

LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM)

INFORME N° 00032-2020-MINAM/VMGA/DGCA

Servicio de Consultoría para la elaboración de los Planes de Rehabilitación de 12 sitios impactados por las actividades de hidrocarburos en la cuenca del Río Tigre

Levantamiento de Observaciones Subsistentes Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)

PREPARADO PARA

FONDO DE PROMOCIÓN DE LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS DEL PERÚ



ELABORADO POR

CONSORCIO ECODES INGENIERÍA – VARICHEM DE COLOMBIA



Enero, 2021

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
2. LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES	7
2.1. Observación N° 04	7
2.2. Observación N° 07	9
2.3. Observación N° 08	10
2.4. Observación N° 13	10
2.5. Observación N° 14	13
2.6. Observación N° 16	14
2.7. Observación N° 23	15
2.8. Observación N° 25	17
2.9. Observación N° 27	19
2.10. Observación N° 33	26
2.11. Observación N° 36	28
2.12. Observación N° 37	30
2.13. Observación N° 38	31
2.14. Observación N° 39	33
2.15. Observación N° 41	33
2.16. Observación N° 42	34
2.17. Observación N° 43	36
2.18. Observación N° 44	47
2.19. Observación N° 45	47
2.20. Observación N° 46	48

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fases de Pendientes.....	8
Tabla 2. Capacidad de Uso Mayor Sitio S0131	10
Tabla 3. Antecedentes Históricos del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra).....	11
Tabla 4. Informes Previos Consultados para el Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)	13
Tabla 5. Resultados de los Muestreos de Suelo Realizados por la OEFA	14
Tabla 6. Área de Potencial Interés del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra).....	15
Tabla 7. Resultado del Muestreo de Suelo Realizado por la OEFA	16
Tabla 8. Datos de los Ensayos de Toxicidad	32
Tabla 9. Escala de Valoración de Incertidumbres.....	37
Tabla 10. Criterios Considerados en la Valoración de Incertidumbres	38

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pendientes del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)	8
Figura 2. Mínimo Número de Puntos de Muestreo de Detalle	17
Figura 3. Unidad De Suelo de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131	20
Figura 4. Unidad Geológica de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131	21
Figura 5. Zona Climática de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131	22
Figura 6. Unidad Fisiográfica de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131	23
Figura 7. Zona de Vida de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131	24
Figura 8. Distancia a las Estaciones de Muestreo de Nivel de Fondo.	25
Figura 9. Perfil de Elevación entre el Sitio S0131 y el Punto de Muestreo de Fondo	26

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Poblador de la Comunidad Nativa San Juan de Bartra en la Plataforma de los Pozos 12, 13 y 14 (Sitio S0131).....	27
Fotografía 2. Presencia de Hidrocarburos en el Suelo del Sitio S0131 (429268 E / 9727137 N)	28

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

LISTA DE ANEXOS

ANEXO MINAM OBSERVACIÓN N° 4
ANEXO MINAM OBSERVACIÓN N° 7
ANEXO MINAM OBSERVACIÓN N° 16
ANEXO MINAM OBSERVACIÓN N° 38

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Levantamiento de Observaciones al Expediente “Servicio de Consultoría para la elaboración de los Planes de Rehabilitación de 12 sitios impactados por las actividades de hidrocarburos en la cuenca del Río Tigre”.

INFORME N° 00032-2020- MINAM/VMGA/DGCA

1. INTRODUCCIÓN

El presente informe corresponde al levantamiento de observaciones remitida por EL Oficio N° 00354-2020-MINAM/VMGA/DGCA - Informe N° 00032-2020-MINAM/VMGA/DGCA, el cual contiene las observaciones subsistentes relacionadas al Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra), botadero ubicado en la cuenca de Río Tigre, dentro de la competencia del Ministerio del Ambiente (MINAM).

2. LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES

2.1. Observación N° 04

El PR S0131, no incluye la metodología y los datos específicos necesarios para la descripción de la topografía. Al respecto el PR, debe incluir los resultados y los análisis realizados para describir la topografía, o en su defecto la fuente de datos de la información descrita. Asimismo, el PR debe indicar las pendientes predominantes en la zona relacionadas con las unidades fisiográficas, de acuerdo con la clasificación de la ONERN.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 4

La Consultora¹, indicó la información solicitada sobre las pendientes predominantes, así como sustento lo indicado en el Anexo remitido. Sin embargo, la consultora no ha presentado la información requerida en la observación N° 4, respecto a la metodología y fuente de información de la descripción indicada en la ítem 2.2.4. *Topografía*.

Respuesta:

Se aclara que los aspectos relacionados con la topografía no estaban contemplados en esta fase del estudio, de acuerdo a lo solicitado al inicio del proyecto. Sin embargo, para efectos de la elaboración del Plan de Rehabilitación se realizó una topografía preliminar, el cual se adjunta el **Anexo MINAM Observación N° 4**.

Respecto a la información presentada en el numeral 2.2.4 del Plan de Rehabilitación, corresponde a una descripción narrativa de la topografía y pendientes del Sitio S0131. La metodología seguida se basó en la recopilación de información durante los trabajos de campo, reconocimiento de depresiones y de modificaciones topográficas causadas por las actividades industriales que se presentan en el Sitio.

Respecto a las pendientes predominantes en la zona, el mapa de pendientes del área de estudio ha sido elaborado utilizando un plano topográfico con curvas de nivel cada 0,25 m, las cuales fueron procesadas con el software ArcGis. El rango de pendientes a utilizarse para la elaboración del plano consideró el aspecto geológico y geomorfológico, bajo el criterio mencionado en la **Tabla 1**.

¹ El Informe del MINAM señala a la Consultora JCI; esta indicación del nombre de la consultora es incorrecta; se ha procedido a retirar dicho nombre en la transcripción.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Tabla 1. Fases de Pendientes

Clase de Pendiente	Rango de Pendiente (%)	Término Descriptivo
A	0 – 2	Plana o casi a nivel
B	2 – 4	Ligeramente inclinada
C	4 – 8	Moderadamente inclinada
D	8 – 15	Fuertemente inclinada
E	15 – 25	Moderadamente empinada
F	25 – 50	Empinada
G	50 – 75	Muy empinada
H	Más de 75	Extremadamente empinada

Fuente: ONERN, 1975

En la **Figura 1** se presenta el Mapa de Pendientes elaborado para el Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra).

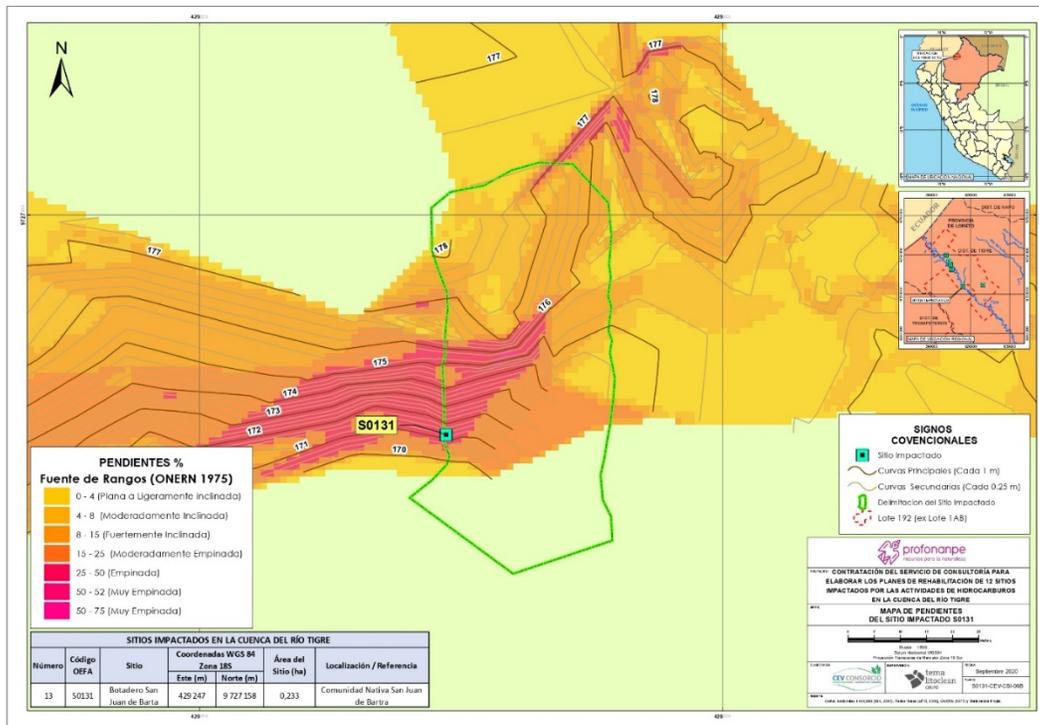


Figura 1. Pendientes del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

De la **Figura 1**, se puede concluir que el área de estudio se ubica entre el rango de pendientes de 0% a 75%.

En el **Anexo MINAM Observación N° 4** se presenta el plano de pendientes del Sitio S0131.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

2.2. Observación N° 07

El PR debe indicar la fuente de información de la descripción de las características edafológicas incluidas en el texto del PR y además debe incluir la clasificación taxonómica del área de estudio. El análisis debe considerar el D.S N° 017-2009-AG sobre la Clasificación de Tierras por su Capacidad de Uso Mayor, el D.S N° 013-2010-AG sobre la Ejecución de Levantamiento de Suelos y la clasificación taxonómica “Claves para la taxonomía de Suelos” (Keys to Soil Taxonomy. Edición Doce, 2014. USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. NRCS: Servicio de Conservación de Recursos Naturales).

Comentarios a la absolución de la Observación N° 7

La consultora no ha presentado la información requerida en la observación N° 07 sobre la clasificación taxonómica del área de estudio, y solo ha indicado las fuentes de información para el párrafo sobre Capacidad de Uso Mayor del Suelos y el rango de los valores de pH indicados en el texto del PR.

Respuesta:

Respecto a la fuente de información del numeral 2.2.6 Caracterización de Suelo del Plan de Rehabilitación, se explica a continuación:

- El primer párrafo del mencionado numeral en la cual se indica que la Capacidad de Uso Mayor del Suelo corresponde a F3w-X proviene de la información obtenida del Mapa de Capacidad de Uso Mayor de la Tierra realizada por ONERN en 1981. La descripción de las características de la mencionada categoría se obtuvo de la revisión de los conceptos del D.S. N° 017-2009-AG Clasificación de Tierras por su Capacidad de Uso Mayor.
- Lo mencionado en el segundo párrafo del numeral 2.2.6, respecto al rango de pH presentado, proviene de los valores de pH registrados en dos de los 12 sitios impactados de la cuenca del río Tigre. Respecto a las descripciones de la consistencia, dureza, plasticidad y color provienen de las descripciones de campo presentadas en los formatos de muestreo de suelos (folios 783 al 829 del Anexo del PR).

Se aclara que dentro del marco legal aplicable a la elaboración de los Planes de Rehabilitación, los decretos D.S. N° 017-2009-AG y D.S. N° 013-2010-AG no hicieron parte del alcance del proyecto, tampoco estuvieron presentes en las bases técnicas del servicio; debido a que se considera específico para la planificación, uso y manejo de cultivos, entre otros alcances no definido para los sitios impactados por actividades de hidrocarburos.

No obstante a lo mencionado en el párrafo anterior, la información edafológica para el Área del Proyecto proviene de estudios efectuados en la zona² que sirvió de base para la determinación de los pronósticos o lineamientos sobre su comportamiento y aprovechamiento bajo sistemas de manejo, uso y conservación del recurso suelo, en armonía con su entorno ambiental y de acuerdo con el Sistema de Clasificación de Tierras según su Capacidad de Uso Mayor (D.S. N° 017-2009-AG) en términos de su aptitud potencial de uso. En la Tabla 2 se presentan las Descripciones de la Clasificación de Tierras.

² “Inventario y Evaluación de los Recursos Naturales de la Microregión Pastaza-Tigre”, del departamento de Loreto, realizado por ONERN-1984, a nivel de “Reconocimiento” sobre una superficie aproximada de 650,000 ha.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Tabla 2. Capacidad de Uso Mayor Sitio S0131

Paisaje	Sub-Paisaje	Elementos del Paisaje	Símbolo-Fisiografía	Descripción-Suelos	Símbolo-SUELOS	Descripción-CUM	Símbolo-CUM	Superficie	
								Ha.	%
Colinas del Terciario superior (Arcillas, areniscas, margas)	Colinas Bajas	Moderadamente disectada (15 - 25%).	BS 2/D Y 3/D	Forestal (Fo) Typic Dystrudepts	Fo/D y FOSJ/D	Tierras aptas para Producción Forestal, de calidad agrologica media, con limitaciones por suelo y riesgo de erosión	F2se	2,21	100,00
Superficie Total								2,21	100,00

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

La información de capacidad de Uso Mayor se detalla en el Mapa de Capacidad de Uso Mayor el que se presenta en el **Anexo MINAM Observación N° 7**.

2.3. Observación N° 08

La información indicada en el Mapa de Suelos del anexo 6.1., debe coincidir con la información indicada en el texto del PR indicando la respectiva fuente, metodología y caracterización de la unidad Cambisol dístico-Acrisol háplico (CMd-ACh).

Comentarios a la absolución de la Observación N° 8

La consultora no ha presentado la información solicitada por la observación N° 08 sobre la clasificación del suelo respecto a la unidad "Asociación Cambisol dístico – Acrisol háplico (CMd-ACh)", y solo indica que incluirá en el texto del PR, el detalle de la misma.

Respuesta:

De acuerdo a lo mencionado en la presente observación se incluye un párrafo en el numeral 2.2.6 del texto del Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 respecto a la caracterización de la asociación Cambisol dístico – Acrisol háplico (CMd-ACh) presentado en el Mapa de Suelo del Anexo 6.1 (Folio 457), la cual estará expresada de la forma siguiente:

"La unidad Cambisol dístico se caracterizan por ser suelos profundos, originados en los materiales aluviales recientes y antiguos, así como arcillas, areniscas y lutitas, de naturaleza ácida. Los Acrisoles háplicos son suelos originados a partir de limonitas y arcillitas sedimentarias del terciario. Son suelos profundos de textura fina y color pardo rojizo, rojo o rojo-amarillento; de reacción muy ácida, con pH que puede variar entre 4,0 y 5,0 con proporciones menores de 4% de materia orgánica en el horizonte superficial".

Respecto a la metodología y fuente de la información, se aclara que se empleó como fuente secundaria el Mapa de Suelos del Perú (MINAGRI 2009) para determinar la unidad de suelo del Sitio S0131.

2.4. Observación N° 13

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

En el Tabla 3-1 Antecedentes Históricos del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra), se debe incluir la entidad responsable de su realización y/o aprobación y una breve descripción de la información que contiene cada documento.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 13

La consultora no indica la información solicitada en la observación 13 respecto a la descripción de la información sobre los documentos de los antecedentes históricos y solo incluye información respecto a la institución responsable de los estudios.

Respuesta:

En la **Tabla 3** se incluye la institución responsable de la realización o aprobación de los documentos señalados en la Tabla 3-1 del Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra); también se realiza una breve descripción de la información contenida en cada documento.

Tabla 3. Antecedentes Históricos del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)

Año	Eventos Importantes Relevantes de las Actividades Industriales	Documento de Referencia	Institución Responsable	Descripción
1996	Programa de Adecuación y Manejo Ambiental	PAMA – Occidental Peruana Inc., 1996	Elaborado por: Occidental Peruana Inc. Aprobado Mediante: RD N° 099-96-EM/DGH	El PAMA fue creado como un instrumento de adecuación de nuevas disposiciones ambientales aplicables a las actividades de hidrocarburos, por parte de las empresas que a la fecha de implementación (1993) se encontraban operando, tal es el caso del Lote 1AB. En este documento Occidental Peruana Inc., planteó lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> • Periodo de ejecución de siete años, desde 1995 hasta 2002. • Presentación del Plan de Manejo Ambiental (PMA) para cada año de ejecución.
2005	Plan Ambiental Complementario (PAC) – Lote 192 (ex Lote 1AB), (PPN, 2005)	PAC - PPN, 2005	Elaborado por: Pluspetrol Norte S.A. Aprobado Mediante: RD N° 153-2005-MEM/AA	El contenido del Plan Ambiental Complementario está basado en 2 actividades que se detallan a continuación: <p><u>Plan de Sistema de Tratamiento de Agua Producida</u>, el cual indica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Construcción de una poza API en cada batería de

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Año	Eventos Importantes Relevantes de las Actividades Industriales	Documento de Referencia	Institución Responsable	Descripción
				<p>producción; asimismo, diseñar y construir ductos que conduzcan las aguas producidas, tratadas hacia los cuerpos correspondientes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reinyección de los yacimientos Jibarito y Dorisa. <p>Plan de Remediación de suelos, el cual menciona:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Remediación de sitios impactados por el uso de pozas de remediación y pozas de seguridad. • Remediación de 75 sitios impactados. Los cuales se dividieron en áreas menores y áreas mayores (menores y mayores a 1 hectárea).
2013	<p>Reporte Público de Monitoreo Participativo ambiental de la calidad de suelos en el Lote 192 (ex Lote 1AB), correspondiente a la Cuenca del Río Tigre, junio de 2013. Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental</p>	<p>OEFA; Reporte Público OEFA Tigre, 2013</p>	<p>Elaborado por: Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA)</p>	<p>En este monitoreo ambiental participativo se logró realizar 59 puntos de monitoreo para evaluar la calidad ambiental de suelo, distribuidos en 5 locaciones y en la ex refinería Marsella.</p> <p>Los resultados obtenidos, muestran que 56 puntos evaluados superaron el Estándar de Calidad Ambiental de Suelo vigente al momento del muestreo (D.S. N° 002-2013-MINAM).</p>
2018	<p>Se realizó la visita de reconocimiento del botadero por parte del consorcio CEV, con el fin de elaborar Los Planes de Rehabilitación de 12 Sitios Impactados por Las Actividades de Hidrocarburos en la Cuenca del Río Tigre. En el Anexo 6.12 se presentan los formatos de campo y las</p>	<p>Formato Entrevista a Personal de la Comunidad Código: VAR-PR Fecha: 31/01/2018</p>	<p>Elaborado por: Consortio Ecodes-Varichem</p>	<p>La información recopilada en el Formato de Entrevista a Personal de la Comunidad, consta principalmente de consultas sobre los siguientes temas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antecedentes de derrames en el Sitio y actividades de remediación • Presencia de cultivos o crianza de animales.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Año	Eventos Importantes Relevantes de las Actividades Industriales	Documento de Referencia	Institución Responsable	Descripción
	entrevistas realizadas en la visita de reconocimiento al Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra).			

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

Cabe mencionar que la inclusión de información en la Tabla 3-1 del Plan de Rehabilitación del Sitio no modifica las conclusiones o los resultados obtenidos en el estudio realizado.

2.5. Observación N° 14

En la Tabla 3-2. Informes Previos Consultados para el Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra) se presentan los valores del muestreo de Suelo realizado por la OEFA, que presentan excedencias. Sin embargo, al revisar el Informe N° 477 – 2014- OEFA/DE-SDCA (Anexo 6.8) los valores indicados no se mencionan. Asimismo, el Informe Salida de Reconocimiento (2017) también indicado como fuente de información no se incluye en los anexos. Al respecto, el PR deberá incluir dentro de los anexos la fuente real de estos resultados indicados.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 14

La consultora adjunta la corrección solicitada respecto los datos del Informe N°477 para el punto de muestreo S 44, sin embargo, no se aclara cual es la fuente de datos de los tres puntos de muestreo de la Tabla 3-3 del PR.

Respuesta:

Respecto a la Tabla 3-2 del PR se corrige la información presentada, la cual estará expresada de la siguiente forma:

Tabla 4. Informes Previos Consultados para el Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)

Documento	Título del Documento	Información relevante
Informe N° 00022-2015-OEFA-SDCA-CEAI del OEFA, 2015	Determinación de Niveles de Fondo y Niveles de Referencia en tres asociaciones de suelo del departamento de Loreto - 2015	Se tuvo en cuenta el informe sobre Niveles de fondo, el cual presenta diferentes puntos de muestreo cercanos a la cuenca Tigre, con la descripción de las características naturales del suelo.
Informe N° 477 – 2014-OEFA/DE-SDCA del OEFA	Identificación de sitios contaminados del componente suelo en la cuenca del río Tigre en el área de influencia del Lote 1-AB de la empresa Pluspetrol Norte S.A.	El muestreo realizado en el Sitio determinó la excedencia al ECA para suelo agrícola de los parámetros: Ba y Cd (punto S 44 de la Locación Bartra)

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Adicionalmente, se corrige la información presentada en la Tabla 3-3 del PR, la cual quedará expresa de la siguiente forma:

Tabla 5. Resultados de los Muestreos de Suelo Realizados por la OEFA

ECA Suelo Agrícola		1200	3000	50	750	1,40	0,40	6,60	70,00	
Punto de Muestreo	Coordenadas UTM WGS84		Resultados (mg/Kg)							
	Este	Norte	F2 (C10-C28)	F3 (C28-C40)	Arsénico (As)	Bario (Ba)	Cd	Cr VI	Hg	Pb
S 44	429247	9727158	1100	587,90	2,80	998,60	3,87	<0,28	<0,06	34,52

Fuente: Informe N° 477 – 2014- OEFA/DE-SDCA, del Informe de Identificación de Sitios Contaminados (página 7), OEFA.

Se aclara que la información presentada en la tabla anterior corresponde a lo realizado por OEFA.

Cabe mencionar que la información primigenia de la Tabla 3-3 del Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 (estaciones de monitoreo BA201_203_SS_BA_005_150729, BA201_203_SS_BA_005_150729_DU2 y BA201_203_SS_BA_005_150730) corresponden al informe presentado por la empresa Pluspetrol Norte S.A., el cual no se encontraba aprobado a la fecha elaboración del Plan de Rehabilitación. Adicionalmente, en la respuesta a la Observación N° 15 se amplió esta explicación.

2.6. Observación N° 16

En la Tabla 3-4 Área de Potencial Interés del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra), se indica un área referencial, un área relevada en la visita preliminar y un área de potencial interés. Al respecto, el PR deberá indicar la metodología por la cual se determinaron estas áreas o en su defecto citar en que sección del PR se indica esta información para que se mantenga la concordancia y coherencia en toda la extensión del texto del PR. Asimismo, toda esta información debe coincidir con los anexos, considerando que el Mapa Área potencial de interés del Anexo 6.3 indica un área diferente (0.23 ha) al área indicada en el cuadro mencionado (0.3 ha).

Comentarios a la absolución de la Observación N° 16

De acuerdo a lo revisado se valida que la consultora realizó la corrección a la Tabla 3-4 y al mapa S0131-CEV-CSI-04A, sin embargo, no indica información solicitada por la observación N° 16 sobre la metodología por la cual se determinaron las áreas de potencial interés.

Respuesta:

A continuación se presentan las descripciones a cada una de las categorías de la Tabla 3-4 del PR:

- El área referencial es el área suministrada por FONAM en las Bases de Integradas del Concurso Público Internacional N° 04-2017-FONAM.
- El área relevada en la visita preliminar, es el área identificada durante la primera visita a campo (visita preliminar) realizado por el Consorcio Ecodes-Varichem en el marco de la elaboración del Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra).

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

- El área de potencial interés (post muestreo 1), se le denomina así al área en la cual se realizaron las labores de muestreo en el Sitio.

Se aclara que el área de potencial interés del Sitio S0131 es 0,23 ha, en este sentido se corrige la información de la Tabla 3-4 del PR quedando expresa de la siguiente manera.

Tabla 6. Área de Potencial Interés del Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra)

Parámetro	Fuente	Área del Sitio Impactado (ha)
Área referencial	FONAM	0,02
Área relevada en la visita preliminar	CEV	0,23
Área de potencial interés (Post muestreo 1)	CEV	0,23

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

Se corrige el mapa S0131-CEV-CSI-04A (Folio 469 del PR), el cual se adjunta en el **Anexo MINAM Observación N° 16**.

Respecto a la metodología para determinación del área de potencial interés, se detalla a continuación:

- Revisión de los antecedentes históricos del Sitio, que consistió en:
 - a) Revisión del Informe N° 477-2014-OEFA/DE-SDCA realizado por OEFA, Informe de Identificación de Sitios Contaminados.
 - b) Revisión del Informe N° 00022-2015-OEFA/DE-SDCA-CEAI realizado por OEFA, Informe de determinación de niveles de fondo y niveles de Referencia en tres asociaciones de suelo del departamento de Loreto.
 - c) Entrevista con pobladores de la comunidad nativa San Juan de Bartra, los cuales aportaron con informaron del Sitio; esta información se encuentra presente en el Formato de Entrevista a Personal de la Comunidad (Folio 1450 del Anexo del Plan de Rehabilitación).
- Visita preliminar, la cual consistió en:
 - a) Verificación de los accesos y límites naturales (topográficos como pendientes, colinas, quebradas) o antropogénicos (oleoductos, vías carrozables, plataformas, construcciones, etc.). En este aspecto el Sitio S0131 limita por el norte con la plataforma y por el sur con un bajial, hacia los lados Este y Oeste se presenta desnivel topográfico.
 - b) Sondeo manual, efectuado con un barreno; para la identificación de presencia visual u organoléptica de características típicas de impactos por hidrocarburos (como por ejemplo: presencia de fase libre, iridiscencia, olor característico).
 - c) Participación de los monitores ambientales comunitarios durante la visita preliminar, los cuales son personas que conocen el Sitio y acompañaron también a OEFA.

Con este volumen de información se determinó el área de potencial interés del Sitio S0131.

2.7. Observación N° 23

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

En el ítem 3.5.1.5.7. Número de puntos de muestreo, el muestreo considerado es a detalle. Al respecto, el PR debe indicar el fundamento técnico de la cantidad de puntos de muestreo a detalle considerado, a su vez que los resultados del muestreo de identificación no se indican en el texto. Además, el PR debe indicar los criterios por lo que sólo se ha ejecutado la fase de detalle.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 23

La información indicada por la consultora, no sustenta técnicamente la determinación de la cantidad de puntos de muestreo a detalle tanto que esta debe considerar las excedencias respecto a puntos de muestreo de identificación o fondo, los cuales deben a su vez ser determinados en base a las áreas de potencial interés, de acuerdo con lo señalado en la Guía para el Muestreo de Suelos, aprobada con R.M N° 085-2014-MINAM, en la Tabla N° 5 (Número mínimo de puntos de muestreo para el Muestreo de Identificación) y N° 6 (Número mínimo de puntos para el muestreo en el Muestreo de Detalle).

Respuesta:

A continuación se presentan los siguientes aspectos técnicos para considerar el muestreo de suelo realizado en el ámbito del Plan de Rehabilitación en la etapa de caracterización o detalle:

- Basados en el informe N° 477-2014-OEFA/DE-SDCA del OEFA, en el cual se identifica al Sitio Impactado y se establece 01 punto de muestreo con excedencia al Estándar de Calidad Ambiental para Suelo de uso agrícola (S 44). Siendo el OEFA la responsable de la identificación de los sitios impactados (De acuerdo al Decreto Supremo 039-2016-EM que aprueba el reglamento de la Ley que crea el Fondo de Contingencia para la Remediación Ambiental en su artículo N° 11 asigna al OEFA la responsabilidad de la identificación de los sitios impactados).
- Con la información anterior y de acuerdo a la Tabla N° 6 *Número mínimo de puntos de muestreo en el muestreo de detalle* de la Guía de Muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente, para el punto de muestreo de suelos presenta excedencia al Estándar de Calidad Ambiental corresponde un mínimo de 04 puntos de muestreo de detalle. En este sentido en el Sitio S0131 se realizarán más 04 puntos de muestreo de detalle.

En la **Tabla 7** se presenta el resultado del muestreo realizado por OEFA.

Tabla 7. Resultado del Muestreo de Suelo Realizado por la OEFA

Matriz	Código de la Muestra	Coordenadas UTM, WGS84, Zona 18 S		Resultados (mg/kg)	
		Este	Norte	Bario	Cadmio
Suelo	S 44	429247	9727158	998,60	3,87

Fuente: Informe N° 477 – 2014- OEFA/DE-SDCA

Con este volumen de información técnica se consideró realizar el muestreo en once (11) puntos para el Sitio S0131 (Botadero San Juan de Bartra), teniendo en cuenta la información previa del Sitio, conociendo los contaminantes probablemente derramados, reconociendo directamente en campo las evidencias de la extensión en la afectación y descartando incertidumbres con el análisis de las características propias del Sitio identificadas en la visita de reconocimiento, delimitando claramente el área impactada, entendiendo la geomorfología, topografía y los perímetros que limitan el Sitio Impactado.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Después de haber sustentado el tipo de muestreo, se sustenta la determinación de las muestras que corresponden al muestreo de detalle, los cuales se presentan a continuación:

- a) De acuerdo a lo explicado en las respuestas a las observaciones N° 14 y 15 de este documento, para el Sitio S0131, OEFA identificó 1 punto que excedió los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo de Uso Agrícola para Bario y Cadmio (S 44). En este sentido, se realizó el muestreo de detalle considerando el número de puntos de muestreo indicado en la Tabla N° 6 de la Guía de Muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente (ver **Figura 2**).

Tabla N° 6: Número mínimo de puntos de muestreo en el Muestreo de Detalle

Puntos del MI > ECA o Nivel de Fondo	Puntos de muestreo en el Muestreo de Detalle
1	4
2	6
3	7
4	9
5	11
6	13
7	14
8	16
9	18
10	20
15	28
20	37
25	46
50	90

MI = Muestreo de Identificación

Figura 2. Mínimo Número de Puntos de Muestreo de Detalle

Fuente: Guía para Muestreo de Suelos, R.M. N° 085-2014-MINAM.

- b) No obstante, al número mínimo de puntos de muestreo de detalle (4 puntos de muestreo) con base al punto muestreo que supera el Estándar de Calidad Ambiental; se realizaron en total 11 puntos de muestreo.

De acuerdo, a lo mencionado se ha cumplido el criterio técnico de la Guía de Muestreo de Suelo referido al número de puntos de muestreo de detalle.

2.8. Observación N° 25

El PR, deberá contener el análisis de Potencial Redox considerando que este parámetro permite evaluar la capacidad de oxidación o reducción de los contaminantes y de esa manera conocer la movilidad de los mismos.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Comentarios a la absolución de la Observación N° 25

La consultora no sustenta técnicamente la información solicitada en la observación N° 25, respecto al análisis del potencial redox, mas solo indica que la movilidad también se puede evaluar directamente y por otros métodos.

Respuesta:

No se incluyó (ni se evaluó) el parámetro REDOX en el Plan de Muestreo presentado para la conformidad de PROFONANPE y Socializado con los representantes de las Comunidades; aun así podemos precisar respecto a la capacidad de movilidad de los contaminantes se aclara lo siguiente:

- No solamente determinando el potencial redox se puede conocer la movilidad de los contaminantes. La movilidad tanto horizontal como vertical se puede evaluar directamente sobre todo cuando lo eventos antropogénicos que originaron impacto sobre el suelo se presentaron hace varios años (en este caso aproximadamente hace 2 décadas). En este sentido, de forma práctica la movilidad se puede verificar con los muestreos de suelo; es decir, la liberación de los contaminantes en el suelo se realizó a nivel superficial y mediante el muestreo realizado años después de la liberación, se puede determinar la movilidad que presenta las sustancias contaminantes en el suelo del Sitio. En este sentido, en el eje vertical el máximo alcance de los contaminantes metálicos (Bario y Plomo) se presentó antes de los 2,20 metros tal como se puede observar en los resultados del punto de muestreo S0131-S011 mencionado en la Tabla 3-50 del PR (Folio 137). Es decir, después de haber pasado casi dos décadas de la liberación de los contaminantes en el suelo, estos no han excedido los 2,20 metros de profundidad.
- Por otro lado, en el ámbito del Plan de Rehabilitación se han realizado análisis de metales en el extracto de TCLP; en la Tabla 3-51 del Plan de Rehabilitación del Sitio S0131 (Folio 137) se observa que en casi todas las muestras presentaron concentraciones por debajo del límite de detección; es decir, los resultados de los análisis evidencian que en caso de presentarse lixiviados estos no presentarían concentraciones de metales que excedan los estándares de referencia ambiental. Cabe mencionar que la evaluación del parámetro TCLP está en relación a la movilidad de los contaminantes en el suelo.
- El Bario presente en el suelo del Sitio proviene del Sulfato de Bario empleado en las actividades de perforación de pozos (baritina); esta sustancia se caracteriza por su baja solubilidad. Los resultados de Bario extraíble de las muestras que excedieron el estándar de calidad ambiental confirman que la sustancia presente en el suelo presenta baja solubilidad; en este sentido, dada la baja solubilidad de este contaminante presentaría escasa movilidad.
- Los resultados de granulometría (Tabla 3-46 del Plan de Rehabilitación, folio 131) evidencian el predominio de arcillas, tanto a nivel superficial como a 1 metro de profundidad. La presencia de arcilla en el suelo del Sitio minimiza la movilidad que los contaminantes.

Por lo expresado, aunque no se determinó el parámetro REDOX, las evaluaciones complementarias realizadas en el Sitio permiten inferir sobre el comportamiento y movilidad de los contaminantes.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

Adicionalmente, las labores de remediación que se realizarán en el Sitio tienen por objetivo la inmovilización de los contaminantes inorgánicos mediante la solidificación; en este sentido aunque se evalué este parámetro la aplicación de la técnica inmovilizará el contaminante.

No obstante a la argumentación técnica, en caso el análisis de potencial REDOX sea requerido imperativamente por la autoridad se realizará antes del inicio de los trabajos de remediación.

2.9. Observación N° 27

En el ítem 3.5.2.1.3. Número de puntos y estaciones de muestreo con profundidad se indica que “(...) la toma de muestras de Nivel de Fondo se realizó en tres lugares ubicados en áreas no intervenidas y principalmente en los lugares más altos”. Al respecto, el PR debe indicar el sustento técnico de esta afirmación.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 27

La consultora no indica el sustento técnico respecto a la ubicación de muestras de nivel de fondo, tanto solo incluye de manera general una descripción sobre áreas no intervenidas y no indica los criterios para poder determinar estas áreas no intervenidas.

Respuesta:

El sustento técnico de la afirmación presentada se basa en el razonamiento lógico aplicado al muestreo, según se explica a continuación:

- Las áreas no intervenidas aseguran que no se presentarán contaminantes antropogénicos en el lugar de muestreo, precisamente por no estar intervenidas. Es decir, se encuentran fuera de la influencia de los contaminantes; tal como se menciona en el segundo párrafo del numeral 1.3.3 de la Guía para Muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente.
- Los lugares más altos, son aquellas zonas en las cuales no existirá posibilidad de acumulación de contaminantes; por regla general, la escorrentía transporta contaminantes hacia lugares más bajos. En este sentido, los lugares bajos podrían presentar acumulación de contaminantes.

Respecto al sustento técnico de la ubicación de las muestras de fondo, estos están basadas en los lineamientos de la Guía para Muestreo de Suelos del Ministerio del Ambiente, específicamente en los numerales 1.3.3 y 5.2.3; tal como se menciona a continuación:

- Los puntos de muestreo de fondo se ubicaron en áreas homogéneas con características orográficas, geológicas, climáticas y de vegetación similares; las cuales se pueden verificar en las figuras presentadas a continuación.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

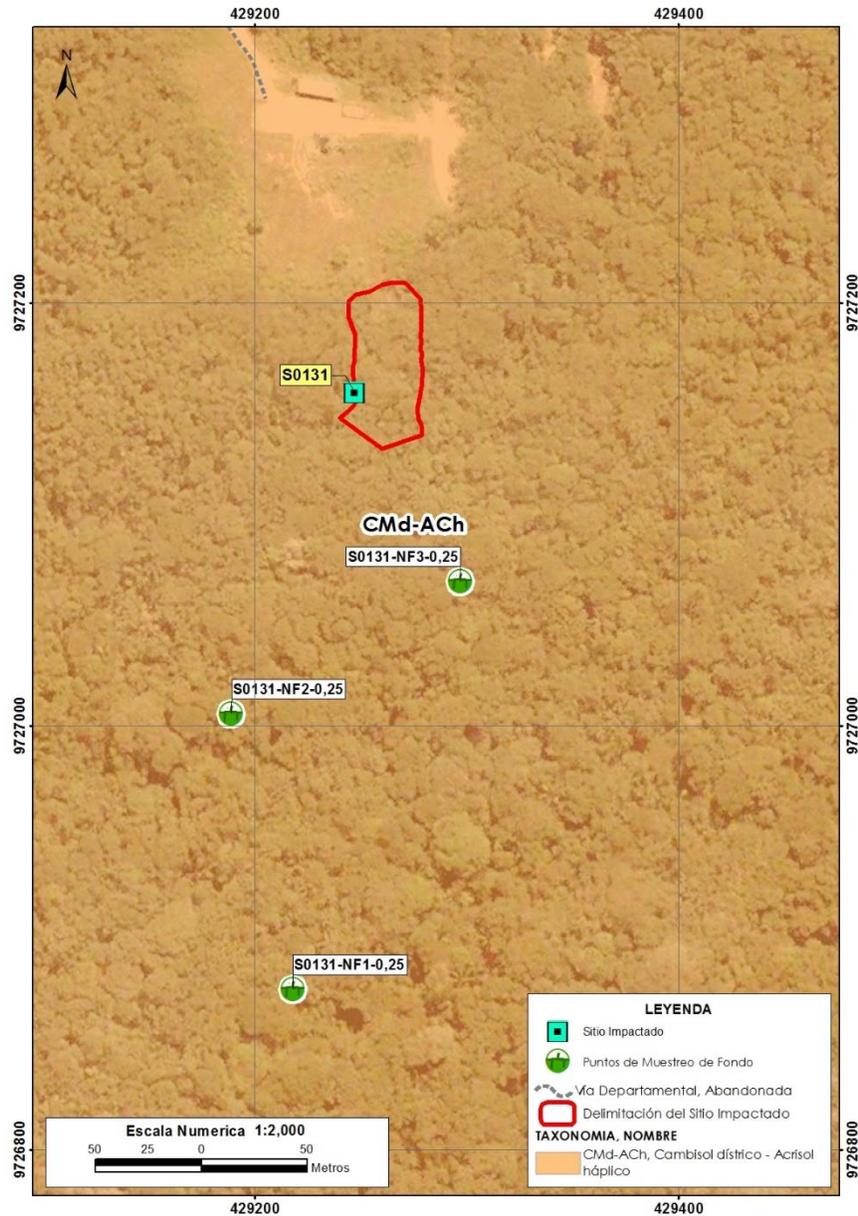


Figura 3. Unidad De Suelo de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

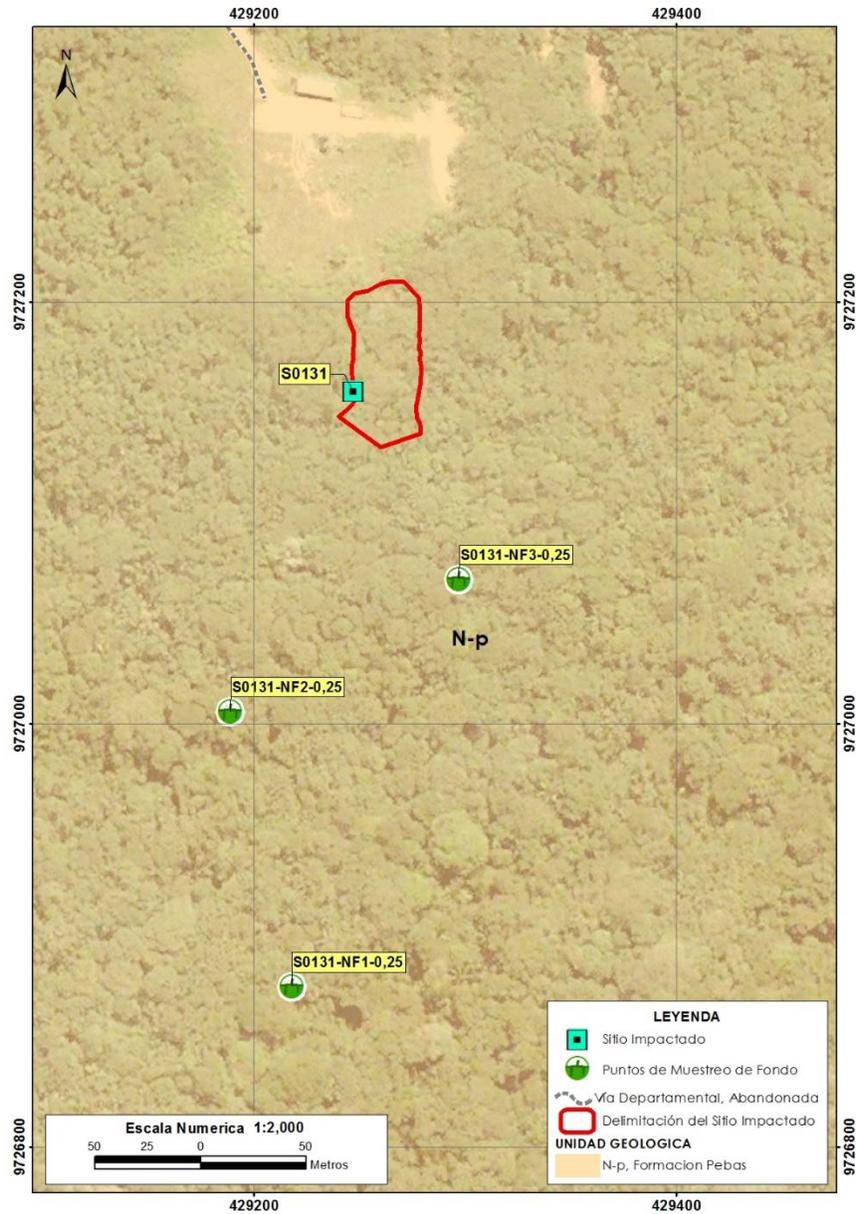
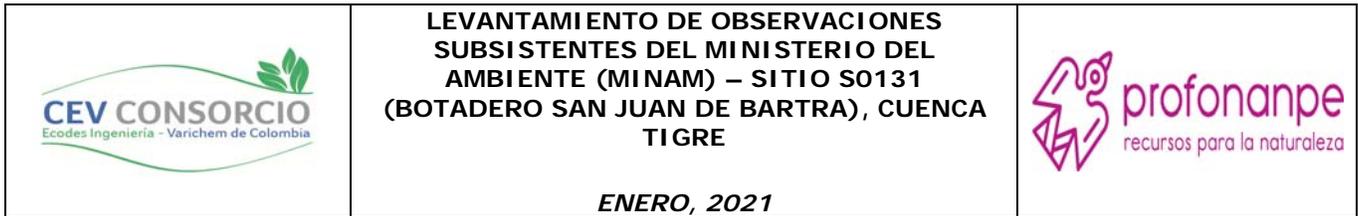


Figura 4. Unidad Geológica de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

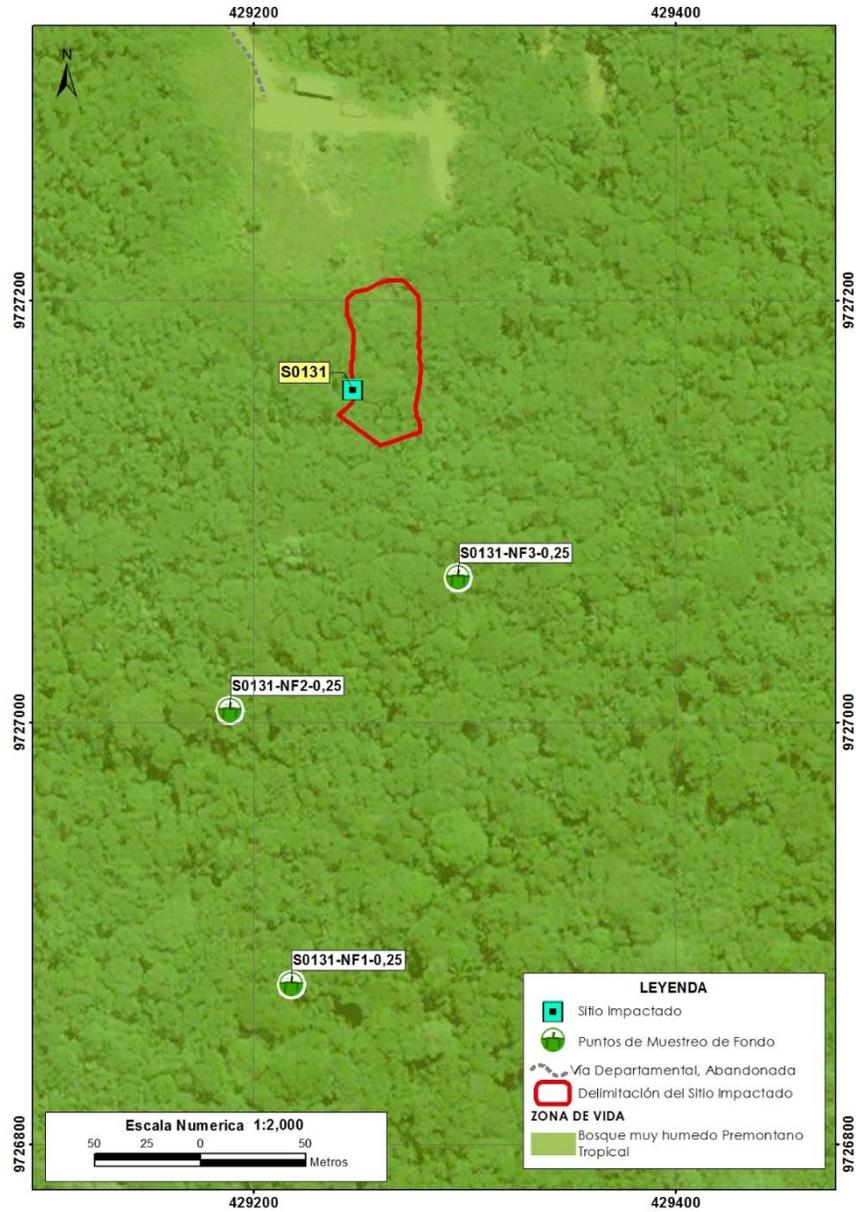


Figura 5. Zona Climática de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

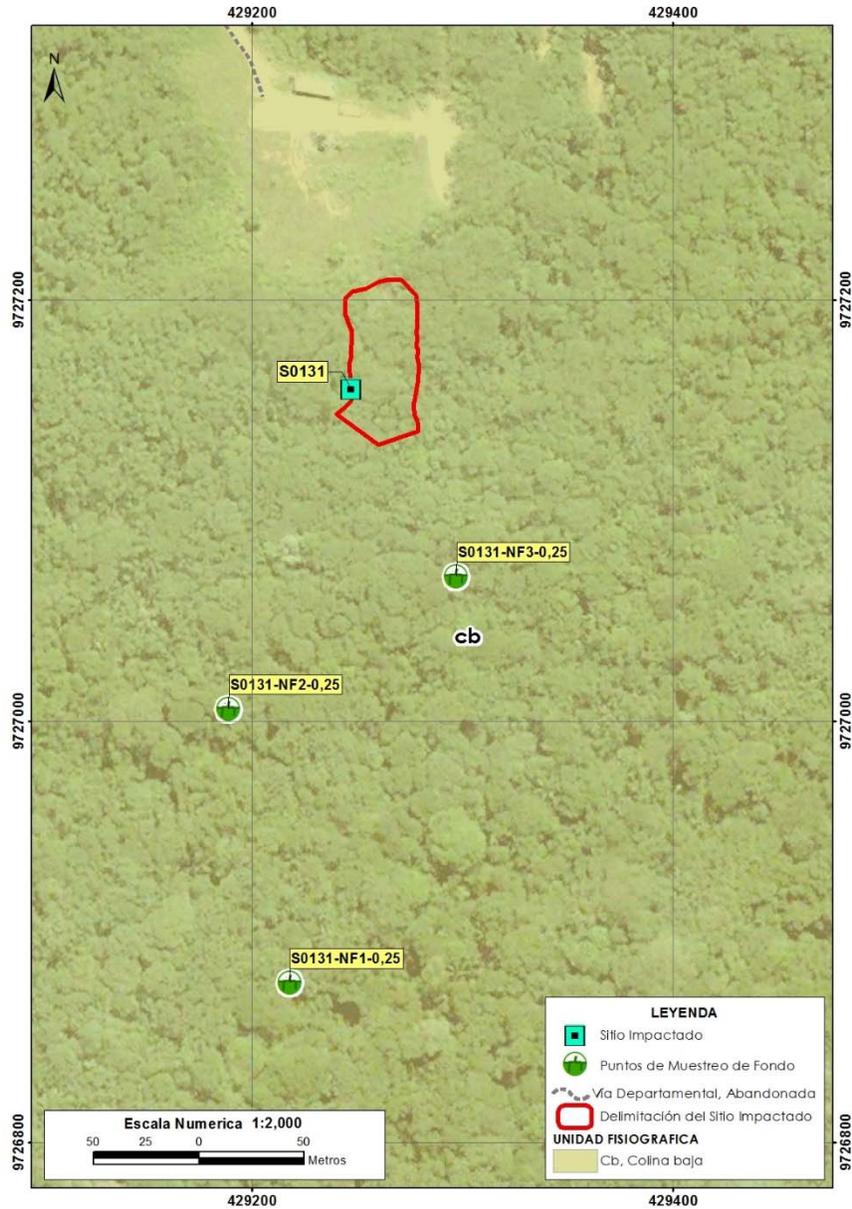


Figura 6. Unidad Fisiográfica de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131
Elaboración: Consorcio ECOCODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

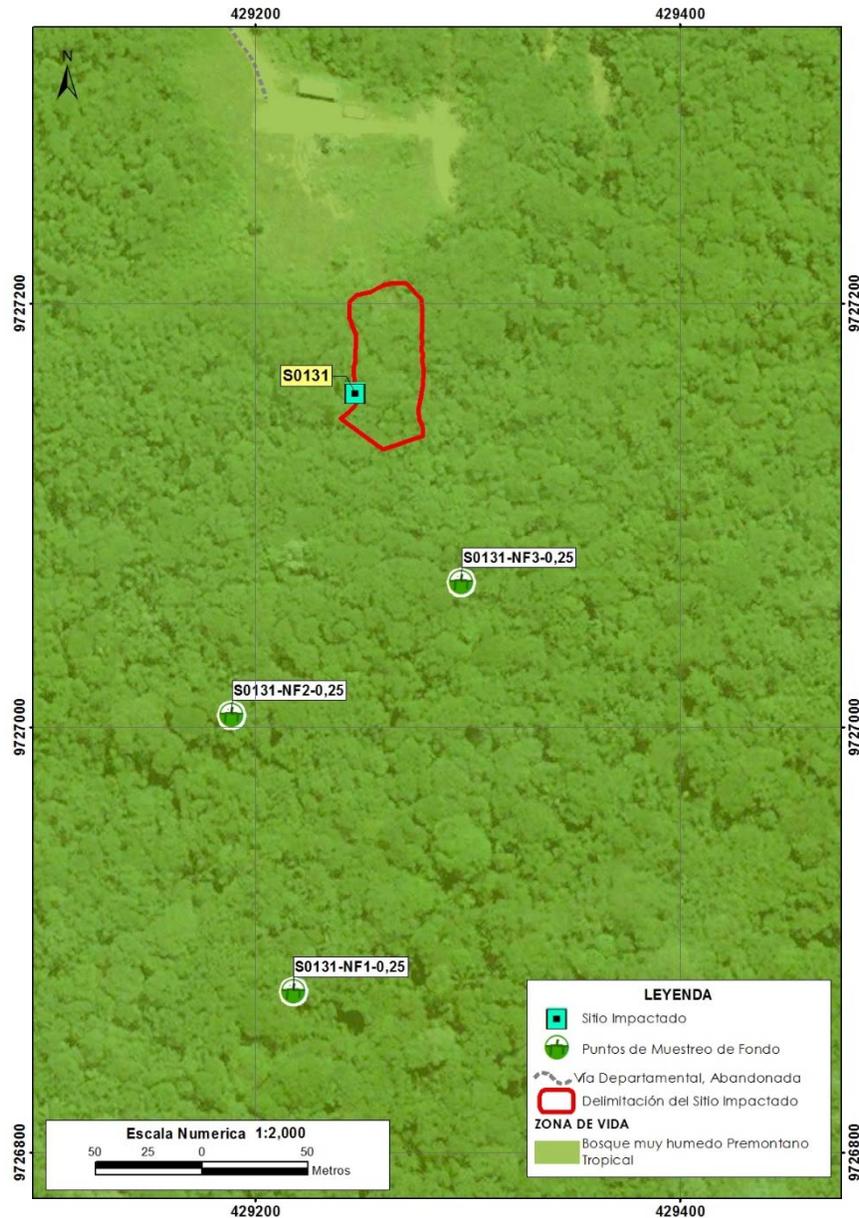
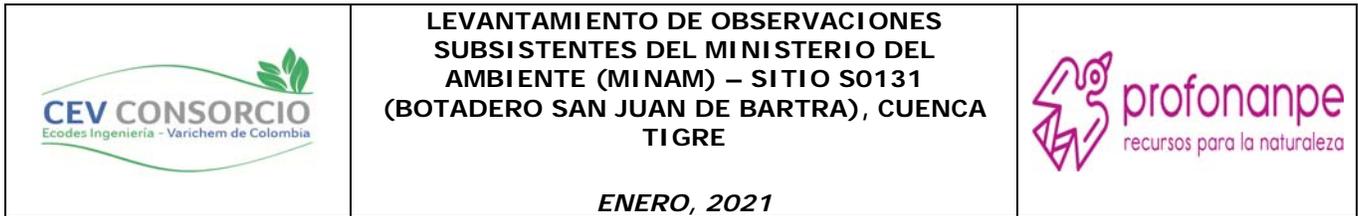
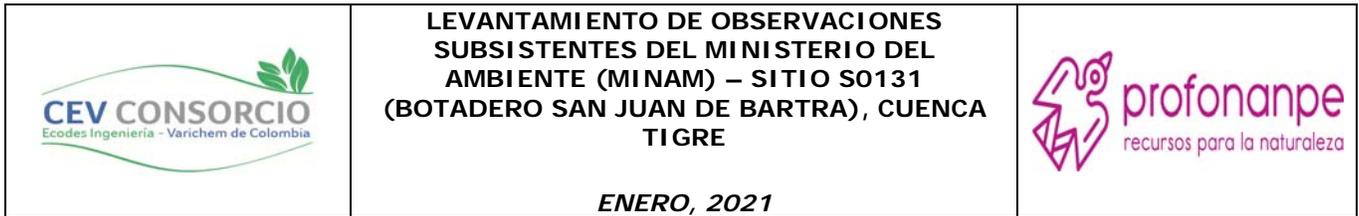


Figura 7. Zona de Vida de las Muestra de Fondo y del Sitio S0131

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

Por otro lado, de acuerdo a lo solicitado, se presentan los criterios técnicos para determinar las áreas no intervenidas:

- El área de muestreo para las muestras de nivel de fondo se ubica fuera del Sitio Impactado. La estación de muestreo de nivel de fondo más cercana al Sitio se ubica a aproximadamente 68



metros hacia el lado sur, tal como se aprecia en la **Figura 8**; además por su ubicación las estaciones se encuentran en áreas más elevadas como se puede apreciar en la **Figura 9**.

- La vegetación presente en el área no evidencia alteración antropogénica.
- El área no presenta o presentó actividad antropogénica; tampoco presenta modificación del relieve. Esto validado con el conocimiento de los monitores ambientales comunitarios de la zona.

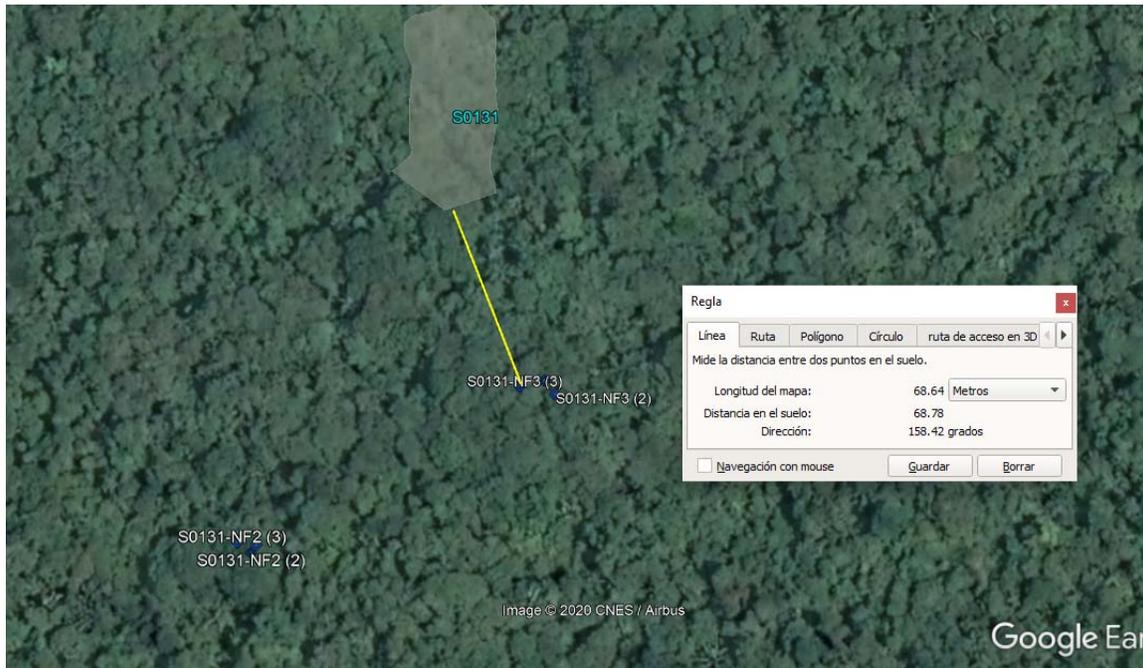


Figura 8. Distancia a las Estaciones de Muestreo de Nivel de Fondo.
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

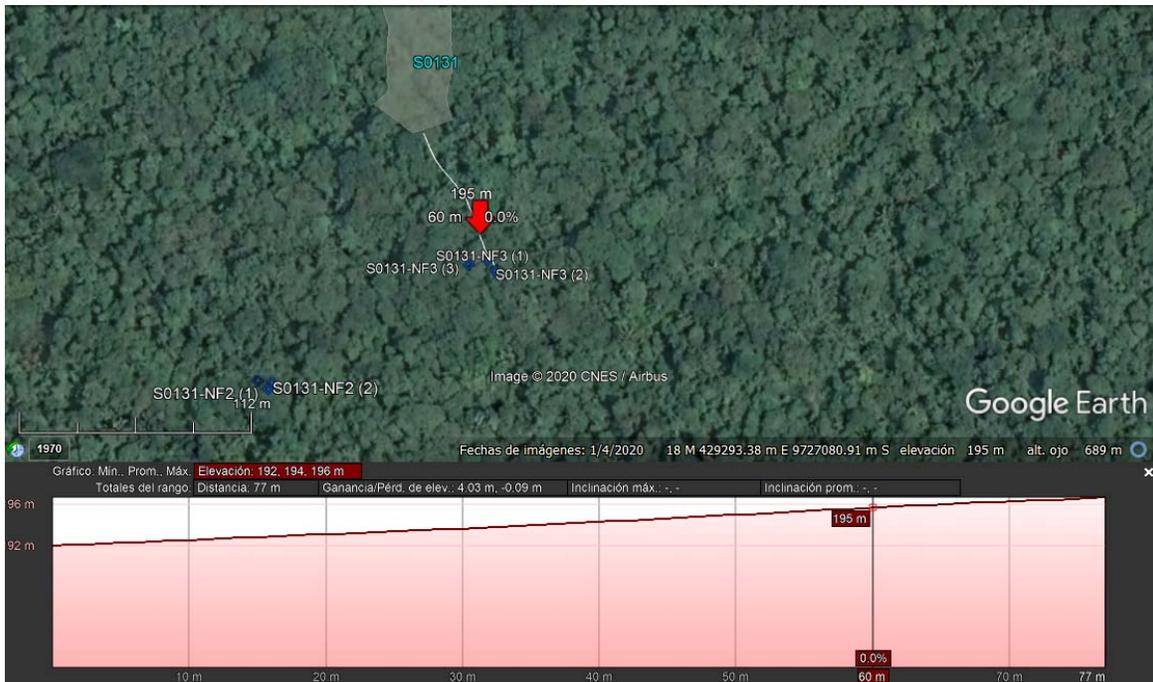
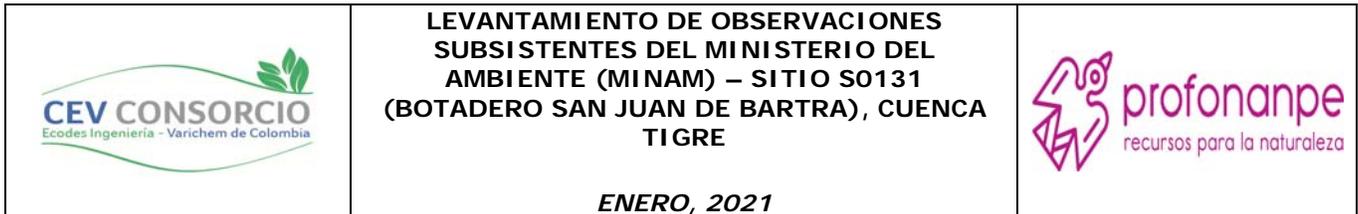


Figura 9. Perfil de Elevación entre el Sitio S0131 y el Punto de Muestreo de Fondo
Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

2.10. Observación N° 33

En el ítem 3.8.1.2. Visita Preliminar de Campo se menciona lo siguiente respecto a los pasos de la visita preliminar de campo:

- “(...) Personas conocedoras del lugar, que acompañaron indicando los límites de las áreas (...)”.
- “(...) Sondeo manual, efectuado con un barreno cada cierto tramo (de manera aleatoria). En este se buscó la presencia visual u organoléptica de características típicas de impactos por hidrocarburos: presencia de hidrocarburos, iridiscencia, presencia de grasas y aceites en áreas saturadas con agua, olor característico (...)”.

Al respecto, el PR debe indicar el sustento técnico de estas afirmaciones.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 33

La consultora no indica el sustento técnico de la secuencia para la visita preliminar en campo toda vez que no se incluye mayor detalle respecto al sondeo manual, específicamente para la búsqueda de la presencia visual u organoléptica de características típicas de impactos por hidrocarburos: presencia de hidrocarburos, iridiscencia, presencia de grasas y aceites en áreas saturadas con agua, olor característico.

Respuesta:

Respecto a las afirmaciones se indica lo siguiente:

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

- La participación de los pobladores de la Comunidad Nativa San Juan de Bartra fue activa, mostrando su interés desde la visita preliminar. Los monitores comunitarios que estuvieron presente en la visita de la OEFA acompañaron en la visita de reconocimiento (**Fotografía 1**). Aunque el área afectada por la actividad petrolera es evidente, también es delimitable topográficamente.



Fotografía 1. Poblador de la Comunidad Nativa San Juan de Bartra en la Plataforma de los Pozos 12, 13 y 14 (Sitio S0131)

Fuente: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 6 febrero 2018.

- Durante la visita preliminar se realizaron sondeos en el Sitio para identificar la presencia de hidrocarburos en el suelo del Sitio. En esta etapa se busca recoger las evidencias de afectación y con ello delimitar el Sitio (**Fotografía 2**). Los sondeos realizados durante la visita preliminar se presentan en la Tabla 3-72 Sondeos Realizados en la Visita de Reconocimiento (Folio 203).

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---



Fotografía 2. Presencia de Hidrocarburos en el Suelo del Sitio S0131 (429268 E / 9727137 N)

Fuente: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 6 febrero 2018.

Después de haber sustentado las afirmaciones indicadas; también se presenta el sustento técnico de la secuencia para la visita preliminar en campo, el cual está basado en aspectos mencionados en el *Standar Practice for Environmental Site Assessments: Phase I Environmental Site Assessment Process* (ASTM E 1527). En el numeral 9 “Reconocimiento del Sitio” de la práctica estándar ASTM E 1527, se describen las actividades que se desarrollan en el reconocimiento, las cuales fueron consideradas en el presente proyecto, las cuales son:

- En la visita al Sitio, se realizan observaciones visuales y mediante el sentido del olfato; sobre cualquier estructura ubicada dentro y fuera de ella, así como las vías adyacentes.
- Realización de entrevistas; con el objetivo es obtener información que indique las condiciones ambientales reconocidas en relación con el Sitio.

De acuerdo a lo solicitado, se presentó el sustento técnico de la secuencia de la vista preliminar la cual se encuentra basada en una Práctica Estándar de la ASTM para evaluación de sitios contaminados.

2.11. Observación N° 36

En el PR, para la elección de la especie receptora para los posteriores análisis de riesgo y cálculo de los niveles de remediación, se considera a la especie menos sensible, es decir las especies con valores NOEC y EC50, más bajos para los contaminantes de preocupación. Al respecto, el PR deberá indicar el sustento técnico de esta selección considerando factores como sensibilidad al contaminante de preocupación, representatividad en el ecosistema, entre otros.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 36

La consultora no indica el sustento técnico solicitado en la observación N° 36 respecto a la elección de

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

la especie representativa, asimismo indica que "(...) existen entonces otros criterios que permitan proteger a todo el ecosistema, como los empleados en el presente estudio, a falta de información específica o detallada", sin embargo estos criterios no se indican en la respuesta ni en otras secciones del PR. En ese sentido los valores de NOEC considerados para de las especies representativas no cuentan con sustento técnico y por lo tanto invalida la información contenida en la Tabla 4-8, Tabla 4-9 y Tabla 4-10 y la posterior determinación del riesgo ecológico.

Respuesta:

Se debe tener presente que las evaluaciones de riesgo ecológico son más complejas debido a que típicamente no existe una sola especie como receptor sino una variedad de especies en el universo de la fauna y flora con diferentes respuestas a una exposición a los contaminantes. Especies que viven dentro de un cuerpo de agua o suelo contaminado naturalmente tienen un contacto muy superior a seres humanos, lo que puede resultar en una mayor susceptibilidad al contaminante. Sin embargo, típicamente en una evaluación de riesgos se da un valor mucho menor a los organismos no humanos y es más difícil encontrar argumentos válidos a emplear grandes cantidades de recursos para implementar acciones de remediación de riesgos ecológicos que muchas veces son altamente incierto (Ministerio del Ambiente, 2015).

Adicionalmente, los criterios para la selección de la especie son:

- La susceptibilidad a los factores estresantes conocidos o potenciales, referido a como un elemento del ecosistema es afectado por un estresor particular. (EPA, 1996, p. 50).
- Existencia de información toxicológica del contaminante sobre el receptor ecológico; esto referido a que la información toxicológica se encuentra disponible solo para pocas especies.
- Por su potencial de exposición, los receptores seleccionados presentan alto potencial de exposición por su localización en el ecosistema, en contacto directo con el suelo.
- En general los receptores de pequeño tamaño presentan tasas metabólicas mayores que los receptores de mayor tamaño.

Por otro lado, la elección de la especie receptora se fundamenta en lo mencionado en *Ecological Risk Assessment Guidance* (Canada, 2012, p 2-21) sobre la selección de una especie en particular para la evaluación directa de esa especie y / o para su uso como representante.

Lo mencionado justifica el empleo de los mejores indicadores de medio acuático o terrestre para establecer que en cualquier posible escenario, ese podría ser considerado el criterio más conservador. Motivo por el cual se empleó toda la base de datos almacenada por más de 20, 30 y 40 años en el EPA (<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>) para elegir el parámetro NOEC o CE₅₀ y realizar la estimación de riesgo según el escenario de estudio y las características del mismo.

Bibliografía

Government of Canada. (2012). *Ecological Risk Assessment Guidance*.

U.S. Environmental Protection Agency. (1996). *Proposed Guidelines for Ecological Risk Assessment*. Washington, DC. EPA/630/R-95/002B.

Ministerio del Ambiente. (2015). Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados.

2.12. Observación N° 37

En la Tabla 4-8, Tabla 4-9 y Tabla 4-10 se presentan los valores de NOEC o EC50 para las especies representativas respecto a los contaminantes de preocupación: Fluoranteno, Bario y Plomo.

Según la EPA, las especies utilizadas para la caracterización de los efectos ecológicos (toxicidad para receptores ecológicos) se deben considerar especies relevantes que ayuden a mantener la estructura natural, la función y la biodiversidad de un ecosistema o sus componentes. Estas pueden contribuir a la base de nutrientes (por ejemplo, producción primaria), proporcionar hábitat (por ejemplo, para alimentos o reproducción), promover la regeneración de recursos críticos (por ejemplo, descomposición o ciclo de nutrientes) o reflejar la estructura de la comunidad, ecosistema o paisaje (por ejemplo, diversidad de especies). Además se debe considerar si los efectos ecológicos se dan a través de las vías de exposición tradicionales (exposición dérmica, por inhalación o consumo de agua, sedimentos, suelo) o si los efectos se generan por la acumulación de contaminantes, en las cadenas alimentarias.

Al respecto el PR debe i) fundamentar el uso de especies análogas en reemplazo de especies propias del área de estudio considerando los diferentes ecosistemas de vida y ii) incluir el sustento técnico de la elección de las especies para la evaluación de toxicidad tomando en cuenta la relevancia de la especie en el ecosistema del área de estudio.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 37

La consultora no indica el sustento técnico solicitado en la observación N° 37 respecto a la elección de la especie receptora por lo que no se puede validar la información contenida en la Tabla 4-8, Tabla 4-9 y Tabla 4-10 y la posterior determinación del riesgo ecológico para las mismas.

Respuesta:

A continuación se presentan los fundamentos a cada uno de los ítems de la observación:

- (i) Respecto al fundamento sobre el uso de especies análogas en reemplazo de especies propias del área de estudio.
- Es bien conocido que la información toxicológica de fuentes reconocidas para las diferentes especies es limitada o escasa; los estudios toxicológicos se han realizado en su mayoría para especies presentes en Norteamérica o en ecosistema europeos. En este sentido, las especies del ecosistema amazónico en su mayoría son especies endémicas; por ello, la información toxicológica de las especies identificadas en el Sitio es muy limitada.
- (ii) Respecto al sustento de la elección de las especies para la evaluación de toxicidad, se menciona lo siguiente:
- Por su potencial de exposición, los receptores seleccionados presentan alto potencial de exposición por su localización en el ecosistema (especies terrestres y de poco desplazamiento).
 - En general los receptores de pequeño tamaño presentan tasas metabólicas mayores que los receptores de mayor tamaño.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

2.13. Observación N° 38

Respecto a los datos de toxicidad, se deben anexar los datos de las condiciones de control de los ensayos de toxicidad. Este debe contener información como la edad de cada animal o estadio de vida, peso corporal para cada prueba y grupo de control (al inicio y finalización de la prueba), consumo total de alimentos para cada prueba y grupo de control, dieta de prueba, programas de dosis, mortalidad, número y circunstancias de lesiones o muertes, DL50 (en mg / kg) o LC50 (en ppm) con límites de confianza del 95% o dosis máxima tolerada estimada, métodos de cálculo, pendiente de la línea de respuesta a la dosis y protocolo de prueba.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 38

La consultora no indica lo solicitado por la observación N° 38 y solo sustenta la consideración de información secundaria, sin embargo, considerando la importancia de los datos de toxicidad para el cumplimiento de los objetivos del estudio, es necesario incluir mayor detalle respecto a las condiciones de estos ensayos. Cabe resaltar que la base de datos ECOTOX, incluye tanto valores de toxicidad como información adicional sobre el ensayo que podría servir para el sustento de lo solicitado en la observación N° 38.

Respuesta:

Se aclara que los datos de toxicidad que se presentaron en el Plan de Rehabilitación provienen de información secundaria de bases de datos de reconocido prestigio como el ECOTOX. En este sentido, no formó parte de los alcances del Plan de Rehabilitación verificar la información disponible en la base de datos ECOTOX. Lo solicitado se podría aplicar a estudios que no han sido reconocidos o que no se usan ampliamente; asimismo no hay requerimiento en la normatividad nacional aplicable que la única referencia técnica a utilizar sea la de ECOTOX.

No obstante a lo mencionado y para complementar lo solicitado, en la **Tabla 8** se presentan datos de las condiciones de control de los ensayos de toxicidad como: etapa de crecimiento, género, duración de la exposición, tipo de exposición, punto final, efecto sobre la muestra, los cuales se encuentran disponibles. Además, para mayor detalle se adjuntan estos estudios en el **Anexo MINAM Observación N° 38**.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Tabla 8. Datos de los Ensayos de Toxicidad

N°	Especie	Título del Estudio	Autores	Punto Final	Contaminante Químico	Efecto	Etapa de Vida del Organismo	Género	Duración de la Observación	Tipo de Exposición
1	<i>Sinapis alba</i>	Toxicity of Eight Polycyclic Aromatic Compounds to Red Clover (<i>Trifolium pratense</i>), Ryegrass (<i>Lolium perenne</i>), and Mustard (<i>Sinapis alba</i>)	Sverdrup, L.E., P.H. Krogh, T. Nielsen, C. Kjaer, and J. Stenersen	EC ₅₀ : 1000 mg/kg	Fluoranteno	Crecimiento	Semilla	No Reportado	21 días	Presente en suelo
2	<i>Enchytraeus crypticus</i>	Toxicity Assessments of Antimony, Barium, Beryllium, and Manganese for Development of Ecological Soil Screening Levels (Eco-SSL) Using Enchytraeid Reproduction Benchmark Values	Kuperman, R.G., R.T. Checkai, C.T. Phillips, M. Simini, J.A. Speicher, and D.J. Barclift	NOEC: 1798 mg/kg	Nitrato de Bario	Mortalidad	Adulto	Ambos	14 días	Aplicación directa
3	<i>Sinella curviseta</i>	Evaluation of Growth and Reproduction as Indicators of Soil Metal Toxicity to the Collembolan, <i>Sinella curviseta</i>	Xu, J., X. Ke, P.H. Krogh, Y. Wang, Y.M. Luo, and J. Song	EC ₅₀ : 3212 mg/kg	Cloruro de Plomo	Reproducción	Adulto	Ambos	28 días	Aplicación directa

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

2.14. Observación N° 39

En el ítem 4.4.3 Salud Ambiental se menciona que a diferencia del cálculo de RQ tradicional para el PR se utilizan los valores de toxicidad de las especies de mayor tolerancia y para los valores de exposición se utilizarán los factores de seguridad solo si se considera conveniente. Al respecto, el PR deberá indicar el sustento técnico de utilizar la metodología mencionada para el cálculo del RQ.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 39

La evaluación de riesgo en el marco de un Plan de rehabilitación permite determinar la concentración objetivo para la remediación y tiene como principio evaluar la probabilidad de que ocurran efectos adversos como resultado de la exposición a factores estresantes físicos o químicos. En ese sentido se considera el peor caso razonable para la especie más sensible o en su defecto más representativa. En ese sentido lo indicado por la consultora, respecto a considerar a la especie mejor adaptada a estas condiciones para la determinación de la concentración de remediación se contradeciría con el objetivo de una evaluación de riesgos y se encontrarían valores que maximizarían además la probabilidad de que ocurran efectos adversos adicionales en los ecosistemas como resultado de la exposición.

Respuesta:

Lo planteado en el PR y precisado en la respuesta a la observación se fundamenta en las consideraciones que se tienen sobre el proceso evolutivo propio del ecosistema. En este caso, las concentraciones de algunos contaminantes fueron altas (a inicio de o cuando se dio origen a la contaminación) por lo que un modelo de riesgos al inicio del proceso de remediación (es decir al momento actual, luego de varios años de contaminación) debe incluir a las especies mejor adaptadas a estas condiciones, es decir, las tolerantes. Conforme se recupere el ecosistema, luego del proceso de remediación, se dará un proceso de sucesión que dará paso a especies más sensibles hasta llegar a una comunidad clímax.

Cabe señalar que los contaminantes están presentes en el ecosistema del Sitio desde hace más de dos décadas.

Adicionalmente, la elección de la especie receptora se fundamenta en lo mencionado en la guía técnica: *Ecological Risk Assessment Guidance* (Canada, 2012, p 2-21) sobre la selección de una especie en particular para la evaluación directa de esa especie y / o para su uso como representante.

2.15. Observación N° 41

En el ítem 4.10.2.1. Estimación del Riesgo Para Ecosistemas, se indicó lo siguiente, respecto a la elección de la especie más tolerante para la caracterización de riesgo ecológico. "Esto se debe a consideraciones sobre el proceso evolutivo propio del sistema de gestión. En este caso, las concentraciones de algunos contaminantes fueron altas, por lo que un modelo de riesgos al inicio del proceso de remediación debería incluir a las especies mejor adaptadas a estas condiciones, es decir, las tolerantes. Conforme se recupere el ecosistema, luego del proceso de remediación, se dará un proceso de sucesión que dará paso a especies más sensibles hasta llegar a una comunidad clímax". Al respecto, el PR debe indicar el sustento técnico para las afirmaciones realizadas.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 41

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

La evaluación de riesgo en el marco de un Plan de rehabilitación permite determinar la concentración objetivo para la remediación y tiene como principio evaluar la probabilidad de que ocurran efectos adversos como resultado de la exposición a factores estresantes físicos o químicos. En ese sentido se considera el peor caso razonable para la especie más sensible o en su defecto más representativa. En ese sentido lo indicado por la consultora, respecto a considerar a la especie mejor adaptada a estas condiciones para la determinación de la concentración de remediación se contradeciría con el objetivo de una evaluación de riesgos y se encontrarían valores que maximizarían además la probabilidad de que ocurran efectos adversos adicionales en los ecosistemas como resultado de la exposición. En su defecto, se debe incluir el sustento técnico científico de las afirmaciones respecto a las consideraciones particulares para la remediación derrames de mayores antigüedades.

Respuesta:

Lo mencionado está basado en el siguiente análisis:

El Sitio en evaluación presenta más de 2 décadas (20 años) con presencia afectación en el suelo. En ese sentido, se considera que las especies presentes en él se encuentran mejor adaptadas a los contaminantes, lo que no ocurre en escenarios con derrames recientes.

Adicionalmente, las consideraciones y criterios tomados para el ERSA están alineados a lo mencionado en el capítulo 7 de la Guía ERSA, y de manera puntual para esta observación se ha tomado en cuenta lo siguiente: “...las evaluaciones de riesgo ecológico son más complejas debido a que típicamente no existe una sola especie como receptor sino una variedad de especies en el universo de la fauna y flora con diferentes respuestas a una exposición a los contaminantes. Especies que viven dentro de un cuerpo de agua o suelo contaminado naturalmente tienen un contacto muy superior a seres humanos, lo que puede resultar en una mayor susceptibilidad al contaminante. Sin embargo, típicamente en una evaluación de riesgos se da un valor mucho menor a los organismos no humanos y es más difícil encontrar argumentos válidos a emplear grandes cantidades de recursos para implementar acciones de remediación de riesgos ecológicos que muchas veces son altamente inciertos...”³.

2.16. Observación N° 42

La caracterización del riesgo para recursos naturales abióticos para el PR, contempla una evaluación cualitativa con descripciones genéricas sin respaldo de evidencia específica cuantitativa ni estadística. Al respecto, el PR debe indicar el sustento técnico de la evaluación de riesgo a través del uso de una metodología cuantitativa.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 42

La consultora no sustenta de manera técnica el análisis cualitativo de la caracterización del riesgo para recursos naturales abióticos. Si bien la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA), indica que la evaluación de riesgos para recursos naturales abióticos puede ser conceptual indicando la *probabilidad de una posible contaminación del suelo*, este término no necesariamente implica el enfoque cualitativo que hace referencia a la sección 4.10.3 y que no define de manera clara la *probabilidad de una posible contaminación del suelo*.

Respuesta:

³ El subrayado es nuestro

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

Se aclara que la caracterización del riesgo para recursos naturales abióticos, ha sido evaluada cualitativamente, teniendo como respaldo las interpretaciones de los resultados de ensayo de laboratorio y también considerando la distribución de los contaminantes en el suelo.

Por otro lado, la evaluación de riesgo para los Recursos Naturales Abióticos presentado en el Plan de Rehabilitación se realizó siguiendo los lineamientos de la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA), siendo esta “Guía” la base para el Desarrollo de Evaluaciones de Riesgo a la Salud y Ambiente. En el numeral 8.1 Riesgo para el Suelo como Recurso Natural, menciona:

“El análisis de riesgo debe abarcar una determinación a nivel conceptual de la probabilidad de una posible contaminación del suelo por las fuentes de contaminación, y de ser posible, una estimación de la carga de contaminantes esperados”.

En este sentido, lo presentado en el numeral 4.10.3 del Plan de Rehabilitación considera los lineamientos de la Guía ERSA.

Sin embargo, dado que se solicita la caracterización cuantitativa del riesgo para el suelo del Sitio se aclara lo siguiente:

El cálculo cuantitativo del riesgo no es necesario, debido a que los principales mecanismos de transporte presentes en el Sitio no estarían aportando contaminantes a otros medios; la Guía ERSA en el numeral 8.1 menciona los procesos de una posible contaminación (transporte eólico, transporte de suelo contaminados por escurrimiento, lixiviación de contaminantes, vertimiento intencional de aguas o residuos contaminados al suelo), en este sentido se explican que los procesos mencionados no contribuyen al transporte de contaminantes:

- **Transporte eólico:** no se espera ni está ocurriendo el transporte de contaminantes del Sitio a través de polvo; debido a que toda el área del Sitio está cubierta de vegetación, las lluvias esporádicas y la vegetación que aún persiste dentro del Sitio evitan ello.
- **Transporte de suelos contaminados por escurrimiento:** Cercano al Sitio no se presentan cuerpos de agua. Dada la topografía de Sitio en caso de producirse escurrimiento de contaminantes estos se mantendrían en su parte baja.
- **Lixiviación de contaminantes:** los contaminantes metálicos encontrados en el Sitio no generan lixiviados con concentraciones detectables de metales (tabla 3-51 del Plan de Rehabilitación), el cual es el principal riesgo para una probable contaminación del agua subterránea. Aún más, el Sitio se delimitó correctamente y se tiene que los contaminantes han alcanzado una profundidad máxima de 2,4 metros; por otro lado, el informe hidrogeológico y las perforaciones efectuadas en el Sitio indican la ausencia de agua subterránea hasta 6 metros de profundidad.
- **Vertimiento intencional de aguas o residuos contaminados al suelo:** este proceso no se viene dando, por ello no habría adición actual de contaminantes en el Sitio.

Por lo expuesto, no se espera que estén ocurriendo el transporte de contaminantes por los procesos descritos anteriormente.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

2.17. Observación N° 43

Para el análisis de incertidumbre se presentan valores en porcentajes para diferentes aspectos y temas, indicando una incertidumbre total de 19,5%, resultado de la sumatoria de las incertidumbres particulares y específicas. Al respecto, el PR debe indicar la metodología para el cálculo de cada valor de incertidumbre indicado en la Tabla 4-40. Incertidumbres Estimadas para la Cuenca Tigre, así como el cálculo de la incertidumbre total.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 43

La consultora no sustenta técnicamente el cálculo de cada valor de incertidumbre, mas solo define y describe la estructura de la metodología para la evaluación de incertidumbres con un enfoque cualitativo más no cuantitativo que sustenten los porcentajes incluidos en la Tabla 4-40 del PR.

Respuesta:

Según los autores Peña, Carter y Ayala-Fierro (2001), se pueden presentar tres (3) metodologías para la evaluación de las incertidumbres, la cuales son: cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa.

En el análisis de las incertidumbres del Plan de Rehabilitación, se ha empleado la metodología semicuantitativa, la cual consiste en lo siguiente:

- a) Revisión de la información empleada en el estudio.
- b) Agrupación de las principales fuentes de incertidumbre en las 04 categorías:
 - Incertidumbres asociadas al modelo conceptual,
 - Incertidumbres asociadas a la caracterización del Sitio,
 - incertidumbres sobre los efectos de los contaminantes e incertidumbre relativa al análisis de la exposición, y
 - Incertidumbre relativa al análisis de la exposición.
- c) Identificación de los aspectos de evaluación de cada una de las categorías de la incertidumbre, por ejemplo: contaminantes, usos de suelo, metodologías de laboratorio, entre otras.
- d) Taller de especialistas para estimar la incertidumbre de cada aspecto considerado.
- e) Análisis y presentación de los resultados.

Cabe mencionar que la metodología descrita se adaptó de lo mencionado por el autor Evans et al. (2003); también, en esta metodología, se consideraron las categorías de incertidumbre mencionadas en el numeral 9 Análisis de Incertidumbres de la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados.

Finalmente, se menciona que la metodología de evaluación de incertidumbres realizada en el Plan de Rehabilitación, forma parte de metodologías ampliamente usadas y ha sido referencia en la bibliografía especializada.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

A solicitud se incorpora el sustento técnico que justifica de cada valor de incertidumbre:

Para la evaluación de incertidumbre se definió una escala numérica realizada a criterio experto, la cual se presenta en la **Tabla 9** y en la **Tabla 10** se muestran los criterios y consideraciones que justifican los resultados obtenidos en el análisis de incertidumbre.

Tabla 9. Escala de Valoración de Incertidumbres

Valoración	Calificación	Consideraciones
0,50	Bajo	Se ha empleado información de fuentes confiables y/o se cuenta con información específica del Sitio; no obstante, se pueden haber emplearon algunas suposiciones o simplificaciones durante la evaluación del riesgo.
1,00	Medio	La información general es limitada, se cuenta con información específica del Sitio; se emplearon suposiciones o simplificaciones complementarias durante la evaluación del riesgo.
2,00	Alto	La información es referencial; se emplearon suposiciones o simplificaciones complementarias durante la evaluación del riesgo.
3,00	Muy alto	La información es referencial o está ausente; en la evaluación se han realizado simplificaciones y suposiciones.

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Tabla 10. Criterios Considerados en la Valoración de Incertidumbres

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
Asociadas al modelo conceptual	Contaminantes	Relacionado a contaminantes que no se han incluido en la cuantificación del riesgo.	1%	<p>Respecto a los contaminantes que no se han incluido se tienen las siguientes consideraciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se han evaluado los contaminantes asociados a la actividad petrolera; dado que es la única actividad antropogénica presente en el Sitio. • Previo a la elaboración del modelo conceptual, se revisó información del Sitio, tales como: <ol style="list-style-type: none"> a) Informe 477-2014-OEFA/DE-SDCA "Identificación de Sitios Contaminados del Componente Suelo en la cuenca del Río Tigre en el Área de Influencia del Lote 1AB de la Empresa Pluspetrol Norte S.A. realizado por OEFA, en el cual se han identificado contaminantes que presentaron concentraciones excedencias a los Estándares de Calidad Ambiental. b) Informe de Determinación de Niveles de Fondo y Niveles de Referencia en Tres Asociaciones de Suelo del Departamento de Loreto – 2015, realizado por OEFA. • El paso del tiempo desde la liberación de los contaminantes en el medio ambiente, es una variable que ha contribuido en la degradación de los contaminantes. Los hidrocarburos desde su liberación al ambiente sufren diferentes procesos como la evaporación y formación de aerosoles en los compuestos con elevada presión de vapor. En este sentido, los contaminantes menos volátiles del petróleo son los que posiblemente se encontrarán presentes en el Sitio. Se ha asumido que no existen transformaciones químicas de los contaminantes en los medios evaluados. • Adicionalmente, dentro de las etapas de elaboración del Plan de Rehabilitación, se realizó una visita preliminar en la cual se identificaron las posibles fuentes de contaminación asociadas al Sitio Impactado (presencia de plataformas petroleras, tuberías de transporte de hidrocarburos, como los principales). Con ello se verifica la procedencia de los contaminantes presentes en el Sitio. <p>Este volumen de información minimiza la incertidumbre en este aspecto evaluado.</p>
	Usos de suelo	Relacionados con la fiabilidad de la información utilizada sobre	0,5%	La definición el uso de suelo del Sitio se basó en las consideraciones:



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
		usos futuros del suelo y otros medios de contacto; así como, con la fiabilidad de la información utilizada sobre usos actuales del suelo y otros medios de contacto.		<ul style="list-style-type: none"> Las observaciones de campo realizadas en las visitas al Sitio, se emplearon para identificar el uso actual y el potencial uso futuro del suelo. En este sentido, el Sitio y las áreas adyacentes presentan hábitats para especies permanentes; además de flora y fauna nativa. Entrevistas verbales realizadas a los pobladores de la comunidad nativa, los cuales conocen la secuencia de sucesos vinculados al Sitio Impactado y los usos del mismo. El Sitio Impactado, no es empleado para el asentamiento de viviendas o comunidades, tampoco son espacios destinados a actividades de recreación y esparcimiento. Se consideró lo mencionado en el Informe N° 00311-2018-MINAM/VMGA/DGCA/DCAE "Precisiones respecto de la Aplicación de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo"; en lo relacionado a que en lotes petroleros se presentan áreas que no han sido utilizadas para las operaciones industriales; y por consiguiente, requieren un tratamiento diferente. Respecto al uso futuro, cuando las actividades industriales hayan finalizado en el lote 192, el uso potencial futuro del Sitio será su uso original previo a las actividades antropogénicas. <p>Este volumen de información de los usos del suelo hace que la incertidumbre de este aspecto sea baja.</p>
	Rutas de exposición	Relacionados con elementos constitutivos de cada una de las rutas de exposición consideradas.	0,5%	<p>Se evaluaron las rutas de exposición que cuentan con todos los elementos de exposición (rutas de exposición completas); en los cuales existe la posibilidad de contacto entre el receptor y los contaminantes presentes en el Sitio. En este sentido, en el Sitio Impactado se han identificado las fuentes, focos, mecanismos de transporte, vías de exposición y receptores de la contaminación.</p> <p>La evaluación de los elementos de la ruta de exposición siguió las siguientes consideraciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> Las observaciones de campo realizadas en las visitas al Sitio, permitió identificar las fuentes, focos, mecanismos de transporte, posibles vías de exposición y receptores (humanos como ecológicos). Los resultados de los análisis de laboratorio, cuantificaron la concentración de los contaminantes presentes en los medios evaluados



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
				<p>(suelo, sedimento y agua superficial). En este sentido, los resultados confirmaron las matrices ambientales impactadas (focos).</p> <ul style="list-style-type: none"> Las evaluaciones complementarias para determinar la presencia de agua subterránea: Sondeo Eléctrico Vertical (SEV) y perforaciones exploratorias por debajo de la profundidad máxima del suelo impactado. Los cuales confirmaron que los contaminantes no han alcanzado el agua subterránea; por ello, no se considera la ruta de exposición asociada al agua subterránea. <p>Este volumen de información minimiza la incertidumbre en este aspecto evaluado.</p>
	Receptores ecológicos	Relacionada con la idoneidad de los receptores ecológicos seleccionados.	1%	<p>Respecto a la idoneidad de los receptores ecológicos se consideró lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> El área del Sitio presenta especies de flora y fauna que se caracterizan por su abundancia y diversidad (propios de la región amazónica). Debido a que la liberación de los contaminantes en el ambiente ocurrió hace más de 2 décadas, muchas especies de flora o fauna posiblemente han desaparecido del Sitio. La diversidad de especies presentes en la zona es una variable a considerar; desde especies muy sensibles hasta especies tolerantes; especies de recorrido corto hasta especies de grandes desplazamientos. La información toxicológica de las especies presentes en el Sitio es limitada o escasa (especies de ecosistema amazónico). Para la evaluación del riesgo ecológico, se ha asumido una especie genérica que potencialmente podría estar expuesta a los contaminantes del Sitio. <p>Por lo mencionado, se considera que este aspecto presenta incertidumbre media.</p>
Asociadas a la caracterización del Sitio	Contaminantes	Relacionado con las concentraciones de los contaminantes en las muestras de los medios evaluados.	1%	<p>Respecto a la concentración de los contaminantes en las muestras evaluadas se tienen las siguientes consideraciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> Las diferentes técnicas analíticas empleadas para la cuantificación de los contaminantes en los diferentes medios presentan su propia incertidumbre. En este sentido, la incertidumbre del laboratorio estaría controlada con el empleo de controles de calidad en el muestreo y



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
				<p>análisis.</p> <ul style="list-style-type: none"> Los límites de detección de los métodos analíticos son los adecuados para la comparación con los estándares de calidad ambiental de las diferentes matrices ambientales. Se han cuantificado contaminantes de forma individual (metales y BTEX) y también contaminantes agrupados como es el caso de las fracciones de hidrocarburos. En ese sentido, las referencias toxicológicas para compuestos agrupados es limitada. <p>Por lo mencionado, se considera que este aspecto presenta incertidumbre media.</p>
	Metodologías en campo	Relacionada con la fiabilidad de los resultados analíticos en la toma de muestra en campo.	0,5%	<p>Respecto a las metodologías empleadas en campo, las consideraciones aplicadas son:</p> <ul style="list-style-type: none"> El laboratorio que realizó los análisis de las diferentes matrices ambientales es un laboratorio acreditado bajo la norma NTP ISO/IEC 17025:2006 tanto para el análisis y el muestreo. En este sentido, el laboratorio cuenta con un sistema de gestión auditado periódicamente por un organismo especializado nacional (INACAL) que verifica su capacidad técnica. Las metodologías de muestreo provienen de fuentes reconocidas como: <ul style="list-style-type: none"> a) Guía de Muestreo de Suelos elaborado por el Ministerio del Ambiente. b) Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales. c) Guías de Muestreo de la USEPA. El laboratorio realizó controles de calidad del muestreo, para ello se emplearon: duplicados de campo, blancos de campo, blancos de lavado de equipo y blancos viajeros. Los resultados obtenidos en los blancos evidencian que no existe contaminación de las muestras durante su muestreo. Se cumplieron las consideraciones para la preservación de las muestras colectadas (suelo); es decir, se aplicaron preservantes para muestras que así lo requieran. Desde el Sitio de muestreo hasta su llegada al laboratorio, las muestras fueron refrigeradas manteniéndolas a una temperatura que garantice su preservación.



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
				<ul style="list-style-type: none"> El tiempo máximo de almacenamiento de las muestras (<i>holding time</i>) es un aspecto que se cumplió. <p>Estas consideraciones hacen que la incertidumbre de este aspecto sea baja.</p>
	Metodologías en laboratorio	Relacionada con la fiabilidad de los resultados analíticos en los ensayos de laboratorio.	0,5%	<p>Respecto a las metodologías empleadas con los ensayos de laboratorio, se indica lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> El laboratorio empleado para los análisis de las diferentes matrices ambientales es un laboratorio acreditado bajo la norma NTP ISO/IEC 17025:2006 tanto para el análisis y el muestreo. En este sentido, el laboratorio cuenta con un sistema de gestión auditado periódicamente por un organismo especializado nacional que verifica su capacidad técnica. Las metodología de análisis empleadas provienen de metodologías ampliamente aceptadas en ensayos ambientales como: <ol style="list-style-type: none"> <i>Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods</i> de la EPA (conocido Métodos SW-846), empleado principalmente para ensayos en suelos y sedimentos. <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>, empleado principalmente para ensayos en agua superficial. El laboratorio realizó controles de calidad de los ensayos, para ello emplearon: duplicados, blancos y lectura de estándares de concentración conocida. Los resultados obtenidos de los controles de calidad, confirmaron la representatividad de los ensayos. Como parte del control de calidad del proyecto, al 10% de las muestras de suelo colectadas se realizó duplicados los cuales se analizaron en otro laboratorio acreditado (consideración de la Guía de Muestre de Suelos del Ministerio del Ambiente). En este sentido, los resultados obtenidos por ambos laboratorios se encuentran en el mismo orden de magnitud. <p>Este volumen de información hace que la incertidumbre de este aspecto sea baja.</p>
	Espacio	Relacionada con la representatividad de la	2%	Respecto a la distribución espacial de los contaminantes se indica lo siguiente:



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
		distribución espacial de los contaminantes en los diferentes medios ambientales.		<ul style="list-style-type: none"> Para la determinar la distribución de los contaminantes en el suelo se realizaron muestreos tanto en el eje horizontal como en el eje vertical. Se empleó el muestreo dirigido para determinar la ubicación de los puntos de muestreo de suelo; debido, a que se conoce la naturaleza de los contaminantes y las fuentes de contaminación. Se empleó como criterio conservador realizar el muestreo vertical hasta la profundidad en la cual se encuentre terreno no alterado o sin presencia de contaminantes. A nivel horizontal, la ubicación de los puntos de muestreo se extendió hasta alcanzar terreno no alterado o sin presencia de contaminantes o hasta llegar a barreras como accesos, plataformas, tuberías de transporte de ductos, entre otros; los cuales limitan la extensión del Sitio Impactado. <p>Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto es alta. Sin embargo, se realizaron suposiciones conservadoras para la evaluación del riesgo.</p>
	Tiempo	Evalúa la variabilidad en el tiempo de las concentraciones en los diferentes medios ambientales.	2%	<p>Respecto a la variabilidad en el tiempo de la concentración de los contaminantes se indica lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Se ha considerado que las concentraciones en los diferentes medios evaluados permanecerán constantes a lo largo del tiempo. Aunque han pasado alrededor de 2 décadas desde la liberación de los contaminantes al ambiente, la naturaleza de los contaminantes orgánicos hace que la concentración disminuya para el caso de los compuestos más volátiles. El clima de la región amazónica contribuye con la variabilidad de las concentraciones a lo largo del tiempo; debido a que la alta temperatura de la zona activan los procesos de degradación ambiental, la cual afecta principalmente a estratos situados a nivel superficial (contaminantes orgánicos). Por otro lado, la presencia de lluvia puede provocar arrastre de contaminantes hacia zonas con menor pendiente y variar la concentración de los contaminantes que se encuentran a nivel superficial.



LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE



ENERO, 2021

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
				Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera alta.
	Contaminación cruzada	Evalúa la aportación de otras fuentes de contaminación antropogénica o incluso niveles de ciertas sustancias en forma natural que se encuentran presentes en los medios ambientales caracterizados.	0,5%	Respecto a la aportación de otras fuentes de contaminación natural o antropogénica se indica lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> De acuerdo a lo evaluado en el Sitio no se presentan otras fuentes de contaminación antropogénica ajenas a las evaluadas. Los resultados del muestreo de nivel de fondo evidencian que no existe aporte de contaminación natural.
				Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera baja.
	Salud humana	Considera que los efectos de los contaminantes sobre la salud humana no son completamente conocidos.	2%	Respecto a los efectos de los contaminantes sobre la salud humana se indica lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> No se conocen todos los efectos de los contaminantes sobre la salud humana. La información toxicológica está limitada a pocas sustancias estudiadas. No se ha considera efectos sinérgicos o potenciadores de los contaminantes presentes en el Sitio; se ha asumido un efecto aditivo de los contaminantes del Sitio sobre la salud humana (consideración mencionada en la Guía ERSA).
				Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera alta.
Sobre los efectos de los contaminantes	Salud ecosistemas	Relacionada con el déficit de información sobre el efectos de los contaminantes en los ecosistemas.	2%	Respecto a la falta de información de los efectos de los contaminantes en los ecosistemas se indica lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> Dada la variedad de especies en el ecosistema, no se conocen todos los efectos de los contaminantes sobre las especies del Sitio. La información toxicológica está limitada para pocas sustancias y a unas pocas especies. En la determinación del riesgo a los ecosistemas, se ha asumido una especie genérica que podría estar en contacto con los contaminantes del Sitio. En este sentido, a la especie empleada cuenta con información toxicológica que permite estimar el riesgo ecológico.
				Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera alta. Sin embargo, las suposiciones realizadas corresponden a un escenario conservador.
	Toxicología	Relacionada con la información	0,5%	Respecto a la información toxicológica disponible se menciona lo siguiente:

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
	Biodisponibilidad	<p>toxicológica disponible.</p> <p>Relacionada con la especiación y los efectos de la absorción que son parámetros que influyen en la toxicidad de los contaminantes.</p>	3%	<ul style="list-style-type: none"> Se ha consultado y empleado fuentes bibliográficas o bases de datos de reconocido prestigio como son: ECOTOX, USEPA, ATSDR, entre los principales. <p>Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera baja.</p> <p>Respecto a la especiación y a los efectos de la absorción se indica lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> No se ha realizado especiación de los contaminantes; en este sentido, para la ingesta accidental suelo o ingesta de alimentos se ha considerado que el 100% del contaminante se encuentra biodisponible; la cual es una suposición conservadora en el cálculo del riesgo. Para algunos contaminantes la información de absorción (por ejemplo gastrointestinal) es limitada; en ausencia de información se ha tomado suposiciones conservadoras para el cálculo del riesgo. Los datos toxicológicos en muchos casos fueron extrapolados de ensayos realizados en especies animales. <p>Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera muy alta. Sin embargo, las suposiciones realizadas son conservadoras.</p>
Relativas al análisis de la exposición	Concentraciones	Relacionada con la concentración representativa de un contaminante en el medio de contacto.	0,5%	<p>Respecto a la concentración representativa de un contaminantes en el medio de contacto se indica lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Se ha seguido lo mencionado en la Guía ERSa, en relación al cálculo del UCL para determinar la concentración representativa de los contaminantes en el suelo. Para contaminantes en otros medios ambientales se ha considera la concentración más alta registrada. El UCL se considera un valor estadísticamente seguro para el cálculo de la concentración en el punto de exposición (de acuerdo a lo mencionado por la USEPA). Para el cálculo del UCL se ha empleado el programa informático de la EPA PROUCL. Se ha retirado del cálculo del UCL concentraciones que intencionalmente fueron tomados en sectores que no presentan contaminantes (colectadas con el fin de delimitar la extensión del Sitio). Como parte de la metodología de cálculo de UCL, se ha considerado la

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

Categorías	Aspectos	Descripción del Aspecto que Contribuye con la Incertidumbre	Incertidumbre estimada	Criterios y Consideraciones
				<p>mitad del valor del límite de detección como concentración de las muestras que presentaron niveles por debajo del límite de detección del laboratorio.</p> <p>Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera baja.</p>
	Características	Relacionada con las características biométricas y de comportamiento de las poblaciones expuestas.	2%	<p>Respecto a las características biométricas y el comportamiento de las poblaciones expuestas se emplearon las siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se han considerado características biométricas generales en el cálculo del riesgo. En el país no existen estudios biométricos para poblaciones de comunidades nativas. • Dentro de los grupos poblacionales expuestos se presenta heterogeneidad en los individuos; lo cual contribuye a la incertidumbre de este aspecto. • Una variable son las tasas de ingesta de alimento (peces y vegetales); debido a que el Sitio es relativamente pequeño, los peces pueden estar expuestos a contaminantes de diversas áreas y no solo a sitio contaminado. Por otro lado, el poblador consume pescado y vegetales de diferentes áreas, lo cual hace difícil atribuir una cantidad específica de estos alimentos en relación al Sitio. En este sentido, se han empleado tasas de consumo general los cuales son conservadores para el Sitio. <p>Debido a lo mencionado la incertidumbre de este aspecto se considera alta.</p>

Elaboración: Consorcio ECODES VARICHEM/PROFONANPE (FONAM)-Fondo de Contingencia, 2021.

Bibliografía

Evans et al., 2003. *Introducción al Análisis de Riesgos Ambientales*. 1ra ed. México.
 Peña C., Carter D., y Ayala-Fierro F., 2001. *Toxicología Ambiental*. Ed. Universidad de Arizona.

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

2.18. Observación N° 44

Para el nivel de remediación para el escenario ecológico, se indica que no corresponde calcular un Nivel de Remediación Específico (NRE), dado que se han considerado los efectos de manera indirecta; y que los valores del NOEC o EC50 para las especies analizadas son referencias ecológicas. Al respecto, el PR debe indicar el sustento técnico de no considerar el escenario ecológico para la determinación de los niveles de remediación.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 44

La consultora no indica el sustento técnico de lo indicado en la observación N° 44 respecto al Nivel de Remediación Específico (NRE) ecológico. Asimismo, el PR sobre el Nivel de Remediación Específico (NRE) ecológico indica que se determinará teniendo en cuenta los aspectos abióticos, lo cual se contradice directamente con lo indicado en la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados, sobre el Nivel de Remediación Abiótico: “La determinación de un nivel (concentración) de remediación frecuentemente no es el objetivo idóneo para este fin”. En ese sentido, se considera necesario tener claro la metodología y el cálculo de los Niveles de Remediación Específico (NRE) ecológico.

Respuesta:

Respecto a lo indicado se aclara lo siguiente, dado que las especies analizadas para el riesgo ecológico son referencias ecológicas y no son especies propias del Sitio. En este sentido, establecer niveles de remediación con base a estas especies sería extremadamente conservador.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta lo mencionado en el capítulo 7 de la Guía ERSa: “...las evaluaciones de riesgo ecológico son más complejas debido a que típicamente no existe una sola especie como receptor sino una variedad de especies en el universo de la fauna y flora con diferentes respuestas a una exposición a los contaminantes. Especies que viven dentro de un cuerpo de agua o suelo contaminado naturalmente tienen un contacto muy superior a seres humanos, lo que puede resultar en una mayor susceptibilidad al contaminante. Sin embargo, típicamente en una evaluación de riesgos se da un valor mucho menor a los organismos no humanos y es más difícil encontrar argumentos válidos a emplear grandes cantidades de recursos para implementar acciones de remediación de riesgos ecológicos que muchas veces son altamente inciertos...”.

2.19. Observación N° 45

Para el nivel de remediación para el escenario ecológico, el PR deberá incluir información que brinde estimaciones para parámetros que se requieran determinar, asimismo usar metodologías de interpolación y extrapolación de valores de especies análogas que cumplan con diversos criterios para la validación de los datos, considerando que se requiere obtener datos con baja incertidumbre que brinden resultados confiables.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 45

La consultora no indica el sustento técnico de lo indicado en la observación N° 45 respecto a metodologías de estimación y/o interpolación para la determinación del Nivel de Remediación Específico (NRE) ecológico. Asimismo, el PR sobre el Nivel de Remediación Específico (NRE) ecológico indica que se determinará teniendo en cuenta los aspectos abióticos, lo cual se contradice directamente con lo indicado en la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados, sobre el Nivel de Remediación Abiótico: “La determinación de un nivel (concentración) de remediación frecuentemente no es el objetivo idóneo

	LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE ENERO, 2021	
---	--	---

para este fin". En ese sentido, se considera necesario tener claro la metodología y el cálculo de los Niveles de Remediación Específico (NRE) ecológico.

Respuesta:

Como se ha mencionado en la Observación N° 36, lo solicitado se aplicaría para un caso ideal y específico de afectación en un grupo de especies, donde se pueda obtener información de todas estas y de la red trófica. Generalmente, esos estudios se realizan por varios años tal como se constata en distintos documentos científicos de instituciones referenciales para llegar a tal grado de especificación y/o analogía. Para el presente estudio, el tiempo de ejecución impide cumplir con dichos propósitos. Además, muchas veces la analogía entre especies no brinda precisiones reales ni experimentales que incluso, forman parte de los requisitos para las pruebas ecotoxicológicas que se aplican a nivel de especie y no de familia ni de otras taxas.

2.20. Observación N° 46

Para el nivel de remediación para proteger recursos naturales abióticos, el PR deberá indicar una descripción técnica de los niveles de remediación así como indicar su relación con los valores de pH.

Comentarios a la absolución de la Observación N° 45

La consultora no indica el sustento técnico de lo indicado en la observación N° 46 respecto al Nivel de Remediación Específico (NRE) abiótico. Asimismo, la Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados, sobre el Nivel de Remediación Abiótico indica:

"La determinación de un nivel (concentración) de remediación frecuentemente no es el objetivo idóneo para este fin". En ese sentido, se considera necesario tener claro la metodología y el cálculo de los Niveles de Remediación Específico (NRE) abiótico considerando que el PR asocia el Nivel de Remediación Específico (NRE) ecológico con los aspectos abióticos.

Respuesta:

Se aclara que el nivel de remediación para proteger los recursos naturales abióticos, descrito en el numeral 4.12.3 del PR, fue desarrollado siguiendo la Guía ERSA; respecto al nivel de remediación para proteger los recursos naturales abióticos esta guía menciona:

La determinación de un nivel (concentración) de remediación frecuentemente no es el objetivo idóneo para este fin. El objetivo de remediación debe dar énfasis a la eliminación o reducción del potencial de emisión de la fuente de la contaminación. (Ministerio del Ambiente, 2015, pp. 59).

Para complementar lo señalado, se realiza una descripción técnica de la relación de los valores de pH y el nivel de remediación:

En el suelo del Sitio S0131 (Botadero San Juna de Bartra) se han obtenido valores de pH entre 5,28 y 5,46, dichos valores de pH contribuyen a la solubilidad de los metales presentes en el Sitio.

El pH es un factor para la solubilidad y movilidad de los metales pesados en los lixiviados del suelo y en las aguas subterráneas. De forma general, la mayor solubilidad de los metales pesados ocurre a bajos niveles de pH a excepción del selenio. (Ministerio

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p>ENERO, 2021</p>	
---	---	---

del Ambiente, 2015, pp. 99).

Debido a la presencia de metales y los bajos niveles de pH del suelo, se ha considerado un nivel de mayor protección el cual coincide con los Estándares de Calidad Ambiental para Suelo de uso agrícola.

Respecto a la metodología y el cálculo de los Niveles de Remediación Específicos, se aclara que estos niveles de remediación fueron sugeridos⁴ por los representantes de las federaciones de las comunidades nativas; asimismo, fueron aceptados por el FONAM y la empresa supervisora del Servicio.

Bibliografía

Ministerio del Ambiente. (2015). *Guía para la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgos a la Salud y el Ambiente (ERSA) en Sitios Contaminados*. Lima.

⁴ Considerado como un acuerdo y consideración a seguir para la elaboración y formulación de los PR.

	<p style="text-align: center;">LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p style="text-align: center;"><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

ANEXOS MINAM SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA)

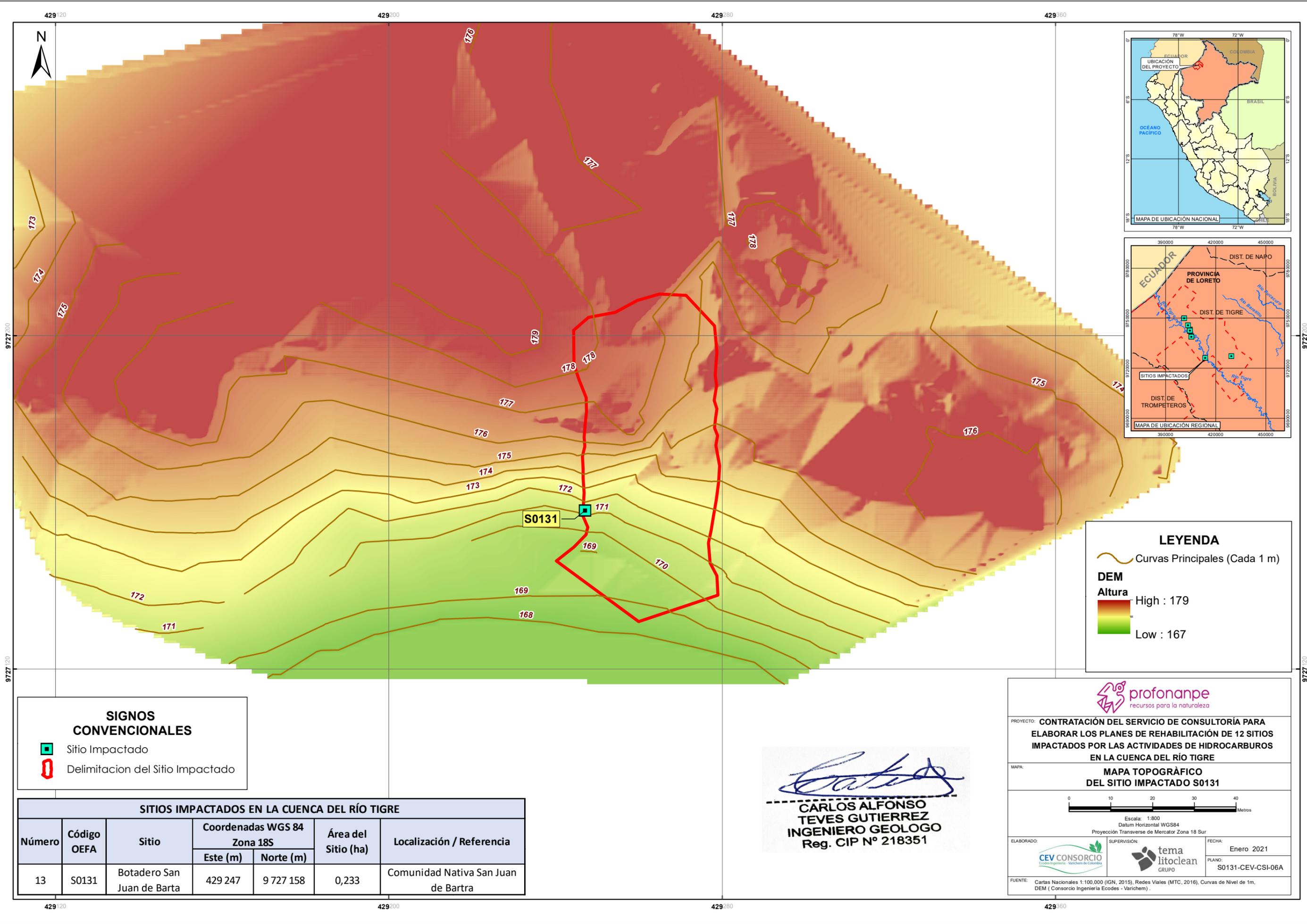
Anexo MINAM	Observación N° 4
Anexo MINAM	Observación N° 7
Anexo MINAM	Observación N° 16
Anexo MINAM	Observación N° 38

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

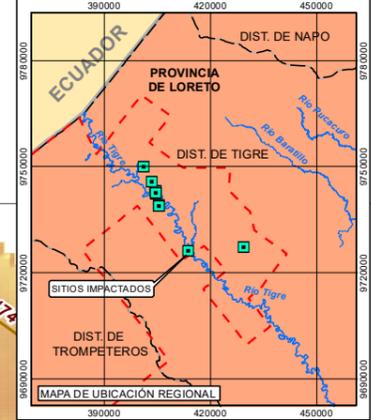
Anexo MINAM Observación N° 4

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

Mapa Topográfico del Sitio S0131



429 20 429 200 429 280 429 360



LEYENDA

Curvas Principales (Cada 1 m)

DEM
 Altura
 High : 179
 Low : 167

SIGNOS CONVENCIONALES

■ Sitio Impactado
 □ Delimitación del Sitio Impactado

SITIOS IMPACTADOS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE						
Número	Código OEFA	Sitio	Coordenadas WGS 84 Zona 18S		Área del Sitio (ha)	Localización / Referencia
			Este (m)	Norte (m)		
13	S0131	Botadero San Juan de Barta	429 247	9 727 158	0,233	Comunidad Nativa San Juan de Bartra

Carlos Alfonso Teves Gutiérrez
CARLOS ALFONSO TEVES GUTIERREZ
 INGENIERO GEOLOGO
 Reg. CIP N° 218351

profonanpe
 recursos para la naturaleza

PROYECTO: **CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE CONSULTORÍA PARA ELABORAR LOS PLANES DE REHABILITACIÓN DE 12 SITIOS IMPACTADOS POR LAS ACTIVIDADES DE HIDROCARBUROS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE**

MAPA: **MAPA TOPOGRÁFICO DEL SITIO IMPACTADO S0131**

Escala: 1:800
 Datum Horizontal WGS84
 Proyección Transversa de Mercator Zona 18 Sur

ELABORADO: **CEV CONSORCIO**
 Ecodes Ingeniería - Varichem de Colombia

SUPERVISIÓN: **tema litoclean GRUPO**

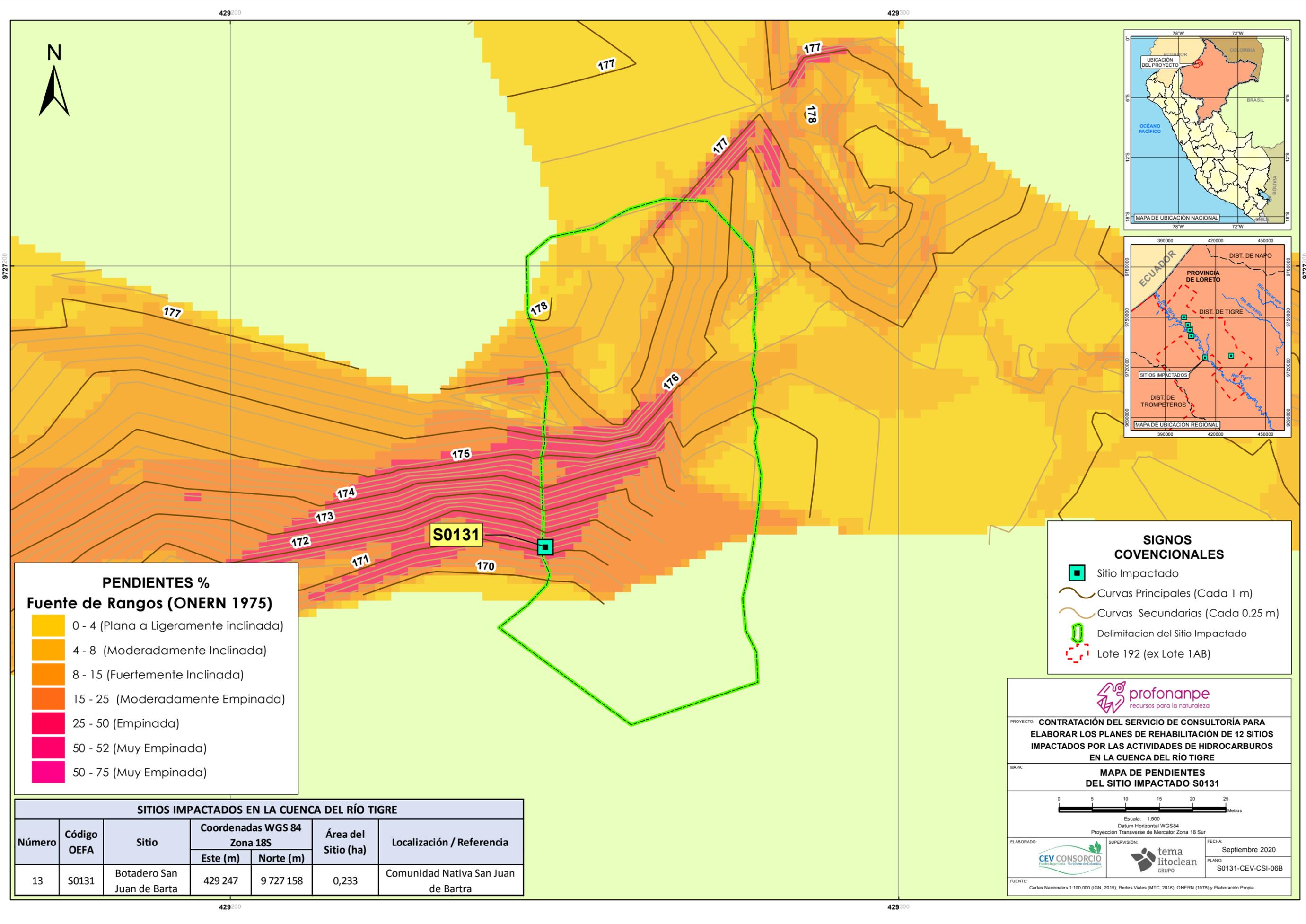
FECHA: Enero 2021
 PLANO: S0131-CEV-CSI-06A

FUENTE: Cartas Nacionales 1:100,000 (IGN, 2015), Redes Viales (MTC, 2016), Curvas de Nivel de 1m, DEM (Consorcio Ingeniería Ecodes - Varichem)

429 20 429 200 429 280 429 360

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

Mapa de Pendiente del Sitio S0131



PENDIENTES %
Fuente de Rangos (ONERN 1975)

0 - 4 (Plana a Ligeramente inclinada)
4 - 8 (Moderadamente Inclinada)
8 - 15 (Fuertemente Inclinada)
15 - 25 (Moderadamente Empinada)
25 - 50 (Empinada)
50 - 52 (Muy Empinada)
50 - 75 (Muy Empinada)

SIGNOS CONVENCIONALES

- Sitio Impactado
- Curvas Principales (Cada 1 m)
- Curvas Secundarias (Cada 0.25 m)
- Delimitación del Sitio Impactado
- Lote 192 (ex Lote 1AB)

SITIOS IMPACTADOS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE

Número	Código OEFA	Sitio	Coordenadas WGS 84 Zona 18S		Área del Sitio (ha)	Localización / Referencia
			Este (m)	Norte (m)		
13	S0131	Botadero San Juan de Barta	429 247	9 727 158	0,233	Comunidad Nativa San Juan de Bartra

profonanpe
recursos para la naturaleza

PROYECTO: **CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE CONSULTORÍA PARA ELABORAR LOS PLANES DE REHABILITACIÓN DE 12 SITIOS IMPACTADOS POR LAS ACTIVIDADES DE HIDROCARBUROS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE**

MAPA: **MAPA DE PENDIENTES DEL SITIO IMPACTADO S0131**

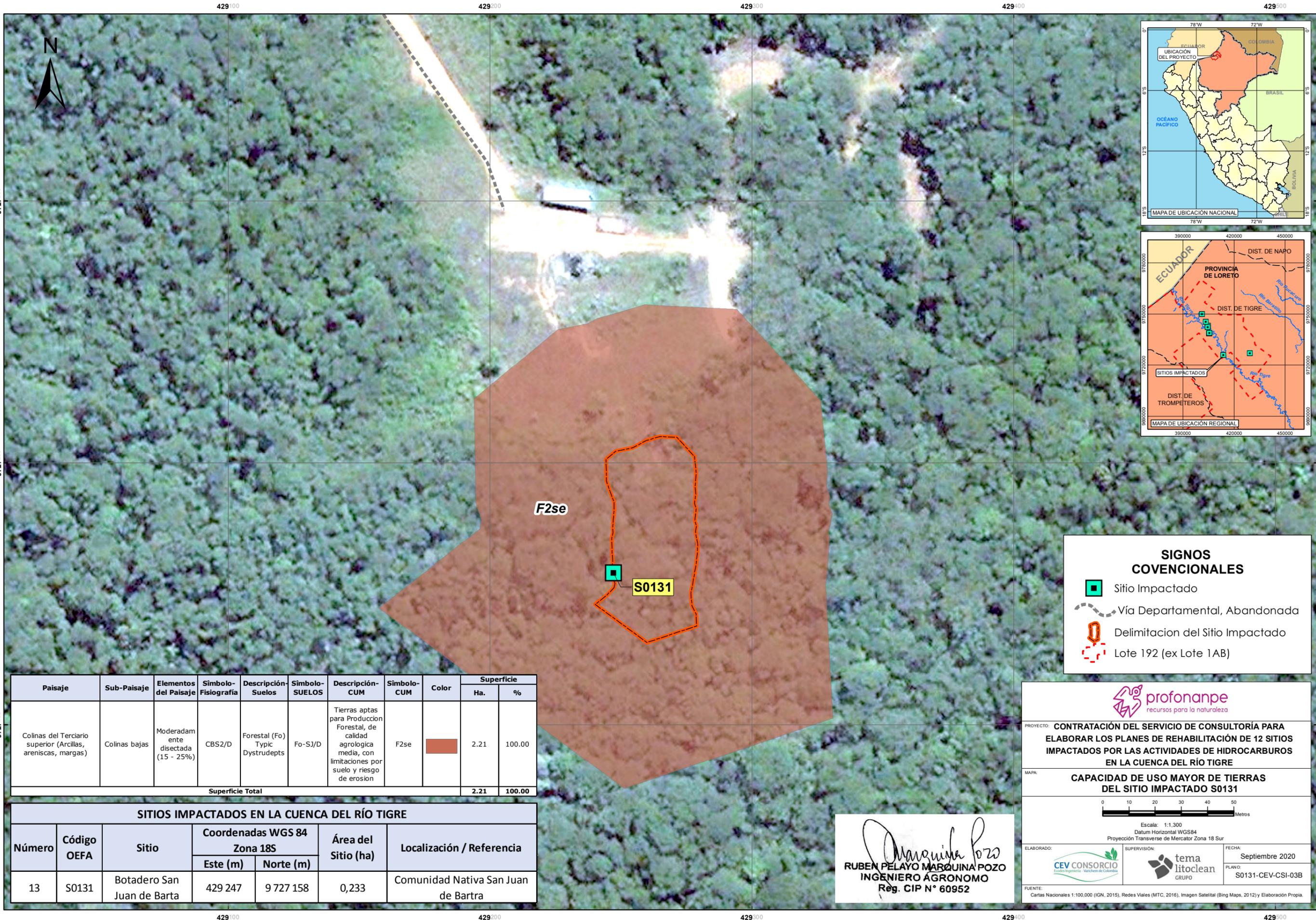
Escala: 1:500
Datum Horizontal WGS84
Proyección Transversa de Mercator Zona 18 Sur

ELABORADO: SUPERVISIÓN: FECHA: Septiembre 2020
PLANO: S0131-CEV-CSI-06B

FUENTE: Cartas Nacionales 1:100.000 (IGN, 2015), Redes Viales (MTC, 2016), ONERN (1975) y Elaboración Propia.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

Anexo MINAM Observación N° 7



SIGNOS CONVENCIONALES

- Sitio Impactado
- Vía Departamental, Abandonada
- Delimitación del Sitio Impactado
- Lote 192 (ex Lote 1AB)

Paisaje	Sub-Paisaje	Elementos del Paisaje	Símbolo-Fisiografía	Descripción-Suelos	Símbolo-SUELOS	Descripción-CUM	Símbolo-CUM	Color	Superficie	
									Ha.	%
Colinas del Terciario superior (Arcillas, areniscas, margas)	Colinas bajas	Moderadamente disectada (15 - 25%)	CBS2/D	Forestal (Fo) Typic Dystrudepts	Fo-SJ/D	Tierras aptas para Producción Forestal, de calidad agrologica media, con limitaciones por suelo y riesgo de erosion	F2se		2.21	100.00
Superficie Total									2.21	100.00

SITIOS IMPACTADOS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE						
Número	Código OEFA	Sitio	Coordenadas WGS 84 Zona 18S		Área del Sitio (ha)	Localización / Referencia
			Este (m)	Norte (m)		
13	S0131	Botadero San Juan de Barta	429 247	9 727 158	0,233	Comunidad Nativa San Juan de Bartra

profonanpe
recursos para la naturaleza

PROYECTO: **CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE CONSULTORÍA PARA ELABORAR LOS PLANES DE REHABILITACIÓN DE 12 SITIOS IMPACTADOS POR LAS ACTIVIDADES DE HIDROCARBUROS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE**

MAPA: **CAPACIDAD DE USO MAYOR DE TIERRAS DEL SITIO IMPACTADO S0131**

0 10 20 30 40 50 Metros

Escala: 1:1,300
Datum Horizontal WGS84
Proyección Transversa de Mercator Zona 18 Sur

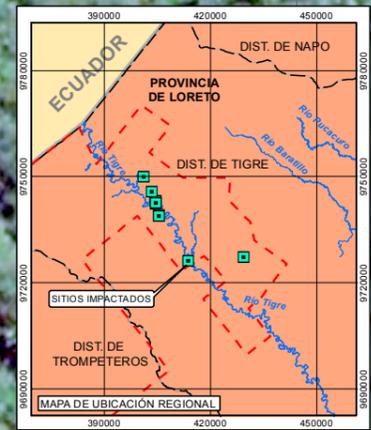
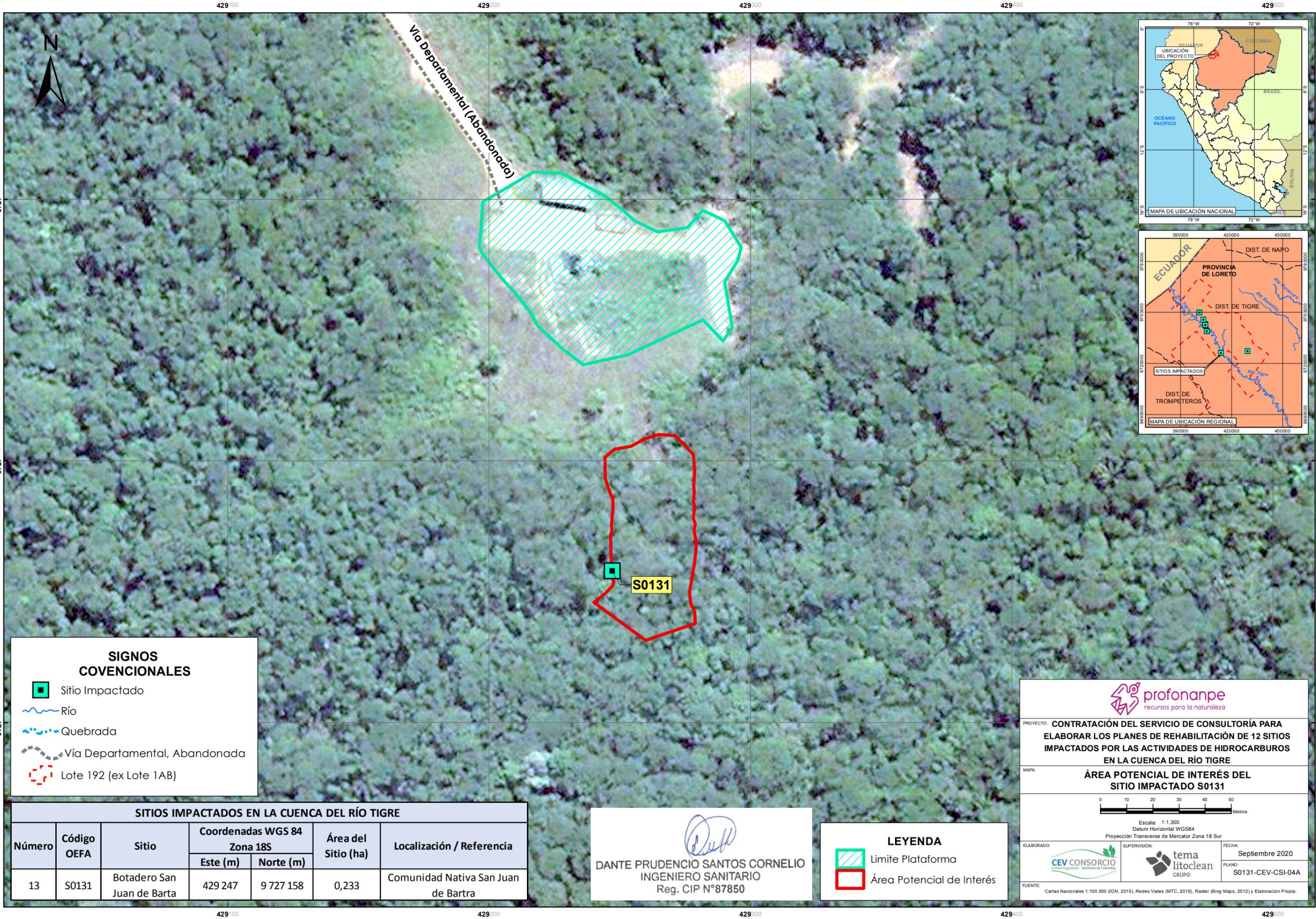
ELABORADO: 	SUPERVISIÓN: 	FECHA: Septiembre 2020
		PLANO: S0131-CEV-CSI-03B

FUENTE: Cartas Nacionales 1:100,000 (IGN, 2015), Redes Viales (MTC, 2016), Imagen Satelital (Bing Maps, 2012) y Elaboración Propia.

RUBEN PELAYO MARQUINA POZO
INGENIERO AGRÓNOMO
Reg. CIP N° 60952

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

Anexo MINAM Observación N° 16



SIGNOS CONVENCIONALES

- Sitio Impactado
- Río
- Quebrada
- Vía Departamental, Abandonada
- Lote 192 (ex Lote 1AB)

SITIOS IMPACTADOS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE						
Número	Código OEFA	Sitio	Coordenadas WGS 84 Zona 18S		Área del Sitio (ha)	Localización / Referencia
			Este (m)	Norte (m)		
13	S0131	Botadero San Juan de Barta	429 247	9 727 158	0,233	Comunidad Nativa San Juan de Bartra

DANTE PRUDENCIO SANTOS CORNELIO
 INGENIERO SANITARIO
 Reg. CIP N°87850

LEYENDA

- Limite Plataforma
- Área Potencial de Interés

PROYECTO: **CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE CONSULTORÍA PARA ELABORAR LOS PLANES DE REHABILITACIÓN DE 12 SITIOS IMPACTADOS POR LAS ACTIVIDADES DE HIDROCARBUROS EN LA CUENCA DEL RÍO TIGRE**

MAPA: **ÁREA POTENCIAL DE INTERÉS DEL SITIO IMPACTADO S0131**

Escala: 1:1,300
 Datum Horizontal WGS84
 Proyección Transversa de Mercator Zona 18 Sur

ELABORADO:	SUPERVISIÓN:	FECHA: Septiembre 2020 PLANO: S0131-CEV-CSI-04A
------------	--------------	--

FUENTE: Cartas Nacionales 1:100,000 (IGN, 2015), Redes Viales (MTC, 2016), Raster (Bing Maps, 2012) y Elaboración Propia.

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	---	---

Anexo MINAM Observación N° 38

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	--	---

Artículo Técnico

**Toxicity Assessments of Antimony, Barium, Beryllium,
and Manganese for Development of Ecological Soil
Screening Levels (Eco-SSL) Using Enchytraeid
Reproduction Benchmark Values**



EDGEWOOD

CHEMICAL BIOLOGICAL CENTER

U.S. ARMY SOLDIER AND BIOLOGICAL CHEMICAL COMMAND

ECBC-TR-324

**TOXICITY ASSESSMENTS
OF ANTIMONY, BARIUM, BERYLLIUM, AND
MANGANESE FOR DEVELOPMENT
OF ECOLOGICAL SOIL SCREENING LEVELS (ECO-SSL)
USING ENCHYTRAEID REPRODUCTION BENCHMARK VALUES**

**Roman G. Kuperman
Ronald T. Checkai
Carlton T. Phillips
Michael Simini**

RESEARCH AND TECHNOLOGY DIRECTORATE

**Jason A. Speicher
David J. Barclift**



**NAVAL FACILITIES ENGINEERING COMMAND
Lester, PA 19113-2090**

November 2002

20040422 060

Approved for public release;
distribution is unlimited.



Disclaimer

The findings in this report are not to be construed as an official Department of the Army position unless so designated by other authorizing documents.

REPORT DOCUMENTATION PAGE			Form Approved OMB No. 0704-0188	
Public reporting burden for this collection of information is estimated to average 1 hour per response, including the time for reviewing instructions, searching existing data sources, gathering and maintaining the data needed, and completing and reviewing this collection of information. Send comments regarding this burden estimate or any other aspect of this collection of information, including suggestions for reducing this burden to Department of Defense, Washington Headquarters Services, Directorate for Information Operations and Reports (0704-0188), 1215 Jefferson Davis Highway, Suite 1204, Arlington, VA 22202-4302. Respondents should be aware that notwithstanding any other provision of law, no person shall be subject to any penalty for failing to comply with a collection of information if it does not display a currently valid OMB control number. PLEASE DO NOT RETURN YOUR FORM TO THE ABOVE ADDRESS.				
1. REPORT DATE (DD-MM-YYYY) XX-11-2002		2. REPORT TYPE Final		3. DATES COVERED (From - To) Feb 2000 - Sep 2002
4. TITLE AND SUBTITLE Toxicity Assessments of Antimony, Barium, Beryllium, and Manganese for Development of Ecological Soil Screening Levels (Eco-SSL) Using Enchytraeid Reproduction Benchmark Values			5a. CONTRACT NUMBER	
			5b. GRANT NUMBER	
			5c. PROGRAM ELEMENT NUMBER 9KNM22	
6. AUTHOR(S) Kuperman, Roman G.; Checkai, Ronald T.; Phillips, Carlton, T.; Simini, Michael (ECBC); Speicher, Jason A.; and Barclift, David J. (EFANE)			5d. PROJECT NUMBER	
			5e. TASK NUMBER	
			5f. WORK UNIT NUMBER	
7. PERFORMING ORGANIZATION NAME(S) AND ADDRESS(ES) AND ADDRESS(ES) DIR, ECBC, ATTN: AMSRD-ECB-RT-TE, APG, MD 21010-5424 CO, NAVFAC, EFANE, 10 Industrial Highway, MS #82, Lester, PA 19113-2090			8. PERFORMING ORGANIZATION REPORT NUMBER ECBC-TR-324	
9. SPONSORING / MONITORING AGENCY NAME(S) AND ADDRESS(ES) CO, NAVFAC, EFANE, 10 Industrial Highway, MS #82, Lester, PA 19113-2090			10. SPONSOR/MONITOR'S ACRONYM(S)	
			11. SPONSOR/MONITOR'S REPORT NUMBER(S)	
12. DISTRIBUTION / AVAILABILITY STATEMENT Approved for public release; distribution is unlimited.				
13. SUPPLEMENTARY NOTES				
14. ABSTRACT The U.S. Environmental Protection Agency is developing Ecological Soil Screening Level (Eco-SSL) benchmarks for ecological risk assessment of contaminants at Superfund sites. Benchmarks for invertebrates were developed from existing literature. Insufficient information for Ba, Be, Mn, and Sb to generate Eco-SSLs necessitated standardized toxicity testing to fill the data gaps. We used the Enchytraeid Reproduction Test (ERT) with <i>Enchytraeus crypticus</i> in this study. This test was selected on the bases of its ability to measure chemical toxicity to ecologically relevant test species during chronic assay, and its inclusion of at least one reproductive component among the measurement endpoints. Tests were conducted in Sassafras sandy loam soil, which supports relatively high bioavailability of metals. Aging/weathering procedures for amended treatment soil were incorporated into the study to better reflect the "real world" exposure conditions. The toxicity order based on juvenile production was Be > Mn > Sb > Ba with EC ₂₀ values of 45, 116, 194, and 585 mg kg ⁻¹ , respectively. These results show that ERT is a robust and sensitive assay for toxicity assessments and is appropriate for the Eco-SSL development.				
15. SUBJECT TERMS				
Barium	Antimony	Bioavailability	Ecological Soil Screening Level	
Beryllium	Toxicity Assessment	Natural soil		
Manganese	Aging/weathering	<i>Enchytraeus crypticus</i>		
16. SECURITY CLASSIFICATION OF:			17. LIMITATION OF ABSTRACT	18. NUMBER OF PAGES
a. REPORT	b. ABSTRACT	c. THIS PAGE		
U	U	U	UL	84
			19a. NAME OF RESPONSIBLE PERSON Sandra J. Johnson	
			19b. TELEPHONE NUMBER (include area code) (410) 436-2914	

Blank

PREFACE

The work described in this report was authorized under Sales Order No. 9KNM22. The work was started in February 2000 and completed in September 2002.

The use of either trade or manufacturers' names in this report does not constitute an official endorsement of any commercial products. This report may not be cited for purposes of advertisement.

This report is approved for public release. Registered users should request additional copies from the Defense Technical Information Center; unregistered users should direct such requests to the National Technical Information Service.

Acknowledgments

This project was completed in cooperation with and from funding provided by the Engineering Field Activity Northeast (EFANE), Naval Facilities Engineering Command (Lester, PA).

The authors thank Stephen J. Ells for support and assistance, and acknowledge the Ecological Soil Screening Level National Program, administered under the auspices of the Office of Solid Waste and Emergency Response (OSWER), U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Washington, DC.

Blank

CONTENTS

1.	INTRODUCTION.....	7
2.	MATERIAL AND METHODS	8
2.1	Test Soil	8
2.2	Test Chemicals.....	8
2.3	Soil Amendment Procedures.....	9
2.4	Treatment Concentrations	9
2.4.1	Range Finding Tests.....	9
2.4.2	Definitive Tests.....	9
2.5	Aging/Weathering of Amended Soil.....	10
2.6	Chemical Extraction and Analyses	10
2.7	Toxicity Assessment	11
2.7.1	Principle of the Test.....	11
2.7.2	Validity of the Test	12
2.7.3	Culturing Conditions.....	12
2.7.4	Test Performance	12
2.8	Data Analysis	13
3.	RESULTS	14
3.1	Soil Analyses.....	14
3.2	Range Finding Tests.....	16
3.3	Definitive Tests	17
4.	DISCUSSION	19
5.	CONCLUSIONS.....	22
	LITERATURE CITED	25
	APPENDIXES	
	A - RANGE FINDING TESTS DATA	29
	B - DEFINITIVE TESTS DATA	37
	C - CONCENTRATION-RESPONSE CURVES FOR REPRODUCTION ENDPOINT DETERMINED FROM ERT USING JUVENILE PRODUCTION DATA IN AGED AMENDED SSL SOIL.....	43
	D - STATISTICAL ANALYSES OF THE DEFINITIVE TESTS DATA.....	47

TABLES

1.	Physical and chemical characteristics of Sassafras sandy loam soil analyzed by the Cooperative Extension Service, University of Maryland Soil Testing Laboratory, College Park, MD.....	8
2.	Nominal barium, beryllium, manganese, and antimony concentrations selected for definitive toxicity studies with <i>E. crypticus</i> , as determined from range finding tests	10
3.	Nominal and measured concentrations of metals in soil following a three-week aging/weathering procedure for total beryllium, manganese, barium, and antimony amended individually in SSL soil. Measured concentrations were determined using USEPA Method 200.8 and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).....	15
4.	Exchangeable manganese fractions during 18-week aging/weathering study using SSL soil amended with manganese sulfate	16
5.	Summary of soil pH data following a three-week aging/weathering procedure determined in studies of beryllium, manganese, antimony, and barium amended individually in SSL soil.....	16
6.	Ecotoxicological parameters (mg kg^{-1}) for adult <i>E. crypticus</i> survival determined in aged/weathered SSL soil independently amended with beryllium, manganese, antimony, and barium using Enchytraeid Reproduction Test	18
7.	Ecotoxicological parameters (mg kg^{-1}) for juvenile production determined in aged/weathered SSL soil independently amended with beryllium, manganese, antimony, and barium using Enchytraeid Reproduction Test; parenthetical values are 95% confidence intervals	19

TOXICITY ASSESSMENTS
OF ANTIMONY, BARIUM, BERYLLIUM, AND MANGANESE FOR DEVELOPMENT
OF ECOLOGICAL SOIL SCREENING LEVELS (ECO-SSL)
USING ENCHYTRAEID REPRODUCTION BENCHMARK VALUES

1. INTRODUCTION

The U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) is developing Ecological Soil Screening Levels (Eco-SSLs) for ecological risk assessment of contaminants at Superfund sites. Eco-SSLs are soil concentrations of chemicals which, when not exceeded, will theoretically protect terrestrial ecosystems from unacceptable harmful effects. They are derived using data generated from laboratory toxicity tests with different test organisms, which represent the vast array of ecological receptors. Whenever sufficient quantity and quality of information existed, Eco-SSLs for soil invertebrates were developed from studies reported in literature. However, insufficient information to generate Eco-SSLs for barium (Ba), beryllium (Be), Manganese, (Mn), and antimony (Sb) necessitated standardized toxicity testing to fill the data gaps.

This study was designed to produce benchmark data for the development of an Eco-SSL for Ba, Be, Mn and Sb for soil invertebrates, and meet specific criteria (USEPA, 2000), including: (1) tests were conducted in soil having physico-chemical characteristics that support relatively high bioavailability of metals; (2) experimental designs for laboratory studies were documented and appropriate; (3) both nominal and analytically determined concentrations of chemicals of interest were reported; (4) tests included both negative and positive controls; (5) chronic or life cycle tests were used; (6) appropriate chemical dosing procedures were reported; (7) concentration-response relationships were reported; (8) statistical tests used to calculate the benchmark and level of significance were described; and (9) the origin of test species were specified and appropriate.

Several soil invertebrate toxicity tests, for which standardized protocols have been developed, can effectively be used to assess the toxicity and to derive protective benchmark values for metals (Stephenson *et al.*, 2002; Løkke and Van Gestel, 1998). We used the Enchytraeid Reproduction Test in this study. This test was selected on the bases of its ability to measure chemical toxicity to ecologically relevant test species during chronic assays, and its inclusion of at least one reproductive component among the measurement endpoints.

Special consideration in assessing chemical toxicity for Eco-SSL development was given to the effects of aging/weathering of soil contaminants on the exposure of relevant ecological receptors, as commonly occurs at Superfund sites. During chemical aging/weathering in soil, reduction in the exposure to the chemical may occur due to volatilization, microbial degradation and immobilization, or other fate processes (e.g., photodecomposition, hydrolysis, and hysteresis, etc.). This can result in a dramatic reduction in the amount of chemical that is bioavailable, compared to tests conducted with freshly-amended chemicals or those tested following a short equilibration period (e.g., 24 h). Standardized methods for aging/weathering of

chemicals in soil are not available. We used the approach developed to simulate at least partially, the aging and weathering process that included exposing soils amended with chemicals to periodic alternating wetting and air-drying cycles for three weeks, in a green house.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Test Soil.

A natural soil, Sassafras sandy loam [Fine-loamy, siliceous, mesic Typic Hapludult] (SSL) was used in this study to assess the toxicity of test chemicals to *E. crypticus*. This soil was selected for developing ecotoxicological values protective of soil biota because it has physical and chemical characteristics supporting relatively high bioavailability of the test chemicals (low pH, organic matter and clay contents). The SSL soil was collected from an open grassland field on the property of the U.S. Army Aberdeen Proving Ground (APG; Edgewood, MD). Vegetation and the organic matter horizon were removed to just below the root zone and the top six inches of the A horizon were then collected. The soil was sieved through a 5mm² mesh screen, air-dried for at least 72h and mixed periodically to ensure uniform drying, passed through a 2-mm sieve, then stored at room temperature before use in testing. Soil was then analyzed for physical and chemical characteristics by the Cooperative Extension Service, University of Maryland Soil Testing Laboratory, College Park, MD. Results of these analyses are presented in Table 1.

Table 1. Physical and chemical characteristics of Sassafras sandy loam soil analyzed by the Cooperative Extension Service, University of Maryland Soil Testing Laboratory, College Park, MD.

Soil Parameter	Sassafras Sandy Loam
Sand %	71
Silt %	18
Clay %	11
Texture %	Sandy loam
CEC cmol kg ⁻¹	4.27
Organic matter %	1.2
pH	5.0

2.2 Test Chemicals.

The goal of this study was to determine the toxicity of Ba, Be, Mn, and Sb to *E. crypticus*. The assessment was done using sulfate salts, including BaSO₄ (CAS #7727-43-7, 97%; stock #13989; lot #I10J20, Alfa Aesar), BeSO₄*4H₂O (CAS #7787-56-6, 99.99%; stock #16104; lot #H09J07, Alfa Aesar), MnSO₄*H₂O (CAS #10034-96-5, ACS, 98.0-101.0%, stock

#33341; lot #I18I29, Alfa Aesar), and $\text{Sb}_2(\text{SO}_4)_3$ (CAS #7446-32-4, 97%, stock #33492; lot #L21I28, Alfa Aesar). Additional tests were done for Ba and Sb to determine how carrier salts and their relative solubilities affect the toxicity to *E. crypticus*. For Ba, these compounds including BaO (CAS #1304-28-5, 97%, lot #12101BI, Aldrich Chemical Company), $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ (CAS #10022-31-8, ACS, lot #000420, Fisher Scientific Co.), and $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (CAS #543-80-6, ACS, lot #995963, Fisher Scientific Co.). For Sb, we used antimony D-tartrate $\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS # 126506-93-2, lot #111004-2, Pfaltz & Bauer). The positive control used in this study was 4-Nitrophenol (CAS #100-02-7, 98%, lot #6623HE, Aldrich). The main carrier salt control was sulfate as $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CAS #10101-41-4, ACS, Reagent grade 100%, lot #C07704, J.T. Baker). ASTM type I water (American Society of Testing and Materials, <http://www.astm.org>) obtained using Milli-RO[®] 10 Plus followed by Milli-Q[®] PF Plus systems (Millipore[®], Bedford, MA) was used throughout the studies.

2.3 Soil Amendment Procedures.

Treatment concentrations for toxicity tests with all sulfate salts and barium oxide were prepared by adding test chemicals to SSL soil in appropriate proportions to achieve nominal target concentrations. Soil was mixed for three hours on a three dimensional rotary mixer. After mixing, soil was hydrated with ASTM type I water to 100% of the soil water holding capacity (WHC; 18% water, on a the basis of the dry soil mass) for toxicity testing, or 60% of the WHC for the aging/weathering procedure. Soil prepared for range finding toxicity tests was allowed to equilibrate for 24 hours before exposing potworms. The exception was soil amended with barium acetate, which was incubated for 5 days before exposing potworms to allow acetate degradation by soil microbes. Treatment concentrations of $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ were prepared by dissolving appropriate amounts of each chemical in ASTM type I water, then hydrating pre-weighed amounts of SSL soil to achieve target treatment concentrations in soil for each chemical, respectively, at the required moisture level.

2.4 Treatment Concentrations.

2.4.1 Range Finding Tests

Range finding tests for Ba, Be, Mn, and Sb were initially conducted using BaSO_4 , BeSO_4 , MnSO_4 , and $\text{Sb}_2(\text{SO}_4)_3$. Concentrations of Ba and Mn were 100, 500, 1000, 5000 and 10000 mg kg^{-1} . Concentrations of Be and Sb were 1, 10, 100, 500 and 1000 mg kg^{-1} . Additional range finding testing for Ba using BaO, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, and for Sb using $\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$, were done using the same concentrations as for the sulfate salts.

2.4.2 Definitive Tests

Data from the range finding tests were used to determine the respective chemical form with higher toxicity values for *E. crypticus*, and to determine treatment concentrations for definitive tests. Additional considerations in the selection of the chemical form for definitive toxicity testing was given to chemical solubility in water and the effect each chemical form had on soil pH level. Concentrations selected for definitive tests are shown in Table 2.

Table 2. Nominal barium, beryllium, manganese, and antimony concentrations selected for definitive toxicity studies with *E. crypticus*, as determined from range finding tests.

Chemical	Ba	Be	Mn	Sb
First positive concentration tested:				
1	451	10	10	100
2	597	14	18	140
3	686	20	31	196
4	789	27	54	274
5	907	38	94	384
6	1043	54	164	538
7	1200	75	287	753
8	1314	105	503	1054
9	1551			
10	1830			

Controls included positive (30 mg kg⁻¹ 4-Nitrophenol), negative (no chemical added) and sulfate (CaSO₄). Sulfate controls were based on estimated sulfate amounts in highest treatment concentrations, and were 7,000 and 35,000 mg kg⁻¹ SO₄²⁻, respectively. Four replicates were used for each treatment concentration and controls.

2.5 Aging/Weathering of Amended Soil.

All soil treatment concentrations and negative controls were subjected to simulated aging/weathering procedure, which included alternating wetting/air-drying cycles for three weeks prior to commencement of definitive tests. Aging/weathering of test soils was conducted in open plastic bags in the green house. Soil treatments were initially hydrated to 60% of water holding capacity (WHC), and then allowed to begin drying. All soil treatments were weighed and adjusted to 60% of WHC twice each week, and afterward brought to 100% of WHC (18% water, on the basis of the dry soil mass) for initiation of bioassays. A separate study was conducted using Mn as a model chemical to determine if the three-week duration of aging/weathering procedure was adequate. The duration of this study was 18 weeks. Nominal Mn treatment concentrations included 0, 10, 18, 31, 54, 94, 164, 287, and 503 mg kg⁻¹. Samples from each treatment concentration were analyzed for exchangeable Mn concentrations at three-week intervals to determine if increase in duration of aging/weathering procedure beyond three weeks affects exchangeable Mn concentrations (directly related to bioavailable Mn).

2.6 Chemical Extraction and Analyses.

Soil was analyzed for total metal concentrations following USEPA Method 200.8 (USEPA, 1994) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Additional analysis was done to determine exchangeable Mn fraction. Exchangeable Mn was extracted from

soil using 0.05M CaCl₂ with agitation on a reciprocating shaker for 24h. All reagents used in extraction of chemicals from soils were either reagent or trace metal grade, and ASTM type I water was used throughout the analytical studies. Glassware was washed with phosphate-free detergent followed by rinses with tap water, ASTM type I water, nitric acid 1% (v/v) and finally again with ASTM type I water. Analyses of exchangeable Mn concentrations were conducted using a Perkin-Elmer 5100 PC Atomic Absorption Spectrophotometer equipped with an AS-90 autosampler.

2.7 Toxicity Assessment.

The Enchytraeid Reproduction Test (ERT) was used to assess the effects of Ba, Be, Mn and Sb on the reproduction of the enchytraeid worm *Enchytraeus crypticus*. The test is an application of the ISO/CD 16387 (Draft). *Soil quality — Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) — Determination of effects on reproduction and survival (January 2001)*. The ERT is a Chronic/Life-Cycle Assay. The ISO Guideline for this assay was originally developed for use with Artificial Soil (USEPA Standard Artificial Soil), however our research showed that this test could also be conducted using natural soils (Kuperman and Simini, 1999). The ISO ERT was designed using the enchytraeid worm species *Enchytraeus albidus*. Results of our previous studies using *E. albidus* showed that this species requires soils containing high organic matter content with a soil pH 6 (±0.5) for optimal test conditions. This species performed poorly in natural soils with physical and chemical characteristics that support a higher level of metal bioavailability (Kuperman and Simini, 1999). The species of Enchytraeidae, *E. crypticus*, listed in the ISO protocol as an acceptable alternative to *E. albidus*, was selected for toxicity testing.

2.7.1 Principle of the Test

Adult *E. crypticus* are exposed to a range of concentrations of the test chemical added to soil. The test consists of two steps. They are a range finding test in which adult survival and total number of juveniles produced are assessed using few treatment concentrations (five) and reduced number of replicates (two), and a definitive test in which the same endpoints are assessed using greater number of concentrations and replicates. The duration of each test is four weeks. After the first two weeks, the adult worms are removed, counted, and any morphological changes are recorded. After an additional two-week incubation, the number of juveniles produced is counted. The number of adults and juveniles in treatment concentrations are compared to numbers in the control(s) to quantify ecotoxicological parameters. These parameters include the bounded No Observed Effect Concentration (NOEC), the bounded Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) and the effective concentration that causes a p percent reduction in juvenile numbers, i.e. EC_p (e.g. EC₂₀, EC₅₀).

2.7.2 Validity of the Test

The validity criteria are included in the test as part of the Quality Control procedures. They include the following performance parameters for the negative controls:

- (1) The adult mortality does not exceed 20% after 14 days, in the range finding and definitive tests
- (2) The average number of juveniles is higher than 25 per test container at the end of the test assuming that 10 adult worms per test container were used
- (3) The coefficient of variation for the mean number of juveniles is $\leq 50\%$ at the end of the test

2.7.3 Culturing Conditions

Enchytraeids were bred in 4.3-L clear plastic boxes (34 x 20 x 10 cm) filled with 2 kg (dry mass) SSL soil. The culture was kept in an incubator at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with continuous light. Soil moisture level was adjusted to 100% of WHC, and was maintained by periodic (once per week) mass checks and water adjustments. Soil in the breeding culture was aerated by carefully mixing it once per week.

The potworms were fed approximately twice a week with a proper amount of ground oats spread on the soil surface. If food from the previous feeding date remained on the soil surface, the amount of food given was adjusted. Every 2-3 months, the worms were transferred into a freshly prepared culture substrate.

Culturing conditions were regarded satisfactory if:

- (1) Worms did not try to leave soil
- (2) They moved quickly through the soil
- (3) They exhibited a shiny outer surface without soil particles clinging to it
- (4) They were whitish in color
- (5) Worms of different ages were present

The worm culture was considered healthy if worms reproduced continuously.

2.7.4 Test Performance

Glass test containers (42 mm ID; 45 mm deep) were rinsed with acetone, tap water, and ASTM type I water before the test. Twenty grams of prepared soil hydrated to 100% of WHC were added to each test container and 0.05 g of grounded oats were mixed with soil. The mass of each container (without lid) with soil was recorded. Each treatment and controls were replicated four times for definitive tests (two for range finding tests). Soil was allowed to equilibrate 24 hours in the range finding test. Definitive tests were conducted using soil subjected to simulated aging/weathering procedure for three weeks.

Enchytraeid adults with eggs in the clitellum region were collected from culture established in the same soil type (SSL) as soil used in the test. The selected worms were placed in a petri dish filled with a small amount of ASTM type I water for examination using a stereomicroscope. Worms with no eggs were discarded. Any invertebrates living in the cultures such as mites were also removed. Ten enchytraeid worms selected for uniformity (approximately 1 cm) were placed on top of prepared soil in each test container. Test containers were placed randomly on trays and incubated at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ with continuous light cycle. The containers were weighed once a week and the mass loss was replenished with the appropriate amount of ASTM type I water. Ground oats (0.05 g) were added to each test container at that time.

After two weeks, soil in each test container was carefully searched and adult worms were removed and counted. Worms were examined for any morphological or behavioral changes. The remaining test substrate, including any cocoons laid during the first two weeks of the test, was incubated for additional two weeks. After four weeks from the start of the test, soil in the test containers was fixed with 70% ethanol, and seven drops of Rosebengal biological stain (1% solution in ethanol) was added. Staining continued for minimum of 24 hours. The content of each test container was wet-sieved on No. 100 (150 μm) mesh and transferred to a counting tray and worms were counted. Measurement endpoints included number of surviving adults after 14 days and number of juveniles produced after 28 days.

2.8 Data Analysis.

Adult survival and reproduction data were analyzed using nonlinear regression models, described in Stephenson *et al.* (2000). Histograms of the residuals and stem-and-leaf graphs were examined to ensure that normality assumptions were met. Variances of the residuals were examined to decide whether or not to weight the data, and to select potential models. The logistic (Gompertz) model had the best fit for data in all toxicity tests. The fit of the line was closest to the data points, the variances were the smallest, and the residuals had the best appearance (i.e., most random scattering). There were the megaphone-shaped patterns in the "residual vs. concentration" graphs for Mn and Sb, suggesting potential heteroscedasticity (Appendix D). Additional analyses were done with data weighted with the inverse of the variances of each concentration. These produced no appreciable difference in the confidence intervals and only minor differences in the endpoint estimates. Based on these results the Gompertz-modeled analyses were left unweighted. The model is:

$$Y = a \times e^{([\log(1-p)] \times [C/EC_p]^b)}$$

where Y is the number of adults or juveniles produced, a is the control response, e is the base of the natural logarithm, p is the percent inhibition/100 (e.g., 0.5 for EC_{50}), C is the exposure concentration in test soil, EC_p is the estimate of effect concentration for a specified percent effect, and b is the scale parameter. The EC_p parameters used in this study included the metal concentration producing a 20% (EC_{20}) or 50% (EC_{50}) reduction in the measurement endpoint. The EC_{20} parameter based on a reproduction endpoint is the preferred parameter for deriving soil invertebrate Eco-SSL benchmarks. The EC_{50} , more commonly used in the past, and survival data

were included to enable comparisons of the results produced in this study with results reported by other researchers. The asymptotic standard error (a.s.e.) and 95% confidence intervals (CI) associated with the point estimates were determined.

Analysis of Variance (ANOVA) was used to determine the bounded No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) values for adult survival or juvenile production data (Appendix D). Mean separations were done using Fisher's Least Significant Difference (LSD) pairwise comparison tests. A significance level of $P < 0.05$ was accepted for determining the NOEC and LOEC values. When NOAEC (bounded no observed adverse effect concentration) or LOAEC (bounded lowest observed adverse effect concentration) values were determined, the same statistical methods were used. All analyses were done using measured metal concentrations. Statistical analyses were performed using SYSTAT 7.0.1 (SPSS, 1997).

3. RESULTS

3.1 Soil Analyses.

Analysis of negative control soil showed that beryllium concentration in natural SSL soil used in this study was below method detection limit (MDL) of 2.5 mg kg^{-1} . Total beryllium concentrations in the experimental treatments ranged from 95 to 124% and averaged 107% of nominal (Table 3).

The natural background manganese concentration determined in the negative control treatment was 94 mg kg^{-1} . Total extractable manganese concentrations (in excess of background) in the experimental treatments ranged from 50 to 117% and averaged 94% of nominal (Table 3). Exchangeable Mn fraction expressed as percent of total concentration increased with increasing soil Mn loads (Table 3). There were no trends within any treatment concentration in the amount of exchangeable Mn fraction beyond three weeks during the 18-week aging/weathering study (Table 4). These results confirmed that the three-week duration for simulated aging/weathering procedure used in to the definitive study design was adequate for the Eco-SSL benchmark development.

Analytical procedures for antimony determination did not confirm agreement with the nominal treatment concentrations. Total antimony treatment concentrations determined using USEPA Method 200.8 ranged from 4 to 21% and averaged 8% of nominal concentration. These results showed that this standard method was not sufficient for total Sb analysis in SSL soil. Additional effort was made in the attempt to improve the analytical procedure. Soils were digested using procedures described in SW-846 Method 3050B (USEPA, 1996). This improved the efficiency of antimony extraction, however it remained relatively low and averaged 58% of nominal concentration added to the soil. For this reason, nominal Sb concentrations were used in determining ecotoxicological parameters for antimony; however because ERA relies on the determination of chemical concentrations extracted from soil, toxicity parameters determined

from nominal concentrations may have to be adjusted to 58% of their values before determining an Sb Eco-SSL to best conservatively-correspond to the level of Sb extracted from soil at specific levels of Sb toxicity in soil.

The natural background barium concentration determined in the negative control treatment was 34 mg kg⁻¹. Total barium concentrations (in excess of background) in the experimental treatments ranged from 88 to 134% and averaged 110% of nominal (Table 3).

The SSL soil pH value of 5.29 was within the range of Eco-SSL's soil matrix of properties that support high bioavailability of cationic metals in natural soils. Soil pH generally decreased with increasing chemical loads but the decrease did not exceed one pH unit for Be, Mn, and Ba treatments (Table 5). The decrease in the highest Sb treatment was 1.2 pH unit compared with untreated SSL soil (negative control). In the sulfate control, soil pH decreased by less than 1.0 pH unit in both 7000 and 35000 mg kg⁻¹ SO₄²⁻ treatments compared with negative control.

Table 3. Nominal and measured concentrations of metals in soil following a three-week aging/weathering procedure for total beryllium, manganese, barium, and antimony amended individually in SSL soil. Measured concentrations were determined using USEPA Method 200.8 and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Beryllium			Manganese			Barium			Antimony		
Nominal mg kg ⁻¹	Measured mg kg ⁻¹	Recovery %	Nominal mg kg ⁻¹	Measured mg kg ⁻¹	Recovery %	Nominal mg kg ⁻¹	Measured mg kg ⁻¹	Recovery %	Nominal mg kg ⁻¹	Measured mg kg ⁻¹	Recovery [§] %
0	2.5*		0	94		0	34		0	2.5*	
10	12	95**	10	99	50**	451	433	88**	100	6.4	4
14	18	111	18	110	89	597	744	119	140	12	7
20	24	108	31	119	80	686	689	95	196	17	7
27	36	124	54	157	117	789	791	96	274	9.6	3
38	43	107	94	191	103	907	843	89	384	27	6
54	57	101	164	267	105	1043	1429	134	538	37	6
75	83	107	287	386	102	1200	1333	108	753	157	21
105	110	102	503	644	109	1314	1798	134	1054	135	13
						1551	2000	127			
						1830	2111	113			

* Method Detection Limit is reported when no metal amount could be determined in negative control soil.

** Percent recovery was determined after correcting metal concentration in treatment soils for the amount present in negative control soil.

§ Using USEPA Method 3050B on selected samples yielded 58% recovery, on average.

Table 4. Exchangeable manganese fractions during 18-week aging/weathering study using SSL soil amended with manganese sulfate.

Nominal Mn treatment (mg kg ⁻¹)	Exchangeable Mn fraction (% of total)						Treatment mean (% of total)
	Week 3	Week 6	Week 9	Week 12	Week 15	Week 18	
0	5.4	4.9	7.3	6.6	6.2	7.7	6.4
10	18.0	16.3	19.9	20.1	16.3	17.8	18.1
18	27.1	25.6	28.7	30.1	23.5	27.9	27.2
31	42.3	37.3	39.1	44.2	38.8	40.5	40.4
54	60.1	52.4	54.9	60.4	48.5	54.5	55.1
94	85.8	75.9	76.0	82.4	65.3	76.7	77.0
164	75.2	63.9	66.7	70.7	56.3	68.9	66.9
287	106.3	93.8	94.3	98.5	82.2	95.8	95.2
503	127.3	99.8	104.7	110.4	101.7	90.3	105.7

Table 5. Summary of soil pH data following a three-week aging/weathering procedure determined in studies of beryllium, manganese, antimony, and barium amended individually in SSL soil.

Be		Mn		Sb		Ba	
treatment	pH	treatment	pH	treatment	pH	treatment	pH
0	5.29	0	5.29	0	5.29	0	5.29
10	5.01	10	5.39	100	5.11	451	4.72
14	4.95	18	5.35	140	4.99	597	4.63
20	4.89	31	5.30	196	4.85	686	4.63
27	4.76	54	5.22	274	4.76	789	4.54
38	4.63	94	5.14	384	4.68	907	4.50
54	4.51	164	5.06	538	4.56	1043	4.48
75	4.45	287	4.96	753	4.35	1200	4.45
105	4.29	503	4.86	1054	4.08	1314	4.44
						1551	4.38
						1830	4.36

3.2 Range Finding Tests.

Range finding test for beryllium was conducted using BeSO₄*4H₂O (cold water solubility 42.5 g per 100 cc). Adult survival decreased by 58% at 100 mg kg⁻¹ and juveniles production decreased by 18% at 10 mg kg⁻¹. There was a 99.9 % reduction in juvenile numbers at the 100 mg kg⁻¹ treatment concentration. No surviving adults or juveniles were recovered in 500 and 1000 mg kg⁻¹ treatment concentrations (Appendix A). Beryllium sulfate hydrate was retained for the definitive test, using Be concentrations shown in Table 3.

Range finding test for manganese was conducted using $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Adult survival decreased by 10% at 500 mg kg^{-1} and by 95% at $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$. Juvenile production decreased by 33% at 100 mg kg^{-1} . There were no surviving adults above $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ or juveniles above the 100 mg kg^{-1} treatment concentrations (Appendix A). Manganese sulfate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was retained for the definitive test, using Mn concentrations shown in Table 3.

Range finding test for antimony was conducted using $\text{Sb}_2(\text{SO}_4)_3$ and antimony D-tartrate [$\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] to determine if a carrier salt form affects Sb toxicity to *E. crypticus*. Significant ($P = 0.001$) reduction in juvenile production at 538 mg kg^{-1} antimony D-tartrate resulted only in 18% decrease compared with negative control. Numbers of juveniles in the preceding treatment concentration of 384 mg kg^{-1} were actually 13% higher compared with negative control (Appendix A). Toxicity of antimony sulfate to *E. crypticus* juvenile production was higher compared with antimony D-tartrate (Appendix A). The reduction in juvenile production at 500 mg kg^{-1} Sb as $\text{Sb}_2(\text{SO}_4)_3$ was 62% ($P < 0.0001$). Antimony sulfate was chosen for the definitive test, using Sb concentrations shown in Table 3.

Range finding test for barium was initially conducted using BaSO_4 salt. This test showed that even at the highest concentration tested ($10,000 \text{ mg kg}^{-1}$), this form of barium is essentially insoluble in water, and did not affect adult survival after 14 days. Toxicity to juveniles after 28 days was low at the same concentration resulting only in a 36% reduction in juvenile numbers compared with control (Appendix A). Such low percent reduction in the reproductive endpoint would not have allowed ECp determination at the 50% level in the definitive test. This necessitated additional range finding tests to determine Ba toxicity to *E. crypticus* with alternative Ba forms. These tests were done using Ba forms soluble in water, including BaO , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, and $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. All three barium forms produced LOEC_{juveniles} at $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ and 100% mortality at $5,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Appendix A). Both BaO and $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ amendments increased soil pH levels beyond boundaries required by the Eco-SSL guidance for soil parameters supporting high cationic metal bioavailability. Barium oxide increased soil pH to 8.69 and barium acetate increased soil pH to 8.61 at $5,000 \text{ mg kg}^{-1}$, respectively. Soil pH in the barium nitrate test decreased to 4.12 in the $5,000 \text{ mg kg}^{-1}$ treatment. Additionally, reproductive toxicity of Ba added as $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ was higher compared with the other two Ba forms. Percent reductions from control at the $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ treatment were 83.4, 50.6, and 29.6 in $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, BaO and $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ tests, respectively. Based on the results of these range finding tests barium nitrate was selected for the definitive test using Ba concentrations shown in Table 3.

3.3 Definitive Tests.

Test results complied with the validity criteria defined in the test guideline. Mean adult survival in negative controls ranged from 97.5 to 100%. The mean juvenile production in negative controls ranged from 735 to 1104 juveniles, and the coefficient of variation ranged from 6 to 18%. Sulfate control treatments showed no statistically significant ($P > 0.05$) effect on adult survival and reproductive measurement endpoints compared with negative controls. Soil pH decreased by less than 1.0 pH unit in both 7000 and 35000 mg kg^{-1} SO_4^{2-} treatments compared with negative control. These results confirmed that the toxicological effects determined in the

definitive tests were most likely due to test metal concentrations. Direct comparisons of the results of positive control are not possible because ERT is a new test and no reference values are available from the literature. Limited information available from our earlier studies of 4-nitrophenol with different enchytraeid species, *E. albidus*, in USEPA/OECD standard artificial soil was used as a reference for comparisons. Juvenile production in positive control was within the range of previous study resulting in 66% reduction from negative control.

Definitive tests with aged/weathered SSL soil using the Enchytraeid Reproduction Tests were conducted to assess the effects of Ba, Be, Mn, or Sb on the reproduction of the enchytraeid worm *E. crypticus*. Adult *E. crypticus* were exposed in SSL soil to a range of concentrations for each metal, in independent investigations. Measurement endpoints were assessed using 8-10 treatment concentrations determined from the range-finding studies and included number of surviving adults after 14 days and number of juveniles after 28 days. All ecotoxicological parameters for Ba, Be, and Mn were estimated using measured chemical concentrations for each treatment level. Ecotoxicological parameters for Sb were estimated using nominal concentrations.

Results showed that Be did not affect ($P = 0.174$) adult *E. crypticus* survival up to 83 mg kg^{-1} treatment concentration (Table 6). Adult survival in this definitive test was significantly ($P < 0.0001$) reduced at 110 mg kg^{-1} (LOEC). The bounded NOEC for juvenile production was 43 mg kg^{-1} ($P = 0.06$). The bounded LOEC for juvenile production was 57 mg kg^{-1} ($P < 0.0001$). The juvenile production EC_{20} and EC_{50} values for Be were, respectively 45 and 52 mg kg^{-1} (Table 7; Figure C 1, Appendixes C, D).

Table 6. Ecotoxicological parameters (mg kg^{-1}) for adult *E. crypticus* survival determined in aged/weathered SSL soil independently amended with beryllium, manganese, antimony, and barium using Enchytraeid Reproduction Test.

Endpoint	Beryllium	Manganese	Antimony*	Barium
NOEC	83	191	384	1798
LOEC	110	267	538	2000

* Parameters determined using nominal concentrations of Sb in soil.

Manganese did not affect ($P = 0.721$) adult *E. crypticus* survival up to 191 mg kg^{-1} concentration. Adult survival was reduced by 5% ($P = 0.48$) at 267 mg kg^{-1} (Table 6). Juvenile numbers were significantly ($P < 0.0001$) higher in the 99 mg kg^{-1} treatment compared to negative control suggesting the hormetic effect of Mn on reproduction at this exposure level. The bounded No Observed Adverse Effect Concentration (NOAEC) for juvenile production was 157 mg kg^{-1} ($P = 0.52$). The bounded Lowest Observed Adverse Effect Concentration (LOAEC) for juvenile production was 191 mg kg^{-1} ($P < 0.0001$) (Table 7). No juveniles were produced in 644 mg kg^{-1} treatment (Appendix B). The hormetic effect at the 99 mg kg^{-1} concentration level suggested the use of the hormetic model to estimate EC_p parameters for Mn data. This model

produced EC₅₀ and EC₂₀ estimates, but the fit was not good and the value for the hormetic component of the model seemed extreme. In addition, the variance was very large and the residuals distinctly displayed a pattern. Varying the parameters in the hormetic model did not improve the fit. Based on these results the Gompertz-modeled analysis was accepted for Mn data (Figure C 2, Appendixes C, D). The juvenile production EC₂₀ and EC₅₀ values for Mn were 116 and 192 mg kg⁻¹, respectively (Table 7).

Antimony did not affect ($P = 0.407$) adult *E. crypticus* survival up to 384 mg kg⁻¹ concentration. Adult survival was reduced by 50% ($P < 0.0001$) at 538 mg kg⁻¹ (Table 6). The bounded NOEC for juvenile production was 100 mg kg⁻¹ ($P = 0.69$). The bounded LOEC for juvenile production was 140 mg kg⁻¹ ($P = 0.027$). The juvenile production EC₂₀ and EC₅₀ values for Sb were 194 and 316 mg kg⁻¹, respectively (Table 7; Figure C 3, Appendixes C, D).

Barium did not significantly affect ($P = 0.467$) adult *E. crypticus* survival up to 1798 mg kg⁻¹ concentration. Adult survival was reduced by 20% ($P = 0.006$) at 2000 mg kg⁻¹ (Table 6). The bounded NOEC for juvenile production was 433 mg kg⁻¹ ($P = 0.597$). The bounded LOEC for juvenile production was 689 mg kg⁻¹ ($P = 0.031$). The juvenile production EC₂₀ and EC₅₀ values for Ba were, respectively 585 and 947 mg kg⁻¹ (Table 7; Figure C 4, Appendixes C, D).

Table 7. Ecotoxicological parameters (mg kg⁻¹) for juvenile production determined in aged/weathered SSL soil independently amended with beryllium, manganese, antimony, and barium using Enchytraeid Reproduction Test; parenthetical values are 95% confidence intervals.

Endpoint	Beryllium	Manganese	Antimony*	Barium
NOAEC	43	157	100	433
LOAEC	57	191	140	689
EC ₂₀	45 (42-49)	116 (56-176)	194 (155-234)	585 (447-722)
EC ₅₀	52 (50-54)	192 (147-238)	316 (285-347)	947 (830-1064)

* Parameters determined using nominal concentrations of Sb in soil.

4. DISCUSSION

Development of screening level benchmarks for Ecological Risk Assessment (ERA) of contaminated soils has become a critical need in recent years (USEPA, 2000). To address this problem, the USEPA in conjunction with stakeholders is developing Eco-SSLs to identify concentrations of chemicals in soil that, when not exceeded, theoretically protective of terrestrial ecosystems within specific soil boundary conditions from unacceptable harmful effects. An extensive review of literature (USEPA, 2000) determined that there was insufficient information for beryllium, manganese, antimony, and barium to generate Eco-SSL benchmarks for soil invertebrates. Our toxicity studies were designed to specifically fill this knowledge gap.

The majority of soil toxicity tests that were reported in literature used standard artificial soil with high organic matter content (10%) and near neutral pH. In contrast, we selected SSL soil to meet the criteria for Eco-SSL development, in large part because it has characteristics supporting relatively high bioavailability of cationic metals. In addition, our aging/weathering procedure of the soils loaded with the range of metal concentrations allowed us to more realistically assess the toxicity under conditions more closely resembling the potential toxic effects of beryllium, manganese, antimony, and barium in the field.

Definitive toxicity tests conducted with aged/weathered soils amended with test chemicals showed that chemical toxicity order based on EC_{20} for juveniles production in tests with *E. crypticus* was $Be > Mn > Sb > Ba$ (Table 7). However because ERA relies on the determination of soil concentrations extracted from soil, Sb toxicity parameters determined from nominal concentrations may have to be adjusted to 58% of their values before determining an Sb Eco-SSL to best conservatively-correspond to the level of Sb extracted from soil at specific levels of Sb toxicity in soil. If the EC_{20} for juveniles production is adjusted by 58% to account for reduced extractability, the toxicity order for *E. crypticus* becomes $Be > Mn = Sb > Ba$. Reproductive endpoints in all tests were more sensitive compared with adult survival (Tables 6, 7). This supports the Eco-SSL requirement of the use of reproductive endpoints for benchmark development. Because this study was designed to produce benchmark data to be used in the development of Eco-SSLs for beryllium, manganese, antimony, and barium for soil invertebrates, the test conditions and the resulting data had to meet specific criteria (USEPA, 2000). Thus results from these studies may not directly compare to those of other studies in the literature, since none of them were designed to specifically quantify metal toxicity to soil invertebrates under Eco-SSL conditions of testing using soils that support relatively high bioavailability of cationic metals.

Beryllium is one of the least studied metals regarding its effects on soil invertebrates, although it is considered one of the problem metals of the future (Newland, 1982). It is a component of various fossil fuel types and is increasingly used in aircraft industry, space research, nuclear energy development (Ireland, 1986), X-ray tube, windows manufacturing, and in production of non-sparking tools composed of copper-beryllium alloy (Thorat *et al.*, 2001). Be concentrations in Aberdeen Proving Ground (APG) soil (including contaminated sites) in the areas adjacent to soil collection ranged from 0.3 to 1.4 mg kg⁻¹ (Hlohowskyj *et al.*, 1999). Extensive toxicological studies of Be exposure effects in humans and experimental animals have established that it can cause pulmonary and systemic granulomatous disease known as chronic beryllium disease (Sprince and Kazami, 1980), necrosis and tumors in animals (Witschi, 1971), can inhibit certain enzymes, including alkaline phosphatase (Reiner, 1971), and can inhibit plant and animal growth (Newland, 1982). Ireland (1986) reported increased mortality and growth suppression in a terrestrial snail *Achatina fulica* (Pulmonata) fed 10 µg ml⁻¹ Be in the diet containing the sub-optimal calcium concentrations. Beryllium was the most toxic metal among the four chemicals tested in our study, and the estimated ecotoxicological parameters for *E. crypticus* are the first in the available literature for a soil invertebrate species.

Natural manganese concentration in SSL soil of 94 mg kg^{-1} was within the range of Mn concentrations reported for soils (including contaminated sites) at the Aberdeen Proving Ground, which ranged from 4.9 to 1140 mg kg^{-1} (Hlohowskyj *et al.*, 1999). Manganese is a required nutrient essential for plants and animals. Manganese was the most previously investigated of the four metals in this study, however none of the previous studies involved invertebrate exposures in natural soils. Reinecke and Reinecke (1996) reported reduction in growth and development (measured as time needed for clitellum development) of *E. fetida* fed with cattle manure spiked with Mn at 151.7 mg kg^{-1} . This value falls within the effect concentrations range of 20-50% reduction in reproductive endpoint determined in our study. In a later study, Reinecke and Reinecke (1997) reported damage to spermatozoan structure from treatments containing food spiked with Mn at 61.57 mg kg^{-1} . Nottrot *et al.* (1987) reported no effect on feeding activity and growth of collembolan *Orchesella cincta* fed with green algae spiked with up to $25 \mu\text{mol Mn g}^{-1}$ dry mass, however that study was conducted on dental plaster. Joosse *et al.* (1983) reported no effect on respiration of woodlice fed with litter containing Mn at 1000 mg kg^{-1} on a porous tile. There was no soil exposure incorporated in that study.

Few studies have investigated antimony concentrations in soil (Cal-Prieto *et al.*, 2001; Crecelius *et al.*, 1974; Kabata-Pendias and Pendias, 1992; van der Voet and de Wolff, 1996). Reported concentrations ranged from 0.17 mg kg^{-1} in organic soils in Norway to 1489 mg kg^{-1} in vicinity of an Sb smelter in northeast England (Ainsworth and Cooke, 1991), and these corresponded with treatment concentrations used in our study. Antimony concentrations in soil (including contaminated sites) at the Aberdeen Proving Ground in the areas adjacent to the location where the SSL soil was collected ranged from 0.1 to 501 mg kg^{-1} (Hlohowskyj *et al.*, 1999). No information could be found in the available literature on ecotoxicological effects of antimony to soil invertebrates. Developing such information is especially important since input to the soil ecosystems was estimated at 26000 t y^{-1} of Sb (Cal-Prieto *et al.*, 2001). This anthropogenic contribution of antimony is 10-fold higher compared with the Sb emissions from natural sources (ca. 2600 t y^{-1}) reported by Nriagu (1990). Limited data for soil biota was reported by Rafel and Popov (1988) as part of a validation effort for developing the USSR maximum allowable concentrations of antimony in soil. These authors reported 23-52% reduction in seed germination and 26-62% reduction in root growth at 1002 mg kg^{-1} Sb in tests with barley, wheat, radish, pees, and onion. Decrease in ammonia mineralization and nitrate accumulation was observed at Sb concentrations of 52 and 102 mg kg^{-1} in their study. Other measures of soil biological activity were also affected, including decrease in soil enzyme catalase activity and stimulation of soil respiration at $102 \text{ mg Sb kg}^{-1}$ (Rafel and Popov, 1988).

Difficulties encountered with the efficiency of extraction of Sb that is aged/weathered in soil prior to analytical determination, using natural SSL amended with antimony, may be symptomatic of a larger problem regarding chemical characterization data during ERA activities at contaminated sites. Low Sb recovery rates using standard USEPA methods suggest that true concentrations of this metal will be underestimated during site characterization efforts. The recovery rates of 8 and 58 percent determined for Sb aged/weathered in soil in our study, using USEPA methods 200.8 and 3050B, respectively were below recovery rates of 70 and 88 percent previously reported for freshly amended soils. This

clearly indicates that USEPA method 3050B appears better suited to extract aged/weathered Sb from soil at Superfund and other contaminated sites, and this potential discrepancy in extractability should be corrected for at the time of compilation of a list of contaminants of potential ecological concern (COPEC) in the screening phase of ERA. To use the ecotoxicological parameters from this study, which are based on nominal Sb values, it is recommended that these nominal Sb values be adjusted to 58% of nominal to account for the aging/weathering of Sb in soil (i.e., adjusted to 58% of nominal prior to determining the Eco-SSL). Aging/weathering of Sb in soils typically occurs even more extensively in the field, but simulated aging/weathering provides a conservative estimate of what might otherwise be extractable from field soils. This is especially important given a steep slope of the concentration-response curve for reproductive endpoint determined from the Enchytraeid Reproduction Test in our study (Figure C 3, Appendix C), which establishes a narrow toxicity threshold range from 194 to 316 mg kg⁻¹ (nominal) based on EC₂₀ and EC₅₀ estimates (Table 6). The 39 percent difference between these two estimates is within the potential recovery error rate of analytical methods used. Disregarding this potential error, especially without adjustment of the Eco-SSL for aging/weathering, can otherwise lead to a removal of antimony from the COPEC list while its extracted concentrations represent field concentrations toxic to relevant ecological receptors. Adjustment of the values of the ecotoxicological parameters determined from nominal concentrations, prior to determination of the Eco-SSL, is properly left to those evaluating benchmarks for Eco-SSL development; however, in these studies an adjustment to 58% of nominal corresponds to the mean recovery rate following three weeks of aging/weathering of Sb in soil.

Natural barium concentration in SSL soil of 34 mg kg⁻¹ was within the Ba concentrations found in soils (including contaminated sites) at the Aberdeen Proving Ground, which ranged from 9.8 to 1580 mg kg⁻¹ (Hlohowskyj *et al.*, 1999). Limited barium ecotoxicological information for soil invertebrates is available from literature. Grace (1990) investigated oral toxicity of barium metaborate to the Eastern Subterranean Termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) in no-choice assays by feeding termite workers for 15 days on filter papers treated with concentrations of 500-40,00 mg kg⁻¹ (356-28,472 mg Ba kg⁻¹, recalculated by Kuperman). Results of this study comport with result of the adult survival (14 days) portion of our definitive test. Grace (1990) reported 19% mortality in 1780 mg Ba kg⁻¹ treatment, which was comparable with 20% adult mortality at 2000 mg Ba kg⁻¹ treatment observed in our investigation. However, direct comparisons of feeding assays results with soil exposure studies using different species should be treated with caution.

5. CONCLUSIONS

This study has produced ecotoxicological data for beryllium, manganese, antimony, and barium using ecologically relevant soil invertebrate species *E. crypticus*. Relative toxicity of the four metals tested in this study was Be > Mn > Sb > Ba. When the EC₂₀ for juveniles production is adjusted by 58% to account for reduced extractability of Sb after three weeks of aging/weathering in soil, the toxicity order for *E. crypticus* becomes Be > Mn = Sb > Ba. It is strongly recommended that the nominal Sb benchmark values from this study be

adjusted to 58% of nominal. To account for the aging/weathering of Sb in soil (i.e., adjusted to 58% of nominal prior to determining the Eco-SSL). Study results showed that tests based on reproductive endpoint provide a more sensitive evaluation of effect than adult survival and therefore should be used to set screening criteria. These tests were performed using a natural soil, Sassafras sandy loam. Sassafras sandy loam has relatively low pH, low organic matter, low cation exchange capacity, and high sand content. Such characteristics support relatively high bioavailability of cationic metals in soil. Furthermore, aging and weathering of the amended soil produced a soil microenvironment more similar to field conditions than previous studies where soil invertebrates were exposed immediately following amendment of soil. These study results will be provided to the Ecological Soil Screening Level (Eco-SSL) workgroup for review. Results will undergo quality control review by the Eco-SSL task group before inclusion in the Eco-SSL database, and before being used for developing Ecological Soil Screening Levels (Eco-SSLs) for Be, Mn, Sb, and Ba.

Blank

LITERATURE CITED

- Ainsworth, N. and Cooke, J.A. (1991). Biological significance of antimony in contaminated grassland. *Water, Air, and Soil Pollution* 57-58, 193-199.
- Cal-Prieto, M.J., Carlosena, A., Andrade, J.M., Martínez, M.L., Muniategui, S., López-Mahía, P. and Prada, D. (2001). Antimony as a tracer of the anthropogenic influence on soils and estuarine sediments. *Water, Air, and Soil Pollution* 129, 333-348.
- Crecelius, E.A., Johnson, C.J. and Hofer, G.C. (1974). Contamination of soils near a copper smelter by arsenic, antimony and lead. *Water, Air, and Soil Pollution* 3, 337-342.
- Grace, J.K. (1990). Oral toxicity of barium metaborate to the Eastern Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Entomol. Sci.* 25 (1), 112-116.
- Hlohowskyj, I., Hayse, J., Kuperman, R. and Van Lonkhuyzen, R. (1999). *Remedial Investigation Report for J-Field, Aberdeen Proving Ground, Maryland. Volume 3: Ecological Risk Assessment.* ANL/EAD/TM-81. Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, November 1999.
- Ireland, M.P. (1986). Studies on the effects of dietary beryllium at two different calcium concentrations in *Achatina fulica* (Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, No. 2, 435-438.
- ISO (International Standardization Organization) (2001). *Soil Quality – Effects of Pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Determinations of effects on reproduction and survival.* ISO CD 16387 (Draft).
- Joose, E.N.G., van Capelleveen, H.E., van Dalen, L.H. and van Diggelen, J. (1983). Effects of zinc, iron and manganese on soil arthropods associated with decomposition processes. In: T.D. Lekkas (ed.), *Heavy metals in the environment*, Volume 1, CEP, Edinburgh, pp. 467-470.
- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1992). *Trace Elements in Soils and Plants*, CRC Press Inc., Florida.
- Kuperman, R., Simini, M., Phillips, C. and Checkai, R. (1999). Comparison of malathion toxicity using enchytraeid reproduction test and earthworm toxicity test in different soil types. *Pedobiologia* 43, 630-634.
- Løkke, H. and Van Gestel, C.A.M. (1998). *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests.* John Wiley & Sons.
- Newland, L.W. (1982). Arsenic, beryllium, selenium and vanadium. In: *The Handbook of Environmental Chemistry* (Hutzinger, O., ed.), Vol. 3, Part B, pp. 27-67. Springer, Berlin.

Nottrot, F., Joosse, E.N.G., van Straalen, N.M. (1987). Sublethal effects of iron and manganese soil pollution on *Orchella cincta* (Collembola). *Pedobiologia* 30, 45-53.

Nriagu, J.O. (1990). Global metal pollution: poisoning the biosphere? *Environment* 32, 7, 6-11, 28-33.

Rafel, Yu, and Popov, Yu, (1988). Validation of maximum allowable concentrations of antimony in soil. *Gigiena i Sanitariya* 1, 63-64 (in Russian).

Reinecke, S.A. and Reinecke, A.J. (1997). The influence of lead and manganese on spermatozoa of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Soil. Biol. Biochem.* 2, 737-742.

Reinecke, A.J. and Reinecke, S.A. (1996). The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Pedobiologia* 40, 439-448.

Reiner, E. (1971). Binding of beryllium to proteins. In: *Mechanisms of Toxicity* (Aldridge, W.N., ed.), pp. 111-125. MacMillan, London.

Sprince, N.L. and Kazami, H. (1980). U.S. Beryllium Case Registry through 1977. *Environmental Research* 21, 44-47.

Statistical Package for the Social Sciences (1997). *SYSTAT® 7.01*. for Windows. Chicago, IL, USA.

Stephenson, G.L., Kuperman, R.G., Linder, G. and Visser, S. 2002. The Use of Single Species Tests for Assessing the Potential Toxicity of Site Soils and Groundwater. Pp. 25-43. In: *Environmental analysis of contaminated sites: Toxicological Methods and Approaches*. (Sunahara, G., Renoux, A., Thellen, C., Gaudet, C. and Pilon, A. eds.). John Wiley and Sons, Ltd.

Stephenson, G.L., Koper, N., Atkinson, G.F., Solomon, K.R., and Scroggins, R.P. (2000). Use of nonlinear regression techniques for describing concentration-response relationships of plant species exposed to contaminated site soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2968-2981.

Thorat, D.D., Mahadevan, T.N., Ghosh, D.K. and Narayan, S. (2001). Beryllium concentrations in ambient air and its source identification. *Environmental Monitoring and Assessment* 69, 49-61.

USEPA (2000). *Ecological Soil Screening Level Guidance*. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Emergency and Remedial Response. Washington, DC July 10, 2000.

USEPA (1996). Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. In: *Method 3050B, SW-846 Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods*, 3rd Ed., U.S. Environmental Protection Agency.

USEPA (1994). Method 200.8. Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry. In: *Methods for the Determination of Metals in Environmental Samples- Supplement 1*. EPA-600/R-94-111, U.S. Environmental Protection Agency. May 1994

van der Voet, G.B. and de Wolff, F.A. (1996). Human exposure to lithium, thallium, Sb, gold, and platinum. In: *Toxicology of metals* (Chang, L., Magos, L. and Suzuki, T., eds.). CRC Press, U.S.A.

Witschi, H.P. (1971). Liver cell injury by beryllium. In: *Mechanisms of Toxicity* (Aldridge, W.N., ed.), pp. 129-145. MacMillan, London.

Blank

APPENDIX A

RANGE FINDING TESTS DATA

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Be [BeSO₄]

Start Date: 21-Apr-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Be (mg/kg)	Rep	Adults 5/5/00	MEAN S.E.	Juveniles 5/19/00	MEAN S.E.	Reduction %
0	1	10	9.5	721	722.5	0
0	2	9	0.3	704	10.4	
0	3	9		752		
0	4	10		713		
1	1	10	10	845	705	2.4
1	2	10	0	565	140	
10	1	9	9.5	596	590.5	18.3
10	2	10	0.5	585	5.5	
100	1	8	4	2	1	99.9
100	2	0	4	0	1	
500	1	0		0		100
500	2	0		0		
1000	1	0		0		100
1000	2	0		0		

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Mn [MnSO₄]

Start Date: 21-Apr-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Mn (mg/kg)	Rep	Adults 5/5/00	MEAN S.E.	Juveniles 5/19/00	MEAN S.E.	Reduction %
0	1	10	9.5	721	722.5	0
0	2	9	0.29	704	10.43	
0	3	9		752		
0	4	10		713		
100	1	10	9.5	503	486	32.73
100	2	9	0.50	469	17.00	
500	1	7	8.5	0		100
500	2	10	1.50	0		
1000	1	0	0.5	0		100
1000	2	1	0.50	0		
5000	1	0		0		100
5000	2	0		0		
10000	1	0		0		100
10000	2	0		0		

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Sb [Sb-d-tartrate]

Start Date: 18-Jan-01

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Sb (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	Adults	Juveniles	MEAN
			2/1/01	2/15/01	S.E.
0	1	96.4	10	962	976.75
0	2	95.1	10	950	13.59
0	3	100.5	10	1012	
0	4	97.8	9	983	
274	1	95.7	10	1109	1084.25
274	2	95.8	10	1095	39.63
274	3	95.8	10	973	
274	4	95.2	10	1160	
384	1	97.8	10	1112	1105.25
384	2	100.2	10	1103	7.30
384	3	98	10	1086	
384	4	97.9	10	1120	
538	1	101.6	10	884	801.75
538	2	97.3	10	771	28.31
538	3	94.9	10	759	
538	4	95.8	10	793	

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Sb [Sb₂(SO₄)₃]

Start Date: 20-Apr-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Sb (mg/kg)	Rep	Adults 5/4/00	MEAN S.E.	Juveniles 5/18/00	MEAN S.E.	Reduction %
0	1	10	9.5	721	722.5	0
0	2	9	0.29	704	10.43	
0	3	9		752		
0	4	10		713		
1	1	7	8.5	642	728	-0.76
1	2	10	1.50	814	86.00	
10	1	10	10	604	649	10.17
10	2	10	0	694	45.00	
100	1	10	10	615	667	7.68
100	2	10	0	719	52.00	
500	1	9	8.5	341	274	62.08
500	2	8	0.50	207	67.00	
1000	1	4	4	0	0	100
1000	2	4	0	0	0	

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Ba [BaSO₄]

Start Date: 20-Apr-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Ba (mg/kg)	Rep	Adults 5/4/00	MEAN S.E.	Juveniles 5/18/00	MEAN S.E.	Reduction %
0	1	10	9.5	721	722.5	0
0	2	9	0.3	704	10.4	
0	3	9		752		
0	4	10		713		
100	1	9	9.5	705	690	4.5
100	2	10	0.5	675	15	
500	1	8	8.5	435	513.5	28.9
500	2	9	0.5	592	78.5	
1000	1	9	8.5	360	443	38.7
1000	2	8	0.5	526	83	
5000	1	9	9.5	515	563.5	22.0
5000	2	10	0.5	612	48.5	
10000	1	10	9	484	462.5	36.0
10000	2	8	1	441	21.5	

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Ba [BaO]

Start Date: 27-Jun-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Ba (mg/kg)	Rep	Adults 7-11-00	MEAN S.E.	Juveniles 7-25-00	MEAN S.E.	Reduction %
0	1	10	9.75	679	702.25	0
0	2	10	0.25	712	30.01	
0	3	9		638		
0	4	10		780		
100	1	10	10	612	621.5	11.50
100	2	10	0	631	9.5	
500	1	10	9	887	730.5	-4.02
500	2	8	1	574	156.5	
1000	1	1	1	385	347	50.59
1000	2	1	0	309	38	
5000	1	0	0	0	0	100
5000	2	0	0	0	0	
10000	1	0	0	0	0	100
10000	2	0	0	0	0	

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Ba [Ba(NO₃)₂]

Start Date: 27-Sep-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Ba (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	10/11/00		10/25/00	
			Mean	S.E.	Mean	S.E.
0	1	91.22	10	10	1275	1261.5
0	2	91.82	10	0	1248	13.5
100	1	96.7	10	10	1530	1598.5
100	2	90.5	10	0	1667	68.5
500	1	90.31	10	9.5	1310	1159.5
500	2	95.47	9	0.5	1009	150.5
1000	1	90.63	10	10	276	209
1000	2	96.48	10	0	142	67
5000	1	91.12	0		0	
5000	2	90.3	0		0	
10000	1	90.83	0		0	
10000	2	92.76	0		0	

Range-finding invertebrate assays

Fresh SSL soil

Compound: Ba [Ba(C₂H₃O₂)₂]

Start Date: 2-Oct-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Ba (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	10-16-00		10-30-00		Mean Reduction	
			Adults	Juveniles	S.E.	%		
0	1	91.75	10	859	893		0	
0	2	91.04	10	927	34			
100	1	91	10	1026	948.5		-6.22	
100	2	91.12	9	871	77.5			
500	1	96.48	10	922	990		-10.86	
500	2	90.62	9	1058	68			
1000	1	90.75	10	545	629		29.56	
1000	2	96.42	8	713	84			
5000	1	95.52	0	0	0		100	
5000	2	90.97	0	0	0			
10000	1	96.02	0	0	0		100	
10000	2	93.25	0	0	0			

APPENDIX B
DEFINITIVE TESTS DATA

Definitive invertebrate assays

Aged SSL soil

Compound: Be [BeSO₄]

Start Date: 20-Oct-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Be (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	11/3 Adults	Mean S.E.	11/17 Juveniles	Mean S.E.
0	1	93.01	10	10	1112	1104.3
0	2	96.36	10	0	1149	43.069
0	3	91.6	10		1175	
0	4	92.78	10		981	
10	1	90.83	10	10	1166	1051.5
10	2	92.27	10	0	906	54.216
10	3	90.97	10		1083	
10	4	91.53	10		1051	
14	1	95.91	10	9.75	1164	1117.3
14	2	96.84	10	0.25	1339	90.133
14	3	96.05	10		1054	
14	4	90.99	9		912	
20	1	90.22	10	10	1208	1102.5
20	2	90.85	10	0	979	64.888
20	3	90.9	10		1002	
20	4	91.47	10		1221	
27	1	90.83	10	10	1095	1077.8
27	2	92.7	10	0	1174	37.172
27	3	96.59	10		1038	
27	4	96.06	10		1004	
38	1	90.78	10	10	1018	946.5
38	2	90.63	10	0	1129	77.039
38	3	91.19	10		803	
38	4	91.47	10		836	
54	1	92.87	10	10	233	244.5
54	2	90.28	10	0	146	68.27
54	3	90.67	10		441	
54	4	92.47	10		158	
75	1	90.74	10	9	12	9
75	2	92.85	9	0.71	9	2.12
75	3	91.18	10		12	
75	4	92.51	7		3	
105	1	97.05	8	4.5	1	1.25
105	2	91.1	5	1.32	0	0.95
105	3	92.92	2		4	
105	4	91.59	3		0	

Definitive invertebrate assays

Aged SSL soil

Compound: Mn [MnSO₄]

Start Date: 5-Jul-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Mn (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	Adults 7-19-00	MEAN S.E.	Juveniles 8-2-00	MEAN S.E.
0	1	96.7	9	9.75	759	735.3
0	2	93	10	0.25	672	21.11
0	3	90.8	10		754	
0	4	92.8	10		756	
10	1	90.3	10	9.5	1097	965
10	2	90.3	10	0.5	1021	75.82
10	3	96.4	10		995	
10	4	95.2	8		747	
18	1	95	9	9.5	684	727.3
18	2	90.3	9	0.29	662	41.17
18	3	95.3	10		717	
18	4	89.9	10		846	
31	1	92.5	10	9.75	649	669.3
31	2	90.3	10	0.25	627	22.38
31	3	90.1	9		670	
31	4	95.5	10		731	
54	1	95.8	10	10	638	700.3
54	2	90.6	10	0	693	24.02
54	3	90.8	10		752	
54	4	90.7	10		718	
94	1	95.1	10	9.5	481	417.5
94	2	91.1	9	0.29	397	47.81
94	3	96.8	10		501	
94	4	90.7	9		291	
164	1	90.2	9	9.25	136	236.5
164	2	90.6	10	0.25	313	41.03
164	3	90.7	9		293	
164	4	90.1	9		204	
287	1	90.7	7	5	33	32.5
287	2	96.9	2	1.22	14.00	8.25
287	3	90.8	4		29	
287	4	92.5	7		54	
503	1	96.5	1	0.25	0	
503	2	90.8	0	0.25	0	
503	3	90.7	0		0	
503	4	90.6	0		0	

Definitive invertebrate assays

Aged SSL soil

Compound: Sb [Sb₂(SO₄)₃]

Start Date: 6-Jul-00

Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Sb (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	Adults 7-20-00	MEAN Juveniles	
				MEAN S.E.	MEAN S.E.
0	1	96.7	9	9.75	759 735.3
0	2	93	10	0.25	672 21.11
0	3	90.8	10		754
0	4	92.8	10		756
100	1	92.8	9	9.5	675 755
100	2	96.44	10	0.29	753 29.09
100	3	97.15	9		782
100	4	90.62	10		810
140	1	96.31	10	9.25	634 621
140	2	90.21	9	0.25	629 31.43
140	3	90.92	9		535
140	4	92.84	9		686
196	1	95.46	9	9.5	561 579
196	2	95.59	9	0.29	593 15.38
196	3	97.05	10		547
196	4	90.89	10		615
274	1	96.03	10	9.5	586 470
274	2	92.84	10	0.50	399 74.52
274	3	92.26	8		294
274	4	92.66	10		601
384	1	91.16	10	8.75	362 254
384	2	92.54	8	0.48	147 47.04
384	3	90.67	8		295
384	4	97.14	9		212
538	1	93.18	6	5	22 52.75
538	2	93.17	7	1.35	85 20.79
538	3	90.81	1		12
538	4	97.16	6		92
753	1	90.49	0	4.75	1 15.25
753	2	92.9	7	1.65	9 7.98
753	3	90.65	5		13
753	4	93.27	7		38
1054	1	96.89	0	1	4 1.5
1054	2	91.26	0	1.00	1 0.87
1054	3	91.15	4		1
1054	4	92.72	0		0

Definitive invertebrate assays

Aged SSL soil

Compound: Ba [Ba(NO₃)₂]

Start Date: 21-Nov-00

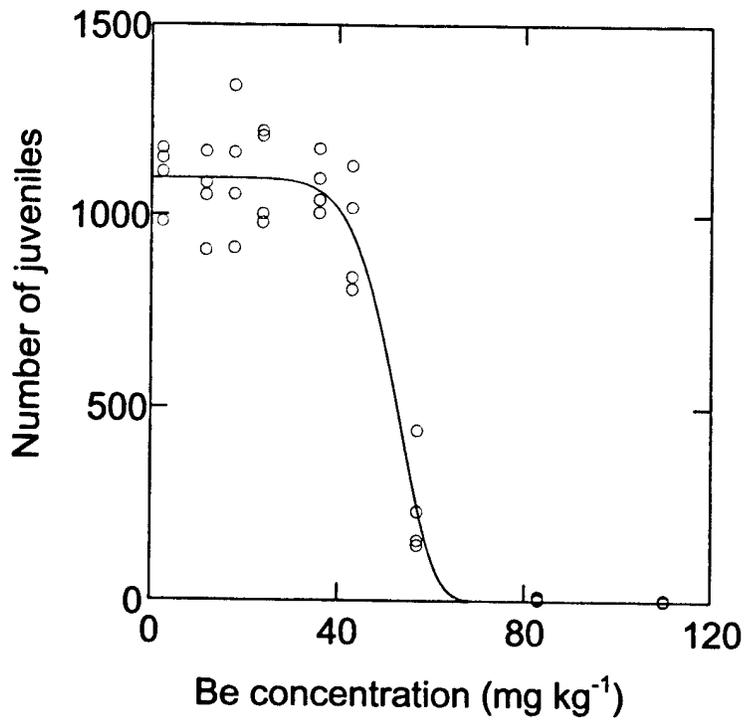
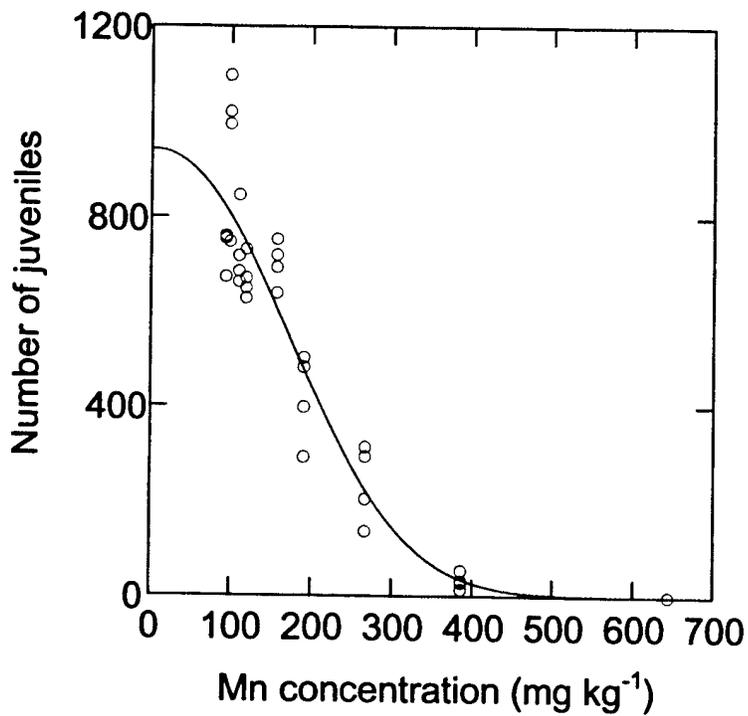
Invertebrate: *E. crypticus*

Nominal Ba (mg/kg)	Rep	Initial container mass (g)	12/5 Adults	Mean S.E.	12/19 Juveniles	Mean S.E.
0	1	94.22	10	10	1166	951.5
0	2	94.92	10	0	752	87.44
0	3	94.11	10		998	
0	4	93.01	10		890	
451	1	94.35	10	10	958	913.5
451	2	92.17	10	0	912	32.9
451	3	96.89	10		963	
451	4	98.42	10		821	
597	1	92.31	10	10	1020	843
597	2	91.79	10	0	925	78.05
597	3	98.51	10		741	
597	4	97.43	10		686	
686	1	98.12	10	10	896	790.8
686	2	92.08	10	0	681	60.23
686	3	97.31	10		894	
686	4	92.31	10		692	
789	1	94.67	10	9.5	795	560.5
789	2	92.71	9	0.29	512	80.42
789	3	97.39	9		506	
789	4	92.45	10		429	
907	1	91.77	10	9.75	470	392.8
907	2	92.59	10	0.25	301	36.98
907	3	98.26	10		369	
907	4	92.25	9		431	
1043	1	96.66	10	10	238	244
1043	2	91.75	10	0	261	9.772
1043	3	94.29	10		258	
1043	4	92.73	10		219	
1200	1	91.74	9	9.25	88	159.3
1200	2	92.17	9	0.25	182	26.63
1200	3	92.51	10		213	
1200	4	92.57	9		154	
1314	1	96.51	10	9.5	157	86.25
1314	2	102.37	9	0.29	35	27.57
1314	3	95.65	10		51	
1314	4	96.95	9		102	
1551	1	101.29	9	8	27	17
1551	2	95.5	7	0.91	21	4.397

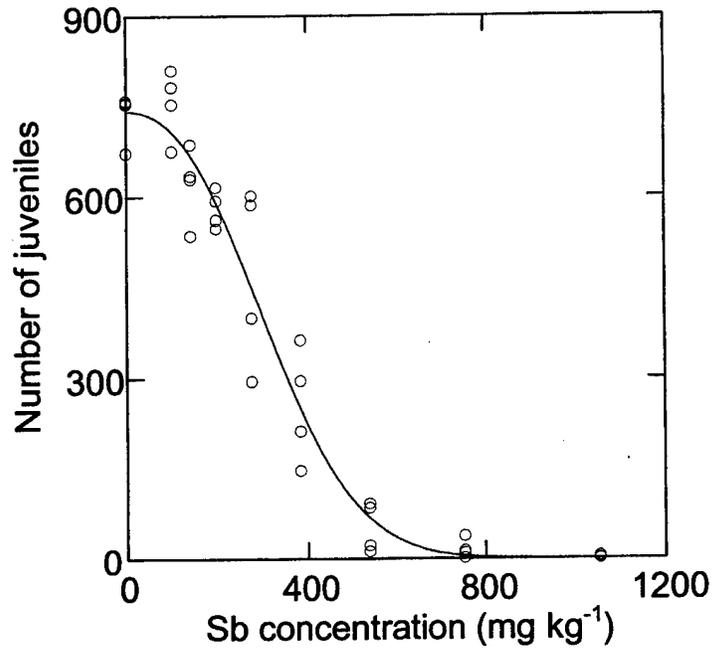
1551	3	96.33	6		7
1551	4	97.94	10		13
1830	1	97.44	5	6.5	11 8.75
1830	2	101.56	5	1.19	17 3.276
1830	3	97.11	6		3
1830	4	96.44	10		4

APPENDIX C

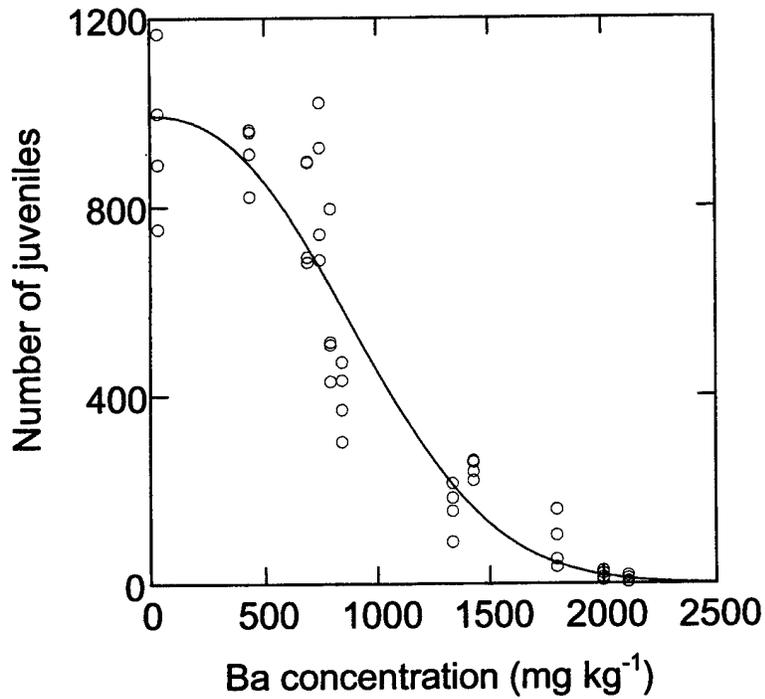
**CONCENTRATION-RESPONSE CURVES FOR REPRODUCTION ENDPOINT
DETERMINED FROM ERT USING JUVENILE PRODUCTION DATA
IN AGED AMENDED SSL SOIL**

C 1. Effect of beryllium on *E. crypticus* juvenile production.C 2. Effect of manganese on *E. crypticus* juvenile production.

C 3. Effect of antimony on *E. crypticus* juvenile production.



C 4. Effect of barium on *E. crypticus* juvenile production.



Blank

APPENDIX D
STATISTICAL ANALYSES OF THE DEFINITIVE TESTS DATA

SYSTAT VERSION 7.0.1
COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

Welcome to SYSTAT!

EC₅₀ determination for Be effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

MODEL:
nonlin
print=long
model juveniles=g*exp((log(1-.5))*(concentr/x)^b)
save
c:\Docume-1\rgkuperm\MyDocu-1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBE50 /
resid
estimate/ start = 1100, 40, 2 iter=200

36 cases have been saved into a SYSTAT file

Iteration				
No.	Loss	G	X	B
0	.233815D+07	.110000D+04	.400000D+02	.200000D+01
1	.125614D+07	.983256D+03	.607419D+02	.373687D+01
2	.707919D+06	.113273D+04	.476012D+02	.407977D+01
3	.441396D+06	.107003D+04	.531308D+02	.664166D+01
4	.362585D+06	.109485D+04	.516959D+02	.841714D+01
5	.361045D+06	.109652D+04	.519856D+02	.841232D+01
6	.361045D+06	.109652D+04	.519858D+02	.841631D+01
7	.361045D+06	.109652D+04	.519857D+02	.841614D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	2.76125E+07	3	9204157.081
Residual	361044.758	33	10940.750
Total	2.79735E+07	36	
Mean corrected	8292462.556	35	

Raw R-square (1-Residual/Total)	=	0.987
Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected)	=	0.956
R(observed vs predicted) square	=	0.956

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%	Upper
G	1096.517	25.298	43.344	1045.048	1147.987
X	51.986	1.064	48.855	49.821	54.151
B	8.416	1.539	5.467	5.284	11.548

Case	JUVENILES		Residual
	Observed	Predicted	
1	1112.000	1096.517	15.483
2	1149.000	1096.517	52.483
3	1175.000	1096.517	78.483
4	981.000	1096.517	-115.517
5	1166.000	1096.514	69.486
6	906.000	1096.514	-190.514
7	1083.000	1096.514	-13.514
8	1051.000	1096.514	-45.514
9	1164.000	1096.416	67.584

10	1339.000	1096.416	242.584
11	1054.000	1096.416	-42.416
12	912.000	1096.416	-184.416
13	1208.000	1095.381	112.619
14	979.000	1095.381	-116.381
15	1002.000	1095.381	-93.381
16	1221.000	1095.381	125.619
17	1095.000	1062.557	32.443
18	1174.000	1062.557	111.443
19	1038.000	1062.557	-24.557
20	1004.000	1062.557	-58.557
21	1018.000	952.935	65.065
22	1129.000	952.935	176.065
23	803.000	952.935	-149.935
24	836.000	952.935	-116.935
25	233.000	243.565	-10.565
26	146.000	243.565	-97.565
27	441.000	243.565	197.435
28	158.000	243.565	-85.565
29	12.000	0.000	12.000
30	9.000	0.000	9.000
31	12.000	0.000	12.000
32	3.000	0.000	3.000
33	1.000	0.000	1.000
34	0.0	0.000	0.000
35	4.000	0.000	4.000
36	0.0	0.000	0.000

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.449	1.000	
B	-0.455	0.600	1.000

Residuals have been saved.
Residuals have been saved.

EC₂₀ determination for Be effect on E. crypticus using Gompertz model.

MODEL:

```

nonlin
print=long
model juveniles=g*exp((log(1-.2))*(concentr/x)^b)
save
c:\Docume-1\rgkuperm\MyDocu-1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBE20n /
resid
estimate/ start = 1100, 40, 2 iter=200
    
```

Iteration No.	Loss	G	X	B
0	.220852D+07	.110000D+04	.400000D+02	.200000D+01
1	.100630D+07	.115691D+04	.311839D+02	.261898D+01
2	.968446D+06	.104284D+04	.472301D+02	.478036D+01
3	.591771D+06	.112268D+04	.382929D+02	.509404D+01
4	.411737D+06	.108543D+04	.453549D+02	.711621D+01
5	.361131D+06	.109566D+04	.455155D+02	.842984D+01
6	.361045D+06	.109652D+04	.454342D+02	.841464D+01
7	.361045D+06	.109652D+04	.454357D+02	.841621D+01

8 .361045D+06 .109652D+04 .454356D+02 .841614D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	2.76125E+07	3	9204157.081
Residual	361044.758	33	10940.750
Total	2.79735E+07	36	
Mean corrected	8292462.556	35	

Raw R-square (1-Residual/Total) = 0.987
 Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected) = 0.956
 R(observed vs predicted) square = 0.956

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%>	Upper
G	1096.517	25.298	43.344	1045.048	1147.987
X	45.436	1.835	24.765	41.703	49.168
B	8.416	1.539	5.467	5.284	11.548

Case	JUVENILES		Residual
	Observed	Predicted	
1	1112.000	1096.517	15.483
2	1149.000	1096.517	52.483
3	1175.000	1096.517	78.483
4	981.000	1096.517	-115.517
5	1166.000	1096.514	69.486
6	906.000	1096.514	-190.514
7	1083.000	1096.514	-13.514
8	1051.000	1096.514	-45.514
9	1164.000	1096.416	67.584
10	1339.000	1096.416	242.584
11	1054.000	1096.416	-42.416
12	912.000	1096.416	-184.416
13	1208.000	1095.381	112.619
14	979.000	1095.381	-116.381
15	1002.000	1095.381	-93.381
16	1221.000	1095.381	125.619
17	1095.000	1062.557	32.443
18	1174.000	1062.557	111.443
19	1038.000	1062.557	-24.557
20	1004.000	1062.557	-58.557
21	1018.000	952.935	65.065
22	1129.000	952.935	176.065
23	803.000	952.935	-149.935
24	836.000	952.935	-116.935
25	233.000	243.565	-10.565
26	146.000	243.565	-97.565
27	441.000	243.565	197.435
28	158.000	243.565	-85.565
29	12.000	0.000	12.000
30	9.000	0.000	9.000
31	12.000	0.000	12.000
32	3.000	0.000	3.000
33	1.000	0.000	1.000
34	0.0	0.000	0.000
35	4.000	0.000	4.000
36	0.0	0.000	0.000

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.505	1.000	
B	-0.455	0.914	1.000

Residuals have been saved.

SYSTAT Rectangular file

c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\ \nonlinre\ \navy\ert\models\reBE20n
.SYD,

contains variables:

JUVENILES	CONCENTR	ESTIMATE	RESIDUAL
-----------	----------	----------	----------

RESIDUALS MODEL:

graph

use

c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\ \nonlinre\ \navy\ert\models\reBE20n

plot residual*concentr

plot residual*estimate

Stem and Leaf Plot of variable: RESIDUAL, N = 36

Minimum:	-190.514
Lower hinge:	-72.061
Median:	2.000
Upper hinge:	66.324
Maximum:	242.584

-1	98
-1	4111
-0 H	9985
-0	4421100
0 M	00001113
0 H	56667
1	112
1	79 .
2	4

	RESIDUAL
N of cases	36
Minimum	-190.514
Maximum	242.584
Mean	1.179
Std. Error	16.926
Standard Dev	101.559
Variance	10314.134

ANOVA for juveniles

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)

2.5, 12, 18, 24, 36, 43, 57, 83, 110

Dep Var: JUVENILES N: 36 Multiple R: 0.979 Squared multiple R: 0.958

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	7943123.556	8	992890.444	76.739	0.000
Error	349339.000	27	12938.481		

Durbin-Watson D Statistic 2.569

First Order Autocorrelation -0.285

COL/

ROW CONCENTR

1	2.5
2	12
3	18
4	24
5	36
6	43
7	57
8	83
9	110

Using least squares means.

Post Hoc test of JUVENILES

Using model MSE of 12938.481 with 27 df.

Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	-52.750	0.0			
3	13.000	65.750	0.0		
4	-1.750	51.000	-14.750	0.0	
5	-26.500	26.250	-39.500	-24.750	0.0
6	-157.750	-105.000	-170.750	-156.000	-131.250
7	-859.750	-807.000	-872.750	-858.000	-833.250
8	-1095.250	-1042.500	-1108.250	-1093.500	-1068.750
9	-1103.000	-1050.250	-1116.000	-1101.250	-1076.500
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	-702.000	0.0			
8	-937.500	-235.500	0.0		
9	-945.250	-243.250	-7.750	0.0	

Fisher's Least-Significant-Difference Test.
Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.517	1.000			
3	0.873	0.421	1.000		
4	0.983	0.531	0.856	1.000	
5	0.744	0.747	0.627	0.761	1.000
6	0.060	0.203	0.043	0.063	0.114
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	0.000	1.000			
8	0.000	0.007	1.000		
9	0.000	0.005	0.924	1.000	

ANOVA for adults.

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)
2.5, 12, 18, 24, 36, 43, 57, 83, 110

Dep Var: ADULTS N: 36 Multiple R: 0.889 Squared multiple R: 0.791

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	105.000	8	13.125	12.770	0.000
Error	27.750	27	1.028		

Durbin-Watson D Statistic 2.266

First Order Autocorrelation -0.173

COL/

ROW CONCENTR

1 2.5
2 12
3 18
4 24
5 36
6 43
7 57
8 83
9 110

Using least squares means.

Post Hoc test of ADULTS

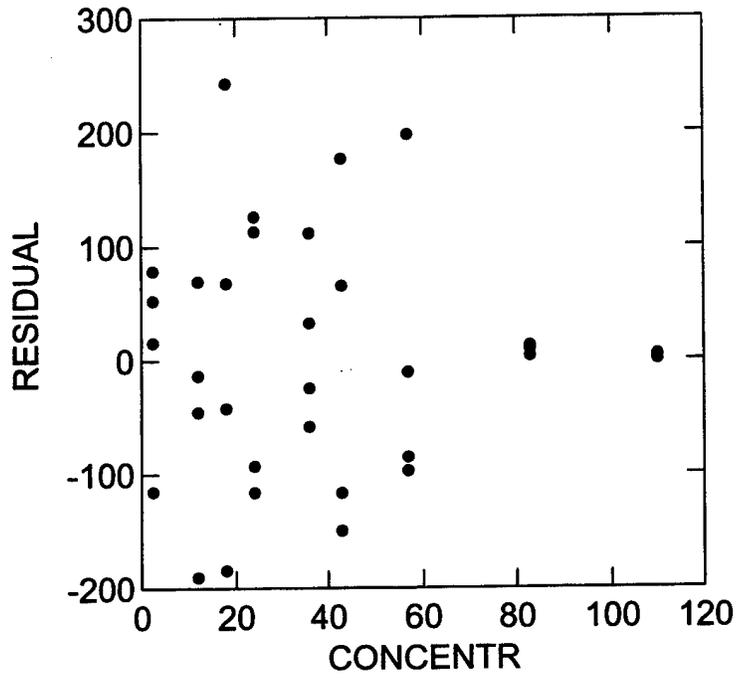
 Using model MSE of 1.028 with 27 df.
 Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	0.000	0.0			
3	-0.250	-0.250	0.0		
4	0.000	0.0	0.250	0.0	
5	0.000	0.0	0.250	0.0	0.0
6	0.000	0.0	0.250	0.0	0.0
7	0.000	0.0	0.250	0.0	0.0
8	-1.000	-1.000	-0.750	-1.000	-1.000
9	-5.500	-5.500	-5.250	-5.500	-5.500
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	0.0	0.0			
8	-1.000	-1.000	0.0		
9	-5.500	-5.500	-4.500	0.0	

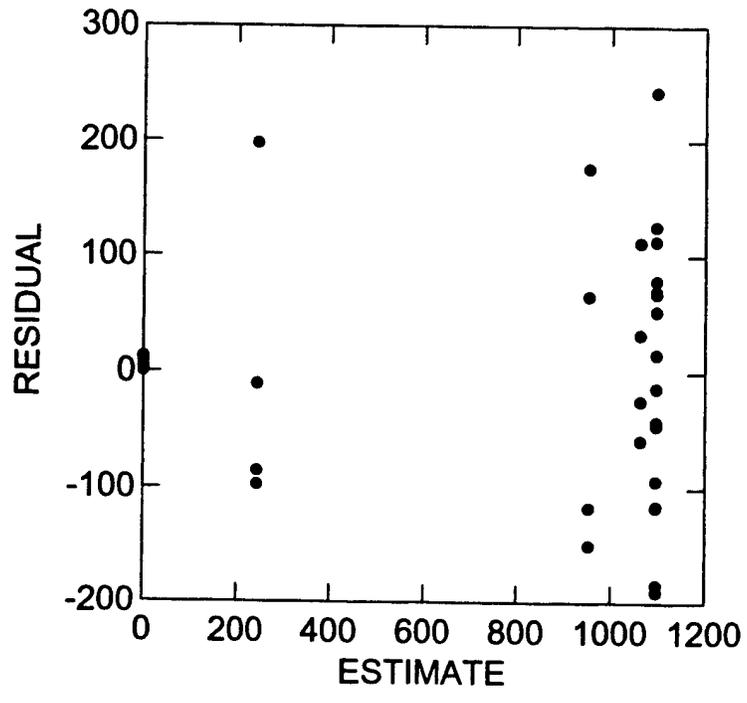
Fisher's Least-Significant-Difference Test.
 Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	1.000	1.000			
3	0.730	0.730	1.000		
4	1.000	1.000	0.730	1.000	
5	1.000	1.000	0.730	1.000	1.000
6	1.000	1.000	0.730	1.000	1.000
7	1.000	1.000	0.730	1.000	1.000
8	0.174	0.174	0.305	0.174	0.174
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	1.000	1.000			
8	0.174	0.174	1.000		
9	0.000	0.000	0.000	1.000	

Residuals for beryllium.



Residuals for beryllium.



SYSTAT VERSION 7.0.1
 COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

Welcome to SYSTAT!

EC₅₀ determination for Mn effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

SYSTAT Rectangular file
 C:\DOCUME-1\RGKUPERM\MYDOCU-1\SYSTAT\ROMAN3\NONLINRE\NAVY\ERT\DATA\MNSDANEW.
 SYD,
 contains variables:

JUVENILES CONCENTR

Iteration

No.	Loss	G	X	B
0	.559258D+07	.700000D+03	.100000D+03	.200000D+01
1	.305280D+07	.103502D+04	.809053D+02	.901236D+00
2	.301590D+07	.714606D+03	.134369D+03	.122146D+01
3	.112391D+07	.619380D+03	.302422D+03	.275802D+01
4	.102054D+07	.766991D+03	.218266D+03	.147993D+01
5	.638838D+06	.930454D+03	.171675D+03	.154953D+01
6	.381747D+06	.896718D+03	.205888D+03	.222469D+01
7	.366625D+06	.946253D+03	.190418D+03	.219337D+01
8	.366075D+06	.941904D+03	.192547D+03	.223653D+01
9	.366075D+06	.942280D+03	.192479D+03	.223580D+01
10	.366075D+06	.942276D+03	.192480D+03	.223583D+01
11	.366075D+06	.942276D+03	.192480D+03	.223583D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	1.24710E+07	3	4156989.043
Residual	366074.870	33	11093.178
Total	1.28370E+07	36	
Mean corrected	3902921.000	35	

Raw R-square (1-Residual/Total) = 0.971
 Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected) = 0.906
 R(observed vs predicted) square = 0.906

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%>	Upper
G	942.276	117.981	7.987	702.241	1182.310
X	192.480	22.479	8.563	146.746	238.214
B	2.236	0.643	3.480	0.929	3.543

Case	JUVENILES	JUVENILES	Residual
	Observed	Predicted	
1	759.000	819.497	-60.497
2	672.000	819.497	-147.497
3	754.000	819.497	-65.497
4	756.000	819.497	-63.497
5	1097.000	805.562	291.438

6	1021.000	805.562	215.438
7	995.000	805.562	189.438
8	747.000	805.562	-58.562
9	684.000	772.707	-88.707
10	662.000	772.707	-110.707
11	717.000	772.707	-55.707
12	846.000	772.707	73.293
13	649.000	743.792	-94.792
14	627.000	743.792	-116.792
15	670.000	743.792	-73.792
16	731.000	743.792	-12.792
17	638.000	607.146	30.854
18	693.000	607.146	85.854
19	752.000	607.146	144.854
20	718.000	607.146	110.854
21	481.000	476.758	4.242
22	397.000	476.758	-79.758
23	501.000	476.758	24.242
24	291.000	476.758	-185.758
25	136.000	223.079	-87.079
26	313.000	223.079	89.921
27	293.000	223.079	69.921
28	204.000	223.079	-19.079
29	33.000	35.290	-2.290
30	14.000	35.290	-21.290
31	29.000	35.290	-6.290
32	54.000	35.290	18.710
33	0.0	0.031	-0.031
34	0.0	0.031	-0.031
35	0.0	0.031	-0.031
36	0.0	0.031	-0.031

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.943	1.000	
B	-0.927	0.856	1.000

Residuals have been saved.

SYSTAT Rectangular file
 c:\Docume-1\rgkuperm\MyDocu-1\systat\roman3\ \nonlinre\ \navy\ert\models\resMn50
 .SYD,

contains variables:

JUVENILES	CONCENTR	ESTIMATE	RESIDUAL
-----------	----------	----------	----------

Stem and Leaf Plot of variable: RESIDUAL, N = 36
 Minimum: -185.758
 Lower hinge: -69.644
 Median: -4.290
 Upper hinge: 50.387
 Maximum: 291.438

```

-1 8
-1 411
-0 H 9887766655
-0 M 211000000
 0 M 0123
 0 H 6788
 1 14
 1 8
 2 1
* * * Outside Values * * *
 2 9

```

	RESIDUAL
N of cases	36
Minimum	-185.758
Maximum	291.438
Mean	-0.040
Std. Error	17.045
Standard Dev	102.271
Variance	10459.280

EC₂₀ determination for Mn effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

Iteration

No.	Loss	G	X	B
0	.711361D+07	.700000D+03	.490000D+02	.200000D+01
1	.618281D+07	.902002D+03	.335404D+02	.143387D+01
2	.381836D+07	.141525D+04	.662866D+01	.642051D+00
3	.380141D+07	.135601D+04	.758002D+01	.661399D+00
4	.377875D+07	.130350D+04	.858887D+01	.680595D+00
5	.375140D+07	.125682D+04	.965010D+01	.699617D+00
6	.372022D+07	.121519D+04	.107584D+02	.718451D+00
7	.368593D+07	.117794D+04	.119086D+02	.737083D+00
8	.364915D+07	.114451D+04	.130953D+02	.755505D+00
9	.361038D+07	.111444D+04	.143135D+02	.773709D+00
10	.357006D+07	.108729D+04	.155585D+02	.791692D+00
11	.354357D+07	.964517D+03	.218936D+02	.880484D+00
12	.341518D+07	.885479D+03	.287133D+02	.966831D+00
13	.327682D+07	.682300D+03	.560622D+02	.129431D+01
14	.106814D+07	.616562D+03	.185842D+03	.287100D+01
15	.768567D+06	.760705D+03	.120754D+03	.188895D+01
16	.432874D+06	.986246D+03	.951375D+02	.197507D+01
17	.370064D+06	.926436D+03	.115542D+03	.220970D+01
18	.366075D+06	.942343D+03	.115927D+03	.223563D+01
19	.366075D+06	.942275D+03	.115938D+03	.223583D+01
20	.366075D+06	.942276D+03	.115938D+03	.223583D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	1.24710E+07	3	4156989.043
Residual	366074.870	33	11093.178
Total	1.28370E+07	36	
Mean corrected	3902921.000	35	

Raw R-square (1-Residual/Total) = 0.971
 Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected) = 0.906
 R(observed vs predicted) square = 0.906

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%	Upper
G	942.276	117.981	7.987	702.241	1182.310
X	115.938	29.326	3.953	56.273	175.602
B	2.236	0.643	3.480	0.929	3.543

Case	JUVENILES		Residual
	Observed	Predicted	
1	759.000	819.497	-60.497
2	672.000	819.497	-147.497
3	754.000	819.497	-65.497
4	756.000	819.497	-63.497
5	1097.000	805.562	291.438
6	1021.000	805.562	215.438
7	995.000	805.562	189.438
8	747.000	805.562	-58.562
9	684.000	772.707	-88.707
10	662.000	772.707	-110.707
11	717.000	772.707	-55.707
12	846.000	772.707	73.293
13	649.000	743.792	-94.792
14	627.000	743.792	-116.792
15	670.000	743.792	-73.792
16	731.000	743.792	-12.792
17	638.000	607.146	30.854
18	693.000	607.146	85.854
19	752.000	607.146	144.854
20	718.000	607.146	110.854
21	481.000	476.758	4.242
22	397.000	476.758	-79.758
23	501.000	476.758	24.242
24	291.000	476.758	-185.758
25	136.000	223.079	-87.079
26	313.000	223.079	89.921
27	293.000	223.079	69.921
28	204.000	223.079	-19.079
29	33.000	35.290	-2.290
30	14.000	35.290	-21.290
31	29.000	35.290	-6.290
32	54.000	35.290	18.710
33	0.0	0.031	-0.031
34	0.0	0.031	-0.031
35	0.0	0.031	-0.031
36	0.0	0.031	-0.031

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.969	1.000	
B	-0.927	0.971	1.000

Residuals have been saved.

ANOVA for Juveniles

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)
94, 99, 110, 119, 157, 191, 267, 386, 644

Dep Var: JUVENILES N: 36 Multiple R: 0.980 Squared multiple R: 0.960

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	3746881.000	8	468360.125	81.042	0.000
Error	156040.000	27	5779.259		

Durbin-Watson D Statistic 1.928
First Order Autocorrelation 0.034

COL/
ROW CONCENTR
1 94
2 99
3 110
4 119
5 157
6 191
7 267
8 386
9 644

Using least squares means.
Post Hoc test of JUVENILES

Using model MSE of 5779.259 with 27 df.
Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	229.750	0.0			
3	-8.000	-237.750	0.0		
4	-66.000	-295.750	-58.000	0.0	
5	-35.000	-264.750	-27.000	31.000	0.0
6	-317.750	-547.500	-309.750	-251.750	-282.750
7	-498.750	-728.500	-490.750	-432.750	-463.750
8	-702.750	-932.500	-694.750	-636.750	-667.750
9	-735.250	-965.000	-727.250	-669.250	-700.250
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	-181.000	0.0			
8	-385.000	-204.000	0.0		
9	-417.500	-236.500	-32.500	0.0	

Fisher's Least-Significant-Difference Test.
 Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.000	1.000			
3	0.883	0.000	1.000		
4	0.230	0.000	0.290	1.000	
5	0.520	0.000	0.620	0.569	1.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	0.002	1.000			
8	0.000	0.001	1.000		
9	0.000	0.000	0.550	1.000	

ANOVA for Adults

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)
 94, 99, 110, 119, 157, 191, 267, 386, 644

Dep Var: ADULTS N: 36 Multiple R: 0.965 Squared multiple R: 0.931

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	349.889	8	43.736	45.418	0.000
Error	26.000	27	0.963		

Durbin-Watson D Statistic 2.313

First Order Autocorrelation -0.168

COL/

ROW CONCENTR

- 1 94
- 2 99
- 3 110
- 4 119
- 5 157
- 6 191
- 7 267
- 8 386
- 9 644

Using least squares means.
Post Hoc test of ADULTS

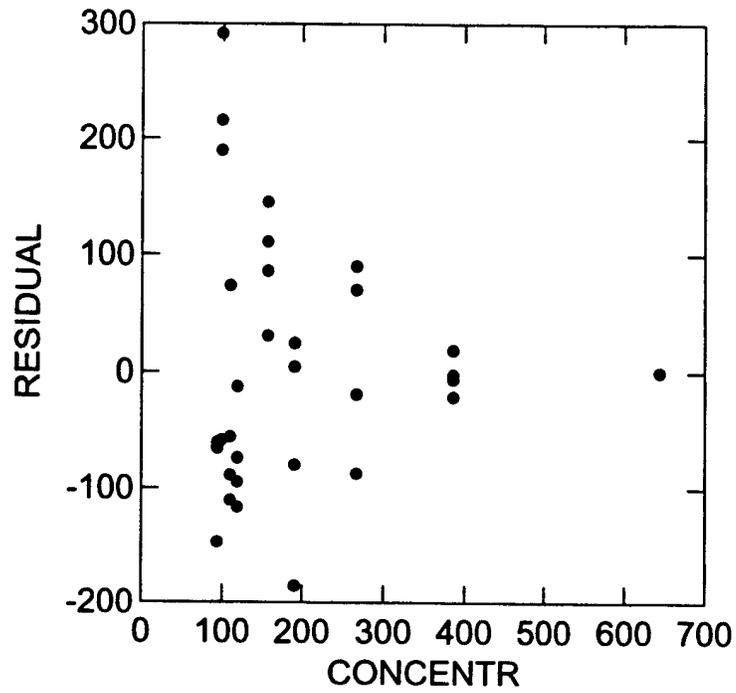
Using model MSE of 0.963 with 27 df.
Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	-0.250	0.0			
3	-0.250	0.000	0.0		
4	0.0	0.250	0.250	0.0	
5	0.250	0.500	0.500	0.250	0.0
6	-0.250	0.000	0.000	-0.250	-0.500
7	-0.500	-0.250	-0.250	-0.500	-0.750
8	-4.750	-4.500	-4.500	-4.750	-5.000
9	-9.500	-9.250	-9.250	-9.500	-9.750
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	-0.250	0.0			
8	-4.500	-4.250	0.0		
9	-9.250	-9.000	-4.750	0.0	

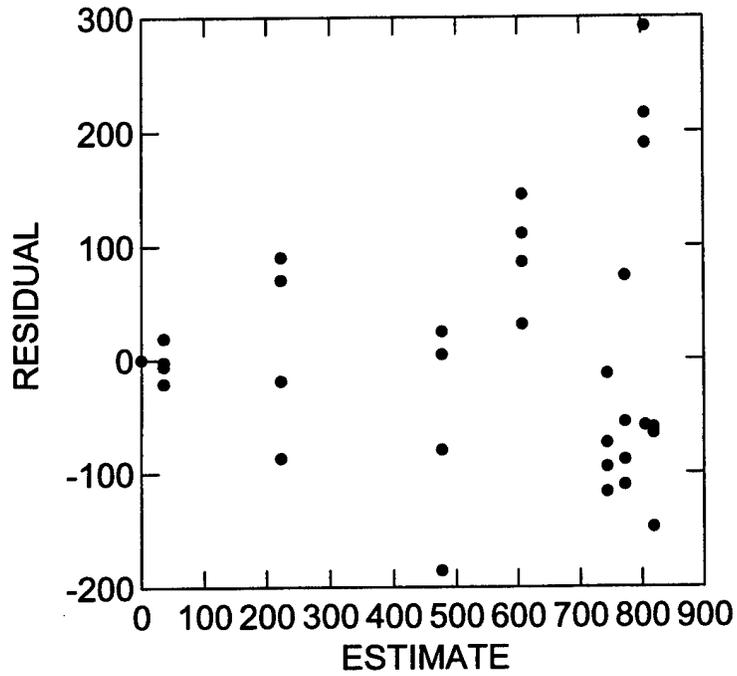
Fisher's Least-Significant-Difference Test.
Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.721	1.000			
3	0.721	1.000	1.000		
4	1.000	0.721	0.721	1.000	
5	0.721	0.477	0.477	0.721	1.000
6	0.721	1.000	1.000	0.721	0.477
7	0.477	0.721	0.721	0.477	0.289
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	0.721	1.000			
8	0.000	0.000	1.000		
9	0.000	0.000	0.000	1.000	

Residuals for manganese.



Residuals for manganese.



SYSTAT VERSION 7.0.1
 COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

Welcome to SYSTAT!

EC₅₀ determination for Sb effect on E. crypticus using Gompertz model.

Model:
 nonlin
 print=long
 model juveniles=g*exp((log(1-.5))*(concentr/x)^b)
 save
 c:\Docume-1\rgkuperm\MyDocu-1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\resSb50j
 / resid
 estimate/ start = 700, 316, 2 iter=200

Iteration No.	Loss	G	X	B
0	.202239D+06	.700000D+03	.316000D+03	.200000D+01
1	.151117D+06	.742440D+03	.315357D+03	.229931D+01
2	.151086D+06	.741629D+03	.316066D+03	.232190D+01
3	.151085D+06	.741545D+03	.316123D+03	.232313D+01
4	.151085D+06	.741539D+03	.316127D+03	.232320D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	8457997.541	3	2819332.514
Residual	151085.459	33	4578.347
Total	8609083.000	36	
Mean corrected	3215076.750	35	

Raw R-square (1-Residual/Total) = 0.982
 Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected) = 0.953
 R(observed vs predicted) square = 0.953

Parameter	Estimate	A. S. E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%	Upper
G	741.539	27.090	27.373	686.425	796.654
X	316.127	15.332	20.619	284.934	347.319
B	2.323	0.314	7.402	1.685	2.962

Case	JUVENILES		Residual
	Observed	Predicted	
1	759.000	741.539	17.461
2	672.000	741.539	-69.539
3	754.000	741.539	12.461
4	756.000	741.539	14.461
5	675.000	706.918	-31.918
6	753.000	706.918	46.082
7	782.000	706.918	75.082
8	810.000	706.918	103.082
9	634.000	667.974	-33.974
10	629.000	667.974	-38.974
11	535.000	667.974	-132.974
12	686.000	667.974	18.026
13	561.000	590.177	-29.177
14	593.000	590.177	2.823
15	547.000	590.177	-43.177

16	615.000	590.177	24.823
17	586.000	451.028	134.972
18	399.000	451.028	-52.028
19	294.000	451.028	-157.028
20	601.000	451.028	149.972
21	362.000	249.543	112.457
22	147.000	249.543	-102.543
23	295.000	249.543	45.457
24	212.000	249.543	-37.543
25	22.000	68.357	-46.357
26	85.000	68.357	16.643
27	12.000	68.357	-56.357
28	92.000	68.357	23.643
29	1.000	4.065	-3.065
30	9.000	4.065	4.935
31	13.000	4.065	8.935
32	38.000	4.065	33.935
33	4.000	0.009	3.991
34	1.000	0.009	0.991
35	1.000	0.009	0.991
36	0.0	0.009	-0.009

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.691	1.000	
B	-0.652	0.521	1.000

Residuals have been saved.

EC₂₀ determination for Sb effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

Model:

```

nonlin
print=long
model juveniles=g*exp((log(1-.2))*(concentr/x)^b)
save
c:\Docume-1\rgkuperm\MyDocu-1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\resSb20j
/ resid
estimate/ start = 700, 190, 2 iter=200

```

Iteration

No.	Loss	G	X	B
0	.198039D+06	.700000D+03	.190000D+03	.200000D+01
1	.151252D+06	.744755D+03	.190552D+03	.226355D+01
2	.151086D+06	.741733D+03	.193877D+03	.231952D+01
3	.151085D+06	.741553D+03	.194068D+03	.232305D+01
4	.151085D+06	.741540D+03	.194080D+03	.232320D+01
5	.151085D+06	.741539D+03	.194080D+03	.232321D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	8457997.541	3	2819332.514
Residual	151085.459	33	4578.347
Total	8609083.000	36	
Mean corrected	3215076.750	35	

Raw R-square (1-Residual/Total) = 0.982
Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected) = 0.953

R(observed vs predicted) square = 0.953

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower	Upper
G	741.539	27.090	27.373	686.424	796.654
X	194.080	19.434	9.987	154.541	233.619
B	2.323	0.314	7.402	1.685	2.962

Case	JUVENILES Observed	JUVENILES Predicted	Residual
1	759.000	741.539	17.461
2	672.000	741.539	-69.539
3	754.000	741.539	12.461
4	756.000	741.539	14.461
5	675.000	706.918	-31.918
6	753.000	706.918	46.082
7	782.000	706.918	75.082
8	810.000	706.918	103.082
9	634.000	667.974	-33.974
10	629.000	667.974	-38.974
11	535.000	667.974	-132.974
12	686.000	667.974	18.026
13	561.000	590.177	-29.177
14	593.000	590.177	2.823
15	547.000	590.177	-43.177
16	615.000	590.177	24.823
17	586.000	451.028	134.972
18	399.000	451.028	-52.028
19	294.000	451.028	-157.028
20	601.000	451.028	149.972
21	362.000	249.543	112.457
22	147.000	249.543	-102.543
23	295.000	249.543	45.457
24	212.000	249.543	-37.543
25	22.000	68.357	-46.357
26	85.000	68.357	16.643
27	12.000	68.357	-56.357
28	92.000	68.357	23.643
29	1.000	4.065	-3.065
30	9.000	4.065	4.935
31	13.000	4.065	8.935
32	38.000	4.065	33.935
33	4.000	0.009	3.991
34	1.000	0.009	0.991
35	1.000	0.009	0.991
36	0.0	0.009	-0.009

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.764	1.000	
B	-0.652	0.911	1.000

Residuals have been saved.

RESIDUALS MODEL:

```
graph
use
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\resSb20j
plot residual*concentr
plot residual*estimate
```

SYSTAT Rectangular file
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\ \nonlinre\ \navy\ert\models\resSb20
j.SYD,
contains variables:

JUVENILES CONCENTR ESTIMATE RESIDUAL

Stem and Leaf Plot of variable: RESIDUAL, N = 36

Minimum: -157.028
Lower hinge: -38.258
Median: 3.407
Upper hinge: 24.233
Maximum: 149.972

```

      -1  53
* * * Outside Values * * *
      -1  0
      -0
      -0  6
      -0 5544
      -0 H 33332
      -0  00
      0 M 00000011111
      0 H 223
      0  44
      0  7
      0
      1  01
* * * Outside Values * * *
      1  34
```

```

RESIDUAL
N of cases      36
Minimum      -157.028
Maximum      149.972
Mean      0.460
Std. Error      10.950
Standard Dev      65.700
Variance      4316.510
```

Graph Model:

```

graph
begin
plot juveniles*concentr / title='', xlab='Sb concentration (mg kg-1)',
ylab='Number of juveniles',
xmax=1200, xmin=0, ymax=900, ymin=0

fplot y=741.539*exp((log(.5))*(concentr/316.127)^2.323); xmin=0, xmax=1200,
xlab='', ymin=0, ylab='',
ymax=900
end
```

ANOVA for Juveniles

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)
0, 100, 140, 196, 274, 384, 538, 753, 1054

Dep Var: JUVENILES N: 36 Multiple R: 0.980 Squared multiple R: 0.960

Estimates of effects $B = (X'X)^{-1} X'Y$

JUVENILES		
CONSTANT		387.083
CONCENTR	0	348.167
CONCENTR	100	367.917
CONCENTR	140	233.917
CONCENTR	196	191.917
CONCENTR	274	82.917
CONCENTR	384	-133.083
CONCENTR	538	-334.333
CONCENTR	753	-371.833

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	3085725.500	8	385715.688	80.512	0.000
Error	129351.250	27	4790.787		

Durbin-Watson D Statistic 2.491

First Order Autocorrelation -0.248

COL/

ROW CONCENTR

1 0
2 100
3 140
4 196
5 274
6 384
7 538
8 753
9 1054

Using least squares means.

Post Hoc test of JUVENILES

Using model MSE of 4790.787 with 27 df.

Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	19.750	0.0			
3	-114.250	-134.000	0.0		
4	-156.250	-176.000	-42.000	0.0	

5	-265.250	-285.000	-151.000	-109.000	0.0
6	-481.250	-501.000	-367.000	-325.000	-216.000
7	-682.500	-702.250	-568.250	-526.250	-417.250
8	-720.000	-739.750	-605.750	-563.750	-454.750
9	-733.750	-753.500	-619.500	-577.500	-468.500
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	-201.250	0.0			
8	-238.750	-37.500	0.0		
9	-252.500	-51.250	-13.750	0.0	

Fisher's Least-Significant-Difference Test.
Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.690	1.000			
3	0.027	0.011	1.000		
4	0.004	0.001	0.398	1.000	
5	0.000	0.000	0.005	0.034	1.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	0.000	1.000			
8	0.000	0.450	1.000		
9	0.000	0.304	0.781	1.000	

ANOVA for Adults

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (9 levels)
0, 100, 140, 196, 274, 384, 538, 753, 1054

Dep Var: ADULTS N: 36 Multiple R: 0.896 Squared multiple R: 0.804

Estimates of effects $B = (X'X)^{-1} X'Y$

ADULTS

CONSTANT		7.444
CONCENTR	0	2.306
CONCENTR	100	2.056
CONCENTR	140	1.806
CONCENTR	196	2.056
CONCENTR	274	2.056
CONCENTR	384	1.306
CONCENTR	538	-2.444
CONCENTR	753	-2.694

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
--------	----------------	----	-------------	---------	---

CONCENTR	310.889	8	38.861	13.806	0.000
Error	76.000	27	2.815		

Durbin-Watson D Statistic 2.835
 First Order Autocorrelation -0.428
 COL/

ROW CONCENTR

1	0
2	100
3	140
4	196
5	274
6	384
7	538
8	753
9	1054

Using least squares means.
 Post Hoc test of ADULTS

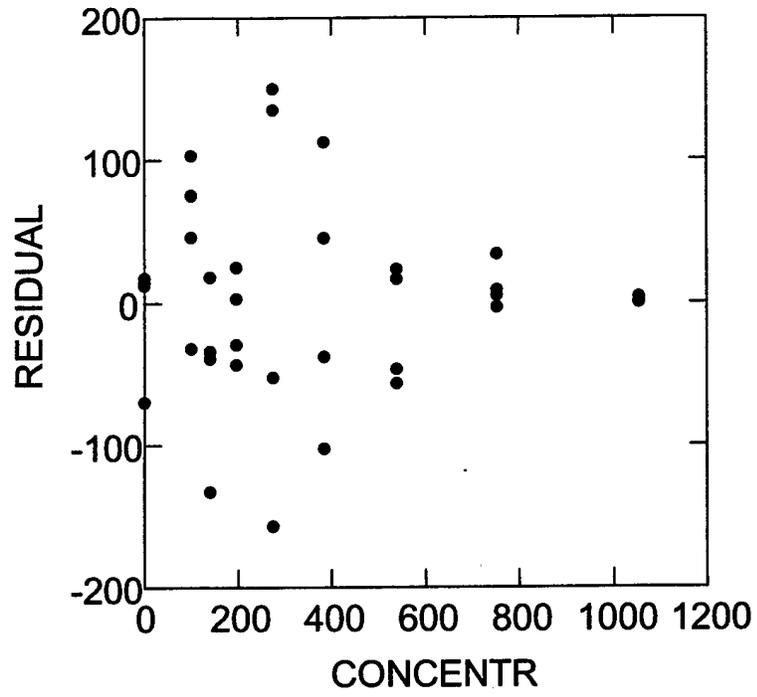
Using model MSE of 2.815 with 27 df.
 Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	-0.250	0.0			
3	-0.500	-0.250	0.0		
4	-0.250	0.0	0.250	0.0	
5	-0.250	0.000	0.250	0.000	0.0
6	-1.000	-0.750	-0.500	-0.750	-0.750
7	-4.750	-4.500	-4.250	-4.500	-4.500
8	-5.000	-4.750	-4.500	-4.750	-4.750
9	-8.750	-8.500	-8.250	-8.500	-8.500
	6	7	8	9	
6	0.0				
7	-3.750	0.0			
8	-4.000	-0.250	0.0		
9	-7.750	-4.000	-3.750	0.0	

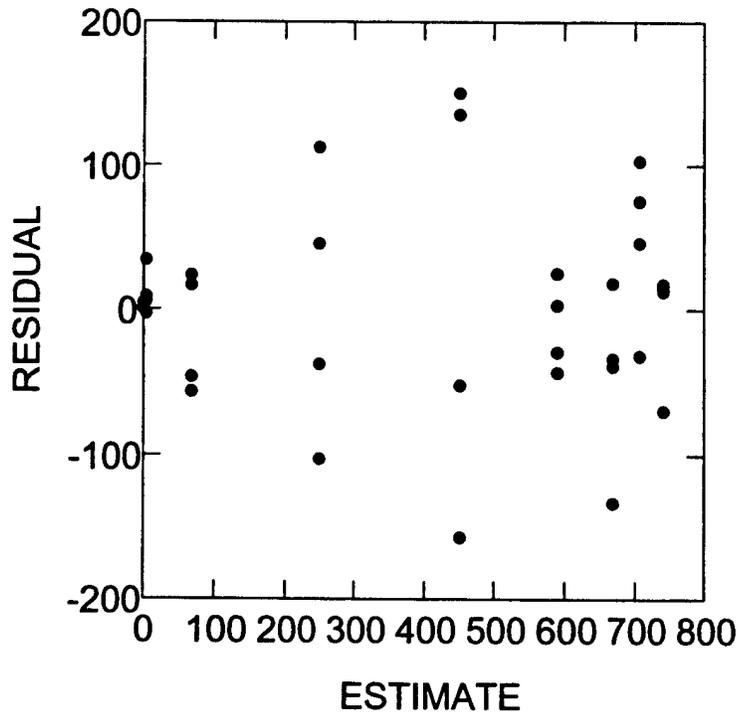
Fisher's Least-Significant-Difference Test.
 Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.835	1.000			
3	0.677	0.835	1.000		
4	0.835	1.000	0.835	1.000	
5	0.835	1.000	0.835	1.000	1.000
6	0.407	0.533	0.677	0.533	0.533
7	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
8	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	
6	1.000				
7	0.004	1.000			
8	0.002	0.835	1.000		
9	0.000	0.002	0.004	1.000	

Residuals for antimony



Residuals for antimony



SYSTAT VERSION 7.0.1
 COPYRIGHT (C) 1997, SPSS INC.

Welcome to SYSTAT!

EC₅₀ determination for Ba effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

MODEL:

```
nonlin
print=long
model juveniles=g*exp((log(1-.5))*(concentr/x)^b)
save
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBA50 /
resid
estimate/ start = 1000, 800, 2 iter=200
```

44 cases have been saved into a SYSTAT file

Iteration

No.	Loss	G	X	B
0	.992081D+06	.100000D+04	.800000D+03	.200000D+01
1	.703536D+06	.972099D+03	.961583D+03	.239042D+01
2	.701177D+06	.993959D+03	.944922D+03	.233348D+01
3	.701119D+06	.991798D+03	.947307D+03	.235458D+01
4	.701117D+06	.992360D+03	.946634D+03	.235188D+01
5	.701117D+06	.992264D+03	.946729D+03	.235264D+01
6	.701117D+06	.992284D+03	.946705D+03	.235253D+01
7	.701117D+06	.992281D+03	.946709D+03	.235255D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	1.41810E+07	3	4726985.947
Residual	701117.160	41	17100.419
Total	1.48821E+07	44	
Mean corrected	5909866.795	43	

Raw R-square (1-Residual/Total)	=	0.953
Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected)	=	0.881
R(observed vs predicted) square	=	0.882

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%	Upper
G	992.281	59.002	16.818	873.124	1111.437
X	946.709	57.875	16.358	829.828	1063.590
B	2.353	0.348	6.759	1.650	3.055

Case	JUVENILES Observed	JUVENILES Predicted	Residual
1	1166.000	992.007	173.993
2	752.000	992.007	-240.007
3	998.000	992.007	5.993
4	890.000	992.007	-102.007
5	958.000	888.873	69.127
6	912.000	888.873	23.127
7	963.000	888.873	74.127
8	821.000	888.873	-67.873
9	1020.000	669.664	350.336
10	925.000	669.664	255.336
11	741.000	669.664	71.336
12	686.000	669.664	16.336
13	896.000	714.637	181.363
14	681.000	714.637	-33.637
15	894.000	714.637	179.363
16	692.000	714.637	-22.637
17	795.000	630.064	164.936
18	512.000	630.064	-118.064
19	506.000	630.064	-124.064
20	429.000	630.064	-201.064
21	470.000	585.480	-115.480
22	301.000	585.480	-284.480
23	369.000	585.480	-216.480
24	431.000	585.480	-154.480
25	238.000	159.814	78.186
26	261.000	159.814	101.186
27	258.000	159.814	98.186
28	219.000	159.814	59.186
29	88.000	210.523	-122.523
30	182.000	210.523	-28.523
31	213.000	210.523	2.477
32	154.000	210.523	-56.523
33	157.000	43.181	113.819
34	35.000	43.181	-8.181
35	51.000	43.181	7.819
36	102.000	43.181	58.819
37	27.000	17.693	9.307
38	21.000	17.693	3.307
39	7.000	17.693	-10.693
40	13.000	17.693	-4.693
41	11.000	10.252	0.748
42	17.000	10.252	6.748
43	3.000	10.252	-7.252
44	4.000	10.252	-6.252

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.777	1.000	
B	-0.619	0.541	1.000

Residuals have been saved.

Residuals MODEL:

```
graph
use
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBA50
plot residual*concentr
plot residual*estimate
```

SYSTAT Rectangular file

```
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBA50.
SYD,
```

Stem and Leaf Plot of variable: RESIDUAL, N = 44

```
Minimum: -284.480
Lower hinge: -62.198
Median: 2.892
Upper hinge: 72.731
Maximum: 350.336
```

```

      -2  8
* * * Outside Values * * *
      -2  410
      -1  5
      -1  22110
      -0 H 65
      -0  32210000
      0 M 000000012
      0 H 5567779
      1  01
      1  6778
      2
      2  5
* * * Outside Values * * *
      3  5
```

	RESIDUAL
N of cases	44
Minimum	-284.480
Maximum	350.336
Mean	4.097
Std. Error	19.240
Standard Dev	127.624
Variance	16287.878

EC₂₀ determination for Ba effect on *E. crypticus* using Gompertz model.

MODEL:

```
nonlin
print=long
model juveniles=g*exp((log(1-.2))*(concentr/x)^b)
save
c:\Docume~1\rgkuperm\MyDocu~1\systat\roman3\nonlinre\navy\ert\models\reBA20 /
resid
estimate/ start = 1000, 600, 2 iter=200
```

Iteration

No.	Loss	G	X	B
0	.897903D+06	.100000D+04	.600000D+03	.200000D+01
1	.707471D+06	.995592D+03	.562714D+03	.218228D+01
2	.701491D+06	.988928D+03	.588580D+03	.234812D+01
3	.701127D+06	.992679D+03	.583758D+03	.234486D+01
4	.701117D+06	.992128D+03	.584929D+03	.235278D+01
5	.701117D+06	.992301D+03	.584724D+03	.235230D+01
6	.701117D+06	.992276D+03	.584768D+03	.235257D+01
7	.701117D+06	.992282D+03	.584760D+03	.235254D+01

Dependent variable is JUVENILES

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square
Regression	1.41810E+07	3	4726985.947
Residual	701117.160	41	17100.419
Total	1.48821E+07	44	
Mean corrected	5909866.795	43	

Raw R-square (1-Residual/Total)	=	0.953
Mean corrected R-square (1-Residual/Corrected)	=	0.881
R(observed vs predicted) square	=	0.882

Parameter	Estimate	A.S.E.	Param/ASE	Wald Confidence Interval	
				Lower < 95%>	Upper
G	992.282	59.002	16.818	873.126	1111.438
X	584.760	68.027	8.596	447.376	722.144
B	2.353	0.348	6.759	1.650	3.055

Case	JUVENILES		Residual
	Observed	Predicted	
1	1166.000	992.007	173.993
2	752.000	992.007	-240.007
3	998.000	992.007	5.993
4	890.000	992.007	-102.007
5	958.000	888.873	69.127
6	912.000	888.873	23.127
7	963.000	888.873	74.127
8	821.000	888.873	-67.873
9	1020.000	669.664	350.336
10	925.000	669.664	255.336
11	741.000	669.664	71.336
12	686.000	669.664	16.336
13	896.000	714.637	181.363
14	681.000	714.637	-33.637
15	894.000	714.637	179.363
16	692.000	714.637	-22.637
17	795.000	630.064	164.936
18	512.000	630.064	-118.064
19	506.000	630.064	-124.064
20	429.000	630.064	-201.064
21	470.000	585.480	-115.480
22	301.000	585.480	-284.480
23	369.000	585.480	-216.480
24	431.000	585.480	-154.480
25	238.000	159.814	78.186
26	261.000	159.814	101.186
27	258.000	159.814	98.186
28	219.000	159.814	59.186

29	88.000	210.523	-122.523
30	182.000	210.523	-28.523
31	213.000	210.523	2.477
32	154.000	210.523	-56.523
33	157.000	43.181	113.819
34	35.000	43.181	-8.181
35	51.000	43.181	7.819
36	102.000	43.181	58.819
37	27.000	17.693	9.307
38	21.000	17.693	3.307
39	7.000	17.693	-10.693
40	13.000	17.693	-4.693
41	11.000	10.252	0.748
42	17.000	10.252	6.748
43	3.000	10.252	-7.252
44	4.000	10.252	-6.252

Asymptotic Correlation Matrix of Parameters

	G	X	B
G	1.000		
X	-0.787	1.000	
B	-0.619	0.897	1.000

Residuals have been saved.

ANOVA for Juveniles

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (11 levels)
34, 433, 689, 744, 791, 843, 1333, 1429, 1798, 2000, 2111

Dep Var: JUVENILES N: 44 Multiple R: 0.971 Squared multiple R: 0.943

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	5575324.045	10	557532.405	54.996	0.000
Error	334542.750	33	10137.659		

Durbin-Watson D Statistic 2.752
First Order Autocorrelation -0.445

- COL/
ROW CONCENTR
- 1 34
 - 2 433
 - 3 689
 - 4 744
 - 5 791
 - 6 843
 - 7 1333
 - 8 1429

9 1798
10 2000
11 2111

Using least squares means.
Post Hoc test of JUVENILES

Using model MSE of 10137.659 with 33 df.
Matrix of pairwise mean differences:

	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	-38.000	0.0			
3	-160.750	-122.750	0.0		
4	-108.500	-70.500	52.250	0.0	
5	-391.000	-353.000	-230.250	-282.500	0.0
6	-558.750	-520.750	-398.000	-450.250	-167.750
7	-792.250	-754.250	-631.500	-683.750	-401.250
8	-707.500	-669.500	-546.750	-599.000	-316.500
9	-865.250	-827.250	-704.500	-756.750	-474.250
10	-934.500	-896.500	-773.750	-826.000	-543.500
11	-942.750	-904.750	-782.000	-834.250	-551.750
	6	7	8	9	10
6	0.0				
7	-233.500	0.0			
8	-148.750	84.750	0.0		
9	-306.500	-73.000	-157.750	0.0	
10	-375.750	-142.250	-227.000	-69.250	0.0
11	-384.000	-150.500	-235.250	-77.500	-8.250
	11				
11	0.0				

Fisher's Least-Significant-Difference Test.
Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	0.597	1.000			
3	0.031	0.094	1.000		
4	0.137	0.329	0.468	1.000	
5	0.000	0.000	0.003	0.000	1.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
6	1.000				
7	0.002	1.000			
8	0.044	0.242	1.000		
9	0.000	0.313	0.034	1.000	
10	0.000	0.054	0.003	0.338	1.000
11	0.000	0.042	0.002	0.284	0.908
	11				
11	1.000				

ANOVA for Adults

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

CONCENTR (11 levels)
 34, 433, 689, 744, 791, 843, 1333, 1429, 1798, 2000, 2111

Dep Var: ADULT N: 44 Multiple R: 0.785 Squared multiple R: 0.617

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
CONCENTR	49.045	10	4.905	5.307	0.000
Error	30.500	33	0.924		

Durbin-Watson D Statistic 2.033
 First Order Autocorrelation -0.217

COL/
 ROW CONCENTR

1	34
2	433
3	689
4	744
5	791
6	843
7	1333
8	1429
9	1798
10	2000
11	2111

Using least squares means.
 Post Hoc test of ADULT

Using model MSE of 0.924 with 33 df.
 Matrix of pairwise mean differences:

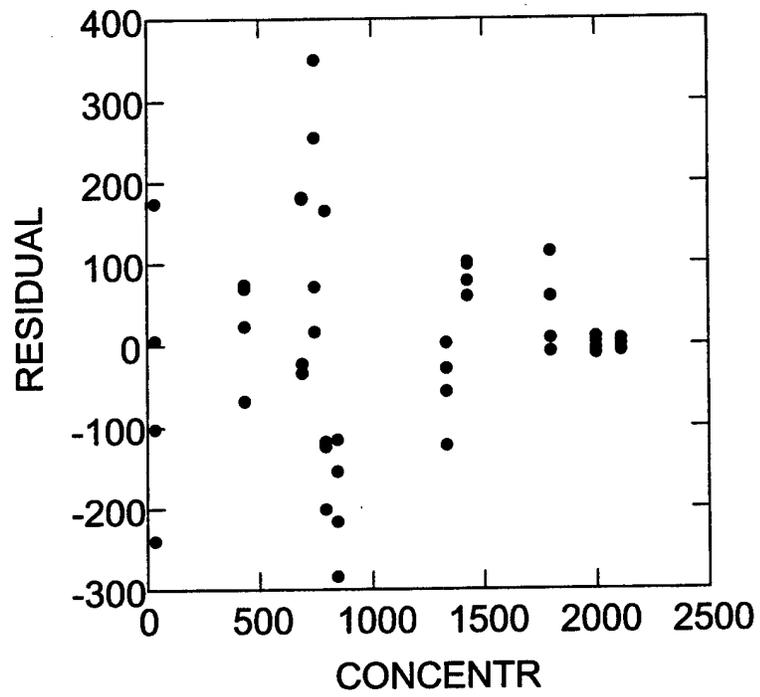
	1	2	3	4	5
1	0.0				
2	0.0	0.0			
3	0.0	0.0	0.0		
4	0.0	0.0	0.0	0.0	
5	-0.500	-0.500	-0.500	-0.500	0.0
6	-0.250	-0.250	-0.250	-0.250	0.250
7	-0.750	-0.750	-0.750	-0.750	-0.250
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
9	-0.500	-0.500	-0.500	-0.500	0.000
10	-2.000	-2.000	-2.000	-2.000	-1.500
11	-3.500	-3.500	-3.500	-3.500	-3.000

	6	7	8	9	10
6	0.0				
7	-0.500	0.0			
8	0.250	0.750	0.0		
9	-0.250	0.250	-0.500	0.0	
10	-1.750	-1.250	-2.000	-1.500	0.0
11	-3.250	-2.750	-3.500	-3.000	-1.500
	11				
11	0.0				

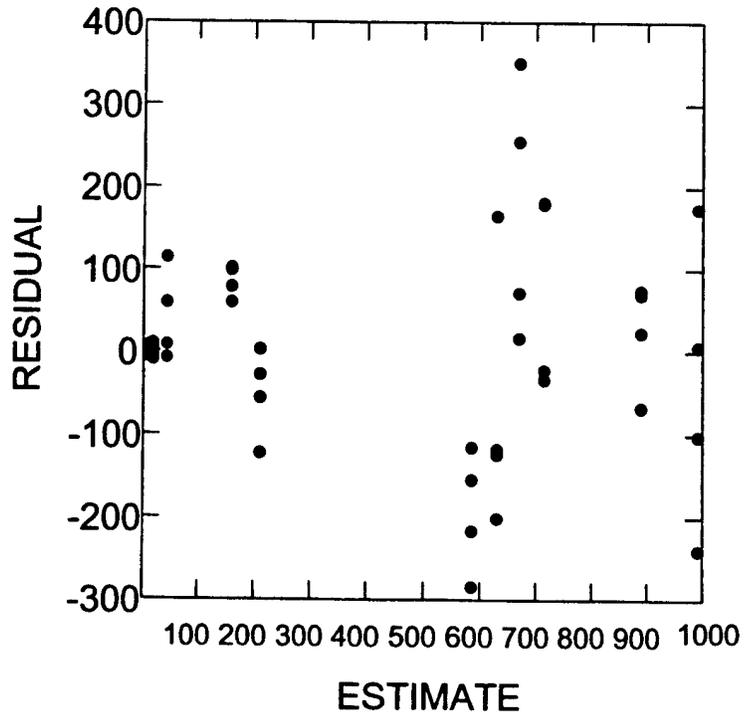
Fisher's Least-Significant-Difference Test.
Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	2	3	4	5
1	1.000				
2	1.000	1.000			
3	1.000	1.000	1.000		
4	1.000	1.000	1.000	1.000	
5	0.467	0.467	0.467	0.467	1.000
6	0.715	0.715	0.715	0.715	0.715
7	0.278	0.278	0.278	0.278	0.715
8	1.000	1.000	1.000	1.000	0.467
9	0.467	0.467	0.467	0.467	1.000
10	0.006	0.006	0.006	0.006	0.034
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	7	8	9	10
6	1.000				
7	0.467	1.000			
8	0.715	0.278	1.000		
9	0.715	0.715	0.467	1.000	
10	0.015	0.075	0.006	0.034	1.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034
	11				
11	1.000				

Residuals for barium.



Residuals for barium.



	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	--	---

Artículo Técnico

**Evaluation of Growth and Reproduction as Indicators
of Soil Metal Toxicity to the Collembolan, *Sinella
curviseta***

Evaluation of growth and reproduction as indicators of soil metal toxicity to the Collembolan, *Sinella curviseta*

Jie Xu¹, Xin Ke¹, Paul Henning Krogh², Yin Wang¹, Yong-Ming Luo³ and Jing Song³

¹Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China,

²Department of Terrestrial Ecology, National Environmental Research Institute, University of Aarhus, Vejlsvøvej 25, DK-8600 Silkeborg, Denmark,

³Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, China

Abstract Laboratory studies evaluated the sensitivity of *Sinella curviseta* Brook (Collembola: Entomobryidae) to selected heavy metals (Cu, Pb and Zn). Survival, reproduction and growth of *S. curviseta* were determined in a 4-week exposure test in an agricultural soil amended with metals to concentrations of 100, 200, 400, 800, 1 600 and 3 200 mg/kg. Results showed reduction in adult survival and reproductive failure at the highest concentrations (3 200 mg/kg) of Cu and Zn. EC_{50 reproduction} values for Cu and Zn were approximately 442 and 2 760 mg/kg, respectively. Application of Pb at all levels resulted in large numbers of progeny and no significant mortality compared to controls. Adult growth rate decreased for all metal treatments compared to the controls, suggesting that metals affect *S. curviseta* metabolism and result in slower growth. We showed that reproduction is a slightly more sensitive parameter than growth. Since a growth test needs fewer juveniles and takes less time than a reproduction test, we conclude that the two parameters are complementary and could be used for a better ecotoxicological evaluation of contaminant levels. However, relative growth and reproduction sensitivities should be tested with more chemicals before a growth test is accepted as a faster sublethal test than a reproduction test.

Key words Collembolan, copper, growth, lead, reproduction, *Sinella curviseta*, soil pollution, toxicity testing, zinc

Introduction

Soil heavy metal pollution is an urgent problem worldwide. Large quantities of heavy metals may enter food chains and potentially harm plants, livestock and humans. Heavy metals may also injure agricultural production through their impact on soil health (Nursita *et al.*, 2005). Chemical analyses are essential for the evaluation of soil pollution but have some drawbacks. For example, they give little information on the overall toxicity of the polluted soil because toxicity is affected by interactions between differ-

ent pollutants and between pollutants and the soil matrix. As a result, ecotoxicity tests are a necessary complement to chemical analyses (Crouau & Moia, 2006). Nowadays, ecotoxicity tests for soil contamination have been developed, including the impact of heavy metals on soil invertebrates such as Collembola (Van Straalen & Krivolutsky, 1996).

Collembola and other soil fauna play an important ecological role as decomposers of leaf litter and soil organic matter. They feed directly on decaying materials and soil fungi and may give an earlier indication of ecosystem disturbance than predaceous soil animals (Cole *et al.*, 2001). Collembola are also known as ideal test animals for ecotoxicological research. They have been used to study the effects on animals of various environmental contaminants, such as pesticides, soil fumigants, acid rain, heavy metals, fertilizers, radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and polychlorinated biphenyls

Correspondence: Xin Ke, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200032, China. Tel: +86 21 54924241; fax: +86 21 54924015; email: xinke@sibs.ac.cn

(PCBs) (Wiles & Krogh, 1998; Ke *et al.*, 2004). Collembola also have been used to improve the International Organization for Standardization (ISO) standard test (Fountain & Hopkin, 2001; Crouau *et al.*, 1999). Many studies have been conducted in relation to Collembola sensitivity and resistance to pollutants in populations exposed to long-term contamination of soils, in particular to heavy metals (Posthuma, 1990; Posthuma *et al.*, 1992; Tranvik *et al.*, 1993).

Much is known about the effects of heavy metal pollutants on Collembola in the field. However, most published studies of the effects of heavy metals on Collembola in soils are from European countries. There are few reports on the effects of heavy metals on *Sinella curviseta* Brook (Collembola: Entomobryidae) in Chinese soils, especially ecotoxicological effects at the species level. The effects of heavy metals may depend on pH, temperature, moisture, length of aging of soils before introduction of springtails, and organic matter (OM) content (Lock & Janssen, 2001; Smit & Van Gestel, 1995, 1996; Van Gestel & Van Diepen, 1997). Differences between the soils of Europe and China, along with different concentrations and availabilities of heavy metals in these soils, may make the situation in China different from the standard laboratory and field system of Europe. Thus it is necessary to establish an assessment system for ecotoxicity of Chinese heavy metal-contaminated soils. The collembolan *Folsomia candida* also has been selected as a standard animal for toxicity tests conducted under laboratory conditions (ISO, 1999) and most European metal accumulation studies of Collembola have used *F. candida*. In the south of China, *F. candida* is very rare in rice paddies. On the other hand, *S. curviseta* is an abundant, widespread soil animal in the order Collembola in China; we have found it to be abundant in rehabilitated mine sites in southern China (unpublished data, 2004).

The objectives of the current research were to study the effects of three heavy metals (Cu, Pb, Zn) that commonly occur in contaminated soils on the growth and reproduction of *S. curviseta* in a soil from Shanghai Qingpu, China. The procedure for the standard ISO laboratory test was followed (ISO, 1999; Wiles & Krogh, 1998), but we replaced the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) soil with a modified Chinese agricultural soil.

Materials and methods

Test organism

The culture of *S. curviseta* was collected from a garden in SIPPE (Institute of Plant Physiology and Ecology,

Shanghai) and was established from cultures maintained for 3 years in our laboratory. These Collembola were not exposed to metals prior to this experiment. The cultures were maintained and testing collembolans were produced according to the handbook of soil invertebrate toxicity tests (Wiles & Krogh, 1998). Plaster of Paris and activated charcoal (5:1 v:v) were mixed with double-distilled water and the mixture was poured to form a 0.5–0.8 cm thick layer in 200 mL glass jars (diameter: 6 cm, height: 7 cm; with plastic screw-on lids). The surface of the mixture was smoothed to cover fissures or holes. The jars were left open at room temperature for a few days until the mixture was dried. Around 20 Collembola individuals were placed into each jar and 15 mg of baker's yeast and a few drops of double-distilled water were added twice a week. The jars were kept in the dark at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. To synchronize the collembolans, adults were stimulated to oviposit by moving them to fresh substrates. Oviposition generally occurred 2 days after transfer. Seven days later the clusters of eggs were transferred with a wetted fine-bristled paintbrush to fresh substrate. The eggs hatched 2–3 days later. Three days after the transfer the remaining unhatched eggs were removed from the containers. The juveniles were used for experiments 10 days later, at the age of 10–12 days (Park & Lees, 2004).

Soil

An uncontaminated agricultural soil collected at Qingpu Experimental Station ($121^\circ10' \text{N}$, $31^\circ15' \text{E}$) in Shanghai was used as the toxicity test medium. Prior to the experiments, the soil was dried at 80°C to kill pre-existing animals, sieved through a 2-mm mesh, and stored at room temperature until use. The Qingpu soil is a sandy loam with the following particle size distribution: coarse sand (200–2 000 μm) 37.3%; fine sand (63–200 μm) 24.7%; coarse silt (20–63 μm) 11.0%; fine silt (2–20 μm) 12.3%; and clay (< 2 μm) 12.0%. The soil contained 2.7% humus (1.6% organic carbon), with an H_2O pH of 6.5, a density of 1.145 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ dry soil and a total cation exchange capacity of 20.14 meq/100 g soil.

Dilute solutions of copper chloride (CuCl_2), lead chloride (PbCl_2), and zinc chloride (ZnCl_2) (AR Grade, Shanghai Chemical Reagent Factory, Shanghai, China), were added to obtain a range of concentrations (100, 200, 400, 800, 1 600 and 3 200 mg/kg dry soil) for these metals. The same volume of double-distilled water was added to jars for a control treatment. Soils were maintained at a moisture content of 60% of field capacity for 4 weeks to equilibrate the added solution and to obtain a homogenous distribution of the applied metals in the soils (Kula & Heimbach, 1998).

Toxicity test

To each test container (plastic Petri dishes: 6 cm diameter, 1.5 cm height) 30 g of moistened soil was added. To measure adult survival, final adult body size, and reproduction, 20 *S. curviseta*, 10 adult females and 10 adult males (aged 10–12 days), were added to each replicate (four replicates per concentration). Containers were incubated for 4 weeks at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12:12 h L:D photoperiod. The lids were removed twice a week to add 5 mg of baker's yeast into the jars and the insides of the lids were sprayed lightly with distilled water to maintain 60% humidity. At the end of the experiment (28 days) the soil was emptied into Tullgren funnels until all the Collembola had been extracted (5 days). They were stored in 70% alcohol. Adult and juvenile springtails were counted under a dissecting microscope.

Digital photographs of springtails were taken (Olympus C-4000 zoom; image quality fine; macro-mode) and body length, measured from the end of the posterior abdominal segment to the anterior margin of the head, was recorded by on-screen viewing using Image Tool software (Photoshop 8.0). Five arbitrarily selected animals were photographed from each treatment. A small plastic ruler with millimetric graduation was placed near photographed animals as a calibration scale.

Statistical analysis

Results of the Collembola exposure test were presented as the means of four replicates. Statistical tests were performed using Statistica Version 6.0. analysis of variance (ANOVA) determined if treatment effects were significant. We used a Dunnett test to compare control

treatment results with those from heavy metal-treated soils, and a Tukey test for pair-wise comparisons of values from different metal treatments. Statistical analyses for estimation of LC (lethal concentration) and EC (effect concentration) values for survival, reproduction and growth were performed with the NLMIXED procedure of SAS/STAT[®] version 9.1 (SAS Institute Inc., 2004). This procedure computed approximate standard errors for the estimates using the delta method and these standard errors were used to compute corresponding 95% confidence limits (SAS Institute Inc., 2004). An exponential decay model or a linear model was used to estimate the relationship between a toxicity endpoint and the soil metal concentration. Mortality data were fitted to a binomial distribution and linear link function.

Results

Survival

The first mortality was observed at the highest concentration of Cu (3 200 mg/kg) 5 days after exposure. After 28 days adult populations were significantly reduced at the highest levels of Cu and Zn ($P < 0.05$, Table 1) compared to the control, but adult populations did not differ significantly from the control at all Pb concentrations. The absence of any statistically significant effect on mortality at all concentrations of Pb may be due to greater tolerance of *S. curviseta* to Pb than to other metals.

Declines in adult survival relative to the control (Table 1) were observed at 200 mg Cu/kg and 400 mg Zn/kg, but statistically significant decreases occurred at 800 mg Cu/kg and 3 200 mg Zn/kg. Collembolans on soils contaminated

Table 1 Number of live adults and juveniles (mean \pm SD) per 10 female *S. curviseta*, following exposure of 20 adult Collembola (10 females and 10 males) to increasing soil metal concentrations (mg/kg) for 28 days.

Metal dose (mg/kg)	Cu		Zn		Pb	
	No. live adults	No. live juveniles	No. live adults	No. live juveniles	No. live adults	No. live juveniles
0 [†]	19.5 \pm 0.5 ^a	72.8 \pm 9.1 ^a	19.5 \pm 0.5 ^a	72.8 \pm 9.1 ^a	19.5 \pm 0.5 ^a	72.8 \pm 9.1 ^a
100	19.5 \pm 0.5 ^a	30.5 \pm 5.9 ^{bc}	19.5 \pm 0.5 ^a	45.5 \pm 6.4 ^{ab}	19.5 \pm 0.5 ^a	61.0 \pm 8.5 ^{ab}
200	17.8 \pm 1.0 ^{ab}	36.8 \pm 8.9 ^{ab}	19.0 \pm 0.5 ^a	39.8 \pm 14.9 ^{ab}	19.5 \pm 0.5 ^a	78.5 \pm 10.7 ^a
400	16.3 \pm 1.5 ^{ab}	28.0 \pm 5.0 ^{bcd}	18.0 \pm 0.7 ^{ab}	38.0 \pm 4.3 ^b	18.8 \pm 0.5 ^a	74.5 \pm 5.8 ^a
800	12.8 \pm 2.5 ^b	18.3 \pm 5.8 ^{bcd}	17.5 \pm 1.0 ^{ab}	29.5 \pm 7.5 ^{bc}	18.3 \pm 0.9 ^a	71.0 \pm 16.2 ^a
1600	13.5 \pm 1.3 ^b	7.8 \pm 3.1 ^{cd}	18.0 \pm 0.8 ^{ab}	10.3 \pm 6.8 ^{bc}	18.8 \pm 0.5 ^a	58.0 \pm 9.9 ^{ab}
3200	13.0 \pm 1.5 ^b	0 ^d	15.5 \pm 1.3 ^b	0 ^d	18.5 \pm 1.6 ^a	39.5 \pm 18.1 ^b

[†]Water control. All results are the means (\pm SD) of eight replicates for the control and four replicates for each metal concentration. Values followed with identical superscript letters are not significantly different between concentrations for each metal in a column (Tukey's test at 5% level of significance).

with 3 200 mg Pb/kg showed no significant effect on mortality compared with the control (Table 1): dead adults were observed in only two replicates of the 3 200 mg/kg Pb treatment.

''

Reproduction

No reproduction was observed at the highest concentrations (3 200 mg/kg) of Cu or Zn (Table 1). Springtail reproduction was clearly affected by exposure to Cu and Zn with a significant reduction ($P < 0.05$) at 100 mg Cu/kg and 400 mg Zn/kg (Table 1). However, results for Pb differed: we found no significant decrease in juvenile populations of the animals in comparison with the water control even at high 1 600 mg Pb/kg (Table 1).

''

Growth

At 14 days of exposure to metal-contaminated soils, there was no significant difference in the body length of the animals at all metal concentrations (Table 2). However, at 21 and 28 days, there was evidence of reduced growth in the presence of metal contamination in some treatments. At 21 days, significant ($P < 0.05$; Table 2) reduction in size

was observed at the three highest levels of Cu and Zn (800, 1 600 and 3 200 mg/kg) compared to the control. After 28 days, significant reduction in size in comparison with the control was observed at the five highest Cu concentrations (200–3 200 mg/kg) and the four highest concentrations of Zn (400–3 200 mg/kg). There was no significant difference between body lengths of control and Pb-treated animals at all concentrations, but at concentrations higher than 800 mg Pb/kg there was a slight but non-significant decrease in body length (Table 2).

''

Metal toxicity

Table 3 shows LC_{10}/EC_{10} and EC_{50} values for survival, reproduction and growth as performed with the NLMIXED procedure of SAS/STAT[®] version 9.1. The toxicity of three metals to *S. curviseta* was in the order Cu > Zn > Pb for reproduction and size for both LC_{10}/EC_{10} and EC_{50} values, while for survival the order was Cu > Pb > Zn (Table 3). The order of toxicity for the three parameters was reproduction > size > survival for Cu and Zn, while the order for Pb was reproduction > survival > size EC_{50} . The Pb size variable and the Cu, Pb and Zn survivals could not be calculated because the toxic effects were less than 50%.

Table 2 Effects of metal concentrations on the body length (mm) of *S. curviseta* adults after 14, 21, and 28 days of exposure in soil.

Treatments	Metal concentration (mg/kg dry soil)	Body length (mm)		
		14 days	21 days	28 days
Control	0	1.16 ± 0.03 ^{ab}	1.59 ± 0.08 ^a	1.73 ± 0.09 ^a
Cu	100	1.18 ± 0.05 ^{ab}	1.52 ± 0.03 ^a	1.70 ± 0.07 ^a
	200	1.15 ± 0.05 ^{ab}	1.49 ± 0.04 ^{ab}	1.55 ± 0.07 ^{ab}
	400	1.19 ± 0.04 ^{ab}	1.48 ± 0.03 ^{ab}	1.52 ± 0.03 ^{bc}
	800	1.18 ± 0.02 ^{ab}	1.43 ± 0.12 ^b	1.45 ± 0.04 ^c
	1600	1.16 ± 0.05 ^{ab}	1.36 ± 0.03 ^c	1.39 ± 0.04 ^d
	3200	1.13 ± 0.12 ^{ab}	1.16 ± 0.04 ^d	1.29 ± 0.05 ^d
Zn	100	1.20 ± 0.03 ^{ab}	1.59 ± 0.08 ^a	1.73 ± 0.09 ^a
	200	1.18 ± 0.05 ^{ab}	1.53 ± 0.05 ^a	1.61 ± 0.10 ^b
	400	1.15 ± 0.05 ^{ab}	1.46 ± 0.03 ^{ab}	1.50 ± 0.07 ^{bc}
	800	1.19 ± 0.02 ^{ab}	1.42 ± 0.08 ^b	1.48 ± 0.10 ^{bcd}
	1600	1.18 ± 0.12 ^{ab}	1.32 ± 0.13 ^c	1.35 ± 0.11 ^d
	3200	1.16 ± 0.05 ^{ab}	1.22 ± 0.06 ^d	1.29 ± 0.05 ^d
Pb	100	1.16 ± 0.03 ^{ab}	1.59 ± 0.08 ^a	1.73 ± 0.05 ^a
	200	1.18 ± 0.05 ^{ab}	1.56 ± 0.03 ^a	1.78 ± 0.05 ^a
	400	1.25 ± 0.05 ^a	1.59 ± 0.06 ^a	1.74 ± 0.11 ^a
	800	1.19 ± 0.12 ^{ab}	1.48 ± 0.08 ^{ab}	1.56 ± 0.09 ^{ab}
	1600	1.18 ± 0.08 ^{ab}	1.58 ± 0.08 ^a	1.63 ± 0.06 ^b
	3200	1.16 ± 0.05 ^{ab}	1.49 ± 0.12 ^{ab}	1.56 ± 0.13 ^{ab}

All results are the mean (± SD) of eight replicates for the water control and four replicates for each concentration. Superscripts show multiple comparison of means between concentrations for the same day of observation of all metals and the water control (Tukey's test at 5% level of significance). Means followed with identical letters are not significantly different in a same column.

Table 3 Toxicity of Cu, Pb and Zn in terms of EC/LC (including estimation of 95% confidence limits) to survival, reproduction and size of *S. curviseta*.

	Control level	LC ₁₀ /EC ₁₀ mg/kg	EC ₅₀ mg/kg
Cu survival	96.2% (93.5% - 98.9%)	1585 (825 - 2344)	- †
Cu reproduction (individuals/container)	51.7 (41.0 - 62.4)	67.2 (25.6 - 109)	442 (168 - 716)
Cu size (mm)	1.76 (1.6 - 1.9)	90.1 (- 7.1 - 187)	463 (243 - 682)
Pb survival	95.9% (93.3% - 98.6%)	1838 (869 - 2806)	-
Pb reproduction (individuals/container)	76.9 (61.9 - 91.9)	642 (138 - 1147)	3212 (691 - 5733)
Pb size (mm)	1.68 (1.6 - 1.8)	4094 (- 1416 - 9604)	-
Zn survival	96.5% (91.5% - 101.6%)	2830 (1400 - 4260)	-
Zn reproduction (individuals/container)	73.5 (57.5 - 89.5)	180 (- 200 - 550)	2760 (450 - 5070)
Zn size (mm)	1.73 (1.6 - 1.9)	340 (- 360 - 1050)	3360 (450 - 6270)

†The values could not be calculated. Survival was less than 50%. EC, effect concentration; LC, lethal concentration.

Discussion

In this experiment, the EC_{50 reproduction} value for Cu (442 mg/kg, pH 6.5) determined in this study after 4 weeks exposure is lower than the EC_{50 reproduction} values of 700 and 751 mg/kg reported respectively by Sandifer and Hopkin (1996, 1997) and Greenslade and Vaughan (2003), for *F. candida* after 4 weeks of Cu exposure at pH 6.0. Sensitivity toward different metals may be species-specific and *S. curviseta* is probably more sensitive to Cu than *F. candida*. The EC_{50 reproduction} determined for Zn (2 760 mg/kg) for *S. curviseta* after 28 days exposure was higher than that determined by Smit and Van Gestel (1997), who calculated an EC_{50 reproduction} value of 864 mg Zn/kg for *F. candida* (using an initial 10 animals in each test container, with soil of pH 6.0 kept at 18 °C and 40% water-holding capacity) after 6 weeks of exposure. The differences between EC_{50 reproduction} values for each metal may be due to differences between species and also the different number and age of Collembola added to each soil, time of metal exposure, and soil properties.

Collembola may be less sensitive to Pb than other metals, as observed by Sandifer and Hopkin (1996) for *F. candida* in OECD soil. Those authors observed a much higher EC_{50 reproduction} for Pb (2 970 mg/kg at pH 6.0, 1 360 mg/kg at pH 5.0, and 3 160 mg/kg at pH 4.5) than for other metals, determined using Pb soil concentrations in the range 100–5 000 mg/kg. Fountain and Hopkin (2001) observed that *F. candida* feeding on yeast contaminated with Pb up to 49 200 mg/kg exhibited no significant change in mortality at all Pb concentrations. These results may be explained by Collembola being more tolerant to Pb than to other metals, either by avoidance or by tolerance mechanisms in the intestinal cells, where Pb is temporarily bound and subse-

quently removed from the body by shedding of the midgut epithelium at each molt (Joose & Verhoef, 1983). On the other hand, Pb easily precipitates with anions in soil, forms complexes with soil organic matter, and adsorbs to clay minerals. Therefore, although total Pb concentration in soil was high in this experiment, the amount of bioavailable Pb that could be absorbed by the eggs or juveniles from soil water might be low. However, further quantitative analysis is needed.

At higher concentrations of Cu and Zn (Cu at 200–3 200 mg/kg and Zn at 200–3 200 mg/kg), the growth rate of *S. curviseta* was significantly decreased after 28 days of exposure compared to the control. The slower growth may have resulted in fewer eggs being produced and subsequently reduced numbers of juveniles produced in heavy metal-treated samples. The reduced growth rate of Collembola at high metal concentrations may be because metal toxicity resulted in poor general health and reduced food consumption in comparison with the control. It has been reported that in natural populations of the Collembola species, *Orchesella cincta*, increased excretion efficiency consumed more energy and caused reduced growth on exposure to Cd-polluted soil (Posthuma *et al.*, 1992). Similarly, in our study high energy demands for metal excretion may be responsible for the reduced growth rate of *S. curviseta* in the presence of heavy metals.

In the present work, adults of Collembola were used in response to criticism of the ISO standard test procedure that uses juveniles 10–12 days old, which may be more vulnerable than adults at the beginning of the assay (Fountain & Hopkin, 2001; Crouau *et al.*, 1999). A Chinese field soil was selected in this study in order to obtain data more representative of field conditions. The compositions of

standard soils such as the OECD and ISO soils are based on the properties of European soils and have higher pH and organic matter than many Chinese soils. However, standard soils are useful when used in comparison with field soils in the Collembola test to assess the influence of different soils on metal bioavailability. A range of Chinese field soils with different soil properties, either naturally or artificially contaminated with metals, may be more useful in Collembola bioassay tests to develop a method more easily extrapolated to field conditions.

To better understand the effects of heavy metals and their bioavailability on *S. curviseta*, it may be useful to analyze metal concentrations in the bodies of the springtails. In this experiment, the sensitivity of *S. curviseta* toward Cu, Zn and Pb has been established, with the greatest sensitivity for reproduction and growth to Cu. *Sinella curviseta* was tolerant of high levels of Pb. We suggest that *S. curviseta* is potentially important as a bioindicator of environmental changes, particularly in Chinese contaminated areas, since it has been recorded abundantly in agricultural areas exposed to high levels of pesticides and rehabilitated mine sites. Further research on contaminants should be conducted using this species in comparison to other common Chinese Collembola species using Chinese field soils, which are ecologically more relevant than the European standard method and species (*F. candida*).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (Nos. 40671105 and 40432005).

References

- Cole, L.J., McCracken, D.I., Foster, G.N. and Aitken, M.N. (2001) Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western Scotland. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83, 177–189.
- Crouau, Y. and Moia, C. (2006) The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: An indicator of soil toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 115–121.
- Crouau, Y., Chenon, P. and Gisclard, C. (1999) The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology*, 12, 103–111.
- Fountain, M.T. and Hopkin, S.P. (2001) Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48, 275–286.
- Greenslade, P. and Vaughan, G.T. (2003) A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia*, 47, 171–179.
- ISO (International Organization for Standardization) (1999) Soil Quality – Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. ISO/DIS 11267. Geneva, Switzerland.
- Joose, E.N.G. and Verhoef, S.C. (1983) Lead tolerance in Collembola. *Pedobiologia*, 25, 11–18.
- Ke, X., Xu, J., Gao, Y., Wang, Y., Wu, L., Song, J. and Luo, Y. M. (2004) Effects of heavy metals on population and community parameters of soil collembolans and earthworms in a heavily polluted area in Eastern China – field investigation. The 2nd International Conference on Soil Pollution and Remediation, November 9–12, Nanjing, China, pp. 113–114.
- Kula, H. and Heimbach, U. (1998) Reproducibility in soil toxicity testing. *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests* (eds. H. Løkke & C.A.M. Van Gestel), pp. 33–40. Wiley, New York.
- Lock, K. and Janssen, C.R. (2001) Test designs to assess the influence of soil characteristics on the toxicity of copper and lead to the oligochaete *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology*, 10, 137–144.
- Nursita, A.I., Singh, B. and Lees, E. (2005) The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 306–314.
- Park, E.K. and Lees, E.M. (2004) The interaction of endosulfan with the Collembolan, *Proisotoma minuta* (Tullberg): toxicity, the effects of sub-lethal concentrations and metabolism. *Pest Management Science*, 60, 710–718.
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F. and Van Straalen, N.M. (1992) Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations of *Orchesella cincta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 146–156.
- Posthuma, L. (1990) Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites. *Journal of Applied Ecology*, 27, 609–622.
- Sandifer, R.D. and Hopkin, S.P. (1996) Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem 1902 (Collembola) in a standard test system. *Chemosphere*, 33, 2475–2486.
- Sandifer, R.D. and Hopkin, S.P. (1997) Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 125–130.
- SAS Institute Inc. (2004) *SAS/STAT® 9.1 User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Smit, C.E. and Van Gestel, C.A.M. (1995) Influence of temperature and humidity fluctuations on the sensitivity of *Folsomia candida* for zinc. Contaminated Soil '95 (eds. W.J. Van den Brink, R. Bosman & F. Arendt), pp. 645–646. Kluwer

- Academic, Dordrecht.
- Smit, C.E. and Van Gestel, C.A.M. (1996) Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Applied Soil Ecology*, 3, 127–136.
- Smit, C.E. and Van Gestel, C.A.M. (1997) Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 213–222.
- Tranvik, L., Bengtsson, G. and Rundgren, S. (1993) Relative abundance and resistance traits of two Collembola species under metal stress. *Journal of Applied Ecology*, 30, 43–52.
- Van Gestel, C.A.M. and Van Diepen, A.M.F. (1997) The influence of soil moisture content on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, 123–132.
- Van Straalen, N.M. and Krivolutsky, D.A. (1996) *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 261.
- Wiles, J.A. and Krogh, P.H. (1998) Tests with the collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests* (eds. H. Løkke & C.A.M. Van Gestel), pp. 131–156. John Wiley, Chichester, UK.

Accepted May 5, 2008

	<p>LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES SUBSISTENTES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM) – SITIO S0131 (BOTADERO SAN JUAN DE BARTRA), CUENCA TIGRE</p> <p><i>ENERO, 2021</i></p>	
---	--	---

Artículo Técnico

**Toxicity of Eight Polycyclic Aromatic Compounds to
Red Clover (*Trifolium pratense*), Ryegrass (*Lolium
perenne*), and Mustard (*Sinapsis alba*)**



Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*)

Line E. Sverdrup^{a,b,*}, Paul Henning Krogh^c, Torben Nielsen^d,
Christian Kjær^c, Jørgen Stenersen^b

^a Jordforsk, Norwegian Centre for Soil and Environmental Research, Frederik A. Dahls vei 20, N-1432 Ås, Norway

^b Department of Biology, University of Oslo, P.O. Box 1050, Blindern, N-0316 Oslo, Norway

^c National Environmental Research Institute, Department of Terrestrial Ecology, Vejlsovej 25,
DK-8600 Silkeborg, Denmark

^d Riso National Laboratory, Department of Plant Biology and Biogeochemistry, PBK 313, P.O. Box 49,
DK-4000 Roskilde, Denmark

Received 2 September 2002; received in revised form 21 May 2003; accepted 6 June 2003

Abstract

The effect of eight polycyclic aromatic compounds (PACs) on the seed emergence and early life-stage growth of three terrestrial plants (*Sinapsis alba*, *Trifolium pratense* and *Lolium perenne*) were studied in a greenhouse, using a Danish agricultural soil with an organic carbon content of 1.6%. After three weeks of exposure, seed emergence and seedling weight (fresh weight and dry weight) were determined. Exposure concentrations were verified with chemical analysis. The substances tested were four polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene, phenanthrene and fluorene), the N-, S-, and O-substituted analogues of fluorene (carbazole, dibenzothiophene and dibenzofuran, respectively), and the quinoline representative acridine. Seedling growth was a far more sensitive endpoint than seed emergence for all substances. Concentrations estimated to give a 20% reduction of seedling fresh weight (EC20-values) ranged from 36 to 290 mg kg⁻¹ for carbazole, 43 to 93 mg kg⁻¹ for dibenzofuran, 37 to 110 mg kg⁻¹ for dibenzothiophene, 140 to 650 mg kg⁻¹ for fluoranthene, 55 to 380 mg kg⁻¹ for fluorene, 37 to 300 mg kg⁻¹ for phenanthrene, and 49 to 1300 mg kg⁻¹ for pyrene. For acridine, no toxicity was observed within the concentration range tested (1–1000 mg kg⁻¹). As illustrated by the EC20-values, there was a rather large difference in sensitivity between the species, and *T. pratense* was the most sensitive of the species tested.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Plants; Soil; PAH; Heterocyclic; Ecotoxicity

1. Introduction

As primary producers, plants are essential components of the terrestrial ecosystem. Their relevance for the hazard and risk assessment of common soil contaminants should therefore be obvious. Already in 1984, an OECD Guideline was made available for toxicity testing with terrestrial plants (OECD, 1984), but still, relatively few plant toxicity data are available for substances other than pesticides and some metals.

* Corresponding author. Address: Jordforsk, Norwegian Centre for Soil and Environmental Research, Frederik A. Dahls vei 20, N-1432 Ås, Norway. Tel.: +47-64-94-81-63; fax: +47-64-94-81-10.

E-mail address: line.sverdrup@jordforsk.no (L.E. Sverdrup).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a variable group of compounds, all being made up of 2–7 benzene rings. PAHs are released due to both natural and man-made processes, e.g. burning of biomass or fossil fuels, and they are widespread in the environment. In general, PAHs are characterised by “low to very low” water solubility and “low to moderate” volatility (Mackay et al., 1992). The half-lives of PAHs vary from 1 week to 2 months in aquatic environments, 2 months to 2 years in soils, and 8 months to 6 years in sediments (Mackay et al., 1992).

At coal/tar contaminated sites, N-, S-, O-polycyclic aromatic compounds (PACs) are typically present at a concentration of about 1–10% of the total PAH/PAC concentration (Gissel-Nielsen and Nielsen, 1996). PACs constitute a diverse group of chemicals with respect to physico-chemical properties, and the phytotoxic properties of these compounds are not sufficiently characterised for terrestrial plants.

Some PAHs have been tested earlier for toxicity to some species of terrestrial plants (e.g. Mitchell et al., 1988; Hulzebos et al., 1993; Maliszewska-Kordybach and Smreczak, 2000), and from these studies, significant effects on seedling growth have been reported in the range of 10 to >1000 mg kg⁻¹. For the N-, S-, O-substituted compounds, phytotoxicity has been studied much less, but Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) found that acridine was very toxic to a dicotyledon species (*Brassica campestris*), toxic effects being observed even at the 1 mg kg⁻¹ exposure level. This suggested that the N-, S-, O-PACs might be important for the phytotoxicity of coal/tar contaminations, despite their low concentrations. However, no authors have tried to determine the relative toxicity of PAHs and N-, S-, O-PACs by testing both groups of compounds in the same study (i.e. using the same soil type).

To increase knowledge about the phytotoxicity of coal/tar constituents, the first objective of the present study was to generate sub-lethal plant ecotoxicity data for a number of PACs relevant to coal/tar contaminated soils. Secondly, in order to investigate the relative phytotoxicity of PAHs and some N-, S-, O-PACs, four substances from each of these two groups were selected: fluoranthene, pyrene, phenanthrene and fluorene were selected as representatives of PAHs, and the N-, S-, and O-substituted analogues of fluorene (carbazole, dibenzothiophene and dibenzofuran, respectively), and acridine were selected as representatives of the heterocyclic PACs. These eight substances are all commonly found in relatively high concentrations at sites contaminated by creosote/tar.

The third objective of the study was to investigate whether a general trend in relative sensitivity could be found between some selected species of plants, as such information could be useful for the selection of bioassays for testing of PAC-contaminated field soils. Two dicotyledon plant species (red clover (*Trifolium pratense*) and mustard (*Sinapis alba*)), and one monocotyledon

species (ryegrass (*Lolium perenne*)) was selected for the study.

2. Materials and methods

2.1. Experimental soil

A Danish agricultural soil (Askov, Jutland) was used. Samples were dried at 80 °C for 24 h and subsequently sieved through a 2 mm mesh prior to use. The Askov soil is a sandy loam, and it has the following particle size distribution: coarse sand (200–2000 µm) 38.4%, fine sand (63–200 µm) 23.6%, coarse silt (20–63 µm) 10.0%, fine silt (2–20 µm) 12.3%, clay (<2 µm) 13.0%. The humus content of the soil was 2.8%, and the total content of organic carbon 1.6%. The soil pH_{H₂O}, density and the total cation exchange capacity (CEC) was 6.2, 1.135 (g cm⁻³ dry soil) and 8.14 meq, 100 g⁻¹, respectively.

2.2. Test species and seeds

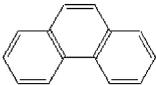
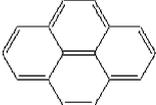
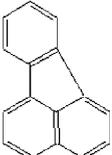
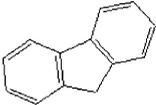
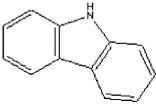
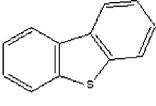
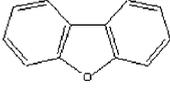
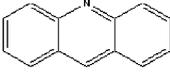
The test species were selected from the list recommended in OECD Guideline 208 (“Terrestrial plants, growth test” (OECD, 1984)). Seeds were purchased in September 2000. One batch was used for all tests with one species. *L. perenne* and *T. pratense* were purchased directly from the producer DLF Trifolium (Randers, Denmark), and *S. alba* seeds from Ove Rasmussens Planteskole (Silkeborg, Denmark). Prior to addition to the soil, seeds were inspected and damaged/dicoloured seeds were removed, and seeds of similar size were then selected for the experiments.

2.3. Sample preparation

Fluoranthene (purity >99%), fluorene, pyrene (desiccated), phenanthrene (purity >96%), dibenzothiophene, acridine (purity 97%), carbazole (purity 95%), and dibenzofuran (purity >99%) were purchased from Sigma-Aldrich. The *n*-octanol–water partitioning coefficients (log *K*_{ow}), soil–pore-water partitioning coefficients (*K*_d-values) in the Askov soil, and the structural formulas of the tested substances are summarised in Table 1.

Test substances were dissolved in acetone (J.T. Baker, HPLC quality) in a stock solution corresponding to the highest test dosage. For each of the test concentrations used, dilutions from the stock solution were made using acetone. Acetone (250 ml) with test substance was added to each concentration batch and mixed thoroughly into the 1.25 kg of soil by the use of aluminium containers and equipment. Pure acetone was used for the control samples. The soil was then transferred to glass plates and left in a fume hood for 24 h to evaporate the solvent. In addition to solvent controls, controls without solvents were also included.

Table 1
Octanol–water partitioning coefficients ($\log K_{ow}$), soil–water partitioning coefficients (K_d) in the Askov soil, and structural formula for the eight substances used in this study

Substance	$\log K_{ow}$	Estimated or measured K_d	Structural formula
Phenanthrene	4.56 ^a	304 ^b	
Pyrene	4.88 ^a	731 ^b	
Fluoranthene	5.16 ^a	667 ^b	
Fluorene	4.18 ^a	142 ^c	
Carbazole	3.51 ^d	101 ^c	
Dibenzothiophene	4.49 ^d	189 ^c	
Dibenzofuran	4.12 ^d	110 ^c	
Acridine	3.27 ^d	977 ^c	

^a Güsten and Sabljic (1995).

^b Estimated $K_d = K_{oc}$ (as reported by Güsten and Sabljic (1995))*0.016 (fraction of organic carbon).

^c Sverdrup et al. (2001).

^d Nielsen et al. (1997).

2.4. Principle of test

Tests were performed according to the OECD Guidelines 208: Terrestrial plants, Growth test (OECD, 1984). However, a slightly higher content of organic carbon (i.e. 1.6%) was used compared to what is recommended by this guideline (maximum of 1.5%), and in addition, test concentrations (1–1000 or 10–1000 mg kg^{-1}) differed from those recommended in the guideline (1–100 mg kg^{-1}).

For all tests, we used a geometric series of three or four test concentrations, separated by a factor of ten, in addition to solvent controls and controls without solvent. Four replicates were used per concentration. Following the sample preparation and evaporation of solvent, 200 ml water kg^{-1} was added (corresponding to 65% of the water holding capacity) and mixed thoroughly into the soil. This humid soil sample (1.5 kg) was divided into five sub-samples of 300 g each, one for each of the four replicates and one for the chemical analysis.

The test samples were transferred to test containers: transparent cylinders made of hard plastics (35 cm high, inner diameter 9.5 cm), closed at the top and bottom with lids. The upper lid was perforated with one hole, diameter 0.8 cm, to allow for transpiration and gaseous exchange. Five seeds were added to each replicate. Following the addition of seeds, the test tubes were weighed to the nearest 0.1 g and placed in the greenhouse.

2.5. Test conditions

For each substance, all three species were tested simultaneously, to achieve the best possible basis for comparing their individual outcome. The exposure period was 19–21 d, i.e. at least 14 d of exposure after which 50% of the seeds had emerged in the control samples. Test containers were weighed twice every week, and the lost amount of weight was replaced with water. At each time of watering, test containers were re-randomised for the position they occupied in the greenhouse.

The temperature in the greenhouse was continuously monitored. The minimum temperature was regulated, and set to 15 °C (night temperature). During daytime, the temperature usually increased, sometimes to more than 25 °C. To provide a photoperiod of 16/8 h light/dark, we used cultivation lamps of the type Philips SON/T Plus (400 W), which emit light in the wavelength spectrum of 310–780 nm. The lamps were regulated to supply additional light if the light intensity provided from outside the greenhouse dropped below 5 klux; light was switched off when intensity rose above 25 klux. Three lamps were used to illuminate a test area of approximately 3 m². The artificial light source gave an approximate photoflux density of 300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the soil surface.

2.6. Test performance and statistical analysis

It was decided to measure both the dry weight and fresh weight of the plants following exposure, to be able to compare the estimated toxicity values with respect to these two endpoints. At the end of the test, seedlings were cut off and immediately weighed to the nearest 0.00001 g (fresh weight). The seedlings were then dried at 80 °C for 24 h after which the dry weight was measured (to the nearest 0.00001 g). Toxic effects were assessed using both dry and fresh weight measurements.

For the effect estimations, the mean fresh weight and dry weight of seedlings in each replicate were used. Estimates of the concentrations that caused a 20% and 50% reduction of growth (the EC20- and EC50-values, respectively) were done by linear interpolation and the confidence intervals were calculated by the regression

procedure of SAS/STAT (SAS, 1999). Estimates of the concentrations that caused a 50% reduction in seed emergence (LC50-values) were only feasible for those substances that affected emergence by more than 50% at the highest concentrations tested (i.e. dibenzofuran and fluorene), and was done using probit analysis in SAS/STAT (SAS, 1999). NOEC-values were assessed using ANOVA and Dunnett's procedure (at a 5% significance level) (SAS, 1999) after testing for fulfilment of ANOVA requirements using SAS LAB (SAS, 1992).

2.7. Chemical analysis

Verification of $t = 0$ exposure concentrations was performed for all tests except the pyrene test (where samples got lost in the mail). The 10, 100 and 1000 mg kg^{-1} exposure levels were measured for all tests, and for phenanthrene, the 1 mg kg^{-1} exposure level was also included. Equal amounts of sodium sulphate were added to 100 mg soil (samples with 100 or 1000 mg kg^{-1}) or 1000 mg soil (samples with 1 or 10 mg kg^{-1}). Known amounts of internal standards (d_{10} -fluorene, d_8 -dibenzothiophene, d_{10} -phenanthrene, d_9 -acridine, d_{10} -fluoranthene, d_{10} -pyrene) were added to the soil sodium sulphate mixture. The soils were extracted ultrasonically six times with a 50:50% mixture of dichloromethane (Merck, p.a.) and acetone (Merck, p.a.). Each extraction lasted 30 min. The combined extracts were concentrated to 1.5 ml.

Identification and quantification of compounds were carried out with a gas chromatography–mass spectrometry system consisting of a Varian 3400 Star GC and a Varian Saturn III ion trap MS, using temperature programmable splitless injection and a 30-m XTI-5 fused silica capillary column coated with 95% methylsiloxane/5% phenyl-siloxane.

3. Results

3.1. Test performance

The solvent control and the control without solvent were not significantly different for any of the substances tested (ANOVA, $p > 0.05$, both on a dry weight and fresh weight basis), and replicates from these two controls could therefore be pooled. With the exception of the tests with *T. pratense* for the substances fluorene and fluoranthene, where only 77.5% of the seeds emerged, all test results were valid according to the validity criteria defined in the OECD test guideline, i.e. seed emergence $\geq 80\%$ and normal growth of control seedlings throughout the test.

The coefficients of variance (CV) for the controls differed between tests, and the difference between tests

was largest for *S. alba*. The CV for fresh weight measurements ranged from 9.8% to 44.1%, 14.4% to 17.6% and 13.6% to 27.1% for *S. alba*, *L. perenne* and *T. pratense*, respectively. The CV for dry weight measurements ranged from 5.8% to 48.0%, 11.4% to 18.9% and 12.2% to 26.3% for *S. alba*, *L. perenne* and *T. pratense*, respectively.

3.2. Chemical analyses

Unfortunately, the pyrene samples got lost in the mail, and the exposure concentrations for pyrene could therefore not be verified (Table 2). However, for the seven other substances, the chemical analyses showed that measured initial concentrations were close to nominal (averaged 99% and ranged from 93% to 112% of nominal values). The measured/nominal concentration ratio was similar for all exposure levels. From the results of the chemical analysis, it was decided that the use of nominal concentrations was adequate for the toxicity calculations.

3.3. General observations on toxicity

The results show that all substances but acridine affected seedling growth in at least one of the species tested (Table 3), while only dibenzofuran and fluorene significantly affected seed emergence within the concentration range tested (Table 3). Not all substances caused reduction in seedling growth close to 50% at the highest test concentrations, and for these substance/species combinations the EC50-values could not be estimated.

3.4. Toxicity of PAHs

Fresh weight EC20-values for the four PAHs ranged from 37 to >1000 mg kg⁻¹ and EC50 values ranged from 79 to >1000 mg kg⁻¹ (Table 3). Within each species, differences in toxicity between substances were smaller. For *T. pratense*, fresh weight EC20-values for the four PAHs ranged from 37 to 140 mg kg⁻¹, for *L. perenne*, fresh weight EC20-values for the four PAHs were in the range 300 to >1000 mg kg⁻¹, and for *S. alba* the EC20-values for these substances was in the range 77–650

Table 2
Results of the chemical analysis (samples were taken at the beginning of each test)

Substance	Nominal concentration (mg (kg dw) ⁻¹)	Measured concentration (mg (kg dw) ⁻¹)	Mean value for measured/ nominal concentrations
Phenanthrene	1	0.9	1.03
	10	9.9	
	100	114	
	1000	1100	
Pyrene	10	ND ^a	ND
	100	ND ^a	
	1000	ND ^a	
Fluoranthene	10	8.9	0.93
	100	86	
	1000	1030	
Fluorene	10	9.6	0.93
	100	88	
	1000	938	
Carbazole	10	9.5	1.12
	100	121	
	1000	1200	
Dibenzothiophene	10	9.9	1.02
	100	104	
	1000	1030	
Dibenzofuran	10	9.4	0.93
	100	80	
	1000	1060	
Acridine	10	9.8	0.95
	100	105	
	1000	825	

^aND: No data, samples lost in the mail.

Table 3

Estimated effect concentrations for 50% reduction in seed emergence (LC50), and the 50% and 20% reduction in fresh weight (FW) or dry weight (DW) of the seedlings (EC50 and EC20, respectively)

Substance	Species	Effects on seed emergence (mg kg ⁻¹) LC50 (95% c.i.)	Effects on seedling growth (mg kg ⁻¹)			
			Fresh weight basis		Dry weight basis	
			EC20 (95% c.i.)	EC50 (95% c.i.)	EC20 (95% c.i.)	EC50 (95% c.i.)
Phenanthrene	<i>S. alba</i>	≥1000	77 (41–110)	480 (350–620)	340 (270–410)	850 (680–1020)
	<i>T. pratense</i>	≥1000	37 (22–52)	79 (0–390)	46 (27–64)	190 (0–490)
	<i>L. perenne</i>	≥1000	300 (210–400)	760 (520–990)	300 (210–400)	760 (530–990)
Pyrene	<i>S. alba</i>	≥1000	120 (14–220)	>1000	810 (260–1300)	≥1000
	<i>T. pratense</i>	≥1000	49 (26–71)	380 (15–740)	56 (31–82)	640 (260–1000)
	<i>L. perenne</i>	≥1000	>1000	≥1000	≥1000	≥1000
Fluoranthene	<i>S. alba</i>	≥1000	650 (260–1000)	>1000	>1000	≥1000
	<i>T. pratense</i>	≥1000	140 (0–478)	710 (440–970)	150 (0–620)	750 (370–1100)
	<i>L. perenne</i>	≥1000	490 (320–670)	>1000	480 (340–620)	>1000
Fluorene	<i>S. alba</i>	≥1000	120 (12–220)	>1000	≥1000	≥1000
	<i>T. pratense</i>	950 (710–1200)	55 (26–83)	360 (88–630)	76 (25–130)	530 (250–800)
	<i>L. perenne</i>	≥1000	380 (0–1600)	950 (0–4000)	350 (270–430)	880 (670–1100)
Carbazole	<i>S. alba</i>	≥1000	89 (40–140)	>1000	>1000	≥1000
	<i>T. pratense</i>	≥1000	36 (20–52)	90 (49–130)	46 (21–71)	>1000
	<i>L. perenne</i>	≥1000	290 (0–2000)	≥1000	770 (190–1400)	≥1000
Dibenzothiophene	<i>S. alba</i>	≥1000	37 (12–62)	93 (31–160)	43 (6.0–79)	270 (110–430)
	<i>T. pratense</i>	≥1000	38 (20–55)	94 (51–140)	37 (22–51)	92 (56–130)
	<i>L. perenne</i>	≥1000	110 (0–230)	890 (520–1300)	74 (0–300)	640 (440–850)
Dibenzofuran	<i>S. alba</i>	1000 (NE ^a)	82 (0–240)	500 (320–690)	67 (0–170)	340 (270–400)
	<i>T. pratense</i>	510 (380–630)	43 (22–64)	160 (17–310)	45 (23–66)	190 (96–360)
	<i>L. perenne</i>	920 (NE ^a)	93 (0–190)	480 (410–540)	78 (0–360)	420 (220–610)
Acridine	<i>S. alba</i>	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
	<i>T. pratense</i>	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
	<i>L. perenne</i>	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000

^a NE: Could not be estimated.

mg kg⁻¹. Comparing the toxicity of the four PAHs for each of the three species investigated, it was evident that the relative effects from the four substances differed between species and exposure levels (Fig. 1A–C). In many cases fluoranthene was slightly less toxic than the other substances (Fig. 1A–C).

3.5. Toxicity of N-, S-, O-PACs

Acridine was not toxic to any of the three species investigated (Table 3). Fresh weight EC20-values for the three other N-, S-, O-PACs ranged from 36 to >1000 mg kg⁻¹ and EC50-values ranged from 90 to >1000 mg kg⁻¹ (Table 3). As for the PAHs, differences in toxicity were reduced when focusing on one species at the time. For *T. pratense*, fresh weight EC20-values for the three neutral N-, S-, O-PACs ranged from 37 to 89 mg kg⁻¹, for *L. perenne* EC20-values were in the range of

93–290 mg kg⁻¹, and for *S. alba*, EC20-values were in the range of 37–89 mg kg⁻¹.

3.6. Comparative toxicity of PAHs and N-, S-, O-PACs

For *T. pratense*, the 95% confidence intervals for the fresh weight EC20-values overlapped for all substances but acridine. Thus, there was no general difference in toxicity between PAHs and N-, S-, O-PACs for this species (Table 3). For *S. alba*, acridine (EC20 > 1000) and fluoranthene (EC20 of 650 mg kg⁻¹) were the least toxic and dibenzofuran was the most toxic (EC20 of 37 mg kg⁻¹) of the substances tested. The remaining five substances had EC20-values in the range of 77–120 mg kg⁻¹, indicating no general difference in toxicity between PAHs and N-, S-, O-PACs. For *L. perenne*, fresh weight EC20-values for the neutral N-, S-, O-PACs ranged from 93 to 290 mg kg⁻¹, while the EC20-value for the PAHs ranged from 300 to >1000 mg kg⁻¹. Thus,

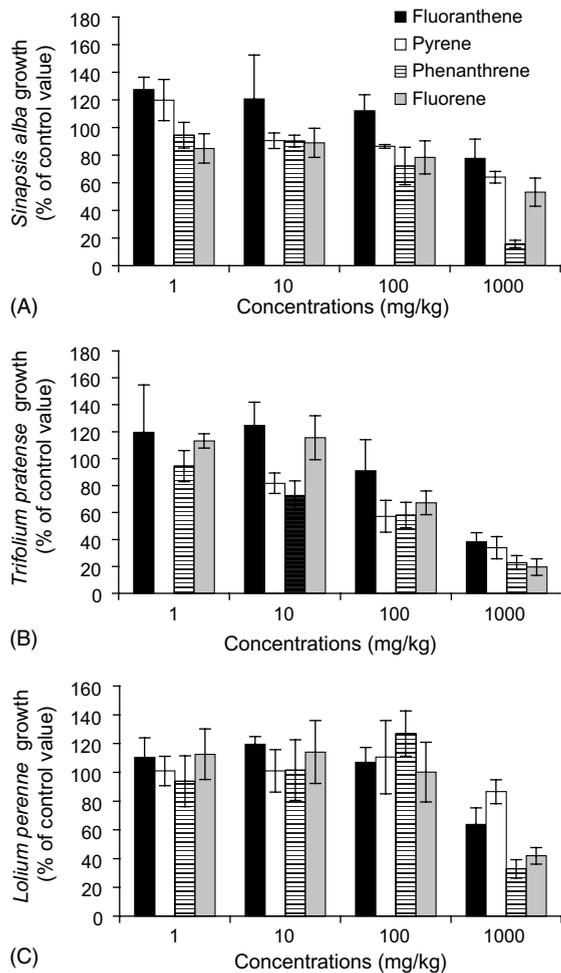


Fig. 1. Comparison of the toxicity of the four PAHs tested in this study for each of the three plant species used: (A) *S. alba*, (B) *T. pratense* and (C) *L. perenne*. Vertical bars represent \pm SD.

for this species, N-, S-, O-PACs were slightly more toxic than PAHs.

A comparison of the dose–response relationship of fluorene and its N-, S-, and O-substituted analogues showed that for *S. alba* (Fig. 2A), dibenzothiophene and dibenzofuran were significantly more toxic than fluorene and carbazole at the highest exposure level. Considering *T. pratense*, toxicity of the four substances were generally in the same range (Fig. 2B), and for *L. perenne*, dibenzothiophene was more toxic and carbazole less toxic than fluorene at the highest exposure concentration (Fig. 2C).

3.7. Relative sensitivity

The relative sensitivity of the three species tested is illustrated by their fresh weight EC₂₀-values in Fig. 3.

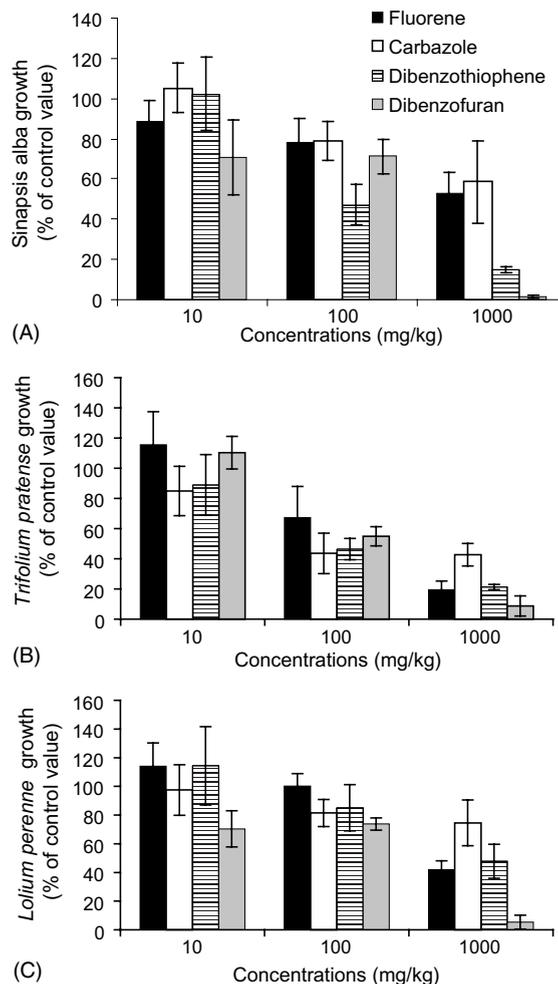


Fig. 2. Comparison of the toxicity of fluorene and its N-, S-, and O-analogues (carbazole, dibenzothiophene and dibenzofuran, respectively) for the three plant species used: (A) *S. alba*, (B) *T. pratense* and (C) *L. perenne*. Vertical bars represent \pm SD.

Trifolium pratense was the most sensitive to all substances, and only in the case of dibenzothiophene, *S. alba* sensitivity was at the same level (Fig. 3). The general rank in sensitivity is *T. pratense* > *S. alba* > *L. perenne* (Fig. 3), and Table 3 shows that in many cases (i.e. for phenanthrene, fluoranthene and carbazole), there is little or no overlap between the 95% confidence limits for the EC₂₀-values, suggesting that the observed differences in sensitivity were statistically significant.

3.8. Soil pore-water concentrations

In an earlier study (Sverdrup et al., 2001), we have determined the soil–pore-water partitioning coefficients for fluorene and the four N-, S-, O-substituted substances

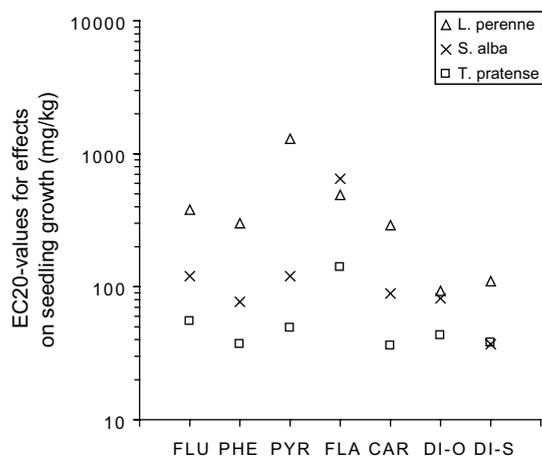


Fig. 3. Relative sensitivity of the three plant species to the eight substances tested. The endpoint used for comparing sensitivity was the 20% reduction in seedling growth (EC20). Substance names on the x-axis: FLU = fluorene, PHE = phenanthrene, PYR = pyrene, FLA = fluoranthene, CAR = carbazole, DI-O = dibenzofuran, DI-S = dibenzothiophene.

in the soil type also used in the present study. Along with estimated soil–pore-water partitioning coefficients for the remaining three substances, these values enabled the calculation of (fresh weight) EC20- and EC50-values into estimated pore-water concentrations. Plots of “pore-water” EC20-values and EC50-values (mmol l^{-1}) on the lipophilicity ($\log K_{ow}$) of the substances are given in Fig. 4A and B, respectively. The regression analysis showed that in only one case (i.e. EC50-values for *L. perenne*) a significant increase in toxicity with increasing lipophilicity was found. For the EC50-values, the regression analysis gave $r^2 = 0.14$ ($p = 0.40$, $n = 7$) for *T. pratense*, $r^2 = 0.46$ ($p = 0.094$, $n = 7$) for *S. alba* and $r^2 = 0.81$ ($p = 0.038$, $n = 5$) for *L. perenne*. The regression analysis for the EC20-values gave $r^2 = 0.49$ ($p = 0.079$, $n = 7$) for *T. pratense*, $r^2 = 0.19$ ($p = 0.32$, $n = 7$) for *S. alba* and $r^2 = 0.15$ ($p = 0.38$, $n = 7$) for *L. perenne*. A significant relationship between pore-water toxicity and lipophilicity would normally be expected for chemicals acting by a narcotic mode of toxic action (Verhaar et al., 1995), and these results thus suggest that some of the substances in question may have more specific modes of toxic action.

However, from Fig. 4A, it can be argued that the low toxicity of fluoranthene ($\log K_{ow}$ of 5.2) to *S. alba* and *T. pratense* has a strong influence on the parameter estimates in the regression analysis. When the data point for this substance was removed, a significant relationship between EC20-values ($\log(\text{mmol l}^{-1})$) and $\log K_{ow}$ was obtained for both these species ($r^2 = 0.69$; $p = 0.040$; $n = 6$ for *T. pratense* and $r^2 = 0.75$; $p = 0.026$; $n = 6$ for *S. alba*).

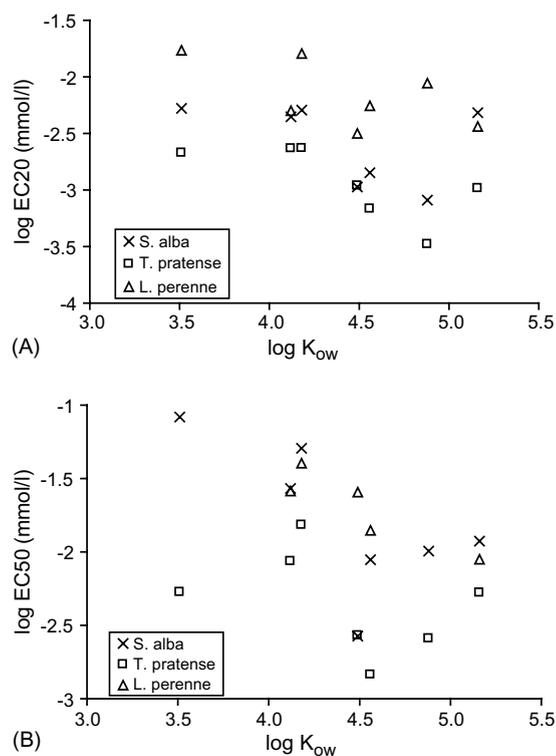


Fig. 4. Plot of pore-water toxicity, expressed as $\log(\text{mmol l}^{-1})$, against the $\log K_{ow}$ of the substances: (A) 20% reduction in seedling growth (EC20-values) and (B) 50% reduction in seedling growth (EC50-values).

3.9. Fresh weight vs dry weight

We made the observation that in most tests, the dry weight/fresh weight ratio increased with increasing test concentrations. This effect was most pronounced for the mustard, *S. alba* (Fig. 5). The consequence of this trend was that toxicity values (EC20 or EC50) were lower when based on dry weight measurements compared to fresh weight measurements (Table 3). In three cases, the difference between estimated EC20-values for the fresh weight data were a factor >4 lower than for the dry weight data (i.e. EC20-values for *S. alba* and the substances phenanthrene, pyrene and carbazole), and in all these instances, there was no overlap in the calculated 95% confidence intervals for these two endpoints.

4. Discussion

The main findings of this study are summarised as follows: four PAHs and the N-, S-, O-substituted analogues of fluorene were all found to be toxic to terrestrial plants. Toxicity of these seven substances were in the

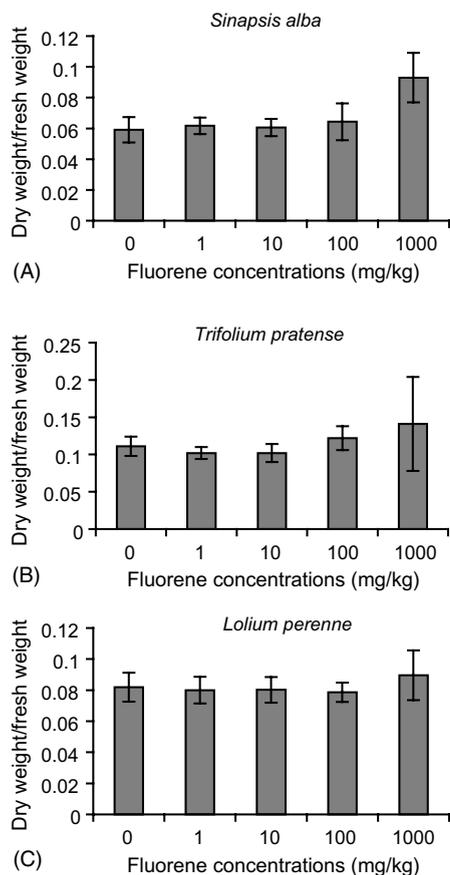


Fig. 5. Effect of fluorene on the dry-to-wet weight ratio of plants: (A) *S. alba*, (B) *T. pratense* and (C) *L. perenne*. Vertical bars represent \pm SD.

same range, indicating that neutral heterocyclic compounds and PAHs have similar toxicity to plants, as expressed on the basis of total soil concentrations. Toxic effects (EC₂₀) were generally observed at concentrations above 30 mg kg⁻¹ soil, and the red clover (*T. pratense*) was generally the most sensitive of the species tested. Acridine, a benzoquinoline representative with basic properties, was not toxic to any of the plants within the concentration range tested.

4.1. Comparison with other plant studies

It is generally agreed that soil sorption of neutral organic chemicals increases with increasing organic carbon content in soils (Güsten and Sabljic, 1995). This has the effect that toxicity data generated in different soil types are not strictly comparable, unless corrected for differences in soil characteristics. The EC₅₀-values (50% reduction in seedling growth) found for the PAHs in our study were in the range 79 to >1000 mg kg⁻¹, and hence

they are in the same range (or somewhat higher) than the values reported by Hulzebos et al. (1993) for the toxicity of naphthalene and acenaphthene to *Lactuca sativa* (EC₅₀-values of 100 and 37 mg kg⁻¹, respectively). In the Hulzebos study, a soil with a similar organic carbon content (1.4%) was used, and the results based on total soil concentrations should therefore be comparable.

The observed effects in our study are also in accordance with the findings of Mitchell et al. (1988), who tested anthracene to six terrestrial plants and found that only two of these species had EC₅₀-values below 1000 mg kg⁻¹. Furthermore, the EC₂₀-values for the PAHs in the present study (37 to >1000 mg kg⁻¹) are in the same range as EC₂₀-values reported by Maliszewska-Kordybach and Smreczak (2000), who studied the effects of a mixture of four PAHs (fluorene, anthracene, pyrene and chrysene) with six species of terrestrial plants. Maliszewska-Kordybach and Smreczak (2000) found EC₂₀-values for tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a sandy soil equal to 20 mg kg⁻¹ for the sum of the four PAHs, while the EC₂₀ for the other species generally exceeded 100 mg kg⁻¹.

To our knowledge, only one of the N-, S-, O-PACs used in our study has earlier been tested for toxicity to terrestrial plants. Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) investigated the toxicity of acridine to *B. campestris*, *L. multiflorum* and *Hordeum vulgare* in two soils low in organic matter content. They found that the seed production of *B. campestris* was inhibited even at the lowest exposure concentration used (1 mg kg⁻¹), and no seedlings survived at the 100 mg kg⁻¹ exposure level. The reason why acridine was not toxic in our studies (even at a concentration of 1000 mg kg⁻¹) may be due to its very strong sorption to the test soil (Table 1). Being a basic compound, this substance exists in two forms in the soil: a neutral compound and a cationic one. The ratio between the neutral and cationic forms depends on soil pH, and hence, soil sorption depends on pH, organic carbon content (sorption of neutral as well as cationic form), and CAC (sorption of cationic form to clay minerals). In the two soils tested in the Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) study, the pH, organic matter content and clay content was measured to 7.5, 2.2% and 28.2% and 7.4, 1.5% and 16.8% for the sandy loam and the loamy sand, respectively. The pH in the Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) study was 1.2–1.3 units higher than in the soil used in the present study, and this has probably affected the speciation of acridine in the soil solution, leaving more acridine in the uncharged form in the Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) study. A higher pH would thus lead to a lower degree of acridinium ion sorption and a higher proportion of the dissolved acridine being neutral and thus available for biological uptake. Both factors may have contributed to a higher toxicity in the Gissel-Nielsen and Nielsen (1996) study. However, the difference in sensitivity between the two studies could also be caused by the use of different plant species.

4.2. Comparison with other terrestrial organisms

This study is part of a large project investigating the toxicity of PACs to terrestrial organisms. The eight substances tested in this study have earlier been tested with three terrestrial invertebrate species (Sverdrup et al., 2001, 2002a,b) and three microbial endpoints (Sverdrup et al., 2002c), using the same soil type as in the present study.

Generally, the studies with invertebrates and micro-organisms confirm the trend that based on total soil concentrations, PAHs and N-, S-, O- substituted analogues are equally toxic. For the terrestrial invertebrates, EC10-values for these substances was found to be in the range 10 to 40 mg kg⁻¹, and acridine was significantly less toxic than the seven other substances to springtails and enchytraeids (Sverdrup et al., 2001, 2002a), but not to earthworms, indicating specific toxicity towards the earthworm species used (Sverdrup et al., 2002b). Compared to the results from the soil invertebrate- and micro-organism studies, EC20-values for the red clover was about a factor of 5 higher than the EC10-value of the most sensitive invertebrate species, and within a factor of 4 for all substances but fluoranthene compared to the EC10-value for the soil nitrification process.

4.3. Pore-water concentrations

Several authors have suggested that plants are primarily exposed through contaminants in the pore-water. Hulzebos et al. (1993) investigated the toxicity of 76 substances to lettuce (*Lactuca sativa*) in both soil and nutrient solutions, and when the soil toxicity values were expressed as equilibrium pore-water concentrations by the use of calculated adsorption coefficients, these values correlated well with those obtained in the nutrient solution studies. Van Gestel et al. (1996) investigated the toxicity of some chlorophenols and chloroanilines to *La. sativa* in two soil types differing in soil organic matter content, and concluded that for plants, toxicity and therefore the bioavailability of organic chemicals in soil mainly depend on the concentration in the soil solution.

In the studies with invertebrates and micro-organisms, as referred to in an earlier section, we found a significant relationship between the pore-water toxicity (mmol l⁻¹) and lipophilicity (log *K*_{ow}) of the eight chemicals in question (Sverdrup et al., 2001, 2002a,b,c)—for earthworms a significant relationship was obtained only when acridine was excluded from calculations (Sverdrup et al., 2002b). An increase in toxicity with increasing log *K*_{ow} is expected for chemicals acting by narcosis as the mode of toxic action because this substance parameter can be causatively linked to the process of bioaccumulation in many organisms.

For plants, both the studies by Hulzebos et al. (1993) and Van Gestel et al. (1996) showed that toxicity of the chemicals tested increased with increasing log *K*_{ow}. Both these studies used the 50% reduction in seedling growth (EC50) as endpoint in the toxicity studies with *La. sativa*, as recommended by the OECD Guideline (OECD, 1984).

In the present study, a significant negative relationship between toxicity (mmol l⁻¹) and the log *K*_{ow} was found for the fresh weight EC50-values of *L. perenne* and for the fresh weight EC20-values of *S. alba* and *T. pratense* following removal of the data points for fluoranthene, thus suggesting a rather non-specific mode of toxic action for the compounds in question. The fact that a significant relationship is not found for all endpoints (and species) could be explained by several different mechanisms, e.g. that pore-water is not the main exposure route for the species tested, that bioaccumulation is not adequately described by the log *K*_{ow}, or that the substances do not act by narcosis as the mode of toxic action. However, the fact that a significant correlation was obtained between toxicity and the log *K*_{ow} for some of the endpoints in the present study, suggests that the same mode of toxic action (narcosis) is generally the case for phytotoxicity for PAHs as well as N-, S-, O-PACs. The results hence support the conclusion that N-, S-, O-PACs and PAHs have similar toxicities to plants.

4.4. Relative sensitivity

It is generally agreed that there is no such thing as the most sensitive species to all substances, due to the many different modes of toxic action (Cairns, 1986). However, our aim of comparing the sensitivity of the three plants used was to suggest which of these species that would be the most sensitive bioassay for the testing of PAH/PAC contaminated field soils. The finding that the red clover was generally more sensitive than mustard and ryegrass (Fig. 3) suggest that this species is suitable for such investigations. However, the final choice of bioassay for a certain polluted site must also depend on other factors such as applicability in relation to soil characteristics (e.g. pH) and ecological relevance.

4.5. Fresh weight vs dry weight

At the highest test concentrations of most of the chemicals, necrotic tissue was observed in the two dicotyledon species. This was reflected by an increase in the dry weight/fresh weight ratio with increasing concentration for these species (Fig. 5) and the fact that estimated EC20- and EC50-values were in many cases significantly lower when calculated on the basis of fresh weight as compared to dry weight (Table 3). As the difference in estimated ECx-values in several cases were larger than a factor of four (Table 3), we suggest that future phyto-

toxicity studies focus on seedling fresh weight rather than dry weight as endpoints when testing chemicals.

5. Conclusions

With the exception of the substance acridine, eight PACs with $\log K_{ow}$ -values ranging from 3.5 to 5.2 was found to reduce the early life-stage growth of terrestrial plants. Estimated EC20-values averaged 210 mg kg⁻¹ and were in the range of 36–1300 mg kg⁻¹, based on seedling fresh weight after 19–21 days of exposure. For many of the substances, there was a large difference in sensitivity between the three species tested, and the red clover was the most sensitive of the species tested.

Acknowledgements

This study was financed by grants from the Norwegian Research Council and NorFA, and it was also supported by the Centre for Biological Processes in Contaminated Soil and Sediment (BIOPRO) under the Danish Environmental Research Program. We would like to thank Trine Guldager Sørensen, Zdenek Gavor, Elin Jørgensen and Karen Kjær Jacobsen for technical assistance, and two anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

References

- Cairns, J., 1986. The myth of the most sensitive species. *Bioscience* 36, 670–672.
- Gissel-Nielsen, G., Nielsen, T., 1996. Phytotoxicity of acridine, an important representative of a group of tar and creosote contaminants, N-PAC compounds. *Polycyclic Aromatic Compounds* 8, 243–249.
- Güsten, H., Sabljic, A., 1995. Overview of structure–activity relationships for environmental endpoints: QSARs for soil sorption. Final Report. Contract EV5V-CT92-0211. European Commission, Luxembourg, Luxembourg.
- Hulzebos, E.M., Adema, D.M.M., Dirven-van Breemen, E.M., Henzen, L., van Dis, W.A., Herbold, H.A., Hoekstra, J.A., Baerselman, R., van Gestel, C.A.M., 1993. Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1079–1094.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., 1992. Illustrated Handbook of Physical–Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—effect on plants. *Environmental Technology* 21, 1099–1110.
- Mitchell, R.L., Burchett, M.D., Pulkownik, A., McCluskey, L., 1988. Effects of environmentally hazardous chemicals on the emergence and early life stage growth of selected Australian plants. *Plant and Soil* 112, 195–199.
- Nielsen, T., Siigur, K., Helweg, C., Jørgensen, O., Hansen, P.E., Kirso, U., 1997. Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic acid as studied by high-performance liquid chromatography. *Environmental Science and Technology* 31, 1102–1108.
- OECD, 1984. Terrestrial Plants, Growth Test. OECD Guidelines (208). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- SAS Institute Inc., 1992. SAS L⁻¹ AB[®] Software: User's Guide, Version 6, first ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT[®] User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sverdrup, L.E., Kelley, A.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Jensen, J., Scott-Fordsmand, J.J., Stenersen, J., 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.
- Sverdrup, L.E., Jensen, J., Kelley, A.E., Krogh, P.H., Stenersen, J., 2002a. Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Clitellata). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 109–114.
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T., Stenersen, J., 2002b. Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1927–1933.
- Sverdrup, L.E., Ekelund, F., Krogh, P.H., Nielsen, T., Johnsen, K., 2002c. Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1644–1650.
- Van Gestel, C.A.M., Adema, D.M.M., Dirven-van Breemen, E.M., 1996. Phytotoxicity of some chloroanilines and chlorophenols, in relation to bioavailability in soil. *Water Air and Soil Pollution* 88, 119–132.
- Verhaar, H.J.M., Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M., 1995. Overview of structure–activity relationships for environmental endpoints: QSARs for ecotoxicity. Contract EV5V-CT92-0211. European Commission, Luxembourg, Luxembourg.