



# Kan die gevoeligheid van grondlewende organismes bydra om die volhoubaarheid van landbewerking van olieraffinadery afval te beoordeel?

## Authors:

Adriaan J. Reinecke<sup>1</sup>  
Sophia A. Reinecke<sup>1</sup>  
Mia van Wyk<sup>1</sup>

## Affiliations:

<sup>1</sup>Department of Botany and Zoology, University of Stellenbosch, South Africa

## Correspondence to:

Adriaan Reinecke

## Email:

ajr@sun.ac.za

## Postal address:

Private Bag X1, Stellenbosch  
7600, South Africa

## Dates:

Received: 06 May 2015  
Accepted: 27 July 2015  
Published: 06 Oct. 2015

## How to cite this article:

Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. & Van Wyk, M., 2015, 'Kan die gevoeligheid van grondlewende organismes bydra om die volhoubaarheid van landbewerking van olieraffinadery afval te beoordeel?', Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie 34(1), Art. #1308, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v34i1.1308>

## Copyright:

© 2015. The Authors.  
Licensee: AOSIS  
OpenJournals. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

## Read online:



Scan this QR code with your smart phone or mobile device to read online.

Voordelige grondlewende organismes lewer ekostelseldienste in gesonde grondtipes. Olieraffinaderye genereer groot hoeveelhede soliede afval wat verskeie tipes koolwaterstowwe en metale bevat wat in die grond geploeg word tydens landbewerking van die afval. Die bedoeling is om die afval deur die grond-ekostelsel te laat degradeer. Die kontaminante mag egter giftig wees vir die diverse verskeidenheid van grondorganismes. Vir die volhoubaarheid van dié praktyk is dit nodig om te weet of remediëring van die landbewerkte grond voldoende was vir die beoogde, voortgesette gebruik daarvan. Indikatore is nodig om die graad van herstel van sodanige grondtipes te bepaal. Die doel van hierdie studie was om die grond van 'n landbewerkte gebied chemies te ontleed en die toksisiteit en herstel te bepaal deur van gestandaardiseerde bioassesserings met die komposteringswurm *Eisenia andrei* (Oligochaeta) en die springstert *Folsomia candida* (Collembola) gebruik te maak. Die organismes is blootgestel aan die gekontameneerde en kontrolegrond en hulle oorlewing, groei, voortplantingsukses en vermydingsgedrag is nagegaan. Die resultate het getoon dat die grond van die landbewerkte perseel steeds verskeie gevaarlike chemikalieë bevat, soos die dieselleks organiese verbindings, maar dat die grond nie akute toksies vir die organismes was nie. Dit het wel die groei en voortplanting van die erdwurms, asook die voortplanting van die springsterte nadelig beïnvloed. Die perseel benodig steeds remediëring alvorens grondbewerking van olieslik voortgesit word. Bioassessering het, aanvullend tot die chemiese analyses, 'n meer volledige en meer ekologies relevante beeld van die remediëringstatus en toksisiteit van die grond verskaf. Die bevinding ondersteun die gebruik van bioassesserings as 'n eko-toksikologiese metode om landbewerkingsgrond te evalueer.

**Can the sensitivity of soil-dwelling organisms to landfarmed soils contribute to assess the sustainability of landfarming of oil refinery waste?** Beneficial soil organisms inhabiting healthy soils participate in providing soil ecosystem services. Oil refineries generate large quantities of solid waste containing several classes of hydrocarbons as well as metals, which are ploughed into the soil during landfarming to utilise the biodegradation capabilities of the ecosystem of the soil. The contaminants may be toxic to these organisms. For the sustainable use of the services of the ecosystem of the soil, it is crucial to know whether remediation had been sufficient for the intended land use. Indicators are needed to assess the degree of recovery. This study aimed to analyse landfarmed soil at an oil refinery chemically and to assess the toxicity and recovery by using a variety of standardised bioassays with the vermicomposting species *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and the springtail *Folsomia candida* (Collembola). The results showed that soil from the landfarming site, despite remediation, still contained several hazardous chemicals such as diesel range organics, but that the soil mixture was not acutely toxic to the exposed test organisms. It did cause a loss in earthworm (*E. andrei*) biomass, inhibited cocoon production and also decreased juvenile production of the springtail *F. candida*. The results suggested the site still needs remediation before landfarming should continue. Bioassays provide a more ecologically relevant assessment of the remediation status of the soil and its toxicity than chemical analysis alone. This finding supports the use of bioassays as an ecotoxicological tool for assessment of landfarmed soils.

## Inleiding

Olieraffinaderye genereer soliede afval in die vorm van slik wat verskillende klasse van koolwaterstowwe en metale bevat en in verskeie lande as gevaarlik geklassifiseer word. Doeltreffende verwerking en remediëring daarvan is problematies (Hu, Li & Zeng 2013). Verskeie metodes vir die behandeling daarvan is reeds ontwikkel, soos landbewerking, verbranding,



stabilisering, oplosmiddel-ekstraksie en ultrasoniese behandeling. Landbewerking behels die behandeling van groot hoeveelhede van die olieslik deur dit in die reaktiewe boonste grondlaag in te ploeg (Da Silva *et al.* 2014). Die gewildheid van landbewerking het toegeneem nadat die ongekontroleerde deponering van die afval tot kommer oor die omgewingsimpak daarvan gelei het. Dit word as 'n laevlak-tegnologie beskou en behels die beheerde toediening van 'n afval waarvan die samestelling redelik goed gedefinieer is, op 'n grondoppervlak en die inkorporering daarvan in die boonste grondlaag (Genouw *et al.* 1994). Dié metode vereis gereelde omploeg van die grondlaag om die kontaminante en grond te meng en te belug sodat biologiese afbraak optimaal kan plaasvind. Die kontaminante word deur biotiese en abiotiese grondprosesse getransformeer, gedegradeer en geïmmobiliseer (Rubinos *et al.* 2007). Dit word aanbeveel vir die doeltreffende remediëring van verskeie stowwe soos vlugtige organiese verbindings (VOV's), polisikliese aromatiese koolwaterstowwe (PAK's), houtpreserveermiddels (pentachlorofenool en kreosoot), oplosmiddels en totale petroleum-koolwaterstowwe (TPK's) (Vidali 2001). Die prosesse wat in die grond gestimuleer word deur landbewerking, kan fisies of chemies (soos vervlugtiging, oksidasie, reduksie, hidrolise, presipitasie, polimerisasie en degradering as gevolg van UV-straling) of mikrobiologies (biodegradering en mineralisering) wees (Rubinos *et al.* 2007). Benewens mikro-organismes speel die meso- en makrofauna in die grond ook 'n rol. Landbewerking word dikwels gebruik weens die eenvoud en kostedoeltreffendheid daarvan indien dit met ander verwerkingsmetodes vergelyk word (Hu *et al.* 2013; Pearce & Ollermann 1998). Khaitan *et al.* (2006) meen dat die remediëring van petroleumafval 'n groot uitdaging bied omdat dit 'n lae oplosbaarheid in water en ook 'n aparte koolwaterstoffase het.

Die landbewerking van olieslik het egter ook fisiese, chemiese en biologiese implikasies vir die omgewing, asook bepaalde beperkings. Die mobiliteit van die kontaminante in die grond kan nie beheer word nie en hulle mag toksies wees vir nuttige grondorganismes soos myte, erdwurms, springsterte en potwurms wat in gesonde grond voorkom. Loehr en Webster (1996) en Maila en Cloete (2004) het vir sekere historiese gekontameneerde grondtipes aangetoon dat remediëring met verloop van tyd tot 'n afname in sommige chemiese konsentrasies kan lei sodat toksisiteit verminder. Tegnieke en metodologieë moet egter ontwikkel word om die omvang van die oorblywende kontaminasie en die toksiese risiko's te bepaal. Dit is belangrik om vas te stel of die remediëring van 'n gekontameneerde grondgebied voldoende was vir die beoogde landgebruik. Die restourasie of herstel van 'n geïmpakteerde grond-ekostelsel en die gepaardgaande ekostelselfunksies is krities vir die volhoubaarheid van landbewerkingspraktyke met afval. Maatstawwe en indikatore is nodig wat ons in staat sal stel om die graad van herstel van ekostelselfunksies te bepaal nadat hulle aan toksiese stresstoestand blootgestel is. Die eko-toksikologiese evaluering van gekontameneerde grond word meestal op waterige fraksies en met akwatiese organismes uitgevoer (Da

Silva *et al.* 2014), wat nie werklik verteenwoordigend van die grond-ekostelsel is nie.

Die chemiese ontleding van besoedelde grond bied ook nie 'n geïntegreerde beeld van chemiese mengsels, hulle wisselwerkings en gekombineerde effekte of hulle biobeskikbaarheid nie (Augulyte *et al.* 2008; Sverdrup *et al.* 2001; Van Gestel 2008; Van Gestel *et al.* 2001). Die respons van die individuele biologiese komponente van die stelsel kan bruikbare aanduidings bied en inligting verskaf oor die mate van herstel wat plaasgevind het nadat landbewerking byvoorbeeld gestaak is. Gestandaardiseerde bio-evalueringsmetodes is beskikbaar om 'n verskeidenheid organisme- en lewensloopparymeters te meet en sluit maniere in om die rol van biobeskikbaarheid en direkte toksiese effekte te meet, bykomstig tot chemiese analises (Henner *et al.* 1997; Lanno *et al.* 2004). Die beheerde blootstelling van grondorganismes aan grond wat voorheen landbewerking ondergaan het, kan die omgewingsimpak van besoedelstowwe uitwys, asook die herstelstatus van die grond en die omvang van bioremediëring wat nog nodig mag wees om die grond se toksisiteit te verminder. Dit is belangrik om die toksisiteit van chemiese mengsels te bestudeer weens moontlike versterkende effekte as gevolg van chemiese wisselwerkings. Ter wille van ekologiese relevansie moet verskillende organismes en eindpunte gebruik word (Amorim *et al.* 2012). Die rol, sistematiek, lewensloop en blootstellingsroetes van toetspesies moet bekend wees (Løkke & Van Gestel 1998) en hulle moet verteenwoordigend wees (Plaza *et al.* 2005).

As eerste stap om die remediëringstatus van 'n besoedelde grondperseel te bepaal, moet die identiteit en konsentrasies van spesifieke kontaminante gemeet word, waarna bioassessering volg, soos deur die *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD 2006) in Europa en die *International Organisation for Standardization* (ISO 2008) voorgestel word.

Die oogmerk met hierdie studie was om die chemiese samestelling van grond van 'n historiese landbewerkingsperseel, waar slik van 'n olieraffinadery behandel is, te karakteriseer en die toksisiteit daarvan met gestandaardiseerde bioassesseringsmetodes te meet sodat die herstelstatus daarvan oorweeg en moontlike uitsprake oor die wenslikheid al dan nie van voortgesette landbewerkings gemaak kan word. Dit is uitgevoer met die vermikomposterende erdwurm *Eisenia andrei* (Oligochaeta) en die springstert *Folsomia candida* (Collembola). Die vraag waarop 'n antwoord verkry moet word, is of met hierdie werkswyse doeltreffend bepaal kan word of die landbewerkingsgrond voldoende geremedieer is sodat die hernude aanwending van olieslik moontlik is sonder onomkeerbare skade aan die aanwesige biologiese komponente en funksies. Die toetsorganismes is blootgestel aan gekontameneerde grond, ongekotameneerde kontrolegrond en kontrolegrond wat met rou olieslik gekontameneer is, en oorlewing, groei, voortplantingsukses en vermydingsgedrag is as eindpunte gebruik.



## Materiaal en metodes

### Veldperseel en monsterneming

'n Historiese landbewerkingsperseel is by 'n binnelandse Suid-Afrikaanse petroleumraffinadery in die Sasolburg-omgewing geïdentifiseer waar die landbewerking van slik oor verskeie jare plaasgevind het (26°50'8.35"S 27°50'45.61"E) deur dit tot 'n diepte van 200 mm in die grond in te ploeg. Die perseel van 5.9 ha het bestaan uit 'n kleiner noordelike deel (ongeveer 1.9 ha), wat deur 'n grondpad van die groter suidelike deel (ongeveer 3.9 ha) geskei is. Die noordelike perseel het volgens getuies met verloop van tyd meer van die afval ontvang as die groter suidelike perseel, waarskynlik omdat dit nader aan die slikdam geleë is. Die afval van die raffinadery staan as API-slik bekend (American Petroleum Institute sludge) weens die API-tegnologie wat gebruik word om die afval van die herbruikbare water en olie te skei (Punnaruttanakun *et al.* 2003). Dit bevat ongeveer 15% koolwaterstowwe en onbekende hoeveelhede swaar metale. Omdat groot hoeveelhede van die slik oor jare in die perseel ingeploeg is, het die vlak van kontaminasie so gestyg dat doeltreffende biodegradering nie meer kon plaasvind nie. Grond van die perseel is sporadies tussen Oktober 1993 en Junie 2000 deur personeel van die raffinadery ontleed en hoë vlakke van swaar metale, polisikliese aromatiese koolwaterstowwe (PAK's) en TPK's is daaropvolgend gevind (M. van Wyk; Persoonlike mededeling), wat die grond se mikro-, meso- en makrofauna kon benadeel en verhoed dat hulle hulle degraderingsrol vervul. In 2000 is die grond op die perseel met geaktiveerde kalk behandel soos ook deur Mikkonen *et al.* (2012) voorgestel om die pH te verhoog en sodoende die swaar metale tot onoplosbare hidroksiede te immobiliseer en opname deur grondorganismes teen te werk. As bykomende remediëringspoging is kunsmis ook in die grond ingeploeg om biologiese aktiwiteit te stimuleer en biodegradering aan te help.

Die afval van die raffinadery wat uit die API-skeidingsproses verkry word, bevat bindings met beide hidrofobiese en hidrofiliese eienskappe (Punnaruttanakun *et al.* 2003) en word in 'n dam gepomp van waar dit later in die perseel ingeploeg is.

Monsterneming op die perseel is ontwerp deur van standaard-riglyne vir die neem van grondmonsters gebruik te maak (Environment Canada 2nd Draft 2009; Tan 2005). Monsters is sistematies by punte op gelyke afstande oor die hele perseel geneem nadat 'n rooster oor 'n kaart van die perseel getrek en 34 subpersele of blokke onderskei is. By elke

subperseel is 4 kg grond tot 'n diepte van 150 mm geneem, in Ziploc® plastieksakke geplaas en na die laboratorium vervoer vir verdere vermenging en voorbereiding. Monsters is in Mei 2009 geneem.

Grondmonsters van die noordelike en suidelike dele van die perseel is deurgaans afsonderlik gehou en afsonderlik gemeng en aanvanklik gesif (36 mm maasgrootte) om van klippe en plantmateriaal ontslae te raak voordat submonsters volgens die standaard-metode vir grondteksturebepaling deur die reeks van siwwe (vanaf 2 mm en laer) geskud is. Omdat die noordelike deel van die perseel slegs ongeveer een-derde van die totale perseel behels het, is dié deel deur 12 en die suidelike deel deur 23 gemengde monsters verteenwoordig. Monsters is ook vanaf 'n nabyglêë buiteperseel (sonder 'n geskiedenis van industriële of landbouaktiwiteit) met soortgelyke grondsamesstelling as die landverwerkingsperseel vir kontroledoelindes versamel.

Tien liter API-slik is ewekansig by verskillende punte in die dam versamel, gemeng en in die toksisiteitstoets in die laboratorium gebruik om kontrolegrond te kontamineer sodat 'n positiewe sowel as 'n negatiewe kontrole ooreenkomstig die OECD-protokol (OECD 2009) verkry is. Omdat komponente soos klei en organiese materiaal die biobeskikbaarheid, en dus toksisiteit, van stowwe kan beïnvloed, is bykomende kontroles met kunsmatige OECD-grond uitgevoer, aangesien gestandaardiseerde toets vereis dat grond met bekende kenmerke gebruik word (Römbke *et al.* 2006). Die OECD-grond het bestaan uit 35% fyn sand, 35% growwe sand (Consol [Pty] Ltd., Suid-Afrika), 20% kaolin-klei (Serina Kaolin [Pty] Ltd., Suid-Afrika) en 10% Sphagnum-veen (< 1 mm) (Nirrom Peat Moss Inc., Kanada). Die samesstelling van die toetsgrond wat in die studie gebruik is, word in Tabel 1 weergegee.

### Chemiese ontledings van grond

Kwantitatiewe chemiese analyses is op alle substrate uitgevoer deur te toets vir 32 elemente, 16 stowwe deur die VSA se Environmental Protection Agency (EPA) aangedui as polisikliese aromatiese koolwaterstowwe (PAK's) van prioriteit en 'n reeks vlugtige organiese koolwaterstowwe (VOK's). Ontledings is uitgevoer soos deur die EPA (U.S.EPA 1996) voorgeskryf. Die metale is bepaal en gekwantifiseer met behulp van 'n 32-element-skandeerder en induksiegekoppelde plasma-massaspektrometer (ICP-MS). VOK's (suiwer-en-opvangtegniek) en PAK's (asetoon/heksaan-ekstraksie) is gaschromatografies-massaspektrofotometries

**TABEL 1:** Fisiese eienskappe van grond wat in die bioassesserings gebruik is.

Grond	%Klei (< 0.002 mm)	%Silt (0.002 mm – 0.05 mm)	%Sand (0.05 mm – 2.0 mm)	%Organiese materiaal	Grondtipe	pH (1M KCl)	Maksimum WHK (%)
OECD-grond	20.0	0.0	70.0	10.0	Sand-leem	6.0 ± 0.5	60 ± 5.0
Buitegrond (kontrole)	9.0	2.0	89.0	0.39 ± 0.05	Lemerige sand	6.8 ± 0.5	32.7 ± 1.1
Noordgrond	3.4	2.4	94.2	4.4 ± 0.21	Sand	6.0 ± 0.1	59.7 ± 1.5
Suidgrond	3.0	2.0	95.0	2.57 ± 0.04	Sand	5.8 ± 0.4	48.7 ± 4.3

Nota: Waardes uitgedruk as gemiddeldes ± standaardafwyking.

OECD, *Organization for Economic Cooperation and Development*; WHK, Waterhoukapasiteit.



(GC-MS) bepaal. Analises is in viervoud uitgevoer en gemiddelde waardes is gebruik.

### Substrate se voorbereiding

Die grond wat in die eksperimentele persele versamel is, is voor die toetse vir 48 uur by 60 °C in 'n Gallenkamp oond, model OV-330 gedroog en gesif (2 mm maasgrootte en kleiner). Die pH is in triplikaat gemeet met die pH-KCl-metode met 'n Crison Micro pH2001-meter deur 5 g grond te weeg en 25 mL 1M KCl-oplossing met gedistilleerde water aan te maak en vir 5 min deeglik te meng en eers vir 2 uur te laat. Vogretensie, voginhoud en waterhoukapasiteit (WHK) is volgens standaardmetodes met 'n Sartorius-voganaliseerder, Model MA45 gemeet. Die WHK is as volg bereken:

$$\text{WHK (\% droë massa)} = \frac{\text{Nat massa} - \text{droë massa}}{\text{droë massa}} \times 100 \quad [\text{Vgl. 1}]$$

Die organiese inhoud van die grond is met behulp van die Walkley-Black-metode van nat verbranding bepaal, soos voorgestel deur Tan (2005). Die klei-, sli- en sandinhoud is met die hidrometermetode (Van der Watt 1966) bepaal.

### Toetsorganismes

Die komposterende erdwurm *Eisenia andrei* (Bouché 1972) is verkry uit 'n gesinchroniseerde kultuur wat in die Ekotoksikologie-laboratorium van die Departement Plant- en Dierkunde, Universiteit van Stellenbosch, uit 'n voorraadkultuur geteel is. Deelname aan 'n internasionale strepieskode-kringtoets (Eng. barcoding) deur sewe onafhanklike laboratoriums het die identiteit van die spesie bevestig (Römbke, persoonlike mededeling). Kokonne is geoes uit die teelbakke en in 24-sel-bakkies met gedistilleerde water geplaas en by 20 °C geïnkubeer ten einde wurms van dieselfde ouderdom vir die toetse te verkry. Wurms wat uitbroei, is daaglik versamel en in bakke met beesmis geplaas (OECD 2009), en op die ouderdom van 90 dae is volwasse, (klitellate) wurms in die eksperimente gebruik.

Collembola (springster) is 'n groep Arthropoda wat wydverspreid in grond voorkom (Løkke & Van Gestel 1998) en weens hulle grootte en biomassa 'n kleiner rol in grond speel as ander organismes. Nogtans is hulle verteenwoordigend van die grondfauna en word dikwels in eko-toksikologiese toetse gebruik omdat hulle gevoelig is en hulle lewensloopsiklus goed bekend is. Springster is maklik om te teel en het 'n kort lewensloop (Fountain & Hopkin 2005). Eksemplare van *Folsomia candida* is uit plaaslike laboratoriumkulture verkry. Hulle is in teelringe met bodems bestaande uit 'n mengsel van gips en geaktiveerde koolstof, geplaas en met bakkersgis (Gold star yeast™, Suid-Afrika) gevoed en gereeld ad libitum klam gehou. Ouderdomsinkronisering is gedoen deur 20 volwasse springster in teelringe te plaas om eiers te tel. Die volwassenes is na twee dae verwyder en die eiers het na sewe dae begin uitbroei. Die springster het volwassenheid na 12–14 dae bereik. Alle springster wat in die toetse gebruik is, was tussen 20 en 22 dae oud.

### Blootstellingstoestande en eindpunte vir *Eisenia andrei*

Die erdwurms is blootgestel volgens OECD se vroeë riglyn 222 (OECD 2009). Alle substrate is aangevul met droë, fyngemaalde, gesife (2 mm maas), urienvrye beesmis as voedsel.

Agt erdwurms wat tussen 300 mg en 500 mg weeg, is twee dae voor elke eksperiment in kontrolegrond (OECD-grond of grond van die buiteperseel) geplaas om te akklimmeer. Alle blootstellings is in 'n donker klimaatkamer by 20 °C uitgevoer en die substrate is tot 60% van die maksimum waterhoukapasiteit (WHK) bevogtig en die pH is aan die begin en einde van elke blootstelling gemeet. Vogverlies is elke tweede week aangevul.

Die erdwurms (aght wurms in elk van agt replikate tensy anders vermeld) is in die finale toetse, blootgestel aan die buiteperseel se grond, die noordelike en suidelike perseel se grond, en aan 'n 1% API-slik in buiteperseelgrond (positiewe kontrole). Die eerste reeks blootstellings het vier weke geduur (kyk Figuur 1) en die tweede reeks ses weke (kyk Figuur 2). Die verandering in biomassa, kokonproduksie en getal nakomelinge is by die verskillende konsentrasies vergelyk. Wurms is weekliks geweeg en kokonne is tweeweekliks versamel. Kokonne is in 24-selbakkies geïnkubeer in gedistilleerde water by 25 °C en die getal nakomelinge is getel (Reinecke, Reinecke & Maboeta 2001).

### Vermydingsgedrag van *Eisenia andrei*

Hierdie toets is gebaseer op die ISO (*International Organisation for Standardisation*) se riglyn vir grondkwaliteit (ISO 2008). 'n Dubbelkamer is gebruik om die beweging tussen toets- en kontrolegrond te bepaal met vermyding van die toetsgrond as gemete eindpunt. Die toets is in plastiekhouders uitgevoer (8 cm × 11 cm × 18 cm) wat deur 'n afskorting in twee gelyke dele verdeel is. Elke deel/helfte is as volg met 200 g van die substraat in verskillende kombinasies gevul: (1) buiteperseelgrond aan beide kante (negatiewe kontrole), (2) buitegrond versus noordperseel se grond, (3) buitegrond versus suidperseel se grond, (4) buitegrond versus buitegrond gekontamineer met 1% API-slik (positiewe kontrole). Die tussenskot tussen die twee kante is verwyder en agt volwasse wurms is op die middellyn geplaas. Die houders is met 'n geperforeerde deksel bedek en vir 48 uur in die donker in 'n klimaatkamer by 20 °C gelaat. Daarna is die tussenskot tussen die twee dele teruggeplaas, die substraat aan elke kant verwyder en die wurms getel. Wurms wat in die middel gevind is, is as 0.5 vir beide kante getel en wurms wat nie gevind kon word nie, is as dood beskou en afgetrek van die totaal. Vyf replikate is vir elke blootstelling uitgevoer.

### Toetse en eindpunte met *Folsomia candida*

Die voortplantingstoetse is volgens die OECD se riglyn 232 (OECD 2009) uitgevoer. Twintig gram droë toetsgrond is vir twee dae in 'n 100-mL-rondeboomfles van glas geplaas



voordat tien volwasse springsterter van dieselfde ouderdom daarin geplaas is. Alle eksimplare was met die aanvang van die blootstellings tussen 20 en 22 dae oud en bakkersgis is as voedsel voorsien. Voedselbesikbaarheid en vog is weekliks gekontroleer en blootstellings is vir vier weke gedoen met vyf replikate per toets. Daarna is die inhoud van elke fles in 'n 300-mL-glasbeker met 100 mL water gewas. Die inhoud is liggies geroer totdat die oorlewende springsterter op die oppervlak gedryf het weens hulle chitienagtige eksoskelet. Die oppervlak van elke houer is drie keer met 'n Canon EOS 350D digitale enkellens-reflekskamera gefotografeer. Die foto's is met Adobe® Photoshop® sagteware aangepas en elektronies gemanipuleer om die kontras te optimeer sodat al die springsterter per foto akkuraat getel kon word. Die gemiddeld van die getal organismes wat op die drie foto's getel is, is bereken. Voortplanting van springsterter (getal juveniele organismes) is as eindpunt gebruik.

### Vermydingsgedrag van *Folsomia candida*

Die vermydingstoets met die springsterter is basies op dieselfde manier as die erdwurmtoets uitgevoer. As positiewe kontrole is buiteperseelgrond versus 1% slik gekontamineerde kontrolegrond gebruik. Na voltooiing is elke kant van die houer fotografies gevisualiseer soos reeds hierbo beskryf vir die bio-assessering.

### Statistiese analises

Data is vir normaliteit getoets deur van Statistica® 9 sagteware gebruik te maak (StatSoft 2010) deur toepassing van die Shapiro-Wilk-toets (waar die waarskynlikheidsfaktor  $p \leq 0.05$  nie-parametriese data en  $p \geq 0.05$  parametriese data aandui).

Waar meervoudigheid van parametriese data vergelyk is, is One-way Analysis of Variance (ANOVA) met die Tukey-post-toets uitgevoer om verskillende toestande te vergelyk. In die geval van nie-parametriese data is Kruskal-Wallis ANOVAs met Dunn se meervoudige vergelyking gebruik met statistiese waarskynlikheid as  $p \leq 0.05$ .

In die vermydingstoets is die getal organismes in die toets- en kontrolegrond met die tweerigting-*t*-toets vergelyk. Vermyding van die toetsgrond het plaasgevind indien die organismes se vermyding daarvan betekenisvol meer as 0.50 (50%) was. Vermydingsgedrag groter as 80% is as toksies beskou (Hund-Rinke *et al.* 2003; Da-Luz, Römbke & Sousa 2008; Yeardeley, Lazprchak & Gast 1996).

## Resultate en bespreking

### Fisiese en chemiese eienskappe van die perseel- en kontrolegrond

Die eienskappe van die grond wat gebruik is, word in Tabel 1 opgesom. Die kunsmatige OECD-grond het die hoogste organiese materiaalinhoud van 10% gehad en die buiteperseel se grond die laagste (0,4%). Grond van die noord- en suidperseel het onderskeidelike 4,4% en

**TABEL 2:** Totale konsentrasies (mg/kg) van elemente en petroleumkoolwaterstowwe wat die petrolreeks organiese verbindings en dieselreeks organiese verbindings insluit wat in die perseelgrond (noord en suid) gevind is.

Element gevind	Buitegrond†	Noordgrond‡	Suidgrond‡
Al	0.06	<b>11.63 ± 0.78</b>	<b>1.57 ± 0.15</b>
Mn	0.05	<b>1.67 ± 0.19</b>	<b>0.82 ± 0.06</b>
Pb	0.05	<b>0.29 ± 0.35</b>	<b>0.16 ± 0.02</b>
S	<b>12.6</b>	<b>59.13 ± 1.24</b>	<b>29.71 ± 2.98</b>
Zn	0.11	<b>3.93 ± 0.07</b>	<b>1.81 ± 0.08</b>
Fe	< 0.04	0.09 ± 0.01	0.077 ± 0.02
Ba	0.46	0.52 ± 0.03	0.65 ± 0.11
Mg	4.62	17.23 ± 0.54	11.15 ± 0.41
K	2.18	7.32 ± 0.1	5.04 ± 0.28
Si	3.79	141.75 ± 3.77	72.58 ± 2.45
Ca	41.1	9.91 ± 0.65	4.57 ± 0.08
PRO (µg/kg)	< 25	< 25	< 25
DRO (mg/kg)	< 150	1469.25	675.25

Nota: Waardes in vetdruk dui konsentrasies aan wat bo die aanvaarbare risikoperk van Department of Water Affairs and Forestry, 1998, *Minimum requirements for the handling, classification and disposal of hazardous waste*, 2nd edn., Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria is.

†,  $n = 1$ ; ‡, gemiddeld ± standaard afwyking waar  $n = 4$ .

2,6% organiese inhoud gehad. Die buitegrond is as 'leem-sanderig' gekarakteriseer en dié van die landbewerkte perseel as 'sanderig' volgens die klassifikasiesetel van die VSA se Departement van Landbou (USDA). Die chemiese samestelling van die grond van die landbewingperseel word in Tabel 2 en 3 weergegee. Dit sluit swaar metale, VOV's en polisikliese aromatiese koolwaterstowwe (PAK's) in. Grond van die landbewingperseel het steeds verskeie van die stowwe bevat wat met verloop van tyd met die slik ingeplou is. Die konsentrasies was opmerklik hoër in die noordperseel waar landbewing meer intensief was as in die suidperseel, waarskynlik omdat meer slik teen 'n hoër frekwensie daar gedeopneer is omdat dit gerieflik nader aan die slikdam geleë is (M. van Wyk, persoonlike mededeling). Hierdie chemikalieë was nie in die kontrolegrond van die buiteperseel in noemenswaardige hoeveelhede aanwesig nie, maar swaer het in beide die toets- en buiteperseel voorgekom (Tabel 2). Die aanwesigheid van verskeie nywerheidsaktiwiteite in die onmiddellike omgewing wat swaweldioksied (SO<sub>2</sub>) in die lug vrylaat (Department of Water Affairs and Forestry 1998), dra moontlik hiertoe by.

Vlakke van aluminium (Al), mangaan (Mn), lood (Pb) en sink (Zn) is in beide dele van die landbewerkte perseel gevind, met Al- en Mn-konsentrasies (Tabel 2) bo die aanvaarbare risikolimiet (ARL) van die riglyne van die Department of Water Affairs and Forestry (DWAF 1998).

Hoë konsentrasies van die dieselreeks organiese verbindings (DRO's) het in die perseelgrond voorgekom en wek waarskynlik die meeste kommer weens hulle giftigheid vir organismes. Die konsentrasies in die noordperseel was ongeveer twee keer soveel as in die suidperseel (1469.25 mg/kg ± 125 mg/kg en 675.25 mg/kg ± 50 mg/kg onderskeidelik [Tabel 2]). Geen spore van die VOV's is in die perseelgrond gevind nie, hoewel hoë vlakke normaalweg in API-slik aanwesig is (Van Wyk 2010). Die degradering daarvan is reeds goed bestudeer, en volgens Insam and Seewald (2010) tree grond op as 'n ideale natuurlike biofilter waarin



**TABEL 3:** Gemiddelde konsentrasies ± standaardafwyking ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) van polisikliese aromatiese koolwaterstowwe in buitegrond en landbewerkte perseelgrond (noord en suid).

PAK gevind	CCME† (CCME 2001)	Buitegrond	Noordgrond	Suidgrond
Naftaleen	22 000	< 0.45	6.75 ± 0.1	6.85 ± 0.15
Asenaftaleen	-	< 0.27	< 0.27	< 0.27
Asenafteen	-	< 0.50	< 0.50	< 0.50
Fluoreen	-	< 0.53	< 0.53	< 0.53
Fenantreen	50 000	< 0.54	2.85 ± 0.1	2.74 ± 0.05
Antraseen	-	< 0.59	2.95 ± 0.08	2.92 ± 0.07
Fluoranteen	-	< 0.74	6.04 ± 0.13	6.11 ± 0.12
Pireen	100 000	< 0.83	6.84 ± 0.36	6.55 ± 0.16
Benzo(a)antraseen†	10 000	< 1.17	8.5 ± 0.70	8.34 ± 0.34
Chriseen†	-	< 0.81	5.4 ± 0.37	5.38 ± 0.23
Benzo(b)fluoranteen†	10 000	< 0.87	3.58 ± 0.20	3.25 ± 0.08
Benzo(k)fluoranteen†	10 000	< 0.84	4.84 ± 0.08	4.86 ± 0.10
Benzo(a)pireen†	700	< 0.87	8.66 ± 0.40	8.23 ± 0.19
Indeno (1,2,3-cd)pireen†	10 000	< 1.10	10.14 ± 0.21	10.15 ± 0.21
Dibenzo(a,h) antraseen†	10 000	< 1.34	11.81 ± 0.21	11.82 ± 0.30
Benzo(ghi)perileen	-	< 1.07	10.79 ± 0.24	10.29 ± 0.30
∑ 16 PAKs	-	-	89.18 ± 3.19	87.49 ± 2.30
∑ 7 Karsinogeniese PAKs	-	-	52.96 ± 2.17	52.03 ± 1.45

PAK, polisikliese aromatiese koolwaterstowwe; CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment.

N = 4.

†, Gestandaardiseerde maksimum toelaatbare PAK-konsentrasies in industriële grond volgens die Canadian Council of Ministers of the Environment.

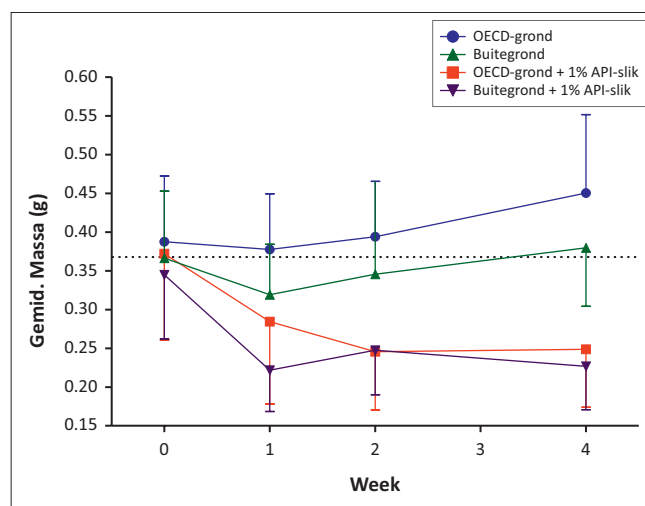
'n verskeidenheid mikro-organismes onder spesifieke toestande van temperatuur, organiese inhoud, suurstof en pH by biodegradering betrokke is.

PAK's het ook in die landbewerkingsperseel voorgekom (Tabel 3). Volgens die VSA se Environmental Protection Agency (US EPA) is 16 PAK's prioriteitstowwe wat skadelik vir die mens is. Hiervan het die International Agency for Research of Cancer (IARC 2012) die volgende as karsinogenies vir mense aangedui, naamlik benzo(a)antraseen, chriseen, benzo(b)fluoranteen, benzo(k)fluoranteen, benzo(a)pireen, indeno (1,2,3-cd)pireen and dibenzo(a,h)antraseen (Nadal, Schuhmacher & Domingo 2004). Al 16 prioriteits-PAK's het in grond van beide die noord- en suidperseel voorgekom, met totale konsentrasies van  $89.18 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 3.19 \mu\text{g}/\text{kg}$  in die noordgrond en  $87.49 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 2.30 \mu\text{g}/\text{kg}$  in die suidgrond.

Die vlakke van PAK's in die landbewerkingsperseel was egter heelwat laer as dié wat by ander raffinaderye gemeet is. Bakker *et al.* (2000) het vlakke van  $3000 \text{ mg}/\text{kg} - 14\,000 \text{ mg}/\text{kg}$  gemeet vir die sewe karsinogeniese PAK's sover as 4.2 km vanaf 'n raffinadery in Zelzate (België). Škrbic, Cvejanov and Đurišić-Mladenovi (2005) het in Novi Sad, Montenegro, vlakke van tot  $47\,870 \text{ mg}/\text{kg}$  gemeet. Die laer vlakke wat in ons studie gevind is, mag die resultaat wees van degradering wat met verloop van tyd in die landbewerkingsperseel plaasgevind het nadat landbewerking opgehou of afgeneem het (Mohan *et al.* 2006).

### Oorlewing en subletale response van *Eisenia andrei*

Alle wurms wat aan kontrole- en perseelgrond blootgestel is, het oorleef. Die veranderinge in biomassa van volwasse eksemplare van *E. andrei* wat aan beide positiewe en negatiewe kontroles blootgestel is, word in Figuur 1 aangebied. Wurms



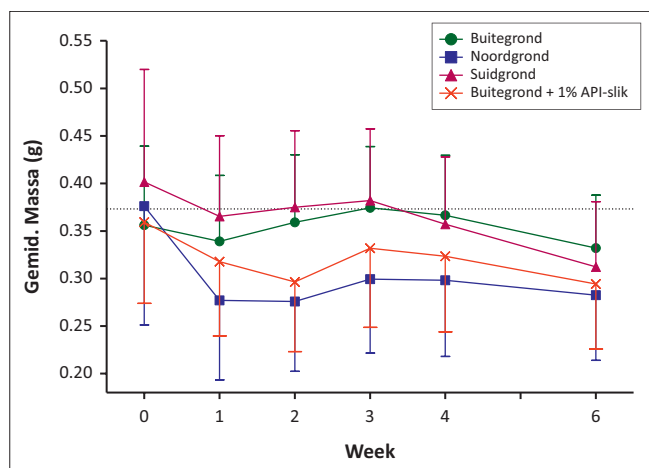
Nota: Die stippellyn toon die gemiddelde aanvangsbioomassas vir alle wurms.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development.

**FIGUUR 1:** Gemiddelde ± standaardafwyking van die biomassaverandering (in g) van *Eisenia andrei* wat vir 4 weke aan kontrolegrond met en sonder API-slik blootgestel is.

wat aan OECD-grond blootgestel is, het die hoogste toename in biomassa na verloop van vier weke gehad, naamlik  $33.89 \pm 3.4$ , terwyl wurms wat aan die buiteperseelgrond blootgestel is, ook oorleef het, maar aanvanklik geen betekenisvolle massaverandering getoon het nie. Die gemiddelde biomassa van die wurms het in beide kontrolegrond (OECD en buitegrond) wat met 1% slikgkontameneer is, na een week betekenisvol afgeneem.

Alle wurms het aanvanklik na verloop van een week in alle blootstellings 'n massaverlies ondergaan. Die verliese in die twee met slikgkontameneerde kontrolegrondtipes was na vier weke statisties betekenisvol ( $p < 0.05$ ) laer as die aanvangsmassa. Wurms in die ongekontameneerde kontrolegrond het teen die tweede week die biomassaverlies



Nota: Die stippellyn verteenwoordig die die aanvangsbioomassas vir alle wurms.

**FIGUUR 2:** Gemiddelde  $\pm$  standaardafwyking van die biomassaverandering (in g) wat *Eisenia andrei* in die toetsgrond oor ses weke ondergaan het.

herwin en teen die vierde week 'n statisties betekenisvolle toename getoon vergeleke met week twee ( $p \leq 0.05$ ).

Die biomassaveranderinge van wurms wat aan die grond van die landbewerkingsperseel blootgestel is, word in Figuur 2 aangebied. Hoewel enkele individuele wurms in alle blootstellingsgroepe massaverlies ondergaan het in die perseelgrond, was die totale biomassaverandering vanaf die aanvangsmassa ( $379.19 \text{ mg} \pm 10.85 \text{ mg}$ ) tot en met terminering van die assessering ( $278.05 \text{ mg} \pm 41.80 \text{ mg}$ ) nie statisties betekenisvol nie. Daar was 'n persentasieverandering van  $-21.35\% \pm 15.44\%$  vir noordperseelgrond en  $-19.99\% \pm 12.30\%$  vir suidperseelgrond. Die gemiddelde biomassaverandering in OECD-grond wat met 1% slik gekontamineer is, was  $-13.25\% \pm 12.52\%$  en in gekontamineerde buitegrond  $-25.49\% \pm 3.06\%$ . Die wurms het beter gevaar in gekontamineerde kontrolegrond met 'n hoë organiese inhoud as in gekontamineerde grond met 'n lae inhoud. Afgesien van die groter beskikbaarheid van voedsel is die biobeskikbaarheid van kontaminante volgens Lanno *et al.* (2004) ook laer in grondtipes met 'n hoër organiese inhoud.

Tabel 4 bevat 'n opsomming van die gegewens vir kokonproduksie en nakomelinge. Die erdwurms het in OECD-grond die meeste kokonne geproduseer, maar die kokonne wat in die buitegrond geproduseer is, het die meeste nakomelinge opgelewer. Die wurms in die twee gekontamineerde kontrolegrond het geen kokonne

**TABEL 4:** Gemiddelde ( $\pm$  standaardafwyking) van kokonproduksie en nuwe nakomelinge van *Eisenia andrei*-wurms wat vir vier weke aan kontrole- en perseelgrond blootgestel is.

Substrate	Kokongetalle	Kokonne	Nakomelinge per wurm
OECD-grond (kontrole)	$16.0 \pm 5.0$	1.6	$20.0 \pm 5.6$
OECD-grond + 1% slik	0.0 <sup>a</sup>	0	0
Buitegrond (kontrole)	$11.0 \pm 3.1$	0.73	$27.0 \pm 5.7$
Buitegrond + 1% slik	0.0 <sup>a</sup>	0	0
Noordperseelgrond	$1.25 \pm 0.7$	$0.03 \pm 0.04$	NM
Suidperseelgrond	$19.00 \pm 5.3$	$0.48 \pm 0.07$	NM

Nota:  $n = 16$  (8 per houer) in OECD-grond en  $n = 24$  (8 per houer) in alle ander grondtipes. OECD, Organization for Economic Cooperation and Development; NM, nie gemeet.

<sup>a</sup>, Dui statisties betekenisvolle ( $p \leq 0.05$ ) verskille van die OECD-grond aan.

geproduseer nie, wat 'n duidelike aanduiding was van die nadelige uitwerking van die slik op voortplanting.

Die wurms se voortplanting soos gemeet aan kokonproduksie was bykans soortgelyk in beide buitegrond en suidperseelgrond, maar laag tot afwesig in noordgrond en in buitegrond wat met 1% slik gekontamineer is. Kokonproduksie in die OECD-grond was statisties betekenisvol hoër ( $p < 0.05$ ) as in alle ander blootstellings. Daar was geen betekenisvolle verskille tussen die ander blootstellings onderling nie.

*Eisenia andrei* is daarvoor bekend dat hulle optimaal groei en voortplant in substrate met 'n hoë organiese inhoud (Sims & Gerard 1985). Die buiteperseelgrond het 'n lae inhoud gehad ( $\pm 0.4\%$ ) in vergelyking met die OECD-grond (10%), maar die wurms het nogtans oorleef en voortgeplant. Dit is in kontras tot die positiewe kontroles met 1% slik waar die wurms biomassa verloor het en nie voortgeplant het nie.

Die biomassaveranderinge en die kokonproduksie in die kontrolegrond en suidperseelgrond dui daarop dat die wurms wat aan laasgenoemde blootgestel is, minder geaffekteer is as die wurms wat aan noordperseelgrond en 1% gekontamineerde grond blootgestel is, waar die grootste biomassaverlies voorgekom het. Wurms wat aan suidgrond blootgestel is, het ook dieselfde getal kokonne geproduseer as die wat in die buitegrond was ( $19.0 \pm 5.3$  en  $18.5 \pm 9.7$  onderskeidelik). In die noordperseelgrond was die kokonproduksie ook aansienlik laer ( $1.25 \pm 0.7$ ). Die negatiewe reponse in terme van sowel kokonproduksie as biomassaverandering stem ooreen met die feit dat die kontaminasie van die noordperseelgrond hoër was as elders. Die chemiese analises en die wurms se response ondersteun dus wedersyds die gevolgtrekking dat die grond van die noordperseel nog sodanig gekontamineer is dat dit groei en voortplanting benadeel, in teenstelling met die suidperseel wat minder toksies is.

Vir soverre die respons van die toetsspesie aanduidend is van die 'gesondheid' van die grond, is verdere remediëring waarskynlik nodig en behoort toekomstige landbewerking op die perseel daarvolgens bestuur te word om volhoubare gebruik van die biologiese aktiwiteit en funksies in die grond te help behou.

### Eindpunte gemeet met *Folsomia candida*

Tabel 5 toon die resultate van die blootstellings van *F. candida* aan die verskillende kontrole en gekontamineerde kontrolegrond. Geen statisties betekenisvolle verskille in die voortplanting het tussen die buitekontrolegrond en die OECD-grond voorgekom nie, hoewel die totale getal juveniele in die buitegrond die hoogste was. Slegs enkele springsterte het blootstelling aan 1% API-slik in buitekontrolegrond oorleef (positiewe kontrole) en enkele juveniele geproduseer (Tabel 5).

*Folsomia candida* se voortplanting in die twee verskillende kontrolegrondtipes (ongekontamineer) was nie betekenisvol



**TABEL 5:** Getal juveniele nakomelinge (gemiddeld  $\pm$  standaardafwyking) wat na vier weke deur *Folsomia candida* geproduseer is na blootstelling aan die toetsgrond.

Toetsgrond	Gemiddelde getal juveniele
Buitegrond (kontrole)	479.89 $\pm$ 30.42
OECD-grond	388.33 $\pm$ 17.86
Noordperseelgrond	289.42 $\pm$ 58.62 <sup>a,c</sup>
Suidperseelgrond	253.33 $\pm$ 122.94 <sup>a,b,c</sup>
1% Slik in buitegrond	1.0 $\pm$ 1.0 <sup>a,b</sup>

*n* = 50 per behandeling met 10 organismes per replikaat.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development.

<sup>a</sup>, Toon statisties betekenisvolle verskille ( $p \leq 0.05$ ) van die buiteperseelgrond as kontrole; <sup>b</sup>, in vergelyking met OECD-grond; <sup>c</sup>, in vergelyking met buitegrond wat met 1% slik gekontamineer is.

verskillend nie. Die hoogste gemiddelde getal juveniele is in die buiteperseelgrond geproduseer (479.89  $\pm$  30.52).

*Folsomia candida* het statisties betekenisvol minder juveniele in die landbewaterkte perseelgrond (in beide noord- en suidgrond) as in die kontroles geproduseer. Die produksie in die noordgrond was betekenisvol laer as in beide die buitegrond en die OECD-grond. Produksie in die suidgrond was slegs betekenisvol laer as in die buitegrond ( $p < 0.05$ ). Die resultate dui daarop dat die kontaminante wat in die landbewaterkingsperseel teenwoordig is, 'n inhiberende uitwerking op die voortplanting van *F. candida* gehad het en dat die spesie besonder sensitief was en duidelik 'n verskil uitgewys het tussen die vlakke van kontaminasie in die noordelike deel en suidelike deel van die landbewaterkingsperseel.

Of en hoe die waargenome response van die organismes op individuele vlak van waarde kan wees om inligting te veskaf oor die effek wat op die bevolkings- en hoër vlakke van organisasie te wagte kan wees, bly 'n groot uitdaging. Meer modelle van gevallestudies is volgens Hamda *et al.* (2014) nodig. Vir soverre die springsterse se sensitiewe voortplantingsrespons ook as indikator kan dien van die vlak van kontaminasie in die landbewaterkingsperseel, en dit na ander biota geëkstrapoleer sou kon word, kan geargumenteer word dat remediëring nog nie voldoende was om verdere toevoeging van slik op die perseel te onderneem sonder dat die organismes, hulle voorplanting en hulle ekologiese funksies drasties benadeel word nie.

### Vermydingsgedrag van *Eisenia andrei* en *Folsomia candida*

Resultate van die vermydingsgedrag word in Tabel 6 saamgevat. Met 'n keuse tussen die kontrole en die noordgrond is laasgenoemde baie sterker deur *E. andrei* as deur *F. candida* vermy. Met 'n keuse tussen suidgrond en buitegrond het die erdwurms geen betekenisvolle vermyding geopenbaar nie, maar die springsterse het wel 'n voorkeur gehad vir suidgrond. Beide spesies het 'n statisties betekenisvolle (meer as 80%) vermyding van die 1% slik gekontamineerde buitegrond getoon. *Folsomia candida* het, wat die twee kontrolegrond betref, OECD-grond bo buitegrond verkies ( $p \leq 0.05$ ).

*Eisenia andrei* het beide noord- en suidgrond vermy, in teenstelling met *F. candida* wat voorkeur aan die grond

**TABEL 6:** Opsomming van die vermydingsgedrag (%) (gemiddelde  $\pm$  standaardafwyking) vir die twee spesies wat 'n voorkeur kon uitoefen tussen buiteperseelgrond (kontrole) (behandeling 1) en verskillende toetsgrondtipes (behandeling 2).

Keuse tussen Behandeling 1 en Behandeling 2	<i>Eisenia andrei</i> <i>n</i> = 32	<i>Folsomia candida</i> <i>n</i> = 50
<b>Buiteperseelgrond (kontrole)</b>	-	-
Buiteperseelgrond	51.56 $\pm$ 17.95	49.06 $\pm$ 18.61
Noordperseelgrond	42.19 $\pm$ 31.20	60.91 $\pm$ 11.58
Suidperseelgrond	45.31 $\pm$ 20.01	60.29 $\pm$ 15.57
Buitegrond + 1% slik	12.50 $\pm$ 17.68	15.93 $\pm$ 12.71
OECD-grond	-	78.62 $\pm$ 9.08

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development.

verleen het bo die relatief ongekontamineerde buitegrond. Hoewel *F. candida* dus sterk negatief deur die grond van die landbewaterkingsperseel geaffekteer is tydens die subletale toetse, het hulle die grond nie tydens die gedragstoetse vermy nie. Dit mag dui op die beperkings wat vermydingstoetse mag inhou en dat die tipe eindpunt met versigtigheid in toksisiteitstoetse gebruik moet word.

*Folsomia candida* verkies grond met 'n hoë organiese-materiaal-inhoud (Lors *et al.* 2006; Da-Luz *et al.* 2008; Paton *et al.* 2005), en dit mag 'n rol gespeel het in hulle voorkeure omdat die toevoeging van slik tydens landbewatering ook die organiese inhoud van die grond verhoog.

*Eisenia andrei* het beide noord- en suidgrond vermy, hoewel nie besonder sterk nie. Die kontrolegrond wat met 1% API-slik gekontamineer is, kan as toksies vir beide erdwurms en springsterse beskou word indien die riglyne van Hund-Rinke *et al.* (2003) gevolg word. Die outeurs meen dat kontaminante wat met meer as 80% deur organismes vermy word, toksies is.

Vermydingsgedrag as toetsmetode het sekere beperkings. Indien 'n organisme nie 'n bepaalde toksiese stof kan waarneem nie, kan dit ook nie vermy word nie. Hoewel die resultate van vermydingstoetse met versigtigheid geïnterpreteer moet word weens die kompleksiteit van die grondomgewing en die moontlike wisselwerking tussen verskillende stowwe in chemiese mengsels, kan dit as bykomende metode dien om 'n eenvoudige en vinnige vroeë assessering te doen (Da Luz, Ribeiro & Sousa 2004; Hund-Rinke & Wiechering 2001; Yeardeley *et al.* 1996).

### Spesiesensitiwiteit

Die gevoeligheid van die twee spesies soos bepaal met behulp van oorlewing, biomassaverandering en voortplanting as eindpunte in landbewaterkingsgrond en 1% slik gekontamineerde kontrolegrond, kan vanaf meeste tot minste gevoelig in die volgende rangorde geplaas word: *F. candida* oorlewing > *F. candida* voortplanting > *E. andrei* konproduksie/voortplanting > *E. andrei* oorlewing. *E. andrei* het gemiddeld 51  $\pm$  9.0 kokonne in die buiteperseel se kontrolegrond (sonder slik) en baie minder kokonne in die noordperseel- en suidperseelgrond ('n gemiddelde van onderskeidelik 1.25 en 19.0 kokonne). Kokonproduksie van die wurms was dus 'n baie sensitiewe maatstaf van die effek van die toksikante in die grond omdat dit 'n verlaging van meer as 50% tot gevolg gehad het.





*Folsomia candida* het in die buitegrond  $479.89 \pm 30.4$  juveniele geproduseer en baie min in die 1% API-slik gekontameneerde buitegrond terwyl die springsterte in die noordgrond en suidgrond respektiewelik gemiddeldes van  $289.42 \pm 58.62$  en  $253.33 \pm 122.94$  juveniele opgelewer het. Ook in die geval van die spesie was voortplanting dus 'n gevoelige eindpunt vir lae kontaminasietoestande waarby die organismes kon oorleef omdat landbewerkte grond voortplanting in vergelyking met buitegrond en OECD-grond (388.3 juveniele) drasties verminder het. Afgesien van die verskille in gevoeligheid is die toksisiteit en biobeskikbaarheid van die kontaminante ook van die samestelling van die grond afhanklik (Dorn *et al.* 1998). Ook kan die onderlinge wisselwerkings tussen stowwe in mengsels 'n rol speel (Amorim *et al.* 2012) sodat afleidings oor toksisiteit dit steeds in aanmerking moet neem.

## Gevolgtrekking

Die grond van die landbewerkingsperseel was, in moontlike teenstelling met die slik self, nie akkute toksies vir die twee blootgestelde spesies nie, maar het tot verlies in biomassa by die erdwurms (*E. andrei*) gelei en kokonproduksie geïnhibeer, terwyl daar ook 'n verlaging in die produksie van juveniele springsterte (*F. candida*) was. Hoë vlakke van DRO's was steeds in die perseelgrond teenwoordig, wat ten spyte van die remediëring wat reeds plaasgevind het, sodanig was dat dit die twee toetspesies kon benadeel. 'n Duidelike onderskeid kon getref word tussen die response van die organismes in die meer gekontameneerde noordelike deel en die minder gekontameneerde suidelike deel van die perseel. Dit was nie duidelik watter van die verskillende kontaminante in die grond van die landbewerkingsperseel verantwoordelik was vir die hoër toksisiteit van die noordperseelgrond nie. Volhoubaarheid van landbewerking van slik op die betrokke perseel sal afhanklik wees van voortgesette remediëring sodat die kontaminante wat skadelik mag wees vir voordelige grondorganismes, gedegradeer kan word. Die studie het getoon dat bioassessering bykomend tot chemiese analise 'n meer volledige en ekologies meer relevante beeld verskaf van die impak van landbewerking en die remediëringstatus van die grond in die landbewerkte perseel.

## Erkenning

Die outeurs erken met dank die finansiële ondersteuning van die Universiteit van Stellenbosch, die Nasionale Navorsingstigting (NRF) en SASOL. Menings, aanbevelings en gevolgtrekkings is uitsluitlik dié van die outeurs. Ons bedank graag vir Randal Albertus, Marna Nel en Neil Paton vir hulle hulp met die chemiese analises en veldwerk.

## Mededingende belange

Die outeurs verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verhouding(s) het wat hulle op 'n voordelige of nadelige wyse in die skryf van die artikel beïnvloed het nie.

## Outeursbydrae

Die konseptuele ontwerp is deur die eerste outeur (A.J.R. [University of Stellenbosch]) gedoen in samewerking met die tweede outeur (S.A.R. [University of Stellenbosch]). Die aanvanklike literatuurstudie is deur die derde outeur (M.v.W. [University of Stellenbosch]) gedoen en later uitgebrei deur A.J.R. Die veldwerk en laboratoriumproewe is deur M.v.W. onder toesig van A.J.R. en S.A.R. uitgevoer en laasgenoemde was vir die identifikasie en teling van die organismes verantwoordelik. M.v.W. het die statistiese verwerking gedoen. Die gegewens is deur al drie outeurs verder verwerk en geïnterpreteer. A.J.R. het hierdie manuskrip in oorleg met die mede-outeurs geskryf.

## Literatuurverwysings

- Amorim, M.J.B., Pereira, C., Menezes-Oliveira, V.B., Campos, B., Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S., 2012, 'Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil', *Environmental Pollution* 160, 145–152. PMID: 22035938, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.005>
- Augulyte, L., Kliaugatte, D., Racys, V., Jankunaite, D., Zaliauskiene, A., Andersson, P.L. *et al.*, 2008, 'Chemical and ecotoxicological assessment of selected biologically activated sorbents for treating wastewater polluted with petroleum products with special emphasis on polycyclic aromatic hydrocarbons', *Water Air and Soil Pollution* 195, 243–256. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-008-9743-7>
- Bakker, M.I., Casado, B., Koerselman, J.W., Tolls, J. & Kollöffel, C., 2000, 'Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery', *Science of the Total Environment* 263, 91–100. PMID: 11194166, [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00669-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00669-0)
- Bouché, M.B., 1972, 'Lombriciens de France, ecologie et systematique', *Institut National des Recherches Agricoles (INRA)* 72, 1–671.
- Council for Canadian Ministers of the Environment (CME), 2001, *Reference methods for the Canada-wide standard for petroleum hydrocarbons in soil – Tier 1 Method*, No. 1310, Canadian Council of Ministers of the Environment Inc., Winnipeg, Manitoba.
- Da Luz, T.N., Römbke, J. & Sousa, J.P., 2008, 'Avoidance tests in site-specific risk assessment-influence of soil properties on the avoidance response of *Collembola* and earthworms', *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1112–1117. PMID: 18419186,
- Da Luz, T.N., Ribeiro, R. & Sousa, J.P., 2004, 'Avoidance tests with *Collembola* and earthworms as early screening tool for site-specific assessment of polluted soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2188–2193. PMID: 15378996, <http://dx.doi.org/10.1897/03-445>
- Da Silva Jr, F.M.R., Silva, P.F., Guimaraes, F.S., De Almeida, K.A., Baisch, P.R.M., Muccillo-Baisch, A.L., 2014, 'Ecotoxicological tools for landfarming soil evaluation in a petrochemical complex area', *Pedosphere* 24, 280–284. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60014-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60014-X)
- Department of Water Affairs and Forestry, 1998, *Minimum requirements for the handling, classification and disposal of hazardous waste*, 2nd edn., Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria.
- Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P. & Wisniewski, H.L., 1998, 'Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants', *Chemosphere* 31, 845–860. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00089-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00089-7)
- Environment Canada, 2009, *Guidance document on the sampling and preparation of contaminated soil for use in the application of biological testing*, 2nd draft, Science and Technology Branch, Environment Canada, Ottawa.
- Fountain, M.T. & Hopkin, S.P., 2005, '*Folsomia candida* (Collembola): A "standard" soil arthropod', *Annual Review of Entomology* 50, 201–222. PMID: 15355236, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130331>
- Genou, G., de Naeyer, F., Van Meenen, P., Van de Werf, H., de Nijs, W. & Verstraete, W., 1994, 'Degradation of oil sludge by landfarming – A case study at Ghent Harbour', *Biodegradation* 5, 37–46. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00695212>
- Hamda, N.T., Forbes, V.E., Stark, J.D. & Laskowski, R., 2014, 'Stochastic density-dependent matrix model for extrapolating individual-level effects of chemicals to the population: Case study on effects of Cd on *Folsomia candida*', *Ecological Modelling* 280, 53–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.09.024>
- Henner, P., Schiavon, M., Morel, J.L. & Lichtfouse, E., 1997, 'Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) occurrence and remediation methods', *Analysis Magazine* 25, 56–59.
- Hu, G., Li, J. & Zeng, G., 2013, 'Recent developments in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review', *Journal of Hazardous Wastes* 261, 470–490. PMID: 23978722, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>
- Hund-Rinke, K., Römbke, J., Achazi, R. & Warneke, D., 2003, 'Avoidance test with *E. fetida* as indicator for the habitat function of soils – Results of a laboratory comparison test', *Journal of Soils and Sediments* 3, 7–12. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02989462>



- Hund-Rinke, K. & Wiechering, H., 2001, 'Earthworm avoidance test for soil assessments', *Journal of Soils and Sediments* 1, 15–20. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02986464>
- IARC, 2012, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Insam, H. & Seewald, M.S.A., 2010, 'Volatile organic compounds (VOCs) in soils', *Biology and Fertility of Soils* 46, 199–213. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-010-0442-3>
- ISO, 2008, *Soil Quality—Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour—Part 1: Test with Earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. Guideline N° 17512-1, International Organization for Standardization (ISO); Geneva, Switzerland.
- Khaitan, S., Kalainesan, S., Erickson, L.E., Kulakow, P., Martin, S., Karthikeyan, R. et al., 2006, 'Remediation of sites contaminated by oil refinery operations', *American Institute of Chemical Engineering* 25, 20–31. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.10083>
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K. & Basta, N., 2004, 'The bioavailability of chemicals in soil for earthworms', *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.014>
- Loehr, R.C. & Webster, M.T., 1996, 'Performance of long-term, field-scale bioremediation processes', *Journal of Hazardous Materials* 50, 105–128. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894\(96\)01797-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3894(96)01797-9)
- Løkke, H. & Van Gestel, C.A.M., 1998, *Handbook of Soil invertebrate toxicity tests*, Wiley, Chichester.
- Lors, C., Aldaya, M.M., Salmon, S. & Ponge, J-F., 2006, 'Use of an avoidance test for the assessment of microbial degradation of PAHs', *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2199–2204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.026>
- Maila, M.P. & Cloete, T.E., 2004, 'Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?', *Environmental Science and Biotechnology* 3, 349–360. <http://dx.doi.org/10.1007/s11577-004-6653-z>
- Mikkonen, A., Hakala, K.P., Lappi, K., Kondo, E., Vaalama, A & Suominen, L., 2012, 'Changes in hydrocarbon groups, soil ecotoxicity and microbiology along horizontal and vertical contamination gradients in an old landfarming field for oil refinery waste', *Environmental Pollution* 162, 374–380. PMID: 22243888, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.012>
- Mohan, S.V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R.A. & Shimizu, Y., 2006, 'Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency', *Review of Environmental Science and Biotechnology* 5, 347–374. <http://dx.doi.org/10.1007/s11577-006-0004-1>
- Nadal, M., Schuhmacher, M. & Domingo, J.L., 2004, 'Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County, Spain', *Environmental Pollution* 132, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.003>
- OECD, 2006, *Organization for Economic Cooperation and Development guideline for the testing of chemicals. 208. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*, OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2009, *Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- Paton, G.I., Killham, K., Weitz, H.J. & Semple, K.T., 2005, 'Biological tools for the assessment of contaminated land: Applied soil ecotoxicology', *Soil Use Management* 21, 487–499. <http://dx.doi.org/10.1079/SUM2005350>
- Pearce, K. & Ollermann, R.A., 1998, 'Status and scope of bioremediation in South Africa', in R.L. Irvine & S.K. Sikdar (eds.), *Bioremediation technologies: Principles and practice*, pp. 155–182, Technomic Publishing, Lancaster, Pennsylvania.
- Plaza, G., Nalêcz-Jaweck, G., Ulfig, K. & Brigmon, R.L., 2005, 'The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation', *Chemosphere* 59, 289–296. PMID: 15722101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.049>
- Punnaruttanakun, P., Meeyoo, V., Kalambaheti, C., Rangsunvigit, P., Riirksomboon, T. & Kittyanan, B., 2003, 'Pyrolysis of API separator sludge', *Journal of analytical and Applied Pyrolysis* 68–69, 547–560. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370\(03\)00033-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370(03)00033-0)
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. & Maboeta, M.S., 2001, 'Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species', *Pedobiologia* 45, 61–68. <http://dx.doi.org/10.1078/0031-4056-00068>
- Römbke, J., Jänsch, S., Junker, T., Pohl, B., Scheffczyk, A. & Schllnass, H.J., 2006, 'Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtail, and plants for the assessment of metals in natural soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 776–787. PMID: 16566163, <http://dx.doi.org/10.1897/04-584R.1>
- Rubinos, D.A., Villasuso, R., Muniategui, S., Barral, M.T. & Diaz-Ferros, F., 2007, 'Using the landfarming technique to remediate soils contaminated with Hexachlorocyclohexane isomers', *Water Air and Soil Pollution* 181, 385–399. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-006-9309-5>
- Sims, R.W. & Gerard, B.M., 1985, *Earthworms*, The Inlnean Society of London and The Estuarine and Brackish-Water Sciences Association, London.
- Škrbic, B., Cvejanov, J. & Đurišić-Mladenovi, N., 2005, 'Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soils of Novi Sad and bank sediment of the Danube river', *Journal of Environmental Science and Health* 40, 29–42. PMID: 15663298, <http://dx.doi.org/10.1081/ESE-200033512>
- StatSoft, 2010, *Statistica (Data analysis software system) version 9.0*. <http://www.statsoft.com>
- Sverdrup, L.E., Kelley, A.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Jensen, J., Scott-Fordsmand, J.J. et al., 2001, 'Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of the springtail *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae)', *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1332–1338. PMID: 11392144, <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620200623>
- Tan, K.H., 2005, *Soil sampling, preparation, and analysis*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL.
- U.S.EPA, 1996, *United States Environmental Protection Agency. Method 2015B: Nonhalogenated Organics using GC/FID*, U.S. Government printing office, Washington, DC.
- Van der Watt, V.H., 1966, 'Improved tables and a simplified procedure for soil particle analysis by hydrometer method', *South African Journal of Agriculture* 9, 911–916.
- Van Gestel, C.A.M., 2008, 'Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils', *Science of the Total Environment* 406, 385–395. PMID: 18620734, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.050>
- Van Gestel, C.A.M., Van der Waarde, J.J., Derksen, J.G.M., Veul, M.F.X.W., Bouwens, S., Rusch, B. et al., 2001, 'The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils', *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1438–1449. PMID: 11434283, [http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<1438:TUOAAAC>2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<1438:TUOAAAC>2.0.CO;2)
- Van Wyk, M., 2010, 'Evaluating the toxic effects of industrial waste from a historic landfarming site using bioassays', M.Sc.-verhandeling, Universiteit van Stellenbosch, Stellenbosch.
- Vidali, M., 2001, 'Bioremediation. An overview', *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163–1172.
- Yeardley Jr, R.B., Lazprchak, J.M. & Gast, L.C., 1996, 'The potential of an earthworm avoidance test for the evaluation of hazardous waste sites', *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1532–1537. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150915>