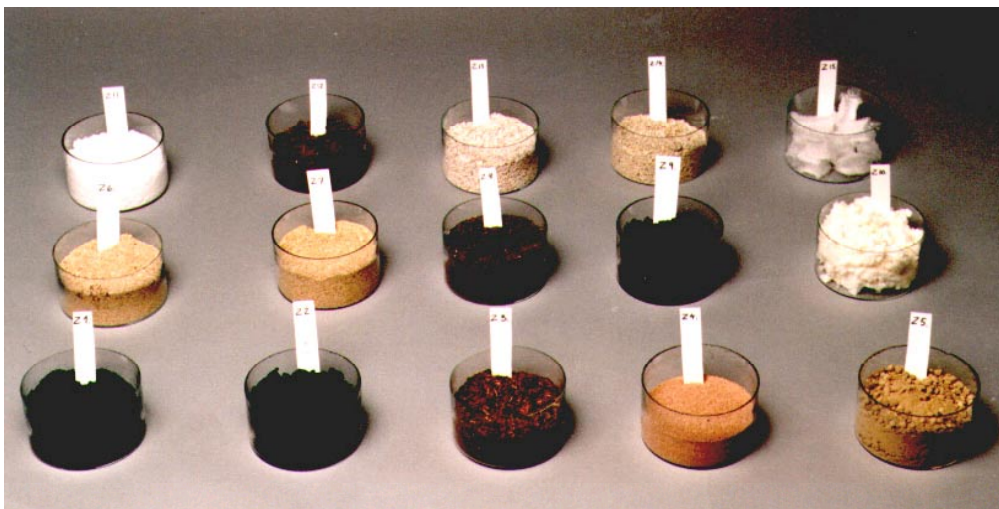




# rappport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

## Prövning av ekotoxikologiska testmetoder vid värdering av miljöpåverkan av sorbenter för olje- och kemikaliespill



Anders Svenson, Ann-Sofie Allard, Marianne Malmberg, Tomas Viktor och  
Jonas Röttorp

B 1371

Stockholm maj 2000

<b>Organisation/Organization</b> IVL Svenska Miljöinstitutet AB IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd	<b>RAPPORTSAMMANFATTNING</b> <b>Report Summary</b>
<b>Adress/address</b> Box 21060 100 31 STOCKHOLM	<b>Projekttitel/Project title</b> Sorbenter för olje- och kemikaliespill. Utveckling av en bedömningsmetodik för miljöanpassad produktion, lagring, transport, användning och omhändertagande
<b>Telefonnr/Telephone</b> 08-598 563 00	<b>Anslagsgivare för projektet/Project sponsor</b> Räddningsverket, Naturvårdsverket, enskilda företag
<b>Rapportförfattare/author</b> Anders Svenson, Ann-Sofie Allard, Marianne Malmberg, Tomas Viktor och Jonas Röttorp	
<b>Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report</b> Prövning av ekotoxikologiska testmetoder vid värdering av miljöpåverkan av sorbenter för olja- och kemikaliespill	
<b>Sammanfattning/Summary</b> Projektets syfte är att ta fram bedömningsgrunder för miljöpåverkan för sorbenter och deras användning vid bekämpning av olje- och kemikaliespill. Som en del av detta ingår en prövning och utvärdering av lämpliga ekotoxikologiska testmetoder. Med dessa metoder ska effekter i olika miljöer, på olika organismer och i olika nivåer i ekosystemet kunna mätas och värderas.  Oanvända sorbenter har undersökts med ett urval ekotoxikologiska testmetoder dels vid direkt exponering, dels efter utlakning i vatten. 10-11 sorbenter representerande olika ursprung och råmaterial har ingått. Effekter av lakvatten av sorbenter på undersökta organismer i landmiljö var mycket små. Vissa sorbentmedel utövade toxiska effekter på organismer i vattenmiljön antingen i test med hela sorbenten närvarande eller via utlakning och exponering för en vattenfas. Multivariat analys av data visade att algtest, Microtox-test, och akut toxicitet i test av fiskyngel gav unik information om toxiska egenskaper hos sorbenter. Ingen av dessa tre organismer/tester kan ersättas av någon av de andra.	
<b>Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område, näringsgren eller vattendrag/Keywords</b> Sorbent, oljespill, kemikaliespill, Microtox, fisktoxicitet, algtoxicitet, Daphnia, markttest, multivariat analys, ekotoxikologi	
<b>Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data</b> IVL Rapport/report B 1371	
<b>Beställningsadress för rapporten/Ordering address</b> IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm fax: 08-31 85 16, e-mail: <a href="mailto:publicationservice@ivl.se">publicationservice@ivl.se</a>	

## Innehållsförteckning

Sammanfattning .....	4
Summary .....	4
1. Inledning, bakgrund .....	5
2. Material och metoder .....	6
2.1 Testade sorbenter .....	6
2.2 Beredning av lakvatten .....	6
2.3 Test av akut akvatisk toxicitet .....	6
2.3.1 Microtox-test.....	6
2.3.1.1 Test av lakvattenprover .....	7
2.3.1.2 Test av sorbenter i fast form.....	7
2.3.1.3 Test av sorption av bakterier .....	7
2.3.2 Algtest.....	8
2.3.2.1 Utförande.....	8
2.3.2.2 Beräkning av algtoxicitet.....	8
2.3.3 Kräfdjurstest.....	10
2.3.4 Fisktoxicitetstest .....	10
2.4 Test av effekter i terrester miljö.....	11
2.4.1. Test med högre växter.....	11
2.4.2 Test med ringmaskar.....	12
2.5 Multivariat statistisk databehandling.....	12
3. Resultat och diskussion.....	12
3.1 Val av lakningsmetod .....	12
3.2 Akvatisk toxicitet.....	13
3.2.1 Microtox-test.....	13
3.2.1.1 Test av lakvatten av sorbenter.....	13
3.2.1.2 Test av sorbenter i fast form.....	14
3.2.2 Algtest.....	16
3.2.3 Kräfdjurstest.....	19
3.2.4 Fisktoxicitetstest .....	19
3.3 Markmiljö.....	20
3.3.1 Test med högre växter.....	20
3.3.2 Masktest.....	21
4 Jämförande utvärdering.....	22
5 Slutsatser .....	29
6 Tillkännagivanden.....	29
7 Referenser .....	30

## Sammanfattning

Projektets syfte är att ta fram bedömningsgrunder för miljöpåverkan för sorbenter och deras användning vid bekämpning av olje- och kemikaliespill. Som en del av detta ingår en prövning och utvärdering av lämpliga ekotoxikologiska testmetoder. Med dessa metoder ska effekter i olika miljöer, på olika organismer och i olika nivåer i ekosystemet kunna mätas och värderas.

Oanvända sorbenter har undersökts med ett urval ekotoxikologiska testmetoder dels vid direkt exponering, dels efter utlakning i vatten. 10-11 sorbenter representerande olika ursprung och råmaterial har ingått. Effekter av lakvatten av sorbenter på undersökta organismer i landmiljö var mycket små. Vissa sorptionsmedel utövade toxiska effekter på organismer i vattenmiljön antingen i test med hela sorbenten närvarande eller via utlakning och exponering för en vattenfas. Multivariat analys av data visade att algtest, Microtox-test, och akut toxicitet i test av fiskyngel gav unik information om toxiska egenskaper hos sorbenter. Ingen av dessa tre organismer/tester kan ersättas av någon av de andra.

## Summary

The purpose of this project is to develop means for evaluation of environmental impacts of sorbent materials and their use in combats of spills of oil and chemicals. Application and evaluation of suitable ecotoxicological test methods was performed on a set of unused products representing different types of sorbing materials. The sorbents were tested either directly or as aqueous elutriates.

Effects of elutriates on terrestrial organisms were very small or missing. Some sorbents were toxic to aquatic organisms when tested either directly or as elutriates. Multivariate data analysis using Microtox test data, algal and fish toxicity showed that all three tests provided unique information on acute toxicity and none could replace another.

## 1. Inledning, bakgrund

Vid större spill av olja och kemikalier används i första hand metoder som går ut på att pumpa eller suga upp substanserna. I ett senare skede eller vid mer begränsade spill kommer olika sorberande material till användning. En aktuell översikt över produkter på den svenska marknaden har nyligen utgivits (Fejes m. fl. 1999). Dessa sorptionsmedel eller sorbenter kan användas vid spill utomhus på mark och i vatten såväl som inomhus t. ex. i industrilokaler. Efter användning hanteras sorbenterna vanligtvis som miljöfarligt avfall och transporteras till anläggningar för destruktion. Olika alternativa sätt för destruktion utreds t. ex. kompostering eller att enbart låta använda sorbenter ligga kvar i naturen för att där brytas ned tillsammans med sitt sorberade spill.

Vid all användning överdoseras sorbenter och vid större spill, där sorptionsmetodik tillämpas, används stora mängder sorberande material. Lokalt kan således miljöpåverkan bli betydande även av oanvända sorbenter. Det är därför motiverat att värdera effekter i de miljöer där sorbenter kan förväntas hamna vid bekämpning av spill av olja och kemikalier.

Undersökningen syftar till att visa användbarheten av olika ekotoxikologiska testmetoder i en miljömässig prövning av sorbenter för olje- och kemikaliespill samt att utreda möjligheten att ersätta vissa metoder med andra. Urvalet av testmetoder har skett efter flera kriterier. Metoderna för test av lakvatten har i första hand valts för att utvärdera effekter i vattenmiljön, men även tre organismer representerande landmiljön ingår. Microtox-test är en screen-metod för i första hand akuta effekter på akvatiska organismer. Toxicitetstest med fisk är vald som den billigaste metod att mäta akuta effekter i fisk. Batteriet av tester representerar vidare olika trofnivåer i akvatiska (och terrestra) ekosystem.

Undersökningen ingår som en del i projektet "Sorbenter för olje- och kemikaliespill. Utveckling av en bedömningsmetodik för miljöanpassad produktion, lagring, transport, användning och omhändertagande" som genomförs under en tvåårsperiod vid Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning, IVL, Stockholm. Projektet finansieras av Naturvårdsverket, Räddningsverket, tillverkare, distributörer och användare av sorbenter.

## 2. Material och metoder

### 2.1 Testade sorbenter

Sorptionsmedlens sammansättning och ursprung framgår av Tabell 1. Produkternas identitet har kodats med beteckningar från Z1 till Z11.

Tabell 1. Sammansättning och ursprung i testade sorbenter.

Sorbent	Material	Ursprung
Z 1	Gummi	Bildäck
Z 2	Gummi	Bildäck
Z 3	Bark/träflis	Skogsråvara
Z 4	Silikatmineral	Moler
Z 5	Polyuretan	Isolering från kylskåp
Z 6	Träspån	Skogsråvara
Z 7	Träspån	Skogsråvara
Z 8	Bark/träflis	Skogsråvara
Z 9	Torv	Torv
Z 10	Polypropylen/cellulosa	Olja/skogsråvara
Z 11	ej deklarerat	växt- och animalisk råvara

### 2.2 Beredning av lakvatten

Till 200 mL destillerat vatten har 2,00 g sorbent tillsatts (10 g sorbent per dm<sup>3</sup> vatten, eller L/S 100). Blandningen har sedan stått på skakbord med långsam omrörning i 24 timmar, varefter lösningen filterats med pappersfilter och 0,45 µm Milliporfilter samt därefter pH-justerats. Betingelserna för lakning har utprovats med multivariat statistisk analys med två av sorbenterna och Microtox-test (Andersson och Zetterberg 1998).

### 2.3 Test av akut akvatisk toxicitet

#### 2.3.1 Microtox-test

Microtox-test är ett bakteriellt bioluminiscenstest som ofta används som screenmetod för akut akvatisk toxicitet. Den ljusalstrande processen, som är kopplad till cellens energiomvandling, störs av toxiska ämnen i testmediet. Bakterier exponeras för prov av fyra olika koncentrationer under 5 och 15 min. Ur dos-effektsambandet beräknas EC<sub>50</sub> och EC<sub>20</sub>, dvs de effektnivåer som motsvarar 50 och 20 % minskning av

ljusintensiteten. Koncentrationer väljs med ledning av ett preliminärt  $EC_{50}$ , som bestämts i förtest. För medel- och högtoxiska prover av blandningar av ämnen används test i duplikat med intensitetsmätning före provtillsats, efter 5 och slutligen efter 15 min (normal-metoden). Lågtoxiska prover ( $EC_{50} > 45\%$ ) testas i triplikat i en särskild procedur (100 %-metoden). Metodiken följer i huvudsak manualen för testapparaturen (Anon. 1992) med de modifieringar som introducerats senare (Svenson 1993).

### **2.3.1.1 Test av lakvattenprover**

Lakvattenprover beredda enligt ovan tinades, tempererades till  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  och justerades till  $\text{pH } 7,3 \pm 0,05$  före test. Ur  $EC_{20}$  beräknades motsvarande  $TU_{20}$ -värden (se nedan) och dessa anges per mL lakvatten och per g sorbent.

### **2.3.1.2 Test av sorbenter i fast form**

Bakterier exponerades i direkt kontakt med en suspension av sorbentpartiklar i fyra olika koncentrationer under 30 min. Ur dos-effektsambandet beräknas  $EC_{50}$ , dvs den effektnivå som motsvarar 50 % minskning av ljusintensiteten. Resultat beräknas som toxiska enheter (TU) genom invertering av  $EC_{50}$  och anges per g torrsvikt sorbent. Koncentrationer väljs med ledning av ett preliminärt  $EC_{50}$  som bestämts i förtest. Huvudtest utförs med triplikat av prov och kontroller och korrektion för ljusspridning utförs med prov av varje koncentration. För detaljer i utförande och utvärdering hänvisas till publicerade beskrivningar av testmetodik för sedimentprover och jordprover (Svenson m. fl. 1994, 1996a, Svenson 1996).

Vissa modifieringar har dock införts för att optimera metodens tillämpning på sorbenter. Till 9 g sorbent tillsattes 90 mL lösning av 2 % NaCl, 15 mM Na-fosfat, varefter pH justerades till  $7,3 \pm 0,05$ . Ett förtest i monoplakat utfördes med provolymer om 2,25 mL och en bakteriesuspension om 30  $\mu\text{L}$  för att fastställa ett preliminärt värde på  $EC_{50}$ . Utifrån detta avgjordes om proverna behövde spädas i huvudtestet.

I huvudtestet exponerades bakterier (30  $\mu\text{L}$  bakteriesuspension) i 30 min för 2,25 mL suspensioner av prov om fyra koncentrationer i triplikat med en spädserie med spädfaktorn 2. Efter 30 minuter avskiljdes bakterierna från provet genom filtrering och intensiteten mättes efter ytterligare 5 minuter. Korrektion för ljusspridning och ljusabsorption utfördes slutligen eftersom proverna även efter filtreringen innehöll partikulärt material och i vissa fall var färgade.

### **2.3.1.3 Test av sorption av bakterier**

Vid tillämpning av Microtox-test med direktexponering för test av sorbenter är sorption av bakterier till det fasta materialet en möjlig felkälla. I anslutning till toxicitetstestet

utfördes även en absorbansmätning i syfte att dels bestämma upptaget av bakterier till sorbenterna, dels att bestämma hur stor andel av bakterierna som avskiljdes vid filtreringen av suspensionen av bakterier och prov. Ett absorbansspektrum för bakteriesuspensionen uppmättes först med en spektrofotometer för att fastställa en lämplig våglängd för mätning av bakteriehalt via dess ljusspridning. Vid 350 nm emitterade inte den luminiserande bakterien ljus. Vid denna våglängd absorberade bakteriesuspensionen ljus med en gradvis ökande absorption med avtagande våglängd vilket kunde förväntas vid ljusspridning av partikelsuspensionen.

Absorbansen mättes sedan i följande prover: filtrat av sorbent med bakterietillsats, filtrat av enbart bakterier resp. enbart sorbent. Andelen bakterier som fastnat på sorbenten beräknades ur skillnaden mellan absorbansen i prov av sorbent med bakterier och prov av enbart sorbent och relaterades till absorbansen i prov av enbart bakterier.

Samtidigt undersöktes filteranordningens avskiljning av bakterier då det tidigare har misstänkts att bakterier inte fritt passerat genom filtret. Absorbansen vid 350 nm uppmättes i en bakteriesuspension före och efter filtrering i det filterkit som tillverkaren tillhandahåller.

## **2.3.2 Algtest**

### **2.3.2.1 Utförande**

Algtoxicitet uppmättes i ett kommersiellt tillgängligt toxicitetstest som baseras på sötvattentalgen *Raphidocelis subcapitata*, tidigare benämnd *Selenastrum capricornutum* (ALGALTOXKIT F™, Bio International B.V., Roermond, Holland). När algen exponeras för toxiska substanser lösta i vatten inhiberas tillväxten. Testerna har utförts i enlighet med tillverkarens manual. Prover av lakvatten pH-justerades till  $8,0 \pm 0,2$ . Fem koncentrationer av lakvatten bereddes i triplikat och överfördes till 10 cm långa kyvetter avsedda för detta ändamål. Algcellerna inkuberades under 72 timmar i konstant temperatur (23 °C) och en ljusstyrka om 8000 lux. Koncentrationen av alger bestämdes genom att var 24:e timme mäta absorbansen i lösningen med en kolorimeter (Jenway 6062) vid 670 nm. Absorbansen mättes omedelbart, varefter kyvetterna åter placerades i inkubatorn.

### **2.3.2.2 Beräkning av algtoxicitet**

Den toxiska effekten erhöles genom att upprätta en dos-effektkurva, varur EC-värden beräknades. Fyra olika sätt att beräkna toxisk effekt i algtest tillämpades, två med biomassa och två med tillväxthastighet som beräkningsgrund.



1) Ur de genomsnittliga absorbansvärdena ( $N$ ) för triplikat, beräknades arean ( $A_i$ ) under tillväxtkurvan för varje testkoncentration:

$$A_i = \frac{N_1 - N_0}{2} t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

där  $N$  egentligen är antalet algceller per mL, men  $N$  är proportionell mot absorbansen. Från detta värde på arean beräknades den procentuella inhiberingen ( $I_A$ ) för varje testkoncentration, jämfört med ett kontrollprov ( $A_c$ ):

$$I_A = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100$$

Resultatet från en gradient med fem koncentrationer avsattes sedan enligt funktionen:

$$I_A = f(\log C)$$

Med minsta-kvadratmetoden anpassades en rät linje till punkterna och ur denna beräknades  $EC_{50}$  och  $EC_{20}$ .

2) Metod 2 utgår också från biomassa och arean under absorbans-tidkurvan. Här beräknades inhiberingen ur:

$$I_A = \frac{A_i}{A_c - A_i}$$

och en rät linje anpassades till punkterna i funktionen:

$$\log(I_A) = f(\log C)$$

Ur denna linjära anpassning beräknades  $EC_{50}$  och  $EC_{20}$ .

3) Den tredje metoden för utvärdering av algtest baserades på tillväxthastigheten i alkkulturen. Tillväxthastigheten ( $\mu$ ) beräknades enligt:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

där  $N_0$  och  $N_n$  är celltäthet (absorbans) vid start och slut av tidsperioden  $t_n$ . Medelvärden av hastigheten mätt vid tre tidpunkter beräknades. Inhiberingen beräknades därefter ur:

$$I_R = \frac{\mu_i}{\mu_c - \mu_i}$$

och en rät linje anpassades med minsta-kvadratmetoden till inhibitionsdata i funktionen:

$$\log(I_R) = f(\log C)$$

Ur denna linjeanpassning beräknades EC<sub>50</sub> och EC<sub>20</sub>.

4) Beräkningsmetod 4 baserades på tillväxthastighet, men utgår från ändringen i (log-transformerad) celltäthet per tidsenhet som mått på tillväxthastigheten. En rät linje anpassades till funktionen:

$$\log(N_n) = f(t)$$

varur tillväxthastigheten ( $\mu$ ) beräknades ur regressionskoefficienten. Inhiberingen beräknades enligt:

$$I_R = \frac{\mu_i}{\mu_c - \mu_i}$$

och en rät linje anpassades till funktionen:

$$\log(I_R) = f(\log C)$$

På samma sätt som ovan beräknades EC<sub>50</sub> och EC<sub>20</sub> ur denna linjeanpassning.

Ur EC-värden beräknades toxiska enheter (TU) genom invertering och dessa värden relaterades per viktsenhet sorbent och uttrycktes som TU per g sorbent.

### 2.3.3 Kräftdjurstest

Testet mäter dödlighet hos kräftdjuret *Daphnia magna* efter en exponeringstid av 24 och 48 timmar. Ett toxkit, DAPHTOXKIT F<sup>TM</sup> MAGNA (Bio International B. V., Roermond, Holland), användes vid testet, som utfördes enligt SS-EN ISO (1996).

Efter tining tempererades provet till  $20 \pm 2$  °C och pH-justerades till  $7,8 \pm 0,2$  varefter en koncentrationsserie bereddes. Varje koncentration och kontroll omfattade 20 djur fördelade på fyra replikat och varje replikat innehöll 10 mL testlösning alternativt spädmedium för kontrollen. Antalet orörliga djur per koncentration registrerades efter 24 och 48 timmars exponering. pH och syremättnad kontrollerades före och efter exponeringen. Resultaten beräknades och angavs som EC<sub>10</sub>, EC<sub>25</sub> och EC<sub>50</sub> med ett databaserat program för probitanalys (SNV, Version 2.1, preliminary C, 1989-01-31). Ur dessa data beräknades även EC<sub>20</sub>, vilket i sin tur omräknades i TU<sub>20</sub> för jämförelser med övriga tester.

### 2.3.4 Fisktoxicitetstest

Yngel av sebrafisk exponerades för lakvatten av sorbenter och ynglens överlevnad avlästes dagligen, varefter LC<sub>20</sub> och LC<sub>50</sub> beräknades för exponering under 4 och 7 dygn

enligt försöksmetodik som harmoniserar med US EPA-metoden 600/4-91-021 "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and surface water to fresh water organisms". Lakvattenprov tinades över natt vid 4°C och tempererades därefter sakta upp till 24°C. Lakvattens pH justerades med konc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> till 7,5 och syrehalter kontrollerades innan testlösningar bereddades.

Försöken utfördes med 2-3 dygn gamla yngel av sebrafisk (*Danio rerio*) som utvecklats i rent sötvatten under embryo/yngelstadiet. Exponeringen av 10 st slumpmässigt valda yngel per koncentration utfördes i petriskålar av glas innehållande 50 mL testlösning. Det av standarden föreskrivna spädvattnet användes. Testlösningar i en koncentrationsserie bereddades genom blandning av tempererat (25°C) och pH-justerat (7,5) lakvatten med spädvatten till avsedda koncentrationer. Försöken startade med 6 olika koncentrationer inom intervallet 100-20 % (v/v) och kompletterades vid behov med ytterligare 8-10 lägre koncentrationer.

Exponeringar pågick under minst 7 dygn och testlösningar förnyades dagligen genom att alla levande yngel överfördes med flampolerade pastuerpipetter till nyberedda lösningar. Samtidigt med bytet kontrollerades antalet döda eller på annat sätt påverkade yngel. pH och syremättnad kontrollerades dagligen för att verifiera att inte dessa faktorer påverkat yngelns överlevnad. Mortalitetsdata behandlades med probitanalys enligt Litchfield och Wilcoxon (1949) vilket ger LC<sub>50</sub>-värden (medianvärden för letala koncentrationer) efter olika exponeringstider.

## 2.4 Test av effekter i terrester miljö

### 2.4.1. Test med högre växter

Hämmande effekter på tillväxten av skott och rötter av engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), och vitklöver (*Trifolium repens*) undersöktes med lakvatten av sorbenter. Frön förgroddes vid 20 °C i mörker 1-2 dygn före teststart. Som testkärl användes grunda, rektangulära plastskålar. 15 g (våtvikt) artificiell jord, beredd enligt OECD's guidelines (1993), justerad till pH 6,5 ± 0,5 lades i ett tunt lager i skålen och genomvattnades med 15 mL lakvatten. Efter tillsats av lakvattnen täcktes innehållet i skålen med ett filterpapper, på vilket fem förgrodda frön av testväxten placerades. Skålen täcktes med ett tätslutande lock och inkuberades vid 25 °C i mörker i tre dygn, varefter rot- och skottlängd uppmättes. Testen utfördes enligt en metod använd bl. a. av Nyffeler m. fl. (1982) och Malmberg m. fl. (1998).

Varje lakvatten testades i fyra replikat mot vardera av testväxterna. Signifikansen av effekterna beräknades från de numeriska resultaten genom Student's t-test.

### 2.4.2 Test med ringmaskar

Effekter på reproduktionen hos en art ringmaskar testades med lakvatten av sorbenter. Maskar av arten *Enchytraeus crypticus* odlades på agarplattor och utfodrades med havregrynsgröt. Testen utfördes på agarplattor (pH 5,5) i vilka olika koncentrationer av lakvattnen samt havregryn gjutits in. Fem maskar överfördes till varje testplatta, varefter plattorna inkuberas i mörker vid 20 °C. Efter 5 dygn räknades de lagda kokongerna och testdjuren flyttades till nya plattor. Detta upprepades 4 ggr. Samtliga plattor sparades och 10 dagar efter det att kokongerna hade räknats noterades antalet helt tomma kokonger, dvs de som övergetts av samtliga nykläckta maskar. Testen varade i 30 dygn, varav 20 för exponering av maskarna. Testen mäter överlevnad och reproduktion i form av antal lagda kokonger och deras kläckningsfrekvens. Testen utfördes enligt en metod beskriven av Westheide och Bethke-Beilfuss (1991) samt Malmberg m. fl. (1998).

Lakvattnen testades i koncentrationerna 50 och 500 mL/L agar. Varje koncentration omfattade 20 maskar fördelade på fyra replikat. Signifikansen av effekterna beräknades från de numeriska resultaten genom Student's t-test.

## 2.5 Multivariat statistisk databehandling

En multivariat statistisk behandling har gjorts på resultaten av test av toxicitet på sorbenter. Den multivariata metod som använts är principalkomponentanalys, PCA, enligt tidigare beskrivning (Chatfield och Collins 1980, Svenson m. fl. 1996b). Underlag för behandlingen var dels data för lakvatten från test med tre olika organismer, dels ett test med direkt exponering av sorbentmaterial för bakterier. Effektparametrar var EC-värden från två effektnivåer, 20 och 50 % av full effekt. I flera fall har effektparametrar beräknade med olika metodik fått ingå. De tre testorganismerna är *Vibrio fischeri* (Microtox-test), *Danio rerio*, sebrafisk (yngelöverlevnad) och en encellig grönalg, *Raphidocelis subcapitata* (tillväxttest).

## 3. Resultat och diskussion

### 3.1 Val av lakningsmetod

De betingelser för lakning av sorbenter som användes, valdes utan särskild hänsyn till olika sorbenters användningssätt. Således valdes rumstemperatur ( $21 \pm 1^\circ$ ) istället för olika utomhustemperaturer som kan förekomma vid sanering av spill. Omrörningen vid beredningen av lakvatten kan möjligen liknas vid lugna vågrörelser på en sjöyta. Valet av extraktionsmedel (destillerat vatten) och lakningstid styrdes av behovet av

jämförbarhet mellan produkterna. Ingen justering av pH förekom före eller under lakningen.

## 3.2 Akvatisk toxicitet

### 3.2.1 Microtox-test

#### 3.2.1.1 Test av lakvatten av sorbenter

Erhållna värden för 10 undersökta sorbenter presenteras i Tabell 2.

Tabell 2. Microtox-test av lakvatten av sorbenter för olje- och kemikaliespill.

Sorbent	EC <sub>50</sub>		EC <sub>20</sub>		TU <sub>20</sub>	TU <sub>20</sub> /g sorbent
	5 min	15 min	5 min	15 min	15 min	15 min
Z 1	27,3	17,3	5,5	2,6	38	3850
Z 2	>>100	>>100	>>100	>>100	<<1	<<100
Z 3	>100	>100	44,0	52,4	2	191
Z 4	>>100	>>100	>>100	>>100	<<1	<<100
Z 5	>100	>100	>100	>100	<1	<100
Z 6	23,4	17,2	7,9	5,7	18	1760
Z 7	19,2	14,2	6,1	4,9	20	2030
Z 8	>100	>100	>100	79,5	1	126
Z 9	>100	>100	>100	>100	<1	<100
Z 10	65,2	53,6	15,7	14,0	7	714

Lakvatten av två sorbenter var icke-toxiska i Microtox-test, dvs ingen dosberoende effekt kunde iakttagas. Lakvatten av ytterligare två sorbenter gav heller ingen mätbar effekt vid nivåerna för EC<sub>50</sub> och EC<sub>20</sub>, men en svag dosberoende effekt kunde dock iakttagas. Ytterligare två lakvatten av sorbenter gav mätbara effekter på EC<sub>20</sub>-nivå men inte EC<sub>50</sub>-nivå. Toxiciteten för dessa sorbenter uppgick till mellan 100 och 200 TU<sub>20</sub>/g. Vidare erhöles mätbara nivåer i test av fyra lakvatten vid såväl EC<sub>20</sub> som EC<sub>50</sub>, toxiciteter motsvarande 700-4000 TU<sub>20</sub>/g erhöles i test av dessa lakvatten.

I de fall där jämförelser är möjliga, var toxiciteten högre efter 15 min exponering än efter 5 min, vilket bör tolkas som en tidsberoende utveckling av den mätbara toxiska effekten.

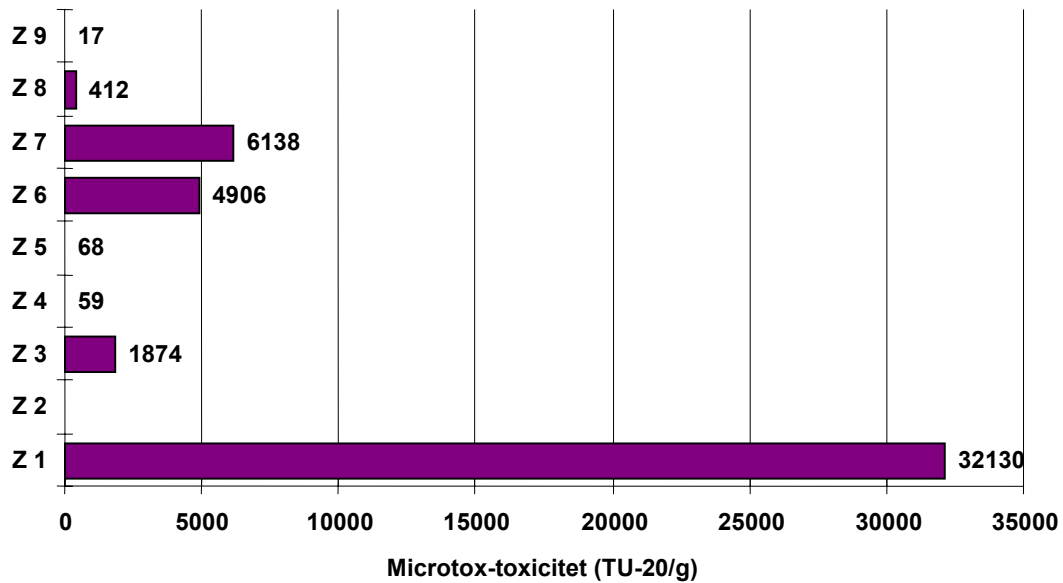
### 3.2.1.2 Test av sorbenter i fast form

I Microtox-test med direktexponering har åtta av tio utvalda sorbenter kunnat testas. Metoden gick ej att tillämpa på två av sorbenterna, Z2 och Z10, på grund av materialens form och egenskaper. Erhållna värden för de åtta undersökta sorbenterna presenteras i Tabell 3. Resultaten ges också i diagram i Fig. 1.

Tabell 3. Microtox-test av sorbenter med direktexponering.

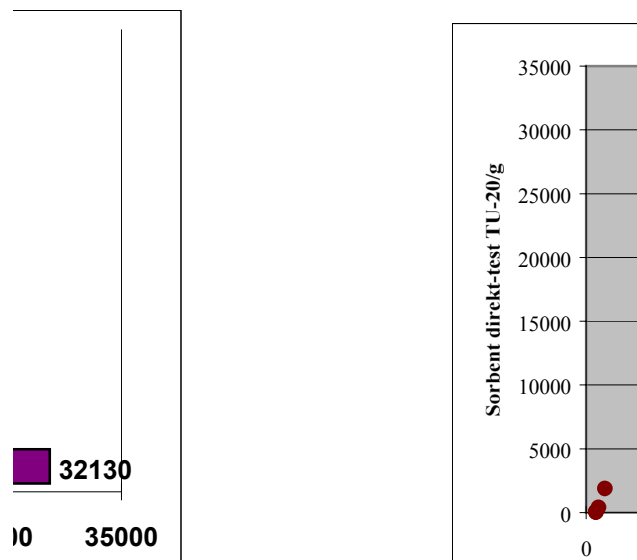
Sorbent	EC <sub>50</sub> , 30 min (mg/ml)		EC <sub>20</sub> , 30 min (mg/ml)		TU <sub>20</sub> /g sorbent
	M	stdav	M	stdav	
Z 1	0,112	0,016	0,0314	0,0040	32100
Z 2	ej undersökt				
Z 3	2,07	0,60	0,549	0,047	1870
Z 4	57,6	9,1	17,5	3,8	59
Z 5	31,6	1,6	15,0	1,0	68
Z 6	0,725	0,072	0,205	0,009	4910
Z 7	0,607	0,032	0,172	0,061	6140
Z 8	8,23	0,60	2,51	0,58	412
Z 9	>100	-	66,9	26	17
Z 10	ej undersökt				

Tre sorbenter uppvisade låg toxicitet, med EC<sub>20</sub>-värden över 10 mg sorbent/ml, en sorbent uppvisade toxicitet med EC<sub>20</sub> mellan 1-10 mg/ml, medan fyra produkter kan klassificeras som högre toxiska. Högst toxicitet erhöles i sorbent Z1.



Figur 1. Microtox-test av sorbenter med direktexponering

Genomgående erhöles högre EC-värden i test med direktexponering än i lakvattentest i överensstämmelse med iakttagelser i tidigare tillämpningar av test av prover i fast fas (se Fig. 2). Toxiciteten testad via utlakning motsvarade 10-33 % av totala effekten som uppmätts i direktexponering i de fall där kvantifierbara resultat erhöles, vilket innebär att 67-90 % orsakas av toxiska ämnen som är så fast bundna till sorbenterna att de inte utlakas vid de betingelser som använts.



Figur 2. Förhållande mellan Microtox-test av sorbenter vid test med direktexponering och via lakvatten av sorbenter.

Sorption av bakterier till fasta partiklar kan vara en faktor som påverkar resultaten i form av uppmätt toxicitet. Resultat av absorbansmätningarna presenteras i Tabell 4.

Tabell 4. Absorbansmätning av sorption av bakterier till sorbenter vid 350 nm.

Sorbent	A(sorbent)	A(sorbent + bakterier)	A(bakterier)	A(bakterier efter filtrering)	Sorberade bakterier (%)	Bortfiltrerade bakterier (%)
Z 1	0,004	0,026	0,046	0,019	-17	58
Z 3	0,062	0,078	0,033	0,030	47	8
Z 4	1,416	1,588	0,039	0,017	-894	55
Z 5	0,191	0,201		0,066	86	
Z 6	0,131	0,138	0,050	0,025	74	50
Z 7	0,014	0,038	0,039	0,017	-39	55
Z 8	0,491	0,468	0,050	0,025	195	50
Z 9	2,230	2,101	0,033	0,030	529	8

Resultaten av mätningarna av sorption av bakterier på sorbenter visade stor spridning i erhållna värden med i några fall orimliga resultat. Sannolikt bidrar beräkningar av värden ur små differenser mellan höga absorbansvärden till osäkerheten i resultaten. Andra metoder att mäta en eventuell sorption av bakterier till sorbenter har övervägts, t.ex. partikelräkning eller odling av bakterier för bestämning av cellantal. Dessa metoder har undvikits på grund av alltför stor onoggrannhet. Att sorption inte verksamt bidrar till minskningen i ljusintensitet i toxicitetstesten styrks av korrelationen mellan resultat av test av lakvatten av sorbenter och test med direktexponering (jmf. Fig. 2).

Resultat av mätningarna av avfiltrering av bakterier tyder på att 50-60 % går förlorade vid filtreringen. Om man kan anta att denna förlust är konstant vid exponering av olika suspensioner i olika koncentrationer och i kontroller, kan ändå jämförbara resultat erhållas.

### 3.2.2 Algtest

Resultaten av algtest ges i Tabell 5. Fyra olika sätt att beräkna hämning av alg tillväxt vid två nivåer av toxicitet,  $EC_{50}$  och  $EC_{20}$ , har tillämpats.



Tabell 5 Algtest av lakvatten av sorbenter för olje- och kemikaliespill

	Inhibition av biomassa EC <sub>50</sub> , g/L		Inhibition av tillväxthastighet EC <sub>50</sub> , g/L		Inhibition av biomassa EC <sub>20</sub> , g/L		Inhibition av tillväxthastighet EC <sub>20</sub> , g/L	
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Z 1	3,3	1,5	1,6	1,4	0,76	0,80	0,79	0,64
Z 2*								
Z 3	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10
Z 4	>>10	>>10	4,7	>>10	>>10	>>10	1,0	>>10
Z 5	9,9	9,8	5,7	5,4	0,17	0,10	3,1	2,7
Z 6	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
Z 7	0,28	0,26	0,57	0,61	0,12	0,13	0,42	0,36
Z 8	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10
Z 9	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10
Z 10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10	>>10
Z 11	1,7	2,1	2,5	1,1	0,95	1,5	1,3	0,63

\*Z2 ej undersökt

Lakvatten av flera sorbenter t. ex. Z3, Z8, Z9 och Z10, gav ingen toxisk effekt i algtest. I test av de tre först nämnda indikerades stimulering av tillväxten. Toxiska effekter erhöles med lakvatten av Z1, Z5, Z7 och Z11, varav Z7 hade den högsta effekten. Sorbent Z6 gav också en tillväxtinhiberande effekt men här kunde endast ett intervall för toxiciteten anges. Lakvatten av Z4 visade ingen toxisk effekt (snarare stimulering) i ett sätt att beräkna resultat. Utvärdering av algens tillväxthastighet indikerade en tillväxthämmande effekt. Test av kaliumdikromat som positiv kontroll gav EC<sub>50</sub> = 0,35 g/L (tillväxt som biomassa) vilket ligger inom metodens (cellkulturens) stipulerade responsintervall, 0,3 –0,7 g/L.

Testresultatens EC-värden har omräknats till toxiska enheter (TU) som uttrycks per g sorbent (se Tabell 6).

Tabell 6 Toxiciteten i algtest av lakvatten av sorbenter

	Inhibition av biomassa TU <sub>50</sub> /g		Inhibition av tillväxthastighet TU <sub>50</sub> /g		Inhibition av biomassa TU <sub>20</sub> /g		Inhibition av tillväxthastighet TU <sub>20</sub> /g	
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Z 1	300	690	610	730	1300	1200	1300	1600
Z 3	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100
Z 4	<<100	<<100	990	<<100	<<100	<<100	210	<<100
Z 5	100	100	170	180	5800	9600	330	370
Z 6	100- 200	100- 200	100- 200	100- 200	100- 200	100- 200	100- 200	100- 200
Z 7	3600	3800	1700	1600	8500	7700	2400	2800
Z 8	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100
Z 9	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100
Z 10	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100	<<100
Z 11	580	480	400	950	1100	690	750	1600

Som framgår av Tabell 5 och 6 varierade toxiciteten i algtest beroende på vilken metod att beräkna som tillämpades. Metoden att kvantifiera biomassa är den mest använda och den betecknad med (I) följer den som rekommenderas i manualen till testmetoden från den belgiske leverantören av material till testet. Metod I och II skiljer sig endast genom att i den senare är även effektparametern logtransformerad före den linjära anpassningen till doskurvan.

Metoder att beräkna toxicitet mot alger baserade på tillväxthastighet förordas beroende på att denna effekt, mätt i tillväxtens logaritmiska fas, inte är lika beroende av design av testsystemet som biomasseökningen är (Nyholm 1985). Effekter på tillväxthastigheten är vanligtvis något större än på biomassan (Annette Pettersson, muntl. medd.).

I föreliggande undersökning gav endast fyra av 10 undersökta sorbenter numeriska värden på algtoxicitet. Underlaget är alltför litet för att kunna användas till att pröva de olika beräkningssätten. Metod III och IV skiljer sig på samma sätt som I och II genom att i metod IV är även effektmåttet logtransformerat.

### 3.2.3 Kräfdjurstest

Resultat av Daphnia-test av lakvatten av sorbenter ges i Tabell 8. Z3 och Z10 uppvisade inga mätbara effekter på överlevnaden av Daphnia. Toxiciteten som TU blir därmed <100 per g sorbent. Z4 däremot påverkade överlevnaden och en toxisk effekt av 1110 TU<sub>20</sub>/g uppmättes.

Tabell 8 Toxiciteten i Daphnia-test av lakvatten av sorbenter

Sorbent	EC 48h (% v/v)			TU/g sorbent	
	EC <sub>10</sub>	EC <sub>20</sub>	EC <sub>50</sub>	TU <sub>20</sub>	TU <sub>50</sub>
Z 3	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 4	7,6	9,0	12,0	1110	830
Z 10	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100

### 3.2.4 Fisktoxicitetstest

Lakvattens effekter på yngelöverlevnad hos sebrafisk redovisas i Tabell 9. Fem undersökta lakvatten, Z3, Z4, Z8, Z9 och Z10 gav ingen toxisk effekt i test med sebrafiskyngel. Fyra sorbenter visade toxisk effekt på yngelöverlevnaden varav tre med fullt mätbara effekter vid såväl LC<sub>20</sub> som LC<sub>50</sub>-nivå. I det fjärde testet (Z7) erhöles för få mätpunkter för att LC<sub>20</sub> skulle kunna beräknas. Sorbent Z5 gav en låg toxisk effekt, där LC<sub>50</sub> uppnåddes vid 100 % inspädning. Testdata gav ej möjlighet att beräkna lägre effektnivåer.

Tabell 9 Toxiciteten i test med yngel av sebrafisk av lakvatten av sorbenter

Sorbent	LC (% v/v)				TU/g sorbent	
	LC <sub>20</sub>		LC <sub>50</sub>		TU <sub>20</sub>	TU <sub>50</sub>
	4 d	7 d	4 d	7 d	7 d	7 d
Z 1	17-25	6,8	25	13	1470	790
Z 3	>>100	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 4	>>100	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 5	(<100)*	(<100)	>100	100	(>100)	100
Z 6	25	9,1	29	13	1100	750
Z 7	(<25)	(<25)	38	25	(>400)	400
Z 8	>>100	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 9	>>100	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 10	>>100	>>100	>>100	>>100	<<100	<<100
Z 11	36-50	12	50	16	830	650

\* värden inom parentes ej numeriskt beräkningsbara

### 3.3 Markmiljö

#### 3.3.1 Test med högre växter

Resultaten från test av rot- och skotttillväxt hos högre växter ges i Tabell 10. Ingen signifikant hämning av tillväxten kunde iaktas med lakvatten av någon av sorbenterna. I tre tester uppmättes en låg men signifikant stimulering av rottillväxten av vitklöver, nämligen med lakvatten av sorbenterna Z3, Z8 och Z10. Även påverkan i stimulerande riktning kan få miljömässiga konsekvenser på växtlighet.

Tabell 10 Test av rot- och skotttillväxt hos engelskt rajgräs och vitklöver

Engelskt rajgräs								
Sorbent	Rot (mm)				Skott (mm)			
	n	M	sd	Sign/ Ej sign*	n	M	sd	Sign/ Ej sign
Kontroll	20	35,7	7,4		20	28,1	5,7	
Z 1	20	32,7	9,1	NS	20	28,4	5,1	NS
Z 8	20	34,3	10,1	NS	20	30,7	5,9	NS
Z 9	20	34,5	6,1	NS	20	28,0	5,6	NS
Z11	20	36,9	3,5	NS	20	28,8	6,0	NS
Kontroll	20	35,0	9,9		20	27,3	10,4	
Z3	20	35,7	7,4	NS	20	29,3	5,4	NS
Z4	20	32,8	7,9	NS	20	26,0	5,2	NS
Z 10	20	35,6	9,7	NS	20	24,9	7,7	NS
Kontroll	20	33,5	6,2		20	25,1	4,6	
Z5	20	36,3	5,8	NS	20	26,4	5,2	NS
Z6	20	37,7	9,3	NS	20	24,6	4,6	NS
Z7	20	35,7	7,0	NS	20	24,4	4,8	NS
Vitklöver								
Sorbent	Rot (mm)				Skott (mm)			
	n	M	sd	Sign/Ej sign	n	M	sd	Sign/Ej sign
Kontroll	20	12,3	2,3		20	20,9	5,9	
Z 1	20	11,6	4,7	NS	20	18,3	7,8	NS
Z 8	20	14,7	2,2	Stim.	20	23,4	4,0	NS
Z 9	20	14,2	5,6	NS	20	20,2	5,6	NS
Z11	20	13,8	3,9	NS	20	20,1	5,6	NS
Kontroll	20	11,0	2,6		20	21,1	6,5	
Z3	20	14,3	2,8	Stim.	20	20,8	6,5	NS
Z4	20	13,0	3,6	NS	20	19,9	5,3	NS
Z 10	20	12,9	3,0	Stim.	20	21,3	3,7	NS
Kontroll	20	12,3	3,3		20	18,9	4,2	
Z5	20	14,8	4,4	NS	20	19,5	4,1	NS
Z6	20	14,5	3,8	NS	20	19,3	4,6	NS
Z7	20	13,8	3,5	NS	20	21,3	5,2	NS

\* NS = ej signifikant skiljd (95 %) från kontroll; Stim. = stimulering av tillväxt.

### 3.3.2 Masktest

Resultaten av toxicitetstest med ringmaskar ges i Tabell 11. Ingen av tre undersökta sorbenter, Z3, Z4 eller Z10 gav via lakvatten någon signifikant effekt på produktionen av äggkokonger vid två olika inspädningar, 5 och 50 %. Ingen signifikant effekt på kläckningsfrekvensen kunde iakttas. Dessa tre sorbenter bör kunna användas till spill på mark utan att dessa ringmaskar påverkas. Då sorbenterna representerar tre olika

råvaruursprung, kan möjligen bedömningen utsträckas till att gälla övriga sorbenter med samma ursprung.

Tabell 11 Toxicitetstest med ringmaskar, *Enchytraeus crypticus*

	Inspädning	Kokongantal				Kläckningsfrekvens (%)			
		n	M	sd	Sign/ Ej sign	n	M	sd	Sign/ Ej sign
Kontroll		4 (x5)	10,4	0,7		4 (x5)	98,5	1,8	
Sorbent									
Z 3	5	4 (x5)	10,9	0,6	NS	4 (x5)	95,0	4,6	NS
	50	4 (x5)	9,9	1,2	NS	4 (x5)	96,8	1,5	NS
Z 4	5	4 (x5)	11,3	0,4	NS	4 (x5)	96,8	4,1	NS
	50	4 (x5)	13,0	0,3	NS	4 (x5)	96,5	2,6	NS
Z 10	5	4 (x5)	11,7	0,8	NS	4 (x5)	97,0	3,5	NS
	50	4 (x5)	12,0	1,1	NS	4 (x5)	98,0	1,5	NS

NS = ej signifikant

## 4 Jämförande utvärdering

Resultat av test med 7 olika organismer har sammanställts i Tabell 14. Som gemensamt mått på effekt har TU<sub>20</sub> per g sorbent valts.

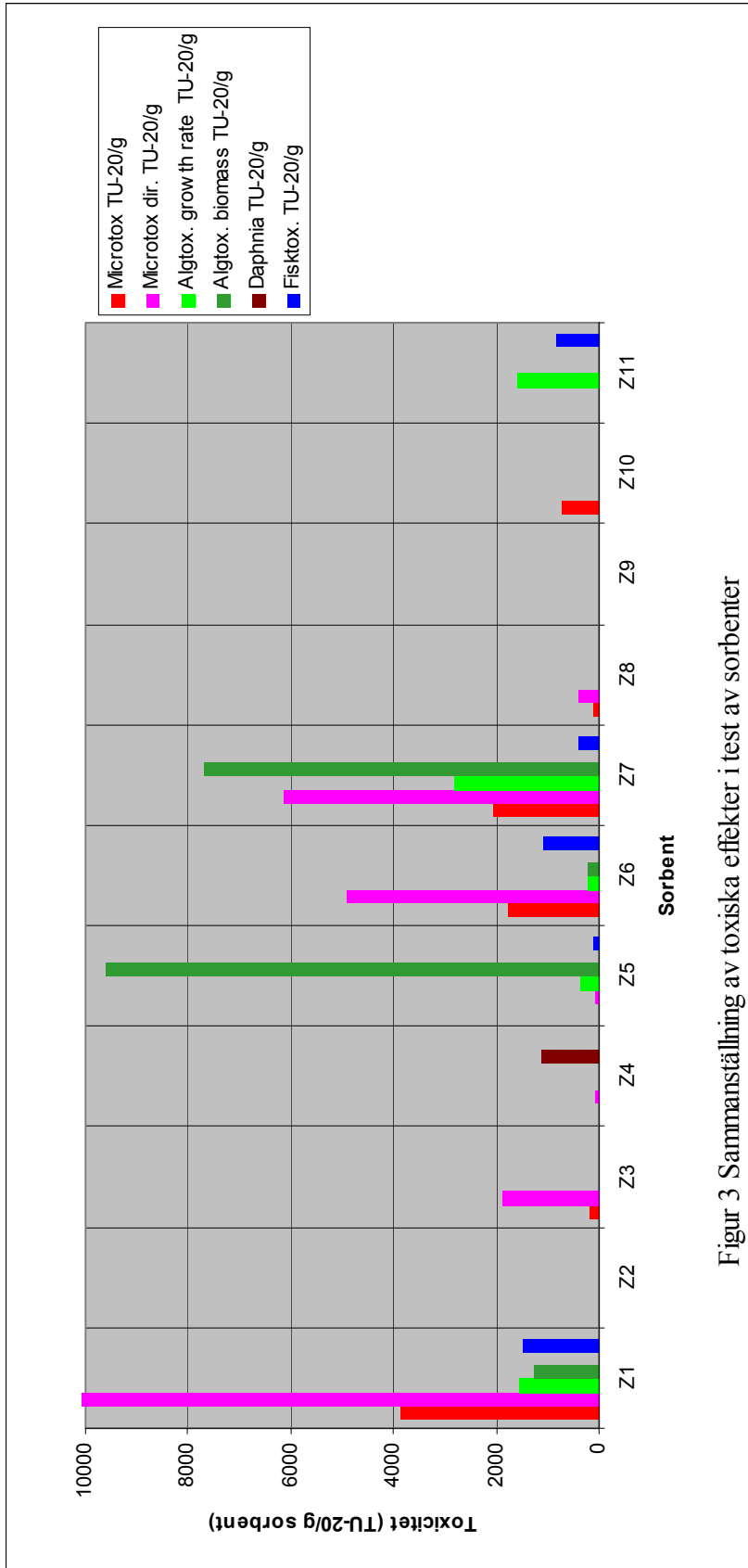
Tabell 12. Sammanställning över testresultat i ekotoxikologiska tester av sorbenter för olje- och kemikaliespill

Produkt	Microtox-test bioluminescenshämning		Algtest tillväxt- hämning	Daphnia- test överlevnad	Fisk- toxicitet överlevnad	Växt-bioassay				Masktest	
	Lakvatten	Direkt- exponering				TU <sub>20</sub> /g sorbent		tillväxthämning		Kokong- antal	reproduktionstörning
						Engelskt rajgräs	Vitklöver				
						Rot	Skott	Rot	Skott		
Z 1	3850	32100	1300	-	1470	0	0	0	0	-	-
Z 2	<<100	***	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z 3	191	1870	<<100	<<100	<<100	0	0	s*	0	0	0
Z 4	<<100	59	<<100	1110	<<100	0	0	s	0	0	0
Z 5	<100	68	5800	-	100**	0	0	0	0	-	-
Z 6	1760	4910	100-200	-	1100	0	0	0	0	-	-
Z 7	2040	6140	8500	-	400**	0	0	0	0	-	-
Z 8	126	412	<<100	-	<<100	0	0	0	0	-	-
Z 9	<<100	17	<<100	-	<<100	0	0	0	0	-	-
Z 10	714	-	<<100	<<100	<<100	0	0	s	0	0	0
Z 11	-	-	1100	-	830	0	0	0	0	-	-

\* s = stimulering av tillväxt, reproduktion etc.

\*\* EC<sub>50</sub> anges då EC<sub>20</sub> ej kunnat beräknas

\*\*\* - = ej testad



Figur 3 Sammenstilling av toksiske effekter i test av sorbenter



För en inledande klassificering av testresultat indelades sorbenters toxicitet i olika nivåer enligt Tabell 13. Denna indelning ska kunna användas som mått vid värdering av sorbenters miljöeffekter. Som jämförelsenivå för toxiska effekter har EC<sub>20</sub> valts, som i de flesta fall erhållits direkt i testutvärderingen, i andra fall har EC<sub>20</sub> beräknats ur samband mellan logtransformerade värden för effekter och koncentrationer.

Tabell 13 Kategori-indelning av testresultat av sorbenter

Testresultat	TU <sub>20</sub> /g sorbent		Kategori
	lakvatten	direktexponering	
Icke-toxiska, ingen dosberoende effekt	<<100		0
Lågtoxiska, lägre än EC <sub>20</sub> -nivå	<100	<100	1
Lågtoxiska, lägre än EC <sub>50</sub> -nivå	100 - ca 400 (<100 TU <sub>50</sub> /g)	100 - ca 400 (<100 TU <sub>50</sub> /g)	2
Toxiska	>ca 400 (= />100 TU <sub>50</sub> /g)	>ca 400 (= />100 TU <sub>50</sub> /g)	3

Indelningen i kategorier har införts i Tabell 14 för genomförda tester. Som framgår av tabellen stämmer kategoriindelningen väl överens mellan de två sätten att tillämpa Microtox-test. Jämförelser mellan andra tester uppvisar såväl likheter som olikheter. Inget lakvattenprov har givit genomgående samma kategori i alla testen. Resultaten understryker behovet av flera tester för att kartlägga effekter i miljön i allmänhet såväl som i detta fall i test av sorbenter, och att det inte går att förlita sig på resultat baserade på ett enda test.

Tabell 14 Toxicitetskategorier för sorbenter, se Tabell 13

	Microtox-test		Alg-test	Daphnia-test	Fisk-test	Mask-test	Tillväxttest växter	
	Lakvatten	Direkt-exponering					Raj-gräs	Vitklöver
Z 1	3	3	3	-	3	-	0	0
Z 2	0	-	-	-	-	-		
Z 3	2	3	0	0	0	0	0	0
Z 4	0	1	1	3	0	0	0	0
Z 5	1	1	3	-	2	-	0	0
Z 6	3	3	3	-	3	-	0	0
Z 7	3	3	3	-	3	-	0	0
Z 8	2	2	0	-	0	-	0	0
Z 9	1	1	0	-	0	-	0	0
Z 10	3	-	0	0	0	0	0	0
Z 11	-	-	3	-	3	-	0	0

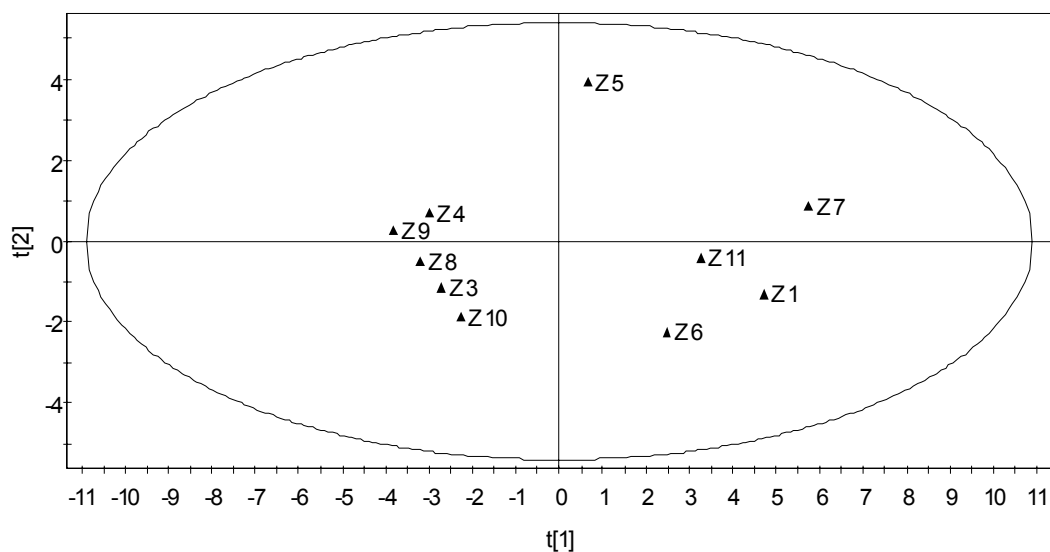
Underlaget för den multivariata utvärderingen är som tidigare nämnts tester med tre organismer på 10 sorbenter vars identitet kodats med Z1-Z11 (ej Z2), se Tabell 1. Test med andra organismer har utförts med alltför få testobjekt (masktest och kräftdjurstest med tre testade lakvatten vardera) eller har givit alltför liten varians (test med högre växter var alla icketoxiska). Låga toxiska effekter under gränsen för beräkning av numeriska värden för toxicitet och resultat indikerande icke-toxiska prov har åsatts halva gränsvärdet för testmetoden i den multivariata analysen.

De toxiska parametrar som ingått i utvärderingen ges i Tabell 15.

Tabell 15 Sammanställning av toxiska parametrar ingående i den multivariata utvärderingen av toxicitetstester av sorbenter samt kodning till Fig. 5 och 6.

Organism /test	Testobjekt /mode	Exponerings-tid	Beräkningsmodell för toxicitet	EC-nivå (%)	Kod till Fig. 5 och 6
Microtox	Lakvatten	5 min		20	MT5-20
Microtox	Lakvatten	5 min		50	MT5-50
Microtox	Lakvatten	15 min		20	MT15-20
Microtox	Lakvatten	15 min		50	MT15-50
Microtox	hel sorbent	30 min		20	MTDI-20
Microtox	hel sorbent	30 min		50	MTDI-50
Algtest	Lakvatten	3 d	Biomassa 1	20	AL1BI-20
Algtest	Lakvatten	3 d	Biomassa 1	50	AL1BI-50
Algtest	Lakvatten	3 d	Biomassa 2	20	AL2BI-20
Algtest	Lakvatten	3 d	Biomassa 2	50	AL2BI-50
Algtest	Lakvatten	3 d	Tillväxt-hastighet 1	20	AL1RA-20
Algtest	Lakvatten	3 d	Tillväxt-hastighet 1	50	AL1RA-50
Algtest	Lakvatten	3 d	Tillväxt-hastighet 2	20	AL2RA-20
Algtest	Lakvatten	3 d	Tillväxt-hastighet 2	50	AL2RA-50
Fiskyngeltest	Lakvatten	4 d		20	FI4-20
Fiskyngeltest	Lakvatten	4 d		50	FI4-50
Fiskyngeltest	Lakvatten	7 d		20	FI7-20
Fiskyngeltest	Lakvatten	7 d		50	FI7-50

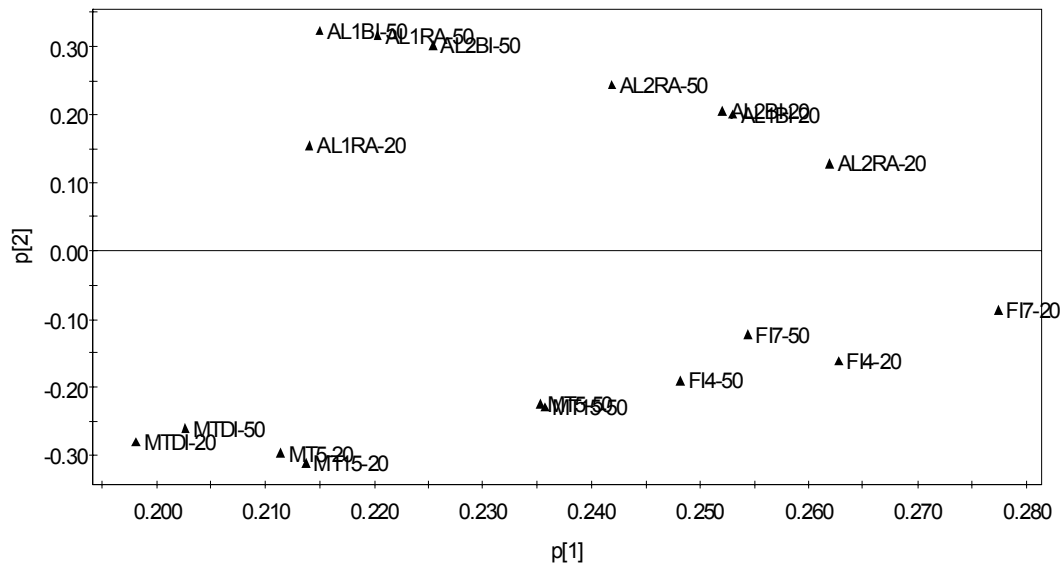
Principalkomponentanalysen resulterade i en modell med tre komponenter som tillsammans förklarade 95 % av variationen i datamaterialet. Fig. 4 visar testobjektens projektion för de två första komponenterna.



Figur 4. Objektprojektion för komponent 1 mot komponent 2.

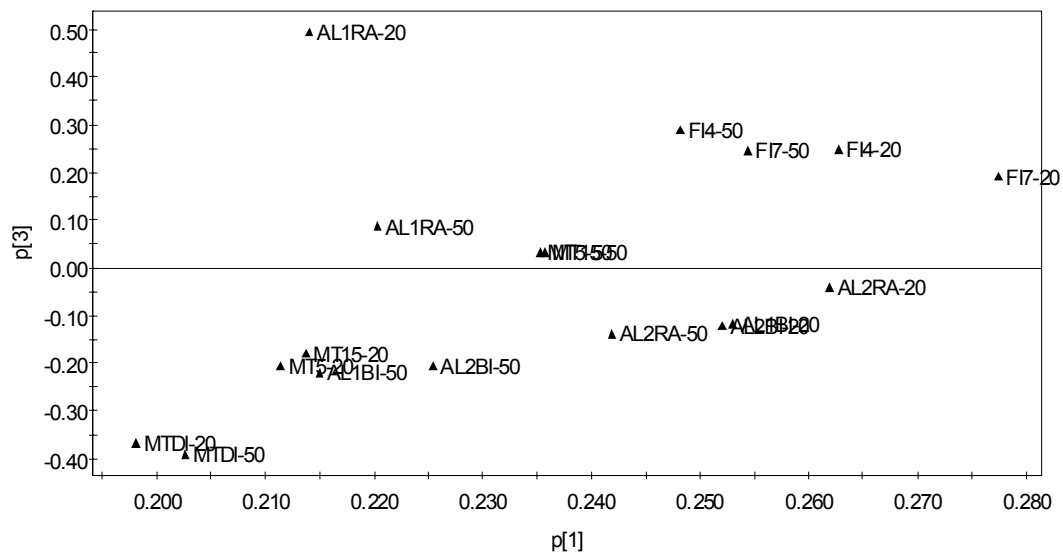
Sorbenterna Z3, Z4, Z8-Z10 utgjorde en samvarierande grupp med låg toxicitet. Z1, Z7 och Z11 samvarierade sinsemellan och var å andra sidan mest toxiska av samtliga. Z6 var toxisk mot fisk och i Microtox-test men inte mot algen. Z6 samvarierade inte i någon större utsträckning med någon av de övriga. Z5 samvarierade ej heller med de övriga men denna var mest toxisk mot algen och mindre mot fisk och i Microtox-test. Grupperna av sorbenter som samvarierade avseende ekotoxikologiska egenskaper återspeglar inte de råvaror till sorbenterna som framgår av tillverkarnas beskrivningar. I den första gruppen av fem lågtoxiska sorbenter förekom sorbenter av minerogent ursprung och produkter baserade på bark/träflis och torv. I gruppen av mer toxiska sorbenter förekom en däckgummiprodukt, en träspånprodukt samt en med ospecificerat innehåll av organiskt material. Sannolikt påverkar behandlingen av råvaran vid tillverkningen av sorbenter och eventuella tillsatser toxiciteten av produkterna mer än råvarans ursprung.

Variabelprojektion i Fig. 5 visar hur de olika toxiska effekterna samvarierar. Figuren visar projektionen av komponent 1 mot komponent 2, där samtliga parametrar förklaras till stor del, utom toxiciteten i Microtox-test av sorbenter i direktkontakt med bakterier, som till största delen förklarats av komponent 3, se Fig. 6.



Figur 5. Variabelprojektion för komponent 1 mot komponent 2. Beteckningar enligt Tabell 15.

Ur Fig. 5 framgår att olika parametrar för Microtox-toxicitet, algtoxicitet och fisktoxicitet samvarierar i liten utsträckning vilket omvänt innebär att test med de tre organismerna bidrar med unik information om sorbenternas toxiska egenskaper. Utvärderingen av log-transformerade toxicitetsdata gav en något annorlunda tolkning än motsvarande med ej log-transformerade data (ej redovisad). I den sistnämnda utvärderingen erhöles en högre samvariation mellan fisktoxicitet och Microtox-toxicitet.



Figur 6. Variabelprojektion för komponent 1 mot komponent 3. Beteckningar enligt Tabell 15.

Fig. 6 visar att Microtox-toxicitet i direktexponeringstest till en övervägande del varierade oberoende av parametrarna i de övriga testen, vilket innebär att detta sätt att testa bidrar med annan information om giftigheten än de övriga toxicitetstesterna.

Den multivariata databehandlingen har endast kunnat genomföras med tre testorganismer och två moder att testa på grund av olika begränsningar i datamaterialet. Varje test har dock bidragit med flera toxiska parametrar, t ex  $EC_{20}$  och  $EC_{50}$ , olika exponeringstider, etc., se Tabell 15. Slutsatsen ovan att utvärderingen av sorbenters toxicitet måste baseras på fler än ett enda test står fast. Ingen av de tre utvärderade testorganismerna kan ersättas av någon av de övriga.

## 5. Slutsatser

Valda testmetoder kunde tillämpas på lakvatten av sorbenter medan test av hela sorbenter endast genomfördes med en av metoderna. Några ytterligare t. ex. markttester lämpar sig för test av hela sorbenter medan t. ex. test med fisk och alger måste ske med prov i vattenfas.

Effekter av lakvatten av sorbenter på undersökta organismer i landmiljö var mycket små. Inga hämmande effekter och endast en stimulering av tillväxt av växter i ett fåtal fall kunde iakttas. Vissa sorptionsmedel utövade toxiska effekter på organismer i vattenmiljön antingen i test med hela sorbenten närvarande eller via utlakning och exponering för en vattenfas.

Karakterisering av sorbenters effekter på biota kan inte baseras på enbart ett enda test. Multivariat analys av data visade att algtest, Microtox-test, och akut toxicitet i test av fiskyngel gav unik information om toxiska egenskaper hos sorbenter. Ingen av dessa tre organismer/tester kan ersättas av någon av de andra.

## 6. Tillkännagivanden

Tack till Anne Zetterberg och Stefan Andersson, som genom sitt examensarbete i vattenkemi inom utbildningen vid Stockholms universitet, bidragit med utredningen om beredning av lakvatten samt test med alger och i Microtox-test.

## 7. Referenser

- Andersson, S. och Zetterberg, A., 1998, Utvärdering av screentester för akvatisk toxicitet för tillämpning på sorbenter för olje- och kemikaliespill. Multivariat analys på effekter av olika lakningsparametrar. Examensarbete i vattenkemi. Inst. fys. kem., oorg. kem. och strukturkemi, Stockholms universitet.
- Anon. 1992, Microtox manual. A toxicity testing handbook. Vol. 2, Detailed protocols, Microbics Corp., Carlsbad, USA.
- Chatfield, C. och Collins, A. J., 1980, Introduction to multivariate analysis, Chapman & Hall, London.
- Fejes, J., Zetterberg, A., Andersson, S., Palokangas, P. och Svenson, A., 1999, Sorbenter för olje- och kemikaliespill. En marknadsöversikt. IVL publikation B 1327, Räddningsverket R60-200/99.
- Litchfield, I.T. och Wilcoxon, F., 1949. A simplified method for evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96, 99-113.
- Malmberg, M., Allard, A-S. och Remberger M., 1998, Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark. IVL publikation B 1294.
- Nyffeler, A., Gerber, H.-R., Hurle, K., Pestemer, W. och Schmidt, R. R., 1982, Collaborative studies of dose-response curves obtained with different bioassay methods for soil-applied herbicides. Weed Res., 22, 213-222.
- Nyholm, N., 1985, Response variable in algal growth inhibition tests – biomass or growth rate. Water Res., 19, 273-279.
- OECD, 1993, Guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris.
- SS-EN ISO, 1996, Vattenundersökningar – Bestämning av rörlighetshämning för Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Akut toxicitet. ISO 6341:1996.
- Svenson, A., 1993, Microtox-test, en metodbeskrivning, IVL-publ. B 1100.
- Svenson, A., 1996, Microtox toxicity in soil. IVL-publ. B 1249.
- Svenson, A., Cardoso, A., Thurén, A., Kaj, L. och Dave, G., 1994, Microtox toxicity in sediments. Modified method for the direct contact test with luminescent bacteria. IVL-publ. B 1140.

- Svenson, A., Cardoso, A., Thurén, A., Kaj, L. och Dave, G., 1996a, An improved and direct exposure bioassay using bacterial luminescence for sediment toxicity testing. I M. Munawar & G. Dave, Utg., *Development and progress in Sediment Quality Assessment: Rationale, Challenges, Techniques & Strategies*, pp. 143-152.
- Svenson, A., Edsholt, E., Ricking, M., Remberger, M. och Röttorp, J., 1996b, Sediment contaminants and Microtox toxicity in a direct contact exposure test. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 11, 293-300.
- Westheide, W. och Bethke-Beilfuss, D., 1991, The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. I *Modern Ecology: Basic and Applied Aspects*. (Utg. G. Esser och D. Overdieck) Elsevier, Amsterdam.



## IVL Svenska Miljöinstitutet AB

IVL är ett oberoende och fristående forskningsinstitut som ägs av staten och näringslivet. Vi erbjuder en helhetssyn, objektivitet och tvärvetenskap för sammansatta miljöfrågor och är en trovärdig partner i miljöarbetet.

IVLs mål är att ta fram vetenskapligt baserade beslutsunderlag åt näringsliv och myndigheter i deras arbetet för ett bärkraftigt samhälle.

IVLs affärsidé är att genom forskning och uppdrag snabbt förse samhället med ny kunskap i arbetet för en bättre miljö.

### Forskning- och utvecklingsprojekt publiceras i

IVL Rapport: IVLs publikationsserie (B-serie)  
IVL Nyheter: Nyheter om pågående projekt på den nationella och internationella marknaden  
IVL Fakta: Referat av forskningsrapporter och projekt  
IVLs hemsida: [www.ivl.se](http://www.ivl.se)

Forskning och utveckling som publiceras utanför IVLs publikationsservice registreras i IVLs A-serie. Resultat redovisas även vid seminarier, föreläsningar och konferenser.



---

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd

P.O.Box 210 60, SE-100 31 Stockholm  
Hälsingegatan 43, Stockholm  
Tel: +46 8 598 563 00  
Fax: +46 8 598 563 90

P.O.Box 470 86, SE-402 58 Göteborg  
Dagjämningsgatan 1, Göteborg  
Tel: +46 31 725 62 00  
Fax: +46 31 725 62 90

Aneboda, SE-360 30 Lammhult  
Aneboda, Lammhult  
Tel: +46 472 26 77 80  
Fax: +46 472 26 77 90

[www.ivl.se](http://www.ivl.se)