



# rappo**rt**

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

## Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark

Marianne Malmberg, Ann-Sofie Allard, Mikael Remberger  
B 1294  
Stockholm, juni 1998

# IVL

## Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning Swedish Environmental Research Institute

<b>Organisation/Organization</b> Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning <b>Adress/Address</b> Box 21060 100 31 STOCKHOLM <b>Telefonnr/Telephone</b> 08-729 15 00	<b>RAPPORTSAMMANFATTNING</b> <b>Report Summary</b> <b>Projekttitel/Project title</b>  <b>Anslagsgivare för projektet/Project sponsor</b> CFs Miljöfond och IVLs delkollektiva program
<b>Rapportförfattare, author</b> Marianne Malmberg, Ann-Sofie Allard, Mikael Remberger	
<b>Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report</b> Utveckling av biologiska metoder för bedömning av förorenad mark Development of biological methods for evaluation of the toxicity of contaminated soil	
<b>Sammanfattning/Summary</b> Det finns ett ökande behov av att använda förorenade markområden för bebyggelse och rekreation. För att kunna utföra adekvata riskbedömningar av dylika områden krävs utveckling av biologiska markttestsystem av den typ som används för den akvatiska miljön. Ett testpaket för bedömning av mikrobiell persistens och toxicitet mot bakterier, växter och maskar har tagits fram. Persistenstesten visar föroreningarnas stabilitet mot bakteriella angrepp och kan vägleda vid val av saneringsmetod. Toxicitetstesterna visar på behov och effektivitet av sanering. För de bakteriella testerna används naturliga, i testjorden befintliga bakterier. Engelskt rajgräs ( <i>Lolium perenne</i> ), vitklöver ( <i>Trifolium repens</i> ) och rova ( <i>Brassica rapa</i> ) ingår i växttesten som bedömer rot- och skotttillväxt. Masktesten mäter dödlighet och reproduktion hos ringmasken <i>Enchytraeus crypticus</i> . Testsubstanserna utgjordes av fluoranthen, karbazol, <i>p</i> -kresol och <i>m</i> -xylenol, representerande kresotföroreningar, 4-klorbifenyl, surrogat för PCB och 3-metylbensoesyra, omvandlingsprodukt från <i>m</i> -xylen. Persistensförsöken visade att 3-metylbensoesyra var den substans som snabbast minskade i koncentration och fluoranthen var den som minskade långsammast. Inga metaboliter kunde påvisas vid de kemiska analyserna. Toxiciteten mot bakterierna var högst hos de fenolära föreningarna, medan ingen toxicitet kunde påvisas för karbazol, fluoranthen och 4-klorbifenyl. Toxicitet mot växterna uppvisades av de vattenlösliga substanserna <i>p</i> -kresol, <i>m</i> -xylenol och 3-metylbensoesyra. De i vatten svårslösliga ämnena gav ingen effekt, möjligen beroende på att de inte var tillgängliga för växterna. De fenolära föreningarna och 3-metylbensoesyra var akut toxiska mot maskarna och reproduktionen påverkades av karbazol och 4-klorbifenyl. Ingen toxisk effekt kunde påvisas för fluoranthen. Undersökningen visar att det framtagna testpaketet kan användas för bedömning av markföroreningar och är väl anpassat för att ingå på basnivån i ett hierarkiskt markttestsystem.	
<b>Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område, näringsgren eller vattendrag/Keywords</b> Förorenad mark, persistens, toxicitet, bakterier, mask, växter Contaminated soil, toxicity, persistence, bacteria, worms, higher plants	
<b>Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data</b>  <b>IVL Rapport B 1294</b>	
<b>Beställningsadress för rapporten/Ordering address</b>  IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm, Sweden	

## Innehållsförteckning

Sammanfattning .....	2
Summary .....	3
1. Inledning.....	4
2. Målsättning.....	4
3. Material och metoder .....	5
3.1 Tester och testorganismer .....	5
3.2 Testsubstanser .....	6
3.3 Utförande .....	7
3.3.1 Analyser.....	7
3.3.2 Persistenstest.....	8
3.3.3 Toxicitet mot jordbakterier.....	9
3.3.4 Toxicitet mot växter .....	9
3.3.5 Toxicitet mot ringmaskar .....	10
4. Resultat och diskussion .....	11
4.1 Persistenstest .....	11
4.2 Toxicitet mot jordbakterier .....	12
4.3 Toxicitet mot växter.....	13
4.4 Toxicitet mot ringmaskar .....	15
5. Slutsatser och kommentarer .....	17
6. Tillkännagivanden.....	18
7. Referenser.....	18

## Bildbilaga

## Sammanfattning

Det finns ett ökande behov av att använda förorenade markområden för bebyggelse och rekreation. För att kunna utföra adekvata riskbedömningar av dylika områden krävs utveckling av biologiska markttestsystem av den typ som används för den akvatiska miljön. Ett testpaket för bedömning av mikrobiell persistens och toxicitet mot bakterier, växter och maskar har tagits fram. Persistenstesten visar föroreningarnas stabilitet mot bakteriella angrepp och kan vägleda vid val av saneringsmetod. Toxicitetstesterna visar på behov och effektivitet av sanering. För de bakteriella testerna används naturliga, i testjorden befintliga bakterier. Engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), vitklöver (*Trifolium repens*) och rova (*Brassica rapa*) ingår i växttesten som bedömer rot- och skotttillväxt. Masktesten mäter dödlighet och reproduktion hos ringmasken *Enchytraeus crypticus*. Testsubstanserna utgjordes av fluoranthen, karbazol, *p*-kresol och *m*-xylenol, representerande kreosotföreningar, 4-klorbifenyl, surrogat för PCB och 3-metylbensoesyra, omvandlingsprodukt från *m*-xylen. Persistensförsöken visade att 3-metylbensoesyra var den substans som snabbast minskade i koncentration och fluoranthen var den som minskade långsammast. Inga metaboliter kunde påvisas vid de kemiska analyserna. Toxiciteten mot bakterierna var högst hos de fenolära föreningarna, medan ingen toxicitet kunde påvisas för karbazol, fluoranthen och 4-klorbifenyl. Toxicitet mot växterna uppvisades av de vattenlösliga substanserna *p*-kresol, *m*-xylenol och 3-metylbensoesyra. De i vatten svårösliga ämnena gav ingen effekt, möjligen beroende på att de inte var tillgängliga för växterna. De fenolära föreningarna och 3-metylbensoesyra var akut toxiska mot maskarna och reproduktionen påverkades av karbazol och 4-klorbifenyl. Ingen toxisk effekt kunde påvisas för fluoranthen. Undersökningen visar att det framtagna testpaketet kan användas för bedömning av markföroreningar och är väl anpassat för att ingå på basnivån i ett hierarkiskt markttestsystem.

## Summary

There is increasing interest in the possible use of contaminated sites for building and recreation. It is therefore necessary to develop a set of biological assays comparable to that used for aquatic systems. This should include tests for persistence of contaminants to establish whether or not the site is suitable for bioremediation and for toxicity to determine whether remediation is necessary and if so, determine its effectiveness. Tests used indigenous bacteria to assay persistence and toxicity, and higher plants and earthworms to determine toxicity to higher terrestrial biota. The established contaminants in creosote fluoranthene, carbazole, *p*-cresol and *m*-xylenol were examined, 4-chlorobiphenyl was used as a PCB surrogate, and 3-methylbenzoate as a potential metabolite from *m*-xylene. Evaluation of persistence based on analysis of the substrates during incubation used spiked concentrations in mineral medium up to 50 mg/L, and were carried out for 30d at 25°C: azide was used as a control to inhibit microbial activity. 3-methylbenzoate was most rapidly degraded and fluoranthene most slowly. The presence of metabolites could not be established by chemical analysis. The toxicity to bacteria was greatest for the phenols and was absent for fluoranthene and carbazole. The plant assays used sprouted seedlings of *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, and *Brassica rapa*, and was carried out by incubation in artificial soil for 3 d at 25° C. Length of roots and stems were used as endpoints. The water-soluble phenols and 3-methylbenzoate were toxic, but the other substrates had no toxic effect plausibly because they were not available for uptake by the plant roots. The worm assay used *Enchytraeus crypticus* and was carried out in agar plates containing ground oatmeal: insoluble substrates were mixed with agar. Survival and reproduction were used as the end-points. Fluoranthene displayed no toxic effect, whereas the phenols and 3-methylbenzoate were acutely toxic, and carbazole and 4-chlorobiphenyl had an adverse effect on reproduction. On the basis of the results, it is suggested that the following groups of assays would merit provisional acceptance and further evaluation in other situations. Indigenous bacteria for estimating persistence and toxicity: higher plants to establish inhibition of root development: earthworms to determine acute toxicity and adverse effects on reproduction.

## 1. Inledning

Det finns många förorenade markområden i Sverige, där industrier, bensinstationer eller avfallsupplag tidigare varit belägna. Genom tätorternas expansion och förtätning finns nu ett ökande behov av att använda dessa markområden för andra ändamål t.ex. bostadsbebyggelse, parker, vägar. Nyttjandet av dem får givetvis inte medföra några miljö- eller hälsorisker, varför området kanske måste saneras innan det kan exploateras.

Miljöriskerna bestäms av föroreningarnas toxicitet, persistens och rörlighet i naturen. Varje förorenat område är emellertid unikt beroende på dess markkaraktär och hydrogeologi, föroreningens egenskaper samt känsligheten av tänkt markanvändning. Det är därför viktigt att i varje enskilt fall kunna avgöra om marken måste åtgärdas. Valet av saneringsmetod, biologisk eller fysikalisk-kemisk, måste också noga övervägas.

Riskbedömning av förorenad mark baseras på uppmätta halter av kända föroreningar (Naturvårdsverket 1996). I den förorenade marken kan emellertid finnas andra ämnen eller omvandlingsprodukter av de kända föroreningarna, som inte upptäcks vid de kemiska analyserna. Dessa substanser kan vara både toxiska och persistenta, varför de kan utgöra en potentiell miljörisk. Å andra sidan kan markförhållanden vara sådana att den befintliga föroreningen binds till jorden eller på annat sätt inte är biotillgänglig och därför inte utgör så stor miljörisk, som den uppmätta halten anger. För att besvara dylika frågor krävs tillgång till relevanta biologiska testsystem. För markmiljön saknas emellertid ett riskbedömningssystem av den typ som har utvecklats för den akvatiska miljön (t.ex. Naturvårdsverket 1989).

Det är därför av stort allmänt intresse att vid sidan av kemiska analyser utveckla relevanta biologiska system, som på ett objektiva sätt kan mäta om ett markområde behöver saneras och om sanering utförs, följa upp effektiviteten av åtgärden.

## 2. Målsättning

Avsikten med projektet är att ta fram biologiska metoder för att karaktärisera förorenad mark. Metoderna skall kunna användas för att bedöma utsläpp till mark samt behov av, förutsättningar för och effektivitet av sanering av förorenade markområden. De framtagna metoderna bygger på kontrollerade laborieförsök med relevanta marklevande organismer och försöker så långt som möjligt efterlikna naturliga förhållanden för att senare kunna appliceras på faktiska saneringsobjekt. Undersökningarna omfattar försök avseende föroreningarnas persistens (stabilitet) mot mikroorganismer och toxicitet (giftighet) mot bakterier, växter och ringmaskar. Metoderna är tänkta att utgöra basnivån i ett hierarkiskt system, d v s ett testsystem med organismer från olika trofiska nivåer och med tester, som stegvis går från enkla screeningtester till alltmer förfinade system.

### 3. Material och metoder

#### 3.1 Tester och testorganismer

Bakterier förekommer överallt i vår miljö och spelar en avgörande roll för nedbrytning och omvandling av olika substanser. Det är därför viktigt att ha med olika bakteriella tester i ett markbedömningssystem. I de mikrobiella undersökningarna, både vid persistens- och toxicitetstesten, användes enbart de bakterier som redan finns i de testade jordarna. Inga tillsatser av på laboratoriet upplodade bakteriestammar gjordes.

Metoder för testning av persistens har tidigare utvecklats vid vårt laboratorium (Neilson et al 1994, Allard et al 1995). Dessa metoder har tagits fram för den akvatiska miljön men har i föreliggande projekt anpassats till markmiljö. Testen visar om de i jorden befintliga bakterierna under optimerade betingelser kan bryta ned eller omvandla testsubstanserna. Om substanserna under gynnsamma testförhållanden är persistenta är en biologisk saneringsmetod med stor sannolikhet inte aktuell.

Toxicitetstesten bygger på samma metoder som används för resistensbestämning av antibiotika och har tidigare används vid vårt laboratorium för toxicitetstestning av klorfenolära föreningar (Allard et al 1987). Testen mäter tillväxthämning av jordbakterier vid närvaro av olika testsubstanser.

För de mikrobiella testerna användes två okontaminerade naturliga jordar, en trädgårdsjord (provnummer 801) och en åkerjord (provnummer 807).

Växterna har en given plats i ett riskbedömningssystem genom sin centrala roll som primärproducenter och genom tillgång på relevanta arter för de flesta biotoper. I vår undersökning representeras växterna av en test avseende rottillväxt. Den utfördes enligt en testmetod, använd bl andra av Nyffeler et al (1982). Testarterna valdes ur tre olika grupper enligt rekommendation i OECDs guidelines (1993). Valet av engelskt rajgräs (*Lolium perenne*) och vitklöver (*Trifolium repens*) grundades på att de är vanliga ingredienser i gräsmattor och kan tänkas utgöra lämplig vegetation på sanerade områden. Rova (*Brassica rapa*) valdes för att den vid tidigare försök visat sig känslig mot olika miljöfrämmande ämnen.

Daggmaskar har stor betydelse för olika markprocesser såsom nedbrytning, mineralisering, luftning m.m. varför de bör ingå i ett markttestsystem. Till föreliggande studie valdes en test utarbetad av Westheide och Bethke-Beilfuss (1991), vilken bedömer såväl akuta som subletala effekter. Testen utfördes med *Enchytraeus crypticus* som är en vit, liten, ca 1 cm lång representant för gruppen daggmaskar (Bilaga 1, Bild 1 och 2). Den hör till maskfamiljen Enchytraeidae som är mycket art- och individrik och har repre-

sentanter i de flesta svenska jordar från mager skogsmark till kompost, där den i stort sett fyller samma funktion som sina större släktingar.

För växt- och masktesterna minimerades antalet testkoncentrationer och replikat till förmån för att fler substanser skulle kunna testas. En fullständig statistisk behandling av testresultaten har därigenom inte kunnat utföras.

### 3.2 Testsubstanser

Testsubstanserna utgörs av organiska substanser som valts med utgångspunkt från kända vanliga föroreningar i vår miljö.

**Kreosot** är en vanligt förekommande markförorening bl a på gasverkstomter och vid träimpregneringsanläggningar (Mueller et al 1989). Största delen av kreosot utgörs av PAH (polycykliska aromatiska kolväten) och PAH-liknande föreningar. Som representanter för denna grupp valdes **fluoranthen** (PAH) och **karbazol** (heterocyklisk kväveförening). Fluoranthen utgör dessutom större delen av PAH i luftföroreningar. Många fenolära föreningarna ingår också i kreosot. För vår undersökning valdes **p-kresol** och **m-xylenol**.

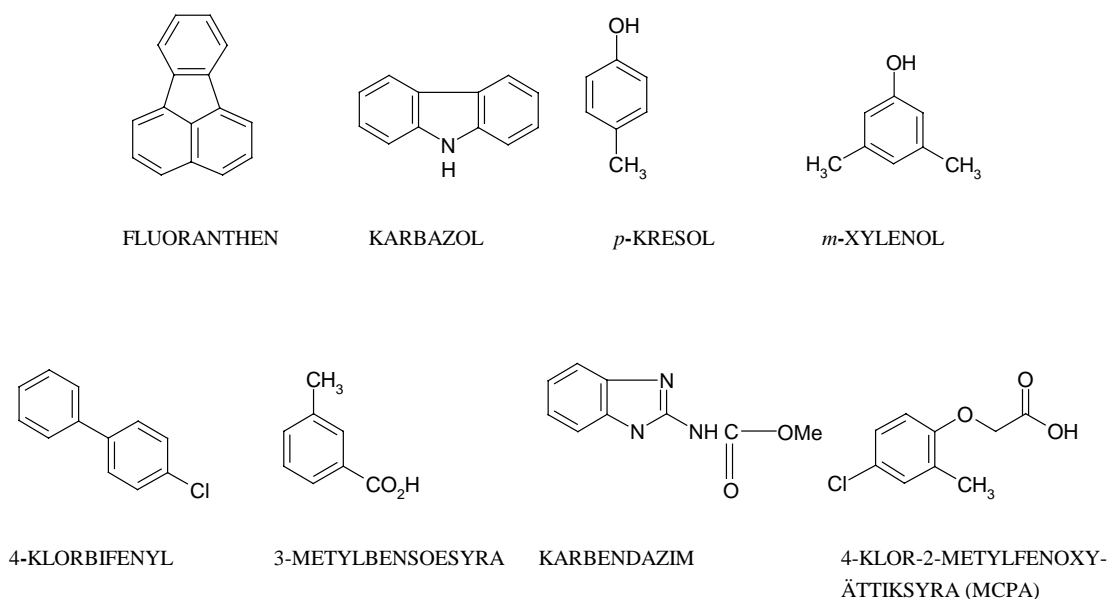
Polyklorerade bifenyler (PCB) har väckt stor uppmärksamhet på grund av sin allmänna förekomst i miljön (Safe and Hutzinger 1987). PCB ingår i gruppen organiska klorföreningar och har använts bl a som isoleringsvätskor. I vår undersökning representeras PCB av **4-klorbifenyl**, som ofta används som surrogat på grund av den höga kostnaden för rena, mer högklorerade PCB congener.

Xylen är en aromatisk förening, som ingår i bensin och många lösningsmedel. **3-metylbensoesyra** är en nedbrytningsprodukt av *m*-xylen (Davey and Gibson 1974) och kan förväntas återfinnas i mark efter bensinspill. Eftersom många potentiella saneringsobjekt utgörs av områden kring nedlagda bensinstationer, ingår 3-metylbensoesyra i undersökningen.

Organiska bekämpningsmedels valdes som referenssubstanser för testerna. Ogräsbekämpningsmedel **MCPA** (4-klor-2-metylfenoxyättiksyra) användes för växttesterna och för maskarna svampbekämpningsmedlet **karbendazim** (metyl benzimidazol-2-ylkarbamat).

Test- och referenssubstansernas strukturformler visas i Figur 1.





Figur 1. Strukturformler för test- och referenssubstanter.

### 3.3 Utförande

#### 3.3.1 Analyser

Analyserna utfördes huvudsakligen enligt tidigare beskrivna metoder (Hynning et al 1997). Lösningsmedel och kemikalier som användes för analys var av den högsta renhetsgrad som finns kommersiellt tillgängliga.

Proverna från nedbrytningsförsöken överfördes från provkolvorna till centrifugrör. Vattenfasen separerades från jorden genom centrifugering. Jordproverna från växttesterna används direkt utan föregående centrifugering.

#### **Upparbetning av jordprover innehållande 4-klorbifenyyl, karbazol och fluoranthen.**

Surrogatstandard, bifenyyl, tillsattes till proven och blandades väl. Jordfasen från centrifugeringen av proverna från nedbrytningsförsöken och proverna från växttesterna extraherades med aceton först i ultraljudbad och därefter på skakbord. Extraktionen upprepades ytterligare en gång. Acetonextrakten separerades från jordprovet genom centrifugering. De två sammanslagna extrakten indunstades med vakuumindunstare till torrhet, provet återlöstes sedan i aceton och överfördes till ett provrör. Vatten tillsattes varefter provet extraherades med hexan. Hexanfasen kromatograferades på en öppen kiselkolonn för att eliminera interfererande föreningar.

### **Upparbetning av prover från nedbrytningsförsöken innehållande 3-metylbensoesyra**

Jordfasen från centrifugeringen surgjordes med HCl och en surrogatstandard (4-klorbensoesyra) tillsattes. För att underlätta extraktionen tillsattes också "see-sand" (Merck) och natriumsulfat. Provet extraherades sedan med metyl-*tert*-butyleter (MTBE) först i ultraljudbad och därefter på skakbord. Detta upprepades ytterligare en gång. För att även extrahera analyter från vattenfasen tillsattes denna till MTBE-extraktet, skakades och organfasen separerades från vattenfasen. Volymen på extraktet reducerades med hjälp av en svag kvävgasström. En delvolym av extraktet indunstades till torrhet och metylförestrades (metanol/10% HCl) för kvantitativ bestämning av 3-metylbensoesyra. Före analys tillsattes bifenylyl som internstandard.

### **Metaboliter**

Extraktet från de olika proverna som beskrivs ovan indunstades och fick reagera med N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid. Reagenset togs bort genom indunstning och provet återlöstes i hexan.

### **Instrument**

Analyserna utfördes på en HP 5890 A gaskromatograf utrustad med en modell HP 7673 autoinjektor. FID-detektorn var inställd på 300°C. Proverna (1 µl) injicerades på en "splitless" (0,5 min) injektor vid 225°C. Kapillärkolonnen (HP-5, Helwett Packard, Palo Alto, CA) var 25 meter med en innerdiameter på 0,25 belagd med en tvärbunden fas på 0,25µm. Helium användes som bärgas. Följande temperaturprogram användes: Isotermt i 1 min vid 45°C, därefter höjdes temperaturen med 15°C/min till 150°C och därefter med 7,5°C / min till 320°C som hölls i 10 min. För intergrering, kvantifiering och utvärdering av diagrammen utnyttjades den PC-baserade kromatografiprogramvaran Turbochrom™ (Perkin Elmer, San Jose, CA).

### **3.3.2 Persistenstest**

Fyra av testsubstanserna - fluoranthen, karbazol 4-klorbifenyl, 3-metylbensoesyra - undersöktes avseende persistens. De i vatten svårslösliga substanserna fluoranthen, karbazol och 4-klorbifenyl löstes i metyl-*tert*-butyleter och bestämda mängder tillsattes därefter till sterila 100 ml E-kolvar så att slutkoncentrationen av testsubstanserna uppgick till 50 mg/kg jord. Kolvarna fick stå i rumstemperatur tills lösningsmedlet helt avdunstat. 3-metylbensoesyra tillsattes som en vattenlösning i samma koncentration som de övriga testsubstanserna. En kolv per provtagningstillfälle och substans iordninggjordes. 10 g lufttorkad och siktad jord från ett okontaminerat område (trädgårdsjord, provnr 801) och 50 ml sterilt mineralmedium innehållande kväve, fosfor och en spår-

elementblandning (VV2, Neilson et al 1983) tillsattes sedan till varje kolv. Inga ytterligare bakterier utom de i jorden befintliga användes i försöken. Kolvarna placerades sedan på skakbord med cirkulär rörelse i rumstemperatur (22° C). Försöket pågick i 30 dygn. Under försökets gång uttogs prov med jämna tidsintervall. Vid varje provtagningstillfälle togs en kolv per substans och placerades i frys i väntan på GC-analys för nedgång av testsubstanserna.

För att kontrollera att eventuell nedgång av substanserna inte härrörde från kemisk omvandling hämmades den mikrobiologiska aktiviteten genom tillsats av natriumazid (2 g/l) till kolvar som blandats på samma sätt som ovan. Prov från dessa kolvar togs endast vid försöksstart och försöksslut.

### 3.3.3 Toxicitet mot jordbakterier

Vid samtliga toxicitetstester mot jordbakterier utfördes två parallella försök, ett med trädgårdsjord (801) och ett med åkerjord (807). 1 g jord blandades med 10 ml steril buffert och skakades varsamt för att få loss bakterierna från jorden. Blandningen fick sedan stå några minuter tills de största partiklarna sjunkit till botten. 200-300 µl av suspensionen ströks sedan på ytan av agarplattor (Nutrientagar, Oxoid) med sterila bomullspinnar för att få en jämn tillväxt på agarytan av jordbakterierna. Filterdiskar (8 mm diameter) impregnerades med olika koncentrationer av testsubstanserna. Karbazol löstes i aceton och de övriga substanserna löstes i metyl-*tert*-butyleter och tillsattes sedan i olika mängder till diskarna så att koncentrationerna av testsubstanserna uppgick till 0,5 mg , 1 mg, 5 mg och 10 mg per disk. Efter att lösningsmedlet avdunstat helt placerades filterdiskarna på agarytan och 20 µl DMSO (dimetylsulfoxid) tillsattes till diskarna för att öka lösligheten av substanserna. Efter 1 och 5 dygns inkubering i 20°C mättes diametern på de bakteriefria zonerna runt filterdiskarna där tillväxten hämmats på grund av toxicitet (Bilaga 1, Bild 3). För att kontrollera att ingen toxicitet uppstod på grund av lösningsmedlen placerades filterdiskar med enbart aceton, metyl-*tert*-butyleter och DMSO utan testsubstans på agarplattor som behandlats som ovan.

### 3.3.4 Toxicitet mot växter

Frön av engelskt rajgräs (*Lolium perenne*), vitklöver (*Trifolium repens*) och rova (*Brassica rapa*) förgröddes vid 20°C i mörker ett till två dygn före teststart. Som testkärl användes grunda, rektangulära plastskålar. 25 g artificiell jord, beredd enligt OECDs guidelines (1993), justerad till pH 6,5 ± 0,5 lades i ett tunt lager i skålen varefter 14 ml avjoniserat vatten tillsattes. Testsubstanserna tillsattes enligt nedanstående beskrivning i samband med doseringen av jord och vatten i testkärlen. Testkoncentrationerna bereddes var för sig. De vattenlösliga substanserna MCPA, 3-metylbensoesyra, *p*-kresol och *m*-xilenol löstes i den vattenmängd som tillsattes jorden vid teststart. Vattenlösningarna var justerade till pH 6,5. De i vatten svårlösliga - fluoranthen, karbazol och 4-klor-

bifenyl - blandades med sand som noga inblandades i jorden som därefter spreds ut i testkärnen. Den sand som användes vid substansinblandningen utgjorde en delmängd av det totala sandinnehållet i den OECD-jord som bereddes för test av dessa substanser. Efter tillsatts av testsubstans täcktes innehållet i skålen med ett filterpapper, på vilket fem förgrödda 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 med hjälp av bildanalys (Quantimet500, Leica). Växttesten illustreras i Bilaga 1, Bild 4 och 5.

Samtliga substanser utom referenssubstansen (se nedan) testades i koncentrationerna 8, 80 och 800 mg/ kg jord. Fluoranthen, karbazol och 4-klorbifenyl testades dessutom vid 8000 mg/ kg jord och de båda förstnämnda även vid 80000 mg/ kg. Vid referens-testen med växtbekämpningsmedlet MCPA användes koncentrationerna 0,015, 0,15 och 1,5 mg/ kg jord. Koncentrationerna av fluoranthen, karbazol och 4-klorbifenyl i test-jorden kontrollerades med hjälp av GC-analys och befanns överensstämma väl med invägda substansmängder.

### 3.3.5 Toxicitet mot ringmaskar

Maskar av arten *Enchytraeus crypticus* odlades på agarplattor och utfordrades med havregrynsgröt. Testen utfördes på agarplattor i vilka olika koncentrationer av testämnet samt havregryn gjutits in. Testsubstanserna tillsattes agarn efter autoklaveringen. *m*-Xylenol, *p*-kresol, 3-metylbensoesyra tillsattes som steril vattenlösning, justerad till pH 5,0 och de i vatten svårlösliga (fluoranthen, karbazol, 4-klorbifenyl, karbendazim) finfördelades och skakades med agarn i samband med ingjutningen. 5 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 5 ggr. Samtliga plattor sparades och 10 dagar efter det att kokongerna hade räknats noterades antalet helt tomma kokonger, d.v.s. de som övergetts av samtliga nykläckta maskar. Testen varade i 35 dygn, varav 25 för exponering av maskarna. Testen mäter överlevnad och reproduktion i form av antal lagda kokonger och deras kläcknings-frekvens. Masktesten illustreras i Bilaga 1, Bild 6 och 7.

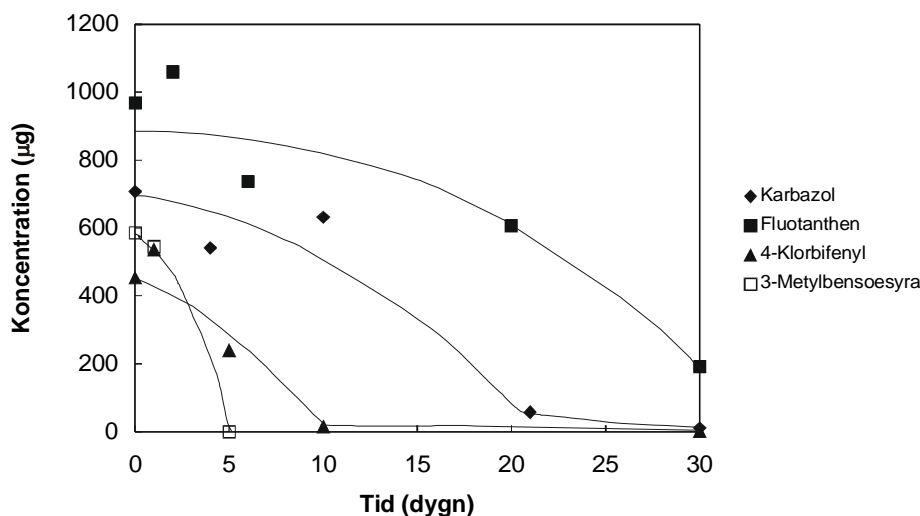
Substanserna testades i koncentrationerna 1, 10 och 100 mg/l agar. Referenssubstansen karbendazim testades även i koncentrationen 0,1 mg/l agar. Varje koncentration omfattade 10 maskar fördelade på två replikat.

## 4. Resultat och diskussion

### 4.1 Persistenstest

Resultaten från persistenstesten visas i Figur 2. Det kunde konstateras att samtliga testsubstanser minskade i koncentration under försöket. 3-metylbensoesyra minskade snabbast och koncentrationen gick ner till 0 redan efter 5 dygn. Ingen av de övriga testsubstanserna försvann helt. 4-klorbifenyl minskade snabbt i koncentration de första 10 dygnen men koncentrationen gick aldrig ner till 0. Mycket låga halter av substansen kunde påvisas även vid försöksslutet. Karbazol uppvisade samma tendens men hade ett långsammare tidsförlopp. Fenomenet med en tröskelkoncentration under vilken nedbrytning inte alls sker eller där nedbrytningshastigheten är så låg att substansen i praktiken är persistent har tidigare observerats (t.ex. Alexander 1985). Fluoranthen var den substans som minskade långsammast i koncentration. Ca 20% av den tillsatta testmängden kunde återfinnas efter 30 dygn. Att så höga koncentrationer kunde återfinnas vid försöksslutet kan bero på att substansen sakta bands till jorden och därför inte längre var tillgänglig för bakterierna.

Inga metaboliter kunde påvisas med de analysmetoder som användes i undersökningen.



Figur 2. Nedgång av fluoranthen, karbazol, 4-klorbifenyl och 3-metylbensoesyra under 30 dygns inkubering med naturliga jordbakterier. Koncentrationen av testsubstanserna anges i µg/kg jord.

I de kolvar där azid hade tillsats för hämning av den mikrobiologiska aktiviteten, kunde ingen minskning av testsubstansernas koncentration påvisas vid testslutet.

Testen utfördes med "spikad" jord d.v.s. testsubstanserna tillsattes till en oförorenad jord. Härigenom finns substanserna tillgängliga för mikroorganismerna under försöket. I

en naturlig förorenad jord sitter ofta föroreningarna hårt bundna till partiklar eller humusämnen. Detta kan innebära att substanserna inte är tillgängliga för mikroorganismerna. Även om substanserna kan brytas ner i laboratorieförsök kan de vara persistenta i naturen på grund av att de inte är biotillgängliga. Hatzinger and Alexander (1995) har visat att substanser i jordprov som fått "åldras" är mer stabila mot mikrobiell nedbrytning än föreningar som tillsätts direkt till ett jordprov.

Ingen ytterligare bakterieymp tillsattes till testkolvarna utan de bakterier som redan fanns i jorden är de som utför nedbrytningen eller omvandlingen. Meningen med persistenstesten är att undersöka om de bakterier som finns tillgängliga i jorden på ett förorenat område kan bryta ner föroreningarna och om så är fallet om en biologisk saneringsmetod är möjlig. Kan inte substanserna brytas ned i laboratoriemiljö där gynnsamma förhållanden kan skapas är det inte troligt att detta kan ske under de mer okontrollerbara förhållanden som råder i miljön.

## 4.2 Toxicitet mot jordbakterier

Resultaten från toxicitetstesten med jordbakterier visas i Tabell 1. Tabellen visar zondiametrarna för den högsta använda testmängden (10 mg substans per disk).

Tabell 1. Resultat från toxicitetstesterna med jordbakterier. Siffrorna visar diametern (mm) av de tillväxtfria zonerna runt filterdiskarna (koncentration 10mg testsubstans per disk). <8 mm (diskarnas diameter ) anger ingen toxisk effekt.

Substans	1 dygn (jord 801)	5 dygn (jord 801)	1 dygn (jord 807)	5 dygn (jord 807)
Fluoranthen	<8	<8	<8	<8
Karbazol	<8	<8	<8	<8
4-Klorbifenyl	<8	<8	11	<8
3-Metylbensoesyra	20	13	19	12
p-Kresol	30	22	30	16
m-Xylenol	29	25	31	17

Fluoranthen och karbazol uppvisade ingen toxicitet mot bakterierna från någon av jordarna. Bakterierna växte in mot filterdisken och ingen tillväxtfri zon kunde observeras. För 4-klorbifenyl observerades en svag toxicitet med bakterierna från jord 807 (åkerjord) efter 1 dygns inkubering. Efter 5 dygns inkubering hade dock denna zon försvunnit helt. Detta beror sannolikt på tillväxt av långsamväxande bakterier och bakterier som hunnit utveckla resistens mot testsubstansen.

Bakterierna från bägge de använda jordarna gav utslag av samma storleksordning för de övriga testade substanserna. 3-Metylbensoesyra var något mindre toxisk än *p*-kresol och

*m*-xylenol. Alla dessa substanser gav utslag redan vid 5 mg substans per disk. Efter 5 dygns inkubering kunde tydliga zoner uppmätas runt filterdiskarna. Ingen av substanserna gav dock utslag vid 1 mg substans per disk.

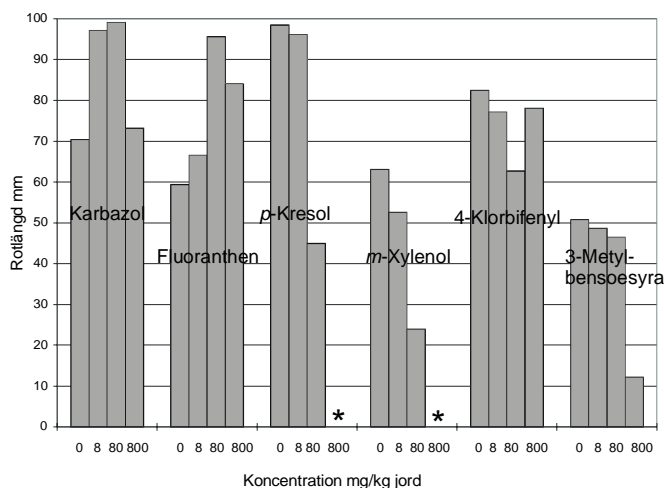
Inga tillväxtfria zoner kunde observeras för någon av jordarna vid kontroldiskarna som impregnerats med endast lösningsmedel.

I denna test har endast bakterier från oförorenade områden används. Bakterier från förorenade markområden kan användas på samma sätt. Dessa bakterier är redan anpassade för föroreningarna och kan vara mindre känsliga för dessa. Man får då ett svar på hur bakterierna i den aktuella jorden påverkas. Är substanserna mycket giftiga kan man inte räkna med att någon mikrobiell nedbrytning eller omvandling av dem kan ske. Man kan på samma sätt som med rena substanser även testa lösningsmedelsextrakt av förorenade jordar.

Resultaten från bakterietesten överensstämmer väl med resultaten från rot- och skotttillväxttesten.

### 4.3 Toxicitet mot växter

Resultaten från rot- och skotttillväxttesterna uppvisade viss spridning. Tydlig påverkan kunde konstateras för tre av de testade substanserna (*m*-xylenol, *p*-kresol, 3-metylbensoesyra). Vid de försök där påverkan kunde konstateras var effekten av de testade substanserna större på rot- än på skotttillväxten. Figur 3 visar resultaten från testerna med rova och i Tabell 2 sammanfattas resultaten från växttesterna.

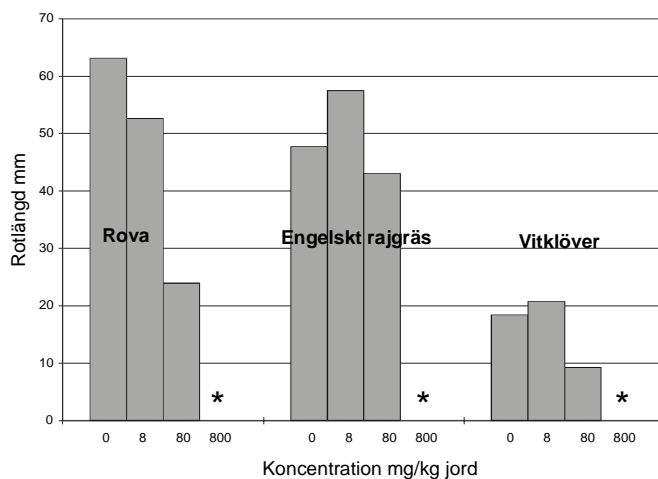


Figur 3. Resultat från toxicitetstesterna med rova. Den redovisade rotlängden utgör medelvärdet av 10 testväxter. \* anger total hämning av rottillväxten.

Tabell 2. Resultat från växttesterna. Tabellen visar lägsta testade koncentration med effekt på rot-tillväxten, angiven i mg/kg jord torrsvikt.

Substans	Engelskt rajgräs	Rova	Vitklöver
Fluoranthen	>80000	>80000	>80000
Karbazol	>80000	>80000	>80000
<i>m</i> -Xylenol	80	80	80
<i>p</i> -Kresol	800	80	800
3-Metylbensoesyra	800	800	800
4-Klorbifenyl	>8000	>8000	>8000
MCPA	1,5	0,015	0,15

Av testsubstanserna hade karbazol, fluoranthen och 4-klorbifenyl ingen effekt på någon av växterna. Kraftigast effekt hade de båda fenolerna, *m*-xylenol och *p*-kresol, som helt inhiberade rot- och skotttillväxten hos alla växterna i den högsta testade koncentrationen, 800 mg/kg jord (Figur 4). 3-Metylbensoesyra hade inte lika stark påverkan men gav hos alla växterna tydlig effekt i den högsta koncentrationen (800 mg/kg). Resultaten från testerna med referenssubstanten MCPA stämde väl överens med de, som tidigare erhöles vid vårt laboratorium: Engelskt rajgräs visade effekt vid 1,5, vitklöver vid 0,15 och rova vid 0,015 mg MCPA /kg jord torrsvikt.



Figur 4. Resultat från växttesterna med *m*-xylenol. Den redovisade rotlängden utgör medelvärdet av 10 testväxter. \* anger total hämning av rottillväxten.

Spridningen i resultaten från testerna kan förklaras av att det finns en stor naturlig variation hos växtmaterialet. Frön av samma storlek och till synes samma förgröningsgrad kan uppvisa olika stark tillväxt. Testmaterialet är dessutom litet, i de flesta fall har



endast fem frön per koncentration testats, varför svag tillväxt hos ett enstaka frö tydligt återspeglas i testresultaten. En jämförelse mellan kontrollerna från de olika testerna visar att samma växt kunde uppvisa skillnader i tillväxt mellan testerna. Den totala testlängden kan emellertid ha varierat något mellan testerna eftersom det av praktiska/tekniska skäl kunde skilja en del på tiden för förgroning, teststart och avslutning. Genom att öka antalet frön per koncentration och att noga iakttaga att tiden för testens olika delmoment är densamma, bör det vara möjligt att väsentligt minska spridningen i testresultaten.

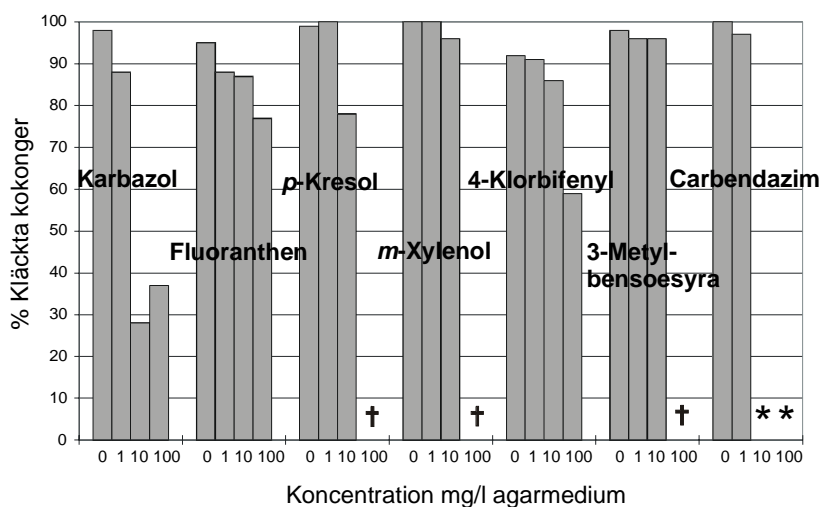
De tre vattenlösliga substanserna gav tydliga och enhetliga utslag på rot- och skotttillväxten hos samtliga testväxter. Däremot erhöles ingen effekt på någon av växterna av de i vatten svårösliga substanserna trots kompletterande tester med flouranthen och karbazol i koncentrationer upp till 80000 och 4-klorbifenyl till 8000 mg/kg jord. Inga toxiska effekter av dessa substanser kunde således påvisas genom rottillväxttesten. Det kan finnas ett samband mellan tillgänglighet och testlängd och under rottillväxttestens korta förlopp kanske endast den vattenlösliga fraktionen är tillgänglig för växterna. Genom sin ringa löslighet i vatten är det möjligt att de här aktuella substanserna inte uppnår för växterna akuttoxiska koncentrationer. Fröna kan också vara mindre påverkbara genom att de har förgrots och inte tar upp så mycket vatten.

Rottillväxttesten har för de vattenlösliga substanserna som ingår i undersökningen visat sig vara en god testmetod. Den är snabb och känslig och mäter effekt på en mycket väsentlig del av växten, roten. I föreliggande studie har endast "spikade" jordar undersökts, men metoden kan utan modifiering även användas för test av naturligt förorenade jordprover.

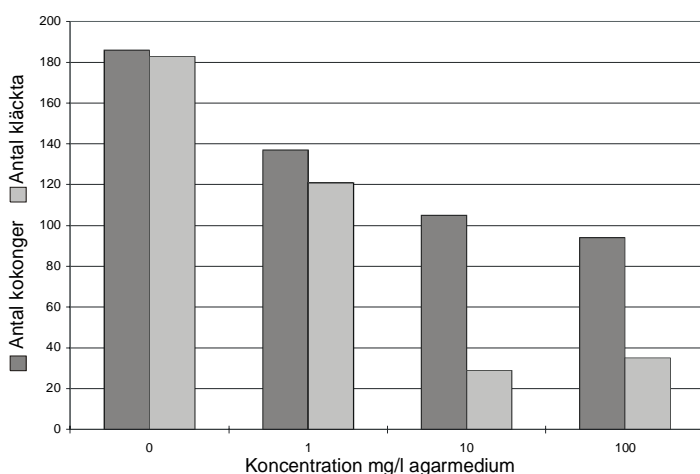
Testen är en screeningmetod och bör som sådan ingå på nivå 1 i ett hierarkiskt marktestsystem.

#### **4.4 Toxicitet mot ringmaskar**

Resultaten av reproduktionstesterna med *Enchytraeus crypticus* mot samtliga undersökta substanser redovisas i Figur 5.



Figur 5. Resultat från masktesterna. † inga överlevande maskar, \* total inhibering av kokongkläckningen.



Figur 6. Resultat från masktesten mot karbazol. Figuren visar att substansen har kraftigare effekt på kläckningen än av produktionen av kokonger.

Av figuren framgår att alla substanserna utom fluoranthen hade effekter på maskarna. Akut toxicitet uppvisades av *m*-xylenol, *p*-kresol och 3-metylbensoesyra, där alla maskarna dog i den högsta testkoncentrationen (100 mg/l). Kokongproduktion skedde endast i de två lägre koncentrationerna (1 och 10 mg/l), men inga tydliga effekter på kläckningen (tömningen) av dessa kokonger jämfört med kontrollen kunde konstateras. Effekt på kokongernas kläckningsfrekvens erhöles för karbazol vid 10 och för 4-klorbifenyl vid 100 mg/l. För referenssubstanten karbendazim noterades total inhibering av kokongkläckning redan vid 10 mg/l, däremot kunde ingen skillnad mellan antalet lagda

kokonger i de olika testkoncentrationerna (1 - 100 mg/l) konstateras. I försöken med 4-klorbifenyl och med karbazol (Figur 6) noterades kraftigare effekt på kläckningen (tömnings) än på produktionen av (antalet lagda) kokonger.

Masktesten gav utslag för samtliga testade substanser utom för flouranthen. Achazi et al (1995) iakttog inga effekter på överlevnad, kokongproduktion eller på kläckningsfrekvensen hos kokongerna vid koncentrationer upp till ca 1000 mg fluoranthen /l agar, men kunde konstatera fördröjd kläckning av kokongerna vid ca 100 mg fluoranthen /l agar. Någon fördröjning av kokongkläckning kunde dock inte noteras vid denna studie. Av de i undersökningen ingående organismerna gav endast maskarna utslag för karbazol och 4-klorbifenyl. Karbazol uppvisade effekt på både produktion och kläckning av kokonger vid lägre testkoncentration (10 mg/l agar) än något annat testämne i undersökningen.

Metoden måste anses lämplig att ingå i ett markttestsystem. Den uppvisar känslighet mot de undersökta substanserna och eftersom den mäter både akuta (överlevnad) och subakuta effekter (reproduktion i form av kokongproduktion och äggkläckning) kan den användas på såväl nivå 1 som 2 i ett hierarkiskt testsystem.

I föreliggande undersökning har endast rena substanser testats. För test av förorenade markprover måste med testens nuvarande utformning extrakt av proverna framställas.

## 5. Slutsatser och kommentarer

Ett testpaket för bedömning av markföroreningar har tagits fram. Det omfattar metoder för bestämning av toxicitet av föroreningar i markmiljö och bedömning av deras persistens mot mikrobiella angrepp. Testorganismerna utgörs av relevanta marklevande organismer på olika trofiska nivåer i det ekologiska systemet. Testpaketet ger ökade möjligheter att bedöma miljörisker av utsläpp till mark samt behov av, förutsättningar för och effektivitet av sanering av förorenade markområden. I testpaketet ingår:

Bakterier	Persistenstest Tillväxthämning av naturliga jordbakterier
Växter	Hämning av rottillväxt
Maskar	Dödlighet och reproduktionshämning hos <i>Enchytraeus crypticus</i>

De biologiska metoderna utgör ett mycket viktigt komplement till kemiska analyser. Förutom att de kan påvisa toxicitet av okända föroreningar eller omvandlingsprodukter av de kända föroreningarna i marken, kan de också visa på biotillgängligheten av föroreningarna.

Testpaketet är tänkt att ingå på basnivån i ett stegvis mer komplicerat testsystem. En viktig del i den fortsatta utvecklingen är studier av biotillgänglighet och upptag i växter och djur.

## 6. Tillkännagivanden

Undersökningarna har finansierats av Sveriges Civilingenjörersförbunds Miljöfond och projektet Förorenad mark i IVLs delkollektiva program vilka härmed tackas. Ett stort tack riktas till Alasdair Nielson för ovärderlig hjälp under hela projektets gång. Varmt tack också till Arne Persson, Svalöf Weibull, Trädgård AB för tillhandahållande av växtmaterialet och Jan-Olof Sundqvist, projektledare för projektet Förorenad mark. Bildanalysen utfördes vid Zoologiska Institutionen, Stockholms Universitet. Institutionen och Göran Malmberg tackas för värdefull hjälp.

## 7. Referenser

- Achazi, R. K., Dücker, C., Henneken, M. and Rothe, B. (1995). Einfluss von anthropogenen Schadstoffen auf terrestrische Invertebraten: 2. Einfluss von BaP, Fla und Cd auf Lebenszyklusparameter von *Enchytraeus crypticus* in Labor-Testsystemen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*. **24**: 535-540
- Alexander, M. (1985). Biodegradation of organic chemicals. *Environmental Science & Technology* **18**, 106-111.
- Allard A.-S., M. Remberger, and A.H. Neilson. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 839-845.
- Allard, A.-S., M. Remberger and A.H. Neilson (1995). Evaluation of microcosm systems for determining the persistence of chlorocatechols in the aquatic environment. IVL Report B 1170.
- Davey, J.F., and D.T. Gibson. (1974). Bacterial metabolism of para- and meta-xylene : oxidation of a methyl substituent. *Journal of Bacteriology* **119**: 923-929.
- Hatzinger, P.B., and Alexander, M. (1995). Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* **29** : 537-545.

- Hynning, P.-Å., M. Remberger, A.H. Nielson, M. Kipps, and P. Stanley. (1997). Broad-spectrum analysis of a contaminated sediment: exemplification of a protocol. *Journal of Chromatography A* **774**: 311-319.
- Mueller, J.G., P.J Chapman, and P.H Pritchard. (1989). Creosote-contaminated sites. Their potential for bioremediation. *Environmental Science and Technology* **23**: 1197-1201.
- Naturvårdsverket (1989). Biologisk-kemisk karakterisering av industriavloppsvatten. Allmänna råd 89:5.
- Naturvårdsverket (1996). Generella riktvärden för förorenad mark. Rapport 4638.
- Neilson, A.H. A.-S. Allard, P.-Å. Hynning, and M. Remberger. (1994). Chronic hazard assessment. A strategy for evaluating organic compounds in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology* **28**: 278A-2288A.
- Neilson, A.H., A.-S Allard, P.-Å. Hynning, M. Remberger, and L. Landner. (1983). Bacterial methylation of chlorinated phenols and guaiacols: formation of veratroles from guaiacols and high-molecular-weight lignin. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 774-783.
- Nyffeler, A., Gerber, H.-R., Hurle, K., Pestemer, W. and Schmidt, R. R. (1982). Collaborative studies of dose-response curves obtained with different bioassay methods for soil-applied herbicides. *Weed Research* **22**: 213-222.
- OECD (1993). Guidelines for testing of chemicals. OECD, Paris.
- Safe, S., and Hutzinger, O. (1987). *Environmental Toxin Series 1*. Springer-Verlag, Berlin.
- Westheide, W. and Bethke-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. In *Modern Ecology: Basic and Applied Aspects*. (Ed. G. Esser and 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 arbete för ett bärkraftigt samhälle.

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

### Forsknings- 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 publikationsserie registreras i IVLs A-serie.

Resultat redovisas även vid seminarier, föreläsningar och konferenser.



#### **IVL Svenska Miljöinstitutet AB**

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

#### **IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd**

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 20 75  
Fax: +46 472 26 20 04