsk Jord og miljø
Frederik A. Dahls vei 20
1432 Ås
Tlf: 03 246
Faks: 63 00 94 10
jord@bioforsk.no

| | | | |
|---|---------------------------------------|---|---|
| Tittel/Title: Miljøgiftighet av nanosilane | | | |
| Forfatter(e)/Autor(s): Erik J Joner | | | |
| Dato/Date: 2.02.2010 | Tilgjengelighet/Availability: Åpen | Prosjekt nr./Project No.: 2110603 | Arkiv nr./Archive No.: 2010/72 |
| Rapport nr./Report No.: 5(21)/2010 | ISBN-nr.: 978-82-17-00616-9 | Antall sider/Number of pages: 12 | Antall vedlegg/Number of appendix: Ingen |
| Oppdragsgiver/Employer: NanoConcept | | Kontaktperson/Contact person: Espen Linnerud | |
| Stikkord/Keywords: Nanoteknologi, økotoksikologi Nanotechnology, ecotoxicology | | Fagområde/Field of work: Økotoksikologi Ecotoxicology | |
| Sammendrag Et nanoteknologiprodukt som brukes til overflatebehandling for å hindre tilsmussing og redusere kostnader til rengjøring og vedlikehold ble testet for giftighet overfor jordboende organismer (meitemark og collemboler). Produktet er basert på silane, SiH ₄ , og selges som en flytende to-komponentløsning som blandes før bruk. De to komponentene inneholder løsemidler i form av alkoholer som fordampes etter påføring. Giftigheten av løsemidlene er ikke testet, da dette dreier seg om vanlige alkoholer som er lett nedbrytbare og har lav persistens. I testene ble produktet blandet i jord og, for forsøk med meitemark, også i fôr. Testene viser ingen giftighet overfor collemboler (jordboende spetthaler), ingen akutte effekter (dødelighet) på meitemark, og kun en svak reduksjon i en av to parametre som er undersøkt mht reproduksjon av meitemark. Disse effektene ble observert ved svært høye konsentrasjoner. Det konkluderes med at dette produktet ser ut til å ha en svært lav miljørisiko overfor jordboende organismer. | | | |
| Summary: A nanotechnology product used as a dirt repellent surface treatment was tested regarding toxicity towards soil-dwelling organisms (earthworms and collembolans). The product is silane based, and is sold as a two component liquid solution. The two components contain solvents (alcohols) that evaporate upon application. The toxicity of the solvents was not tested as these are common alcohols that are biodegradable and have low persistence. The tests used both product mixing into soil and for earthworms also mixing into food. The test results showed that no acute toxicity towards collembolans or earthworms, no growth inhibition for earthworms, and only a weak reduction in one of two reproduction endpoints for earthworms. The latter effects were observed at very high concentrations. We conclude that the tested product is seem to have a very low impact on terrestrial organisms. | | | |
| Sted: Ås | | | |

Godkjent / Approved

Roald Sørheim

Prosjektleder / Project leader

Erik J. Joner

Forord

Nanoteknologi er et nytt satsningsområde innen forskning og utvikling, og en rekke produkter som utnytter de unike egenskapene ved nanomaterialer er allerede på markedet, også i Norge. Potensielt kan nanoprodukter tilby bedre og mer ressursøkonomiske tekniske løsninger på en rekke problemer som samfunnet har behov for, fra medisin til energiproduksjon, elektronikk, optikk og en rekke forbrukerprodukter. En anvendelse i sistnevnte kategori er overflatebehandling, hvor man har mulighet til å gjøre overflater ekstremt smuss- og vannavstøtende (lotus-effekt). Dette kan gi besparelser til rengjøring, vedlikehold, osv., men også øke f.eks. synligheten av veiskilt og lignende som har en direkte effekt på trafikksikkerhet.

NanoConcept er et nylig startet firma som ønsker å utnytte de spesielle egenskapene som slike produkter har, og de markedsfører dem som ressursbesparende overfor sine kunder. I sin markedsføring er det viktig for NanoConcept å synliggjøre denne ressursbesparelsen, men da ressursøkonomi ofte går hånd i hånd med mer miljøorienterte krav har det også vært viktig for dem å vise at produktene de selger ikke er skadelige for miljøet. En sunn skepsis til ny teknologi har fulgt fremveksten av nanoteknologien, og selv om forbrukerprodukter som regel testes eller vurderes for mulige negative helseeffekter blir tilsvarende miljøbetraktninger ofte utelatt. Dette kan dels skyldes at slike undersøkelser er kompliserte og kostbare, at de krever svært spesiell kompetanse, og at det i forhold til lovverket ikke stilles like strenge krav til slik testing som til testing av effekter på helse.

På eget initiativ har NanoConcept bedt Bioforsk om å teste ett av deres produkter for mulige negative miljøeffekter. Bioforsk har lang erfaring i slike vurderinger, og har de siste årene drevet forskning på mulige negative miljøeffekter av nanomaterialer, bl.a. gjennom forskningsprosjektet "NanoEnvironment".

Innhold

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Sammendrag | 3 |
| 2. Innledning | 4 |
| 3. Metoder..... | 5 |
| 4. Resultater og diskusjon | 7 |
| 5. Konklusjoner | 10 |
| 6. Referanser | 11 |

1. Sammendrag

Et nanoteknologiprodukt som brukes til overflatebehandling for å hindre tilsmussing og redusere kostnader til rengjøring og vedlikehold ble testet for giftighet overfor jordboende organismer (meitemark og collemboler). Produktet er basert på silane, SiH_4 , og selges som en flytende to-komponentløsning som blandes før bruk. De to komponentene inneholder løsemidler i form av alkoholer som fordamper etter påføring. Giftigheten av løsemidlene er ikke testet, da dette dreier seg om vanlige alkoholer som er lett nedbrytbare og har lav persistens. I testene ble produktet blandet i jord og, for forsøk med meitemark, også i fôr. Testene viser ingen giftighet overfor collemboler (jordboende spetthaler), ingen akutte effekter (dødelighet) på meitemark, og kun en svak reduksjon i en av to parametre som er undersøkt mht reproduksjon av meitemark. Disse effektene ble observert ved svært høye konsentrasjoner. Det konkluderes med at dette produktet ser ut til å ha en svært lav miljørisiko overfor jordboende organismer.

2. Innledning

Mulige negative miljøeffekter av nye kjemikalier testes systematisk vha. standardtester fra OECD, ISO eller andre organisasjoner, og en grundig testing med flere ulike tester, både akutte og kroniske, og både for jord og vannmiljøer, er som regel nødvendig før man kan konkludere med at en nytt kjemikalie er ufarlig for miljøet.

Når det gjelder nanomaterialer består disse ofte av kjemiske stoffer som allerede har vært testet, men da enten som oppløst stoff eller som større partikler. Nanomaterialer har den spesielle egenskap at de ofte har andre egenskaper enn materialer med større dimensjoner, slik at man ikke uten videre kan konkludere om en type nanomateriale er giftig eller ikke ved å henvise til tester av oppløste stoffer eller materialer med større partikkelstørrelse og samme eller tilsvarende sammensetning. På bakgrunn av dette forskes det nå intensivt på mulige giftvirkninger av nanomaterialer på internasjonalt nivå. Ett av problemene man strir med innen slik forskning er i hvilken grad standard tester kan anvendes direkte på undersøkelser av nanomaterialer (ISO/IEC/NIST/OECD 2008; OECD 2008). Et annet aspekt er om dose-begrepet basert på konsentrasjon er relevant for nanomaterialer, idet disse materialene ofte viser økt reaktivitet og toksisitet ved redusert partikkelstørrelse, selv om konsentrasjonen er den samme. Under visse forutsetninger om biotilgjengelighet ser dette så langt ut til å være overførbart i stor grad. Usikkerhet knytter seg også i stor grad til hvilke eksponeringsscenarioer man anser som realistiske og hva slags interaksjoner som finner sted mellom nanomaterialer og naturlige bestanddeler i jord og vann (Nowack and Bucheli 2007).

Et annet usikkerhetsmoment når man gjennomfører tester slik vi har gjort i denne rapporten er hvorvidt man har målt effekter etter tilstrekkelig lang kontakttid til å spore senskader, og hvorvidt man har benyttet tilstrekkelig følsomme endepunkter (Wiesner et al. 2009). Slike avveininger er alltid et kompromiss, men ved å øke dosene man utsetter testorganismene for kan man til en viss grad ta høyde for at akutte effekter ved høye doser kan antyde noe om kroniske effekter ved lavere doser. Dette er likevel en forenkling.

I denne rapporten har vi benyttet to ulike eksponeringsveier og to typer jordlevende organismer. Videre har vi tilsatt det testede produktet på en måte som kun representerer én mulig interaksjon mellom jordmiljøet og organismer. Dette er ikke fyllestgjørende, men kan gi en brukbar indikasjon på graden av giftighet i terrestriske miljøer.

3. Metoder

Meitemarktest

Giftighet av produktet ble først testet på meitemark (*Eisenia fetida*) i henhold til en videreutviklet testprotokoll basert på en OECD-test for giftighet overfor jordlevende organismer (OECD 1984). Voksne meitemark med en minimumsvekt på >300 mg ble valgt ut fra en permanent oppformeringskultur som drives av Bioforsk Jord og Miljø. Disse ble så veid, vekten registrert og 5 meitemark overført til hvert av 12 ulike glass med en standardjord (500 g tørrvekt/glass, fuktet opp til 20 % vanninnhold). Fire behandlinger ble sammenliknet:

- 1) En kontrollbehandling uten noen form for tilsetning av nanoprodukter
- 2) En behandling der 1 % (volum til tørrvekt) av produktet ble blandet inn i jord
- 3) En behandling der 1 % (volum til tørrvekt) av produktet ble blandet inn i fôr
- 4) En behandling der 10 % (volum til tørrvekt) av produktet ble blandet inn i fôr

Hver behandling ble gjentatt tre ganger.

Ved tilsetning av nanoproduktet til jord eller fôr ble f.eks. 5 ml av det ferdig blandete produktet tilsatt 50 g tørr jord og dette jordvolumet satt til tørking i 16 timer. På dette tidspunktet var jorda igjen tørr (kontrollert ved veiing). Jorden ble så først blandet manuelt med en spatel for å knuse opp aggregater som ble dannet ved fukting/opptørking, før disse 50 g jord ble blandet med 450 g tørrvekt jord som var blitt fuktet opp til 10 % vanninnhold. Fôr ble tilsatt nanoprodukt på samme måte.

Meitemark ble fôret med tørket og siktet hestemøkk tatt ut ved stallen til Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, UMB. Uttak ble gjort fra dyr som ikke var gjenstand for behandling med medikamenter, og i en vinterperiode der de ble fôret med standard fôr. De fem meitemarkene i hvert glass fikk samlet 3 g fôr (friskvekt, 20 % tørrstoff) pr uke, i hht OECD-standarden. Fôr tilsatt nanoproduktet ble tillaget ved oppstart av forsøket og fôrrasjoner på 3 g frosset i zip-lock poser. Forsøket ble inkubert i et vekstkammer ved 20 °C og med 16 timer lys ($>100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) og avsluttet etter 8 uker ved at markene ble tatt ut og veid etter tømning av tarminnhold (24 timer). Samtidig ble kokonger og juvenile mark ekstrahert fra jorda og talt.

Collemboltest

Dødelighet og reproduksjon av collemboler (spretthaler) i jord tilsatt 3 ulike konsentrasjoner av nanoproduktet ble også foretatt basert på en standardtest (ISO 1999). Her ble 10 collemboler fra synkrone kulturer av *Folsomia candida* (klekket 10 dager tidligere) overført til 50 ml glass med standardjord tilsatt 0, 1, 5 og 25 % (volum/vekt) av nanoproduktet, som over, og fuktet til 60 % vannholdingskapasitet. Collemboler ble så inkubert ved 20 °C i 4 uker og foret på tørrgjær (15 mg/replikant hver 14. dag). Vanninnhold ble justert ukentlig ved veiing, og fordampnet vann erstattet med destillert vann. Ved forsøkets slutt ble oppformerte collemboler ekstrahert ved oversvømming, og antall dyr registrert vha fotografering og digital billedbehandling (Lemnatec™). Hver behandling ble gjentatt 4 ganger.

Kjemisk analyse

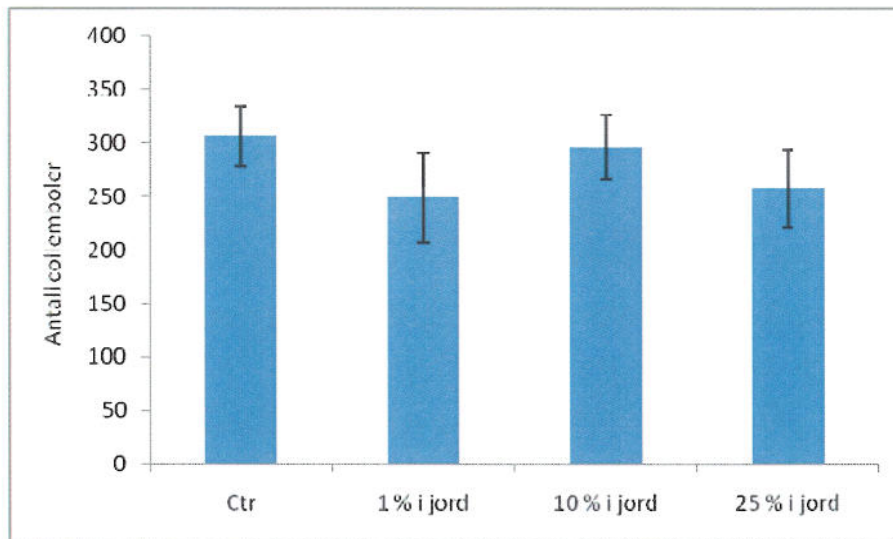
Nanoproduktet ble analysert for innhold av uorganiske elementer vha ICP-MS. Selv etter fortykning vanskeliggjorde det høye innholdet av organiske løsemidler analysen, men det ble konstatert at prøven hovedsakelig inneholdt Si, og at innholdet av dette utgjorde ca. 0,6 % på vektbasis.

Statistiske metoder

Data for fysiologiske og reproduktive endepunkter ble analysert vha variansanalyser, og statistiske forskjeller testet med Tukey's test (Zar 1984). Grafisk fremstilte data er presentert med standardavvik.

4. Resultater og diskusjon

Ingen akutt giftighet ble observert med noen av testorganismene ved de konsentrasjoner som ble brukt (opp til 25 % i jord for collemboler, 1 % i jord for meitemark, og 10 % i fôr for meitemark). Se Figur 1 og Tabell 1.



Figur 1. Gjennomsnittlig antall collemboler +/- standardavvik (n=4) i jord tilsatt ulike andeler nanoproduct, sammenliknet med kontrollbehandling (Ctr) uten tilsetning av nanoproduct.

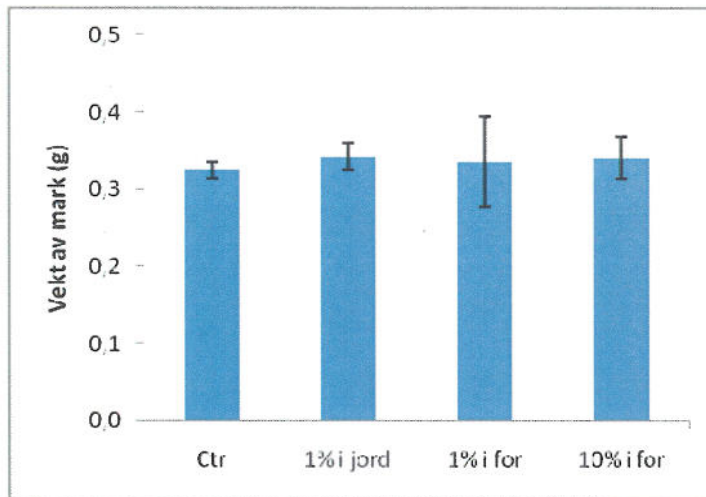
Tabell 1. Dødelighet, vekst og reproduksjon av meitemark (*Eisenia fetida*) eksponert i 8 uker for nanoproduct i jord eller fôr. Innen en kolonne er verdier fulgt av samme bokstav ikke signifikant forskjellige (Tukeys test, $p < 0,05$, $n=3$).

| | Dødelighet (%) | Vekt (mg) | Kokonger (Antall) | Juveniler (Antall) |
|------------|----------------|-----------|-------------------|--------------------|
| Kontroll | 0 | 325 | 57,7 | 97,7 a |
| 1% i jord | 0 | 342 | 59,7 | 80,7 b |
| 1% i fôr | 0 | 336 | 61,0 | 81,3 b |
| 10% i fôr | 0 | 341 | 50,3 | 74,3 c |
| Statistikk | ISF* | ISF | ISF | $p < 0.005$ |

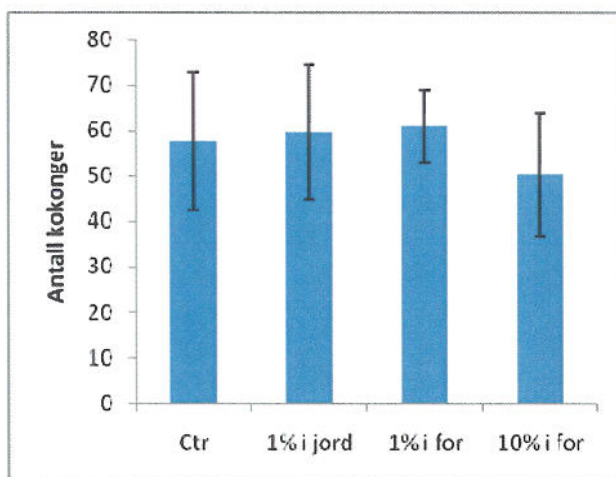
* ISF = Ingen signifikante forskjeller

For meitemark ble tre kroniske endepunkter vurdert, vekst av voksne mark, produksjon av kokonger og juvenile mark. Kun for ett av disse tre endepunktene ble det funnet en viss hemmende effekt (for antall juvenile), mens de to andre endepunktene viste ingen effekt (se figur 2a-c). For antall juvenile

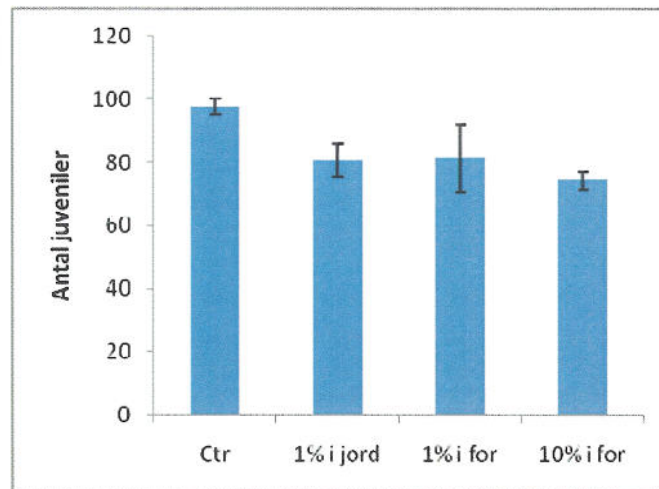
ble det observert en svak men signifikant reduksjon ved tilsetning av 1 % vektandel av produktet til både jord og fôr. Ved en 10 ganger høyere dose tilsatt fôr ble denne effekten forsterket, noe som tyder på et tradisjonelt dose-respons forhold.



Figur 2a. Gjennomsnittlig vekt av meitemark +/- standardavvik (n=3) etter 8 ukers eksponering for nanoprodukt i jord eller fôr, sammenliknet med kontrollbehandling (Ctrl) uten nanoprodukt.



Figur 2b. Gjennomsnittlig antall kokonger +/- standardavvik (n=3) produsert etter 8 ukers eksponering for nanoprodukt i jord eller fôr, sammenliknet med kontrollbehandling (Ctrl) uten nanoprodukt.



Figur 2c. Gjennomsnittlig antall juveniler +/- standardavvik (n=3) produsert etter 8 ukers eksponering for nanoprodukt i jord eller fôr, sammenliknet med kontrollbehandling (Ctr) uten nanoprodukt. Signifikante forskjeller ble observert vha variansanalyse (ANOVA). Tester og kontraster er presentert i Tabell 1.

Diskusjon

Silane (SiH₄, CAS 7803-62-5) er i utgangspunktet lite giftig for pattedyr med LC50 verdi for mus (dødelig konsentrasjon for 50% av testdyrene etter 4 timer) på 9600 mg/kg (Richardson and Gangolli 1994) og anbefalte grenseverdier for eksponering i arbeidsmiljø (recommended exposure limit; REL) på 7 mg/m³ (National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH). Ingen tilsvarende akseptable eksponeringsverdier (permissible exposure limits, PEL) er etablert (Occupational Safety and Health Administration, OSHA). Det finnes heller ingen data for negative miljøeffekter eller økotoxikologiske virkninger (Richardson and Gangolli 1994). I de beskrevne testene ble det benyttet jordlevende insekter og invertebrater som normalt kommer i nær kontakt med potensielt skadelige stoffer når disse ender opp i jord, og disse må ansees som både relevante og sensitive som indikatorer for virkninger på andre jordlevende organismer.

5. Konklusjoner

Det er ikke sannsynlig at organismer i terrestriske miljøer vil ta skade eller på andre måter påvirkes negativt av normal bruk av dette produktet, da konsentrasjonene som man evt. vil kunne finne i miljøet omkring behandlede objekter neppe vil kunne nå opp i konsentrasjoner som gir negative effekter tilsvarende de vi har sett i forsøkene over. To former for spredning ser ut til å være mulig: Dels vil en behandlet overflate gradvis kunne avgi svært små mengder silane som transporteres ned i jord og vann ved naturlige forvitningsprosesser (regn, vind, annen mekanisk slitasje). Videre vil søl og annet direkte utslipp av produktet i væskefase være mulig og dette vil kunne gi lokale effekter tilsvarende de vi har vist. Da volumene som benyttes gjerne er små vil slike hendelser få liten betydning. Vi konkluderer med at det testede nanoproduktet har lav giftighet overfor jordlevende organismer.

6. Referanser

- ISO. 1999. Soil quality – Inhibition of reproduction of *Collembola* (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO method 11267. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO/IEC/NIST/OECD. 2008. International workshop on documentary standards for measurement and characterization for nanotechnologies. Gaithersburg: US National Institute of Standards and Technology (NIST). 40 p.
- Nowack B, Bucheli TD. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1):5-22.
- OECD. 1984. Guidelines for testing of chemicals: Earthworms, acute toxicity tests. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development.
- OECD. 2008. Manufactured nanomaterials: Work programme 2006-2008. Paris: OECD. 17 p.
- Richardson ML, Gangolli S. 1994. The dictionary of substances and their effects. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Wiesner MR, Lowry GV, Jones KL, Hochella JMF, Di Giulio RT, Casman E, Bernhardt ES. 2009. Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk and ecological implications of nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 43(17):6458-6462.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs: Prentice Hall. 718 p.