

אוניברסיטת תל-אביב
הפקולטה למדעי החיים ע"ש גורג' ס. וייז

הרחקה של אסטרוגנים ומזהמים קונבנציונאליים מקולחים מוניציפאליים שניוניים
באמצעות אגנים ירוקים עבור שימוש חוזר

חיבור לשם קבלת התואר "דוקטור לפילוסופיה"

מאת

דנה מילשטיין

הוגש לסנאט של אוניברסיטת תל-אביב
(מרץ, 2010)

עבודה זו נעשתה בהדרכת

פרופ' אביטל גזית, המחלקה לזואולוגיה, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת תל-אביב
ד"ר דרור אבישר, הפקולטה למדעי הרוח, אוניברסיטת תל-אביב

תודות

ברצוני להודות לכל מי שסייע בביצוע ובקידום המחקר. בכלל זה לכל אלו שנטלו חלק בתהליך ההקמה, התפעול, התחזוקה והניטור של מערכת המחקר בשפד"ן. לאלו שסייעו בהיבטים טכניים של אנליזות כימיות מורכבות ולכל החברים שהתעניינו והשיאו עצות טובות לאורך הדרך.

ובמיוחד,

- לפרופ' אביטל גזית, מנחה העבודה.
- לד"ר דרור אבישר, מנחה העבודה.
- לחברי הוועדה המלווה, לפרופ' מיכל גרין מהטכניון, פרופ' רמי קרן מהמכון הוולקני ולפרופ' עמוס אולמן ופרופ' יצחק צ'ושניאק מאוניברסיטת תל-אביב.
- למשרד לאיכות הסביבה באיטליה על סיוע במימון מערכת המחקר.
- לביה"ס פורטר ללימודי סביבה באוניברסיטת תל אביב על סיוע וקידום שיתוף הפעולה הנ"ל.
- למשרד המדע, התרבות והספורט על סיוע באמצעות מלגת אשכול.
- לקרן ריגר (Riger Foundation, USA-Fellowship Program) על סיוע באמצעות מלגה.
- ליגאל גוזלן, על הדרכה וייעוץ בתחום הכימיה האנליטית.
- לטכנאים: ירון קרוטמן, פאול ברקוביץ, אלון סמברג, אייל גוטנטאג וסמי פרנק על הסיוע בתחזוקת מערכת המחקר בשפד"ן ובמחקר.
- לאורי מורן, על סיוע בהקמה, בתחזוקה ובתפעול של האגנים הירוקים בשפד"ן.
- למכון טיהור שפכים שפד"ן ובעיקר לנלי איצקסון טל על אירוח בשטח המפעל.
- לצוות הסטודנטים במעבדה לאקולוגיה של מקווי מים.
- לצוות הסטודנטים במעבדה להידרו-כימיה.
- למשפחתי.

תוכן עניינים

מספר		תקציר עברית
עמוד		רשימת איורים
ו'		רשימת טבלאות
י'		רשימת קיצורים
יג'		
טז'		
1	פרק 1: מבוא
3	פרק 2: רקע מדעי
3	2.1 : מיקרו-מזהמים
4	2.2 : אסטרוגנים
4	2.2.1 : מבנה ותכונות כימיות-פיסיקליות
5	2.2.2 : מקורות זיהום וגורל אסטרוגנים בסביבה
7	2.2.3 : השפעות של זיהום אסטרוגנים על החי
10	2.3 : אגנים ירוקים
10	2.3.1 : אגנים ירוקים טבעיים
10	2.3.2 : אגנים ירוקים מלאכותיים
14	פרק 3: השערות המחקר ומטרות העבודה
14	3.1 : השערות המחקר
14	3.2 : מטרות המחקר
15	פרק 4: התאמה של שיטה אנליטית לזיהוי וכימות אסטרוגנים בקולחים
	פרק 5: המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים באמצעות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים
17	5.1 : מבוא
17	5.2 : רקע מדעי
19	5.3 : שיטות וחומרים
19	5.3.1 : ספיחה של אסטרוגנים לדפנות של כלי המבחן
19	5.3.2 : ספיחה של אסטרוגנים למצע בזלת ללא ביופילם
20	5.3.3 : גידול ביופילם שמקורו באגנים ירוקים
21	5.3.4 : ניטור של מערכת גידול הביופילם
21	5.3.5 : זיהוי ובידוד תוצרי ביוטרנספורמציה של אסטרוגנים
23	5.3.6 : המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים
25	5.4 : תוצאות
25	5.4.1 : ספיחה של אסטרוגנים לדפנות של כלי המבחן
25	5.4.2 : ספיחה של אסטרוגנים למצע בזלת ללא ביופילם
25	5.4.3 : זיהוי ובידוד תוצאי ביוטרנספורמציה של אסטרוגנים
31	5.4.4 : המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים
39	5.5 : דיון ומסקנות
39	5.5.1 : זיהוי ובידוד תוצרי המרה של אסטרוגנים
41	5.5.2 : המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים
47	פרק 6: ליטוש קולחים שניוניים באמצעות אגנים ירוקים
47	6.1 : מבוא
47	6.2 : רקע מדעי
47	6.2.1 : מנגנונים לסילוק מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים
51	6.2.2 : ליטוש קולחים באגנים ירוקים
54	6.3 : שיטות וחומרים
54	6.3.1 : מבנה מערכת המחקר אגנים ירוקים בשפד"ן
56	6.3.2 : מצע האגן
57	6.3.3 : הרכב הצומח
58	6.3.4 : זמן שהייה הידראולי
59	6.3.5 : משתנים לימנולוגיים ואיכות מים
61	6.4 : תוצאות
75	6.5 : דיון ומסקנות

87	פרק 7: הרחקה של אסטרונגנים באגנים ירוקים
87	7.1 : מבוא
87	7.2 : רקע מדעי
87	7.2.1 : מנגנונים פוטנציאליים לסילוק אסטרונגנים באגנים ירוקים
88	7.2.2 : עדויות להרחקה של אסטרונגנים באגנים ירוקים
90	7.3 : שיטות וחומרים
91	7.4 : תוצאות
97	7.5 : דיון ומסקנות
97	7.5.1 : אסטרונגנים בקולחים שניוניים
98	7.5.2 : הרחקה של אסטרונגנים בטכנולוגיה של אגנים ירוקים
104	פרק 8: דיון כללי מסכם ומסקנות
104	8.1 : שאריות מזהמים בקולחים לאחר טיפול קונבנציונאלי
105	8.2 : הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים
107	8.3 : הרחקה של אסטרונגנים באגנים ירוקים
109	8.4 : המלצות למבנה ותפעול של אגנים ירוקים
111	8.5 : התאמה של הקולחים המטופלים באגנים ירוקים להזרמה לנחלים ולהשקיה
114	8.6 : סיכום המחקר והמשכו
115		רשימת מקורות
136		נספח 1: השוואה של שיטות אנליטיות לזיהוי אסטרונגנים
139		נספח 2: התאמה של שיטה אנליטית לזיהוי וכימות אסטרונגנים בקולחים
171		נספח 3: ערכים חודשיים ושנתיים של משתני איכות מים נבחרים בקולחים שניוניים במט"ש שפד"ן בשנת 2008
175		נספח 4: צילומי מחקר
180		נספח 5: מאפייני איכות מים בכלי הניסוי, במדיום מימי מועשר בנוטריאנטים ובקולחים שניוניים, בתחילתה ובתום הניסוי (4 ימים)
183		נספח 6: מדדי איכות מים נבחרים בכניסה ובמוצא אגנים ירוקים בזרימה עילית ותת-קרקעית בעולם
189		נספח 7: אפיון לימנולוגי של בריכות אגנים ירוקים בשפד"ן בשנות התפעול הראשונה והשלישית

תקציר

בעבודה הנוכחית נבחנה ההתאמה של טכנולוגיית אגנים ירוקים לטש קולחים עירוניים באיכות שניונית לאיכות המתאימה בין השאר לשיקום נחלים. מלבד הרחקה של מזהמים קונבנציונאליים הושם דגש על יעילות הרחקה של הורמונים אסטרונים.

בתום טיפול שניוני (ביולוגי) בשפכים נותרים בקולחים מזהמי מים קונבנציונאליים כחומר אורגאני, מוצקים מרחפים ותרובות חנקן וזרחן, לרוב בריכוזים של מ"ג בליטר. בקולחים השניוניים קיימים גם שאריות של מיקרו-מזהמים הכוללים תרכובות אורגאניות ספציפיות כאסטרונים, משבשי פעילות אסטרונגית, תרופות ותוצרי טיפוח אישי בריכוזים שבין ננוגרם ועד מיקרו-גרם בליטר. עם הזרמה של הקולחים לנחלים ושימוש בהם להשקיה מוצאים המזהמים הקונבנציונאליים והמיקרו-מזהמים את דרכם לסביבה. בדרך זו מסכנים המזהמים הנותרים בקולחים את בריאות הסביבה, החי והאדם.

אגנים ירוקים מייצגים טכנולוגיה אקסטנסיבית לטיפול במים מזהמים ממקורות שונים ובאיכויות שונות. בשיטה הנ"ל מוזרמים הקולחים דרך בריכות רדודות מלאות במצע נקבובי ושתולות בצמחי מים. תוך כדי מעבר הקולחים דרך המצע האבני, הצמחים והביופילם המיקרוביאלי המתפתח עליהם (חברה של מיקרואורגניזמים), חלים בקולחים שינויים המביאים לשיפור באיכות המים. השינויים כוללים תהליכים פיסיקליים-כימיים (כסינון, שקיעה, ספיחה, נידוף ותהליכי פירוק כימיים) וביולוגיים (כתמותה טבעית של פתוגנים ופירוק ביולוגי). מבחינים בין אגנים ירוקים בהם זרימת הקולחים מעל לפני המצע (SF, Surface Flow), לאלו שהזרימה מתחת לפני השטח, בין חללי המצע (SSF, Sub-Surface Flow). באחרונים ניתן להזרים את הקולחים אנכית (טיפול ורטיקאלי) ולקיים תנאים אירוביים במצע האגן או אופקית (טיפול הוריזונטאלי) ולקיים תנאים אנאירוביים. הביוטה המיקרוביאלית משתנה בהתאם לתנאים הנ"ל. כמו כן ניתן לטפל בקולחים במערכת היברידית המשלבת מספר דפוסים של מבנה וזרימה.

כחלק מעבודת המחקר הוקמה בשטח מפעל טיפול בשפכים השפד"ן מערכת מחקרית של אגנים ירוקים הכוללת 21 בריכות (כ- 30 מ"ר כל אחת) המאפשרת בחינה של טיפולים שונים. המערכת הוקמה במימון של המשרד לאיכות הסביבה של ממשלת איטליה ובסיוע ביה"ס ללימודי סביבה ע"ש פורטר באוניברסיטת תל-אביב. בכל טיפול הוזרמו קולחים שניוניים (באיכות גבוהה) ברצף דרך שלוש בריכות הנבדלות בנוכחות ובהרכב הצומח ובאופן הזרמת הקולחים. לאחר כשלוש שנים של "הבשלה" התקיימו במערכת האגנים הירוקים בשפד"ן בריכות בהן הצמח השולט הוא גומא פפירוס, בריכות בהן שלטת צמחיה עשבונית (יבלית) ובריכות ללא צומח (ביקורת).

תחילה נבחן התפקוד של מערכת האגנים הירוקים ע"י יכולתה להרחיק מזהמים קונבנציונאליים (חומר אורגאני קל פירוק, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט, חנקן כללי וזרחן מומס). נמצא שמערכת האגנים הירוקים ההיברידית מסוגלת לשפר את איכות הקולחים. ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (BOD), ריכוז ממוצע בקולחים הנכנסים 6.1 מ"ג/ליטר, מוצקים מרחפים (TSS), ריכוז ממוצע בקולחים הנכנסים 5.2 מ"ג/ליטר) ואמוניה ($\text{NH}_4\text{-N}$), ריכוז ממוצע בקולחים הנכנסים 2.2 מ"ג/ליטר) פחתו בשיעור ממוצע של 66%, 77% ו 98% לאחר מעבר הקולחים דרך שתי בריכות בזרימה תת-

קרקעית. ריכוז החנקן הכללי (Total nitrogen) בקולחים היוצאים מהמערכת (רצף 3 בריכות) היה נמוך ב- 52% מאשר הריכוז בקולחים השניוניים (4.8 מ"ג/ליטר). ריכוז הניטראט ($\text{NO}_3\text{-N}$) עלה פי 2.6 בשלב הטיפול האירובי (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית) ופחת בשלב טיפול האנאירובי (בריכות בזרימה עילית). בהתאם, ריכוז הניטראט הממוצע בקולחים היוצאים מהמערכת היה גבוה ב- 0.1 מ"ג/ליטר בלבד מריכוזו בקולחים השניוניים (0.6 מ"ג/ליטר). במערכת האגנים הירוקים הבשלה (לאחר 3 שנות תפעול) לא התקיימה הרחקה יעילה של זרחן מומס ($\text{PO}_4\text{-P}$).

בנוסף לדפוס המבנה והזרימה של האגן הירוק נמצא כי גם למצב בשלות (משך תפעול המערכת), איכות הקולחים (הרכב וריכוז המזהמים) ונוכחות הצומח קיימת השפעה על יעילות הטיפול. מידת ההשפעה של המשתנים הללו שונה בטיפוסים שונים של אגנים ירוקים. כך למשל נמצא במחקר הנוכחי כי לתקופת הבשלות השפעה חיובית על שיעור הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ואמוניה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית. לאיכות קולחים טובה (ריכוז נמוך של פחמן אורגאני) נמצאה השפעה שלילית על שיעור הרחקה של ניטראט באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אופקית (עיכוב של דניטריפיקציה). לנוכחות הצומח נמצאה השפעה נמוכה או היעדר השפעה על שיעור הרחקה של כלל המזהמים הקונבנציונאליים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית. מאידך, לעודף חומר צמחי באגנים ירוקים בזרימה עילית הייתה השפעה שלילית על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק, מוצקים מרחפים ואמוניה והשפעה חיובית על יעילות הרחקה של ניטראט וחנקן כללי.

בהשוואה בין ריכוז המזהמים בקולחים הנכנסים ויוצאים מהאגנים הירוקים בשפד"ן לבין קריטריונים של "ועדת ענבר" הובחנה השפעה שונה של הטיפול באגנים הירוקים על משתנים שונים של איכות הקולחים. נמצא שיפור של איכות הקולחים בהשוואה לקריטריון לנחלים בריכוז האמוניה. כמו כן נמצא כי קיים מיתון של חריגות (ריכוזי מקסימום) בריכוז חומר אורגאני קל פירוק ומוצקים מרחפים בהשוואה לקריטריון הזרמה לנחלים ולהשקיה. הטיפול באגנים הירוקים בשפד"ן לא תרם משמעותית להרחקה של זרחן ולכן הקולחים אינם עומדים בקריטריון להזרמה לנחלים במשתנה זה. איכות הקולחים בתום טיפול באגנים ירוקים מתאימה להשקיה ללא מגבלות שכן ריכוז הזרחן בקולחים אינו מהווה מגבלה.

החדשנות המרכזית של המחקר הייתה בבחינה של יכולת אגנים ירוקים להרחיק מיקרו-מזהמים מקבוצת האסטרואגנים. אסטרואגנים הם כימיקאליים טבעיים המסונתזים בגוף בעלי חיים (למשל Estrone-E1, Estradiol-E2 ו-Estriol-E3). כמו כן קיימים אסטרואגנים סינטטיים המיוצרים כתרופות (למשל, גלולות למניעת היריון; Ethynylestradiol-EE2). אסטרואגנים המופרשים על ידי אדם מגיעים למפעלים לטיפול בשפכים. התברר כי הטיפול הקונבנציונאלי בשפכים אינו מרחיק חומרים אלו במלואם. למרות שריכוז האסטרואגנים בקולחים נמוך (ננוגרמים בליטר), הם עדיין מהווים סכנה, למשל למאכלסי נחלים. בין השאר קיימות עדויות כי בריכוזים של ננוגרמים בודדים לליטר קיים שינוי מין בדגים (מזכרים לנקבות), עיכוב התפתחות סימני מין משניים בדגים זכרים ופגיעה בפוריות הדגים.

במחקר הנוכחי הותאמה שיטה לזיהוי וכימות של אסטרוגנים בקולחים שניוניים לרמה המאפשרת אבחנה וכימות בריכוזים סביבתיים. השיטה מבוססת על מיצוי הקולחים בטכניקה של מיצוי בפאזה מוצקה (Solid Phase Extraction) ואנליזה ב-HPLC-MS/MS.

על מנת להבין את מנגנון ההרחקה של האסטרוגנים במערכת אגנים ירוקים בוצעו ניסויי מעבדה בהם נבדק גורל אסטרוגנים שונים (E1, E2, E3 ו-EE2) בתנאים אירוביים והיפוקסיים. ניסויים אלו נערכו בנוכחות ובהיעדר ביופילם שמקורו באגנים ירוקים, במדיום של קולחים שניוניים מסוננים ובמים באיכות גבוהה מועשרים בנוטריאנטים. הממצאים הראו כי ללא נוכחות של ביופילם ריכוז האסטרוגנים בתמיסה נותר ללא שינוי (>90% מהריכוז ההתחלתי). בנוכחות ביופילם ובתנאים אירוביים פחת ריכוז האסטרוגנים בתמיסה באופן משמעותי. כך למשל, קבוע הדעיכה מסדר ראשון (K) של האסטרוגנים הטבעיים (E1, E2, E3) בקולחים היה 0.014 hr^{-1} , 0.003 hr^{-1} ו- 0.003 hr^{-1} , בהתאמה, ושל האסטרוגן הסינטטי (EE2) 0.0007 hr^{-1} . לא היה הבדל בשיעור הדעיכה של האסטרוגנים בתנאים אירוביים במדיום של קולחים שניוניים מסוננים לבין מדיום של מים מועשרים בנוטריאנטים. בתנאים היפוקסיים פחת משמעותית קצב הפירוק של האסטרוגנים בקולחים (למשל של K של E2 היה 0.001 hr^{-1} , נמוך כבסדר גודל מאשר בתנאים אירוביים). הדעיכה בריכוז האסטרוגנים בתמיסה הייתה בעיקר תוצאה של המרה ביולוגית. העבודה הנוכחית היא הראשונה לזהות (באמצעות MS/MS ו-NMR ^1H) את המולקולה 17-ketoestradiol כתוצר המרה של האסטרוגן E3.

במחקר שדה נמצאה עדות לנוכחות האסטרוגנים הטבעיים E1 ו-E2 בלבד בקולחים השניוניים של השפד"ן (ממוצע 10.6 ± 8.4 ו- 24.2 ± 14.5 ננוגרם בליטר, בהתאמה). לאחר טיפול ראשון באגנים ירוקים שכלל מעבר קולחים שניוניים בבריכה אחת בזרימה תת-קרקעית אנכית (טיפול אירובי), פחת ריכוז E1 ו-E2 לפחות ב-60% ו-81%, בהתאמה. לנוכחות ולהרכב הצומח לא הייתה השפעה על יעילות ההרחקה של האסטרוגנים בתנאים הנ"ל. בטיפול נוסף בקולחים בבריכות אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אופקית או בזרימה עילית לא חל שינוי נוסף משמעותי בריכוז האסטרוגנים.

תוצאות ניסויי השטח והמעבדה מעידים שהרחקה של אסטרוגנים מהקולחים מתקיימת גם כאשר ריכוז החומר האורגני קל הפירוק (BOD) גבוה בשישה סדרי גודל מזה של האסטרוגנים (מיליגרם ונוגורם בליטר, בהתאמה). הרחקה של אסטרוגנים טבעיים מהקולחים מתרחשת בעיקר במנגנון של המרה ופירוק ביולוגי והתרומה של מנגנון ספיחה הוא נמוך. המיקרואורגניזמים להם יכולת להמיר ביולוגית ולפרק את האסטרוגנים מתפתחים באגן הירוק על פני המצע באופן טבעי. ההמרות הביולוגיות של האסטרוגנים על ידי מיקרואורגניזמים באגן הירוק מתרחשות בעיקר בתנאים אירוביים ולכן, מבין האגנים הירוקים, הרחקה יעילה ביותר של אסטרוגנים צפויה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית. זמן השהייה הקצר של הקולחים באגנים ירוקים אלו (שעות) הופך את הטכנולוגיה לאטרקטיבית להשלמה של ליטוש קולחים שכן לא נדרש בהכרח שטח קרקע גדול.

לסיכום, המחקר הנוכחי מצביע על יכולת של אגנים ירוקים במערך היברידי לטש ולהרחיק מזהמים קונבנציונאליים הכוללים חומר אורגני קל פירוק, מוצקים מרחפים ותרכובות חנקן וכן אסטרוגנים

מקולחים שניוניים באיכות גבוהה. יכולת אגנים ירוקים להרחיק זרחן היא מוגבלת. במקרים שנדרשת הרחקה של זרחן (למשל בהזרמה של קולחים לנחלים) ניתן לשפרה באמצעות שילוב טכנולוגיה משלימה (למשל, אלקטרופלוקולציה). בהתאם ראוי שאגנים ירוקים או מערך טכנולוגיות המשלב גם אגנים ירוקים יבחן כטיפול משלים ליצירת קולחים הראויים לשימוש חוזר לשיקום נחלים ולהשקיה.

רשימת איורים

מספר עמוד		
2	מבנה העבודה	איור 1.1
6	גורל בסביבה של אסטרוגנים שמקורם באדם	איור 2.1
11	סכמה המתארת אגן ירוק בזרימת מים עילית (SF)	איור 2.2
12	סכמה המתארת אגן ירוק בזרימת מים תת-קרקעית אופקית (HSSF)	איור 2.3
13	סכמה המתארת אגן ירוק בזרימת מים תת-קרקעית אנכית (VSSF)	איור 2.4
15	שלבים עיקריים בפרוטוקולים לניקוי ואנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינתטיים בקולחים שניוניים. הפרוטוקולים מבוססים על השיטות שפותחו במחקר הנוכחי.	איור 4.1
21	ריכוז חלבון (אקוויולנט לאלבומין) שהופק משטח פנים של 3 גרם מצע בזלת ונאסף מיחידת גידול רוויה (היפוקסית) ובלתי רוויה (איירובית) בתקופת המחקר. כמו כן מוצגת משוואה פולינומית וקבוע מתאם (R^2).	איור 5.3.1
26	כרומטוגרמה (LC/UV, 280nm) של תמיסת E2 בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים, בתחילת הניסוי ולאחר אינקובציה של 90 שעות בתנאים איירוביים.	איור 5.4.1
27	כרומטוגרמה (LC/UV, 280nm) של תמיסת E3 בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים, בתחילת הניסוי ולאחר אינקובציה של 90 שעות בתנאים איירוביים.	איור 5.4.2
28	כרומטוגרמות (LC/UV, 280nm) של E3, של 16-hydroxyE1 ושל תוצר המרה בלתי מזוהה של E3 וספקטרום בליעה של שלושת החומרים הנ"ל.	איור 5.4.3
29	ספקטרום של שברי יונים חיוביים (MS/MS, m/z) של האסטרוגן הטבעי E3, 16 hydroxyE1 ושל תוצר ההמרה של E3.	איור 5.4.4
30	ספקטרום של שברי יונים שליליים (MS/MS, m/z) של האסטרוגן הטבעי E3, 16hydroxy E1 ושל תוצר ההמרה של E3.	איור 5.4.5
32	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E2 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים והופעה של E1 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.6
33	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E2 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים והופעה של E1 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.7
34	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E1 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים והופעה של E2 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.8
35	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E1 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים והופעה של E2 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.9
37	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E3 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים והופעה של 17ketoE2 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.10
37	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E3 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים והופעה של 17ketoE2 במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.11
38	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז EE2 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	איור 5.4.12
39	שיעור השינוי עם הזמן בריכוז EE2 בנוכחות ביופילם, בתנאים	איור 5.4.13

	היפוקסיים במדיום של קולחים שניוניים ומים מועשרים בנוטריאנטים.	
40	מסלול מטבולי מוצע לפירוק E2 על ידי חיידקים שמקורם במפעלים לטיפול בשפכים.	איור 5.5.1
55	סכמה המציגה את סידור הבריכות במערכת אגנים ירוקים במט"ש השפד"ן.	איור 6.3.1
56	עובי והרכב שכבות המצע בבריכות אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולונות המוזנות בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי.	איור 6.3.2
57	עובי והרכב שכבות המצע בבריכות אגנים ירוקים בשפד"ן המוזנות בדפוס זרימה תת-קרקעי אופקי.	איור 6.3.3
61	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז חומר אורגני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.1
62	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז חומר אורגני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.2
63	ממוצע (\pm סטטיית תקן) הרחקה חומר אורגני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים, עם צמחיה עשבונית ובבריכות הביקורת ללא צמחים, במפלס הטיפול הראשון והשני ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי.	איור 6.4.3
64	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז מוצקים מרחפים (TSS) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.4
65	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז מוצקים מרחפים (TSS) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.5
66	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז אמוניה ($\text{NH}_4\text{-N}$) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.6
67	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז אמוניה ($\text{NH}_4\text{-N}$) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.7
68	ממוצע (\pm סטטיית תקן) הרחקה של אמוניה בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים, עם צמחיה עשבונית ובבריכות הביקורת ללא צמחים, במפלס הטיפול הראשון והשני ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי.	איור 6.4.8
69	ממוצע (\pm SD) ריכוז ניטראט ($\text{NO}_3\text{-N}$) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.9
70	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז ניטראט ($\text{NO}_3\text{-N}$) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.10
71	ממוצע (\pm סטטיית תקן) הרחקה של ניטראט בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים, עם צמחיה עשבונית ובבריכות הביקורת ללא צמחים, במפלס הטיפול הראשון והשני ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי.	איור 6.4.11
72	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז חנקן כללי (TN) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.12
72	ממוצע (\pm סטטיית תקן) ריכוז חנקן כללי (TN) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.13

	מהבריכות.	
73	ממוצע (\pm סטיית תקן) הרחקה של חנקן כללי בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים, עם צמחיה עשבונית ובבריכות הביקורת ללא צמחים (אדום, u.v.), במפלט הטיפול הראשון והשני ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי.	איור 6.4.14
74	ממוצע (\pm סטיית תקן) ריכוז זרחן מומס (PO_4-P) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.15
75	ממוצע (\pm סטיית תקן) ריכוז זרחן מומס (PO_4-P) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן ובקולחים היוצאים מהבריכות.	איור 6.4.16
93	ממוצע וסטיית תקן של ריכוז E1 ו E2 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלט הראשון עם מגוון צמחים, ללא צמחיה וצמחיה עשבונית.	איור 7.4.1
95	ממוצע וסטיית תקן של ריכוז E1 ו E2 בקולחים הנכנסים ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית, זרימה תת-קרקעית אופקית ובריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים	איור 7.4.2
96	סכום הריכוזים של E1 ו E2 כתלות בריכוז ניטראט (NO_3-N) בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות הניסוי. משוואה ומקדם המתאם (R^2) מוצגים.	איור 7.4.3
96	סכום הריכוזים של E1 ו E2 כתלות ריכוז צריכת חמצן כימית (COD) בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות הניסוי. משוואה ומקדם המתאם (R^2) מוצגים.	איור 7.4.4
97	ריכוז אסטרוגנים בשפכים וקולחים בעולם.	איור 7.5.1

רשימת טבלאות

מספר עמוד		
4	מבנה ותכונות פיסיקו-כימיות של אסטרוגנים.	טבלה 2.1
5	כמות אסטרוגנים המופרשים מידי יום על ידי האדם (μg).	טבלה 2.2
7	דוגמא לריכוז אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים שנמצאו בשפכים, קולחים, בוצה שמקורה במפעל לטיפול בשפכים, מים עיליים וסדימנט נחלים.	טבלה 2.3
16	ריכוז אסטרוגנים מינימאלי הניתן לזיהוי (LOD) וכימות (LOQ) בפרוטוקולים שפותחו במחקר הנוכחי הכוללים את שיטה A המתאימה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים ושיטה B המתאימה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים בלבד.	טבלה 4.1
21	רוויה בחמצן (%), ריכוז אמוניה, ניטראט וחנקן כללי בקולחים המזינים את הקולונות ובמוצא קולונה בלתי רוויה (איירובית) ורוויה (איירובית) בתקופת המחקר.	טבלה 5.3.1
27	מבנה מולקולארי, נוסחה כימית ומשקל מולקולארי של האסטרוגן הטבעי E3 ותוצרי המרה אפשריים הכוללים את המולקולות 16hydroxyE1 ו 17ketoE2.	טבלה 5.4.1
28	משקל מולקולארי, יון מולקולארי (MS, m/z) ושברי יונים (m/z), MS/MS ביינון חיובי (PI) ושילולי (NI) של האסטרוגן הטבעי E3, של הסטנדרט האנליטי 16hydroxyE1 ושל תוצר המרה בלתי מזוהה של E3.	טבלה 5.4.2
31	ערכי הסטים כימיים (ppm) של מימנים במולקולות E3, 16hydroxy ותוצר המרה של E3 באנליזה $^1\text{H NMR}$.	טבלה 5.4.3
31	כמות חלבון על פני 1.5 גרם מצע בזלת (מ"ג/ליטר אקוויוולנט אלבומין).	טבלה 5.4.4
33	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון E2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.5.5
33	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים היפוקסיים של ההורמון E2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.4.6
34	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון E1 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.4.7
36	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון E3 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.4.8
36	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים היפוקסיים של ההורמון E3 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.4.9
38	מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון EE2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם.	טבלה 5.4.10
43	קבוע פירוק של E2 (K, סדר אפס g/l hr^{-1} ; סדר ראשון hr^{-1}) ויחס בינו לבין קבוע הפירוק של האסטרוגנים הטבעיים E1, E3 והאסטרוגן הסינטטי EE2 (ניסויים מעבדתיים מנתיים, תנאים אירוביים, נוכחות חיידקים ממקורות שונים).	טבלה 5.5.1 :

52	ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק (%) ב- 67 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 31 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית.	טבלה 6.2.1
53	ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז מוצקים מרחפים (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של מוצקים מרחפים (%) ב- 60 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 31 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית.	טבלה 6.2.2
53	ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז אמוניה (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של אמוניה (%) ב- 36 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 27 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית.	טבלה 6.2.3
54	ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז חנקן כללי (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של חנקן כללי (%) ב- 24 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 27 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית.	טבלה 6.2.4
54	ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז זרחן כללי (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של זרחן כללי (%) ב- 34 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 21 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית.	טבלה 6.2.5
58	פרמטרים מרכזיים למדידת זמן שהייה הידראולי באמצעות Rhodamin WT בבריכה בזרימה תת-קרקעית אנכית (VF).	טבלה 6.3.1
76	השפעה מובהקת (+) או העדר השפעה (-) של נוכחות והרכב צומח (בריכות ללא צמחים, עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים-בעיקר גומא פפירוס), דפוס זרימה אופקי או אנכי, שלב הטיפול (טיפול בבריכה במפלס הראשון או השני) וגיל המערכת (שנת תפעול ראשונה ושלישית) בבריכות בזרימה תת-קרקעית על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק (BOD), מוצקים מרחפים (TSS), אמוניה (NH ₄ -N), ניטראט (NO ₃ -N), חנקן כללי (TN) וזרחן מומס (PO ₄ -P).	טבלה 6.5.1
77	ריכוז, סטיית תקן וערך מקסימאלי (mg/l) של מזהמי מים קונבנציונאליים בקולחים השניוניים הנכנסים לבריכות האגנים ירוקים בשפד"ן, ובמוצא בריכות המפלס הראשון, שני ושלישי. מוצג עומס המזהמים (mass load, g/m ² /year), שעור הרחקה (removal efficiency, %) ויעילות סילוק (g/m ² /year) בבריכות המפלס הראשון, שני ושלישי ובמערכת היברידיית הכוללת את בריכות המפלס הראשון, הראשון והשני ושלושת הבריכות יחד.	טבלה 6.5.2
92	ממוצע, סטיית תקן, סטיית תקן יחסית, חציון וערכי מינימום ומקסימום של האסטרונגנים E1 ו E2 שנדגמו בקולחים שניוניים של השפד"ן בין מרץ 2008 ליולי 2009.	טבלה 7.4.1
92	ריכוז E2 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלס הראשון, עם מגוון צמחים, עם צומח עשבוני וללא צמחים.	טבלה 7.4.2
93	ריכוז E1 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלס הראשון, עם מגוון צמחים, עם צומח עשבוני וללא צמחים.	טבלה 7.4.3
94	ריכוז E2 בקולחים שניוניים המזינים את מערכת האגנים הירוקים ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית, זרימה תת-קרקעית אופקית ובריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים.	טבלה 7.4.4
94	ריכוז E1 בקולחים שניוניים המזינים את מערכת האגנים הירוקים ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית, זרימה תת-קרקעית אופקית ובריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים.	טבלה 7.4.5
99	שעור הרחקה של אסטרונגנים (או פעילות אסטרונגנית) באגנים ירוקים בזרימה עילית, תת קרקעית אופקית ואנכית. כמו כן מידע על גודל האגן, הרכב הצומח וריכוז האסטרונגנים בקולחים הנכנסים.	טבלה 7.5.1
113	ריכוז מזהמי מים נבחרים ב"תקן ענבר" עבור קולחים המיועדים	טבלה 8.1

	להשקיה ללא הגבלה ולהזרמה לנחלים (במ"ג/ליטר) וריכוז מומלץ לשיקום אקולוגי של נחלים. כמו כן מוצג ריכוז ממוצע, סטטית תקן (וערך מקסימאלי) של המזהמים בקולחים הנכנסים ויוצאים מהאגנים הירוקים בשפד"ן (מחקר נוכחי).	
114	טווח ריכוזים (וחציון) של E1 ו E2 (ננוגרם בליטר) בקולחים שניוניים של השפד"ן ובמוצא בריכות טיפול בזרימה תת-קרקעית אנכית והשפעות ביולוגיות על דגים להם ערכי LOEC בטווחים אלו.	טבלה 8.2

רשימת קיצורים

קיצור באנגלית	שם מלא	שם בעברית או תרגום
AA	Area	שטח סיגנל כרומטוגרפי
AcN	Acetonitril	אצטוניטריל
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	יוניזציה כימית בלחץ אטמוספרי
BOD	Biochemical Oxygen Demand	צריכת חמצן ביוכימית
CW	Constructed Wetland	אגנים ירוקים
DCDMS	Dichlorodimethyl Silan	דיכלורודימתיל סילן
DCM	Dichloromethane	דיכלורומתאן
DP	Direct Phase	פאזה ישרה
E1	Estrone	אסטרוגן (אסטרוגן טבעי)
E2	Estradiol 17 β	אסטרדיול (אסטרוגן טבעי)
E3	Estriol	אסטריול (אסטרוגן טבעי)
EE2	Ethynylestradiol	אתינילאסטרדיול (אסטרוגן סינטטי)
ESI	Electrospray Ionization	-
HSSF	Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetland	זרימה תת-קרקעית אופקית (אגנים ירוקים)
GCB	Graphitized Carbon Black	פחם פעיל (ב-SPE)
H	Height	גובה סיגנל כרומטוגרפי
HLR	Hydraulic Loading Rate	עומס הידראולי
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	כרומטוגרפיה נוזלית בלחץ גבוה
LLE	Liquid Liquid Extraction	מיצוי נוזל נוזל
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration	ריכוז נמוך ביותר של מזהם הגורם להשפעה ביולוגית שלילית
m/z	Mass to Charge Ratio	היחס בין המטען למסה של חלקיק טעון
MeEE2	Mestranol	מסטרנול (אסטרוגן סינטטי)
MeOH	Methanol	מתנול
MS	Mass Spectrometry	ספקטרוגרף מסות
MS/MS		אנליזה לשברי יונים
NH ₂	Aminopropyl	אמינו פרופיל (ב-SPE)
NI	Negative Ionization	יינון שלילי (בספקטרום מסות)
NL	-	עצמת סיגנל
PI	Positive Ionization	יינון חיובי (בספקטרום מסות)
R	Resolution	רזולוציה (כושר הפרדה בין סיגנלים)
RP	Reverse Phase	פאזה הפוכה (ב-SPE)
S/N ratio	Signal to Noise Ratio	יחס בין גובה סיגנל של האנליט לבין זה של רעש הרקע (בכרומטוגרפיה)
SF	Surface Flow Constructed Wetland	זרימת מים עילית (אגנים ירוקים)
SIM	Selected Ion Monitoring	סריקה סלקטיבית של יון בודד
SPE	Solid Phase Extraction	מיצוי בפאזה מוצקה

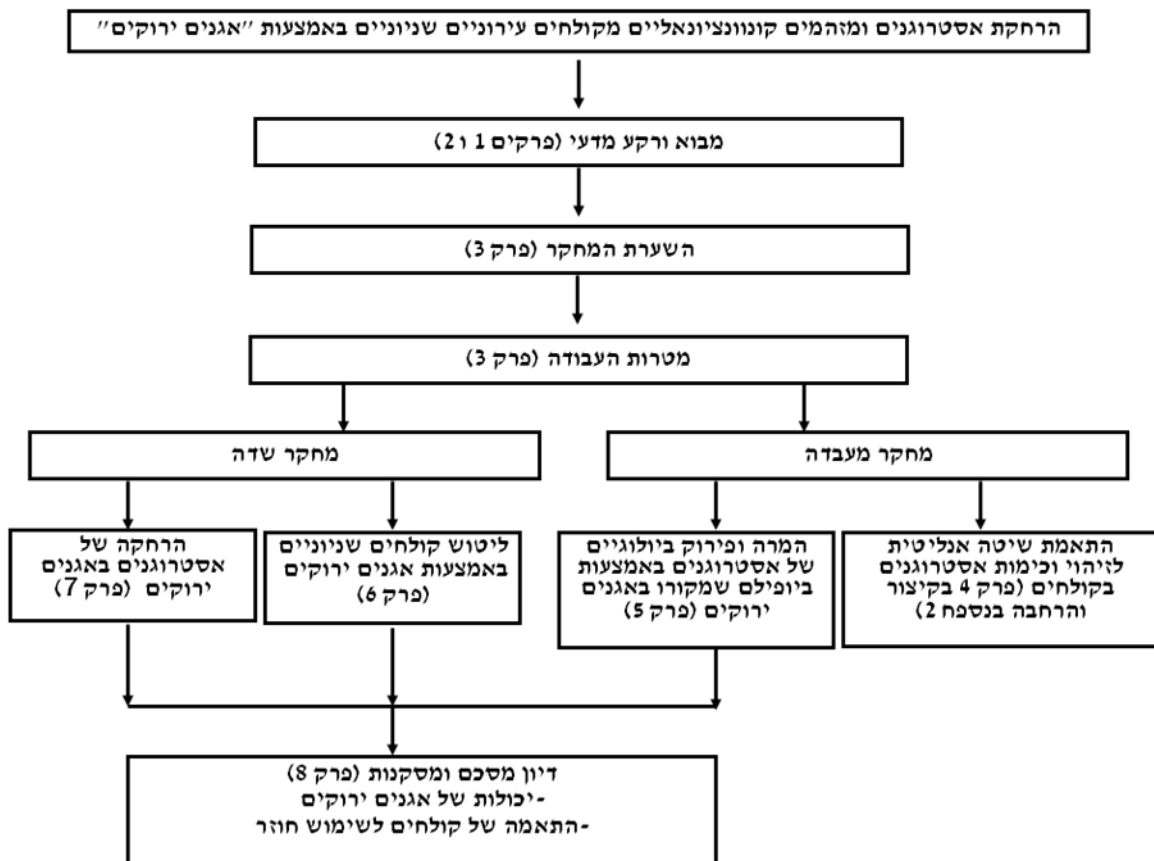
SRM	Selected Reaction Monitoring	סריקה סלקטיבית של שבר יון בודד
SSF	Subsurface Flow Constructed Wetland	זרימה תת-קרקעית (אגנים ירוקים)
TSS	Total Suspended Solids	כלל מוצקים מרחפים
ULC/MS grade	Ultra Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry Grade	איכות ממש המתאימה לאנליזה ב HPLC-MS
VSSF	Vertical Subsurface Flow Constructed Wetland	זרימה תת-קרקעית אנכית (אגנים ירוקים)

1. מבוא

בתנאי מצוקת מים גובר השימוש בקולחים מטופלים. ישראל מובילה בעולם בהשבה של שפכים (כ-76%, רט"ג, 2008; US EPA 2004) מרביתם מופנים להשקיה חקלאית והנותרים מוזרמים לנחלים. מרבית הקולחים הם באיכות שניונית ומכילים מגוון מזהמים אופייניים (קונבנציונאליים) בריכוזים של מיליגרמים בליטר, בכלל זה חומרים אורגאניים, מוצקים מרחפים ותרכובות חנקן וזרחן. בשנים האחרונות התבררה נוכחותם של מיקרו-מזהמים אורגאניים שריכוזם בקולחים נמוך בשלושה עד שישה סדרי גודל מריכוז המזהמים הקונבנציונאליים. בניהם נתגלו הורמונים וחומרים בעלי פעילות הורמונאלית, המשבשים התפתחות של מאכלסי המים ומסכנים את בריאות הציבור.

שימוש בקולחים להשקיה ולשיקום נחלים מחייב שיפור איכותם כך שיורחקו גם המיקרו-מזהמים. במקומות רבים בעולם מחפשים חלופות זולות ויעילות המחליפות או משלימות את הטיפול הקונוונציונלי במתקני הטיפול בשפכים. אחת משיטות הטיפול הידידותיות היא מערכת אקולוגית המכונה - "אגנים ירוקים מלאכותיים" (Constructed Wetlands). מטרת העבודה הנוכחית היא לבחון את ההתאמה של טכנולוגיה זו לליטוש של קולחים עירוניים באיכות שניונית בדגש על יעילות הרחקה של הורמונים אסטרוגנים.

העדר שיטה אנליטית לבדיקה של תרכובות אסטרוגניות בקולחים באמצעות HPLC-MS/MS בארץ, חייבה במחקר הנוכחי פתוח של היכולת הנ"ל. כמו כן נבחנה בתנאי מעבדה היכולת של ביופילם שמקורו באגנים ירוקים להמיר ביולוגית (biotransformation) ולפרק (biodegradation) תרכובות אסטרוגניות. יכולת ההרחקה של מזהמים קונבנציונאליים ושל הורמונים אסטרוגנים מקולחים עירוניים שניוניים נבחנה בתנאי שטח במערך אגנים ירוקים שהוקם בשפד"ן. מבנה העבודה מוצג באיור 1.1. כל פרק כולל מבוא, רקע מדעי, שיטות, תוצאות ודיון. כלל הפרקים נידונים בפרק "דיון כללי מסכם ומסקנות".



איור 1.1: מבנה העבודה

2. רקע מדעי

2.1 מיקרו-מזהמים

פיתוח של שיטות חדשות, רגישות יותר לזיהוי כימיקלים והשפעותיהם הביולוגיות הטה את תשומת לב החוקרים בשנים האחרונות לקבוצה חדשה של כימיקלים הנמצאים בסביבה ובעיקר במקורות המים (Schwarzenbach et al., 2006). חומרים אלו לא היו מוכרים בעבר או לא נחשבו כסיכון סביבתי ולכן כונו "מזהמים של הדור החדש", ("Emerging Contaminant", Lopez de Alda et al., 2003). לרוב, ריכוזם של מזהמים אלו בסביבה נמוך לכדי ננוגרמים בליטר ולכן כונו גם מיקרו-מזהמים (Schwarzenbach et al., 2006, Micro-pollutants). מדובר באלפים רבים של כימיקלים טבעיים וסינטטיים הנמצאים בשימוש יום יומי ע"י האדם (Lopez de Alda et al., 2003; Schwarzenbach et al., 2006). מקורם של החומרים הללו מגוון וכולל כימיקלים המיוצרים למגזר התעשייתי, החקלאי והביתי (Schwarzenbach et al., 2006).

על מרבית המיקרו-מזהמים חסר עדיין מידע באשר לריכוזם, גורלם בסביבה וכן מידע על אופן ומידת השפעתם על מאכלסי מים והאדם. שונה מכך הוא המקרה של קבוצת מיקרו-מזהמים שהשפעתם השלילית על התפתחות ותפקוד המערכת ההורמונאלית זוהתה. חומרים אלו אוגדו יחד לקבוצה הנקראת "משבשי פעילות הורמונאלית" (EDC's, Endocrine Disrupting Chemicals, Lintelmann, 2003; Vymazal, 2009). אלו כוללים תרכובות אורגאניות רבות דוגמת פטלאטים (Phthalates) וביספנול (Bisphenol) המשמשים בתעשיית הפלסטיק, בי-פנילים עתירי כלור (Polychlorinated Biphenyls, PCBs), המשמשים בתעשיית פלסטיק וכנוזלי קירור, קוטלי חרקים, עשבים ופטריות (Pesticides), דיאוקסין (Dioxins), שנופץ כתוצר התפרקות פלסטית של PVC, פחמימנים ארומאטיים רב טבעתיים (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH's), שמקורם בבערה חלקית של דלקים מבוססי פחמן, והורמונים סטרואידים טבעיים וסינטטיים שמקורם למשל בגולות למניעת היריון (Birkett and Lester, 2003; Masi et al., 2004).

עדויות להשפעות השליליות של המזהמים הנ"ל על בע"ח הצטברו במחקרי שדה ובניסויים מבוקרים במעבדה. בשנים האחרונות עלה החשש כי חשיפה של הציבור לחומרים אלו עלולה לסכן גם את בריאות האדם. חשש זה התבסס על עדויות שהצטברו במהלך שבעים השנים האחרונות בהם נצפתה עליה בשכיחות מחלות סרטן אברי הרבייה (סרטן השד, סרטן אשכים) והתפתחות לקויה של האשכים הכוללת בין השאר ספירת זרע נמוכה וטמירות אשכים (אי צניחת אשך ואשכים) (Skakkebaek et al., 2001; Calle et al., 2002; Rajapakse et al., 2002; Duty et al., 2003; Hardell et al., 2003; Huyghe et al., 2003; Sharp and Irvine, 2004). מכלל החומרים המשבשים פעילות ההורמונאלית, האסטרוגנים הם בין השכיחים ביותר בסביבה האקוויטית ונמצאים בריכוזים גבוהים יחסית (Erickson, 2002; Kolpin et al., 2002). מעבר לכך, הם גם בעלי ההשפעה החזקה ביותר, כלומר,

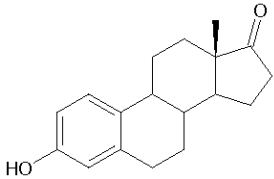
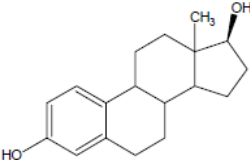
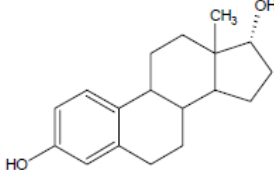
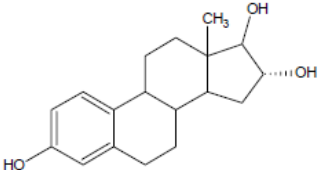
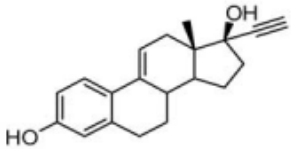
Bachmann Christiansen et al., 2002; Khanal et al.,) השפעתם ניכרת בריכוזים הנמוכים ביותר (, 2006). משום כך, התמקדה העבודה הנוכחית בקבוצת מזהמים זו.

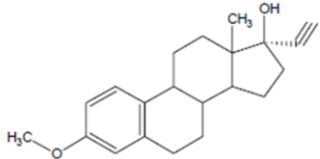
2.2 אסטרוגנים

2.2.1 מבנה ותכונות כימיות-פיסיקליות

ההורמונים האסטרוגנים כוללים קבוצה גדולה של כימיקלים. בהקשר הסביבתי בולטים האסטרוגנים הטבעיים אסטרון (Estrone, E1), 17β -אסטרדיול (17β -estradiol, E2- 17β), 17α -אסטרדיול (17α -estradiol, E2- 17α), אסטריול (Estriol, E3) המופרשים ע"י חולייתנים והאסטרוגנים הסינטטיים 17α -אתינילאסטרדיול (17α -ethinylestradiol, EE2) ומסטרנול (Mestranol, MeEE2), המשמשים ברפואה, בעיקר בגלולות למניעת היריון (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). התכונות הכימיות פיסיקליות של האסטרוגנים הני"ל מוצגות בטבלה 2.1.

טבלה 2.1: מבנה ותכונות פיסיקו-כימיות של אסטרוגנים (נתונים: Routledge et al., 1998)

Substance	Molecular structure	Molecular weight	Water solubility (mg/L at 20°C)	Vapor pressure (mm Hg)	Log K _{ow}
Estrone (E1)		270.4	13	2.3×10^{-10}	3.43
17β -estradiol (E2)		272.4	13	2.3×10^{-10}	3.94
17α -estradiol (E2- 17α)		272.4	-	-	4.01
Estriol (E3)		288.4	13	6.7×10^{-15}	2.81
17α -ethinylestradiol (EE2)		296.4	4.8	4.5×10^{-11}	4.15

Mestranol (MeEE2)		310.4	0.3	7.5×10^{-10}	4.67
----------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-------	-----	-----------------------	------

- חסרים נתונים

האסטרוגנים הם כימיקלים ליפופיליים עם ערך pK_a גבוה (מעל 10) ולכן ניתן לצפות כי בסביבה יספחו לפאזות מוצקות אורגניות (Khanal et al., Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003;).
 (2006). לאסטרוגנים הטבעיים מקדם חלוקה אוקטנול-מים (K_{ow}) נמוך בהשוואה לאסטרוגנים הסינתטיים ולכן מסיסותם במים גבוהה יותר (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). כמו כן, האסטרוגנים מתאפיינים בלחץ אדים נמוך ולכן אינם נוטים להתנדף ממים.

2.2.2 מקורות זיהום וגורל האסטרוגנים בסביבה

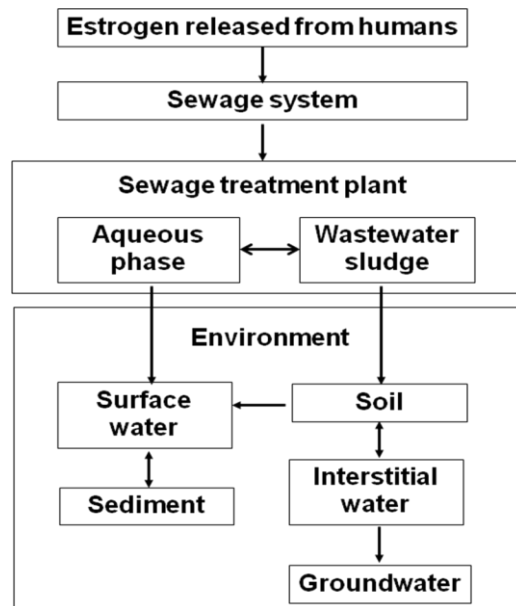
האסטרוגנים הטבעיים מיוצרים בגוף אדם ובגופם של חולייתנים אחרים ומופרשים מהם. אסטרוגנים מהפרשות אדם מגיעים לסביבה כתוצאה מהזרמה של קולחים ממפעלים לטיפול בשפכים (מט"ש). אסטרוגנים ממקור מהפרשות בעלי חיים מגיעים לסביבה כתוצאה משטיפה של הפרשות בקר בשטחי מרעה ושפכים של חוות חקלאיות כרפתות או חזיריות (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). העבודה הנוכחית עוסקת בסילוק אסטרוגנים מקולחים שניוניים, כלומר באסטרוגנים שמקורם באדם. כמות האסטרוגנים המוערכת המופרשת על ידי האדם מוצגת בטבלה 2.2.

טבלה 2.2 כמות אסטרוגנים המופרשים מידי יום על ידי האדם (μg) (נתונים: Johnson et al., 2000)

Category	E2	E1	E3	EE2
Males	1.6	3.9	1.5	-
Menstruating females	3.5	8	4.8	-
Menopausal females	2.3	4	1	-
Pregnant woman	259	600	6000	-
Woman	-	-	-	35

האסטרוגנים מופרשים מהגוף בצורתם הטבעית (טבלה 2.1) או קשורים לנשאים (בעיקר glucuronic acid ו sulphate). בצורתם הקשורה האסטרוגנים אינם פעילים ביולוגית (de Mes et al., 2005). ומסיסותם במים גבוהה פי 10 עד 50 בהשוואה לאסטרוגנים שאינם קשורים (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). פירוק האסטרוגנים מהנשאים קשור בחלקו בפעילות בקטריאלית ונעשה ברובו על ידי האנזים β -glucuronidase המיוצר למשל ע"י *Escherichia coli* (Ternes et al., 1999a). אסטרדיול הקשור לנשא גלוקורונואידי נוטה להשתחרר מהנשא יחסית מהר בתרחיף שפכים

Belfroid et al., 1999; Panter et al., 1999; Ternes et al.,) בלתי מטופלים ובבוצה משופעלת (1999a; D'Ascenzo et al., 2003 ומשום כך נוכחים בשפכים ובקולחים בעיקר ההורמונים הבלתי קשורים, הפעילים ביולוגית. במפעלים לטיפול בשפכים (מט"ש) קיימת הרחקה של אסטרוגנים מהפאזה המימית באמצעות תהליכים של ספיחה לבוצה ופירוק ביולוגי (איור, 2.1, Halling-Sørensen, 2003).



איור 2.1: גורל בסביבה של אסטרוגנים שמקורם באדם (מתוך: Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003)

שעור ההרחקה של האסטרוגנים משתנה כתלות בשיטה המיושמת לטיפול בשפכים ובמשתנים התפעוליים של המפעל (Bachmann Christiansen et al., 2002). האחרונים כוללים למשל זמן שהייה הידראולי (Hydraulic Retention Time, HRT), גיל הבוצה (Sludge Retention Time, SRT) וטמפרטורה (Johnson et al., 2000; Johnson and Sumpter, 2001). בתום הטיפול השניוני בשפכים נותרים האסטרוגנים הן בפאזה המוצקה (ספוחים לבוצה) והן בפאזה המימית (בקולחים). האסטרוגנים שנספחו לבוצה עשויים למצוא דרכם לסביבה, בעיקר כאשר משמשת הבוצה כדשן חקלאי (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003, איור 2.1, soil). אסטרוגנים אלו עשויים לשוב ולהשתחרר למדיום המימי (מים אינטרסטיציאליים) ומשם להישטף בנגר עילי למקווי מים סמוכים או לחלחל למי תהום (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003, איור 2.1). ראוי לציין כי מידת החשיבות של הבוצה כמקור לזיהום הסביבה באסטרוגנים אינו ברור עדיין בשל מיעוט מידע (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2002; Bachmann Christiansen et al., 2002; Sørensen, 2003). מרבית המחקרים על אסטרוגנים בסביבה עוסקים בקולחים (טבלה 2.2).

אסטרוגנים אלו עשויים למצוא דרכם ישירות לנחלים, לים או לקרקע עם הזרמה של הקולחים לנחלים או השבה של הקולחים להשקיה (איור 2.1, טבלה 2.3).

טבלה 2.3: דוגמה לריכוז אסטרוגנים טבעיים וסינטיים שנמצאו בשפכים, קולחים, בוצה, מים עיליים וסדימנט נחלים

	E1	E2	E3	EE2	MeEE2	Reference
Sewage influent (ng/l)	44-490	11-180	<LOD-263	<LOD-120	5.3-120	Busch et al., 2002 Solé et al., 2000 Baronti et al., 2000
Sewage effluent (ng/l)	<LOD-82	<LOD-21	<LOD-28	<LOD-62	N.D.	Bachmann Christiansen et al., 2002
Sewage sludge (ng/g)	<LOQ-37	<LOQ-49	N.D.	<LOQ-17	<LOQ	Ternes et al., 2002
Surface water (ng/l)	<LOD-17	<LOD-27	<LOD-3.1	<LOD-5.1	N.D.	Tabata et al., 2001 Bachmann Christiansen et al., 2002 Ying et al., 2002
Sediments (ng/g)	<LOQ-2	<LOQ-1.5	N.D.	<LOQ-0.9	<LOQ	Ternes et al., 2002

LOD- Limit of detection

LOQ- Limit of quantification

N.D.- No data

כמו כן, בסקר שבוצע בין 1999 ל- 2000 ע"י USGS (United States Geological Survey) ב- 139 נחלים מ- 30 מדינות בארה"ב נמצאו אסטרוגנים במרבית הנחלים, בריכוזים של עד מאות ננוגרמים לליטר (Kolpin et al., 2002). האסטרוגנים בנחלים עשויים להימצא בפאזה המימית או להיספח לסדימנט בקרקעית (Young et al., 2002) ולהצטבר בו (Williams et al., 2001). כלומר, הסדימנט בנחלים יכול לשמש כמבלע לאסטרוגנים ומקור להפצתם (de Mes et al., 2005).

2.2.3. השפעות של זיהום אסטרוגנים על החי

בעלי חיים נחשפים לאסטרוגנים המצויים בסביבה (במים, בסדימנט, בקרקע). כך למשל מאכלסי נחלים נחשפים לאסטרוגנים מומסים במים ולאסטרוגנים המרוכזים בסדימנט. הצטברות (bioaccumulation) של אסטרוגנים נמצאה למשל בסרטני דפניה (*Daphnia magna*, Gomes et al., 2004) ואצות (*Chlorella Vulgaris*, Lai et al., 2002) המשמשים כמקור מזון לחסרי חוליות ודגים רבים. לפיכך צפויה הצטברות אסטרוגנים גם דרך מארג המזון (Khanal et al., 2006). בקרקע נמצא למשל כי בפרק זמן של 35 ימים קלט שלשול (*Lumbriculus variegates*) מסומן רדיואקטיבית מסדימנט מועשר. השלשול הפריש 50% מהאסטרוגן לקרקע נקייה מהורמונים לאחר שהצבירה של האסטרוגן בגופו הגיעה לשיאה (Liebig et al., 2004).

ההשלכות של החשיפה לאסטרוגנים ולחומרים בעלי פעילות אסטרוגנית התבררה בשנים האחרונות. במהלך עשרים השנים האחרונות נתגלו תופעות הקשורות בהיפוך מין של דגים זכרים (פמיניזציה) במקומות שונים בעולם (Folmar et al., 1996; Knudsen et al., 1997; Jobling et al., 1998; Larsson et al., 1999; Flammarion et al., 2000; Harshbarger et al., 2000; Hashimoto et al., 2000; Solé et al., 2002; Folmar et al., 2001a,b; Hecker et al., 2002). תצפיות אלה תומכות בהיפותזה שהוצגה ב-1993 על ידי Sharpe and Skakkebaek שחשיפה של זכרים, בתקופה קריטית במחזור חייהם לאסטרוגנים נקביים או כימיקלים המחקים פעילות אסטרוגנית (קסנו-אסטרוגנים), עשויה לפגוע בהתפתחות הנורמאלית ובתפקוד של מערכת הרבייה הזכרית. בניסויים מבוקרים בהם נחשפו דגים לריכוזים שונים של קולחים במעבדה או בנחלים נמצא קשר בין חשיפת הדגים לקולחים לבין פמיניזציה (Larsson et al., 1998; Jobling et al., 1997; Knudsen et al., 1997; Harries et al., 1997; al., 1999; Flammarion et al., 2000; Solé et al., 2000; Hecker et al., 2002; Vehaak et al., 2002). חיזוק לממצאים הנ"ל התקבל גם במבחנים של תרבויות תאים לקביעה של מידת הפעילות האסטרוגנית של הקולחים (Körner et al., 1999; Körner et al., 2000; Desbrow et al., 1998; Körner et al., 2001; Shen et al., 2001; Witters et al., 2001; Murk et al., 2002). נמצא כי במרבית המקרים הפעילות האסטרוגנית שבקולחים היא תוצאה של נוכחות האסטרוגנים הטבעיים E1 ו E2 והאסטרוגן הסינטטי EE2 (Bachmann Christiansen et al., 2002). מרבית המחקרים שעסקו בהשפעות של זיהום באסטרוגנים ומזהמים אחרים להם פעילות אסטרוגנית, בחנו השפעתם על דגים זכרים. זאת משום שהזכרים נחשבים לרגישים יותר להשפעות של אסטרוגנים מאחר שריכוז האסטרוגנים בגוף הדגים הזכרים נמוך בהשוואה לזה שבגוף הנקבות. תופעה נפוצה הקשורה בפמיניזציה של דגים זכרים היא יצירת חלבון ויטלוגנין (vitelogenin), לו תפקיד בהבשלה של ביצים (Bachmann Christiansen et al., 2002). חלבון זה מיוצר בכבד כתגובה לייצור והפרשה של ההורמון הטבעי E2 (Bachmann Christiansen et al., 2002). ההשפעה של ייצור ויטלוגנין בדגים זכרים על יכולת רבייתם אינו ברור עדיין במלואו. אולם, קיימות עדויות כי לייצור חלבון ויטלוגנין עלות אנרגטית והשפעה שלילית על בריאות הדג (Herman and Kincaid 1988; Schwaiger et al., 2000; Folmar et al., 2001b). כן תועדו מקרים של השפעה שלילית ברורה של חשיפה לאסטרוגנים על רבייה בדגים כתוצאה מהטיה זוויגית (intersex). בדגים זכרים נמצאו ביציות בשלבי התפתחות מוקדמים באשכים. במקרים קיצוניים נצפתה גם התפתחות של מבנים המשמשים להובלה של הביצים לצינור הביצים והיעלמות של צינור הזרע. שינויים נוספים במערכת הרבייה כללו עיכוב התפתחות וניוון של תאי זרע (Miles-Richardson et al., 1999). בנוסף לשינויים במערכת הרבייה קיימת השפעה שלילית של אסטרוגנים על הפריה של ביצים ושינויים בהתנהגות הרבייה של דגים זכרים (Shioda and Wakabayashi 2000a and b; Van den Belt et al., 2001; Knörr and Braunbeck, 2002). קיימות גם עדויות כי זיהום באסטרוגנים פוגע ברבייה של נקבות, המתבטא

בהטלה של מספר נמוך של ביצים. זאת ככל הנראה כתוצאה מהפרעה בתהליך הבשלת הביצים (Harris et al., 2001; Van der Belt et al., 2001).

קיימים דיווחים על ריכוז אסטרוגנים נמוך מנוגרים אחד בליטר כריכוז הנמוך ביותר של אסטרוגנים הגורם להשפעה ביולוגית שלילית על דגים (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC;) (Miles-Richrdson et al., 1999; Metcalfe et al., 2001 עם זאת, מרבית העדויות מצביעות על ערכי LOEC גבוהים כבסדר גודל. בניסויים בהם נחשפו דגים זכרים לריכוזים עולים של E2 נמצא למשל, שייצור חלבון הויטלוגנין מתרחש בעקבות חשיפה בריכוז של 5 ננוגרם בליטר (Thorpe et al., 2001, 2000; Thorpe et al., 2001); הטיה זוויגית (intersex) נצפתה ב 10 ננוגרם בליטר (Metcalfe et al., 2001); פגיעות אחרות באשכים נצפו בריכוזים של בין 10 ל- 50 ננוגרם בליטר (Nimrod and Benson, 1998; Miles-Richardson et al., 1999; Halm et al., 2002) ואף בריכוז הגבוה מ- 100 ננוגרם בליטר (Miles-Richardson et al., 1999). ייצור של ויטלוגנין והטיה זוויגית בעקבות חשיפה ל E1 תועד בריכוז של 30 ננוגרם בליטר (Panter et al., 1998; Routledge et al., 1998) ו 10 ננוגרם בליטר (Metcalfe et al., 2001), בהתאמה. מבין האסטרוגנים הטבעיים ל- E3 הפעילות הנמוכה ביותר (פי- 30 עד פי 100 בהשוואה לזו של E2, Metcalfe et al., 2001). האסטרוגן הסינטטי EE2 משבש פעילות אסטרוגנית בדגים זכרים בריכוז נמוך מזה של ההורמונים הטבעיים. ייצור ויטלוגנין בדגים זכרים והטיה זוויגית תועדו בריכוזים של 0.1 ננוגרם בליטר (Metcalfe et al., 2001). מחקרים שבחנו דפוס השפעה של אסטרוגנים על החי מעידים כי לאסטרוגנים השפעה אדטיבית על מערכת הרבייה הזכרית (Thorpe et al., 2001; EA, 2002). מידת הרגישות לאסטרוגנים שונה בין מינים של דגים ובשלבי התפתחות שונים במחזור החיים (Bachmann Christiansen et al., 2002). באופן כללי בשלבים מוקדמים של מחזור החיים הדגים רגישים ביותר להשפעות זיהום באסטרוגנים מאחר ובשלבים אלה מתרחשת ההתמיינות הזוויגית (Piferrer, 2001). גם לדגים בוגרים קיימות תקופות במהלך מחזור הרבייה בהם הדגים צפויים להיות רגישים יותר לשיבושים הורמונאליים (Bachmann Christiansen et al, 2002). רגישות הדגים לזיהום של אסטרוגנים עולה ככל שמשך החשיפה מתארך (Rodgers-Gray et al., 2000; Thorpe et al., 2001). עם זאת דווח כי לחשיפה תקופתית בריכוזים גבוהים (חשיפה אקוטית) השפעה גדולה יותר מאשר לחשיפה כרונית בריכוזים נמוכים (Panter et al., 2000).

בנוסף לעדויות על פגיעה של משבשי פעילות אסטרוגנית בהתפתחות ותפקוד של מערכת הרבייה ובהתנהגות רבייה של דגים הצטברו עדויות להשפעותיהם השליליות גם על חסרי חוליות (למשל, Jobling et al., 2004), זוחלים (למשל, Milnes and Guillette, 2008; Guillette and Iguchi, 2003) ודו-חיים (למשל, Rouhani Rankouhi et al., 2005). יתרה מכך, נטען כי ההשפעות השליליות של משבשי פעילות אסטרוגנית על בעלי חיים ועל הסביבה אינן מוגבלות רק למזהמים שעמידים בסביבה

(persistent contaminant) משום שקיימים מזהמים להם רעילות בריכוזים נמוכים במיוחד המוזרמים ברציפות לסביבה עם הקולחים (Jones et al., 2005). בניגוד להשפעה השלילית הברורה של משבשי הפעילות האסטרונגית על מאכלסי הנחל השפעותיהם השליליות על בריאות הציבור פחות ברורה. יש הטוענים להיעדר השפעה שלילית משום שריכוזם בקולחים נמוך (Toze, 2006a and b). הקושי בהוכחה של הקשר בין נוכחות מיקרו-מזהמים ומשבשי פעילות אסטרונגית בקולחים לבין בריאות הציבור מוסברת בנוכחות של מגוון גדול של כימיקלים והיעדר ידע רב על השפעות אדטיביות או סינרגיסטיות; בריכוזים הנמוכים של משבשי הפעילות האסטרונגית בקולחים הגורמים לביטוי של תחלואה רק לאחר חשיפה כרונית של חודשים או שנים; והיעדר הבנה מעמיקה של התנהגות המזהמים בסביבה ובכלל זה קליטתם והצטברותם בצומח או פוטנציאל של חלחול למי תיהום (Hamilton et al., 2007).

2.3 אגנים ירוקים

2.3.1 אגנים ירוקים טבעיים

אגנים ירוקים טבעיים (natural wetlands) הם מערכות אקולוגיות מוצפות במים רדודים במהלך חלק או כל השנה (Haberl et al., 2003). המכנה המשותף לכל מערכות האגנים הירוקים הטבעיים הוא תקופת הצפה ממושכת התומכת בהתפתחות של צמחי מים (hydrophytes) הגדלים רק בקרקעות מוצפות. אגנים ירוקים הם בין האקוסיסטמות הפוריות ביותר בכדור הארץ, בהן היצרנות הראשונית גבוהה ביותר ולכן קיימת יכולת להרחיק מזהמים בתהליכים כימיים, פיסקאליים וביולוגיים (Kadlec and Knight, 1996; Kadlec and Wallace, 2008). שנים רבות שמשו אגנים ירוקים טבעיים כאתר להזרמה של שפכים. במקרים אלו שימשו האגנים הירוקים הטבעיים בעיקר כאתרי קליטה של השפכים ופחות כמוקדים לטיפול בהם (Wentz, 1987; Haberl et al., 2003). הזרמה בלתי מבוקרת של שפכים גרמה במקרים רבים להרס של אזורי ביצה (Vymazal, 2003a). כיום, הזרמה של שפכים וקולחים לאגנים ירוקים טבעיים פחתה ואת מקומה תפס השימוש באגנים ירוקים מלאכותיים (Constructed Wetlands, CW), שנועדו לטיפול בשפכים (Vymazal, 2003a).

2.3.2 אגנים ירוקים מלאכותיים

אגנים ירוקים מלאכותיים הם אקוסיסטמות שנבנו על ידי האדם למטרת טיפול בשפכים, לחלקם גם תרומה נופית. מערכות אלו מתוכננות לחקות ולהעצים תהליכים המתקיימים באגנים ירוקים טבעיים במטרה לשפר את היכולת של הרחקת המזהמים. תוך כדי זרימת הקולחים דרך האגנים חל שיפור באיכות הקולחים כתוצאה ממגוון תהליכים הכוללים ספיחה, התגבשות והשקעה (פרסיפיטציה), סינון, חמצון וחיזור, פירוק כימי או קליטה ופרוק ביולוגיים (למשל Haberl et al., 2003). קיימים מודלים הידרולוגיים שונים של אגנים ירוקים מלאכותיים (Kadlec and Wallace, 2008). הטיפוסים הבסיסים מוצגים להלן:

א. זרימת מים עילית (Surface Flow-SF): במערכות אלו גופי מים פתוחים הדומים במבנם לאגנים ירוקים טבעיים. הקולחים מוזרמים מאתר כניסה, זורמים דרך כל האגן ונאספים במתקן יציאה אחד או יותר (Kadlec, 1994).

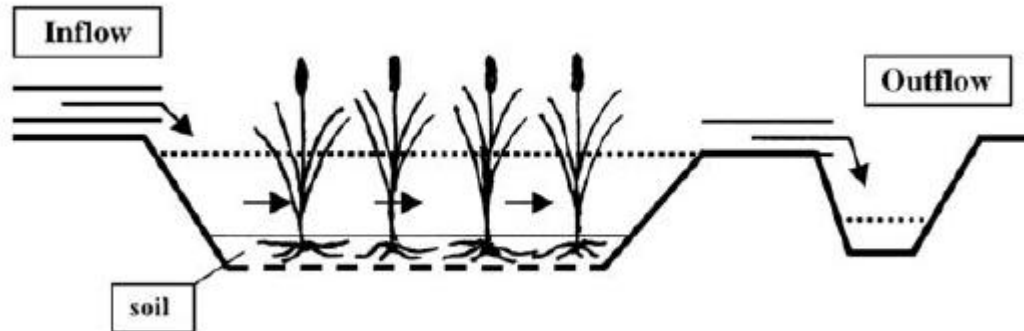
ב. זרימה תת-קרקעית אופקית (Horizontal Subsurface Flow- HSSF): מערכות בהם קיים מצע נקבובי בו שתולים צמחי מים. המים מוזרמים אופקית וזורמים מתחת לפני השטח בין חללי המצע, מהכניסה ליציאה.

ג. זרימה תת-קרקעית אנכית (Vertical Subsurface Flow - VSSF): מערכות בהם קיים מצע נקבובי או חול בו שתולים צמחי מים. המים מוזרמים אנכית וזורמים מתחת לפני השטח בין חללי המצע, מפני השטח לקרקעית.

בכל אחת מהקטגוריות הנ"ל קיימים טיפוסי משנה עם פרטי מבנה ותפעול ייחודיים (Sun et al., 1999; Behrends et al., 2001; Poach and Hunt, 2007; Kadlec and Wallace, 2008).

אגנים ירוקים בזרימת מים עילית (SF)

אגנים ירוקים בזרימת מים עילית נבנים לרוב כאגן רדוד, אטום בקרקעיתו ובו כ-20-30 ס"מ מצע עבור התבססות שורשי הצמחים (איור 2.2). בדרך כלל חלק גדול משטח הפנים (>50%) מכוסה בצמחיה מזדקרת (emergent hydrophytes) צפופה.



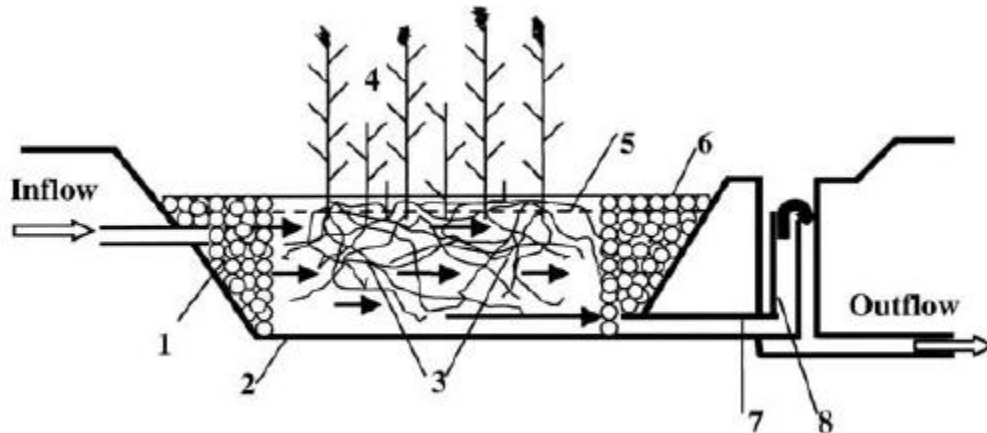
איור 2.2: סכמה של אגן ירוק בזרימת מים עילית. במערכת שתולים צמחי מים מזדקרים (מתוך: Vymazal, 2001)

התפתחות הצמחים מאיטה ומכוונת את זרימת המים (Reed et al., 1998). באגנים אלו קיימים אזורים בעלי משטר חמצן שונה (מושגי משטר חמצן – סעיף 6.3.5). בדרך כלל סמוך לפני המים ריכוז החמצן גבוה יחסית (תוצאה של שיחלוף חמצן עם האטמוספירה) וסמוך לקרקעית התנאים היפוקסיים (עניים בחמצן) ואנאירוביים (ללא חמצן). ככל שהעומס האורגני על המערכת רב יותר, היקף האזורים ההיפוקסיים והאנאירוביים גדל והם וימצאו סמוך יותר לפני המים (Vymazal, 2003a). על פני חלקי הצמחים הטבולים במים ועל פני הקרקעית מתפתחת חברה של יצורים

מיקרוסקופיים בעיקר חיידקים, פיטריות ואצות היוצרים קרום ביולוגי פעיל (ביופילם), US EPA, (2000).

אגנים ירוקים בזרימת מים תת-קרקעית אופקית (HSSF)

באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אופקית זורמים הקולחים מתחת לפני השטח, בין חללים של קרקע או מצע נקבובי בהם שתולים צמחי מים מזדקרים (איור 2.3). הקולחים עוברים דרך המצע והשורשים. באגנים אלו קיימים אזורים אירוביים, אנאוקסיים ואנאירוביים. מקור החמצן בשחלוף עם האטמוספירה ובדיפוזיה משורשי הצמחים אל הסביבה (Vymazal, 2003a). בשל מרחק הדיפוזיה הקצר האזור האירובי מוגבל ותהליכים של פירוק ביולוגי מתקיימים בעיקר בתנאים אנאוקסיים ואנאירוביים (Brix, 1990). על פני השורשים והמצע מתפתח ביופילם המורכב מחברה של מיקרואורגניזמים (בעיקר חיידקים ופיטריות). המצע והשורשים מספקים שטח פנים גדול יותר להתפתחות ביופילם בהשוואה לזה הזמין במערכות זרימה עילית (Vymazal, 2003a).

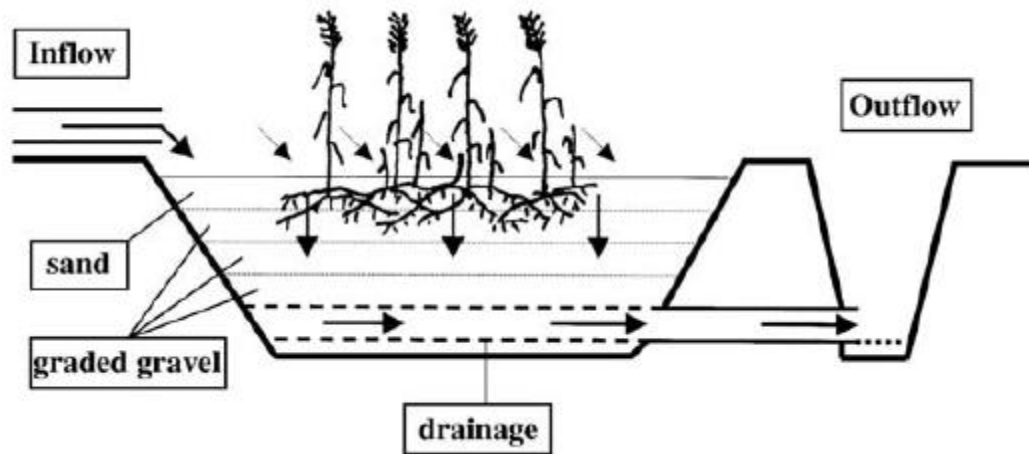


איור 2.3: סכמה המתארת אגן ירוק בזרימת מים תת-קרקעית אופקית (HSSF). 1. אזור הכניסה של הקולחים עשיר במצע גס, 2. יריעת איטום, 3. מצע ושורשי הצומח, 4. צמחיה, 5. מפלס המים באגן, 6. אזור ניקוז הקולחים עשיר במצע גס, 7. צינורות ניקוז ו 8. מתקן איסוף הקולחים הכולל בקרה על מפלס המים באגן. החצים מסמנים את כיוון התנועה של המים. (מתוך: Vymazal, 2003a).

אגנים בזרימת מים תת-קרקעית אנכית (VSSF)

אגנים ירוקים בזרימת מים אנכית בדרך כלל בנויים ממספר שכבות מצע, העליונה בגודל גרגר הקטן ביותר (למשל חול) ותחתיה, מספר שכבות חצץ בגודל גרגר הולך וגדל (Vymazal, 2003a). במצע שתולים צמחים מזדקרים בדומה לקיים במערכת זרימה תת-קרקעית אופקית (איור 2.4). קיימים דפוסים שונים של אופן ההזרמה של הקולחים באגנים אלה. הטיפול הנפוץ ביותר (מיושם בעיקר באירופה) הוא של הזרמת קולחים לסירוגין (פעימות - pulse loading). בדפוס זה האגן מוצף במהלך הזרמה של הקולחים המחלחלים בהדרגה דרך שכבות המצע ונאספים בתחתית באמצעות צינורות ניקוז (איור 2.4). בצפון אמריקה מופעלות מערכות אלה גם בסחרור הקולחים (vegetated re-circulating gravel filters; Lemon et al., 1996). עם ניקוז הקולחים מהמצע, אוויר חודר אל חללי

המצע ולפיכך באגנים בזרימה אנכית מתקיימים בעיקר תנאים אירוביים (Cooper et al., 1996). דפוס הזרמה נוסף כולל מחזורים מהירים של הצפה וניקוז (tidal flow) המשפרים עוד יותר את אוורור המצע (Behrend et al., 1996; Ausin and Lohan, 2005). התנאים האירוביים במערכות זרימה תת-קרקעית אנכית מאפשרים חמצון של אמוניה לניטראט (ניטריפיקציה) ולכן במקרים רבים הן משולבות עם מערכות בזרימת מים תת-קרקעית אופקית, בהם מתבצעת ביעילות הרחקה של ניטראט (דניטריפיקציה). המערכת המשולבת מכונה מערכת היברידיית ובה קיים סילוק יעיל של חנקן כללי (Cooper et al., 1999).



איור 2.4: סכמה המתארת אגן ירוק בזרימת מים תת-קרקעית אנכית (VSSF). אזור כניסת הקולחים, המצע, ניקוז ויציאה מסומנים בסכמה. החצים מסמנים את כיוון תנועת הקולחים דרך התא (מתוך: Vymazal., 2001).

טכנולוגיה של אגנים ירוקים הופכת למקובלת בעולם. כיום קיימים למעלה מ-20 אלף מתקנים של אגנים ירוקים המיועדים לשפר איכות של קולחים ממקורות עירוניים, תעשייתיים חקלאיים ומתשטיפים (Vymazal and Kröpfelová, 2008). מבין האגנים הירוקים המוקמים בעולם לטיפול בשפכים מרבית האגנים הירוקים כוללים דפוס מבנה זרימה אחד (Kadlec, 2009) ומיועדים לטיפול בשפכים באיכות נמוכה יחסית (Bachand and Horne, 2000b; Ghermandi et al., 2007). ליטוש קולחים באיכות גבוהה באגנים ירוקים מוגבל בעיקר לאגנים ירוקים בדפוס של זרימה עילית (Thullen et al., 2005).

3. השערת המחקר ומטרות העבודה

3.1 השערת המחקר

בתום טיפול קונבנציונאלי בשפכים נותרים בהם מזהמים אסטרואגנים. חומרים אורגאניים הידרופוביים נוטים לצאת מעמודת המים באמצעות תהליך של ספיחה. כמו כן אוכלוסייה מיקרוביאלית עשירה ומגוונת יכולת לתרום לפירוק ביולוגי של מגוון חומרים אורגאניים כולל תרכובות סינטטיות (Van Der Meer et al., 1992). באגנים ירוקים המצע הנקבובי והצמחייה מספקים שטח פנים גדול להתפתחות ביופילם. כמו כן, באגנים הירוקים קיימות מגוון נישות אקולוגיות ותנאי סביבה שונים התומכים בהתפתחות של מגוון רחב יחסית של אוכלוסיות מיקרוביאליות להן יכולות פיסולוגיות מגוונות. המצע הקבוע המאפיין אגנים ירוקים מאפשר התפתחות גם של חיידקים בעלי זמן מחצית חיים ארוך יחסית. בהתאם, השערת המחקר היא כי באגנים ירוקים מתקיימים תנאים המאפשרים סילוק של אסטרואגנים מקולחים באמצעות מנגנון של פירוק ביולוגי וספיחה.

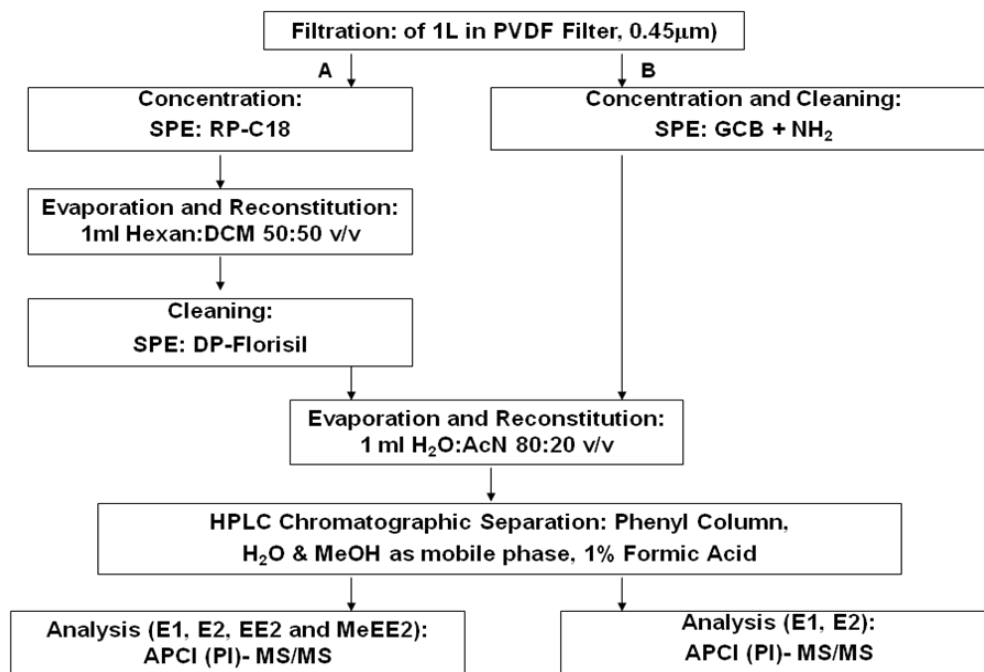
3.2 מטרות העבודה

המטרה הכוללת של המחקר הנוכחי היא לבחון את היכולת של אגנים ירוקים במערכת היברידית להרחיק הורמונים אסטרואגנים מקולחים שניוניים. בהתאם נקבעו המטרות הביצועיות הבאות:

1. לפתח שיטות אנליטיות לזיהוי וכימות של אסטרואגנים טבעיים וסינטטיים בקולחים שניוניים באמצעות אנליזה ב-HPLC-MS/MS (פרק 4 בקיצור ונספח 2 בהרחבה).
2. לבחון בתנאי מעבדה מבוקרים את היכולת של ביופילם שמקורו באגנים ירוקים להמיר ביולוגית ולפרק אסטרואגנים טבעיים וסינטטיים בתנאי סביבה שונים (פרק 5).
3. לבחון בתנאי שדה את היכולת של אגנים ירוקים עם דפוסי זרימה והרכבי צומח שונים להרחיק מזהמי מים קונבנציונאליים (חומר אורגאני, חלקיקים מרחפים, תרכובות חנקן וזרחן) מקולחים שניוניים (פרק 6).
4. לבחון בתנאי שדה את היכולת של אגנים ירוקים עם דפוסי זרימה והרכבי צומח שונים להרחיק אסטרואגנים מקולחים שניוניים (פרק 7).
5. להעריך את ההתאמה של אגנים ירוקים בדפוסי זרימה שונים לטש קולחים שניוניים (הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים ואסטרואגנים; פרק 8).
6. לבחון את ההתאמה של קולחים שניוניים שטופלו באגנים ירוקים להזרמה לנחלים ולהשקיה (פרק 8)

4. התאמה שיטה אנליטית לזיהוי וכימות אסטרוגנים בקולחים

קיים קושי אובייקטיבי באנליזה של אסטרוגנים בדוגמאות של קולחים משום הריכוזים הנמוכים של האסטרוגנים בסביבה (ננו עד מיקרוגרם לליטר) ומשום נוכחות של מגוון רחב של תרכובות אורגניות אחרות בדגימה (Díaz-Cruz et al., 2003). בתקופת המחקר לא הייתה בארץ מעבדה שעסקה בכימות של אסטרוגנים בקולחים בריכוזים סביבתיים באנליזות כימיות כ- HPLC-MS/MS או GC-MS/MS. אנליזה של אסטרוגנים בשיטה אימונו-כימית אינה מתאימה ליישום במחקר הנוכחי משום היעדר אפשרות של זיהוי תוצרי פירוק בלתי מוכרים. בעולם קיימים פרוטוקולים שונים לאנליזה של אסטרוגנים בדגימות סביבתיות (נספח 1). בשל הקשיים האנליטיים עדיין נעשים מאמצים לשיפור השיטות (Brossa et al., 2004; Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Gomes et al., 2005; Farré et al., 2006; Koh et al., 2007). כמו כן, בגין התלות של רגישות הבדיקה במכשור ובמדיום הנבדק היה צורך בהתאמה של שיטות קיימות לתנאי המחקר. משום כך פותחו במחקר הנוכחי שיטות אנליטיות לזיהוי וכימות של אסטרוגנים מקולחים שניוניים באמצעות HPLC-MS/MS. עיקרי השיטות הכוללות פרוטוקול לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים (A) ופרוטוקול לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים (B) מוצגים באיור 4.1. השלבים הכרוכים בפיתוח השיטה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים מפורטים בנספח 2. ערכי LOD (ריכוז מינימאלי שניתן לזיהו) ו- LOQ (ריכוז מינימאלי שניתן לכימות) של השיטות הנ"ל מוצגים בטבלה 4.1.



איור 4.1: שלבים עיקריים בפרוטוקולים לניקוי ואנליזה של אסטרוגנים טבעיים (שיטה A ו B) וסינטטיים (שיטה A) בקולחים שניוניים. הפרוטוקולים מבוססים על השיטות שפותחו במחקר הנוכחי (נספח 2)

טבלה 4.1: ריכוז אסטרוגנים מינימאלי הניתן לזיהוי (LOD) וכימות (LOQ) בפרוטוקולים שפותחו במחקר הנוכחי הכוללים את שיטה A המתאימה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים ושיטה B המתאימה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים בלבד

	Method A		Method B	
	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
E1	2	5	2	5
E2	1	5	1	2
E3	-	-	5	10
EE2	2	5	*	*
MeEE2	2	5	*	*

-לא נבדק
* השיטה אינה מתאימה לאנליזה

5. המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים באמצעות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים

5.1 מבוא

מטרתו של הפרק הנוכחי היא לזהות תוצרי המרה ביולוגיים של אסטרוגנים בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים ולבדוק האם ובאלו תנאים אסטרוגנים עוברים המרה (biotransformation) ופירוק ביולוגיים (biodegradation). הבדיקה נעשתה בתנאי מעבדה באמצעות מבחני חשיפה מנתיים (batch experiments).

5.2 רקע מדעי

באגנים ירוקים עיקר ההרחקה של חומר אורגני מומס מתבצעת על ידי חיידקים (50%-90%, Greenway, 1997), בעיקר הטרוטרופים. כמו כן יתכן פירוק של חומר אורגני גם על ידי חיידקים אוטוטרופים, פיטריות ופרוטוזואה מסוימים (Reddy and DeLaune, 2008). אורגניזמים אלו הם המרכיבים העיקריים של הקרום הביולוגי הפעיל (biofilm) הקיים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (Baptista, 2003). באגנים ירוקים עם זרימה עילית קיימת חדירה של אור ולכן כולל הביופילם גם אצות (Kadlec et al., 2000). הביופילם מתפתח על פני מצע טבול הכולל באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית את מצע האגן ושורשי הצומח. באגנים בזרימה עילית מתפתח הביופילם על פני מצע הקרקעית ועל גבי חלקיהם הטבולים של צמחי מים (Kadlec et al., 2000). הביופילם מתאפיין בייצור של פולימרים בקטריאליים חוץ-תאיים היוצרים מטריקס העוטף את התאים ומצמידם למצע (Dowd et al., 2000). המטריקס הסיבי תורם לפעילות ולשרידות החיידקים, בין השאר משום נוכחות אזורים טעונים להם נקשרים יונים חיוניים לאוכלוסיית הביופילם. כמו כן מספק המטריקס החוץ תאי הגנה מפני תנאי סביבה עוינים כהתייבשות, שינויים בערך הגבה, שינויי טמפרטורה ובמידה מסוימת אף מפני טריפה על ידי פרוטוזואה (Tanner et al., 1998; Dowd et al., 2000). הביופילם תומך בהתפתחות אוכלוסיות חיידקים מגוונות (Kadlec and Knight, 1996) בין השאר משום קיומן של מיקרו-נישות בתוכו כאזורים עשירים או עניים בחמצן. פעילות ההדדית בין אוכלוסיות חיידקים שונות מאפשרת קיומם של מיקרואורגניזמים בעלי דרישות פיזיולוגיות שונות ומגביר את המגוון הביולוגי בו (Dowd et al., 2000). למשל, כאשר תוצר מטבוליזם אירובי משמש כסובסטרט לגדילה והתפתחות של אוכלוסייה אנאירובית. המנגנונים הבקטריאליים המשמשים להרחקה של אסטרוגנים דומים לאלו של סילוק תרכובות אורגניות אחרות. חיידקים מנצלים תרכובות אורגניות כמקור אנרגיה (תורם או מקבל אלקטרונים), מקור פחמן או תחליף לתרכובות טבעיות דומות. Reddy and DeLaune (2008) התייחסו לתהליך של המרה ביולוגית (biotransformation) כמנגנון כללי של סילוק (attenuation) תרכובות אורגניות למשל ממקור רפואי בסביבה. בהקשר זה הם

הבחינו בין התהליכים הבאים: א. פירוק ביולוגי (biodegradation) חלקי או מלא (מינרליזציה) בו החומר האורגני משמש לצרכי גדילה וכמקור אנרגיה למיקרואורגניזמים. מינרליזציה מתרחשת בעיקר כאשר קיימת אינטראקציה בין מספר קבוצות מיקרואורגניזמים. ב. קו-מטבוליזם בו מלווה הגדילה של מיקרואורגניזמים המבוססת על תרכובת קיימת, בפירוק של תרכובת אחרת המצויה בסביבה ושאינה משמשת כמקור לנוטריאנטים או אנרגיה. ג. צבירה ביולוגית (microbial accumulation) העשויה להתרחש בתהליכים פסיביים כספיחה או בתהליכים אקטיביים של קליטה. ד. פולימריזציה וקוניוגציה (polymeration and conjugation) בהם משמשים המיקרואורגניזמים כמתווכים לקשירה אוקסידטיבית בין תרכובת אורגנית למולקולה מאותו סוג או לתרכובת אורגנית אחרת. ה. השפעה עקיפה של פעילות בקטריאלית על התרכובת האורגנית כתוצאה משינוי תנאי הסביבה כערך הגבה, פוטנציאל חיזור או יצירה של תוצרים פעילים המגיבים עם התרכובת האורגנית (Reddy and DeLaune, 2008).

המרה ביולוגית של מזהמים יכולה להתרחש על ידי מנגנון יחיד או שילוב של מנגנונים שונים. כמו כן, יתכנו מנגנוני הרחקה שונים לאותה תרכובת בסביבות שונות בשל הבדלים במגוון אוכלוסיות המיקרואורגניזמים (Shi et al., 2004b) והבדלים בתנאי הסביבה (Ke et al., 2007). בנוסף לכך הפירוק של תרכובת אורגנית עשוי להתרחש ע"י אורגניזם יחיד או שילוב של מספר אורגניזמים (Reddy and DeLaune, 2008). לפיכך, לתרכובת נתונה תתכן הופעה של תוצרי המרה שונים. הבנה של תהליכי ההמרה ותוצריהם חשובה משום האפשרות שגם לתוצרי הפירוק של מזהמים סביבתיים תהיה השפעה ביולוגית שלילית (Reddy and DeLaune, 2008).

בעבודה הנוכחית נעשתה הבחנה בין תהליכי המרה ביולוגית בהם חומר המוצא עובר פירוק או שינוי כימי לתוצרי משנה (metabolites), לבין פירוק ביולוגי בו החומר עובר מינרליזציה ולבין קליטה (accumulation).

שכיחות של אוכלוסיות מיקרוביאליות המסוגלות להמיר ביולוגית ולפרק אסטרוגנים צפויה לעלות בסביבות בהם קיימת חשיפה ארוכה למזהמים אלו (Spain and Van Veld, 1983; Ternes et al., 1999b). בהתאם לזאת ניתן להניח כי בסביבה המזוהמת בקולחים המכילים הורמונים אסטרוגנים צפויים להתקיים מיקרואורגניזם להם יכולות פיזיולוגיות לפרקם. בשנים האחרונות בודדו בהצלחה מסביבות החשופות לשפכים וקולחים מגוון גדול של מיקרואורגניזמים להם יכולות להמיר ביולוגית ולפרק אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים. בין מיקרואורגניזמים אלו ניתן למנות למשל את הפטרייה והחיידקים *Novosphingobium* (Fujii et al., 2002 and 2003), *Rhodococcus zopfii* ו *Ralstonia* sp. ו *Achromobacter xylosoxidans* (Yoshimoto et al., 2004) *Rhodococcus equi* (Weber et al., 2005) שבודדו מבוצה משופעלת. *Acinetobacter* spp. בודד בהצלחה וכנראה נפוץ במים וקררע (Abdel-EI-Hallem, 2003) ו *Sphingomonas* בודד מקרקע אקוויפר חולית המוזנת בקולחים שניוניים (Ke et al., 2007).

קביעה של פוטנציאל הפירוק של מזהם סביבתי על ידי מיקרואורגניזמים נעשית לרוב בתנאי מעבדה על ידי חשיפת המזהם לסובסטרט (קרקע או בוצה), לאוכלוסיה מיקרוביאלית שנאספה בסביבה או לתרבית טהורה שבודדה מהסביבה. בסקר ספרות שערכתי לא נמצאו עבודות שבחנו המרה או פירוק ביולוגי של אסטרונגים על ידי אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שמקורם באגנים ירוקים. לעומת זאת, קיים מידע על המרה ביולוגית ופירוק ביולוגי של אסטרונגים על ידי אוכלוסיות מיקרואורגניזמים מסביבות אחרות (למשל קרקעות חקלאיות, Colucci and Topp, 2001) ובעיקר משפכים וקולחים (למשל de Mes et al., 2005). מחקרים אלו מעידים כי סילוק אסטרונגים טבעיים באמצעות תהליכים של המרה ופירוק ביולוגי מהיר יותר מאשר זה של אסטרונגים סינטטיים (למשל de Mes et al., 2005). כמו כן נמצא כי פירוק בקטריאלי של אסטרונגים על ידי חיידקים שבודדו ממפעלים לטיפול בשפכים יעיל יותר בתנאים עשירים בחמצן בהשוואה לתנאים אנאירוביים (Jürgens et al., 1999, Lee and Liu, 2002; Ying and Kookana, 2003; Andersen et al., 2004; de Mes et al., 2005).

5.3 שיטות וחומרים

5.3.1 ספיחה של אסטרונגים לדפנות של כלי המבחן

הניסויים בוצעו בארלנמיירים מזכוכית בנפח 300ml (להלן כלי הניסוי) ולכן בשלב ראשון נבחנה התאמתם כמערכת ניסוי. ספיחה של אסטרונגים לדפנות כלי הניסוי נקבעה באמצעות בחינה של שיעור השבה של אסטרונגים שהוספו לכלים עם וללא טיפול מקדים בדיכלורודימתיל סילן (dichlorodimethyl silan DCDMS). החומר הנ"ל החוסם את אתרי הספיחה על פני הזכוכית (קבוצות סילונוליות). DCDMS הוכן באמצעות מיהול 1% באצטוניטריל (AcN). ארבעה כלים נשטפו היטב בתמיסת הטיפול (DCDMS), נאטמו ונשמרו למשך 48 שעות. ארבעה כלים נוספים נשטפו בתמיסה של אצטוניטריל בלבד ושמשו כביקורת. בתום ההשריה נשטפו כל הכלים באצטוניטריל (3 פעמים) ויובשו בתנור (במהלך הלילה, 105°C). לאחר התקררות הכלים לטמפרטורת החדר, הם נשטפו היטב במים מזוקקים. על מנת לבחון ספיחה של אסטרונגים (E1 ו E2) לדפנות כלי הניסוי נבחו שיעור השבה בכלים שטופלו ב DCDMS ובכלי הביקורת. לכלים הוכנסה תמיסה מימית של E2 ו E1 (נפח 200ml וריכוז 0.05µg/ml). הכלים נאטמו ונשמרו למשך 24 שעות בטלטול (בחושך, למניעה של פירוק פוטו-כימי). בתום ההשריה מוצו האסטרונגים באמצעות SPE, הכולל חומר סופח מסוג C18 וריכוזם בתמיסה נקבע באמצעות אנליזה ב HPLC-MS/MS (איור 4.1).

5.3.2 ספיחה של אסטרונגים למצע בזלת ללא ביופילם

ביופילם לצרכי הניסויים יוצר על גבי חצץ בזלת (סעיף 5.3.3). במסגרת ניסויי הספיחה נבדק שיעור הדעיכה בריכוז אסטרונגים טבעיים E1 ו E2 במדיום מימי בנוכחות מצע בזלת ללא ביופילם וכתלות

במשקל המצע. חצץ בזלת (גודל חלקיקים 4.6-2mm) נשטף במי ברז, יובש בתנור (במהלך הלילה, 105°C) ואוכסן בדיסקטור עד להתקררות החצץ לטמפרטורת החדר. כמות חצץ של 2 עד 50 גרם הוכנסה לכלי הניסוי (3 חזרות לכל משקל). לכל כלי הוספה תמיסה של כספית כלורית (נפח 200ml, ריכוז 100mg/l) לעיכוב פעילות בקטריאלית. התמיסה נשמרה עם המצע בטלטול (בחושך, וטמפרטורה של 22±1°C) למשך 12 שעות טרם הוספת האסטרוגנים. E1 או E2 הוספו לכלים מתמיסת אם (ריכוז 100µg/ml, מומס באצטוניטריל) להשגת ריכוז סופי של 0.1µg/ml. נפח זהה של אצטוניטריל ללא אסטרוגן הוסף במקביל לשלושה כלים ושימש כבלנק וכלים ללא מצע בזלת בהם הוסף אסטרוגן (3 חזרות) שמשו כביקורת. דוגמא (נפח 2ml) לקביעה של ריכוז התחלתי של האסטרוגנים נאספה מיד עם ההוספה של האסטרוגן לכלי הניסוי. הדוגמה סוננה (syringe filter , PVDF, 0.45µm), ונשמרה בקירור (כ 4-5°C) עד לאנליזה. דוגמא שנייה להערכה של ריכוז האסטרוגן שנותר בתמיסה נאספה באותו אופן כעבור 24 שעות. אנליזה לריכוז האסטרוגנים בוצעה ב- HPLC-MS/MS (איור 4.1).

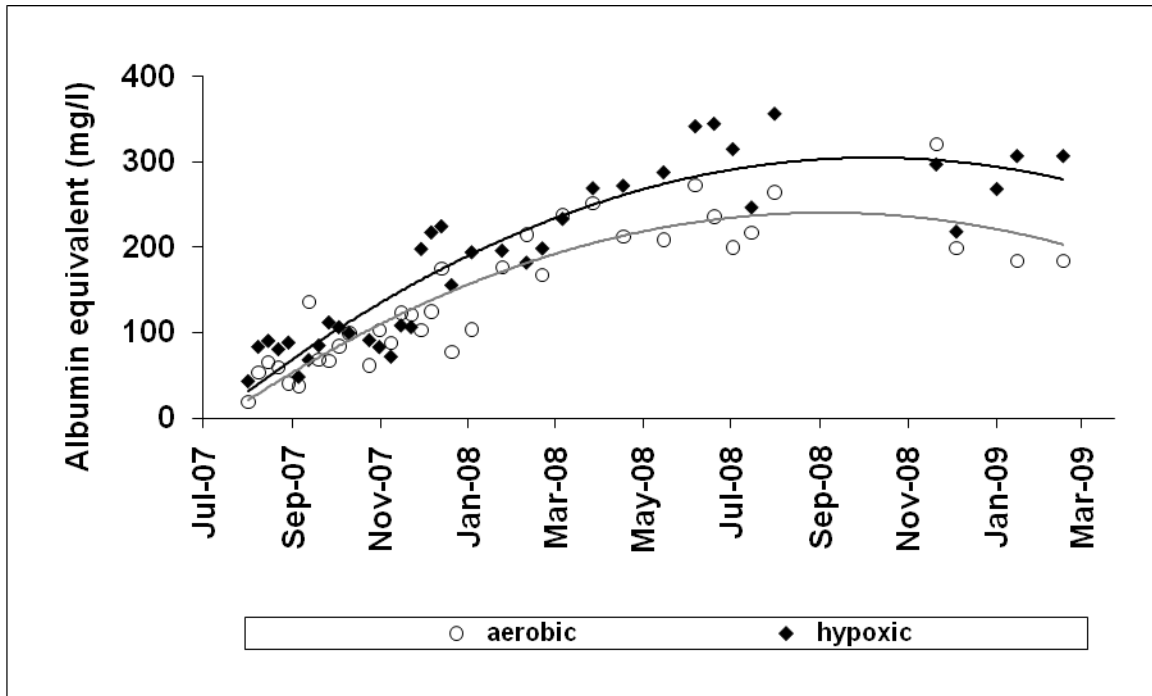
5.3.3 גידול ביופילם שמקורו באגנים ירוקים

ביופילם מקובע למצע בזלת התפתח במערכת ייעודית, שהוקמה במפעל טיהור השפכים שפד"ן. הביופילם הנ"ל התפתח על פני מצעי בזלת (שטוף) בקוטר 4.6-2mm (הופרד באמצעות נפה) בתוך קולונות שנבנו כאגנים ירוקים (גובה: 80cm, קוטר: 33cm, איור 1, נספח 4), להלן ביופילם שמקורו באגנים ירוקים. מצע הבזלת (גובה של כ- 60cm) הוכנס לקולונות מעל לשכבה של מצע גס (10cm בזלת בקוטר של 20-30mm), שמטרתו צמצום סתימה של אזור ניקוז הקולחים הממוקם בתחתית הקולונות. הקולונות נעטפו ביריעות בידוד תרמי רפלקטיביות (פוליאוריתן המכיל בועות אויר כלאות ומחופות משני צידיהן ברדיד אלומיניום). הקולונות הוזנו בקולחים שניוניים של השפד"ן (לאחר סינון מקדים בפילטר בקוטר נקבים של 400µm), במשטר זרימה הכולל הזנה לסירוגין (12 מנות ביום, שטף כ 162cm day⁻¹). שינוי בגובה צינור ניקוז הקולחים אפשר יצירה של תנאי זרימה רוויים או בלתי רוויים (איור 1, נספח 4) ובהתאם יצירה של תנאים אירוביים או היפוקסיים בתוך הקולונות (טבלה 5.3.1).

בקולחים הנכנסים ויוצאים מהקולונות נמדדו משתנים לימנולוגיים הכוללים טמפרטורה, חמצן מומס ומוליכות חשמלית באמצעות מד חמצן מוליכות מסוג Oxygen-Conductivity Meter YSI. בנוסף, נאספו דוגמאות לאנליזה של אמוניה, ניטראט וחנקן כללי. הדגימות הובלו לאנליזה במעבדה (עד שעתיים מאיסוף הדוגמאות) בקירור. ריכוז אמוניה ניטראט וחנקן כללי נמדדו בשיטה קולוריטרית באמצעות קיטים מסחריים (Hach Lange) ופוטומטר Hach Lange, LASSA 100. על מנת להעריך את קצב התפתחות הביופילם ויציבותו ביחידות הגידול נקבעה כמות חלבון חוץ תאי על פני 3 גרם מצע (BCA protein assay, Pierce).

5.3.4. ניטור של מערכת גידול הביופילם

התפתחות החיידקים בביופילם על פני המצעים הציגה דינאמיקה של רוויה (איור 5.3.1). בהתאם, איסוף מצעים עם ביופילם עבור ניסויי המעבדה החל עשרה חודשים לאחר הפעלת המערכת. ריכוז נוטריאנטים בקולחים המזינים ויוצאים מהקולונה הרוויה והבלתי רוויה (ממוצע וסטיית תקן) בתקופת המחקר מוצגים בטבלה 5.3.1. נתונים אלו מצביעים כי בקולונה הבלתי רוויה מתקיימת אוכלוסיה בקטריאלית המבצעת ניטריפיקציה.



איור 5.3.1: ריכוז חלבון (אקוויולנט לאלבומין) שהופק משטח פנים של 3 גרם מצע בזלת ונאסף מיחידת גידול רוויה (היפוקסית, נקודות מלאות) ובלתי רוויה (איירובית) בתקופת המחקר.

טבלה 5.3.1: ריכוז ממוצע (\pm סטיית תקן) של רוויה בחמצן (%) וריכוז אמוניה, ניטראט וחנקן כללי בקולחים המזינים את הקולונות ובמוצא קולונה בלתי רוויה (איירובית) ורוויה (איירובית) בתקופת המחקר (מאי 2008-מאי 2009)

	Influent	Effluent unsaturated column	Effluent saturated column
D.O. (%)	59.8 \pm 8.9	61.4 \pm 19.7	19.1 \pm 8.0
NH ₄ -N (mg/l)	2.8 \pm 1.5	0.2 \pm 0.3	2.7 \pm 1.8
NO ₃ -N (mg/l)	1.0 \pm 0.4	4.0 \pm 2.0	0.7 \pm 0.6
Total nitrogen (mg/l)	7.4 \pm 4.4	7.3 \pm 4.9	6.2 \pm 4.1

5.3.5 זיהוי ובידוד תוצרי ביוטרנספורמציה של אסטרונגים

נוכחות של תוצרי המרה ביולוגית (ביוטרנספורמציה) של אסטרונגים בתנאי חשיפה אירוביים ובנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים נבחנה לפני ואחרי אינקובציה של כ-90 שעות. אסטרונגים טבעיים וסינתטיים נבחרים (E1, E2, E3, או EE2) הוכנסו בריכוז סופי של 0.5 μ g/ml לכלי הניסוי

(וכלי הביקורת) שהכילו מדיום מימי מועשר בנוטריאנטים (נפח של 200ml המכיל BOD nutrient buffer, APHA formulation), להלן מדיום מימי מועשר. מדיום זה ללא אסטרוגנים שמש כבלנק. 1.5 גרם של מצע מכוסה בביופילם הוכנס לכלי הניסוי והבלנק, מלבד לכלי הביקורת. עם הוספה של האסטרוגנים והביופילם נאספה מהתמיסה דוגמה (נפח 2ml) לקביעת ריכוזו ההתחלתי של האסטרוגן. הדוגמה סוננה (syringe filter PVDF, 0.45µm) ונשמרה בקירור (4-5°C) עד לאנליזה. לאחר מכן נשמרו כלי הניסוי בחושך, בטלטול ובאוויר למשך 90 שעות, לאחריו נאספה דוגמה שנייה באותו אופן.

דעיכה בריכוז התחלתי של אסטרוגן המוצא בתום האינקובציה נקבעה באמצעות כרומטוגרמה של HPLC) UV, אורך גל של 280nm, קולונה HPLC מסוג Phenyl ובמריצים הכוללים מים ומתנול מוחמצים ב 0.1% חומצה פורמית, המוזרמים בתכנית גרדיאנט המתחילה ב- 35% ממס האורגאני ועליה הדרגתית ל 100% במהלך 15 דקות נוספות). הופעה וזיהוי של תוצרי פירוק ביולוגיים נבחנו באמצעות זיהוי הופעה של סיגנלים ב LC/UV (באותם תנאי הרצה) וב MS (ספקטרום יונים טעונים חיובית ב m/z בין 400-50). באם הופיע תוצר המרה ביולוגית (נוכחות סיגנל בדוגמא לאחר אינקובציה בנוכחות ביופילם החסר בדוגמא לפני אינקובציה ובדוגמת הביקורת), השווה זמן שהייה וספקטרום בליעה (LC/UV) של תוצר הפירוק (כפי שפורט להלן) לזה של סטנדרט אנליטי מוכר. כמו כן נבחנו משקלים (m/z) של יון מולקולארי (MS) ושברי יונים (MS/MS) חיוביים ושיליים של תוצר הפירוק בהשוואה לזה של הסטנדרט.

כאשר לא התאפשר זיהוי וודאי של תוצר ביוטרנספורמציה באמצעות השוואה לסטנדרט מוכר, נערכה אנליזה של ¹H NMR לקביעת המבנה המולקולארי. משום שבאנליזה זו נדרשת כמות גדולה יחסית של תוצר ביוטרנספורמציה (כ- 0.5mg), פותח פרוטוקול הכולל הפקת התוצר וריכוזו לפי המפורט להלן:

- א. אסטרוגן המוצא (ריכוז של 2µg/ml) הוכנס לתמיסה מימית מועשרת (נפח של 10 ליטר בכ- 50 ארלנמיירים), הכוללת מצע עם ביופילם (כ-2g). כלי הניסוי נשמרו בחושך, טולטלו ואווררו (הזרמה של אוויר באמצעות משאבת אוורור). אחת ל- 24 שעות נאספה דוגמא (2ml) לקביעת נוכחות של תוצר ההמרה הביולוגית עד להצטברותו בתמיסה.
- ב. אסטרוגן המוצא ותוצר ההמרה הופרדו מהתמיסה המימית באמצעות מיצוי נוזל-נוזל (LLE liquid-liquid extraction) הכולל אתיל אצטט (Ethyl Acetate) כממס אורגאני. ההפרדה בוצעה 3 פעמים על מנת לשפר מעבר של האסטרוגן ושל תוצר ההמרה לפאזה האורגאנית.
- ג. הפאזה האורגאנית (אתיל אצטט) המכילה את האסטרוגנים נשטפה במים (ULC-MS Grade) על מנת להרחיק את שאריות המלחים (שמקורם בתמיסה המועשרת).

ד. הממס האורגאני נודף ב rotavapore עד לייבוש מלא של התמיסה, לאחריו הומסו האסטרוגנים מחדש בכ- 10ml אצטוניטריל (AcN) ונפח הדוגמה נודף באמצעות גז חנקן לכ- 4ml.

ה. הפרדה בין אסטרוגן המוצא לבין תוצר המרה ביולוגית כמו גם ניקוי של הדוגמאות מחומרים נלווים אחרים בוצע באמצעות Preparative- HPLC הכולל הפרדת הדוגמאות על פני קולונה סמי-פרפרטיבית מסוג C18 (Phenomenex Luna C18 250X10mm, 5 μ). מים ואצטוניטריל שמשו כמריצים להפרדה בין החומרים (יחס איזוקרטי 40:60 AcN:H₂O) והוזרמו בקצב של 5ml/min. תוצר ההמרה הביולוגית נאסף באופן בררני (באמצעות מעקב אחר הסיגנל ב UV). בהמשך, הממס האורגאני (AcN) מהתמיסה של תוצר ההמרה נודף באמצעות rotavapore ושארית המים הורחקו על ידי הקפאה (חנקן נוזלי) ולאופילציה. תוצר הפירוק הומס מחדש ב 1.5ml אצטוניטריל (X 4 פעמים) ונודף לכ- 1ml באמצעות זרם עדין של גז חנקן. התהליך הנ"ל הכולל הפרדה וניקוי באמצעות Preparative-HPLC בוצע פעם נוספת לשיפור ניקוי הדוגמא.

ו. תוצר הפירוק זוהה כימית באמצעות אנליזת ¹H NMR (Varian Unity Plus) בממס DMSO, במכון תמ"י.

5.3.6 המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים

קצב פירוק והמרה של אסטרוגנים טבעיים (E2, E1, E3) וסינטטי (EE2) בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים נבחן בתנאי מעבדה מבוקרים (כ 20 \pm 2 $^{\circ}$ C, בחושך). כל ניסוי כלל בחינה של פירוק אסטרוגן נבחר, במדיום של קולחים שניוניים או במדיום מימי מועשר (סעיף 5.3.5). הניסויים בוצעו בתנאים אירוביים או היפוקסיים. כל ניסוי כלל ביקורת (נוכחות אסטרוגן בהיעדר ביופילם), טיפול (נוכחות אסטרוגן וביופילם) ובלנק (נוכחות ביופילם בהיעדר אסטרוגן).

כ- 20 גרם מצע עליו התפתח ביופילם נאסף מקולונות האגנים הירוקים בשפד"ן. המצע הוכנס לצנצנת זכוכית מלאה בקולחים, שנאספו במוצא הקולונות (אירובית או היפוקסית, בהתאמה). הצנצנות נעטפו בנייר כסף (למניעת חדירת אור) והועברו למעבדה בקירור. להרחקה של חלקיקים גסים (סדימנט, חומר אורגאני גס או חסרי חוליות גדולים) נשטף המצע עם הביופילם בעדינות באמצעות הזרמה של מי ברז מיושנים שעברו אוורור באוויר או בעבוע בחנקן, עבור אוכלוסיות אירוביות והיפוקסיות, בהתאמה.

הניסוי בוצע במדיום של קולחים שניוניים מסוננים או במדיום מימי מועשר. הקולחים השניוניים נאספו ממט"ש השפד"ן בכלי זכוכית כהה והועברו למעבדה בקירור. הקולחים סוננו בפילטר PVDF (0.45 μ m) ונשמרו בקירור (כ 4-5 $^{\circ}$ C) עד תחילת הניסוי (עד 24 שעות ממועד האיסוף). מדיום מימי מועשר הוכן לפי המפורט בסעיף 5.3.5. בניסויים שבוצעו בתנאים היפוקסיים הוסף למדיום המימי המועשר גם סודיום ניטראט (NaNO₃) לריכוז סופי של כ 10mg/l NO₃-N כמקבל אלקטרוניים.

תמיסת אם של אסטרוגנים הוכנה על ידי המסה של 10mg אסטרוגן נבחר ב- 100ml אתנול. שיפור המסה בוצע באמצעות סוניקציה (sonic cleaner, לכ- 30 דקות) בליווי חימום עדין (כ 40°C). עבור הכנה של עקומת כיוול הוכנה תמיסה נוספת של האסטרוגן (ושל תוצר הפירוק הביולוגי אם ידוע) ע"י המסה של 25mg של האסטרוגן הנבחר ב- 250ml אצטוניטריל (בלווי סוניקציה וחימום עדין). התמיסה נמהלה במים לריכוזים של 1 עד 0.005µg/ml.

הניסוי בוצע בארלנמיירים מזכוכית בנפח 300ml שמולאו בנפח של 200ml. המדיום אוורר במהלך הניסוי באמצעות הזרמה של אוויר או בעבוע של גז חנקן (ממיכל חנקן באיכות 5/9). אוויר או חנקן הוחדרו לכלי הניסוי באמצעות צינורות זכוכית. אסטרוגנים (מתמיסת אם באתנול) הוספו לכלי הניסוי והביקורת לקבלת ריכוז סופי של 0.4, 0.15, 0.5 ו 0.15µg/ml עבור E1, E2, E3 ו EE2, בהתאמה. לדוגמאות הבלנק הוכנס אתנול בלבד בנפח זהה לזה של האסטרוגן שהוסף לכלי הטיפול. ביופילם הוכנס באמצעות הוספה של 1.5 גרם מצע בזלת שמקורו בקולונות. על מנת לקבוע את כמות הביופילם על פני המצע נאספו ארבע דוגמאות נוספות של מצע בזלת (1.5 גרם) לקביעת ריכוז חלבון על פני המצע. דוגמאות אלו נשמרו בהקפאה (-20°C) עד לאנליזה (BCA Protein Assay, Pierce). כלי הניסוי נאטמו בפאראפילם, הוכנסו לשייקר אורביטאלי עם בקרת טמפרטורה (Environ Shaker, Lab-Line, 22±1°C, איור 2, נספח 4) ושהו בטלטול בחושך במהלך הניסוי (כ- 4 ימים).

להלן משתני איכות המים שנמדדו במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים מסוננים: צריכת חמצן כימית (COD) וחנקן כללי נקבעו בתחילת הניסוי באמצעות קיטים מסחריים וקולורימטר (Lassa 100, Hach Lange). אמוניה וניטראט נקבעו (כנ"ל) בתחילת הניסוי ובסיומו. ריכוז חמצן (נמדד ב- AB64, Accument®) וערך הגבה (נמדד ב- IQ, Fischer Science) נקבעו בתחילת הניסוי ומידי 24 שעות.

דוגמאות לקביעה של הריכוז ההתחלתי של האסטרוגן בכלי הניסוי, הביקורת והבלנק נאספו בתחילת הניסוי באמצעות איסוף נפח של 2ml. הדוגמאות סוננו (0.45µm, PVDF filter) ולכל דוגמא הוספה כספית כלורית (HgCl₂, לריכוז של 50mg/l) לעיכוב פעילות בקטריאלית. הדוגמאות נשמרו בקירור (5-4°C) עד לאנליזה. דוגמא נוספת נאספה מכל הכלים כעבור כ- 3, 24, 48, 72 ו 96 שעות.

אנליזה של האסטרוגנים בוצעה באמצעות HPLC-MS/MS (איור 4.1). ריכוז ההורמון חושב על פי עקומת כיוול שהתבססה על 7 מהולים שונים.

במקרה של תוצר המרה ביולוגי שאין לו סטנדרט אנליטי, נבחנה אפשרות לכימותו על בסיס עקומת כיוול שהופקה בספקטרוגרף מסות לאסטרוגן המוצא. במקרה זה נבחן אם מתקיים יחס קבוע בין השטחים המתקבלים לשברי יונים (m/z, MS/MS) של ריכוזים שונים (בין 0.05 ל 2µg/ml) של אסטרוגן המוצא לבין אלו של תוצר ההמרה הביולוגי (Response Factor, RF). לשם כך, תוצר המרה ביולוגי הופק ורוכז על פי המפורט בסעיף 5.3.5. ריכוזו של תוצר המרה הביולוגית בתום ההפקה הנ"ל

נקבע על פי עקומת כיוול שהוכנה עבור אסטרוגן המוצא ב UV (HPLC, אורך גל 280nm). השוואה זו אפשרית משום הדמיון הרב בעוצמת הבליעה ב UV בין מולקולות שונות של אסטרוגנים.

אנליזה סטטיסטית: הבדלים בשיעור הספיחה לדפנות כלי הזכוכית נקבעו באמצעות מבחן שונויות מסוג oneway ANOVA (לאחר טרנספורמציה מסוג Arcsin לשיעור השבה המבוטא באחוזים). הבדלים בקצב פירוק של אסטרוגנים (סדר אפס או סדר ראשון) במדיום מימי מועשר לבין זה של קולחים שניוניים נקבע על בסיס הבדלים בשיפוע עקומות של $[C] \text{ vs } t$ ו $\ln[C_i/C_0] \text{ vs } t$, בהתאמה. הבדלים בשיפוע העקומות הני"ל נבחנו במבחן t-test. במקרה של שיפועים זהים נבחנו (t-test) גם ערכי החיתוך עם ציר ה Y (intercept).

5.4 תוצאות

5.4.1 ספיחה של אסטרוגנים לדפנות של כלי הניסוי

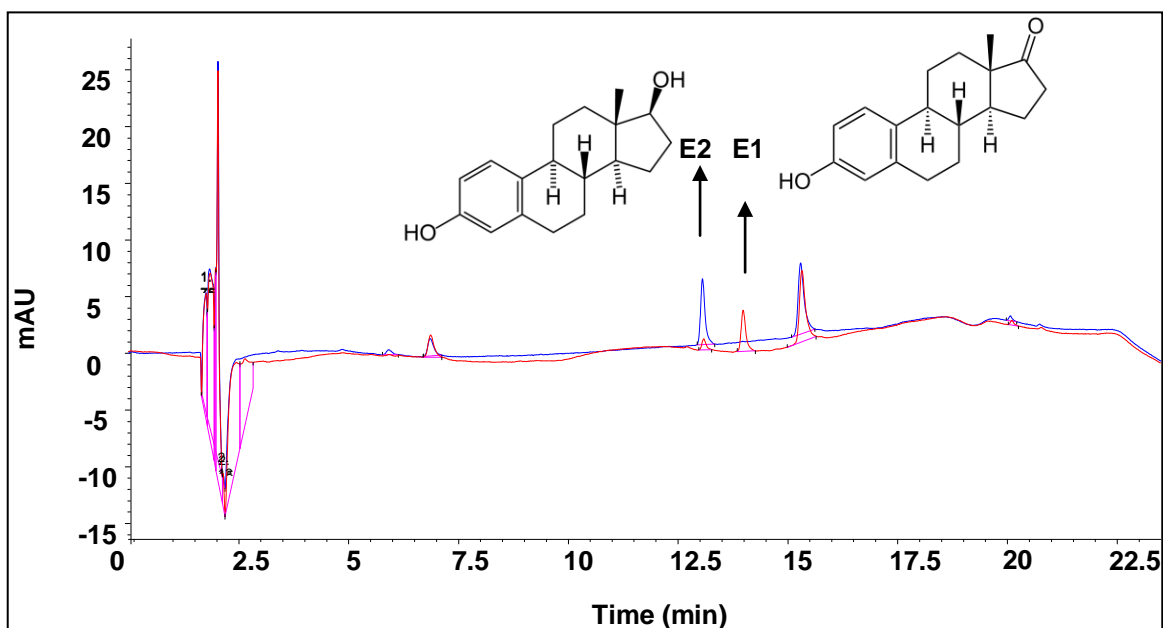
בכלים עם וללא טיפול בדיכלורודימתיל סילן (DCDMS) התקבל שיעור השבה דומה עבור E1 (oneway ANOVA, $P > 0.05$, $86.7\% \pm 12.8$ ו $82.7\% \pm 7.7$, בהתאמה). במקרה של E2 שיעור השבה בכלי הביקורת היה גבוה יותר בהשוואה לכלים שטופלו ב DCDMS ($90.8\% \pm 13.6$ ו $73.3\% \pm 12.4$, בהתאמה). בכל מקרה הממצאים מעידים שלא הייתה ספיחה משמעותית של אסטרוגנים לדפנות הכלים ובהתאם לכך לא אומץ בפרוטוקול הניסויים טיפול מקדים של כלי הזכוכית ב DCDMS.

5.4.2 ספיחה של אסטרוגנים למצע בזלת ללא ביופילם

בתום אינקובציה של E1 ו E2 ($0.1 \mu\text{g/ml}$) עם מצע בזלת במשקלים עולים שבין 2 ל 50 גרם, למשך 24 שעות ריכוז האסטרוגן בתמיסה היה נמוך לכל היותר בכ- 6% בהשוואה לביקורת. כמו כן, לא נמצא מתאם בין שיעור הירידה בריכוז האסטרוגן בתמיסה לבין משקל המצע. ממצאים אלו מעידים על היעדר ספיחה משמעותית של אסטרוגנים למצע בזלת.

5.4.3 זיהוי ובידוד תוצרי ביוטרנספורמציה של אסטרוגנים

בתום אינקובציה של אסטרוגנים למשך 90 שעות בהיעדר ביופילם שמקורו באגנים ירוקים לא חלו שינויים משמעותיים בריכוז האסטרוגנים בתמיסה (ריכוז נותר $\geq 90\%$ בהשוואה לריכוזו בתחילת האינקובציה) ולא אובחנו תוצרי המרה. בנוכחות ביופילם חלה הפחתה בריכוז האסטרוגנים ואובחן תוצר המרה ביולוגית עבור האסטרוגנים הטבעיים בלבד. האסטרוגן הטבעי E2 הומר ביולוגית לתוצר א-פולארי יותר, בעל משקל יון מולקולארי (MS, PI) של $[MH]^+ = 271$. באמצעות השוואה לסטנדרט אנליטי, זוהה התוצר כאסטרוגן הטבעי E1 (איור 5.4.1).

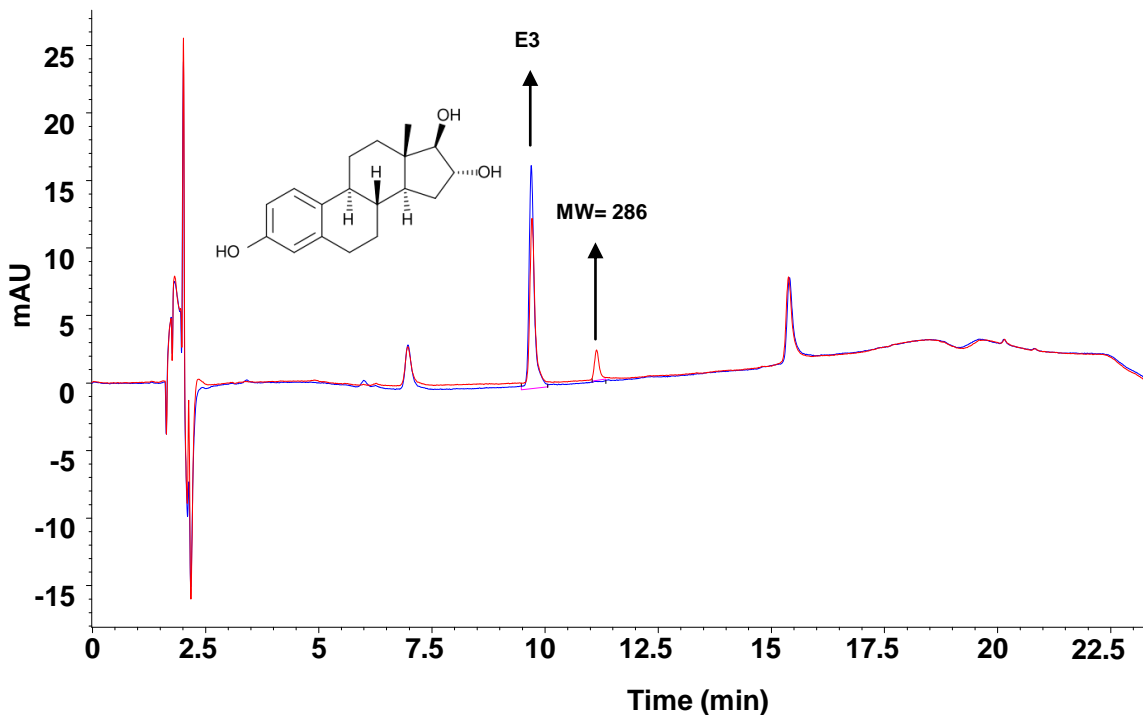


איור 5.4.1: כרומטוגרמה (LC/UV, 280nm) של תמיסת E2 בנוכחות ביופילס שמקורו באגנים ירוקים, בתחילת הניסוי (כחול) ולאחר אינקובציה של 90 שעות בתנאים איירוביים (אדום). האסטרוגנים E2 ו E1 מסומנים בחצים ומבנה המולקולה מוצג. (סיגנלים שאינם מסומנים בחצים ושריכוזם אינו משתנה מיצגים מזהמים שמקורם בתמיסות ההרצה)

באינקובציה של האסטרוגן הטבעי E3 זוהה תוצר המרה א-פולארי יותר מחומר המוצא (זמן שהיה ארוך בכ- 1.5 דקה בהשוואה ל E3, איור 5.4.2). משקל היון המולקולארי (MS, PI) נקבע כ- $m/z=287.2$ ל E3 קיימות שלוש קבוצות הידרוקסיל, אחת מהן על הטבעת הארומטית (טבלה 5.4.1). בהנחה שתוצר הפירוק נוצר כתוצאה מהמרה של קבוצת הידרוקסיל שאינה ממוקמת על הטבעת הארומטית בקבוצת קרבוניל ניתן להניח אחד או שני תוצרי המרה הכוללים 16hydroxyE1 ו 17ketoE2 (טבלה 5.4.1). על מנת לזהות את תוצר המרה של האסטרוגן E3 בוצעה הפרוצדורה להפקה ובידוד כמפורט בסעיף 5.3.5. בתום התהליך הני"ל הופקה כמות של כ- $600\mu\text{g}$ של תוצר ההמרה.

מתוך שני תוצרי ההמרה האפשריים הני"ל ניתן היה לרכוש סטנדרט אנליטי ל 16hydroxyE1 בלבד. בהתאם, בוצעה השוואה ב UV ו MS בין E3, 16hydroxyE1 ותוצר ההמרה הבלתי מזוהה. אובחנה הפרדה טובה ב UV ($R>2$) בין האסטרוגן E3 לבין תוצר ההמרה הבלתי מזוהה (על פני קולונה מסוג Phenyl) וחפיפה בין תוצר ההמרה לבין הסטנדרט 16hydroxyE1 (איור 5.4.3). ספקטרום בליעה (UV, אורכי גל של 200-400nm) של שלושת החומרים הני"ל זהה (איור 5.4.3). באנליזה בספקטרוגרף מסות נמצאה זהות בין היונים המולקולאריים החיוביים והשליליים (MS, m/z) של תוצר ההמרה של E3 לבין 16hydroxyE1 (טבלה 5.4.2). כמו כן נצפו שברי יונים (MS/MS, m/z) משותפים עבור תוצר המרה בלתי מזוהה של האסטרוגן E3 ובין 16hydroxyE1, הן ביינון חיובי והן ביינון שלילי (איורים

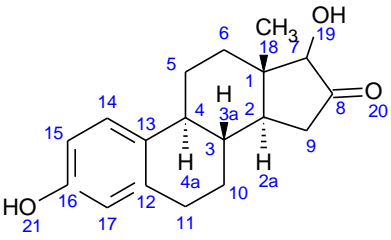
5.4.4 ו 5.4.5). שברי יון מולקולאריים אלו שונים מאלו של האסטרוגן E3. ממצאים אלו לכאורה מצביעים על זהות בין תוצר המרה בלתי מזוהה של E3 לבין המולקולה 16hydroxyE1 אך אינם פוסלים אפשרות של קיום תוצר ההמרה 17ketoE2.

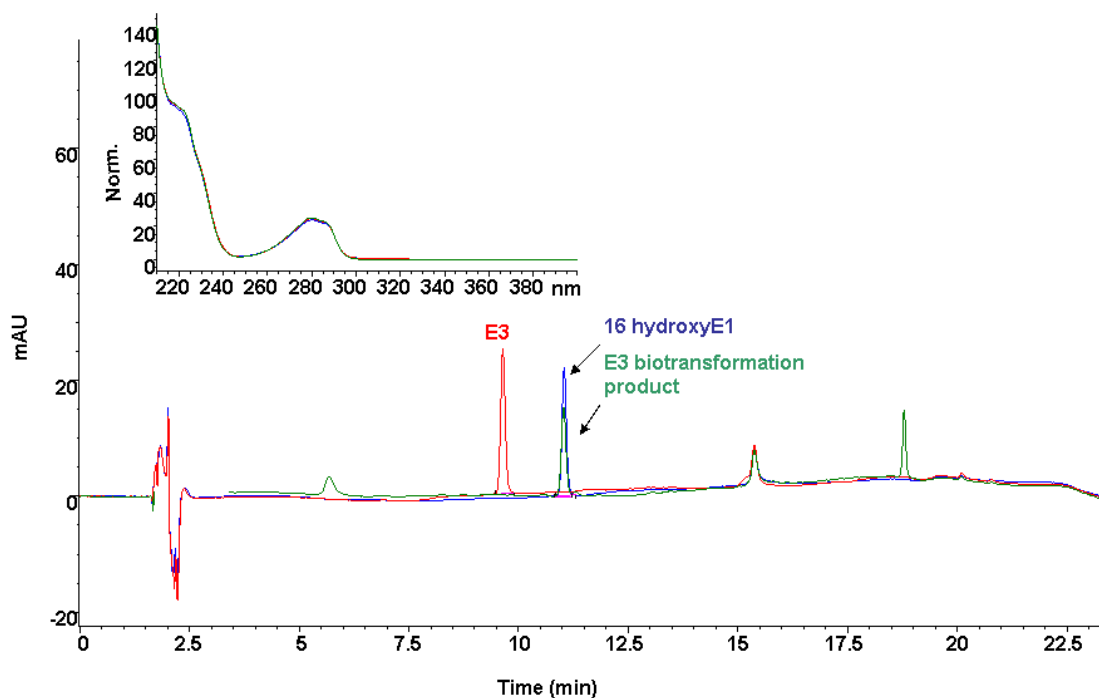


איור 5.4.2: כרומטוגרמה (LC/UV, 280nm) של תמיסת E3 בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים, בתחילת הניסוי (כחול) ולאחר אינקובציה של 90 שעות בתנאים איירוביים (אדום). האסטרוגן E3 ותוצר המרה (MW=286) מסומנים בחצים והמבנה של E3 מוצג. (סיגנלים שאינם מסומנים בחצים ושריכוזם אינו משתנה מיצגים מזהמים שמקורם בתמיסות ההרצה).

טבלה 5.4.1: מבנה מולקולארי, נוסחה כימית ומשקל מולקולארי של האסטרוגן הטבעי E3 ותוצרי המרה אפשריים הכוללים את המולקולות 16 hydroxyE1 ו 17ketoE2

	Molecule structure	Molecule formula	Molecular weight
Estriol (E3)		$C_{18}H_{24}O_3$	288.4
16 hydroxyestrone (16 hydroxyE1)		$C_{18}H_{22}O_3$	286.4

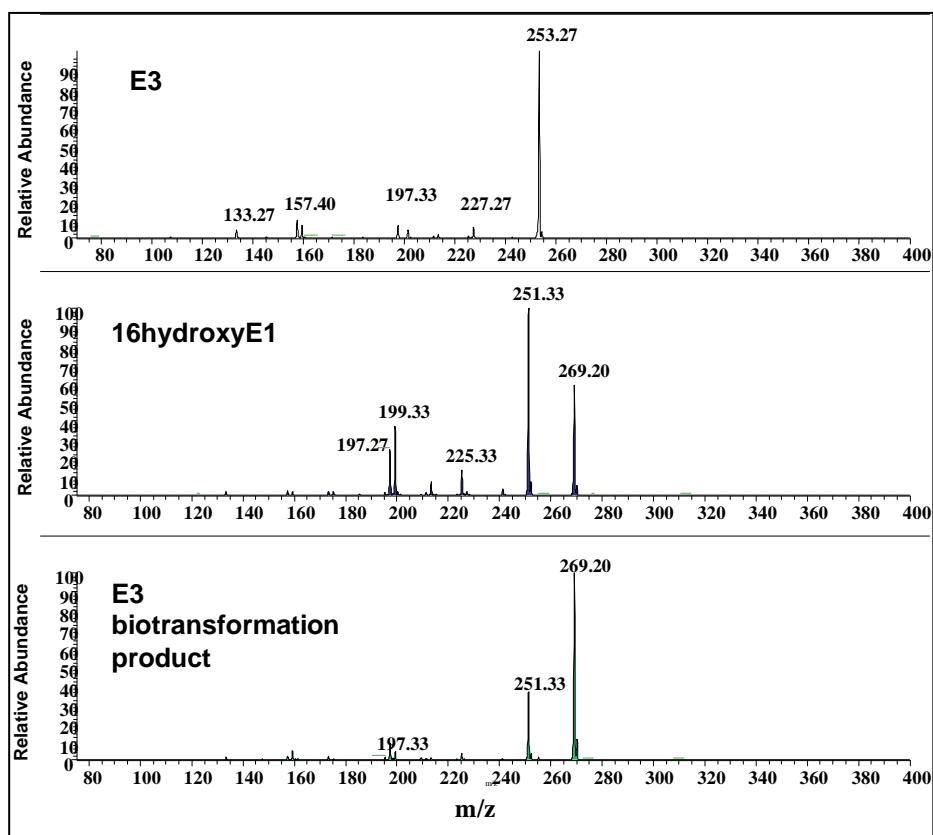
17 ketoestradiol (17 ketoE2)		$C_{18}H_{22}O_3$	286.4
-----------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------	-------



איור 5.4.3: כרומטוגרמות (LC/UV, 280nm) של E3 (אדום), של 16-hydroxyE1 (כחול) ושל תוצר המרה בלתי מזוהה של E3 (ירוק). בחלק העליון מוצג ספקטרום בליעה של שלושת החומרים.

טבלה 5.4.2: משקל מולקולארי, יון מולקולארי (MS, m/z) ושברי יון מולקולאריים (m/z), MS/MS ביינון חיובי (PI) ושילי (NI) של האסטרוגן הטבעי E3, סטנדרט אנליטי 16hydroxyE1 ותוצר המרה בלתי מזוהה של E3.

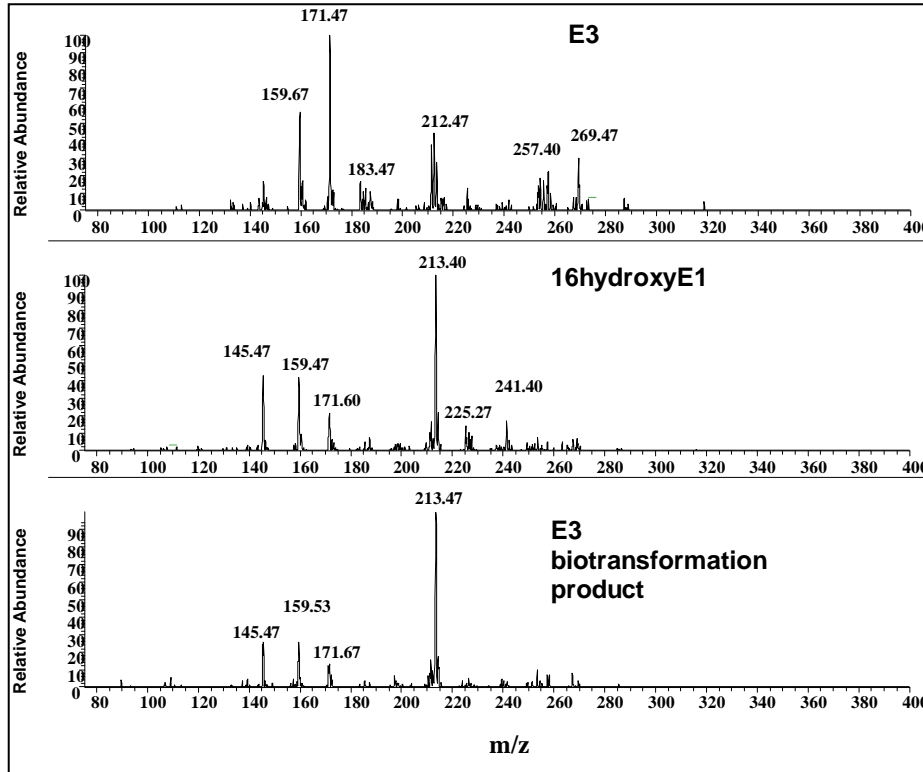
	Molecular weight	MS (PI)	MS (NI)
Estriol (E3)	288.4	271.4 [MH-H ₂ O] ⁺	287.2 [M-H] ⁻
16hydroxyE1	286.4	287.4 [MH] ⁺	285.5 [M-H] ⁻
E3 biotransformation product	286.4	287.4 [MH] ⁺	285.5 [M-H] ⁻



איור 5.4.4: ספקטרום של שברי יונים חיוביים (MS/MS, m/z) של האסטרוגן הטבעי E3, 16 hydroxyE1 ושל תוצר ההמרה של E3

באנליזה השוואתית בין ספקטרום $^1\text{H NMR}$ של תוצר ההמרה בלתי מזוהה של E3 לבין סטנדרט E3 וסטנדרט של 16hydroxyE1 (טבלה 5.4.3) לא נמצא הבדל משמעותי בהיסטים הכימיים של המימנים הארומטיים (H_{14} , H_{15} ו H_{17}) בין שלושת המולקולות (טבלה 5.4.1). בניגוד לכך, קיים הבדל בהיסטים הכימיים באזורים אחרים של המולקולות. למשל, ההיסט של H_8 מופיע ב E3 ב $\delta=3.93\text{ppm}$ וב 16hydroxyE1 ב- $\delta=4.34\text{ppm}$. הבדל זה מעיד על סביבה אלקטרונית שונה, שנובעת בהמרה של קבוצת קרבוקסיל בפחמן 7 ב E3 לקרבוניל ב 16hydroxyE1. בתוצר ההמרה של E3 מופיע הסיגנל של H_7 ב- $\delta=3.82\text{ppm}$, גם הוא בדומה ל 16hydroxyE1 מימן α לקרבוניל, אך המימן הנ"ל מוסת לשדה גבוה יותר מאשר H_7 של E3 ($\delta=3.36\text{ppm}$). הבדל זה מעיד כי תוצר ההמרה של E3 שונה במבנהו המולקולארי מזה של הסטנדרט 16hydroxyE1. חיזוק לטענה שתוצר ההמרה שונה מ 16hydroxyE1 מתבסס גם בהיסט המתקבל עבור המימנים המתיליים. בתוצר ההמרה המימנים המתיליים מופיעים בהיסט של $\delta=0.75\text{ppm}$ בדומה לזה של E3 ($\delta=0.76\text{ppm}$). ב 16hydroxyE1 מוסטים המימנים ל $\delta=0.97\text{ppm}$. הדמיון שבין ההיסט של המימנים המתיליים של תוצר ההמרה לזה של E3 מעיד כי בתוצר ההמרה ממוקמים המימנים המתיליים גם הם בשכנות לפחמן הקשור

לקבוצת הידרוקסיד. הבדלים בין תוצר ההמרה ו E3 לבין 16hydroxyE1 מבטאים את העובדה שב 16hydroxyE1 הפחמן הקשור למתיל סמוך לפחמן הקרבונילי (C7) בעוד שב E3 הפחמן הקשור למתיל סמוך לפחמן הקשור לקבוצת הידרוקסיד.



איור 5.4.5: ספקטרום של שברי יונים שליליים (MS/MS, m/z) של האסטרוגן הטבעי E3, 16hydroxy E1 ושל תוצר ההמרה של E3

מהנתונים אלו ($^1\text{H NMR}$) והנתונים שהתקבלו באנליזה ב MS, ניתן להסיק כי תוצר המרה של E3 שונה במבנה הכימי מזה של 16hydroxyE1. השוני במבנה המולקולארי קיים בפחמן מספר 8 שהומר מפחמן הקשור לקבוצת הידרוקסיד (ב E3) לפחמן קרבונילי בתוצר ההמרה. בנוסף לכך, משום זהות משקל היון המולקולארי של תוצר ההמרה והסטנדרט 16hydroxyE1 (טבלה 5.4.2) ניתן לשער כי תוצר הפירוק הוא המולקולה 17ketoE2 בעלת נוסחה כימית זהה לזו של 16hydroxyE1.

טבלה 5.4.3: ערכי הסטים כימיים (ppm) של מימנים במולקולות האסטרוגן E3, 16hydroxy ותוצר המרה של E3 באנליזה ¹H NMR

¹ H	E3 (δ,ppm)	16hydroxy (δ,ppm)	E3 biotransformation Product (δ,ppm)
H ₁₄	7.13(d)	7.14(d)	7.16(d)
H ₁₅	6.6(dd)	6.62(dd)	6.92(dd)
H ₁₇	6.52(d)	6.54(d)	6.54(d)
H ₈	3.93(m)	4.34(m)	-
H ₇	3.36(m)	-	3.82(d)
2H ₁₁	2.79(m)	2.84(m)	2.82(m)
H ₄	2.31(m)	2.38(m)	
2H ₅	2.20(m), 1.35(m)	2.25(m), 1.5(m)	
2H ₆	1.75(m), 1.35(m)	2.07(m), 1.45(m)	
2H ₁₀	1.85(m), 1.35(m)	1.81(m), 1.45(m)	
2H ₉	1.85(m), 1.51(m)	1.96(m), 1.82(m)	
H ₃	1.51(d)	1.82(m)	
H ₂	1.35(m)	1.51(m)	
CH ₃	0.76(s)	0.97(s)	0.75(s)
OH ₂₁	9.10(s)	9.14(s)	8.41(s)
OH ₁₉	4.79(d)	-	5.48(d)
OH ₂₀	4.72(d)	5.49(d)	-

s-singlet, d-dublet, dd-duble dubletm, m-multiplet

5.4.4. המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים

כמות החלבון על פני המצע שימשה להערכת הביומסה של הביופילם. ביומסת הביופילם בשמונה הניסויים שבוצעו הייתה דומה (CV=7.9%, n=8; טבלה 5.4.4).

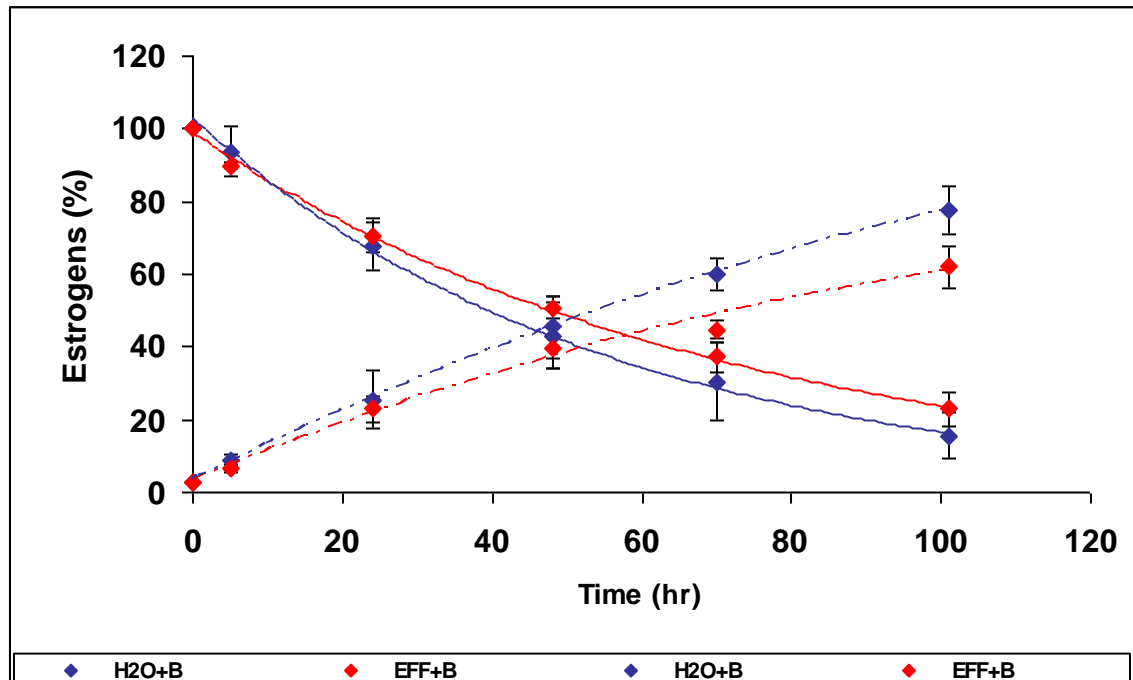
טבלה 5.4.4: כמות חלבון ממוצעת על פני 1.5 גרם מצע בזלת (מ"ג/ליטר אקויוולנט אלבומין)

	aerobic E2	hypoxic E2	aerobic E1	hypoxic E1	aerobic E3	hypoxic E3	aerobic EE2	hypoxic EE2
average	149.1	140.4	129.7	119.7	122.6	133.6	128.2	145.5
sd	38.6	10.0	17.3	22.4	34.1	11.9	5.9	7.5

בכל הניסויים ללא ביופילם (ביקורת) הייתה עדות לפעילות ביולוגית נמוכה (שינויים בריכוז אמוניה וניטראט, נספח 5) וריכוז האסטרוגן נותר גבוה יחסית (>90%).

בחשיפה של E2 לביופילם לתקופה של ארבעה ימים בתנאים איירוביים במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים פחת ריכוזו בריאקציה בעלת אפיון מסדר ראשון (איור 5.4.6; טבלה 5.4.5). זמן מחצית חיים היה 36.5 ו 48.1 שעות, בהתאמה, אך ההבדל בקצב הדעיכה לא היה מובהק ($p=0.19$, t-test). הירידה בריכוז E2 לוותה בהופעה והצטברות של האסטרוגן E1 (איור 5.4.6). שיעור ההרחקה הכולל של חומר המוצא (E2) יחד עם תוצר ההמרה (E1) היה נמוך ($15 \pm 1.2\%$ ו $6.8 \pm 2.2\%$, במים מועשרים ובקולחים, בהתאמה).

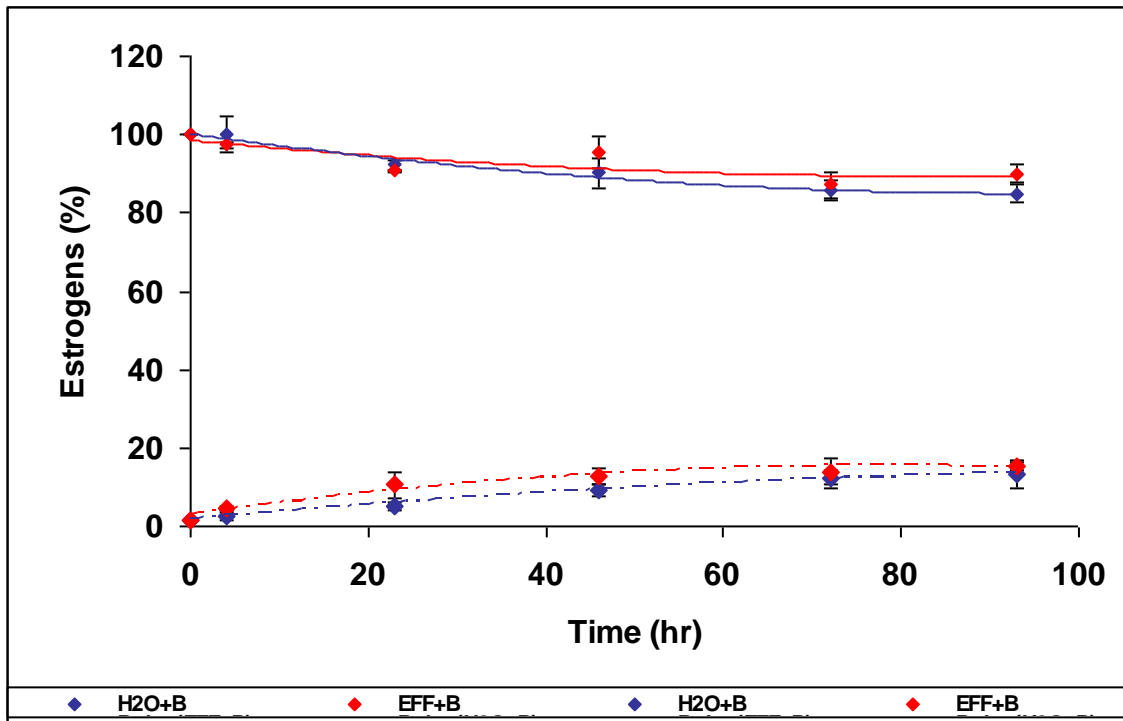
בחשיפה של E2 לביופילם למשך ארבעה ימים בתנאים היפוקסיים (ריכוז חמצן נמוך מ 10% רוויה) במדיום מימי ובקולחים שניוניים פחת ריכוזו של E2 והופיע והצטבר תוצר ההמרה E1 (איור 5.4.7). במים מועשרים היה דגם הדעיכה תואם סדר ראשון ($R^2=0.935$). בקולחים, ההתאמה לסדר ראשון הייתה נמוכה יחסית ($R^2=0.615$, טבלה 5.4.5). קצב הירידה בריכוז E2 בקולחים שניוניים בתנאים היפוקסיים היה נמוך מאשר במדיום מימי מועשר ($p=0.01$, t-test) וזמן מחצית החיים שחושב לפי ריאקציה מסדר ראשון היה ארוך פי 1.6 (טבלה 5.4.6). בתנאים היפוקסיים הדעיכה בריכוז E2 במדיום מימי מועשר ובקולחים הייתה נמוכה בסדר גודל ויותר מאשר במדיום איירובי (זמן מחצית חיים ארוך פי 10 ו 13, בהתאמה, טבלה 5.4.6). בתום אינקובציה של 4 ימים בתנאים היפוקסיים השעור הכולל של חומר המוצא (E2) יחד עם תוצר ההמרה (E1) במדיום מימי ובקולחים נותר כמעט ללא שינוי ($96.3 \pm 1.3\%$ ו $104.2 \pm 2.8\%$, בהתאמה).



איור 5.4.6: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E2 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים (קו רציף) והופעה של E1 (קו מקווקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

טבלה 5.5.5: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון E2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	k	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.957	3.4 µg/l hr ⁻¹	57.5
		Effluent	0.967	2.9 µg/l hr ⁻¹	56.0
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.997	0.019 hr ⁻¹	36.5
		Effluent	0.999	0.014 hr ⁻¹	48.1

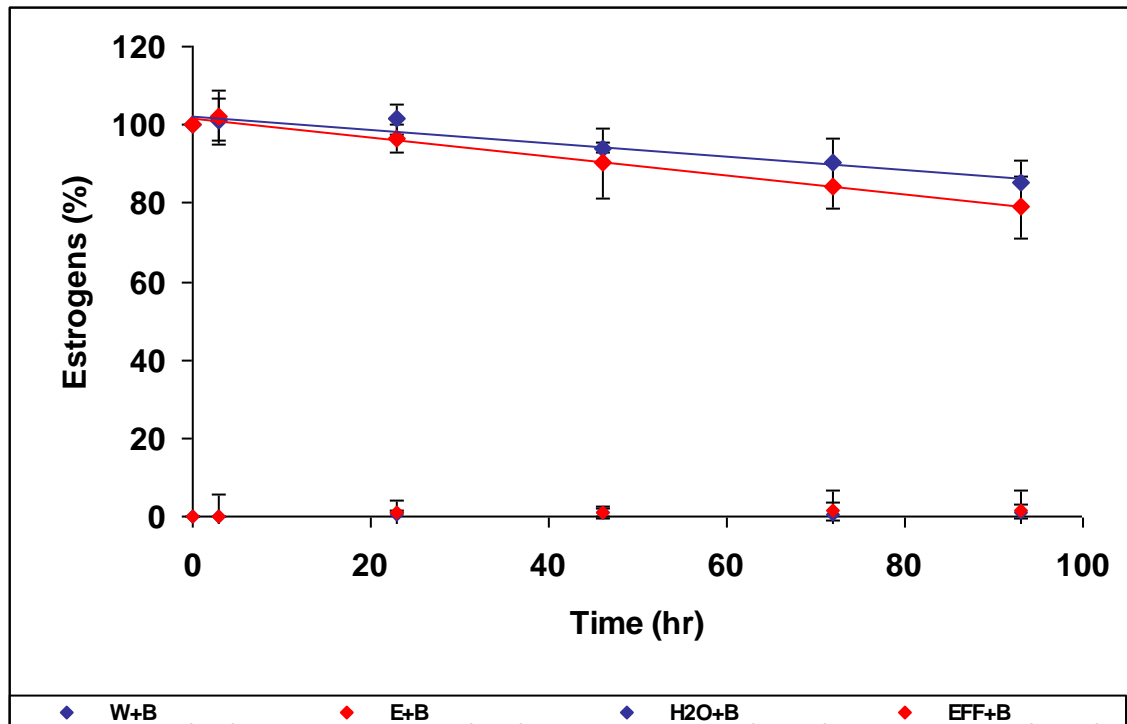


איור 5.4.7: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E2 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים (קו רציף) והופעה של E1 (קו מקוקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

טבלה 5.4.6: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים היפוקסיים של ההורמון E2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	K	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.925	0.7 µg/l hr ⁻¹	265
		Effluent	0.614	0.4 µg/l hr ⁻¹	490
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.935	0.0018 hr ⁻¹	385
		Effluent	0.615	0.0011 hr ⁻¹	630

בחשיפה של E1 לביופילם בתנאים איירוביים במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים לתקופה של כארבעה ימים היה דגם הדעיכה תואם לריאקציה מסדר אפס וסדר ראשון ($R^2 > 0.9$, איור 5.4.8; טבלה 5.4.7). זמן מחצית חיים שחושב בהתאם לריאקציה מסדר ראשון היה כ-16 ו-11 ימים, למדיום מימי מועשר וקולחים שניוניים, בהתאמה, אך ההבדל בקצב הדעיכה לא היה מובהק ($t=0.33$, test). במדיום מימי מועשר ובקולחים נמדדה נוכחות של E2 בריכוז נמוך (0.8% ו-1.2%, בהתאמה, מריכוז E1 בתחילת הניסוי). שיעור ההרחקה הכולל של חומר המוצא (E1) יחד עם תוצר ההמרה (E2) היה $15\% \pm 5.7$ ו- $21\% \pm 7.8$, בהתאמה.

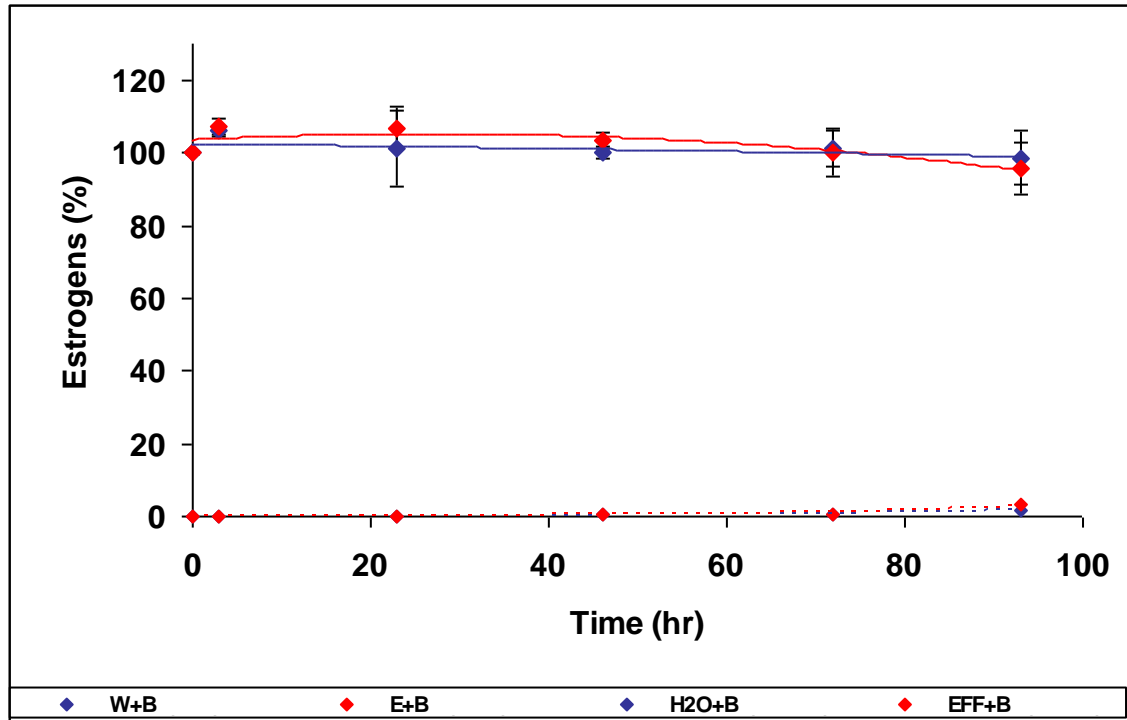


איור 5.4.8: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E1 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים (קו רציף) והופעה של E2 (קו מקווקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

טבלה 5.4.7: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים איירוביים של ההורמון E1 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	K	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.932	0.2 μg/1 hr ⁻¹	293
		Effluent	0.926	0.4 μg/1 hr ⁻¹	206
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.934	0.0018 hr ⁻¹	383
		Effluent	0.925	0.0027 hr ⁻¹	257

בחיפה של E1 לביופילם בתנאים היפוקסיים (ריכוז חמצן נמוך מ 10% רוויה) במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים למשך ארבעה ימים לא חל שינוי משמעותי בריכוז של E1 ($98.7\% \pm 7.4$) ו $94.0\% \pm 4.7$, בהתאמה, איור 5.4.9). במדיום מימי מועשר ובקולחים נמדדה נוכחות של E2 בריכוז נמוך (עד 3% מריכוז התחלתי של E1). לא הייתה עדות להרחקה של חומר המוצא יחד עם תוצר ההמרה בתום האינקובציה הן במדיום המימי המועשר והן בקולחים השניוניים.



איור 5.4.9: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E1 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים (קו רציף) והופעה של E2 (קו מקווקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

בחיפה של E3 לביופילם בתנאים איירובים לתקופה של ארבע ימים במדיום מימי מועשר פחת ריכוזו בריאקציה בעלת מאפיינים הדומים לסדר אפס או לסדר ראשון ($R^2=0.84$ ו $R^2=0.86$). בהתאמה; טבלה 5.4.8). דפוס דומה של דעיכה התואם סדר אפס או ראשון התקבל גם במדיום של קולחים שניוניים ($R^2=0.81$ ו $R^2=0.78$, בהתאמה; טבלה 5.4.8). זמן מחצית חיים (חושב ע"פ ריאקציה מסדר ראשון) היה כ-8 ו-10 ימים במדיום מים מועשרים וקולחים שניוניים, בהתאמה (טבלה 5.4.8) וההבדל בקצב הדעיכה לא היה מובהק ($p=0.37$, t-test). הירידה בריכוז E3 לוותה ביצירה והצטברות של 17ketoE2 (סעיף 5.4.3; איור 5.4.8). חישוב ריכוז 17ketoE2 התבסס על עקומת כיוול של ההורמון E3 וכתלות ביחס (Response Factor) RF, שערכו 0.22 ± 0.01 היה קבוע בטווח הריכוזים של 0.05 ועד $2 \mu\text{g/ml}$. בתום אינקובציה של כ-4 ימים, ריכוז של סך כל חומר המוצא (E3)

ותוצר ההמרה (17ketoE2) במים מועשרים דומה לזה של E3 בתחילת הניסוי (102.6%±1.3). בקולחים לעומת זאת נמצאה דעיכה בריכוז של סכום חומר המוצא ותוצר ההמרה בהשוואה לריכוז חומר המוצא בתחילת הניסוי (83.1%±13.2). יתכן ודעיכה זו קשורה בהמשך פירוק של תוצר ההמרה (17ketoE2) או ספיחתו לחומר אורגאני בתמיסה.

טבלה 5.4.8: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים אירוביים של ההורמון E3 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

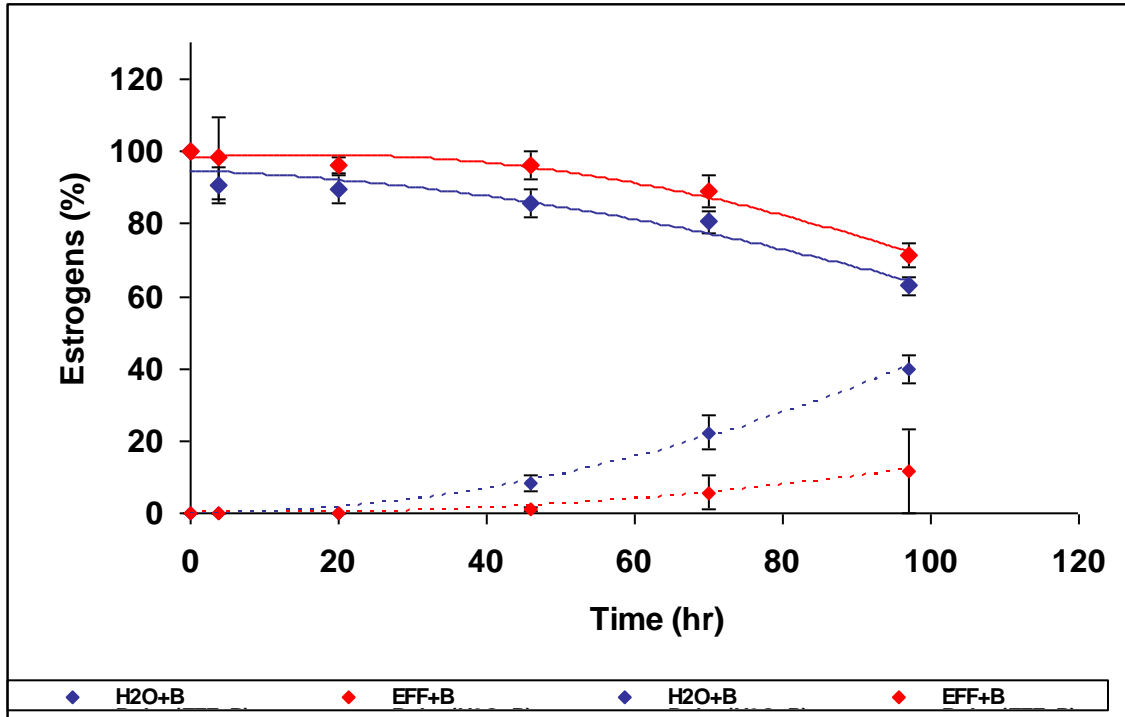
Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	K	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.858	1.5 µg/1 hr ⁻¹	165
		Effluent	0.814	1.2 µg/1 hr ⁻¹	195
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.842	0.0037 hr ⁻¹	187
		Effluent	0.785	0.0029 hr ⁻¹	239

בחיפה של E3 לביופילם בתנאים היפוקסיים למשך ארבעה ימים במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים פחת ריכוזו של E3 בכ- 20% (19.2±2.8% ו 17.8±3.8%, בהתאמה) והופיע והצטבר תוצר ההמרה 17ketoE2 (איור 5.4.11). במים מועשרים ובקולחים היה דגם הדעיכה שונה מזה של סדר אפס או ראשון (R²<0.2, טבלה 5.4.9). בתום אינקובציה של כ- 4 ימים במים מועשרים נראה לכאורה שיש תוספת של כ- 12% בסכום חומר המוצא (E3) ותוצר ההמרה (17ketoE2). בקולחים קיימת דעיכה בשיעור של 5%. חשוב לציין כי במקרה של ההורמון הטבעי E3 הכימות של תוצר הפירוק בעייתי משום היעדר סטנדרט אנליטי וריכוזו נקבע על פי יחס RF. לפיכך, התוספת והאיבוד לכאורה אינם יכולים להיחשב כמשמעותיים.

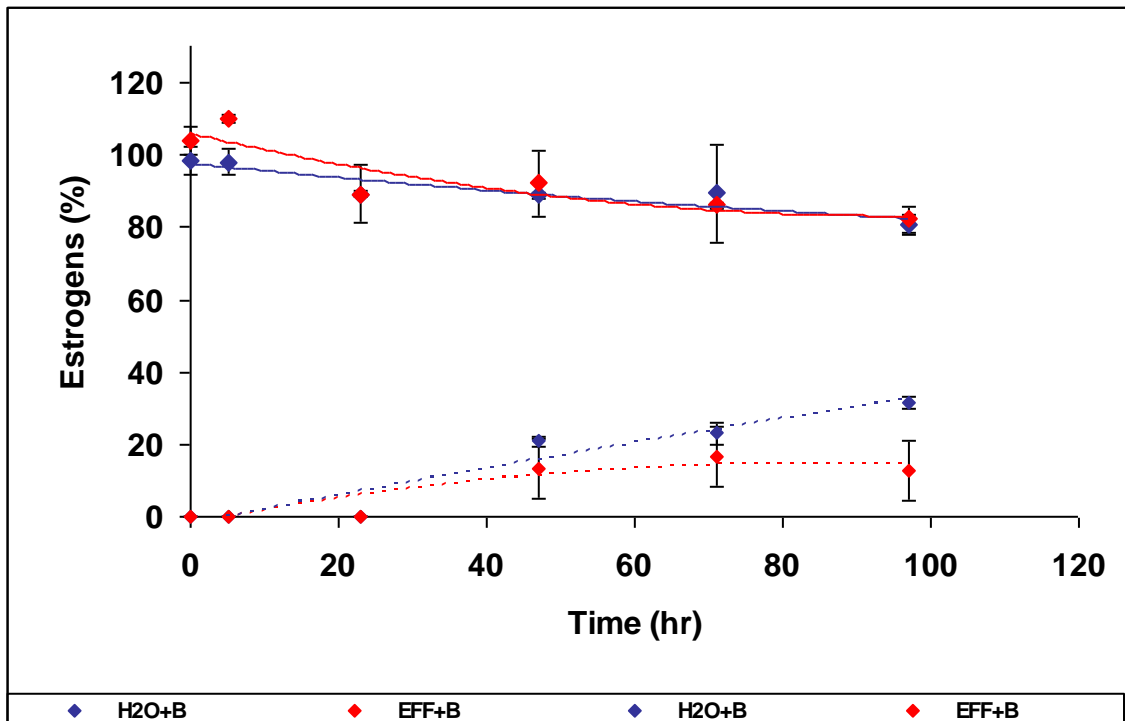
טבלה 5.4.9: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים היפוקסיים של ההורמון E3 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	K	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.026	0.1 µg/1 hr ⁻¹	*
		Effluent	0.191	0.3 µg/1 hr ⁻¹	*
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.023	0.0002 hr ⁻¹	*
		Effluent	0.183	0.0008 hr ⁻¹	*

* לא חושב משום העדר מתאם לדפוס דעיכה מסדר אפס או ראשון

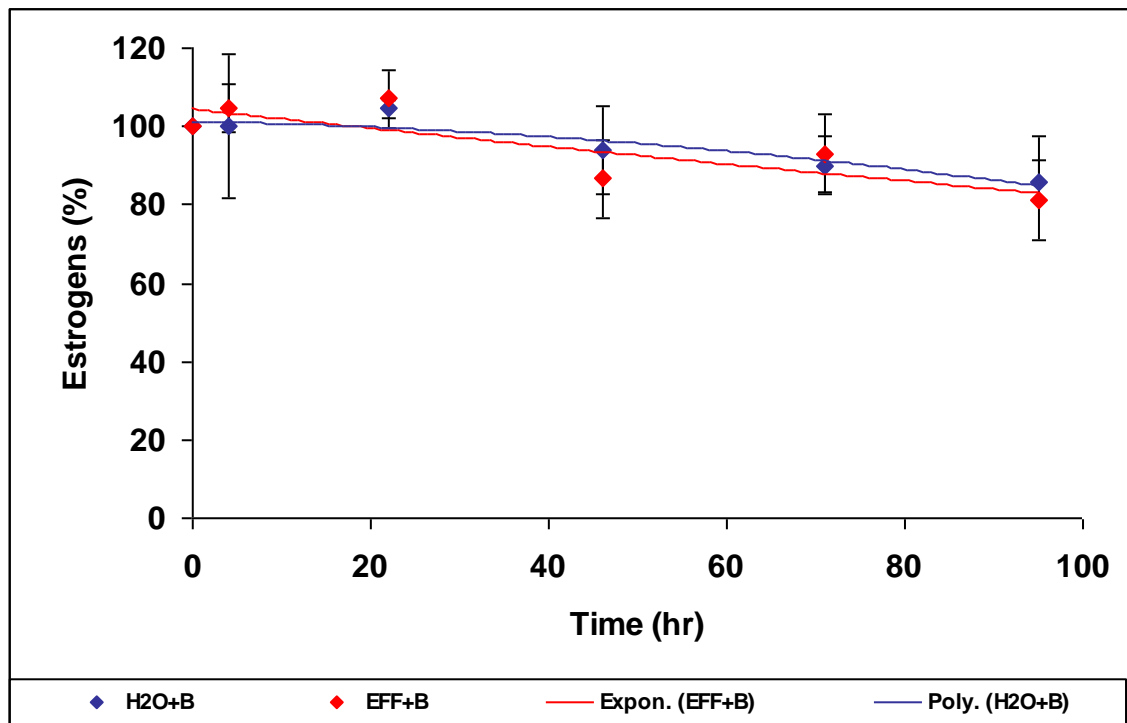


איור 5.4.10: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E3 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים (קו רציף) והופעה של 17ketoE2 (קו מקווקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)



איור 5.4.11: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז E3 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים (קו רציף) והופעה של 17ketoE2 (קו מקווקו) במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

בחשיפה של EE2 לביופילם בתנאים איירוביים לתקופה של ארבעה ימים פחת ריכוזו במדיום מימי מועשר ובקולחים שניוניים בשיעור של $14.2\% \pm 11.5$ ו $18.8\% \pm 10.3$, בהתאמה (איור 5.4.12). דפוס הדעיכה אינו תואם ריאקציה מסדר אפס או ראשון ($R^2 < 0.2$, טבלה 5.4.10). לא נמצאה עדות להופעה של תוצר פירוק. בחשיפה של EE2 לביופילם בתנאים היפוקסיים לתקופה של ארבעה ימים במים מועשרים בנוטריאנטים ובקולחים שניוניים לא חל שינוי משמעותי בריכוז האסטרוגן (ריכוז $102.1\% \pm 9.3$ ו $100.6\% \pm 4.2$, בהתאמה, בהשוואה לריכוזו בתחילת הניסוי; איור 2.3.13).

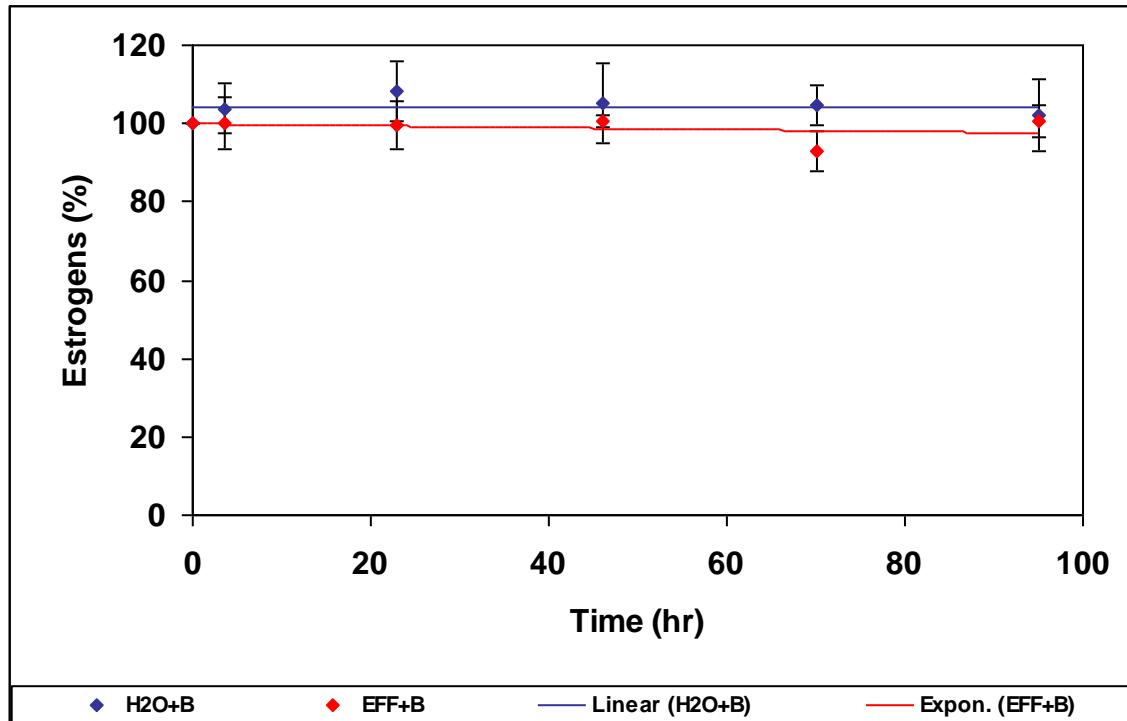


איור 5.4.12: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז EE2 בנוכחות ביופילם, בתנאים איירוביים במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

טבלה 5.4.10: מקדם המתאם, קבוע הריאקציה מסדר אפס ומסדר ראשון וזמן מחצית חיים עבור פירוק ביולוגי בתנאים איירוביים של ההורמון EE2 במדיום של מים מועשרים וקולחים שניוניים בנוכחות ביופילם

Reaction order	Concentration vs time	Medium	R ²	K	t _{1/2} (hr)
Zero order	[C] vs t	Enriched water	0.032	0.06 μg/l hr ⁻¹	*
		Effluent	0.235	0.13 μg/l hr ⁻¹	*
First order	Ln[C _i /C ₀] vs t	Enriched water	0.041	0.0004 hr ⁻¹	*
		Effluent	0.230	0.0007 hr ⁻¹	*

* לא חושב משום העדר מתאם לדפוס דעיכה מסדר אפס או ראשון



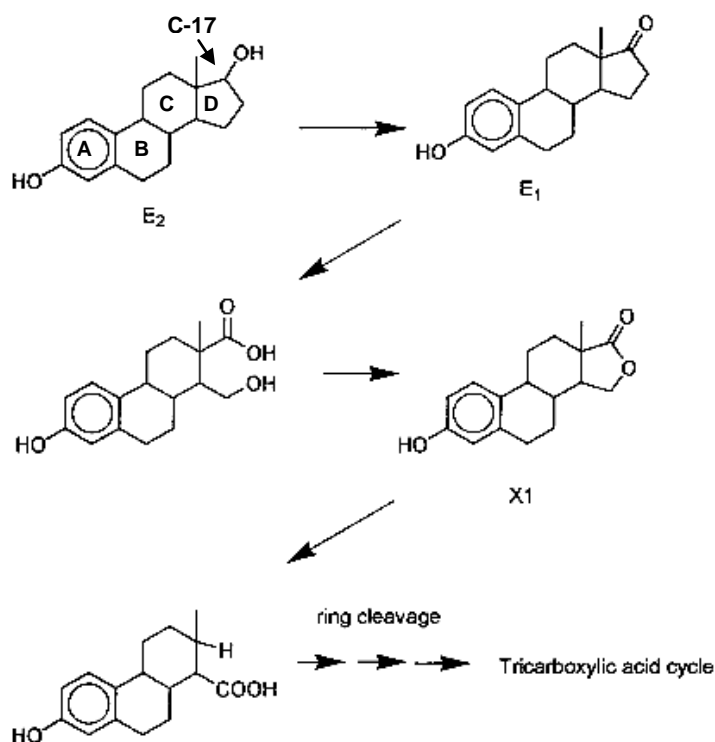
איור 5.4.13: שיעור השינוי עם הזמן בריכוז EE2 בנוכחות ביופילם, בתנאים היפוקסיים במדיום של קולחים שניוניים (אדום) ומים מועשרים בנוטריאנטים (כחול)

5.5 דיון ומסקנות

5.5.1 זיהוי ובידוד תוצרי המרה של אסטרוגנים

בעבודה הנוכחית נבחנה המרה ביולוגית של אסטרוגנים הטבעיים (E1, E2, E3) והאסטרוגן הסינטי (EE2) על ידי ביופילם שמקורו באגנים ירוקים. תוצרי המרה ביולוגית דומיננטיים התקבלו עבור האסטרוגנים E2 ו E3 וזוהו כ E1 ו 17ketoE2, בהתאמה. בשני המקרים כללה ההמרה החלפה של קבוצת קרבוקסיל בקבוצת קרבונל. המרה ביולוגית של E2 ל E1 בתנאים אירוביים והיפוקסיים נפוצה וקיימות עדויות למעורבות של חיידקים שבודדו מסביבות מגוונות כנחלים ואגמים (Jürgens et al., 2002; Czajka and Londry, 2006), סדימנט אקוויפר שהוזן בקולחים (Ke et al., 2007) וקולחים ושפכים (Ternes et al., 1999b; Lee and Liu, 2002; Shi et al., 2004b; Weber et al., 2005). עדויות ליצירה של האסטרוגן E2 כתוצר המרה של E1 בעיקר בתנאים היפוקסיים-אנאירוביים (עבודה נוכחית, Czajka and Londry, 2006) מעידות על כך שהתהליך ההמרה עשוי להיות הפיך בתנאים מסוימים. תוצרי פירוק אחרים של המולקולה E2 יציבים פחות בהשוואה ל E1, לכן אינם נוטים להצטבר בניסויים מנתיים (batch reactors) וקיים קושי בזיהויים. כך למשל, בחשיפה של E2 לתרבית חיידקים מפרקי E2 שבודדו משפכים נמצא תוצר פירוק בלתי מוכר (Lee et al., 2005).

(and Liu, 2002). משום העדר סטנדרט אנליטי לא יכלו החוקרים לזהות את התוצר בוודאות. אולם, על בסיס משקל היון המולקולארי ב MS משערים החוקרים שמדובר במולקולה: 5-hydroxy-15-methyl-13-oxatetracyclo[8.7.0.0<2,7>.0.<11,15>]-heptadeca-2(7),3,5-trien-14-one (איור 4.1.1, מולקולה X1). מולקולה זו בעלת מבנה של לקטון, נוצרה ככל הנראה בעקבות המרה של התוצר E1. תחילתו של מסלול מטבולי לפירוק E2 על ידי חיידקים שמקורם בשפכים ומתבסס על הממצאים הנ"ל מוצע באיור 5.5.1 (Lee and Liu, 2002). על פי המודל הנ"ל מתחיל פירוק E2 בפחמן 17 שבטבעת D ומביא ליצירה של קבוצת קטו (keto) באותו המיקום, היא האסטרוגן E1. באמצעות חמצון נוסף של מולקולה E1 מתרחש ביקוע של טבעת D וכתוצאה מכך נוצרת חומצה בלתי יציבה. באמצעות הרחקה של מולקולת מים משיירי החומצה, שבה הטבעת להיסגר במבנה של לקטון (מולקולה X1).



איור 5.5.1: מסלול מטבולי מוצע לפירוק E2 על ידי חיידקים שמקורם במפעלים לטיפול בשפכים (מתוך Lee and Liu, 2001)

בספרות מדווח גם על תוצרי המרה אחרים הכוללים למשל את האסטרוגן E3 (Lee and Liu, 2002; 16hydroxyE1, (Czajka and Londry, 2006) 2methoxyE1 ו 2methoxyE2, (16hydroxyE1) המעידים על מסלולים מטבולים אחרים מזה המוצע לעיל. משום שאין בהמרה של קבוצת הידרוקסיד לקטון (מעבר בין E2 ל E1) תרומה אנרגטית למיקרואורגניזמים

(Czajka and Londry, 2006; Pauwels et al., 2008) מציעים (Czajka and Londry, 2006) כי E2 משמש כמקבל אלקטרונים אלטרנטיבי בתנאים מחזרים. האנרגיה הדרושה לחיידקים מתקבלת במקרה זה עם המשך המרה של E1 ומטבוליטים אחרים (Pauwels et al., 2008). בתנאים איירובים קיימות עדויות כי E2 משמש כמקור פחמן לגדילתם של חיידקים הטרוטרופיים (Yoshimoto et al., 2004).

בעבודה הנוכחית נמצאה עדות להמרה ביולוגית של האסטרוגן E3 לתוצר של 16hydroxyE1 או 17ketoE2. 16αhydroxyE1 זוהה כתוצר פירוק של E3 בתנאים איירוביים על ידי חיידקים שבודדו מאקוויפר המוזן בקולחים שניוניים (Ke et al., 2007). במקרה הנ"ל התבסס זיהוי התוצר על אנליזה שבוצעה ב HPLC-MS/MS. מולקולה זו מוזכרת גם כאחד מתוצרי ההמרה של E2 על ידי חיידקים שמקורם בשפכים (Lee and Liu, 2002) ותוצר המרה של E1 על ידי חיידקי מעיים (Järvenpää et al., 1980). בעבודה הנוכחית התברר שהבחנה בין 16hydroxyE1 ל 17ketoE2 באנליזה של HPLC-MS ו HPLC-MS/MS אינה פשוטה משום דמיון בין יונים מולקולאריים ושברי יונים (חיוביים ושליילים) של התוצרים הנ"ל. זיהוי וודאי של תוצר הפירוק אפשרי באנליזה המספקת מידע מבני של המולקולה, כפי שקיים למשל באנליזה של H' NMR. באנליזה זו זוהה במחקר הנוכחי תוצר ההמרה של E3 כ- 17ketoE2.

במחקר הנוכחי לא זוהה תוצר המרה ביולוגית דומיננטי לאסטרוגן E1, אם כי כן נראו עדויות להופעה בלתי יציבה של ריכוזים נמוכים של האסטרוגן E2. מרבית המחקרים שבחנו את פירוקו של E1 על ידי חיידקים שבודדו מסביבות שונות התקשו לזהות תוצר המרה לאסטרוגן זה (למשל, Ternes et al., 1999b; Pauwels et al., 2008). סיבה אפשרית לקושי בזיהוי תוצר פירוק של E1 היא תכונות פולאריות של תוצרי ההמרה (Shi et al., 2004a; Shi et al., 2004b). זאת משום שמיצוי והפרדה של אסטרוגנים טרם אנליזה (למשל RP-HPLC) מתבססת בדרך כלל על תכונותיהם האפולאריות של האסטרוגנים.

האסטרוגן הסינטטי EE2 יציב יחסית לפירוק ביולוגי. יציבות זו קשורה ככל הנראה, בנוכחות של קבוצת אתניל הממוקמת על פחמן 17 וחוסמת את האפשרות להמרה של קבוצת הקרבוקסיל לקרבוניל (Czajka and Londry, 2006; Pauwels et al., 2008).

5.5.2 המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים

ככל הידוע לי לא נערכו עבודות לבחינה של הגורמים המשפיעים על סילוק אסטרוגנים ע"י אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שמקורם באגנים ירוקים בניסויי מעבדה מבוקרים. בעבודה הנוכחית נבחנה השפעה של מידת רוויה בחמצן ונוכחות חומר אורגני מומס על המרה ופירוק ביולוגיים של אסטרוגנים על ידי ביופילם שמקורו באגנים ירוקים. הנ"ל נבדקו במבחני חשיפה מנתיים (batch experiments). ניסויים אלו שונים מהתנאים הצפויים באגנים ירוקים בקנה מידה גדול ובתנאי שדה

בין השאר בריכוז האסטרוגנים ובדגם החשיפה של האסטרוגנים לביופילם. בתנאי הניסוי ריכוז האסטרוגנים היה גבוה בהשוואה לריכוזם בקולחים (בין 0.1 ל 0.5 מיליגרם בליטר בהשוואה לעשרות ננוגרם בליטר הצפויים בקולחים). בניסוי השתמשתי בריכוז מינימאלי המאפשר זיהוי אמין של האסטרוגן, גם במקרה וחל פירוק בשיעור של 90% או יותר. נפח המים וכמות הביופילם בתנאי הניסוי היו קבועים. הביופילם בניסוי טולטל בעוד שבתנאי שדה החשיפה מתבצעת תוך כדי זרימה של הקולחים על פני הביופילם. יתרה מכך, תנאי הניסוי קבועים ומבוקרים (למשל משטר חמצן, טמפרטורה). לפיכך ממצאי הניסוי אינם מיועדים לצרכי ניבוי קצב המרה ופירוק ביולוגי של אסטרוגנים באגנים ירוקים אלא לבחינה של השפעה של תנאי הסביבה על הפירוק. מערך הניסוי הנ"ל נקבע מטעמים פרקטיים.

בהיעדר ממצאים מקבילים (ניסויי מעבדה מבוקרים בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים) השוואתי את מגמות ההמרה והפירוק הביולוגיים של האסטרוגנים לנתונים של המרה ופירוק על ידי אוכלוסיות מיקרוביאליות מסביבות אחרות (בעיקר מפעלים לטיפול בשפכים), בניסויי מעבדה (טבלה 5.5.1). הניסויים שנערכו בעבודה הנוכחית שונים מאלו שבוצעו במחקרים אחרים: א. בכך שבמחקר הנוכחי המיקרואורגניזמים צמודים למצע בעוד שבמחקרים אחרים הם היו בתרחיף (למשל Li et al., 2008; Li et al., 2005); ב. יש לצפות שהרכב אוכלוסיית המיקרואורגניזמים וצפיפותם שונה (Li et al., 2005; Li et al., 2008); ג. הריכוז התחלתי של אסטרוגנים היה שונה; ד. תנאי הניסוי היו שונים, למשל טמפרטורה (Li et al., 2005). משום כך מוקדה ההשוואה למגמות הפירוק וההמרה ולא לקצבים.

במחקר הנוכחי נמצא כי קיים הבדל בשעור המרה ופירוק ביולוגי של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים על ידי מיקרואורגניזמים ממקור אגנים ירוקים הצמודים למצע, בקולחים שניוניים (מחקר נוכחי: $E2 > E3 > E1 > EE2$). בתנאים אירוביים שיעור ההמרה והפירוק הביולוגי גבוהים מאשר בתנאים היפוקסיים. כמו כן, תוספת של חומר אורגני מומס (קולחים שניוניים מסוננים לעומת מים מועשרים בנוטריאנטים) בתנאים אירוביים לא שינתה את קצב הפירוק.

קצב פירוק מהיר יותר של האסטרוגן הטבעי E2 בתנאים אירוביים בהשוואה לאסטרוגנים טבעיים אחרים נמצא גם במחקרים עם חיידקים מבוצה משופעלת (למשל, Li et al., 2008, Shi et al., 2004b, טבלה 5.5.1) וחיידקים מקרקע חרסיתית החשופה לרעייה של בקר (Xuan., et al., 2008). במחקר הנוכחי נמצא שקצב סילוק של E3 מהיר בהשוואה ל E1. ממצא זה נתמך בממצאים של Shi et al., (2004a) ו Ren et al., (2007) שבחנו סילוק אסטרוגנים על ידי חיידקים שמקורם בבוצה משופעלת וסותר את זה של Shi et al., (2004b). הבדלים בקצב פירוק של E3 ו E1 בין ניסויים מוסברים על ידי Ren et al., (2007) בהבדלים במקור אוכלוסיות המיקרוביאליות ובהרכבן. כך למשל טוענים החוקרים כי פירוק של E1, בדומה ל E2 מתקיים בעיקר במנגנון של קו-מטבוליזם של חיידקים מחמצני אמוניה ופירוק של E3 ע"י חיידקים הטרוטרופיים.

טבלה 5.5.1: קבוע פירוק של E2 (K, סדר אפס $g/l\ hr^{-1}$; סדר ראשון hr^{-1}) ויחס בינו לבין קבוע הפירוק של האסטרונגים הטבעיים E1, E3, והאסטרונג הסינטטי EE2 (ניסויים מעבדתיים מנתיים, תנאים אירוביים, נוכחות חיידקים ממקורות שונים).

Source of microorganisms	Biofilm (g) or sludge SS (g/l)	Medium	Initial conc. ($\mu g/l$)	Temp. ($^{\circ}C$)	k value of E2	K E2/ K E3	K E2/ K E1	K E2/ K EE2	Ref.
Activated sludge	2.16	No feed	E2: 58 EE2: 72	5-10	0.174 hr^{-1}	N.A.	N.A.	29	Layton et al., 2000
Activated sludge	2.16	No feed	E2: 58 EE2: 72	22-25	0.252 hr^{-1}	N.A.	N.A.	21	Layton et al., 2000
Activated sludge	2.7	Mineral salt medium	1000	30	1.3 hr^{-1}	43.3	23.2	37.1	Shi et al., 2004b
Activated sludge	0.3	No feed	E2, E1: 0.5 EE2: 0.1	16	4.37 hr^{-1}	N.A.	2.2	43.7	Joss et al., 2004
Activated sludge	2	No feed	16	20	5.85 hr^{-1}	N.A.	1.4	N.A.	Onda et al., 2003
Activated sludge	2	Mineral salt medium	20000-25000	30	0.048 hr^{-1}	2.6	3.7	N.D.	Shi et al, 2004a
Activated sludge	0.26	No feed	1000	N.A.	1.08 hr^{-1}	N.A.	25.7	N.D.	Ternes et al., 1999a **
Activated sludge	0.52	No feed	1	N.A.	10.3 hr^{-1}	N.A.	21.4	N.D.	Ternes et al., 1999a **
Activated sludge with ammonia oxidation inhibitor	0.7	Mineral salt medium	200	30	0.6 hr^{-1}	N.A.	16.7	10.2	Shi et al., 2004b
SBR sludge	0.2 and 5g/l wet microbial granules containing nitrifying bacteria	Mineral salt medium	100	N.A.	0.052 hr^{-1}	9	6.6	11.45	Wang and Ivanov, 2009
MBR sludge	0.29	No feed	0.5: E2, E1 0.1: EE2	16	11.48 hr^{-1}	N.A.	2.2	158.3	Joss et al., 2004
<i>Nitrosomonas europaea</i>	N.A.	Mineral salt medium	400	30	0.002m $g/l\ hr^{-1}$	1.25	0.91	1.05	Shi et al., 2004b
Night soil-composting sludge	2	Mineral salt medium	20000-25000	30	0.014 hr^{-1}	1.3	1.8	N.D.	Shi et al, 2004a
Constructed wetland biofilm	1.5g/200 l*	Nutrient enriched medium	100-500	20	0.019 hr^{-1}	5.1	10.6	N.D.	Current study
Constructed wetland biofilm	1.5g/200 ml*	Filtered (0.45 μ) secondary effluent	100-500	20	0.014 hr^{-1}	4.8	5.2	N.D.	Current study

* Biofilm on substrate

**Reviewed in de Mes et al., 2005

No feed= diluted sludge; SS=suspended solids; N.A.=not available; N.D. =not degraded; SBR= Sequencing batch reactor, MBR=membrane bioreactor

כאמור לעיל האסטרוגן הסינטטי EE2 הוא העמיד ביותר בפני פירוק ביולוגי. ממצא דומה דווח בחשיפה של אסטרוגנים לחיידקים משפכים (Shi et al., 1999b; Layton et al., 2000; Ternes et al., 2003). בניגוד לממצאים הנ"ל קיימות עדויות לפירוק ביולוגי של האסטרוגן הסינטטי EE2 כאשר אינו מקור הפחמן היחיד בתמיסה (קו-מטבוליים). קו-מטבוליים של EE2 דווח בנוכחות ריכוזים גבוהים של אמוניה וחיידקים מחמצני אמוניה (Ren et al., 2000; Vader et al., 2007; Yi and Harper, 2007; Pauwels et al., E3, E2, E1, או בנוכחותם של אסטרוגנים טבעיים (2007; Yi and Harper, 2007; Pauwels et al., 2008).

בדומה לממצאים של המחקר הנוכחי, דווח על שיעור סילוק גבוה של E2 בתנאים אירוביים לעומת אנאירוביים בחשיפה של אסטרוגנים לחיידקים מקולחים (Lee and Liu, 2002; Hashimoto and Murakami, 2009) וחיידקים ממקור של מי תהום (Guang-Guo et al., 2003). במחקר הנוכחי האסטרוגן הסינטטי EE2 היה יציב בתנאים היפוקסיים. יציבות גבוהה בתנאים היפוקסיים של אסטרוגן זה דווחה גם במחקר של Czajka and Londry (2006); הריכוז לא השתנה במשך 3 שנים בנוכחות חיידקים שמקורם באגמים ובריאקטור אנאירובי ובנוכחות ניטראט, ברזל או סולפאט).

הניסויים במדיום מועשר בנוטריאנטים בהשוואה למדיום של קולחים שניוניים מסוננים אפשרה לבחון השפעה של תוספת חומר אורגני מומס המצוי בקולחים על קצב הפירוק. במחקר הנוכחי לתוספת זו בתנאים אירוביים לא הייתה השפעה על קצב הפירוק של האסטרוגנים. כלומר, סילוק אסטרוגנים על ידי ביופילם שמקורו באגנים ירוקים יכול להתקיים גם בנוכחות של חומר אורגני מומס בריכוז גבוה יחסית. Jürgens et al. (2002) דיווחו על פירוק של E2 בריכוז נמוך (20 ננוגרם/לליטר) בנוכחות חומר אורגני (מי נחל). מאידך, קיימים ממצאים סותרים המעידים על הפחתה בקצב פירוק של E2 עם עליה בריכוז של חומר אורגני קל פירוק. Li et al. (2008) דיווחו כי בריאקטור בוצה משופעלת בתנאים אירוביים קבוע פירוק מסדר ראשון פחת פי 2.4 ו 2.7 עבור E2 ו E1, בהתאמה, עם עליה מ 0 ל 100 מ"ג/ליטר גלוקוז. החוקרים מסבירים הפחתה זו בקצב הפירוק של האסטרוגנים בעיכוב תחרותי. אם אכן כך, במחקר הנוכחי לא נצפתה הפחתה בקצב פירוק האסטרוגנים בשל ריכוזם הגבוה יחסית בתמיסה (כ 0.1-0.5 מיליגרם/ליטר) וריכוז נמוך יחסית של חומר אורגני מומס בקולחים (ממוצע של כ- 5 מ"ג/ליטר BOD). מאידך, דווח על העדר עיכוב תחרותי של פירוק אסטרוגנים בנוכחות חומר אורגני כאשר החיידקים הם סלקטיביים לאסטרוגנים (Yoshimoto et al., 2004; *Rhodococcus zopfii* Y 50158). תוספת חומר אורגני בתנאים

היפוקסיים הפחיתה את שיעור הפירוק של E2 (פי 1.6; האסטרוגנים האחרים נותרו יציבים בתנאים אלו). כלומר, יתכן עיכוב תחרותי בתנאים אלו.

במחקר הנוכחי נמצא שבתנאים אירוביים ריכוז E2 פוחת בריאקציה מסדר ראשון. ממצא דומה דווח בניסויים עם חיידקים שמקורם בשפכים וקולחים (Li et al., 2005; Li et al., 2004a; Shi et al., 2008, טבלה 5.5.1). בריאקציה מסדר אפס קיימת דעיכה ליניארית של החומר עם הזמן (Lima, 2003). בריאקציה מסדר ראשון פוחת קצב פירוק החומר עם ירידה בריכוזו בתמיסה. קיים קושי לקבוא את דפוס הדעיכה של ריכוז האסטרוגנים הטבעיים E3 ו E1 בתנאים אירוביים משום סילוק חלקי בלבד של האסטרוגנים בתמיסה. בספרות מדווח על דעיכה התואמת סדר אפס וסדר ראשון עבור האסטרוגנים E1 ו E3. כך למשל דעיכה התואמת ריאקציה מסדר אפס התקבלה באינקובציה של אסטרוגנים שונים (ריכוז 0.4 מ"ג/ליטר E1, E2, E3 או EE2) בנוכחות החיידק מחמצן האמוניה *Nitrosomonas aeuropaea* (Shi et al., 2004a). דעיכה התואמת סדר ראשון התקבלה באינקובציה של אותם אסטרוגנים נתקבלה, בניגוד לצפוי, בריכוז גבוה יותר (1 מ"ג/ליטר). במקרה האחרון אוכלוסיית החיידקים הייתה ממקור של בוצה משופעלת (nitrifying activated sludge, Shi et al., 2004a), שכללה חיידקים הטרוטרופיים וחיידקים מחמצני האמוניה. ממצאים אלה עשויים להעיד כי להרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית השפעה על דפוס הדעיכה.

במחקר הנוכחי נמצא שבתנאים היפוקסיים ובנוכחות של חומר אורגני מומס המתאם לדפוס דעיכה של E2 ו E3 בריאקציה מסדר ראשון פוחת בהשוואה לזה הקיים במדיום מימי מועשר. היעדר מתאם בין דעיכה בריכוז אסטרוגנים לבין ריאקציה מסדר ראשון דווחה גם ע"י Hashimoto and Murakami (2009) והוסברה בנוכחות מקורות פחמן אחרים בתמיסה (ניסוי בוצע במדיום של קולחים סינטטיים) ובריכוז אסטרוגנים נמוך יחסית (1 מיקרוגרם בליטר).

תהליך של ספיחה נחשב בעבר למנגנון סילוק משמעותי של אסטרוגנים משפכים (בוצה משופעלת, למשל, Layton et al., 2000). התברר שעיקר הדעיכה של אסטרוגנים בקולחים הם תוצאה של המרה ופירוק ביולוגיים (Andersen et al., 2003) ולספיחה חשיבות נמוכה (Li et al., 2003; Andersen et al., 2005). גם בקרקעות מורחקים האסטרוגנים בעיקר במנגנונים ביוטיים. כך למשל, בקרקע חרסיתית עליה מתקיימת רעייה של בקר, נמצא מתאם חיובי ליניארי בין אחוז קרקע בלתי מעוקרת לבין קצב הפירוק של E2 ו EE2 והשפעה שלילית של אנטיביוטיקה על קצב הפירוק (Xuan et al., 2008). מבין האסטרוגנים שנבחנו במחקר הנוכחי, E1 ו EE2 הם היותר הידרופוביים (ערכי K_{ow} הגבוהים ביותר, טבלה 2.1) ולכן צפוי היה ששיעור ספיחתם לביופילם יהיה הרב ביותר. מאידך, במחקר הנוכחי אין עדות לספיחה של אסטרוגנים לביופילם. כך למשל כעבור ארבעה ימים בתנאים היפוקסיים ריכוז EE2 בתמיסה מימית מועשרת ובקולחים השניוניים בנוכחות ביופילם נותר ללא שינוי (כ- 100%). בדומה, סכום ריכוז האסטרוגן E1 ותוצר ההמרה E2 לאחר ארבעה ימים היה דומה

לריכוז ההתחלתי של E1 (עדות להיעדר ספיחה). לא ניתן לשלול שבתנאי הניסוי במחקר הנוכחי, העדר ספיחה משמעותית היא תוצאה של יחס נמוך בין כמות הביופילם לבין נפח הנוזל (1 גרם מצע ל - 133 מ"ל).

לסיכום, הממצאים מעידים כי הרחקה של אסטרוגנים טבעיים אפשרית בנוכחות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים. עיקר ההרחקה מתרחשת במנגנונים ביוטיים הכוללים המרה ביולוגית המתרחשת בעיקר בתנאים אירוביים. במחקר הנוכחי פירוק האסטרוגנים נבחן למשך תקופה של ארבעה ימים. בתקופה זו לא התקבל פירוק ביולוגי מלא. אין להוציא מכלל אפשרות ששיעור הפירוק וההמרה היו גבוהים יותר בחשיפה ארוכה יותר ובנוכחות כמות גדולה יותר של ביופילם. טיעון זה נתמך במסקנותם של Li et al. (2005) ששיעור פירוק והמרה של אסטרוגנים עולה עם עליה בביומסה של החיידקים. תמיכה נוספת היא הפחתה בפעילות אסטרוגנית של תמיסות (פירוק והמרה) בנוכחות אוכלוסיות מיקרואורגניזמים עם עליה במשך החשיפה (Shi et al., 2002; Lee and Liu, 2002; Colucci et al., 2001; Yoshimoto et al., 2004a, 2004).

6. ליטוש קולחים שניוניים באמצעות אגנים ירוקים

6.1 מבוא

במחקר הנוכחי נבחנה היכולת של אגנים ירוקים בדפוסי מבנה וזרימה שונים (מערכת היברידיית) לסלק מזהמי מים קונבנציונאליים ואסטרונגנים מקולחים שניוניים (ליטוש קולחים). למטרה זו הוקמה במפעל טיפול השפכים שפד"ן מערכת מחקרית הכוללת 21 בריכות אגנים ירוקים, הנבדלים בדפוס זרימה ובהרכבי צומח (פרק שיטות וחומרים, סעיף 6.3 להלן). הפרק הנוכחי בוחן את ההתאמה של המערכת הנ"ל להרחיק מזהמי מים קונבנציונאליים (חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט, חנקן כללי וזרחן מומס). ריכוז מזהמים נבחרים נוטר בקולחים שניוניים הנכנסים ויוצאים מהבריכות בשנת התפעול הראשונה והשלישית (מערכת בשלה). להלן מוצגים שעור ההרחקה של המזהמים במערכת בשפד"ן וההשפעה של דפוס הזרימה והרכב הצומח על יעילות ההרחקה. כמו כן קיימת התייחסות לשינויים שחלו ביעילות המערכת עם הבשלתה.

6.2 רקע מדעי

6.2.1 מנגנונים לסילוק מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים

חומר אורגאני מומס מורחק באגנים ירוקים בפעילות מיקרוביאלית המתקיימת בתנאים אירוביים ואנאירוביים. התהליך האירובי המרכזי כולל פירוק של חומר אורגאני מומס בנשימה של חיידקים הטרוטרופים (Vymazal and Kröpfelová, 2008). כמו כן מתקיים תהליך משני בחשיבותו של פירוק אירובי של תרכובות אורגאניות המכילות חנקן על ידי חיידקים בתהליך אמוניפיקציה (Cooper et al., 1996; ammonification). בסביבה ללא חמצן מפורק החומר האורגאני בנשימה אנאירובית (תסיסה) ע"י חיידקים אנאירוביים פקולטיביים או אובליגטוריים. פירוק של חומר אורגאני במסלול אנאירובי איטי מאשר פירוק בתנאים אירוביים. באגנים ירוקים בהם העומס של חומר אורגאני גבוה, פוחת ריכוז החמצן ומנגנוני הרחקה אנאירוביים עשויים להוות מנגנון מרכזי (Vymazal and Kröpfelová, 2008; Cooper et al., 1996).

הרחקה של חומר אורגאני מתרחשת גם כתוצאה מסילוק של חומר חלקיקי (TSS). הרחקה זו מתרחשת תוך כדי זרימת הקולחים דרך האגן הירוק, בעיקר סמוך לאזור כניסתם לתא. המוצקים המרחפים מורחקים במנגנונים שונים בעיקר סינון ושקיעה (סדימנטציה), פירוק ביולוגי וספיחה (Vymazal 2003b). באגנים בזרימת מים עילית (FWS, סעיף 2.5), עיקר ההרחקה של המוצקים המרחפים היא בתהליך של שקיעה תוך כדי מעבר איטי של הנוזל דרך עומדים צפופים של צמחיה (Kadlec and Knight, 1996). צמחיה צפה מסייעת לשקיעה של המוצקים המרחפים באמצעות צמצום ערבול המים הנגרם על ידי הרוח. כמו כן, על פני הצמחיה מתפתח ביופילם אליו נצמדים החלקיקים. החומר החלקיקי ששוקע, נתפס בחללים הנוצרים על ידי חומר צמחי שנרקב בקרקעית והרחפתו מחדש בעמודת המים מצטמצמת (Vymazal, 2003b). באגנים בזרימת מים תת-קרקעית (סעיף 2.5) המוצקים המרחפים נלכדים בחללים קטנים הקיימים במצע, שם הם מצטברים ומפורקים ביולוגית.

תרכובות חנקן מקיימות בסביבה ובאגנים ירוקים מעגל ביו-גיאוכימי מורכב הכולל המרות ביוטיות ואביוטיות רבות (למשל, Kadlec and Knight, 1996). היונים הבולטים בתהליכים הנ"ל הם אמוניום (NH_4^+), ניטריט (NO_2^-) וניטראט (NO_3^-). החנקן יכול להימצא גם כגז (N_2), כחנקן מחומצן (N_2O), NO_2 , N_2O_4) או מחוזר כאמוניה (NH_3). בצורתו האורגנית נמצא החנקן במולקולות כאוראה, חומצות אמיניות ואמינים (Vymazal, 1995). התהליכים המרכזיים הקשורים בהסעה והרחקה של חנקן שהוצגו באופן מסורתי באגנים ירוקים כוללים נידוף, ניטריפיקציה אירובית, אמוניפיקציה, דניטריפיקציה אנאירובית וקיבוע ביולוגי. בשנים האחרונות מצטברות עדויות לקיומם של תהליכים נוספים הקשורים להרחקה של חנקן ובניהם חמצון אמוניה בתנאים אנאירוביים ודניטריפיקציה בתנאים אירוביים (Reddy and DeLaune, 2008; Vymazal and Kröpfelová, 2008).

נידוף של אמוניה (ammonia volatilization) הוא תהליך פיסיקו-כימי הקשור בשיווי משקל המתקיים בין יונים של אמוניום ואמוניה בלתי מיוננת. נידוף אמוניה משמעותי בערכי הגבה גבוהים (מעל 9), משום דומיננטיות של צורן האמוניה הבלתי מיון, הנדיף יותר אשר יון האמוניום (Reddy and Patrick, 1984). נידוף אמוניה מתקיים בעיקר באגנים ירוקים בהם דפוס הזרימה עילי המאפשר נידוף אמוניה משטח פני המים. פעילות פוטוסינתטית של אצות וצמחי מים צפים וטבולים בשעות היום תורמת לעליה בערך ההגבה ומשום כך משפרת סילוק אמוניה במנגנון של נידוף (Vymazal, 2003b).

אמוניפיקציה של חנקן אורגני (ammonification) הוא תהליך בו מפורקים חומרים אורגאניים המכילים חנקן דוגמת חלבונים וחומצות גרעין לחנקן מינראלי (NH_4^+). האנרגיה המשתחררת בתהליך זה משמשת את החיידקים לגדילה והאמוניה לבנייה של ביומסה. באגנים ירוקים תהליך האמוניפיקציה יעיל ורוב החנקן האורגני מפורק לאמוניה (Kadlec and Knight, 1996). אמוניפיקציה מתקיימת בתנאים מחמצנים ומחזרים (Reddy, 1982; Vymazal, 2003b). אולם, התהליך יעיל יותר בתנאים אירוביים, ופוחת עם המעבר ממיקרופלורה אירובית לאנאירובית פקולטיבית ואנאירובית אובליגטורית (Reddy and Patrick, 1984).

ניטריפיקציה (nitrification) מוגדרת לרוב חמצון ביולוגי דו שלבי של אמוניה (Kadlec and Knight, 1996). בשלב ראשון קיים חמצון אמוניה לניטריט על ידי חיידקים שגדילתם מחייבת נוכחות אמוניה. חמצון האמוניה משמש להפקה של אנרגיה לגדילה (חיידקים איירוביים כמואוטוטרופיים) והפחמן הדו-חמצני או מולקולות קרבונאט משמשים כמקור פחמן (Paul and Clark, 1996). בשלב השני קיים חמצון הניטריט לניטראט על ידי חיידקים כמוליטוטרופיים פקולטיביים, המסוגלים לעשות שימוש גם בתרכובות אורגניות, בנוסף לניטריט, להפקה של אנרגיה. ניטריפיקציה מתקיימת בכל הטיפוסים של האגנים הירוקים, אולם משמעותית יותר באגנים בזרימה תת-קרקעית אנכית בהם נישות אירוביות רבות. חמצון של אמוניה מתרחש גם בתנאים אנאירוביים (anaerobic ammonia oxidation, ANAMMOX) בו קיימת המרה של ניטריט או ניטראט ואמוניה (NH_4^+) לגז חנקן

בתנאים מחזרים (Vymazal and Kröpfelová, 2008). ניטראט ובעיקר ניטריט (Strous et al., 1997) משמשים כמקבלי אלקטרונים בתהליך הנשימה. תהליך חמצון אמוניה בתנאים אנאירוביים הוא אוטוטרופי ולכן לא נדרש לחיידקים חומר אורגני. ככל שידוע חיידקי ה-ANAMMOX הם אנאירוביים אובליגטוריים. מידת פעילותם ותרומתם להרחקה של חנקן באגנים ירוקים מלאכותיים עדיין אינה ברורה (Vymazal, 2007; Reddy and DeLaune, 2008) ומשתנה בהתאם לדפוס הזרימה באגן (למשל, גבוהה יותר באגנים רוויים מאשר בבלתי רוויים, Zhou et al., 2009).

דניטריפיקציה (denitrification) מוגדרת כחיזור בלתי הפיך של יוני ניטריט או ניטראט לחנקן גזי או גזים אחרים של חנקן מחומצן (Hauck, 1984; Paul and Klark, 1996). דניטריפיקציה מתקיימת בנשימה של חיידקים כמוהטרורופיים בנוכחות חומר אורגני ותנאים היפוקסיים או אנאוקסיים. התרכובות האורגניות משמשות כתורמות אלקטרונים ותרכובות החנקן כמקבלות אלקטרונים. חומר אורגני משמש לחיידקים דניטריפיקנטים גם כמקור פחמן לבניה של התא והיעדרותו עשויה להגביל את קצב הדניטריפיקציה (Vymazal and Kröpfelová, 2008). דניטריפיקציה מתקיימת בכל הטיפוסים של האגנים הירוקים ויעילה יותר באגנים בזרימה תת-קרקעית אופקית או זרימה עילית בהם אזורים עניים בחמצן. דניטריפיקציה מתקיימת בשילוב עם ניטריפיקציה, בעיקר כאשר ניטראט מגביל את קצב התהליך, ורצף התהליכים נחשב למנגנון היעיל ביותר להרחקה של חנקן כללי באגנים ירוקים (Kadlec and Knight, 1996; Kadlec and Wallace, 2008). כיום ידוע כי חיזור ניטראט לגז חנקן מתקיים גם בתנאים אירוביים (Reddy and DeLaune, 2008; Vymazal and Kröpfelová, 2008). חיידקים המבצעים דניטריפיקציה אירובית קולטים חמצן, ניטראט או ניטריט כמקבלי אלקטרונים גם כאשר ריכוז החמצן קרוב לרבייה (Zehr and Ward, 2002).

הרחקה של יוני ניטראט בתנאים אנאוקסיים קיימת גם בתהליך אמוניפיקציה של יוני ניטראט לאמוניה (Keeney et al., 1973). אמוניפיקציה של ניטראט עשויה להיות דומיננטית על דניטריפיקציה בתנאים הכוללים ריכוז פחמן גבוה וריכוז ניטראט נמוך (Vymazal and Kröpfelová, 2008).

סילוק חנקן באגנים ירוקים מתרחש גם על ידי קליטתו למיקרואורגניזמים, אצות וצמחי מים עיליים (אסימילציה, plant uptake and assimilation). אסימילציה כוללת תהליכים ביולוגיים של קליטת חנקן אנאורגני והמרתו לתרכובות אורגניות המשמשות לבנייה של תאים ורקמות. צורוני החנקן הנקלטים על ידי הצמחייה הם יונים של ניטראט ואמוניה (Kadlec and Knight, 1996). באגנים ירוקים נקלט החנקן מהסדימנט על ידי צמחים מזדקרים. צמחים צפים וטבולים ששורשיהם בקרקעית קולטים חנקן המומס בגוף המים ובסדימנט. ריכוז החנקן בצמחים גבוה ביותר במהלך תחילת הצימוח ופוחת עם התבגרות והזדקנות הצמח. כאשר פוחתת היצירה של הביומסה הצמחית קיימת הסעה של החנקן וחומרי ההטמעה אחרים מהעלים לאזור הריזומים (Vymazal, 1995). במהלך הזדקנות ותמותה של הצמחים נרקב החומר הצמחי וחנקן משתחרר חזרה אל המים.

באגנים ירוקים תתכן גם ספיחה של אמוניה (ammonia adsorption). יוני האמוניום בגוף המים נספחים במנגנון של חילוף קטיונים על פני שטח של חומר אורגאני נרקב (דטריטוס), סדימנט אנאורגאני, קרקעות וחצץ. האמוניום הקשור משתחרר בקלות עם שינוי בתנאים כימיים של המים. כמות האמוניום הקשור עולה ככל שריכוזו במים רב יותר וזמינות גבוהה יותר של אתרי ספיחה (Vymazal, 2003b). ספיחה זו מוגבלת בעיקר לאגנים ירוקים בזרימת מים תת-קרקעית בהם מתאפשרת אינטראקציה בין הקולחים לבין המצע. מנגנון זה מיושם לסילוק של אמוניה באגנים ירוקים מטיפוס של tidal flow (מחזורי הצפה, Green et al., 1997; Sun et al., 1999). בנוסף למנגנון חילוף יונים תתכן גם ספיחה כימית של האמוניום הטעון חיובית לחומצות הומיות (humic acids) להן מטענים שליליים רבים.

זרחן קיים באגנים ירוקים כמולקולות אורגניות ואנאורגניות. אורתופוספאט (PO_4^{3-}) נחשב לצורן היחיד שנקלט ישירות על ידי אצות וצמחי מים עליליים ולכן משמש כחוליה מקשרת בין זרחן אורגאני ואנאורגאני במחזור הזרחן באגנים ירוקים (Vymazal, 1995). במים נמצא יון האורתופוספאט בשיווי משקל עם יונים של $H_2PO_4^-$ ו HPO_4^{2-} , המהווים את צורני הזרחן האנאורגניים הדומיננטיים בטווח ערכי הגבה של 5 עד 9 (Reddy and DeLaune, 2008). הזרחן קיים במולקולות אורגניות רבות כפוספוליפידים, חומצות גרעין ופוליפוספאטים אורגאניים (למשל קואנזימים, ATP ו ADP, Vymazal, 1995). פחות שכיח הוא הזרחן המימני המתקיים בצורה גזית (phosphine, PH_3 , Dévai, et al., 1988). באגנים ירוקים מתרחשים מגוון תהליכים של שחלוף זרחן בין פאזה אורגנית ואנאורגנית, קשורה וחופשית. התהליכים הדומיננטיים הקשורים לסילוק זרחן באגנים ירוקים מלאכותיים הם ספיחה לסדימנט ושקיעה/התגבשות (soil adsorption and precipitation). בתהליך ספיחה קיים מעבר זרחן בצורתו האנאורגנית מתמיסת הקרקע (מים אינטרסטיציאליים) לשטח פנים של קרקע מינרלית, שם הוא מצטבר מבלי לחדור את פני השטח (Vymazal and Kröpfelová, 2008). ספיחה של זרחן קיימת בעיקר לחלקיקי קרקע וסדימנט המכילים כמות רבה של קלציום (Ca), מגנזיום (Mg), אלומיניום (Al) וברזל (Fe). מידת פעילותם של הקטיונים הללו מושפעת מערך ההגבה וכמות יוני הברזל (Richardson, 1999). שקיעה והתגבשות הזרחן (פרסיפיטציה) נובעת מתגובה בין יונים של זרחן לקטיונים מתכתיים (דוגמת Fe, Al, Ca ו Mg). תהליך זה מתרחש כאשר קיימת זמינות גבוהה במיוחד של יוני זרחן או קטיונים מתכתיים (Rhue and Harriss, 1999). בנוסף לתגובה כימית ישירה, יכול הזרחן להשתתף גם בקו-פרסיפיטציה עם מינרלים אחרים למשל $CaCO_3$ (calcite- calcium carbonate, Vymazal and Kröpfelová, 2008).

הסדימנט בו מצטבר הזרחן נחשב למדור המאכסן את הזרחן לפרקי זמן ארוכים (Richardson, 1999). בנוסף לתהליכי ספיחה שוקעים ומצטברים בסדימנט גם חלקיקים אורגאניים המכילים זרחן. אלו עשויים לשקוע ולהיקבר תחת זרם רציף של סדימנט ההופך עם הזמן למבלע של זרחן (קרקעות

כבול; Healy and Cawley, 2002). אכסון זרחן במדור הסדימנט רב יותר במערכות בהם קיימים עומסים גבוהים של זרחן (Vymazal, 2004).

סילוק זרחן מגוף המים עשוי להתרחש גם כתוצאה מקליטה על ידי אוכלוסייה מיקרוביאלית (למשל חיידקים, פטריות, אצות וחסרי חוליות קטנים). הקליטה של הזרחן למדור המיקרוביאלי הוא תהליך מהיר כתוצאה מקצב גדילה והתרבות מהירים, אולם כמות הזרחן האגורה במדור זה נמוכה (Richardson and Marshall, 1986) בשל חילוף החומרים המהיר (rapid turnover). באופן כללי מקובל כי קליטה על ידי מיקרואורגניזמים אינה תורמת להרחקה של זרחן מקולחים ומעורבת בעיקר בהמרה של הצורה המומסת לזו החלקיקית (Vymazal, 2003b). בהשוואה לקליטת הזרחן ע"י מיקרואורגניזמים, הקליטה ע"י מקרופיטים איטית הרבה יותר (קנה מידה של מספר שבועות, Richardson and Marshall, 1986). מרבית הזרחן נקלט מתמיסת הקרקע ע"י השורשים של צמחים מזדקרים. קליטה של זרחן ע"י העלים ובאזורי צימוח חדשים מוגבל למיני צומח טבולים בלבד (Vymazal, 2003b). באקלים ממוזג, הקצב של קליטת הזרחן ע"י הצמחייה הוא מיטבי בתחילת עונת הצימוח, לפני שקצב הצימוח מגיע לשיאו (Garver et al., 1988). העונתיות משפיעה לא רק על קצב הקליטה של הזרחן אלא גם על המדור בו מאוכסן הזרחן בגוף הצמח. בעונת הצימוח מוסע הזרחן מחלקי הצמח התת-קרקעיים (שורשים) לחלקי הצמח העל קרקעיים. טרם הזדקנות הצמח מועבר הזרחן בחזרה מאזורי הצימוח לאזור השורשים והריזומים ונאגר בהם עד לשימוש בו בעונת הצימוח הבאה (Garver et al., 1988). אגירה של זרחן בצמחים עשויה להיות קצרת טווח או ממושכת, כתלות בסוג הצמחייה, קצב פירוק של חומר צמחי מת, דליפה של זרחן מדטריטוס (חומר צמחי נרקב) והסעה של זרחן בין חלקי הצמח העל לתת-קרקעיים (Vymazal, 2003b).

6.2.2 ליטוש קולחים באגנים ירוקים

בעבודה הנוכחית נבדקה יכולת של אגנים ירוקים להרחיק מזהמי מים קונבנציונאליים (TSS; BOD; PO_4 ; TN; NO_3 ; NH_4) מקולחים שניוניים באיכות גבוהה (ליטוש קולחים). מרבית האגנים הירוקים בצפון אמריקה נבנים בדפוס זרימה עילי ומוזנים בקולחים מוניציפאליים באיכות שניונית או גבוה יותר. בניגוד לכך באירופה מוקמים אגנים ירוקים בעיקר בדפוס זרימה תת-קרקעי המוזנים בקולחים באיכות נמוכה (למשל לאחר שיקוע ראשוני בלבד; Kadlec et al., 2000). מרבית הניסיון הקיים בליטוש קולחים באיכות גבוהה מבוסס על שימוש באגנים ירוקים בזרימה עילית (Thullen et al., 2005; Toet et al., 2005; Ghermandi et al., 2007). ליטוש קולחים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית או באגנים המשלבים מספר דפוסי זרימה (מתקנים היברידיים) נפוץ פחות ומוגבל בעיקר לעת האחרונה (Tuncsiper et al., 2006; Ayaz, 2008; Toscano et al., 2009; Torrens et al., 2009; Yeh and Wu, 2009).

השוואה של יעילות ליטוש קולחים בין מתקנים של אגנים ירוקים בעייתית משום שקיימים מכלול משתנים להם השפעה על יעילות ההרחקה של המזהמים הכוללים למשל את מבנה המערכת, העומס

ההידראול, עומס המזהמים, זמן שהייה של הקולחים, גיל המערכת ותנאי אקלים. עם זאת, בנספח 6 מוצגים נתונים של ריכוז חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, תרכובות חנקן וזרחן בקולחים הנכנסים ויוצאים מ- 67 אגנים ירוקים בזרימה עילית ו 31 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית. המשותף למערכות הנ"ל הוא ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (BOD) $\leq 30\text{mg/l}$ בקולחים המזינים את המערכות. איכות זו נחשבת לאיכות שניונית נמוכה.

חומר אורגאני קל פירוק (BOD)

קיימים דיווחים שונים על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק באגנים ירוקים שונים בטווח שבין הרחקה שלילית (תוספת של חומר אורגאני) ועד להרחקה בשיעור של כ- 94% (טבלה 6.2.1).

טבלה 6.2.1: ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק (%) ב- 67 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 31 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מבוסס על נתונים בנספח 6).

	Free flow (n=67)			Subsurface flow (n=31)		
	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)
Average	15.6	7.6	40	16.3	6.3	59
sd	8.6	4.4	39	6.6	5.8	35
Median	18.0	7.6	46	15.0	4.0	70
Min	0.7	0.3	-125	3.0	1.0	-67
Max	30.0	19.0	86	30.0	27.8	94

שעור ההרחקה של חומר אורגאני קל פירוק באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית לרוב גבוה מאשר באגנים בזרימה עילית (ממוצע או חציון גבוהים פי 1.5). באחוז רב יותר של אגנים ירוקים בזרימה עילית קיימת עליה בריכוז החומר אורגאני קל הפירוק בתום הטיפול בהשוואה לאגנים בזרימה תת-קרקעית (12% ו 6%, בהתאמה; נספח 6). ב- 36% מהאגנים בזרימה עילית ריכוז החומר האורגאני הנותר בתום הטיפול גבוה מ- 10mg/l לעומת 12% בלבד באגנים בזרימה תת-קרקעית.

מוצקים מרחפים (TSS)

קיימת שונות רבה ביעילות הרחקה של מוצקים מרחפים באגנים ירוקים. קיימים מתקנים בהם הרחקה העולה על 80% בעוד שבאחרים קיימת תרומה של מוצקים מרחפים לקולחים (טבלה 6.2.2). ב- 50% מהאגנים בזרימה עילית דווח על הרחקה בשיעור של כ- 33% ובזרימה תת-קרקעית שיעור הרחקה כפול (טבלה 6.2.2).

טבלה 6.2.2: ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז מוצקים מרחפים (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של מוצקים מרחפים (%) ב- 60 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 31 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מבוסס על נתונים בנספח 6)

	Free flow (n=60)			Subsurface flow (n=31)		
	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)
Average	29.3	17.1	11	54.5	33.1	44
sd	26.5	18.6	94	149.0	133.2	64
Median	22.9	11.5	33	26.0	6.1	70
Min	0.7	1.5	-379	4.0	2.0	-157
Max	112.0	81.0	84	852.0	750.0	97

באחוז רב יותר של אגנים ירוקים בזרימה עילית קיימת עליה בריכוז של מוצקים מרחפים בתום הטיפול בהשוואה לאגנים בזרימה תת-קרקעית (22% ו 13%, בהתאמה).

אמוניה (NH₄)

יעילות הרחקה שונה של אמוניה דווחה באגנים ירוקים שונים בטווח שבין יעילות שלילית (תרומה של אמוניה) לסילוק בשעור העולה על 90% (טבלה 6.2.3). על פי ערכי החציון שעור ההרחקה נמוך של אמוניה (<50%) דווח הן באגנים בזרימה עילית והן בזרימה תת-קרקעית. באחוז גבוה יותר של אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית נצפתה עליה בריכוז האמוניה בתום הטיפול בהשוואה לאגנים בזרימה עילית (26% ו 3%, בהתאמה; נספח 6).

טבלה 6.2.3: ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז אמוניה (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של אמוניה (%) ב- 36 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 27 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מבוסס על נתונים בנספח 6)

	Free flow (n=36)			Subsurface flow (n=27)		
	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)
Average	6.5	3.2	50	4.8	3.1	1
sd	6.2	3.8	37	3.4	2.7	136
Median	5.0	1.3	50	5.0	2.7	38
Min	0.1	0.1	-58	0.1	0.1	-600
Max	23.5	14.0	98	12.0	10.8	91

חנקן כללי (TN)

שעורי הרחקה שונים של חנקן כללי דווחו באגנים ירוקים בזרימה עילית ותת-קרקעית, בטווח שבין יעילות שלילית לבין הרחקה בשיעור העולה על 90% (טבלה 6.2.4). הרחקה רבה יותר של חנקן כללי דווחה באגנים בזרימה עילית מאשר באגנים בזרימה תת-קרקעית (ערכי חציון גבוהים פי 1.9; טבלה 6.2.4).

טבלה 6.2.4: ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז חנקן כללי (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של חנקן כללי (%) ב- 24 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 27 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מבוסס על נתונים בנספח 6)

	Free flow (n=24)			Subsurface flow (n=27)		
	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)
Average	12.6	5.4	51	19.8	12.5	29
sd	8.7	4.6	34	12.1	7.0	39
Median	11.7	3.5	58	17.9	12.1	30
Min	0.6	0.7	-55	4.1	0.2	-105
Max	35.9	18.0	92	51.0	26.1	97

במרבית האגנים בזרימה עילית (כ- 88%) ובכמצית מאגנים בזרימה תת-קרקעית דווח על ריכוז חנקן כללי נמוך מ 10mg/l בתום הטיפול.

זרחן כללי (TP)

שעור הרחקה נמוך של זרחן כללי דווח הן באגנים בזרימה עילית והן באגנים בזרימה תת-קרקעית (חציון יעילות סילוק נמוכה מ- 30%). הרחקה רבה יותר של זרחן כללי דווחה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית מאשר באגנים בזרימה עילית (טבלה 6.2.5). ב- 18% מהאגנים בזרימה עילית קיימת עליה בריכוז הזרחן הכללי בתום הטיפול בהשוואה ל כ- 10% באגנים בזרימה תת-קרקעית.

טבלה 6.2.5: ממוצע, סטיית תקן, חציון וערכי מינימום ומקסימום של ריכוז זרחן כללי (מ"ג/ליטר) ויעילות סילוק של זרחן כללי (%) ב- 34 אגנים ירוקים בזרימה עילית וב- 21 אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מבוסס על נתונים בנספח 6)

	Free flow (n=34)			Subsurface flow (n=21)		
	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)	In (mg/l)	Out (mg/l)	Removal (%)
Average	4.3	3.0	15	5.5	4.2	22
sd	4.8	2.4	52	3.5	3.2	36
Median	2.6	2.2	21	4.1	3.9	26
Min	0.1	0.1	-129	0.5	0.2	-86
Max	23.2	7.2	84	13.2	12.8	95

לסיכום, קיימת שונות גבוהה בשיעור ההרחקה של מזהמים קונבנציונאליים באגנים ירוקים בדפוס זרימה שונים. בדרך כלל באגנים בדפוס זרימה תת-קרקעית ההרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים וזרחן כללי גבוהה מאשר באגנים בזרימה עילית. הרחקה של תרכובות חנקן גבוהה יותר באגנים בזרימה עילית.

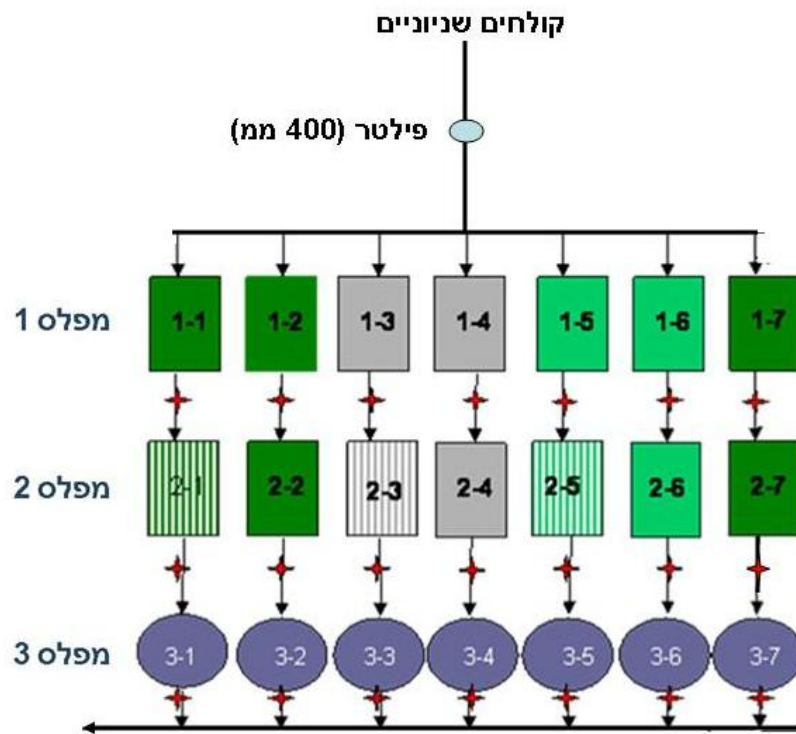
6.3 שיטות וחומרים

6.3.1 מבנה מערכת המחקר אגנים ירוקים בשפד"ן

מערכת אגנים ירוקים מחקרית הוקמה בשפד"ן במימון של המשרד לאיכות הסביבה והטריטוריה של איטליה ובסיוע ביה"ס ללימודי סביבה ע"ש פורטר באוניברסיטת תל-אביב. מערכת זו כוללת 21

בריכות המוזנות בקולחים שניוניים באיכות גבוהה (נספח 3). המערכת נבנתה בשנת 2005 על ידי חברת "עפרה צמחי מים" ושודרגה כשנה לאחר מכן ע"י חברת "מורן יעוץ ופיתוח".

בריכות המחקר נחלקות לשבעה טיפולים הפועלים במקביל (איור 6.3.1). בכל טיפול זורמים הקולחים דרך שלוש בריכות בטור בדפוסי זרימה שונים (מערכת היברידיית). בבריכות המפלס הראשון (כל בריכה 6X5 מטר) הזרמת המים בדפוס תת-קרקעי אנכי (VSSF). הבריכות נבדלות בהרכב הצומח כמפורט להלן (איור 6.3.1). בבריכות המפלס השני (כל בריכה 6X5 מטר) זרימת המים תת-קרקעית אופקית (HSSF, שטח חתך זרימה 2.75 מ"ר) או אנכית (VSSF, איור 6.3.1). בדומה למפלס הראשון גם במפלס השני קיימים הרכבי צומח שונים בבריכות (מפורט בסעיף 6.3.2). בריכות המפלס השלישי (5X5 מטר) זרימת המים עילית (SF). בבריכות אלו מגוון צמחי מים צפים ומזדקרים (סעיף 6.3.2).



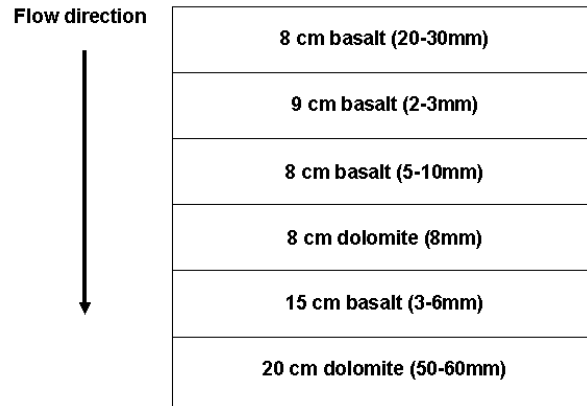
איור 6.3.1: סכמה המציגה את סידור הבריכות במערכת אגנים ירוקים במט"ש השפד"ן. במערכת 7 טיפולים בכל אחד זורמים הקולחים דרך 3 בריכות (מפלסים 1 – 3). בבריכות המפלס הראשון והשני זרימת הקולחים מתחת לפני השטח (subsurface flow). בכל בריכות המפלס הראשון דפוס הזרימה תת-קרקעי אנכי. בבריכות המפלס השני דפוס הזרימה תת קרקעי אופקי (2-1, 2-3, 2-5) או תת קרקעי אנכי (2-2, 2-4, 2-6, 2-7). בבריכות המפלס השלישי זרימת הקולחים מעל לפני המצע (Surface flow). בריכות 1-1, 1-2, 1-7, 2-1, 2-2, ו 2-7 נשתלו במגוון צמחי מים מזדקרים, בריכות 1-5, 1-6, 2-5, ו 2-6 שתולות בצמחיה עשבונית ובריכות 1-3, 1-4, 2-3 ו 2-4 מייצגות טיפול ביקורת ונשמרו ללא צומח. בכל בריכות המפלס השלישי (3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6 ו 3-7) מגוון צמחים צפים ומזדקרים.

בכל בריכה הקולחים נאספים בתחתית באמצעות צינור PVC (קוטר 20 ס"מ) ומתנקזים למיכל איזון ובקרת מפלס (מוצא הבריכה). מהמיכל זורמים הקולחים בגרביטציה אל הבריכה הבאה. בתום הטיפול (מוצא בריכות המפלס השלישי), נאספים הקולחים שטופלו במערכת ומושבים למפעל השפד"ן.

הבריכות מוזנות בקולחים שניוניים לאחר שעברו סינון מקדים בפילטר 400 מיקרון להרחקה של חלקיקים גסים. הפילטר נישטף אוטומטית במנגנון שטיפה הפוכה (back wash) על בסיס הפרשי לחצים. לאחר הסינון עוברים הקולחים למתקן בקרת זרימה ופיזור לבריכות (איור 3, נספח 4). על מנת לשמור על אחידות הספיקה, הותקנה במתקן פיזור הקולחים צנרת נפרדת עבור ספיקות גבוהות ($>1\text{m}^3/\text{h}$) וספיקות נמוכות ($\leq 1\text{m}^3/\text{h}$). דפוס ההזנה (הזרמה קבועה או מנתית) מווסת באמצעות מגופים הידראוליים ובקרים (Gavish, Control Systems). במהלך תקופת המחקר הוזנה המערכת בספיקה יומית של 84 מ"ק/יום. ספיקה זו יצרה עומס הידראולי של 40 ס"מ/יום בבריכות המפלס הראשון והשני, 48 ס"מ/יום בבריכות המפלס השלישי. העומס ההידראולי על כלל המערכת הוא כ 14 ס"מ/יום. המערכת הוזנה בדפוס מנתי הכולל 12 פולסים ליום (הזרמה ומנוחה של 1 שעה).

6.3.2. מצע האגן

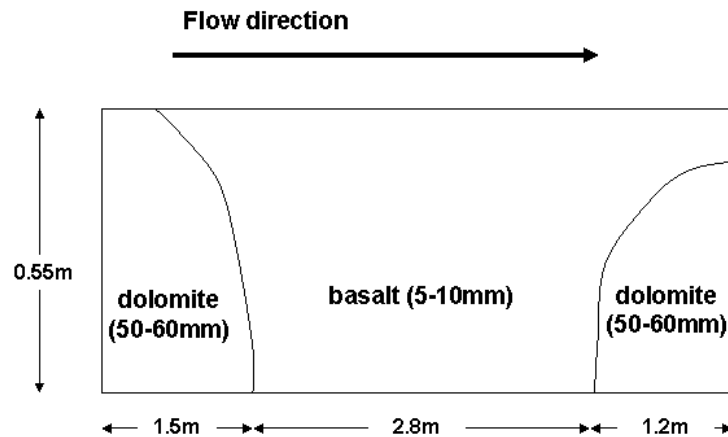
בבריכות בזרימת מים תת-קרקעית (בריכות המפלס הראשון והשני) היה מצע מסוג בזלת ודולומיט בעומקים שונים, בקטרים שונים (איורים 6.3.2 ו 6.3.3).



איור 6.3.2: עובי והרכב שכבות המצע בבריכות ובקולונות המוזנות בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי

נקבוביות המצע (porosity) ללא השפעה של שורשי צמחיה נמדדה במעבדה (באמצעות השלמה של נפח נוזל לכלי בנפח ידוע המלא במצע) והייתה 0.43 ± 0.01 עבור בזלת בקוטר חלקיקים 2-3 מ"מ; 0.44 ± 0.01 עבור מצע בזלת בקוטר נקבים של 5-10 מ"מ; 0.48 ± 0.01 עבור מצע בזלת בקוטר נקבים של 20-30 מ"מ; 0.46 ± 0.01 עבור מצע דולומיט בקוטר של 8 מ"מ ו 0.50 ± 0.01 עבור מצע דולומיט בקוטר של 50-60 מ"מ. מוליכות הידראולית ברוויה של מצע האגן בזרימה תת-קרקעית אנכית נקבעה באמצעות בחינה של שינוי ספיקה כתלות בלחץ הידראולי בשש קולונות אגנים ירוקים

(גובה 80 ס"מ, קוטר 33 ס"מ) בהן הרכב מצע זהה לזה שבבריכות. המוליכות הידראולית ברוויה הייתה 1242 ± 202 ס"מ בשעה.



איור 6.3.3: עובי והרכב שכבות המצע בבריכות המוזנות בדפוס זרימה תת-קרקעי אופקי

6.3.3. הרכב הצומח

בבריכות המפלס הראשון והשני בהן זרימת הקולחים תת-קרקעית קיימים שלושה הרכבי צומח הכוללים בריכות ללא צמחיה (איור 4, נספח 4), בריכות שתולות במין צומח יחיד (monoculture, איור 5, נספח 4) ובריכות שנשתלו במגוון צמחים (poly-culture, איור 6, נספח 4). הצמחים נשתלו בינואר 2005 בצפיפות של 2 שתילים למ"ר. בבריכות המפלס השלישי בהן זרימת הקולחים עילית קיים הרכב צומח יחיד הכולל מגוון צמחים (poly-culture, איור 7, נספח 4), כמפורט להלן. במהלך תפעול המערכת (4 שנים) חלו שינויים בהרכב ודומיננטיות הצמחים בבריכות, כמפורט להלן. בריכות בזרימה תת-קרקעית ומין צומח יחיד: עם ההקמה של מערכת המחקר נשתלו בבריכות 1-5, 1-6, 2-5 ו 2-6 (איור 6.3.1) צמחי סוף צר עלים (*Typha angustifolia*). הסוף לא התפתח היטב בבריכות אלו. בתום עונת הצימוח הראשונה קרסה אוכלוסיית הסוף בבריכות. הסוף הוצא מהבריכות ויבלית מצויה (*Cynodon dactylon*) שפלשה לאותן הבריכות התפתחה ותפסה את מקומו (איור 5, נספח 4).

בריכות בזרימה תת-קרקעית ומגוון צמחים: עם הקמה של מערכת המחקר נשתלו בבריכות 1-1, 1-2, 1-7, 2-1, 2-2 ו 2-7 גומה פפירוס (*Cyperus papyrus*), קאנת מים (*Canna sp*), אירוס ענף (*Iris pseudoacorus*), קנה ננסי (*Phragmites australis*) וסמר מחויץ (*Juncus ensifolius*). בבריכות אלו גומה פפירוס מהווה כיום את הצמח הדומיננטי (איור 6, נספח 4).

בריכות בזרימה עילית: בריכות אלו מייצגות את שלב הטיפול השלישי וכוללות את בריכות 1-1, 1-2, 1-3, 3-4, 3-5, 3-6 ו 3-7 (איור 6.3.1). הן נשתלו עם הקמת המערכת בפונטדריה איזמלנית (*Pontaderia lanceolata*), בוציץ סוככני (*Butomus umbellatus*), אירוס צר עלים (*Iris*

pseudacorus, חצצון (*Sagittaria graminea*) ואלף עלה (*Myriophyllum aquaticum*). לאחר שתי עונות צימוח (מערכת בשלה) ניכרה דומיננטיות של אלף אלה (כ- 50% משטח הבריכות), פונטדריה איזמלנית (כ- 35% משטח הבריכות) והשאר אירוס צר עלים (איור 7, ספח 4).

6.3.4 זמן שהייה הידראולי

זמן שהייה הידראולי (wetland detention time, τ) בבריכות עם זרימת מים על ותת-קרקעית אופקית הוערך על פי נפח החללים הזמין לזרימה של נוזל במצע האגן וספיקת הקולחים על פי המשוואה:

$$\tau = \frac{V_{active}}{Q} = \frac{\epsilon h A_{active}}{Q} \quad (\text{Kadlec and Wallace, 2008})$$

τ מייצג את זמן שהייה (ימים), Q ספיקה (מ"ק/ליום), V_{active} הוא נפח האגן המכיל מים בזרימה פעילה (נפח האגן מוכפל בנקבוביות, ביחידות מ"ק), A_{active} הוא חתך הזרימה הפעילה של האגן המכיל מים בזרימה פעילה (שטח חתך זרימה פעילה מוכפל בנקבוביות, ביחידות מ"ר), h הוא גובה המים בבריכה (מטר), ϵ הוא נקבוביות (porosity), על פי קביעה במעבדה סעיף 6.3.1. באגנים בזרימה עילית המים עוברים דרך צמחיה ושורשיה. לנקבוביות של מכלול הצמחיה אימצתי את הערך 0.75 על פי Lin et al., 2005. זמן שהייה המחושב הוא כ- 15.5 שעות בבריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית ו 19 שעות בבריכות בזרימת מים עילית.

בבריכות עם זרימת מים תת-קרקעית אנכית זמן שהייה ההידראולי נמדד בבריכה עם מגוון צומח. הבדיקה בוצעה באמצעות הזרמה של סמן פלואורסנטי (Rhodanim DW). ניסוי זה ביצעתי בשיתוף עם חוקר איטלקי שביצע מחקר באגנים הירוקים בשפד"ן (Giraldi et al., 2009). בניסוי זה זמן שהייה ההידראולי נבחן בשלושה מצבים, מצע רווי (עומד מים 68 ס"מ), מצע מנוקז חלקית (20 ס"מ של עומד מים, דפוס הפעלה נוכחי) ומצע מנוקז לחלוטין. במדידה הוזרמו מים בספיקה של 24 ליטר לדקה (פי 1.4 מזו שהתקיימה במערכת בתקופת המחקר). פרמטרים תפעוליים של הניסוי מוצגים בטבלה 6.3.1

טבלה 6.3.1 פרמטרים מרכזיים למדידת זמן שהייה הידראולי באמצעות Rhodamin WT בבריכה בזרימה תת-קרקעית אנכית (VF) (מתוך, Giraldi et al., 2009).

כמות סמן שהוזרקה (mg)	משך הזנה של הסמן (min)	ממוצע ריכוז סמן בכניסה ($\mu\text{g/l}$)	עומס הידראולי (l/min)	רוויה של המצע מנוקז לחלוטין
307	230	56	24	מנוקז חלקית
240	180	56	24	רווי
446	169	110	24	

זמן שהייה הנמדד היה 51 דקות עבור מצע בתנאים מנוקזים, 128 דקות עבור מצע מנוקז חלקית ו- 341 דקות עבור מצע רווי. על פי נתונים אלה ובהתחשב בכך שהספיקה בניסוי הייתה גבוהה כפי 1.4 מאשר בתנאי המחקר, זמן שהייה בבריכות בזרימה אנכית הוא מעל שעתיים.

6.3.5. משתנים לימנולוגיים ואיכות מים

מושגי משטר חמצן

בתחום הלימנולוגיה תנאים איירוביים (aerobic conditions) הם תנאי סביבה עשירים בחמצן; תנאים היפוקסיים (hypoxic condition) הם תנאי סביבה עניים בחמצן ותנאים אנאירוביים (anaerobic condition) או אנאוקסיים (anoxic condition) מייצגים סביבה ללא חמצן. בתחום הטיפול בשפכים מבחינים בין תנאים אנאוקסיים (anoxic conditions) המייצגים סביבה ללא חמצן אך בנוכחות תרכובות חנקן כניטריט או ניטראט (סביבה תומכת דניטריפיקציה) לבין תנאים אנאירוביים המייצגים היעדר חמצן והעדר תרכובות החנקן הנ"ל. בעבודה הנוכחית אומצו המושגים הלימנולוגיים.

לצורך בדיקה של איכות הקולחים נאספו דגימות מברז הממוקם במורד לפילטר סינון הקולחים ובמעלה מתקן בקרה של פיזור הקולחים לבריכות (איור 6.3.1). כמו כן נאספו דגימות ממיכלי האיזון, הממוקמים במוצא כל אחת מהבריכות (איור 6.3.1 ואיור 8, נספח 4). טרם איסוף הקולחים נמדדו משתנים לימנולוגיים הכוללים טמפרטורת מים, חמצן מומס ומוליכות חשמלית (Oxygen Conductivity Ceter, YSI, 85). בתום המדידות הלימנולוגיות נאספו קולחים לאנליזה של ערך הגבה, ריכוז חומר אורגני קל פירוק (BOD), מוצקים מרחפים (TSS) ונוטריאנטים (זרחן מומס, חנקן כללי, אמוניה וניטראט). מיכלי הדיגום נשמרו בחשיכה ובקירור ממועד האיסוף ועד ביצוע האנליזה במעבדה (עד שלוש שעות מאיסוף הדגימות). ריכוז חומר אורגני קל פירוק נמדד בשיטה של BOD_{5,20} (5210 5-day BOD test, APHA, 2005). ריכוז חמצן נקבע באמצעות אלקטרודה YSI, 5100. ריכוז מוצקים מרחפים נקבע על פי APHA (2540 D. Total Suspended Solids Dried at 103–105°C, APHA, 2005). ריכוז נוטריאנטים (אמוניה, ניטראט, חנקן כללי וזרחן מומס) נקבע בשיטה קולורимטרית באמצעות קיטים מסחריים (Hach Lange) ופוטומטר (Hach Lange, LASA) (100).

אנליזה סטטיסטית

ריכוז המזהמים: הבדל בין ריכוז מזהמים בקולחים הנכנסים לאגנים הירוקים בשנת התפעול הראשונה והשלישית נקבע במבחן t-test. הבדל בין ריכוז מזהמים בקולחים הנכנסים למערכת לבין הקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון עם וללא צמחים נקבע במבחן oneway ANOVA. מובהקות של כל טיפול בבריכות הנ"ל (בריכות ללא צמחים, עם צמחיה עשבונית או מגוון צמחים) נקבעו במבחן פוסטריורי מסוג Dunnett

(משום התאמה של המבחן הפוסטריורי הנ"ל לבחינה של הבדלים בין קבוצת ביקורת אחת למספר קבוצות טיפול, Winer et al., 1991). הבדלים בריכוז המזהמים בקולחים היוצאים מבריכות המפלט הראשון הנבדלות בהרכב הצומח (עם צמחיה עשבונית, מגוון צמחים ובריכות ביקורת ללא צמחיה) והבדלים בין מצבי בשלות המערכת (שנת תפעול ראשונה ושלישית) נבחנו ב twoway ANOVA ומבחנים פוסטריוריים מסוג Tukey.

הבדלים בריכוז המזהמים בקולחים היוצאים בריכות המפלט השני הנבדלות בהרכב צומח ודפוס הזרימה (אופקי או אנכי) בשתי תקופות הדיגום נקבעו במבחן מסוג threeway ANOVA ומבחנים פוסטריוריים מסוג Tukey. מבחן דומה שימש לבחינה של הבדלים בין ריכוז המזהמים בקולחים היוצאים מבריכות הטיפול במפלט הראשון והשני והשפעה של הרכב הצומח ודפוס הזרימה בשני המפלסים (בשניהם, זרימת קולחים תת-קרקעית).

הבדלים בריכוז המזהמים בקולחים היוצאים מבריכות המפלט השני והשלישי, השפעה של מצבי בשלות המערכת, דפוס הזרימה והרכב הצומח נקבע במבחן fourway ANOVA ומבחנים פוסטריוריים מסוג Tukey.

יעילות הרחקה: יעילות הרחקה של מזהמים היא ההפרש שבין ריכוז המזהם בקולחים היוצאים מהבריכה לריכוזו בקולחים הנכנסים, מחולק לריכוז המזהם בקולחים הנכנסים. הבחינה הסטטיסטית בוצעה על היחס בין ריכוז המזהם בקולחים היוצאים מהבריכה לבין הממוצע הגיאומטרי (בתקופת הדיגום; אביב-קיץ בכל אחת מהשנים) של ריכוז המזהם בקולחים הנכנסים לבריכה. הבדלים ביעילות הרחקה המזהמים הבריכות במפלסים השונים, תרומה של הרכבי צומח ודפוס זרימה במצבי הבשלות השונים נקבע במבחנים שתוארו לעיל. הבדלים ביעילות הרחקה המזהמים בבריכות אלו נבחנו רק במקרים בהם היה ריכוז המזהמים בקולחים הנכנסים לבריכות בכל מפלס דומה.

בנתוני ריכוז שלא ענו על דרישות ניתוח פרמטרי (כהתפלגות נורמאלית של הנתונים ושוויון שוניות) בוצעה טרנספורמציה של log או Ln (לאמוניה, חומר אורגאני, כלל מוצקים מרחפים, ניטראט, חנקן כללי, רוויה בחמצן ומוליכות חשמלית); או טרנספורמציה שורש (לזרחן מומס). בנתוני יעילות בוצעה טרנספורמציה של log או Ln (לאמוניה, חומר אורגאני, כלל מוצקים מרחפים, ניטראט וחנקן כללי).

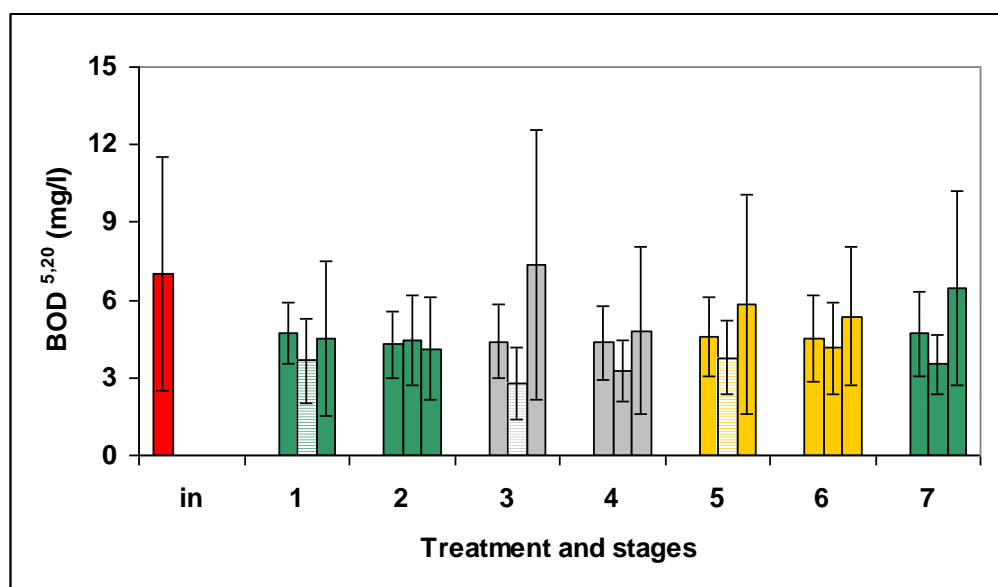
במחקר הנוכחי לא השתמשתי במודלים סטטיסטיים מורכבים יותר לניתוח התוצאות של תפקוד האגנים הירוקים בהרחקה של מזהמים קונבנציונאליים. מודלים מורכבים יכולים להצביע על אינטראקציות בין טיפולים שונים (מצב בשלות מערכת, סדר הטיפול, נוכחות והרכב צומח ודפוס הזרימה). נמנעתי מהמודלים הנ"ל משום שבמרבית המקרים התפלגות הנתונים לא הייתה נורמאלית. כמו כן המערכת הייתה מורכבת (דפוסי טיפול שונים) וגודל המדגם בתקופות דיגום שונות היה שונה. האנליזה הסטטיסטית שבוצעה אפשרה זיהוי של המגמות המרכזיות הקשורות לטיפולים השונים בבריכות ובמצבי ההבשלה השונים.

6.4 תוצאות

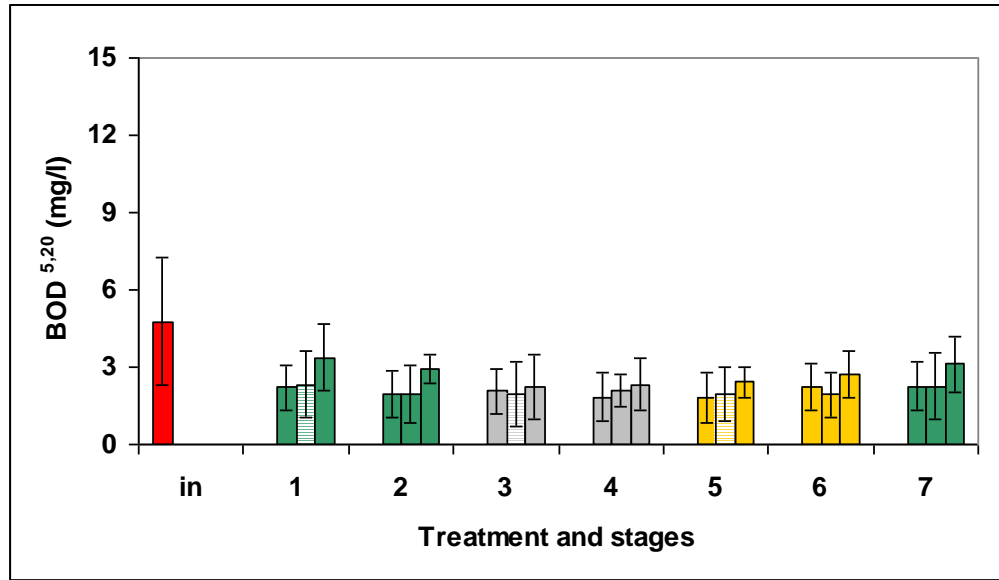
להלן הממצאים של ניטור מזהמי מים קונבנציונאליים במערכת המחקר בשפד"ן. אפיון לימנולוגי (רוויה בחמצן, מוליכות חשמלית וערך הגבה) של המערכת מוצג בנספח 7. בפרק הנ"ל מוצג השינוי בריכוז המזהמים ושיעור הרחקתם (יעילות הרחקה) בבריכות במפלסים השונים בהם טיפולים שונים, בשנה הראשונה להפעלה ולאחר הבשלה של שנתיים (שנת תפעול שלישית). במפלס הראשון הטיפולים כללו בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית והרכב צומח הכולל מגוון צמחיה בהם שולט גומא פפירוס, צמחיה עשבונית וביקורת ללא צמחיה. במפלס השני הטיפולים כללו בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית או אופקית, והרכב צמחיה כנ"ל. במפלס השלישי הטיפולים כללו בריכות בזרימה עילית עם מגוון צמחים צפים ומזדקרים. הבדיקות מתייחסות לבחינה של השפעת הצמחיה ודגם הזרימה על יעילות ההרחקה של המזהמים ועל ריכוזם בשנת התפעול הראשונה והשלישית. כל הממצאים מתייחסים לתקופת האביב והקיץ. משמעות הממצאים בהקשר של עומס מזהמים וקצב הרחקתם מוצגים בפרק הדיון (6.5).

חומר אורגאני קל פירוק (BOD)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ריכוז דומה של חומר אורגאני קל פירוק בקולחים הנכנסים לבריכות (t-test, $p=0.17$; איורים 6.4.1 ו 6.4.2).



איור 6.4.1: ממוצע ($\pm sd$) ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=9$)



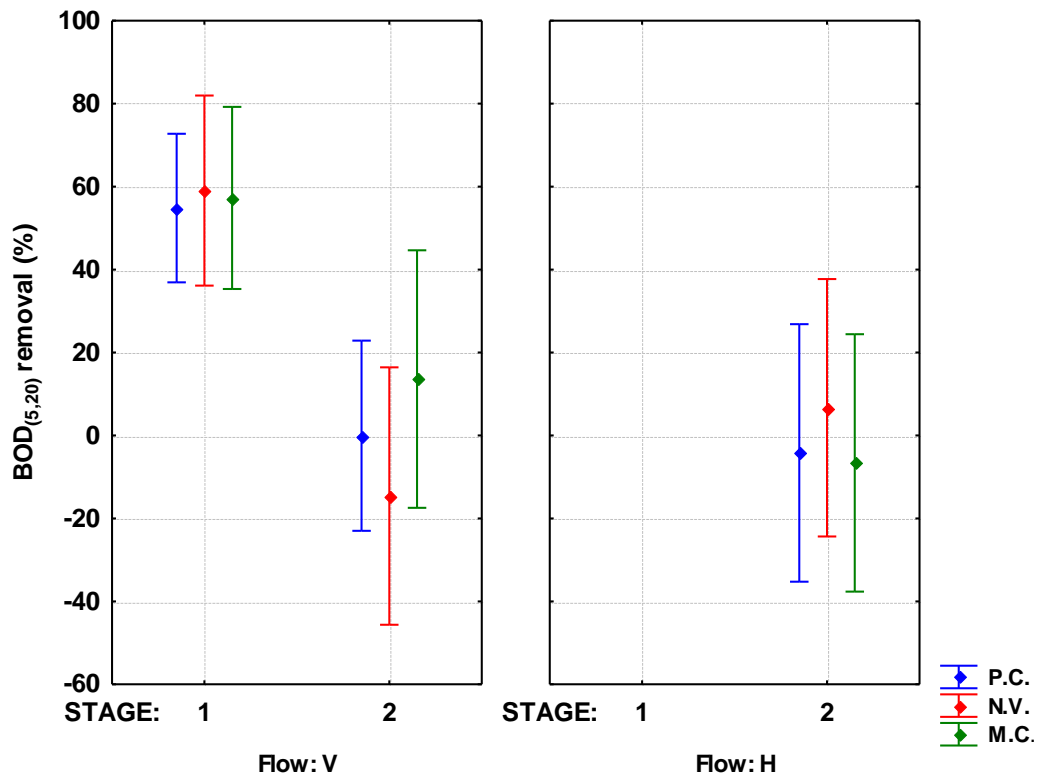
איור 6.4.2: ממוצע (\pm sd) ריכוז חומר אורגאני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחייה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=6$)

בשני מצבי ההבשלה היה ריכוז החומר האורגאני בקולחים היוצאים מהבריכות, עם וללא צמחיה, נמוך בהשוואה לזה שבקולחים הנכנסים אליהן ($p<0.03$, Dunnett ו $p<0.01$, בהתאמה; איורים 6.4.1 ו 6.4.2). יעילות הרחקה דומה ($p=0.71$, twoway ANOVA) של חומר אורגאני קל פירוק התקבלה בבריכות ללא צומח, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים (למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי ההרחקה $59\% \pm 19$, $57\% \pm 19$ ו $55\% \pm 18$, בהתאמה; איור 6.4.3). ריכוז החומר האורגאני דומה התקבל בקולחים היוצאים מהבריכות עם וללא צמחים ($p=0.71$, twoway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית היה ממוצע ריכוז החומר האורגאני בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון נמוך מ- 2.5 מ"ג/ליטר בכל הרכבי הצומח. בשנת התפעול השלישית יעילות הרחקה של החומר האורגאני הייתה גבוהה כפי 2 מזו שבשנת התפעול הראשונה ($p<0.01$, twoway ANOVA).

מפלס שני: ריכוז החומר האורגאני בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). יעילות הרחקה דומה של חומר אורגאני קל פירוק התקבלה בבריכות ללא צמחיה, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים ($p=0.68$, threeway ANOVA) וריכוז החומר האורגאני קל הפירוק במוצאן היה דומה ($p=0.41$, threeway ANOVA, איורים 6.4.1 ו 6.4.2). כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $-4\% \pm 48$, $3\% \pm 47$ ו $-2\% \pm 54$,

בהתאמה (איור 6.4.3), כלומר לא קיימת הרחקה. בדפוס זרימה אופקי ואנכי יעילות ההרחקה של חומר אורגני קל פירוק הייתה דומה ($p=0.31$, threeway ANOVA). למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $1.4\% \pm 55$ ו $-0.3\% \pm 45$, בהתאמה (איור 6.4.3). יעילות הרחקה בשנת התפעול השלישית (בין 4- ל 3.5%) הייתה נמוכה בהשוואה לזו בשנת התפעול הראשונה (בין 13 ל- 31%; $p=0.05$, threeway ANOVA). בשתי התקופות יעילות ההרחקה בבריכות המפלס השני הייתה נמוכה מזו של בריכות המפלס הראשון ($p<0.01$, threeway ANOVA).

מפלס שלישי: בבריכות המפלס השלישי הרכב הצומח ודפוס הזרימה זהים. בכל הבריכות יעילות ההרחקה של חומר אורגני קל פירוק הייתה שלילית, כלומר קיימת תרומה נמוכה יחסית אך משמעותית של חומר אורגני על ידי הצמחייה (הריכוז עלה כפי 1.1 – 1.4; $P<0.01$, fourway ANOVA; איורים 6.4.1 ו 6.4.2).

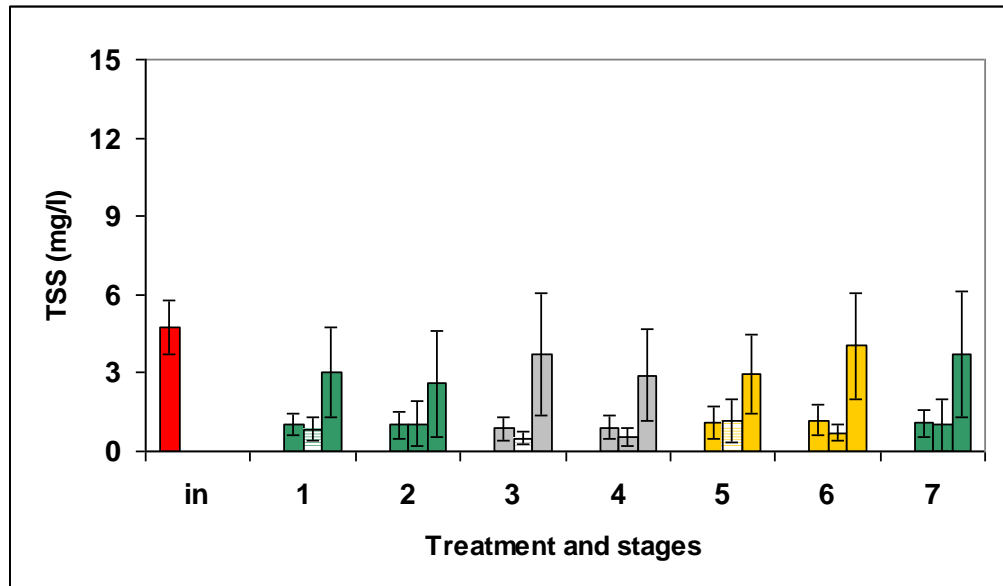


איור 6.4.3: ממוצע (\pm sd) הרחקה של חומר אורגני קל פירוק (BOD) בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים (כחול, p.c.), עם צמחיה עשבונית (ירוק, m.c.) ובבריכות הביקורת ללא צמחים (אדום, n.v.), במפלס הטיפול הראשון והשני (Stage 1 ו Stage 2, בהתאמה) ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי (Flow H ו Flow V, בהתאמה)

מוצקים מרחפים (TSS)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ריכוז דומה של מוצקים מרחפים בקולחים הנכנסים לבריכות ($p=0.92$, t-test; איורים 6.4.4 ו 6.4.5). בשני מצבי ההבשלה היה ריכוז המוצקים

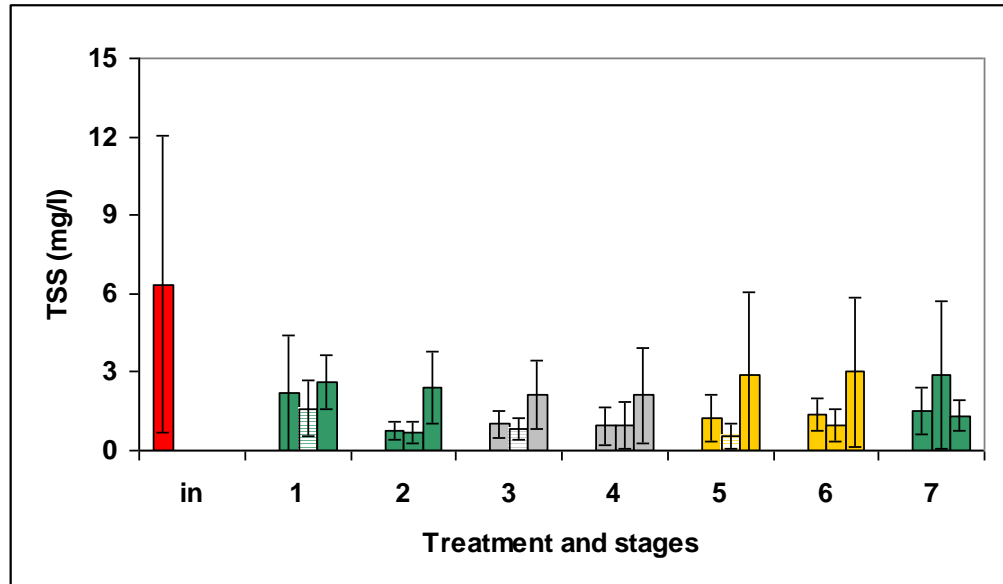
המרחפים בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון, עם וללא צמחיה, נמוך מאשר בקולחים הנכנסים ($p < 0.01$, Dunnett), איורים 6.4.4 ו 6.4.5).



איור 6.4.4: ממוצע ($\pm sd$) ריכוז מוצקים מרחפים (TSS) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=15$)

יעילות הרחקה דומה של מוצקים מרחפים התקבלה בבריכות עם מגוון צמחים, צמחיה עשבונית ובריכות ללא צמחים ($p=0.09$, twoway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה של מוצקים מרחפים $76\% \pm 23$, $79\% \pm 11$ ו $85\% \pm 10$, בהתאמה (איור 6.4.6). ריכוז מוצקים מרחפים דומה התקבל בקולחים היוצאים מהבריכות עם וללא צמחים ($p=0.14$, twoway ANOVA). כך למשל ממוצע ריכוז המוצקים המרחפים בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני בשנת התפעול השלישית היה שווה או נמוך מ- 1.5 מ"ג/ליטר, עבור כל הרכבי הצומח. יעילות הרחקה דומה של מוצקים מרחפים התקבלה בשני מצבי ההבשלה ($p=0.24$, twoway ANOVA). מפלס שני: ריכוז המוצקים המרחפים בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). יעילות הרחקה דומה של מוצקים מרחפים התקבלה בבריכות ללא צמחיה, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים ($p=0.08$, threeway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית הייתה יעילות ההרחקה של מוצקים מרחפים $-0.2\% \pm 1.9$, $0.5\% \pm 0.5$ ו $0.1\% \pm 0.7$, בהתאמה, כלומר לא הייתה הרחקה. בדפוס זרימה אופקי ואנכי יעילות ההרחקה של מוצקים מרחפים הייתה דומה ($p=0.05$, threeway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית

הייתה יעילות ההרחקה של מוצקים מרחפים $0.5\% \pm 0.7$ ו $-0.2\% \pm 1.6$, בהתאמה. בשני מצבי ההבשלה יעילות ההרחקה בבריכות המפלס השני הייתה נמוכה מזו של בריכות המפלס הראשון ($p < 0.01$, threeway ANOVA).



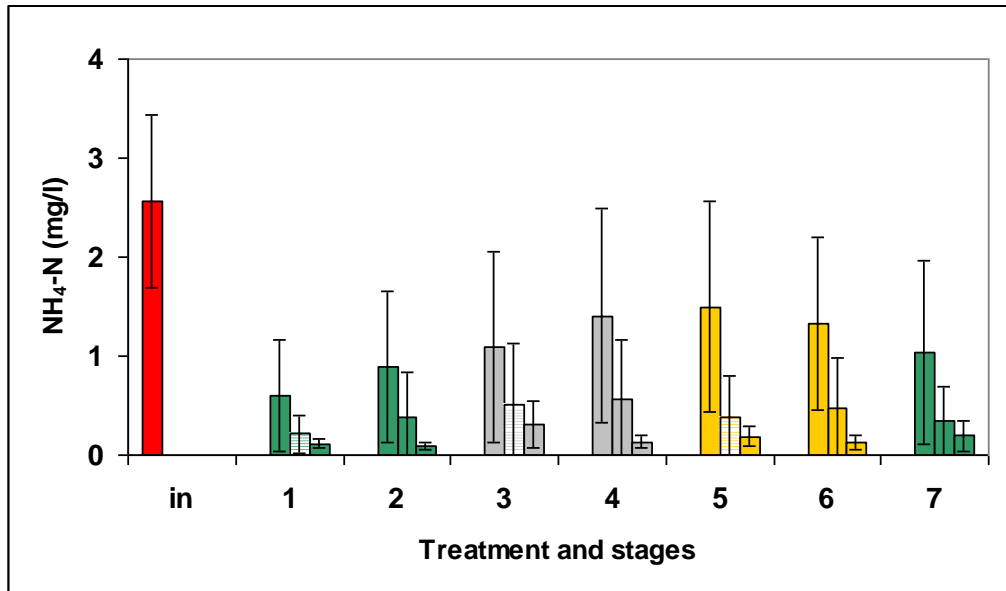
איור 6.4.5: ממוצע (\pm sd) ריכוז מוצקים מרחפים (TSS) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העבודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=6$)

מפלס שלישי: בכל הבריכות יעילות ההרחקה הייתה שלילית, כלומר הייתה תרומה של מוצקים מרחפים על ידי הצמחיה ($p < 0.01$, fourway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית עלה ריכוז המוצקים המרחפים בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי פי 1.2-3.8 (איורים 6.4.4 ו 6.4.5). עם זאת ריכוז המוצקים בקולחים היוצאים מהבריכות היה עדיין נמוך יחסית (הממוצע בשנת התפעול השלישית היה 2.3 ± 1.9 מ"ג/ליטר).

אמוניה ($\text{NH}_4\text{-N}$)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ריכוז דומה של אמוניה בקולחים הנכנסים לבריכות ($p=0.08$, t-test; איורים 6.4.6 ו 6.4.7). בשנת התפעול הראשונה ריכוז האמוניה בקולחים היוצאים מבריכות ללא צמחיה ובריכות עם צמחיה מגוונת היה נמוך פי 2.1 ו 3, בהתאמה, מזה שבקולחים הנכנסים ($p=0.01$, Dunnett ו $p < 0.01$, בהתאמה; איור 6.4.6). למרות שגם בקולחים היוצאים מבריכות עם צמחיה עשבונית היה הריכוז הממוצע של אמוניה נמוך בהשוואה לקולחים הנכנסים (פי 1.8; איור 6.4.6) השינוי לא היה משמעותי ($p=0.07$, Dunnett). בשנת התפעול השלישית

ריכוז אמוניה בקולחים היוצאים מהבריכות בכל הרכבי הצומח היה נמוך מאשר בקולחים הנכנסים אליהם ($p < 0.01$, Dunnett) עבור כל הרכבי הצומח; איורים 6.4.6 ו 6.4.7).

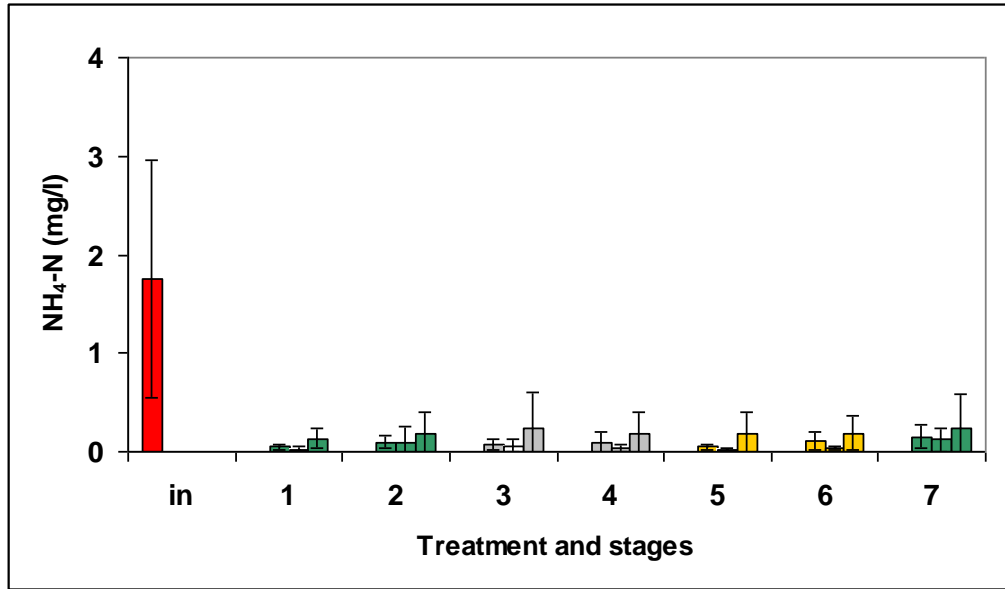


איור 6.4.6: ממוצע ($\pm SD$) ריכוז אמוניה (NH_4-N) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=9$)

יעילות הרחקה גבוהה ודומה של אמוניה ($p=0.44$, twoway ANOVA) התקבלה בבריכות ללא צומח, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים. כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $96\% \pm 4$, $96\% \pm 5$ ו $94\% \pm 5$, בהתאמה (איור 6.4.8). ריכוז אמוניה בקולחים היוצאים מהבריכות היה נמוך ודומה. למשל, ממוצע ריכוז האמוניה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון בשנת התפעול השלישית היה בין 0.08 ל 0.1 מ"ג/ליטר בכל הרכבי הצומח. בשנת התפעול השלישית יעילות ההרחקה של אמוניה הייתה גבוהה פי 1.2 - 1.5 מזו שבשנת התפעול הראשונה ($p < 0.01$, twoway ANOVA).

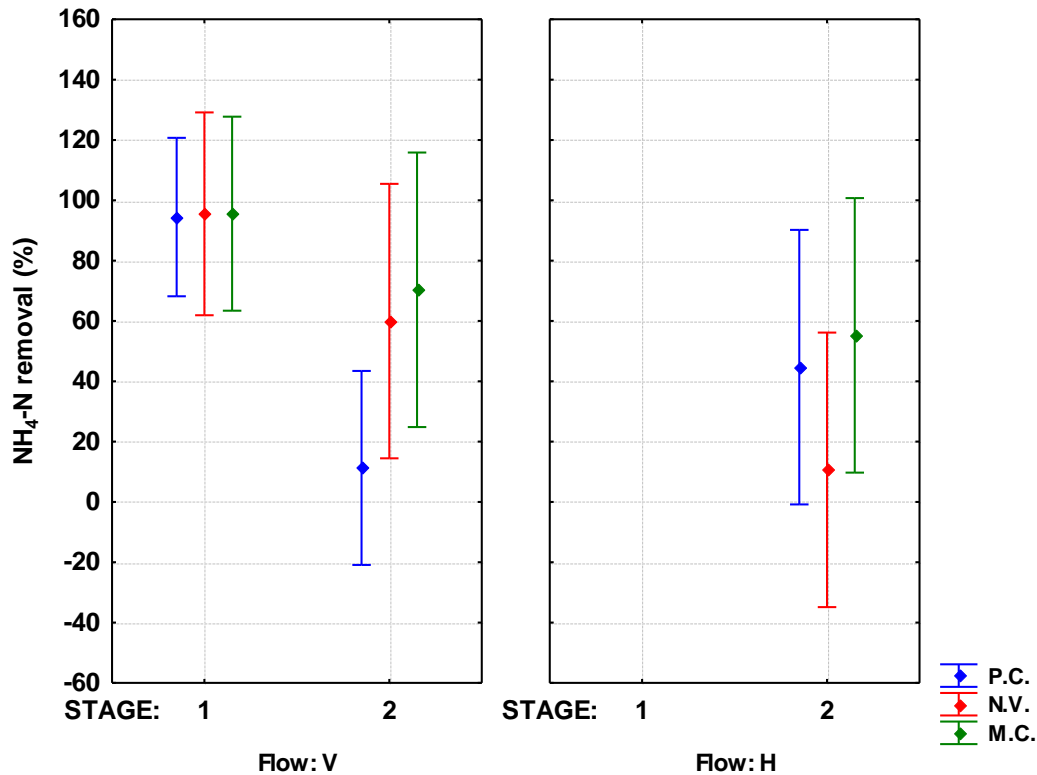
מפלס שני: ריכוז האמוניה בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). בשני מצבי ההבשלה הייתה יעילות הרחקה של אמוניה דומה ובעלת שונות גבוהה בבריכות ללא צמחיה, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים ($p=0.54$, threeway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $63\% \pm 26$ ו $24\% \pm 109$, בהתאמה (איור 6.4.8). ריכוז אמוניה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני היה נמוך ודומה ($p=0.91$, threeway ANOVA). כך למשל, בשנת התפעול השלישית היה

ממוצע ריכוז האמוניה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני ≤ 0.08 מ"ג/ליטר (איורים 6.4.6 ו 6.4.7).



איור 6.4.7: ממוצע (\pm sd) ריכוז אמוניה ($\text{NH}_4\text{-N}$) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=6$)

בדפוס זרימה אופקי ואנכי יעילות ההרחקה של אמוניה הייתה דומה ($p=0.24$, threeway ANOVA). לדוגמה בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $37\% \pm 58$ ו $38\% \pm 93$, בהתאמה (איור 6.4.8). בשנת התפעול השלישית הייתה יעילות הרחקה של אמוניה נמוכה עד פי 3 מאשר בשנת התפעול הראשונה ($p < 0.05$, threeway ANOVA). יעילות הרחקה בבריכות המפלס השני בשנת התפעול השלישית הייתה נמוכה (עד כפי 4) מאשר בבריכות המפלס הראשון בעוד שבשנת התפעול הראשונה הייתה היעילות דומה. כלומר קיימת אינטראקציה ($p < 0.001$, threeway ANOVA) בין יעילות בריכות הטיפול במפלס הראשון והשני לבין מצבי ההבשלה. מפלס שלישי: בשנת התפעול הראשונה ריכוז אמוניה הממוצע בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי היה נמוך מאשר בקולחים הנכנסים אליהם (כפי 2.5). לעומת זאת בשנת התפעול השלישית הייתה עליה בריכוז האמוניה בקולחים היוצאים (כפי 3.5; איורים 6.4.6 ו 6.4.7). בהתאם נמדדה איטראקציה בריכוז האמוניה בין בשלות המערכת ושלב הטיפול ($p < 0.001$, fourway ANOVA). עם זאת, בשני מצבי ההבשלה היה ריכוז ממוצע דומה של האמוניה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי (0.2 ± 0.1 ו 0.2 ± 0.2 מ"ג/ליטר, בהתאמה).

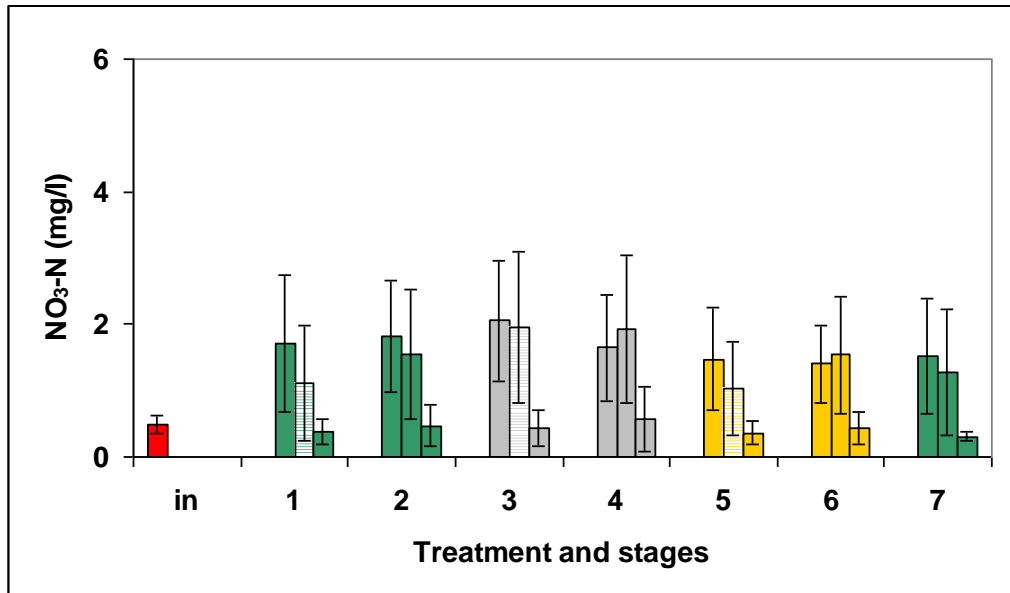


איור 6.4.8: ממוצע (\pm sd) הרחקה של אמוניה בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים (כחול, p.c.), עם צמחיה עשבונית (ירוק, m.c.) ובבריכות הביקורת ללא צמחים (אדום, n.v.), במפלס הטיפול הראשון והשני (Stage 1 ו Stage 2, בהתאמה) ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי (Flow H ו Flow V, בהתאמה)

ניטראט (NO₃-N)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה היה ריכוז הניטראט נמוך כפי 1.6 מאשר בשנת התפעול השלישית ($p < 0.04$, t-test; איורים 6.4.9 ו 6.4.10). בשנת התפעול הראשונה היה ריכוז הניטראט בקולחים היוצאים מהבריכות עם מגוון צמחים, צמחיה עשבונית וללא צמחים גבוה פי 2.9, 3.4 ו 3.7, בהתאמה, מזה של הקולחים הנכנסים (Dunnett, $p < 0.01$, עבור כל הרכבי הצומח; איור 6.4.9), כלומר עדות לניטריפיקציה. בשנת התפעול השלישית היה ריכוז הניטראט בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון גבוה מאשר בקולחים הנכנסים רק בבריכות ללא צמחיה (פי 3.4; $p = 0.02$, Dunnett; איור 6.4.10). זאת ככל הנראה משום ריכוז גבוה יותר של ניטראט בקולחים הנכנסים ושונות גבוהה בריכוז הניטראט בקולחים היוצאים מבריכות עם צמחיה (איור 6.4.10). בשני מצבי ההבשלה התקבלה יעילות הרחקה שלילית (תרומה) גבוהה ודומה של ניטראט ($p = 0.23$, twoway ANOVA) בבריכות ללא צומח, בריכות עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים. כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות ההרחקה $-235\% \pm 195$, $-137\% \pm 158$ ו $-178\% \pm 188$, בהתאמה (איור

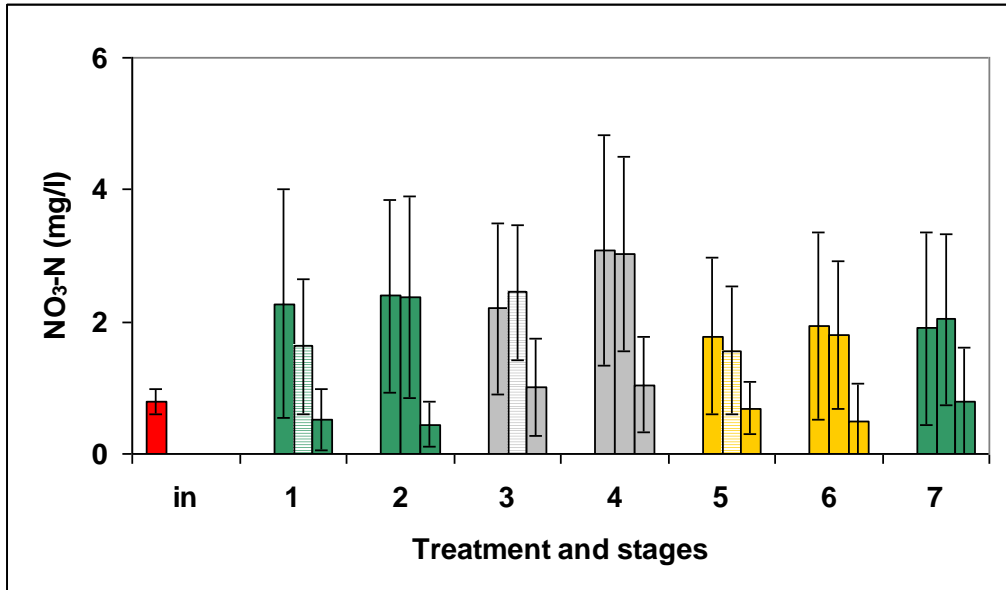
6.4.11) וריכוז הניטראט בקולחים היוצאים מהבריכות היה דומה ($p=0.23$, twoway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית היה ממוצע ריכוז הניטראט בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון בין 2.4 - 3.4 מ"ג/ליטר, בכל הרכבי הצומח.



איור 6.4.9: ממוצע (\pm sd) ריכוז ניטראט ($\text{NO}_3\text{-N}$) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=9$)

מפלס שני: ריכוז הניטראט בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). יעילות הרחקה של ניטראט בבריכות המפלס השני הייתה נמוכה בכל הרכבי הצומח. כך למשל בשנת התפעול השלישית היו ערכי יעילות הרחקה של ניטראט $46\pm 5\%$, $53\pm 10\%$ ו $58\pm 7\%$, בבריכות ללא צמחיה, עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים, בהתאמה. בבריכות בדפוס זרימה אופקי הייתה יעילות הרחקה של ניטראט נמוכה יחסית ($49\pm 10\%$) אך גבוהה כפי 10 מאשר בבריכות בדפוס זרימה אנכי ($p=0.048$, threeway ANOVA; $56\pm 1\%$). בשנת התפעול הראשונה יעילות הרחקה של ניטראט בבריכות עם וללא צמחים היה דומה לזו של השנה השלישית ($p=0.83$, threeway ANOVA).

מפלס שלישי: בכל בריכות הטיפול במפלס השלישי התקבלה יעילות הרחקה חיובית גבוהה של ניטראט. כך למשל בשנת התפעול השלישית היה טווח יעילות ההרחקה בכל הבריכות בין 56 ל- 81% (איורים 6.4.9 ו 6.4.10) וריכוז הניטראט הממוצע בקולחים היוצאים מהבריכות היה בין 0.4-1 מ"ג/ליטר. השיעור המצטבר של ההרחקה של ניטראט בשלושת הטיפולים בשנת התפעול השלישית נע בין 36 ל- 42%.



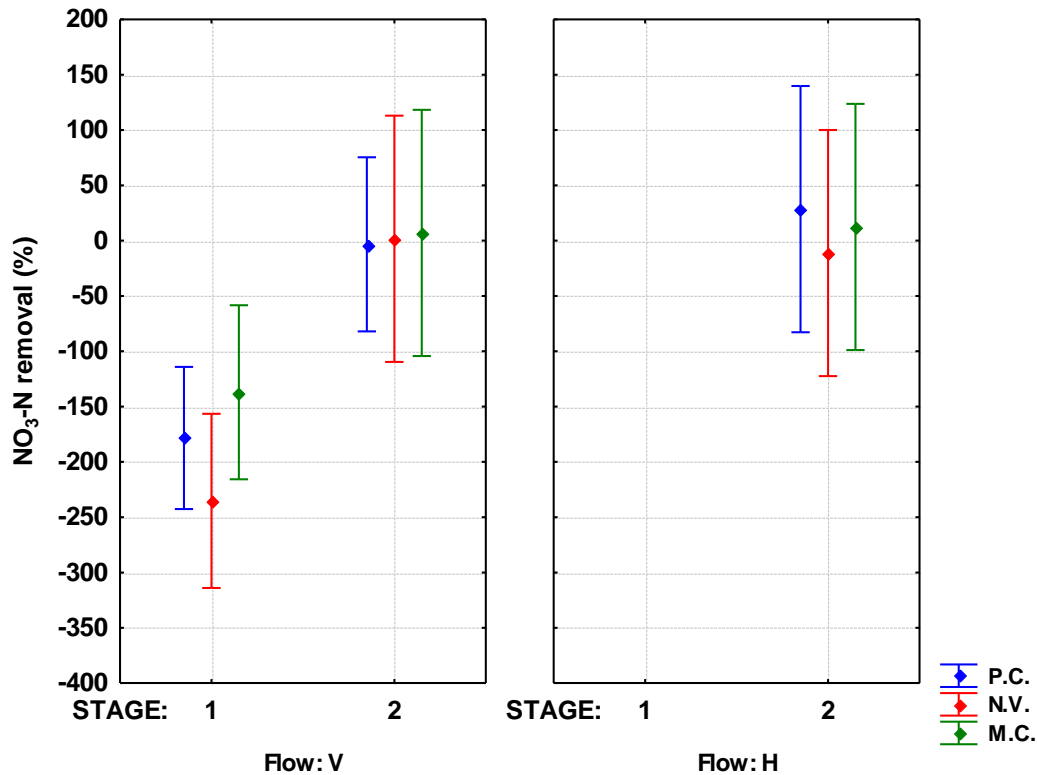
איור 6.4.10: ממוצע (±sd) ריכוז ניטראט (NO₃-N) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. (n=6)

חנקן כללי (TN)

החנקן הכללי משקף את צורוני החנקן האנאורגאניים (בעיקר אמוניה, ניטראט וניטריט) והאורגאניים.

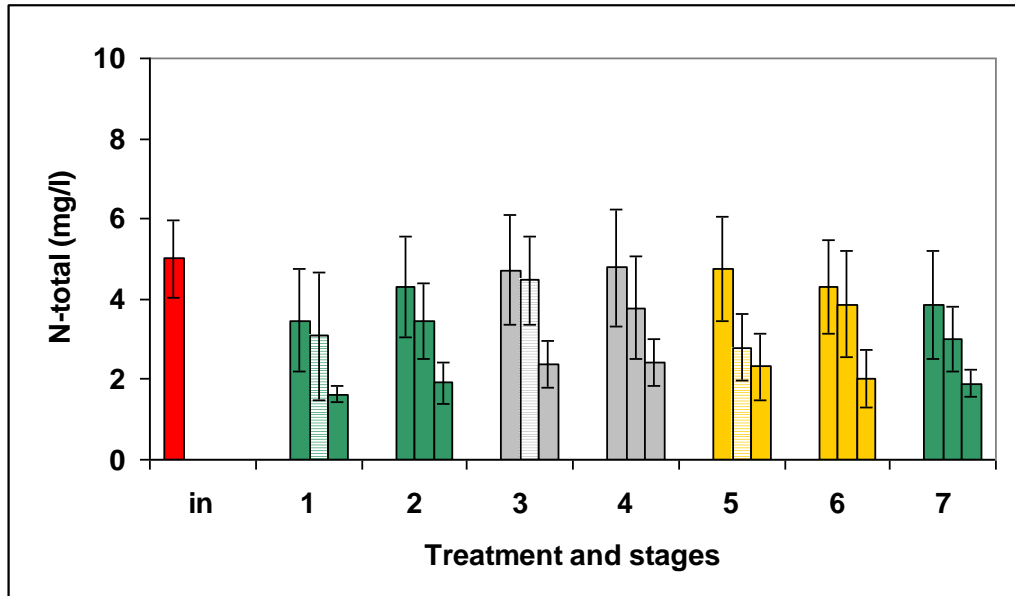
מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ריכוז דומה של חנקן כללי בקולחים הנכנסים לבריכות (6.4.12 ו 6.4.13). בשנת התפעול הראשונה היה ריכוז החנקן הכללי בקולחים היוצאים מבריכות עם מגוון צמחים נמוך ב- 22% מאשר בקולחים הנכנסים (p=0.03, Dunnett). בבריכות עם צמחיה עשבונית או ללא צמחיה לא היה הבדל בריכוז החנקן הכללי בקולחים הנכנסים והיוצאים (Dunnett, p=0.57 ו p=0.81, בהתאמה; איור 6.4.12). בשנת התפעול השלישית היה ריכוז החנקן הכללי בקולחים היוצאים מהבריכות בכל הרכבי הצומח דומה לריכוז בקולחים הנכנסים (oneway ANOVA, p=0.89; איור 6.4.13). יעילות הרחקה נמוכה ודומה (p=0.38, twoway ANOVA) של חנקן כללי ובעלת שונות גבוהה התקבלה בבריכות ללא צומח, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים. כך למשל בשנת התפעול השלישית יעילות ההרחקה הייתה שלילית (66%±14, 67%±12 ו 53%±1, בהתאמה; איור 6.4.14). שיעור ההרחקה של חנקן כללי בשנת התפעול השלישית היה דומה לזה שבשנת התפעול הראשונה (p=0.62, twoway ANOVA). ריכוז החנקן הכללי בקולחים היוצאים מהבריכות עם וללא צמחים היה דומה (p=0.39, twoway ANOVA).

(ANOVA). כך למשל בכל הרכבי הצומח נע ממוצע ריכוז החנקן הכללי בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון בשנת התפעול השלישית בין 4.4-4.9 מ"ג/ליטר (איור 6.4.13).

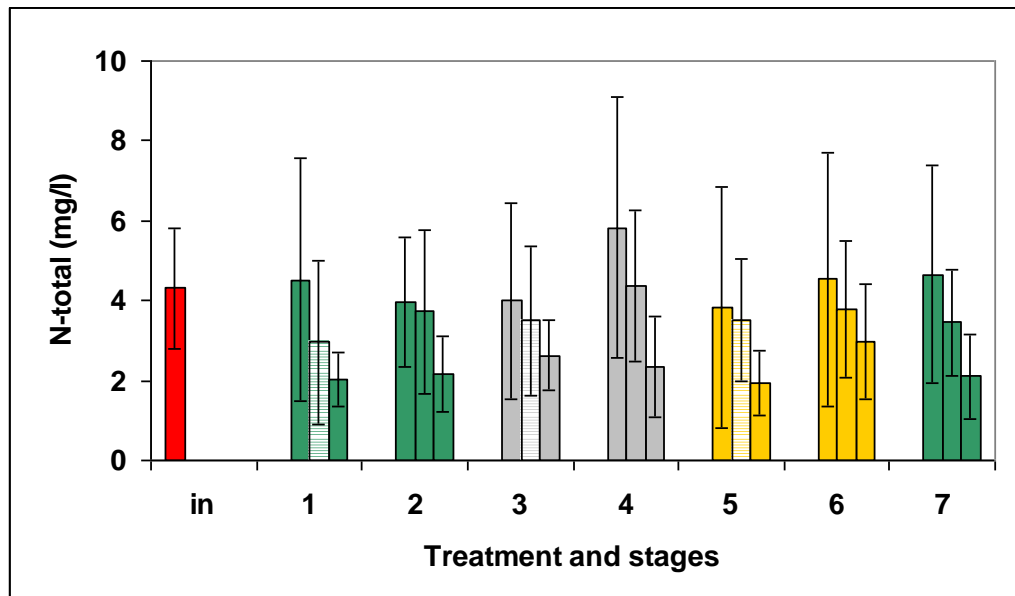


איור 6.4.11: ממוצע (\pm sd) הרחקה של ניטראט בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים (כחול, p.c.), עם צמחיה עשבונית (ירוק, m.c.), ובבריכות הביקורת ללא צמחים (אדום, n.v.), במפלס הטיפול הראשון והשני (Stage 1 ו Stage 2, בהתאמה) ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי (Flow H ו Flow V, בהתאמה)

מפלס שני: ריכוז חנקן כללי בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). יעילות הרחקה דומה של חנקן כללי התקבלה בבריכות ללא צמחיה, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים ($p=0.66$, threeway ANOVA) וריכוז החנקן הכללי במוצאן היה דומה ($p=0.17$, threeway ANOVA, איורים 6.4.12 ו 6.4.13). כך למשל, יעילות ההרחקה בבריכות הנ"ל בשנת התפעול השלישית הייתה $19\% \pm 38$, $17\% \pm 36$ ו $22\% \pm 41$, בהתאמה (איור 6.4.14). בדפוס זרימה אופקי ואנכי יעילות ההרחקה של חנקן כללי הייתה דומה ($p=0.61$, threeway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית הייתה יעילות ההרחקה $18\% \pm 42$ ו $19\% \pm 36$, בהתאמה (איור 6.4.14). יעילות הרחקה של חנקן כללי הייתה דומה בשני מצבי ההבשלה ($p=0.50$, threeway ANOVA).

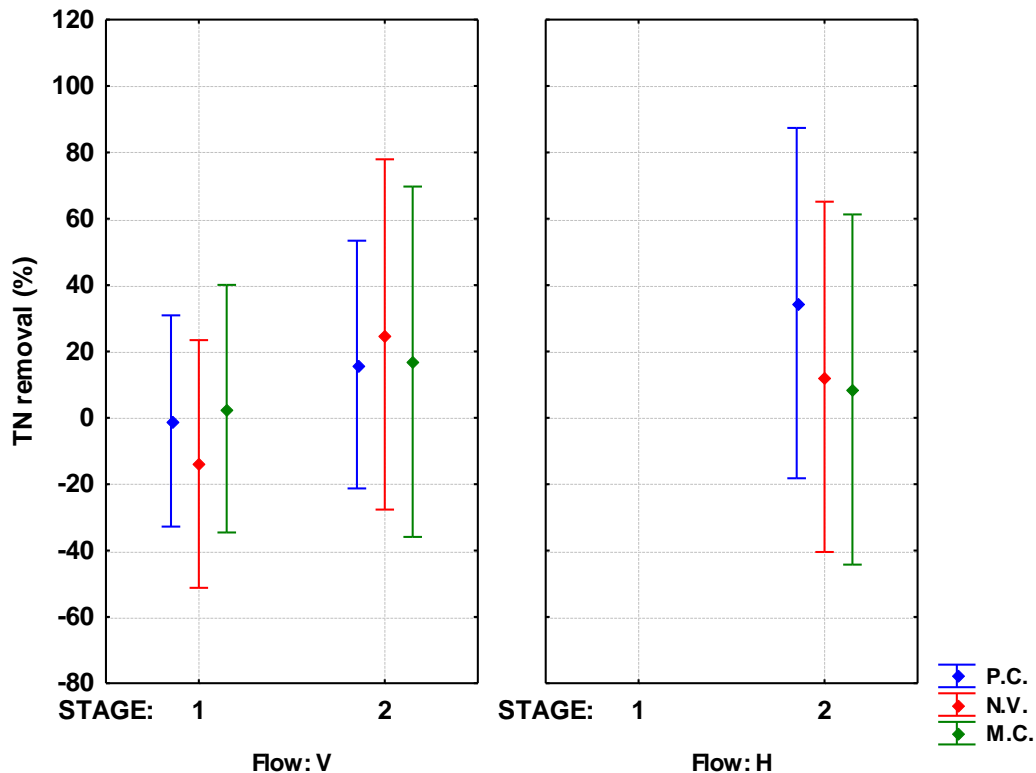


איור 6.4.12: ממוצע ($\pm sd$) ריכוז חנקן כללי (TN) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. (n=9)



איור 6.4.13: ממוצע ($\pm sd$) ריכוז חנקן כללי (TN) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. (n=6)

מפלס שלישי: בבריכות המפלס השלישי הרכב הצומח ודפוס הזרימה זהים. בכל הבריכות יעילות ההרחקה הייתה גבוהה בהשוואה לבריכות המפלס השני ($p < 0.01$, fourway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית נעה יעילות הרחקה בבריכות המפלס השלישי בין 28 ל-38% (איורים 6.4.12 ו 6.4.13). ריכוז החנקן הכללי במוצא הבריכות היה נמוך פי 2.0-2.3 בהשוואה לריכוז בקולחים השניוניים הנכנסים למערכת במפלס הראשון (איורים 6.4.12 ו 6.4.13). השיעור המצטבר של ההרחקה של חנקן כללי בשלושת הטיפולים בשנת התפעול הראשונה והשלישית נע בין 51 ל-67% ובין 27 ל-53%, בהתאמה.

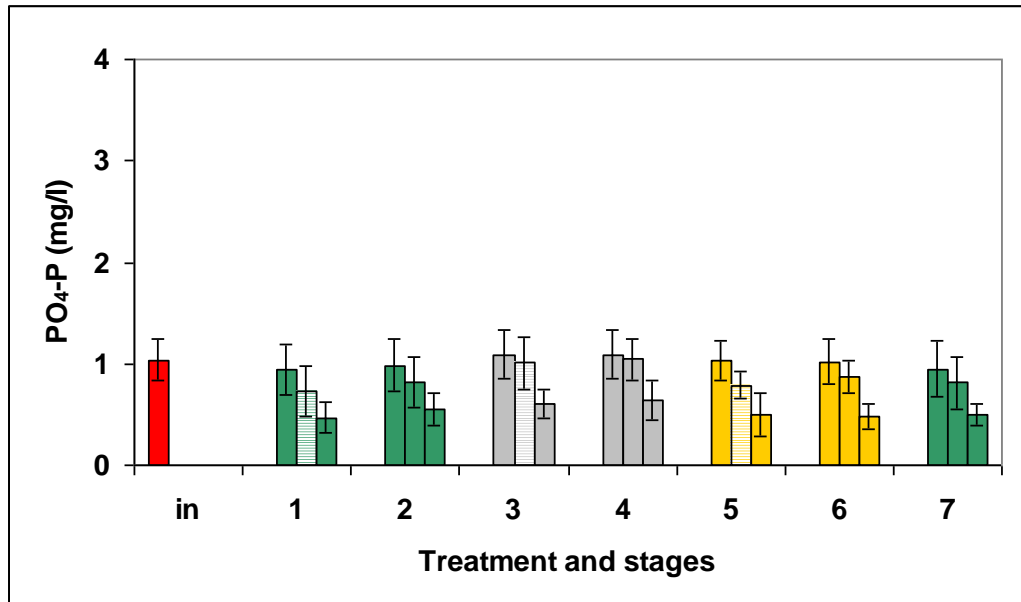


איור 6.4.14: ממוצע (\pm sd) הרחקה של חנקן כללי בשנת התפעול השלישית בבריכות עם מגוון צמחים (כחול, p.c.), עם צמחיה עשבונית (ירוק, m.c.) ובבריכות הביקורת ללא צמחים (אדום, n.v.), במפלס הטיפול הראשון והשני (Stage 1 ו Stage 2, בהתאמה) ובדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי ואופקי (Flow H ו Flow V, בהתאמה)

זרחן מומס (PO_4-P)

מפלס ראשון: בשנת התפעול השלישית היה ריכוז הזרחן המומס בקולחים הנכנסים גבוה פי 1.5 מאשר בשנת התפעול הראשונה ($P < 0.01$, t-test; איורים 6.4.15 ו 6.4.16). בשני מצבי ההבשלה היה ריכוז הזרחן המומס בקולחים היוצאים מהבריכות עם וללא צמחים דומה לזה שבקולחים הנכנסים

אליהן (Dunnett, $p > 0.57$ ו $p > 0.82$, עבור כל הרכבי הצומח, בשתי התקופות, בהתאמה; איורים 6.4.15 ו 6.4.16). יעילות הרחקה נמוכה ודומה ($p = 0.12$, twoway ANOVA) של זרחן התקבלה בבריכות ללא צומח, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים. כך למשל הייתה יעילות ההרחקה בשנת התפעול השלישית $-6\% \pm 30$, $-4\% \pm 26$ ו $5\% \pm 27$, בהתאמה (איור 6.4.17). ריכוז הזרחן המומס בקולחים היוצאים מהבריכות עם וללא צמחים היה דומה ($p = 0.09$, twoway ANOVA). בשנת התפעול השלישית יעילות ההרחקה של זרחן מומס הייתה דומה לזו שבשנת התפעול הראשונה ($p = 0.86$, twoway ANOVA).

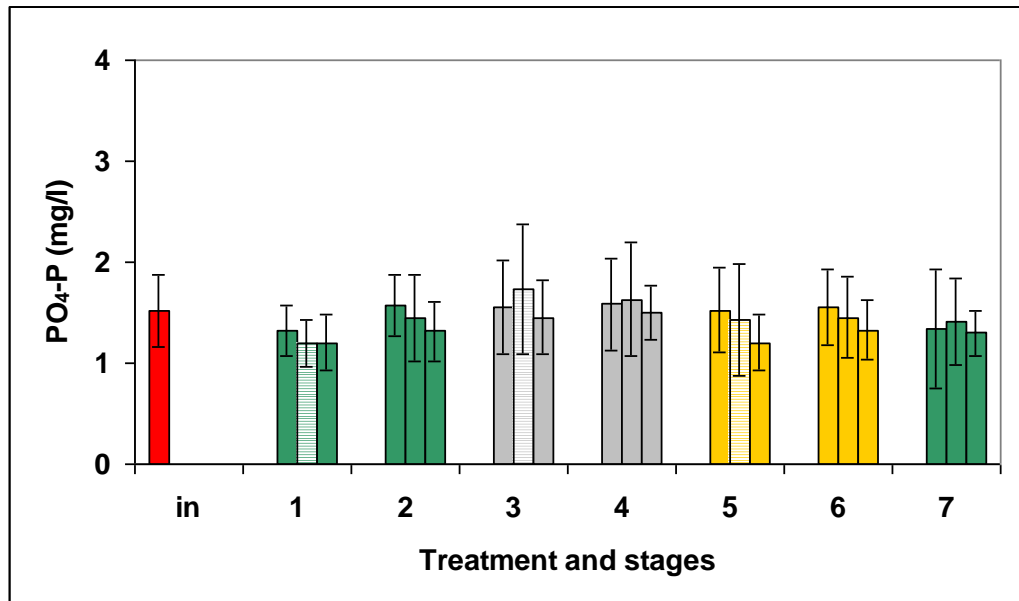


איור 6.4.15: ממוצע (\pm sd) ריכוז זרחן מומס (PO_4-P) בשנת התפעול הראשונה בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6). בהתאמה. ($n=9$)

מפלס שני: ריכוז הזרחן המומס בקולחים הנכנסים לבריכות המפלס השני היה דומה בבריכות עם הרכבי צומח שונים (כמצוין לעיל). בבריכות ללא צמחיה, בריכות עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים הייתה יעילות הרחקה נמוכה ודומה של זרחן מומס ($p = 0.08$, threeway ANOVA). כך למשל בשנת התפעול השלישית הייתה יעילות ההרחקה בבריכות המפלס השני $-10\% \pm 38$, $-4\% \pm 31$ ו $1\% \pm 29$, בהתאמה. לעומת זאת, היה ריכוז הזרחן המומס בקולחים היוצאים מבריכות ללא צמחיה גבוה מאשר בקולחים היוצאים בריכות עם צמחיה עשבונית או מגוון צמחים ($P < 0.001$, Tukey), אך שיעור ההבדל לא עלה על 0.4 מ"ג בליטר. בדפוס זרימה אופקי ואנכי יעילות ההרחקה של זרחן מומס הייתה דומה ($P = 0.57$, threeway ANOVA). כך למשל הייתה יעילות ההרחקה בשנת התפעול

השלישית $34\pm 1\%$ ו $31\pm 3\%$, בהתאמה (איור 6.4.17). בשתי התקופות יעילות ההרחקה בבריכות המפלט השני הייתה דומה לזו של בריכות המפלט הראשון ($P=0.052$, threeway ANOVA), כלומר העדר הרחקה.

מפלט שלישי: כאמור קיים הבדל בריכוז הזרחן בקולחים הנכנסים לבריכות המפלט השלישי. עם זאת שיעור ההבדל נמוך לכן נבחנה יעילות ההרחקה של בריכות המפלט השלישי בשני מצבי ההבשלה. בכל הבריכות יעילות ההרחקה הייתה חיובית. שיעור ההרחקה בבריכות השונות בשנת התפעול השלישית היה נמוך מאשר בשנת התפעול הראשונה ונע בין 5 ל 13% ובין 34 ל 41%, בהתאמה ($p<0.001$, fourway ANOVA; איורים 6.4.15 ו 6.4.16). השיעור המצטבר של ההרחקה של זרחן בשלושת הטיפולים בשנת התפעול השלישית היה נמוך מאשר בשנת התפעול הראשונה (בין 2 ל 16% ובין 40 ל 53%, בהתאמה).



איור 6.4.16: ממוצע ($\pm sd$) ריכוז זרחן מומס (PO_4-P) בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלט ראשון (בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלט שני (בריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלט שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=6$)

6.5 דיון ומסקנות

בפרק הנוכחי נבחן שיעור השינוי בריכוז של מזהמי מים קונבנציונאליים מקולחים שניוניים באיכות גבוהה במהלך טיפול באגנים ירוקים היברידיים בהם בריכות עם דפוסי מבנה שונים (זרימה עילית, תת-קרקעית אופקית ואנכית) והרכבי צומח שונים (צמחיה עשבונית, מגוון צמחים - בעיקר גומא פפירוס, ללא צמחיה). דיגום המים התבצע בתקופת האביב והקיץ בלבד. משום כך התוצאות אינן מאפשרות לבחון שונות עונתית ביעילות הרחקה של המזהמים. במגבלות הידע הקיים, חושבה יעילות

ההרחקה השנתית על בסיס הנתונים העונתיים. יש להתייחס לערך זה בהסתייגות הראויה עד לבירור ההשפעה העונתית על שיעור יעילות ההרחקה של המזהמים. ניתוח הממצאים מאפשר לזהות את ההשפעה של נוכחות והרכב הצומח, דפוס הזרימה, שלב הטיפול (מפלס ראשון או שני) ומצב ההבשלה של המערכת על יעילות הרחקה של מזהמים (טבלה 6.5.1).

טבלה 6.5.1: השפעה מובהקת (+) או העדר השפעה (-) של נוכחות והרכב צומח (בריכות ללא צמחים, עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים-בעיקר גומא פפירוס), דפוס זרימה אופקי או אנכי בבריכות (המפלס השני), שלב הטיפול (טיפול בבריכה במפלס הראשון או השני) וגיל המערכת (שנת תפעול ראשונה ושלישית) בבריכות בזרימה תת-קרקעית על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק (BOD), מוצקים מרחפים (TSS), אמוניה (NH₄-N), ניטראט (NO₃-N), חנקן כללי (TN) וזרחן מומס (PO₄-P)

גיל המערכת (מצב הבשלה)	שלב טיפול	דפוס הזרימה	נוכחות והרכב צומח	
+	+	-	-	BOD
-	+	-	-	TSS
+	+	-	-	NH₄-N
-	+	+	+	NO₃-N
-	-	-	-	TN
-	-	-	-	PO₄-P

מבין מדדי איכות המים שנבחנו (חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט, חנקן כללי וזרחן מומס) נמצאה במערכת ההיברידית בשפד"ן עדות להשפעה חיובית של נוכחות צומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית על יעילות הרחקה של ניטראט בלבד (טבלה 6.5.1). שיעור ההשפעה הנ"ל קטן והתקבל בבריכות הטיפול במפלס השני בלבד (הרחקה של 7% ו 5%-, בבריכות עם מגוון צמחים ובלי צמחים, בהתאמה). גם לדפוס הזרימה הייתה השפעה בעוצמה נמוכה על יעילות הרחקה של ניטראט (הרחקה של 10% ו 1%, בבריכות בדפוס זרימה אופקי ואנכי, בהתאמה). למצב ההבשלה של המערכת השפעה חיובית על יעילות הרחקה של אמוניה וחומר אורגאני קל פירוק ולשלב הטיפול בבריכות המפלס הראשון או השני, המתבטאים בשינויים בעומס המזהמים, הייתה ההשפעה על יעילות הרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה וניטראט. על פי הממצאים הנ"ל בתנאי המערכת (מבנה המערכת ההיברידית ואיכות הקולחים) לנוכחות הצומח ולדפוס הזרימה אין השפעה או קיימת השפעה שולית בלבד על יעילות ההרחקה של מזהמי המים הקונבנציונאליים באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי. לפיכך, נערך חישוב של ריכוז ועומס המזהמים בכל מפלס טיפול, קצב ההרחקה של המזהמים (גרם/מ"ר/שנה) ויעילות ההרחקה (באחוזים) על פי ערך ממוצע של כל הבריכות במפלס נתון. הנתונים הנ"ל והיעילות המצטברת של הרחקת המזהמים לאחר טיפול במפלס ראשון, ראשון ושני ושלושת המפלסים יחד מוצגים בטבלה 6.5.2.

טבלה 6.5.2: ריכוז, סטיית תקן וערך מקסימאלי (mg/l) של מזהמי מים קונבנציונאליים בקולחים השניוניים הנכנסים לבריכות האגנים ירוקים בשפד"ן, ובמוצא בריכות המפלס הראשון, שני ושלישי. מוצג עומס המזהמים (mass load, g/m²/year*), שיעור הרחקה (removal, g/m²/year*) ויעילות סילוק (removal efficiency, %) בבריכות המפלס הראשון (stage 1), שני (stage 2) ושלישי (stage 3) ובמערכת היברידיית הכוללת את בריכות המפלס הראשון (stage 1), הראשון והשני (stage 1+2) ובריכות המפלס הראשון, שני ושלישי (stage 1+2+3)

Conc.	Inflow	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Load/ removal/ efficiency	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Cumulative load/removal/ efficiency	Stage 1	Stage 1+2	Stage 1+2+3
BOD_{5,20}												
Average (mg/l)	6.1	2.1	2.1	2.7	Mass load (g/m ² /year)	892	301	362	Total mass load (g/m ² /year)	892	446	315
sd (mg/l)	4.0	0.9	1.0	1.0	Removal (g/m ² /year)	591	-1	-115	Total removal (g/m ² /year)	591	295	174
Max (mg/l)	18.6	3.4	4.3	5.6	Removal efficiency (%)	66	-0	-32	Total removal efficiency (%)	66	66	55
TSS												
Average (mg/l)	5.2	1.3	1.2	2.3	Mass load (g/m ² /year)	759	190	213	Total mass load (g/m ² /year)	759	180	268
sd (mg/l)	3.1	1.1	1.2	1.9	Removal (g/m ² /year)	569	13	-198	Total removal (g/m ² /year)	569	291	147
Max (mg/l)	16.8	7.6	9.2	7.0	Removal efficiency (%)	75	7	-93	Total removal efficiency (%)	75	77	55
NH₄-N												
Average (mg/l)	2.2	0.09	0.06	0.19	Mass load (g/m ² /year)	327	13	10	Total mass load (g/m ² /year)	327	164	116
sd (mg/l)	1.1	0.08	0.08	0.23	Removal (g/m ² /year)	315	5	-24	Total removal (g/m ² /year)	315	160	106
Max (mg/l)	4.0	0.34	0.41	0.98	Removal efficiency (%)	96	36	-248	Total removal efficiency (%)	96	98	91
NO₃-N												
Average (mg/l)	0.6	2.2	2.1	0.7	Mass load (g/m ² /year)	89	324	372	Total mass load (g/m ² /year)	89	45	32
sd (mg/l)	0.2	1.4	1.2	0.6	Removal (g/m ² /year)	-235	14	247	Total removal (g/m ² /year)	-235	-110	-5

Max (mg/l)	1.1	5.1	4.9	2.0	Removal efficiency (%)	-263	4	66	Total removal efficiency (%)	-263	-247	-17
N total												
Average (mg/l)	4.8	4.5	3.6	2.3	Mass load (g/m²/year)	701	653	632	Total mass load (g/m²/year)	701	351	247
sd (mg/l)	1.1	2.6	1.6	1.0	Removal (g/m²/year)	49	126	228	Total removal (g/m²/year)	49	87	128
Max (mg/l)	6.3	9.6	6.2	4.6	Removal efficiency (%)	7	19	36	Total removal efficiency (%)	7	25	52
PO₄-P												
Average (mg/l)	1.2	1.5	1.5	1.3	Mass load (g/m²/year)	179	218	258	Total mass load (g/m²/year)	179	90	63
sd (mg/l)	0.4	0.4	0.5	0.3	Removal (g/m²/year)	-39	3	25	Total removal (g/m²/year)	-39	-18	-5
Max (mg/l)	2.1	2.5	2.8	1.9	Removal efficiency (%)	-22	1	10	Total removal efficiency (%)	-22	-20	-8

* With a bias of similar seasonal efficiency

ההרחקה היעילה ביותר של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה התקבלה במערכת הבוגרת בשפד"ן לאחר טיפול אחד, תת-קרקעי אנכי (66%, 75% ו 96% הרחקה, בהתאמה, טבלה 6.5.2). טיפול תת-קרקעי נוסף לא תרם לשיפור ההרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ותרם שיפור מזערי בלבד להרחקה של מוצקים מרחפים ואמוניה (+2%, טבלה 6.5.2). הריכוז הסופי הנמוך ביותר של המזהמים הנ"ל בתום שני טיפולים היה 2.1, 1.2 ו 0.06 מ"ג/ליטר, בהתאמה (טבלה 6.5.2). בבריכות הטיפול במפלס הראשון בשפד"ן בהן זרימת הקולחים תת-קרקעית אנכית, קיימת תרומה משמעותית של ניטראט (כפי 2.6). ניטראט זה מורחק ביעילות בבריכות הטיפול במפלס השלישי בהן זרימת הקולחים עילית (כ- 66%). סך הכול במערכת ההיברידיית בשפד"ן אין שינוי משמעותי בריכוז הניטראט (טבלה 6.5.2). הרחקה של חנקן כללי היא ביטוי להרחקה של אמוניה וניטראט. עיקר ההרחקה של אמוניה (יצירה של ניטראט, ניטריפיקציה) התרחשה כאמור בבריכות המפלס הראשון בהן זרימה תת-קרקעית אנכית. עיקר ההרחקה של הניטראט התרחשה בבריכות המפלס השלישי בהן זרימת הקולחים עילית. סך הכול במערכת ההיברידיית בשפד"ן הורחק חנקן כללי בשיעור של כ- 52% (ריכוז סופי 2.3 מ"ג/ליטר; טבלה 6.5.2). במערכת ההיברידיית בשפד"ן אין הרחקה משמעותית של זרחן מומס. בבריכות המפלס הראשון הייתה תרומה מוגבלת של זרחן מומס (כ 22%) ובבריכות המפלס השלישי הייתה הרחקה מוגבלת של זרחן (כ-10%; טבלה 6.5.2).

השוואה בין יעילות הרחקה של מזהמי מים במערכת בשפד"ן לבין יעילותן של מערכות אחרות בעולם בעייתית משום השפעה של מכלול גורמים כעומס הידראולי, עומס מזהמים, גיל האגן ותנאי אקלים על יעילות ההרחקה. קושי להשוות בין מתקנים שונים קיים גם משום הבדלים באופן הצגת הנתונים. במקרים רבים מוצגת יעילות המערכת, בדומה לאופן הצגת התוצאות במחקר הנוכחי, כיחס (באחוזים) בין הפרש ריכוז המזהם בקולחים היוצאים והנכנסים לאגן לבין ריכוז המזהם בקולחים הנכנסים (משוואה 1).

$$removal(\%) = \frac{(C_{in} - C_{out})}{C_{in}} \times 100 \quad \text{משוואה 1}$$

ערך C_{in} או C_{out} מיצגים את ריכוז המזהם, לרוב מ"ג/ליטר, בקולחים הנכנסים ויוצאים מהמערכת, בהתאמה. במחקרים אחרים מוצגת יעילות המערכת כיחס (באחוזים) בין הפרש המסה של המזהם בקולחים הנכנסים ויוצאים מהאגן לבין המסה בקולחים הנכנסים. המסה של המזהם מחושבת כמכפלה של ריכוז המזהם בספיקה (Q, מטר³/יום, משוואה 2)

$$removal(\%) = \frac{(C_{in} \times Q_{in}) - (C_{out} \times Q_{out})}{(C_{in} \times Q_{in})} \times 100 \quad \text{משוואה 2}$$

חישוב המתבסס על מסה מתאים בעיקר במקרים בהם קיימים הבדלים גדולים בין נפח הקולחים הנכנס לזה היוצא מהאגן הירוק כתוצאה מנידוף וטרנספירציה (אופוטורנספירציה), מיהול על ידי משקעים או חלחול לקרקע. במחקר הנוכחי לא היה מיהול על ידי משקעים ולא חלחול לקרקע מאחר ודגימות הקולחים נאספו רק בעונה היבשה וקיים איטום בתחתית האגנים. כמו כן לא קיים איבוד משמעותי בנפח הקולחים כתוצאה מאופוטורנספירציה. הנחה זו מתבססת על העדר הבדלים

במליחות (ב- ppt) של הקולחים המזינים את המערכת והיוצאים ממנה. מסקנה זו נתמכת גם במחקר שבחן שיעור של איבוד מים בבריכות האגנים הירוקים בשפד"ן ומצא שאיבוד המים אינו עולה על כ- 6% מנפח הקולחים הנכנס לבריכות (אשכנזי, 2009).
דרך נוספת לביטוי יעילות הרחקה של מזהמים באגנים ירוקים היא על בסיס שיעור סילוק של מסה ביחידת שטח וזמן (קצב).

השפעה של מפלס הטיפול, מבנה האגן ודפוס הזרימה

באגנים ירוקים היברידיים כדוגמת אלו הקיימים בשפד"ן קיימת אפשרות לעומס מזהמים שונה בכל שלב טיפול (Lin et al., 2002). לפיכך נדרשת התייחסות פרטנית לכל שלב טיפול (מפלס הבריכות) בנפרד.

זרימה תת-קרקעית אנכית (בריכות המפלס הראשון)

בבריכות אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית בשפד"ן קיימת הרחקה יעילה יחסית של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, ואמוניה. יעילות הרחקה של חנקן כללי וזרחן נמוכה ולניטראט קיימת ההרחקה שלילית, כלומר תרומה. להלן התייחסות להרחקה של המזהמים הנ"ל.
יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית בשפד"ן (כ- 66%, טבלה 6.5.2) דומה לזו המדווחת באגנים ירוקים אחרים בזרימה תת-קרקעית המיועדים לליטוש של קולחים (חציון יעילות הרחקה של מערכות שונות כ- 70%, טבלה 6.2.1). יעילות הרחקה נמוכה יותר (כ- 56%, Vymasal., 2003a) דווחה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית (באוסטרליה, גרמניה, סין, צרפת, סלובניה ואנגליה) בהם ריכוז ועומס של חומר אורגאני קל פירוק בקולחים הנכנסים היה גבוה יותר מאשר באגנים הירוקים בשפד"ן (כפי 26 ו 3, בהתאמה). ממצאים אלה שונים מהצפוי לקשר חיובי בין עומס מזהמים לבין שיעור הרחקה באגנים ירוקים (Kadlec, 2009) ויכולים להעיד על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק גבוהה יחסית של מערכת האגנים הירוקים בשפד"ן.

יעילות הרחקה של מוצקים מרחפים בבריכות בזרימה אנכית בשפד"ן (75%, טבלה 6.5.2) דומה לזו המדווחת באגנים ירוקים אחרים בזרימה תת-קרקעית המשמשים לליטוש של קולחים (חציון יעילות הרחקה של מערכות שונות כ- 70%, טבלה 6.2.2).

יעילות הרחקה של אמוניה באגנים הירוקים בשפד"ן גבוהה (96%, טבלה 6.5.2). יעילות זו גבוהה מזו המדווחת באגנים ירוקים בזרימה עילית או תת-קרקעית (בעיקר בזרימה אופקית) ששימשו לליטוש קולחים (ערכי חציון של 50% ו 38%, בהתאמה טבלה 6.2.3). אחד המנגנונים העיקריים להרחקה של אמוניה באגנים ירוקים הוא ניטריפיקציה (Kadlec and Wallace, 1996; Kadlec and knight, 2008). יצירה והצטברות של ניטראט (235 גרם/מ"ר/שנה) בבריכות המפלס הראשון מעידה שזה גם התהליך העיקרי שתורם להרחקה של אמוניה במערכת בשפד"ן. כמו כן ניתן לשלול חשיבות של קליטת אמוניה ע"י הצמחייה במערכת בשפד"ן משום ששיעור הרחקה בבריכות עם וללא צמחים היה דומה. ניטריפיקציה מתרחשת על ידי חיידקים בתנאים אירוביים. סביר להניח ששיעור הניטריפיקציה

בבריכות בשפד"ן גבוה יותר מאשר באגנים ירוקים בזרימה עילית או אופקית משום ההבדלים בזמינות החמצן בין מערכות בלתי רוויות המוזנות לסירוגין (זרימה אנכית) לרוויות (Vymazal, 2003a ; Kadlec, 2009).

יעילות הרחקה של חנקן כללי באגנים הירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית בבריכות השפד"ן נמוכה (כ- 7%, טבלה 6.5.2). יעילות זו נמוכה בהשוואה למדווח מאגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (בעיקר בזרימה אופקית) המיועדים לליטוש קולחים (כ- 30% הרחקה, טבלה 6.2.4). ניתן להסביר את יעילות הרחקה הנמוכה של חנקן כללי באגנים בשפד"ן בהיעדר דניטריפיקציה (Vymazal, 2003a). חיזוק לטענה זו הוא יחס גבוה בין כמות הניטראט שהצטברה בבריכות הנ"ל לבין כמות האמוניה שהורחקה (כ- 75%).

באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית לא קיימת הרחקה יעילה של זרחן. טיעון זה מתבסס על ערך חציון נמוך יחסית במערכות שונות של אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (כ- 26%; טבלה 6.4.5). יתרה בכך, במחקר הנוכחי אף התקבלה עליה של כ- 22% בריכוז הזרחן בבריכות הטיפול במפלס הראשון (תרומה של כ- 40 גרם/מ"ר/שנה; טבלה 6.5.2). מקור אפשרי לזרחן הוא חומר אורגאני נרקב (Lin et al., 2002). אחד המנגנונים בהם זרחן מורחק ממים הוא ספיחה למצע (Kadlec and Wallace, 2008). היעדר הרחקה של זרחן בבריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית בשפד"ן מעידה שבתנאי המערכת (מצע בזלת ודולומיט) ספיחה איננה מנגנון חשוב בסילוק של זרחן.

זרימה תת-קרקעית אופקית או אנכית (בריכות המפלס השני)

מעבר הקולחים באגנים בהם זרימה תת-קרקעית אופקית ואנכית מאפשרים לבחון את ההשפעה של דפוס הזרימה על יעילות הרחקה של המזהמים. שטחים דומים של הבריכות בשלב הטיפול הראשון והשני מאפשרים לבחון את ההשפעה של עומס המזהמים על יעילות הטיפול. יעילות ההרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה בבריכות המפלס השני הייתה נמוכה מאשר במפלס הראשון. ניתן להסביר את המגמה הנ"ל בקשר חיובי בין עומס המזהם לבין שיעור הרחקה (למשל, Tuncsiper, 2006; Ayaz, 2008; Kadlec, 2009). כך למשל, בריכות המפלס הראשון בהן בעומס אורגאני היה גבוה כפי 3 מאשר בבריכות המפלס השני הייתה הרחקה של 66% של קל הפירוק בהשוואה להיעדר הרחקה בבריכות המפלס השני (טבלה 6.5.2). משום העדר הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק בבריכות המפלס השני בזרימה אופקית או אנכית לא ניתן לקבוע את ההשפעה של דפוס הזרימה על יעילות הרחקה. דוגמא נוספת היא ירידה של פי 68 בקצב הרחקה של אמוניה כאשר העומס בבריכות המפלס השני היה נמוך פי 26 מאשר בבריכות המפלס הראשון (טבלה 6.5.2). סילוק דומה ונמוך של אמוניה בבריכות בדפוס זרימה אנכי העשיר יחסית בחמצן ובבריכות בדפוס זרימה אופקי העניות יחסית בחמצן תומך בהנחה שהגורם המגביל את קצב הניטריפיקציה הוא עומס האמוניה. תופעה דומה נתקבלה גם במקרה של מוצקים מרחפים (העומס וקצב ההרחקה פחתו בבריכות המפלס השני פי-4 ו פי-45, בהתאמה, בהשוואה לבריכות המפלס הראשון).

במקרה של ניטראט העומס בבריכות המפלס השני היה גבוה (נוצר במפלס הראשון). העובדה שהניטראט בבריכות המפלס השני בזרימה תת-קרקעית אופקית הורחק בשיעור נמוך מ- 10% על אף

התנאים ההיפוקסיים, רומזת על האפשרות שהגורם המגביל את הדניטריפיקציה הוא פחמן אורגאני זמין. הסבר דומה הוצע גם על ידי אחרים (Kozub and Liehr, 1999; Hume et al., 2002; Hamersley and Howes, 2002; Nivala et al., 2007).

זרימה עילית (בריקות המפלס השלישי)

בבריקות בזרימה עילית בשפד"ן הייתה תרומה של חומר אורגאני, אמוניה, מוצקים מרחפים, הרחקה נמוכה של זרחן מומס והרחקה גבוהה יחסית של ניטראט וחנקן כללי. תוספת של חומר אורגאני, אמוניה ומוצקים מרחפים ניתנת להסבר בדומיננטיות של מדורים אוטוטרופיים באגנים ירוקים בזרימה עילית בהשוואה לאגנים בזרימה תת-קרקעית (Mitsch and Gosselink, 1993). הריכוז הנמוך של המזהמים הקונבנציונאליים בקולחים הנכנסים למערכת בשפד"ן ובמיוחד לאחר טיפול בבריקות המפלס הראשון והשני אפשר להבחין גם בשינויים קלים בריכוז החומרים הנ"ל בבריקות המפלס השלישי. התופעה של עליה בריכוז מזהמים בקולחים היוצאים מאגנים בזרימה עילית דווחה גם על ידי אחרים. כך למשל, מתוך שישה אגנים ירוקים שהוזנו בקולחים בהם חומר אורגאני קל פירוק בריכוז נמוך (7 מ"ג/ליטר), במחציתם חלה עליה בריכוז החומר האורגאני. בשש מערכות שהוזנו בקולחים בהם ריכוז המוצקים המרחפים היה נמוך (6 מ"ג/ליטר), בשתיים הובחנה עליה בריכוז המוצקים המרחפים (Ghermandi et al., 2007). תופעה דומה דווחה גם על ידי Greenway and Woolley (1999). להערכתנו, בבריקות בזרימה עילית בשפד"ן היה מדור אוטוטרופי דומיננטי של צמחייה מקרופיטית שכיסתה בצפיפות את כל שטח האגן (איור 7, נספח 4). הצטברות וריקבון של צמחי המים בקרקעית האגן יכולה להסביר גם את התרומה של האמוניה (Thullen et al., 2005). באגנים ירוקים בדפוס זרימה דומה שהוזנו בקולחים בהם ריכוז חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה היה גבוה מאשר בקולחים המזינים את בריקות המפלס השלישי בשפד"ן (פי 8, 45 ו 80, בהתאמה) נמדדה הרחקה של מזהמים אלו (ערכי חציון במערכות שונות 46%, 33% ו 50%, בהתאמה, טבלאות 6.2.1, 6.2.2 ו 6.2.3).

שיעור הרחקה של ניטראט בבריקות המפלס השלישי בזרימה עילית בשפד"ן היה גבוה יחסית (כ-66%). קצב ההרחקה של ניטראט (כ-247 גרם/מ"ר/שנה) דומה לערכים הגבוהים המדווחים באגנים ירוקים אחרים בדפוס זרימה דומה (בין 36 ל 360 גרם/מ"ר/שנה; Bachand and Horne., 2000b). הרחקה של ניטראט מתרחשת באגנים ירוקים בעיקר במנגנון של דניטריפיקציה (Lindau et al., 1989; Reddy et al., 1988). ניתן להסביר את השיעור הגבוה יחסית של דניטריפיקציה בבריקות בשפד"ן בנוכחות ביומסה בקטריאלית גבוהה, תנאים ההיפוקסיים, זמינות של פחמן אורגאני ובטמפרטורה גבוהה (כ 25°C). קצב דניטריפיקציה מרבי דווח בטמפרטורה של 25°C או גבוהה יותר (Vymazal, 2003a). נוכחות ביומסה גבוהה של צמחיה טבולה ומזדקרת (איור 7, נספח 4) תורמת שטח פנים רב להתיישבות ביופילם המעורב בתהליך של דניטריפיקציה ופחמן אורגאני הנדרש לתהליך. עיכוב של תהליך דניטריפיקציה כתוצאה ממגבלה בזמינות של פחמן אורגאני ולא כתוצאה ממגבלה של ריכוז ניטראט או עודף חמצן דווח על ידי אחרים (Kozub and Liehr, 1999; Bachand)

(and Horne, 2000b; Hume et al., 2002; Hamersley and Howes, 2002; Nivala et al., 2007). העובדה הנ"ל יכולה להסביר את היעדר הדניטריפיקציה בבריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית במפלס השני בשפד"ן בהן צמחיה מזדקרת בלבד. יעילות ההרחקה של חנקן כללי בבריכות בזרימה עילית בשפד"ן (כ- 36%, טבלה 6.5.2) נמוכה מזו המדווחת בבריכות בזרימה עילית אחרות, המלטשות קולחים באיכות טובה (כ- 51%, טבלה 6.2.4). קצב ההרחקה של חנקן כללי בבריכות בזרימה עילית בשפד"ן (כ- 228 גרם/מ"ר/שנה) היה גבוה מאשר זה המדווח על ידי אחרים באגנים דומים (164 גרם/מ"ר/שנה, Vymazal 2003a). הסבר אפשרי להבדלים אלו הוא בעומס הידראולי גבוה יחסית של המערכת בשפד"ן (48cm/day) בהשוואה למתקנים אחרים (עד כ- 5cm/day; Vymazal 2003a). קצב הרחקה גבוה של חנקן כללי ניתן להסבר גם בדניטריפיקציה יעילה. יעילות הרחקה מרבית של חנקן כללי צפויה במערכות היברידיות המשלבות מדורים אירוביים והיפוקסיים. זאת משום שסילוק חנקן כללי מתרחש בשילוב תהליכים של ניטריפיקציה ודניטריפיקציה (Vymazal, 2003b) המתקיימים כל אחד בחלק אחר של המערכת (Yeh and Wu, 2009). יעילות הרחקה מצטברת של חנקן כללי בבריכות השפד"ן (52%) דומה למדווח במערכת היברידיית אחרת הכוללת בריכת חמצון, לאחריה שתי בריכות בזרימה עילית ובמורדן בריכה בזרימה תת-קרקעית אופקית (כ- 53%; מריכוז 7.6 מ"ג/ליטר; Yeh and Wu, 2009). בדומה למערכת בשפד"ן, גם במערכת האחרונה עיקר סילוק החנקן הכללי (כ- 86%) הורחק בטיפול אחרון המתבסס על תנאים היפוקסיים המאפשרים דניטריפיקציה. אגנים ירוקים בזרימה עילית אינם מתאימים לסילוק זרחן. במחקר הנוכחי התקבל בבריכות בזרימה עילית שעור הרחקה ממוצע נמוך מ- 10% (טבלה 6.5.2) וערך חציון מתוך ערכים המדווחים לאגנים ירוקים אחרים בדפוס זרימה דומה הוא 21% בלבד (טבלה 6.2.5). הרחקה נמוכה של זרחן מומס בבריכות בזרימה עילית בהשוואה להיעדר הרחקה או תרומה של זרחן בבריכות בזרימה תת-קרקעית ניתנת להסבר בהרחקה של הזרחן במנגנון של קליטה לצומח (Greenway and Woolley, 2001). האפשרות של הרחקת זרחן בבריכות בזרימה עילית באמצעות מנגנון ספיחה סבירה פחות, משום שבתנאים מועדפים לתהליך זה, כפי שקיימים בבריכות בזרימה תת-קרקעית במערכת בשפד"ן, לא הייתה הרחקה של זרחן מומס.

תרומה של הצומח להרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים

הצמחים הם חלק אינטגרלי מטכנולוגיה של אגנים ירוקים (Kadlec and Knight, 1996, Kadlec and Wallace, 2008). קיימות עדויות שנוכחות צומח משפרת יעילות הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים באמצעות המנגנונים הבאים: שמירה על מוליכות הידראולית של מצע גרנולארי (למשל, Haberl et al., 2003); סינון פיסיקלי (למשל, Brix 1997); זמינות ביומסה ושטח פנים התומכים התיישבות של מיקרואורגניזמים וחסרי חוליות (Kadlec and Knight 1996; US EPA 2000; Haberl et al., 2003); אוורור הסדימנט ויצירה של נישות התומכות בתהליכים

בקטריאליים אירוביים (למשל, Davis et al., 2005); קליטה של נוטריאנטים מומסים מהמים ומהסדימנט (למשל, Liu et al., 2000); שיפור דניטריפיקציה באמצעות תרומה של פחמן אורגאני (למשל, Bachand and Horne, 2000b); ושיפור דניטריפיקציה באמצעות הסעה של ניטראט מגוף המים לנישות היפוקסיות בסדימנט (Martin et al., 2003). קיימים נתונים סותרים על מידת התרומה של תהליכים אלו לשיפור איכות המים ועל מידת חשיבותם בטיפוסים שונים של אגנים ירוקים ובעומסים שונים של מזהמים (Brix, 2003). במערכת המחקר בשפד"ן לא ניתן היה לבחון את כל ההשפעות הנ"ל אולם ממצאי העבודה מאירים על העדר השפעה, השפעה חיובית או שלילית של הצמחים על יעילות ההרחקה של המזהמים ועל איכות הקולחים, כמובהר להלן.

היעדר השפעה: ממצאי המחקר הנוכחי מעידים כי לנוכחות והרכב הצומח בבריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית במערכת בשפד"ן אין השפעה על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק או אמוניה מקולחים באיכות גבוהה. ניתן להסביר את העדר ההשפעה הנ"ל בהיעדר תרומה משמעותית של הצומח לאוורור המצע באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית. זאת משום שהתהליך המרכזי התורם לאוורור מצע באגנים אלו הוא דיפוסיה של חמצן המתרחשת כאשר המצע מתנקז במלואו בין מחזורים של הזנה (Torrense et al., 2009). חיזוק נוסף לטענה זו הוא שיפור ביעילות הרחקה של אמוניה וחומר אורגאני (COD) מקולחים חקלאיים באגנים ירוקים עם ובלי צמחים עם עליה בתדירות של מחזורי הצפה וניקוז (Tanner et al., 1999).

בנוסף לכך, היעדר הבדלים ביעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק או אמוניה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית ללא צמחים, עם צמחיה עשבונית או מגוון צמחים מעידה על תרומה שולית של שורשי הצומח לשטח הפנים הזמין על ידי המצע עבור התיישבות של מיקרואורגניזמים. ממצאי המחקר הנוכחי מעידים על תרומה שולית של מנגנון קליטה לצומח להרחקה של תרכובות חנקן וזרחן באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעית. ממצאים דומים המעידים על היעדר תרומה או תרומה נמוכה של הצמחים לסילוק נוטריאנטים באמצעות קליטה ישירה מקולחים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית מדווחים גם על ידי אחרים (Meuleman, 1999; Obarska Pempkowiak, 1999; Healy and Cawley, 2002; Torrens et al., 2009).

השפעה חיובית: התרומה של הרחקת הנוטריאנטים במנגנון קליטה לצומח גבוהה יותר באגנים ירוקים בזרימה עילית מאשר באגנים בזרימה תת-קרקעית. הנחה זו נתמכת גם בתכולה גבוהה יותר של חנקן וזרחן ברקמות של צמחי מים צפים וטבולים בהשוואה למזדקרים (Greenway and Woolley, 1999).

ממצאי המחקר הנוכחי מעידים כי לצמחיה באגן ירוק בזרימה עילית קיימת השפעה חיובית על הרחקה של ניטראט וחנקן כללי משום תרומה של פחמן אורגאני זמין (ראה לעיל). השפעה זו בולטת במערכות המשמשות לליטוש קולחים באיכות גבוהה בהם פחמן אורגאני מגביל קצב דניטריפיקציה. השפעה שלילית: ממצאי המחקר הנוכחי מעידים כי להתפתחות מסיבית של צומח באגן ירוק בזרימה עילית ולריקבון של חומר אורגאני בקרקעית האגן קיימת השפעה שלילית על איכות המים כתוצאה מתרומה של חומר אורגאני קל פירוק, מוצקים מרחפים ואמוניה. טענה זו נתמכת גם על ידי אחרים

(Sartoris et al., 2000; Thullen et al., 2005). השפעות שליליות נוספות של התפתחות מסיבית של צמחיה מזדקרת בוגרת בבריכות אגנים ירוקים בזרימה עילית כוללות דעיכה בריכוז חמצן שמגביל ניטריפיקציה ומקטין את שרידותם של דגים וחסרי חוליות הנחוצים לפירוק צמחיה מזדקנת; פגיעה ביעילות זרימה של קולחים דרך האגן; עידוד התפתחות אזורים סטגנטיים בהם משגשים פתוגנים ממקור של עופות; הצללה של המים וכתוצאה מכך עיכוב התפתחות של מיקרואורגניזמים ואצות אוטוטרופיות הנחוצות לקליטה של נוטריאנטים; וצמצום תהליך של פירוק פוטו-ליטי המסייע בסילוק פתוגנים ומזהמים אורגאניים (Thullen et al., 2005). מעבר לכך, התפתחות מסיבית של צומח בבריכות בדפוס זרימה עילי יוצרות בית גידול מועדף להתפתחות זחלי יתושים (Thullen et al., 2005).

השפעה של מצב הבשלות של אגנים ירוקים על יעילות הרחקה של מזהמים

במחקר הנוכחי נמצא שלמצב הבשלות קיימת השפעה על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ותרבות חנקן באגנים בזרימה תת-קרקעית. במערכת בשלה יעילות ההרחקה גבוהה יותר. ממצא דומה דווח על ידי Wang et al. (2005) המסביר את השיפור ביעילות ההרחקה של המזהמים בהתפתחות והתבססות של האוכלוסייה המיקרוביאלית והמקרופיטית. משך תקופת הזמן הנדרש עד להתייצבות ביעילות ההרחקה של המזהמים (תקופת ההבשלה) מושפע מגודל האגן (מהיר במערכות קטנות), מדפוס המבנה והזרימה באגן (מהיר באגנים בזרימה תת-קרקעית מאשר בעילית), ומטמפרטורה (מהיר בטמפרטורות גבוהות) (Lin et al., 2002). לתקופת הבשלה קיימת השפעה שלילית על יעילות הרחקה של זרחן באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי, המוסברת לרוב ברוויה של אתרי ספיחה של זרחן במצע האגן (למשל, Lin et al., 2002). במחקר הנוכחי נמצאה במערכת הבשלה יעילות סילוק נמוכה יותר מאשר במערכת המתפתחת באגנים בזרימה עילית. לדעתנו, לרוויה של אתרי ספיחה חשיבות נמוכה בשינויים שחלו ביעילות הרחקה של זרחן באגנים בזרימה עילית. זאת משום תרומה שולית של ספיחה להרחקה של זרחן גם באגנים בהם כמות מצע גבוהה יותר (אגנים בזרימה תת-קרקעית). לחילופין, ניתן להסביר את השינוי ביעילות הרחקה של זרחן בבריכות אגנים ירוקים בזרימה עילית בקצב צימוח מהיר יותר במערכת המתפתחת מאשר במערכת הבשלה ובשינויים בהרכב הצומח. כך למשל, בשנת התפעול הראשונה היה כיסוי האגן בצמחיה מקרופיטית לכל היותר כ- 50% משטח הבריכות ובשטח הנותר הייתה התפתחות של אצה חוטית מסוג קלדופורה (*Cladophora conglomerata*) ונוף מים פתוחים. יתכן ואצות אלו הצטיינו בקליטה של זרחן מומס מהמים והמרתו לזרחן אורגאני שהצטבר בקרקעית. כמו כן באזורים ללא כיסוי צומח קיימת התפתחות של פיטופלנקטון התורם גם הוא להמרה של זרחן מומס לחלקיקי (Kadlec, 2009). בשנת התפעול השלישית כיסתה הצמחייה המקרופיטית את כל פני שטח הבריכות. קצב הצימוח של הצמחייה המקרופיטית פחת וחלה הצללה של הבריכות שעכבה התפתחות של אצות חוטיות ופיטופלנקטון. הסבר נוסף ליעילות הרחקה נמוכה של זרחן בבריכות בזרימה עילית בתקופה

הבוגרת הוא התרומה של זרחה מחומר אורגאני נרקב שמקורו בצמחיה המקרופיטית (Verhoeven and Meuleman, 1999).

לסיכום:

ממצאי העבודה מעידים כי אגנים ירוקים יכולים להרחיק מזהמים קונבנציונאליים ובכך לשפר את האיכות של קולחים גם שאיכותם גבוהה יחסית (קולחים באיכות שניונית). במערכת ההיברידית בשפד"ן הייתה הרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט וחנקן כללי אך לא של זרחה מומס.

למערכת אגנים ירוקים היברידית יתרון על פני דפוס מבנה אחיד משום שהיא מספקת מגוון תנאים המאפשרים קיום של מגוון מנגנוני הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים (Lin et al., 2002). לא נצפתה השפעה משמעותית של הצמחייה על יעילות הרחקה של מזהמים באגנים בדפוס זרימה תת-קרקעי. בדפוס זרימה עילי קיימת השפעה חיובית של הצומח על יעילות הרחקה של ניטראט וחנקן כללי והשפעה שלילית על יעילות הרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה.

7. הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים

7.1 מבוא

הפרק הנוכחי בוחן סילוק של אסטרוגנים מקולחים שניוניים באמצעות מערכת אגנים ירוקים. ברקע המדעי מוצגים המנגנונים הקשורים בסילוק אסטרוגנים בטיפוסים שונים של אגנים ירוקים והניסיון שנרכש עד היום בעולם. בפרק התוצאות מוצגים ריכוז האסטרוגנים שנמצאו בקולחים שניוניים במט"ש השפד"ן, ריכוזם בתום טיפול באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי עם הרכבי צומח שונים ובתום טיפול בסדרה עוקבת של בריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית, אופקית וזרימה עילית. הסיכום דן בדפוסי מבנה המיטביים של אגנים ירוקים לסילוק אסטרוגנים מקולחים.

7.2 רקע מדעי

7.2.1 מנגנונים פוטנציאליים להרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים

תרכובות אורגאניות מורחקות במערכות אגנים ירוקים בתהליכים כימיים, פיסיקליים וביולוגיים המתרחשים במשולב (Imfeld et al., 2009). תהליכים אלו כוללים מנגנונים כנידוף, חמצון פוטו-כימי, סדימנטציה, ספיחה ופירוק ביולוגי (Kadlec, 1992; Imfeld et al., 2009). נכון להיום חסר עדיין מידע על התרומה היחסית של כל מנגנון להרחקה של תרכובות אורגאניות באגנים ירוקים (Imfeld et al., 2009). יתרה מכך, תרומתו היחסית של כל מנגנון צפויה להשתנות כתלות במשתנים הקשורים במערכת כאיכות הקולחים, דפוס הזרימה (על או תת-קרקעי, אופקי או אנכי), דפוס הפעלה (למשל, משטר הזרימה וזמן השהייה), סוג והרכב המצע, סוג, הרכב וצפיפות הצמחייה וכתלות במשתנים סביבתיים כטמפרטורה, משטר חמצן וקרינה. בדומה לתרכובות אורגאניות אחרות אחד המנגנונים הצפויים לתרום להרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים הוא פירוק ביולוגי (Matamoros and Bayona., 2008; Imfeld et al., 2009). בנוסף, גם מנגנון של ספיחה צפוי להתקיים באגנים ירוקים שכן תכונותיהן ההידרופוביות של האסטרוגנים ($\log K_{ow}$ 2.81-4.67) מעודדות ספיחתם לשטח פנים הידרופובי כקרקעות עשירות בחומר אורגאני (White et al., 2006; Matamoros and Bayona., 2008). תכונות הידרופוביות של תרכובות אורגאניות משפיעות גם על מידת קליטתם לצומח הפוחתת בתרכובות עם ערך $K_{ow} > 4$ (Imfeld et al., 2009). ערך ה- K_{ow} של אסטרוגנים טבעיים נמוך מ-4 וזה של הסינטטיים גבוה יותר, בהתאם צפוי כי קליטה לצומח של אסטרוגנים סינטטיים תהיה פחותה בהשוואה לטבעיים. פירוק פוטו-כימי של אסטרוגנים מוגבל למערכות בזרימת מים עילית, בעיקר רדודות וצלולות (White et al., 2006). במקרה של אסטרוגנים סילוק במנגנון נידוף סביר פחות משום לחץ אדים נמוך (Ingerslev and Sørensen, 2003).

7.2.2 עדויות להרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים

הרחקה של אסטרוגנים מקולחים מבוטאת כהפחתה בריכוז או כהפחתה בפעילות אסטרוגנית (estrogenicity). להלן מוצגת יעילות הרחקה של אסטרוגנים במערכות אגנים ירוקים נבחרות, על פי דפוס הזרימה.

אגנים בזרימת מים עילית (Surface flow wetlands)

קיימים נתונים סותרים על יעילות הרחקה של אסטרוגנים במערכות אגנים ירוקים בזרימה עילית. ישנם מחקרים המעידים על היעדר הרחקה בעוד אחרים מדווחים על יעילות הרחקה גבוהה. העדר הרחקה של פעילות אסטרוגנית נמצאה למשל במערכת אגנים ירוקים (Prado Wetland) הממוקמת בקליפורניה (Riverside, California, Xie et al., 2005). המערכת הנ"ל הוזנה בקולחים שמקורם בנהר (Santa Ana River) בו מוזרמים קולחים באיכות שלישונית (Bachand and Horn, 2000a). מי הנהר הוזרמו לחמישים בריכות אגנים ירוקים בהם דפוס זרימה עילי של הקולחים (עומק ממוצע כ-0.75 עד 0.92 ס"מ), בספיקה ממוצעת של 3.6 מ"ק לשנייה, ובזמן שהייה הידראולי של כשישה ימים. במערכת זו נמצא שיעור דומה של פעילות אסטרוגנית (*in-vivo rainbow trout vitellogenin*) (expression and *in-vitro* yeast estrogen screening assays) בקולחים הנכנסים והיוצאים מהבריכות (היעדר הרחקה). מגמה דומה המעידה על היעדר שינוי בריכוז אסטרוגנים נמצאה גם במערכת בריכות אגנים ירוקים בהם זמן שהייה של 6-7 ימים ומוזנים בקולחים שניוניים (Kolodziej et al., 2003). במחקר שבוצע באילינוי (Illinois), Peterson and Lanning (2009) מציגים את כישלונם של אגנים ירוקים בזרימה עילית (שלוש בריכות עוקבות, 1.2X15X6 מטר, בכל אחת מגוון צמחים מזדקרים וצפים) לסלק E2 ו E1 (טווח ריכוזים 55.5-32.8 ו 74.8-73.6 ננוגרם לליטר, בהתאמה) מקולחים שניוניים (ספיקה כ-11.4 מ"ק ליום; זמן שהייה הידראולי של כ-4 ימים). החוקרים מצאו הרחקה נמוכה של E2 (כ-13%) והיעדר הרחקה של E1 במערכת אגנים ירוקים דומה, הכוללת צמחים צפים בלבד (עדשת מים ואצות). הרחקה של E2 במערכת הכוללת צמחים צפים בניגוד להיעדר הרחקה בבריכות עם צמחיה מזדקרת קשורה לדעת החוקרים בהבדלים בהרכב הצומח. בניגוד לממצאים הנ"ל דווח על הרחקה של כ-36% E2 ושל כ-41% EE2 שהוחדרו לתא אגן ירוק בזרימת מים עילית (Gray and Sedlak, 2005). באגן זה (כ-9X83 מטר, עומק כ-0.5 מטר, זמן שהייה הידראולי של כ-3.5 ימים) שממוקם בסמוך ל Prado wetland (הוצגה לעיל) עומדים צפופים של צמחיה מזדקרת. החוקרים מסבירים את ההרחקה של האסטרוגנים במערכת הנ"ל בשילוב תהליכים של ספיחה והמרה ביולוגית. הם מבססים את טיעונם על מידע שהתקבל מדינאמיקה של סמן שמרני ($LiCl_2$) שהוחדר לאגן במקביל לאסטרוגנים בשילוב עם העדר תנאים המתאימים לפירוק פוטו-כימי ועדות להיווצרות והצטברות של E1 (תוצר פירוק ביולוגי של E2). החוקרים מסבירים את היעדר ההתאמה בממצאים הכוללים סילוק אסטרוגנים בתא הנוכחי לבין היעדר סילוקם ב Prado wetland שהוזכרה לעיל (Xie et al., 2005) בצמחיה דלילה יותר הקיימת במערכת השנייה. הם

מציעים כי הצמחייה מספקת שטח פנים להתפתחות של ביופילם, עליו מתרחשים תהליכים של ספיחה ופירוק הביולוגי. במחקר שבוצע בצפון-מרכז טקסס דווח על דעיכה בפעילות אסטרונגית בקולחים שניוניים שטופלו באגן ירוק בזרימה עילית (ספיקה ממוצעת 3 מ"ק בשעה; זמן שהייה הידראולי של 4.3 ימים; Hemming et al., 2001). במערכת הנ"ל, הקולחים (לאחר טיפול בוצה משופעת), הוזרמו למתקן שגודלו 46X46 מטר, שחולק לארבע תעלות (עומק מסנטימטרים ספורים עד 0.6 מטר) בהן מגוון צמחים מזדקרים וצפים. החוקרים דווחו כי ריכוז ויטלוגנין בפלסמה של דגים (Fathead minnow - *Pimephales promelsa*) שנחשפו לקולחים היוצאים מהמערכת היה נמוך בהשוואה לזה שנמצא בדגים שנחשפו לקולחים הנכנסים אליה (פעילות אסטרונגית פחותה). שיעור הרחקה גבוה של E2 ו-EE2 מקולחים שניוניים (כ- 75% ו-89%, בהתאמה), דווח במקרה נוסף של מערכת אגן ירוק בזרימה עילית בקליפורניה (Huang and Sedlak, 2001). במאמר הנ"ל לא ניתן מידע על מאפייני המערכת וההרחקה של האסטרונגים הוסברה במנגנונים "פיסיקליים וביולוגיים".

אגנים בזרימת מים תת-קרקעית אופקית (Horizontal sub-surface flow wetland)

עד כה מצאתי בספרות שתי עבודות בלבד בהן נבחנה הרחקה של אסטרונגים באגן ירוק בזרימה תת-קרקעית אופקית. Peterson and Lanninig (2009) מצאו במערכת אגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אופקית בה מגוון צמחי מים מזדקרים (מימדיי המערכת, ספיקה וזמן שהייה הידראולי מתוארים לעיל במערכת בזרימה עילית) סילוק של E2 בשיעור של כ- 27% והיעדר הרחקה של E1. לדעת החוקרים, ספיחה של E2 והמרה ביולוגית של E1 ל E2 היוו את מנגנוני ההרחקה המרכזיים. במחקר שבוצע באיטליה דווח על הרחקה של אסטרונגים במערכת היברידיה הכוללת תא אגן ירוק בזרימה תת-קרקעית אופקית (160 מ"ר, עומק 0.7 מטר) ובמורדו תא בזרימה תת-קרקעית אנכית (Masi et al., 2004). האגן הירוק הוזן בקולחים באיכות ראשונית, שמקורם במלון בגודל בינוני (ספיקה של בין 17 ל 33 מ"ק ביום). ריכוז האסטרונגים בקולחים הנכנסים למערכת (E2 ו-EE2) היה גבוה ונע בין 164 ל 259 ננוגרם לליטר. בקולחים היוצאים מהתא הראשון (זרימה אופקית) היה ריכוז האסטרונגים נמוך לפחות בסדר גודל (נמוך מסף הזיהוי של 15 ננוגרם בליטר) מאשר בקולחים הנכנסים.

אגנים בזרימת מים תת-קרקעית אנכית (Vertical sub-surface flow wetland)

עד ביצוע המחקר הנוכחי מצאתי בספרות עבודה אחת בלבד שעסקה בסילוק אסטרונגים מקולחים מוניציפאליים באגן ירוק בזרימת מים תת-קרקעית אנכית. במחקר הנ"ל שבוצע ביפן (Song et al., 2009) נבחן סילוק של אסטרונגים במיכלים (0.3X0.5 מטר) המדמים אגנים ירוקים בזרימת מים תת-קרקעית אנכית בהם עומק מצע של 7.5, 30 ו 60 ס"מ. המיכלים נשתלו בצמחיה מזדקרת והוזנו בקולחים שלישוניים בדפוס הזנה מנתי (15 דקות, שטף של 0.15 מ"ק/מ"ר ליום, זמן שהייה הידראולי במיכל בו עומק מצע של 7.5 ס"מ הוא 3.1 שעות). ריכוז E1, E2 ו-EE2 בקולחים היה 0.4-10.5, 1.4 - 9.1 ו 0.6-6.6 ננוגרם לליטר, בהתאמה. במיכל בו 7.5 ס"מ מצע חולי (נקבוביות כ- 26%) מצאו החוקרים הרחקה של E1, E2 ו-EE2 בשיעור ממוצע של כ- 68%±28, 84%±15 ו 75%±18,

בהתאמה. החוקרים מציינים כי היעילות של הרחקת האסטרונגנים במיכלים בהם עומק מצע רב יותר (30 ו 60 ס"מ) הייתה נמוכה מזו של המיכל עם המצע הרדוד למרות שזמן השהייה ההידראולי של הקולחים היה ארוך יותר (12.4 ו 24.8 שעות, בהתאמה). החוקרים הסבירו שהחלק הארי של סילוק האסטרונגנים התרחש בתהליכים ביוטיים הכוללים פירוק והמרה ביולוגיים בשילוב עם קליטה לצומח.

7.3 שיטות וחומרים

דגימות לאנליזה של אסטרונגנים נאספו מקולחים שניוניים של השפד"ן המזיינים את מערכת האגנים הירוקים (במעלה למתקן ויסות ופיזור הזרימה ובמורד לפילטר סינון הקולחים, סעיף 6.3) ובמוצא בריכות אגנים ירוקים (מיכלי האיזון, סעיף 6.3).

הרחקה של אסטרונגנים נבדקה בבריכות בזרימה תת-קרקעית אנכית עם הרכב הצומח הבא: צמחיה מגוונת (בעיקר גומא פפירוס, בריכות 1-1 ו 1-2), צמחיה עשבונית (יבלית, בריכות 1-5 ו 1-6) וללא צומח (בריכות 1-3 ו 1-4). מבנה הבריכות ודפוס הפעלתן מפורט בסעיף 6.3 (איור 6.3.1). דגימות נאספו בעשרה מועדים (דצמבר 2008 עד יוני 2009) מהקולחים הנכנסים והיוצאים מהבריכות הנ"ל. על מנת לבחון את ההשפעה של דפוס זרימה של האגנים הירוקים על יעילות ההרחקה של האסטרונגנים נאספו דגימות בשישה מועדים (בין יוני ליולי 2009) בכניסה ובמוצא בריכות של טור טיפולי מספר 3 (איור 6.3.1). הבריכות כוללות תא בדפוס מבנה תת-קרקעי אנכי ללא צמחיה (בריכה 1-3), במורדה תא בדפוס זרימה תת-קרקעי אופקית ללא צמחיה (בריכה 2-3) ובמורדם בריכה בדפוס זרימה עילית עם מגוון צומח (בריכה 3-3).

הדגימות נאספו בבקבוקי זכוכית כהה (amber) בנפח 2.5 ליטר, שנשטפו מבעוד מועד במים, אתנול ואצטון. לאחר האיסוף אוכסנו הדוגמאות בצידניות והובלו למעבדה בקירור ובחושך. הכנת הדגימות לבדיקה החלה לכל המאוחר שלוש שעות מזמן הדיגום. במעבדה סוננו הקולחים בפילטר סטרילי חד פעמי מסוג PVDF (0.45µ, Millipore). עבור כל בריכה סוננו שלושה ליטר (3 חזרות), ונשמרו בבקבוקי זכוכית כהה (amber) בנפח ליטר אחד. עבור קביעה של שיעור השבה (recovery rate) הוספו בתום סינון של הקולחים השניוניים האסטרונגנים E1, E2, EE2 או MeEE2 לריכוז סופי של 100ng/l (3 חזרות).

מיצוי האסטרונגנים בוצע בטכניקה של SPE (מיצוי בפאזה מוצקה) הכוללת פאזה הפוכה מסוג C18 וניקוי בפאזה ישרה מסוג פלוריסיל (עבור אנליזה של אסטרונגנים טבעיים וסינטטיים) או מיצוי וניקוי במחסנית המשלבת פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים עבור אנליזה של אסטרונגנים טבעיים בלבד (איור 4.1). אנליזה הכוללת הפרדה ב HPLC (Agilent 1100) וכימות ב MS/MS (Finnigan) בוצעו בהתאם לפרוטוקול שפותח כחלק מהעבודה הנוכחית (איור 4.1). הדיגום של האסטרונגנים לווה בניטור משתנים לימנולוגיים (חמצן מומס, טמפרטורה, מוליכות חשמלית וערך הגבה) בקולחים. כמו כן נקבע ריכוז של חומר אורגאני קל פירוק (BOD), מוצקים מרחפים (TSS), אמוניה וניטראט. הנ"ל בוצעו לפי המפורט בסעיף 6.3.5.

אנליזה סטטיסטית

השפעה של הרכב צומח על יעילות הרחקה של אסטרונגנים

הבדל בין ריכוז E1, E2 וריכוז סכום האסטרונגנים בקולחים הנכנסים לבין הריכוז בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון עם וללא צמחים נקבע במבחן oneway ANOVA. המובהקות של כל טיפול בבריכות הנ"ל (בריכות ללא צמחים, עם צמחיה עשבונית או מגוון צמחים) נקבעו במבחן פוסטרורי מסוג Dunnett. הבדלים בריכוז אסטרונגנים בין בריכות המפלס הראשון נקבעו במבחן oneway ANOVA. יעילות ההרחקה נקבעה על בסיס הפרש בין ריכוז האסטרונגנים בקולחים היוצאים מהבריכה לבין ריכוז הממוצע של האסטרונגן בקולחים הנכנסים, בתקופת הדיגום. הבדל ביעילות הרחקה של אסטרונגנים בין בריכות עם מגוון צמחים, עם צמחיה עשבונית וללא צמחים נקבעו במבחן oneway ANOVA.

השפעה של דפוס הזרימה על יעילות הרחקה של אסטרונגנים

הבדלים בריכוז E1, E2 וריכוז סכום האסטרונגנים בקולחים הנכנסים לתא הטיפול במפלס הראשון לבין ריכוזם בקולחים היוצאים מבריכת הטיפול במפלס הראשון, השני והשלישי נקבעו במבחן oneway ANOVA ומבחן פוסטרורי מסוג Tukey.

על מנת לבחון את מידת המתאם בין ריכוז האסטרונגנים לריכוז מזהמי מים קונוונציונאליים (NH_4 , NO_3 , BOD, COD ו pH) בוצעו מבחני קורלציה פרמטריים. לנתונים שלא עמדו בדרישות של ניתוח פרמטרי (כהתפלגות נורמאלית של הנתונים) בוצעו המבחנים הסטטיסטיים לאחר טרנספורמציה (מסוג natural log לנתוני ריכוז האסטרונגנים, נתוני יעילות הרחקה של אסטרונגנים, NO_3 , NH_4 , BOD ו-COD).

7.4 תוצאות

להלן מוצגים ריכוזים של אסטרונגנים שנמצאו בקולחים השניוניים (מזינים את מערכת האגנים הירוקים בשפד"ן); בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון בהן דפוס זרימה תת-קרקעי אנכי והרכב צומח הכולל בריכות ללא צמחיה, עם צמחיה עשבונית ועם מגוון צמחים; ובקולחים היוצאים טור טיפולי הכולל בריכה בזרימה תת-קרקעית אנכית ללא צמחיה, לאחריה בריכה בזרימה תת-קרקעית אופקית ללא צמחיה ובמורד בריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים.

ריכוז אסטרונגנים בקולחים השניוניים

ריכוז האסטרונגן הטבעי E3 וריכוז האסטרונגנים הסינטטיים EE2 ו MeEE2 בקולחים השניוניים של השפד"ן היו נמוכים מסף המדידה בכל הדגימות ($\text{MeEE2} < 2\text{ng/l}$, $\text{EE2} < 2\text{ng/l}$, $\text{E3} < 5\text{ng/l}$; $n=22$). האסטרונגנים הטבעיים E1 ו E2 נמצאו בכל הדגימות ($n=22$, טבלה 7.4.1).

טבלה 7.4.1: ממוצע, סטיית תקן, סטיית תקן יחסית (RSD), חציון וערכי מינימום ומקסימום של ההורמונים E1 ו E2 שנדגמו בקולחים שניוניים של השפד"ן בין מרץ 2008 ליולי 2009 (n=22)*

	E2	E1
Average (ng/l)	10.6	24.2
sd (ng/l)	8.4	14.5
RSD (%)	79.7	60.0
Median (ng/l)	7.7	22.9
Min (ng/l)	3.7	4.9
Max (ng/l)	38.7	64.0

*שעור השבה (recovery rate) של האסטרוגנים הטבעיים והסינטטיים מקולחים שניוניים מוצג בטבלה 5.1 בנספח 2

השפעה של הרכב צומח על יעילות הרחקה של אסטרוגנים

ריכוז E1 ו E2 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלס הראשון (זרימה תת-קרקעית אנכית) עם וללא צמחים מוצג בטבלאות 7.4.2 ו 7.4.3, בהתאמה.

טבלה 7.4.2: ריכוז E2 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלס הראשון, עם מגוון צמחים (בריכות 1 ו 2) עם צומח עשבוני (בריכות 5 ו 6) וללא צמחים (בריכות 3 ו 4) (LOD \leq 1ng/l; LOQ \leq 2ng/l)

Date	Inflow (ng/l)	Outflow (ng/l)					
		pond 1	pond 2	pond 3	pond 4	pond 5	pond 6
02.12.08	7.7	4.1		4.9		4.6	
16.12.08	6.3		≤ 2		4.2		≤ 2
14.01.09	8.0	≤ 2		≤ 1		≤ 2	
28.01.09	5.1		≤ 2		≤ 1		≤ 1
07.06.09	13.2	4.4		5.4		5.9	
09.06.09	11.7		3.6		5.4		3.2
16.06.09	5.1	1.2		8.1		3.9	
17.06.09	10.4		2.4		3.8		3.3
23.06.09	5.4	≤ 2		≤ 1		≤ 2	
24.06.09	4.6		≤ 1		≤ 1		≤ 1

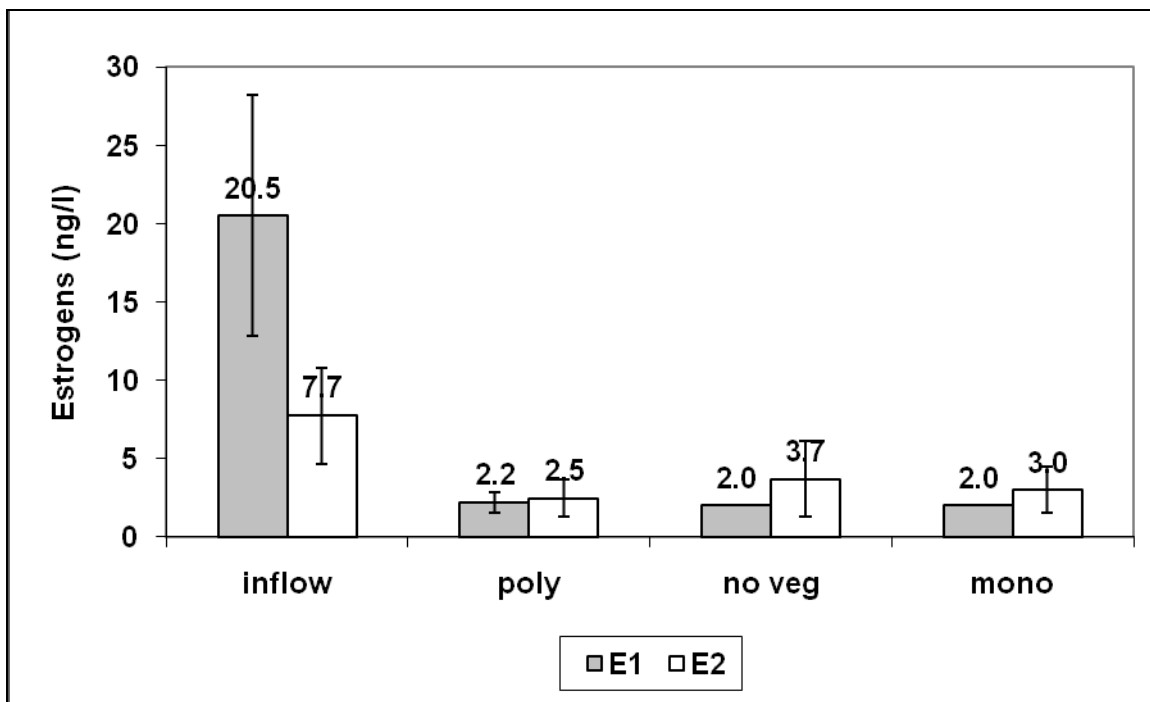
במקרים בהם הריכוז הנמדד היה נמוך מה LOD או ה LOQ חושב שעור ההרחקה על פי ערך ה LOD או ה LOQ (1 ו 2 ננוגרם/לליטר ל E2, בהתאמה או 2 ו 5 ננוגרם/לליטר עבור E1, בהתאמה). ריכוז E1 ו E2 בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון עם צמחיה מגוונת, עשבונית ובריכות ביקורת ללא צומח היה נמוך מאשר בקולחים הנכנסים (Dunnett, $p < 0.001$), עבור כל הרכבי הצומח; (n=10). ריכוז E2 פחת בכמחצית המקרים לריכוז הנמוך מסף הזיהוי או הכימות (טבלה 7.4.2); ריכוז E1 היה נמוך מסף הזיהוי ב כ- 97% מהדגימות (טבלה 7.4.3). בבריכות עם צמחיה מגוונת, עשבונית וללא צמחים היה שעור הרחקה דומה של E2 (לפחות, $68\% \pm 15$, $61\% \pm 19$ ו $52\% \pm 31$, בהתאמה)

ושל E1 (לפחות $89\% \pm 3$, $90\% \pm 0$ ו $90\% \pm 0$, בהתאמה, onway ANOVA, $p > 0.05$, איור 7.4.1).
 שיעור הרכקה ממוצע של ריכוז שני האסטרוגנים הטבעיים (סכום E1 ו E2) הוא לפחות $82\% \pm 7$.

טבלה 7.4.3: ריכוז E1 בקולחים הנכנסים ויוצאים מבריכות המפלס הראשון, עם מגוון צמחים (בריכות 1 ו 2) עם צומח עשבוני (בריכות 5 ו 6) וללא צמחים (בריכות 3 ו 4) ($LOD \leq 2 \text{ ng/l}$; $LOQ \leq 5 \text{ ng/l}$)

Date	Inflow (ng/l)	Outflow (ng/l)					
		pond 1	pond 2	pond 3	pond 4	pond 5	pond 6
02.12.08	23.5	4*		≤ 2		≤ 2	
16.12.08	18.3		≤ 2		≤ 2		≤ 2
14.01.09	37.5	≤ 2		≤ 2		≤ 2	
28.01.09	22.8		≤ 2		≤ 2		≤ 2
07.06.09	24.2	≤ 2		≤ 2		≤ 2	
09.06.09	24.4		≤ 2		≤ 2		≤ 2
16.06.09	14.1	≤ 2		≤ 2		≤ 2	
17.06.09	14.8		≤ 2		≤ 2		≤ 2
23.06.09	15.2	≤ 2		≤ 2		≤ 2	
24.06.09	10.6		≤ 2		≤ 2		≤ 2

* ערך גבוה מ LOD ונמוך מ LOQ עם ערך S/N גבוה מ-9 (ראה שיטות)



איור 7.4.1: ממוצע וסטיית תקן של E2 (לבן) ו E1 (אפור) בקולחים הנכנסים (inflow) ויוצאים מבריכות המפלס הראשון עם מגוון צמחים (poly), ללא צמחיה (no veg) וצמחיה עשבונית (mono). (n=10 samples).

השפעה של דפוס הזרימה על יעילות הרחקה של אסטרוגנים

ריכוז E2 ו E1 בקולחים העוברים שלושה טיפולים בטור (בראשונה זרימת מים תת-קרקעית אנכית ללא צמחיה, לאחריה בריכה בזרימה תת-קרקעית אופקית ללא צמחיה ובמורדה בריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחיה טבולה ומזדקרת) מוצג בטבלאות 7.4.4 ו 7.4.5

טבלה 7.4.4: ריכוז E2 בקולחים שניוניים המזינים את מערכת האגנים הירוקים (inflow) ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית (pond 1.3), זרימה תת-קרקעית אופקית (pond 2.3) ובריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים (pond 3.3). (LOQ≤2ng/l ; LOD≤1ng/l)

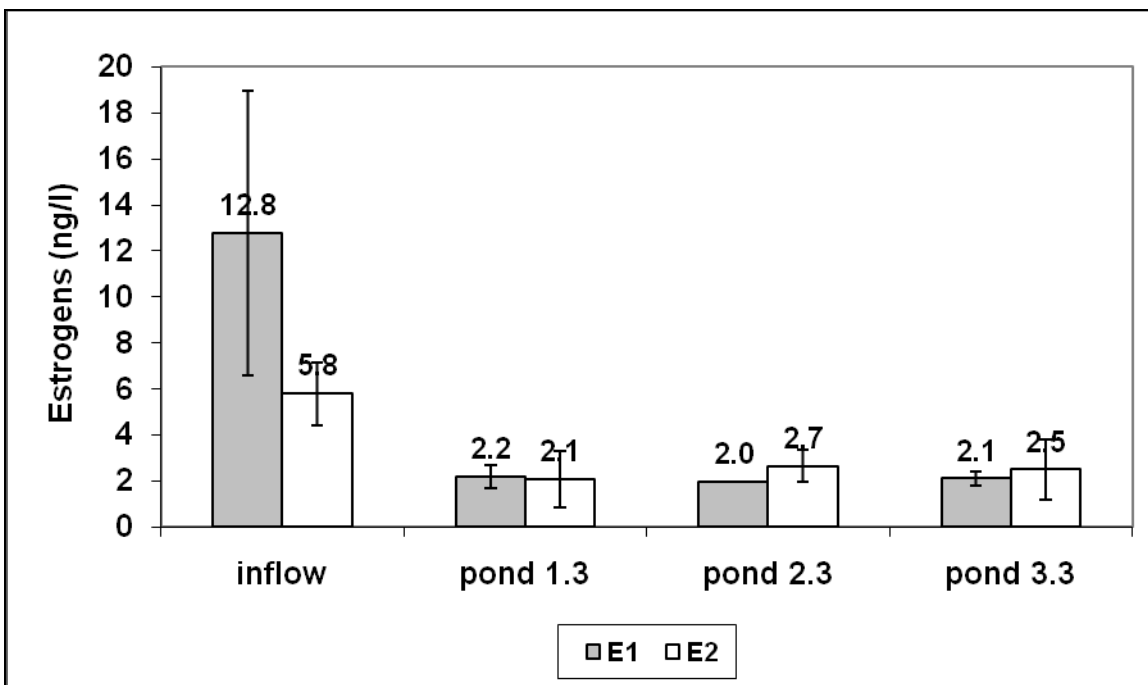
Date	Inflow (ng/l)	Outflow (ng/l)		
		pond 1.3	pond 2.3	pond 3.3
30.06.09	6.0	3.3	3.6	4.9
01.07.09	3.7	2.8	3.2	2.4
05.07.09	7.7	3.5	2.2	2.8
08.07.09	6.6	≤1	2.0	≤1
14.07.09	5.8	≤1	≤2	≤2
15.07.09	5.0	≤1	3.0	≤2

טבלה 7.4.5: ריכוז E1 בקולחים שניוניים המזינים את מערכת האגנים הירוקים (inflow) ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית (pond 1.3), זרימה תת-קרקעית אופקית (pond 2.3) ובריכה בזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים (pond 3.3). (LOQ≤5ng/l ; LOD≤2ng/l)

Date	Inflow (ng/l)	Outflow (ng/l)		
		pond 1.3	pond 2.3	pond 3.3
30.06.09	8.0	3.2*	≤2	≤2
01.07.09	5.0	≤2	≤2	≤2
05.07.09	22.9	≤2	≤2	≤2
08.07.09	14.9	≤2	≤2	2.7*
14.07.09	12.8	≤2	≤2	≤2
15.07.09	13.0	≤2	≤2	≤2

* ערכים גבוהים מ LOD ונמוך מ LOQ עם ערך S/N גבוה מ-9 (ראה שיטות)

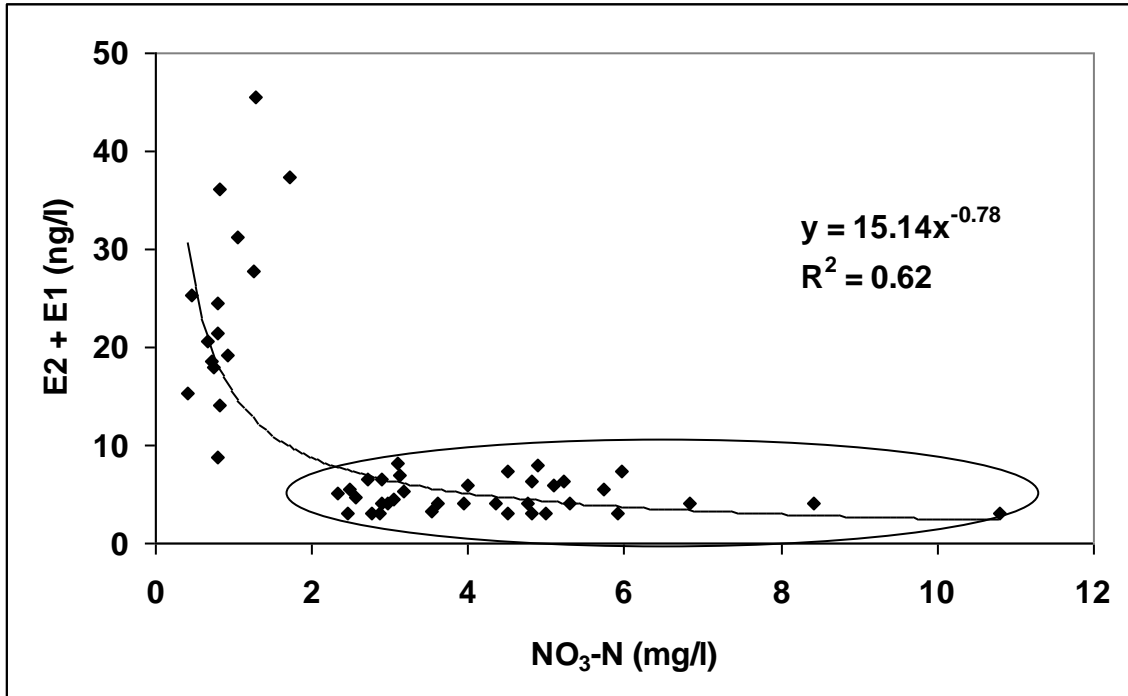
ריכוז E2 ו E1 בקולחים היוצאים מהבריכה הראשונה, בה זרימת הקולחים תת-קרקעית אנכית היה נמוך מריכוזם בקולחים הנכנסים (p<0.001, Tukey). ריכוז האסטרוגן E2 פחת בשיעור של 63%±21; E1 פחת ב- 81%±4 וריכוז של סכום האסטרוגנים E2+E1 פחת בשיעור של 77%±8. ריכוז האסטרוגנים E2 ו E1 בקולחים היוצאים מהבריכה השנייה (זרימה תת-קרקעית אופקית) ומהבריכה השלישית (זרימה עילית) היה דומה לריכוז של האסטרוגנים בקולחים הנכנסים לבריכה השנייה, כלומר לא הייתה הרחקה (p>0.05, Tukey, איור 7.4.2).



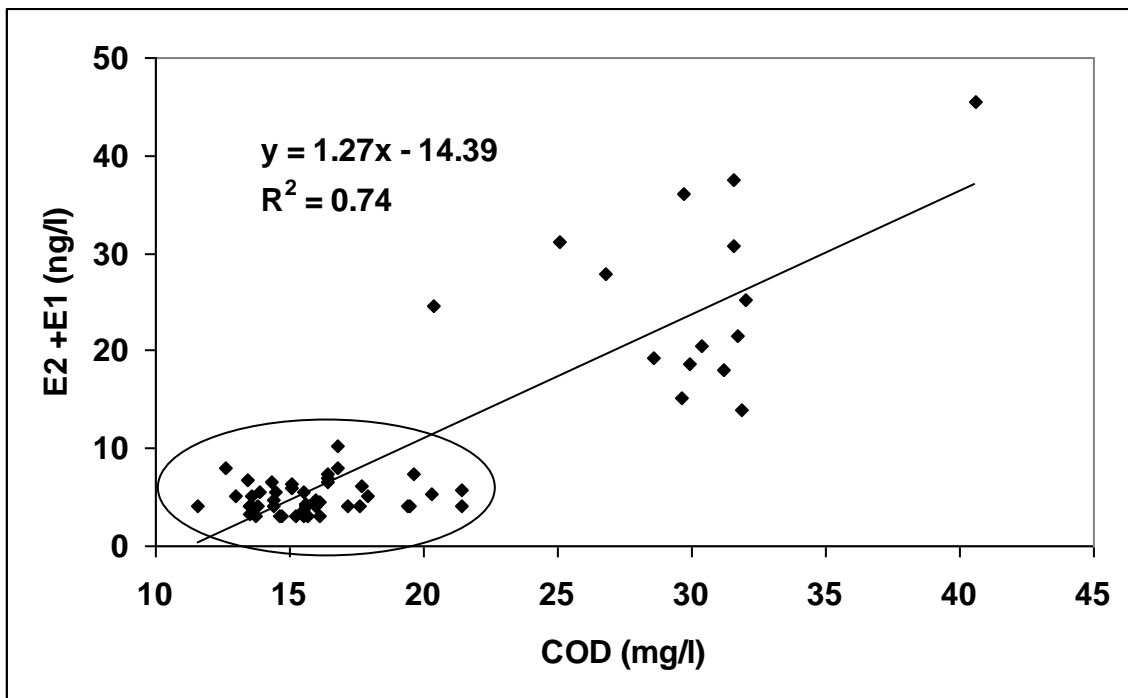
איור 7.4.2: ממוצע וסטיית תקן של E2 (לבן) ו E1 (אפור) בקולחים הנכנסים (inflow) ובמוצא בריכות ללא צומח מוזנות בטור וכוללות זרימה תת-קרקעית אנכית (pond 1.3), זרימה תת-קרקעית אופקית (pond 2.3) ובזרימה עילית עם מגוון צמחים טבולים ומזדקרים (pond 3.3). (n=6 samples)

קשר בין ריכוז של אסטרוגנים למשתנים של איכות המים

בדגימות בהם נקבע ריכוז האסטרוגנים נבדקו גם משתני איכות מים נבחרים שכללו NO_3 , NH_4 , BOD, COD ו pH. נמצא מתאם מובהק ($P < 0.05$, parametric correlation) בין הריכוז הכולל של האסטרוגנים הטבעיים (E2+E1) בקולחים הנכנסים לבריכות האגנים הירוקים והיוצאים מהם לבין ריכוז של NO_3 (איור 7.4.3), NH_4 , BOD ו COD (איור 7.4.4). לא נמצא מתאם בין הריכוז הכולל של האסטרוגנים הטבעיים לבין ערך ההגבה ($p=0.81$).



איור 7.4.3: הקשר בין סכום הריכוזים של E1 ו E2 לריכוז ניטראט (NO₃-N) בקולחים הנכנסים ויוצאים (תחומים בעיגול) מבריכות הניסוי. משוואה ומקדם המתאם (R²) מוצגים.



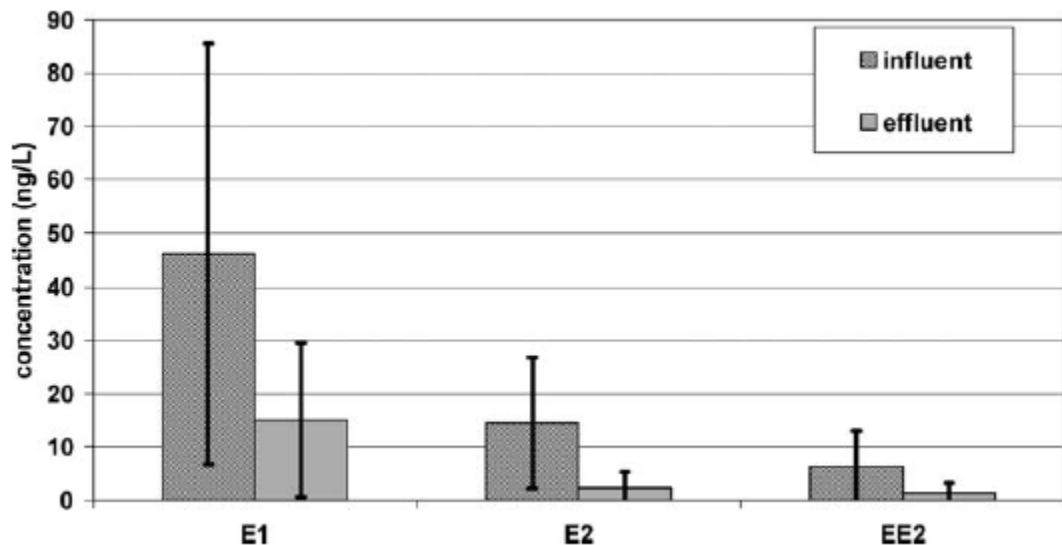
איור 7.4.4: ריכוז E1 ו E2 כתלות בריכוז צריכת חמצן כימית (COD) בקולחים שניוניים המזינים את מערכת האגנים הירוקים במוצא בריכות טיפול אגנים ירוקים (תחומים בעיגול) הכוללות זרימה תת קרקעית אנכית, אופקית ועילית. משוואה המציגה את הקשר ומקדם המתאם (R²) מוצגים.

7.5 דיון ומסקנות

7.5.1 אסטרוגנים בקולחים שניוניים

אסטרוגנים נותרים בקולחים בתום טיפול שניוני (ביולוגי) בשפכים (למשל, מחקר נוכחי; de Mes et al., 2005; Liu et al., 2009). קיימת שונות גבוהה בריכוז אסטרוגנים בקולחים של מפעלים שונים לטיפול בשפכים (למשל, $>0.1-88$, $>0.1-220$, $>0.1-42$ ו $>0.05-62$ ננוגרם בליטר, עבור E3, E1, E2 ו EE2, בהתאמה; Bachmann Christiansen et al., 2002). זאת ככל הנראה בשל שוני בטכנולוגיה, במשתני ההפעלה ובתנאי האקלים בין מפעלים לטיפול בשפכים (Bachmann Christiansen et al., 2002; de Mes et al., 2005; Liu et al., 2009). כמו כן קיימת שונות גבוהה בריכוז האסטרוגנים בקולחים של מפעל נתון (למשל, מחקר נוכחי $RSD \geq 60\%$). שונות זו ניתנת להסבר בהבדלים עונתיים (למשל הבדלים עונתיים בטמפרטורה, משקעים וקרינה), הבדלים בתנאי הפעלה (למשל הבדל בזמן שהיה של הקולחים או הנוצה) ובמאפיינים של הקולחים (Bachmann Christiansen et al., 2002). Kolodziej et al., (2003) מדווח על שינויים של עד כסדר גודל בריכוז אסטרוגנים במוצא של מפעל לטיפול בשפכים בטווח של 24 שעות.

מבין האסטרוגנים הטבעיים, ריכוז E1 בקולחים השניוניים כפול מזה של E2 (מחקר נוכחי: 24.2 ± 15.5 ו 10.6 ± 8.4 ננוגרם בליטר, בהתאמה) וריכוז E3 נמוך מסף המדידה (≤ 5 ננוגרם בליטר). ריכוז האסטרוגנים הסינתטיים EE2 ו MeEE2 היה נמוך מסף המדידה (≤ 2 ננוגרם בליטר). יחסים דומים לני"ל בין ריכוז האסטרוגנים הטבעיים והסינתטיים בקולחים דווחו במחקרים אחרים (Bachmann Christiansen et al., 2002; de Mes et al., 2005). כך למשל (de Mes et al., 2005) מצאו ריכוז גבוה של E1 בהשוואה ל E2 וריכוז נמוך של EE2 בקולחים שניוניים של 70 מפעלים לטיפול בשפכים באיטליה, הולנד, צרפת, גרמניה, ספרד, ישראל, יפן, קנדה וארה"ב (איור 7.5.1).



איור 7.5.1: ריכוז אסטרוגנים בשפכים (עמודה שמאלית) וקולחים (מתוך de Mes., et al., 2005)

דומיננטיות של האסטרוגן E1 בקולחים בהשוואה ל E2 ניתנת להסבר בעובדה שריכוזו בשפכים גבוה יותר (Baronti et al., 2000; Joss et al., 2004; Johnson et al., 2007) וביעילות הרחקה נמוכה מזו של E2 (Khanal et al., 2006). הוצע שיעילות הרחקה הנמוכה של E1 קשורה בשחרור איטי של האסטרוגן מהנשאים ובהמרה ביולוגית של E2 ל E1 (Baronti et al., 2000; Johnson and Sumpter, 2001). גם העדרו של האסטרוגן הסינטטי EE2 מהקולחים השניוניים במחקר הנוכחי יכולה להיות מוסברת בריכוזו הנמוך בקולחים. בסקר שכלל 47 מפעלים לטיפול בשפכים ב-13 מחוזות שונים ביפן לא נמצאה עדות לנוכחות EE2 בקולחים (Yoshimoto et al., 2004). ריכוז נמוך של EE2 בקולחים (1-0.1 ננוגרם בליטר) דווח במפעלים אחרים (Baronti et al., 2000; Bachmann and Christiansen et al., 2002). במקרים בהם ריכוזו היה גבוה מהנ"ל הוא לא חרג, במרבית המקרים, מ-5 ננוגרם בליטר (Falconer et al., 2006; Liu et al., 2009).

7.5.2 הרחקת אסטרוגנים בטכנולוגיה של אגנים ירוקים

במחקר הנוכחי נבחן שעור הרחקה של אסטרוגנים טבעיים מקולחים שניוניים באיכות גבוהה באמצעות במערכת אגנים ירוקים היברידיים. הרחקה של אסטרוגנים בשיעור העולה על 60% E2 ו-80% E1 נמדדה בבריכות הטיפול הראשון בהן זרימת הקולחים היא תת-קרקעית אנכית. כאמור, בשמונה מחקרים בלבד קיימים נתונים על הרחקה של אסטרוגנים מקולחים עירוניים על ידי אגנים ירוקים (טבלה 7.5.1).

חמישה מחקרים בחנו הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים בזרימה עילית. שלושה מהם מדווחים על העדר הרחקה משמעותית של אסטרוגנים (0 עד כ-15%; Kolodziej et al., 2003; Peterson and Lanning, 2009; טבלה 7.5.1) או הרחקה של פעילות אסטרוגנית (Xie et al., 2005). מחקר אחד מדווח על סילוק בינוני של E2 ו EE2 (כ-40%; Gray and Sedlak, 2005; טבלה 7.5.1) ובעבודה אחת שעור ההרחקה של E2 ו EE2 היה גבוה (>75%; Huang and Sedlak, 2001; טבלה 7.5.1).

שני מחקרים בחנו הרחקה של אסטרוגנים באגנים בזרימה תת-קרקעית אופקית, באחד שעור ההרחקה של E2 ו E1 היה נמוך יחסית (אינו עולה על 30%; Peterson and Lanning, 2009) ובשני סילוק של $17\alpha E2$ ו EE2 היה גבוה (>90%; Masi et al., 2004; טבלה 7.5.1).

ראוי לציין כי עד למחקר הנוכחי, מחקר אחד בלבד בחן הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית (ניסויי מיכלים; Song et al., 2009) ודווח על הרחקה יעילה יחסית של E1, E2 ו EE2 (68%-84%). במחקר הנ"ל (Song et al., 2009) ובמחקר הנוכחי ההזנה של הקולחים הייתה בפעימות (pulses) וזמן השהייה של הקולחים קצר יחסית (שעות).

במחקר הנוכחי (ניסויי שטח) ההרחקה של האסטרוגן E1 הייתה גבוהה מאשר של E2 (פי 1.3-1.5). תוצאות אלו אינן תואמות את המצופה על פי ניסויי המעבדה של המחקר הנוכחי בהן קצב הפירוק של E2 היה מהיר יותר מאשר של E1 (טבלה 5.5.1). שעור הרחקה גבוה יותר של E2 מאשר של E1 דווח

גם במחקרם של Song et al. (2009; פי 1.2; טבלה 7.5.1). הסבר אפשרי לשעור ההרחקה הנמוך יחסית של E2 לעומת E1 במחקר השטח הנוכחי הוא בעובדה שריכוז E1 בקולחים היה גבוה בהשוואה ל E2 (טבלה 7.4.1).

טבלה 7.5.1: שעור הרחקה של אסטרוגנים (או פעילות אסטרוגנית) באגנים ירוקים בזרימה עילית, תת קרקעית אופקית ואנכית. כמו כן מידע על גודל האגן, הרכב הצומח וריכוז האסטרוגנים בקולחים הנכנסים

System characteristics	Vegetation	Inflow estrogens concentration	Removal efficiency	Reference
Surface flow constructed wetlands				
Full scale; 50 ponds (size not elaborated); 0.8-0.9m depth	With vegetation	29.8 ng/l VTG E2 equivalent 2.5 ng/l yeast estrogen screening E2 equivalent	Insignificant removal of estrogenic activity	Xie et al., 2004
Shallow interconnected ponds; size not elaborated	With vegetation	No data	No significant removal	Kolodziej et al., 2003
One cell; 6X5 m; 0.5m depth	Emergent and submerged	E2: 2-3.6 ng/l	E2: No removal	Current study
3 consecutive cells, 6X15; 1.2m depth	Emergent	E2: 32.8-55.5 ng/l E1: 73.6-74.8 ng/l	E2: no removal E1: no removal	Peterson and Lanning, 2009
3 consecutive cells, 6X15; 1.2m depth	Floating	E2: 32.8-55.5 ng/l E1: 73.6-74.8 ng/l	E2: 13% E1: no removal	Peterson and Lanning, 2009
One cell; 83X9m; 0.5m depth	Emergent	Spiked estrogen	E2: 36% EE2: 41%	Gray and Sedlak, 2005
Wetland system; 46X46m separated into lanes	Emergent and floating	EE2: found in 3 out of 4 samples; 0.2-0.9µg/l Nonylphenol: 1-22 µg/l	removal of estrogenicity (vitellogen in plasma of male fathead minnow - <i>Pimephales promelas</i>)	Hemming et al., 2001
No data	No data	E2: 0.2 ng/l EE2: 0.7 ng/l	E2: 75% EE2: 89%	Huang and Sedlak, 2001
Horizontal subsurface flow constructed wetlands				
One cell; 6X5 m; 0.6m depth	No vegetation	E2: ≤1-3.5 ng/l	E2: No removal	Current study
3 consecutive cells, 6X15; 1.2m depth	Emergent	E2: 32.8-55.5 ng/l E1: 73.6-74.8	E2: 27% E1: no removal	Peterson and Lanning, 2009

		ng/l		
On cell 160m ² ; 0.7m depth	Emergent	17 α -E2 and EE2: 164 to 259ng/l	17 α -E2 and EE2: >90%	Masi et al., 2004
Vertical subsurface flow constructed wetlands				
Tanks 0.5X0.3m; 0.3m depth	Emergent	E2: 1.4-9.1 ng/l E1: 0.1-10.5 ng/l EE2: 0.6-6.6 ng/l	E2: 84% E1: 68% EE2: 75%	Song et al., 20089
Average of 6 parallel cells 5X6m; 0.7m depth	No vegetation, grass or emergent	E2: 4.6-13.2 ng/l E1: 10.6-37.5 ng/l	E2: >60% E1: >90%	Current study
One cell 5X6m; 0.7m depth	No vegetation	E2: 3.7-7.7 ng/l E1: 4.9-22.9 ng/l	E2: >63% E1: >81%	Current study

המידע המועט הקיים עד כה מעיד על שונות גבוהה ביעילות הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים. שונות זו ניתנת להסבר בחלקה באסטרוגנים שונים, בדפוסי מבנה וזרימה שונים של האגנים הירוקים (יעילי, תת-קרקעי אופקי או אנכי), הבדלים בעומס האסטרוגנים, בתנאי הפעלה ובתנאי האקלים. בהשוואה למידע הקיים, שעור ההרחקה של אסטרוגנים בבריכות המודל בזרימה תת-קרקעית אנכית בשפד"ן הוא גבוה יחסית ודומה לטווח הרחקה שדווח במודל אגנים ירוקים בדפוס זרימה דומה (Song et al., 2009; טבלה 7.5.1).

בתנאי המחקר הנוכחי לא הייתה הרחקה נוספת של אסטרוגנים באמצעות טיפול נוסף בבריכה בזרימה תת-קרקעית אופקית ובבריכה בזרימה עילית. עובדה זו ניתנת להסבר בשתי אפשרויות. האחת בקשר החיובי הקיים בין עומס מזהמים לבין שעור הרחקתם (Ayaz, 2006; Tuncsiper, 2008). כלומר, לאחר ההרחקה בטיפול הראשון העומס הנותר של האסטרוגנים היה נמוך ויעילות ההרחקה פחתה באופן משמעותי. אכן נמצא כי עומס E1 ו E2 בבריכות הטיפול במפלס השני היה נמוך פי 2.8 ו 5.8, בהתאמה, מאשר במפלס הראשון (848 ו 1866 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{year}$, בהתאמה). תופעה דומה נצפתה בהרחקה של חומר אורגני קל פירוק (BOD). עומס ה-BOD בבריכות המפלס השני היה נמוך פי 3 מאשר בבריכות המפלס הראשון ושעור ההרחקה של ה-BOD פחת מ-66% בטיפול הראשון להעדר הרחקה בבריכות הטיפול במפלס השני (טבלה 6.5.1).

הסבר אפשרי נוסף להרחקה יעילה בטיפול הראשון בזרימה אנכית הוא בהשפעה של דפוס הזרימה על תנאי החמצן וכתוצאה מכך על שעור הפירוק הביולוגי של האסטרוגנים. בבריכות בדפוס זרימה תת-קרקעית אנכית התנאים אירוביים ותומכים בתהליכים של פירוק ביולוגי אירובי (Kadlec and Wallace, 2008). פירוק ביולוגי של אסטרוגנים בתנאים אירוביים גבוה מאשר בתנאים היפוקסיים או אנאירוביים. ממצא זה נתמך בתוצאות ניסויי המעבדה אשר הראו כי פירוק ביולוגי של אסטרוגנים באמצעות ביופילם שמקורו באגנים ירוקים מתקיים בעיקר בתנאים אירוביים (סעיף 5.4; דיון 5.5). כמו כן נמצאה הרחקה גבוהה יותר של אסטרוגנים בתנאים אירוביים מאשר באנאירוביים בקולחים המטופלים במפעלים קונבנציונאליים לטיפול בשפכים (Andersen et al., 2002; Lee et Liu, 2002).

(al., 2004; Liu et al., 2009). בבריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית או זרימה עילית ריכוז החמצן נמוך בהשוואה לזה הקיים בזרימה תת-קרקעית אנכית (Vymazal, 2003a; Kadlec, 2009) ולכן צפויה בהם הרחקה נמוכה יחסית של אסטרונגנים. תימוכין למסקנה זו קיים גם בתצפית כי סילוק של אסטרונגנים פוחת באגן ירוק בזרימת מים אנכית בתנאים רוויים בהשוואה לבלתי רוויים (Song et al., 2009). חיזוק אחר לטענה זו הוא הרחקה יעילה גם של תרופות ותוצרי טיפוח אישי באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית (Matamoros et al., 2007). כך למשל מתוך 13 תרופות ותוצרי טיפוח אישי הורחקו שמונה תרכובות (methyl dehydrojasmonate, salicylic acid, caffeine, OH-ibuprofen ו ibuprofen, oxybenzone, hydrocinnamic acid, CA-ibuprofen) ביעילות הגבוהה מ- 95% באגן ירוק עם זרימה אנכית. ארבעה תרכובות סולקו ביעילות של בין 70 ל- 90% (galaxolide, diclofenac, naproxen ו tonalide) ותרכובת אחת בלבד (carbamazepine) הורחקה ביעילות נמוכה מ- 30%. יעילות ההרחקה של החומרים הנ"ל באגן הירוק עם דפוס הזרימה האנכי גבוהה מאשר באגן ירוק עם דפוס זרימה תת-קרקעי אופקי (Matamoros and Bayona, 2006; Matamoros et al., 2007) ומעידה כי גם הרחקה של תרופות רבות מתקיימת בתנאים אירוביים (Zwiener and Frimmel, 2003; Yu et al., 2006). עדות נוספת לדומיננטיות של מנגנון פירוק ביולוגי אירובי היא מתאם חיובי בין שיעור סילוק של תרופות ותוצרי טיפוח אישי לבין ריכוז חמצן באגן הירוק (Matamoros et al., 2007). גם במחקר הנוכחי נמצא קשר מובהק בין שיעור הרחקה של אסטרונגנים לבין זה של חומר אורגני קל פירוק ואמוניה המסולקים באגנים ירוקים בעיקר בתהליכים ביולוגיים המתקיימים בתנאים עשירים בחמצן. מתאם דומה דווח גם במקרה של הרחקה של חומרים ממקור רפואי (Matamoros et al., 2007).

היעדר הרחקה של אסטרונגנים בבריכות בזרימה תת-קרקעית אופקית ובזרימה עילית במחקר הנוכחי עשוי לרמוז כי בתנאי הניסוי למנגנון של ספיחה היה תפקיד שולי בהרחקה של אסטרונגנים. הנחה זו נתמכת במחקרים אחרים בהם לא הייתה הרחקה משמעותית של אסטרונגנים באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי אופקי (Peterson and Lanning, 2009) ובזרימה עילית (Kolodziej et al., 2003; Xie et al., 2005; Peterson and Lanning, 2009). הרחקה גבוהה של אסטרונגנים בתא בזרימת מים תת-קרקעית אופקית (מעל 90%), שדווח ע"י Masi et al. (2004) סותר את המסקנה הנ"ל. אולם, במחקר זה נבחן סילוק של אסטרונגנים מקולחים ראשוניים בהם ריכוז האסטרונגנים כמו גם ריכוז המוצקים המרחפים היה גבוה. ניתן להניח כי האסטרונגנים נספחו לחלקיקים המרחפים ואלו הורחקו באגן הירוק במנגנון של סינון וסדימנטציה. כמו כן ראוי לציין כי רגישות השיטה במחקר הנ"ל היא 15 ננוגרם לליטר, לכן לא היה בידי החוקרים אפשרות לבדוק נוכחות של ריכוז שארית גבוהה יחסית של אסטרונגנים במוצא התא עם הזרימה האופקית. בתנאים של ריכוז חמצן נמוך או היעדר חמצן המאפיינים אגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי אופקי או עילי חשיבות הפירוק הביולוגי פוחתת וחשיבות הספיחה עשויה לעלות. התרומה של מנגנון

הספיחה להרחקה של אסטרוגנים עשויה לגדול באגנים ירוקים בהם זרימה עילית, שטח פנים רב ומצע עשיר בחומר אורגני (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003; White et al., 2006). העדר הרחקה או שעור הרחקה נמוך של אסטרוגנים בבריכה בזרימה עילית עשוי לרמוז כי למנגנון של פירוק פוטו-כימי חשיבות שולית בהרחקה של אסטרוגנים. טענה זו נטענת גם על ידי Gray and Sedlak, (2005) ונתמכת על ידי אחרים בשיעור הרחקה נמוך של E2 בקולחים לאחר חשיפה של 24 שעות לשמש (Mansell et al., 2004). ניתן לצפות כי חשיבות פירוק פוטו-כימי של אסטרוגנים באגנים ירוקים יהיה נמוך עוד יותר ככל שעכירות המים עולה וככל שהקרינה פוחתת כתוצאה מהצללה על ידי הצומח (Gray and Sedlak, 2005; White et al., 2006).

תפקיד הצומח בסילוק אסטרוגנים באגנים ירוקים נותר מעורפל. קליטה לצומח של אסטרוגנים אינה נחשבת כמנגנון סילוק מרכזי (Matamoros et al., 2007). מאידך, נטען כי נוכחות צומח תורמת להרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים בדפוס זרימה עילי (Gray and Sedlak, 2005; Peterson and Lamming, 2009). הוצע שגם באגנים בדפוס זרימה תת-קרקעי לצמחיה יש השפעה חיובית על הרחקה של אסטרוגנים, זאת באמצעות שורשים צפופים המגדילים את שטח הפנים הזמין להתפתחות ביופילם ולספיחה של מזהמים (Song et al., 2009). יתרה מכך, טוענים Song et al., (2009) שהצמחיה מעלה את ריכוז החמצן בריזוספירה, מפרישה מוטמעים המנוצלים על ידי מיקרואורגניזמים המפרקים את האסטרוגנים וקולטת אסטרוגנים הנאגרים ברקמות הצמח. בניגוד לכך, בעבודה הנוכחית נמצאה יעילות הרחקה דומה של אסטרוגנים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית השתולים במגוון צמחים עם ביומסה גבוהה, באגנים עם צמחיה עשבונית או חסרים צמחים. בהתאם אנו מייחסים את ההרחקה של האסטרוגנים לפעילות הביולוגית של ביופילם המתפתח על מצע האגן. ממצאי מחקר אחר המצביע על שעור הרחקה דומה של תרופות ותוצרי טיפוח אישי באגן ירוק בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי שתול בצמחיה לבין זה שהתקבל בפילטר חול בזרימה אנכית בלתי רוויה (Matamoros et al., 2007) תומך בטענתנו.

מרבית החוקרים מייחסים את סילוק האסטרוגנים באגנים ירוקים למנגנונים של ספיחה ופירוק ביולוגי, ללא עדות ישירה (Huang and Sedlak, 2001; Gray and Sedlak, 2005; Peterson and Lanninig, 2009; Song et al., 2009). בהתאם החוקרים מציעים לשפר את שעור ההרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים באמצעות העצמה של המנגנונים הנ"ל. למשל, הגדלה של צפיפות הצומח מאחר והצמחים מספקים שטח פנים להתפתחות ביופילם התורם אתרים לספיחה ולהתיישבות מיקרואורגניזמים המעורבים בפירוק האסטרוגנים (Brix 1997; Gray and Sedlak, 2005). הוצע גם להפחית את עומק המים באגן כך שכמות גדולה יותר של קולחים תזרום דרך אזור השורשים והסדימנט (Gray and Sedlak, 2005) ולהאריך את זמן השהייה ההידראולי (Gray and Sedlak, 2005) המאפשר זמן ריאקציה ארוך יותר של ספיחה ופירוק ביולוגי. בהקשר האחרון, נטען שסילוק

יעיל של אסטרוגנים באגנים בדפוס זרימה עילי יתקיים כאשר משך השהייה של הקולחים באגן הוא מספר חודשים (Matamoros and Bayona, 2008). לדעתנו הארכה של זמן השהייה ההידראולי לחודשים הופכת את הטכנולוגיה של אגנים ירוקים לבלתי אטרקטיבית משום שהוא מחייב שטח אגנים גדול. על פי ממצאי המחקר הנוכחי ניתן לצפות לשיפור של יכולת סילוק האסטרוגנים באגנים ירוקים בדפוס של זרימה עילית או תת-קרקעית אופקית באמצעות שיפור בתנאי החמצן למשל על ידי אוורור הקולחים.

8. דיון כללי מסכם ומסקנות

חלקו הראשון של פרק זה מוקדש לסיכום ממצאי המחקר, מסקנות והמלצות למבנה ותפעול אגנים ירוקים המיועדים להרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים ומיקרו-מזהמים מקבוצת האסטרונגנים. החלק השני דן באפשרויות לשימוש חוזר בקולחים לאחר טיפול באגנים הירוקים.

8.1 שאריות מזהמים בקולחים לאחר טיפול קונבנציונאלי

כמות השפכים העירוניים שיוצרה בישראל בשנת 2008 מוערכת בכ- 460 מיליון מ"ק (רט"ג, 2008). מרבית הקולחים (>90%) נאספים ומטופלים (רט"ג, 2008) בעיקר במפעלים אינטנסיביים לטיפול בשפכים. התכנון של מפעלים לטיפול בשפכים מתבסס על הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים כחומר אורגאני, חלקיקים מרחפים ולעיתים גם תרכובות חנקן וזרחן (Larsen et al., 2004; US EPA, 2004; Schröder et al., 2007; Bolong et al., 2009). בישראל, מרבית הקולחים (כ-70%) מטופלים לאיכות שניונית בלבד או נמוכה יותר (המשרד להגנת הסביבה, <http://www.sviva.gov.il>). כך למשל, בניטור של איכות הקולחים שבוצע בישראל בשנת 2004 ב- 48 מפעלים לטיפול בשפכים דווח על ריכוז של חומר אורגאני קל פירוק (BOD) ומוצקים מרחפים (TSS) גבוה מ- 20 ו 30 מ"ג/ליטר, בהתאמה, ב- 60% מהדגימות וריכוז החנקן (kjeldahl) היה גבוה מ- 50 מ"ג/ליטר ב- 40% מהדגימות (רט"ג, 2005).

המשתנים התכנוניים של המפעלים לטיפול בשפכים אינם כוללים הרחקה של מיקרו-מזהמים כדוגמת תרכובות אורגאניות ספציפיות: אסטרונגנים, משבשי פעילות אסטרונגנית, תרופות או תוצרי טיפוח אישי (Schröder et al., 2007; Bolong et al., 2009). תרכובות אלו נותרות בקולחים בתום טיפוח שניוני (ביולוגי) בריכוזים שבין ננוגרם ועד מיקרו-גרם בליטר (Heberer, 2002a; Ternes et al., 2003; de Mes et al., 2005; Khanal et al., 2006; White et al., 2006; Liu et al., 2009). הזרמה של הקולחים לנחלים, שימוש חוזר להשקיה חקלאית, השקיה של פארקים וכדומה מוצאים המזהמים הקונבנציונאליים והמיקרו-מזהמים את דרכם לסביבה (US EPA 2004; Toze, 2006b; Hamilton et al., 2007; Avisar et al., 2009). הסביבה, החי והאדם (Greenway, 2005; Ghermandi et al., 2007; Hotchkiss et al., 2008; Bolong et al., 2009; Yeh and Wu, 2009). ניתן לצמצם את ההשפעות השליליות של מזהמי המים הקונבנציונאליים והמיקרו-מזהמים על הסביבה ועל בריאות האדם באמצעות הרחקתם מהקולחים לפני הזרמתם לסביבה (Liu et al., 2009). צמצום ההשפעות השליליות ניתן להשגה למשל באמצעות שילוב של טכנולוגיות משלימות לטיפול בשפכים כטיפוליים שלישוניים או רביעונים (Ghermandi et al., 2010; Lester et al., 2008; Llorens et al., 2009; Avisar et al., 2010).

בעבודה הנוכחית נבחנה התאמה של טכנולוגיה של אגנים ירוקים ללטש קולחים באיכות גבוהה יחסית (קולחים שניוניים המופקים במט"ש השפד"ן) באמצעות הרחקה של מזהמי מים

קונבנציונאליים נבחרים (חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט, חנקן כללי וזרחן מומס) ומיקרו-מזהמים מקבוצת האסטרונגים.

8.2 הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים

אגנים ירוקים היברידיים (שילוב של דפוסי מבנה וזרימה) יכולים לשפר איכות של קולחים שניוניים גם כאשר איכות הקולחים גבוהה יחסית (ליטוש קולחים). זאת באמצעות הרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים, אמוניה, ניטראט וחנקן כללי. יכולת ההרחקה של זרחן באגנים ירוקים מוגבלת (למשל, מחקר נוכחי, Yeh and Wu, 2009; Greenway, 2005).

לדפוס המבנה והזרימה של האגן הירוק (זרימה עילית או תת-קרקעית ומערכת יחידנית או היברידיית) קיימת השפעה על יעילות הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים. ניתן להסביר את הקשר הנייל בתנאים סביבתיים שונים הקיימים בדפוסי מבנה וזרימה שונים של אגנים ירוקים ומאפשרים קיומם של מנגנוני הרחקה שונים. כך למשל, הרחקה יעילה של חומר אורגאני קל פירוק ואמוניה קשורים בפעילות מיקרוביאלית אירובית (פירוק וניטריפיקציה) המתרחשת בעיקר באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית (למשל, Vymazal, 2003b). זאת משום שבאגנים אלו קיימים תנאים אירוביים ומצע התומך בהתפתחות ביומסה גבוהה של מיקרואורגאניזמים. הרחקה יעילה של ניטראט קשורה בפעילות מיקרוביאלית אנאירובית (דניטריפיקציה) וצפויה לכן להיות מיטבית באגנים ירוקים העניים בחמצן ובהם שטח הפנים להתפתחות הביופילם גדול. תנאים אלה קיימים למשל באגנים בזרימה עילית או תת-קרקעית אופקית (למשל, Vymazal, 2007).

למערכת אגנים ירוקים המשלבת מספר דפוסים של מבנה וזרימה (מערכת היברידיית) יתרון על פני אגן ירוק בדפוס מבנה יחיד. זאת משום שבמערכת היברידיית ניתן לשלב בריכות בהן תנאים שונים (למשל, תנאים אירוביים והיפוקסיים, Haberl et al., 2003) ולאפשר הרחקה של מגוון גדול יותר של מזהמים (מחקר נוכחי; Vymazal, 2009; Lin et al., 2002). יתרה מכך, במערכת ההיברידיית ניתן להרחיק ביעילות גם מזהמים שמנגנון הרחקתם קשור ברצף המרות ביולוגיות המתקיימות בתנאים שונים, למשל, הרחקה של חנקן כללי המתרחשת בעיקר ברצף של ניטריפיקציה ודניטריפיקציה (מחקר נוכחי; Yeh and Wu, 2009; Lin et al., 2002).

בנוסף לדפוס המבנה של האגן הירוק מושפעת יעילות הרחקה של המזהמים גם מתקופת בשלות המערכת, נוכחות וסוג הצומח ומאיכות הקולחים המטופלים (הרכב וריכוז המזהמים). מידת ההשפעה של גורמים אלו שונה בטיפוסים שונים של אגנים ירוקים.

השפעה של מצב הבשלות

למצב בשלות המערכת קיימת השפעה חיובית על יעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ואמוניה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (מחקר נוכחי; Wang et al., 2005) והשפעה שלילית על יעילות הרחקה של זרחן (Lin et al., 2002; Yeh and Wu, 2009). שיפור ביעילות הרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ואמוניה מוסבר בהתפתחות ובהתבססות של האוכלוסייה המיקרוביאלית והמקרופיטית (Wang et al., 2005). דעיכה ביעילות הרחקה של זרחן מוסברת ברוויה של אתרי ספיחה של זרחן

במצע האגן (למשל, Verhoeven and Meuleman, 1999; Lin et al., 2002) וככל הנראה גם כתוצאה מהתמתנות קצב התפתחות הצומח. במחקר הנוכחי ובאחרים (Greenway and Woolley, 1999) קיימת עדות להשפעה שלילית של תקופת הבשלות על יעילות הרחקה של זרחן גם באגנים ירוקים בזרימה עילית. ניתן להסביר את הדעיכה ביעילות ההרחקה של הזרחן באגנים אלו בהתמתנות קצב התפתחות הצומח, בשינויים בהרכב הצמחייה ובתרומה של זרחן מחומר צמחי נרקב (סעיף 6.5).

השפעה של נוכחות והרכב הצומח

מידת התרומה של נוכחות והרכב הצומח להרחקה של מזהמים באגנים ירוקים עדיין אינה ברורה. בכנס WETPOL (International Symposium on Wetland Pollution Dynamics and Control) שהתקיים בשנת 2007 באסטוניה הוצגו ממצאים סותרים על מידת התרומה של הצמחים לשיפור איכות המים באגנים הירוקים (Mander and Mitsch, 2009).

במחקר הנוכחי קיימת עדות כי בתנאי המחקר (איכות קולחים גבוהה) לנוכחות ולהרכב הצומח אין השפעה או קיימת השפעה נמוכה על יעילות הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית ובעיקר בזרימה תת-קרקעית אנכית. ניתן להסביר את היעדר ההשפעה של הצומח על יעילות הרחקה של מזהמים באגנים ירוקים אלו בקליטה נמוכה יחסית של נוטריאנטים על ידי השורשים של צומח מזדקר (מחקר נוכחי; Meuleman, 1999; Obarska Pempkowiak, 1999; Healy and Cawley, 2002; Brix, 2003; Torrens et al., 2009); בתרומה נמוכה יחסית של שורשי הצמחים לשטח הפנים עבור התיישבות של ביופילם; ובתרומה שולית ליצירה של נישות אירוביות במצע על ידי חמצן הדולף משורשי הצמחים (Torrens et al., 2009).

נטען כי לצומח השפעה חיובית על הרחקה של מזהמים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית משום תרומתם לשמירה על מוליכות הידראולית של המצע (Habrel et al., 2003). באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית קיימת רגישות גבוהה לסתימה של המצע בעיקר כאשר מוזנים האגנים בקולחים באיכות נמוכה (ריכוז גבוה של מוצקים מרחפים, Vymazal, 2002) או כאשר משמשים האגנים למינרליזציה של בוצה (Brix, 2003). במחקר הנוכחי בו טופלו קולחים שניוניים באיכות גבוהה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית נמצא במערכת הבשלה שיעור הרחקה דומה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה בנוכחות ובהיעדר צומח. ממצא זה מעיד שלפחות בתנאי המערכת ובתקופת זמן של שלוש שנים, נוכחות הצומח אינה הכרחית. יתכן כי התרומה של הצומח לשימור המוליכות הידראולית של מצע באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית גבוהה יותר כאשר אגנים אלה מטפלים בקולחים באיכות נמוכה או בטווח זמן ארוך.

לצומח באגנים ירוקים בזרימה עילית השפעה רבה יותר מאשר באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית. כך למשל, קיימת השפעה חיובית של נוכחות הצומח על יעילות הרחקה של נוטריאנטים המוסברת ביעילות גבוהה יותר של קליטת הנוטריאנטים (תרכובות חנקן וזרחן) על ידי צמחיה צפה וטבולה מאשר צמחיה מזדקרת. חיזוק לטענה זו הוא תכולה גבוהה יותר של חנקן וזרחן ברקמות של צמחי מים צפים וטבולים מאשר בצמחי מים מזדקרים (Greenway and Woolley, 1999). כמו כן באגנים בדפוס זרימה עילי חשיבות התרומה של הצומח לשטח פנים להתיישבות ביופילם גבוהה מאשר

בטיפוסים אחרים של אגנים ירוקים (Brix, 2003). באגנים ירוקים בזרימה עילית לצומח השפעה חיובית נוספת כתוצאה מתרומה של פחמן אורגאני הנדרש בתהליך הדניטריפיקציה (Kozub and Liehr, 1999; Bachand and Horne, 2000b; Hume et al., 2002; Hamersley and Howes, 2002; Nivala et al., 2007). לעומת זאת, באגן ירוק בדפוס של זרימה עילית תתכן גם השפעה שלילית של הצומח על איכות הקולחים. זאת כתוצאה מהתפתחות מסיבית ותוספת חומר אורגאני (מחקר נוכחי; Thullen et al., 2005; Alvarez and Bécáres, 2006) הגורם לתהליך ריקבון ושחרור של אמוניה וחלקיקים מרחפים (מחקר נוכחי; Sartoris et al., 2000; Thullen et al., 2005).

השפעה של איכות הקולחים:

קצב ההרחקה של חומר אורגאני קל פירוק ומוצקים מרחפים צפוי לפחות ככל שפוחת העומס שלהם באגן הירוק (Kadlec and Knight., 1996). במחקר הנוכחי, קצב ההרחקה של חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה בבריכות המפלס השני היה נמוך מאשר במפלס הראשון. עובדה זו תומכת במסקנה הנ"ל. מעבר לכך, בקולחים באיכות גבוהה המטופלים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אופקית קיים עיכוב של דינאמיקה בשל מגבלות של פחמן אורגאני (למשל מחקר נוכחי; Brix, 2003). בקולחים באיכות גבוהה באגנים ירוקים בזרימה עילית בולטת במיוחד ההשפעה השלילית של תרומה של חומר אורגאני ממקור צומח ותוצרי פירוק לקולחים (מחקר נוכחי). היצרנות הפנימית גבוהה יותר באגן בזרימה עילית מאשר באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית (Kadlec, 2009). על פי הממצאים הנ"ל יעילות הרחקה של מזהמים בקולחים פוחתת ככל שאיכות הקולחים עולה. כלומר, באגנים ירוקים המוזנים בקולחים באיכות שניונית גבוהה או שלישונית צפויה יעילות נמוכה של הרחקת מזהמים (Jin et al., 2002). לאור זאת בולטת יעילות הרחקה גבוהה יחסית של מזהמים קונבנציונאליים במערכת ההיברידיית בשפד"ן. ריכוז החומר האורגאני, המוצקים המרחפים והאמוניה פחת ב- 66%, 77% ו 98%, בהתאמה, בהשוואה לריכוז בקולחים הנכנסים לאחר טיפול ברצף בריכות בזרימה תת-קרקעית. ריכוז החנקן הכללי פחת ב- 52% בהשוואה לריכוז בקולחים הנכנסים לאחר טיפול במערכת השלמה (רצף שלוש בריכות). ממצאים דומים המעידים על יכולת של אגנים ירוקים לשפר איכות קולחים ברמה שניונית או גבוהה יותר דווחו גם על ידי אחרים (Jin et al., 2002; Llorens et al., 2009; Yeh and Wu, 2009).

היכולת של אגנים ירוקים להרחיק מזהמים קונבנציונאליים מקולחים היא הבסיס לבחינה של יכולת טכנולוגיה זו להרחיק מיקרו-מזהמים.

8.3 הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים

הידע על התאמה ועל יעילות הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים הוא עדיין מועט (Milstein et al., 2009). נתונים שהצטברו עד כה מעידים כי באגנים ירוקים תתכן הרחקה של אסטרוגנים מקולחים מוניציפאליים (למשל, מחקר נוכחי; Huang and Sedlak, 2001; Gray and Sedlak, 2005).

(Song et al., 2009). הרחקה של אסטרוגנים מהקולחים מתקיימת גם כאשר ריכוז החומר האורגאני קל הפירוק (BOD) גבוה בשישה סדרי גודל מזה של האסטרוגנים (מיליגרם ונוגורם בליטר, בהתאמה; מחקר נוכחי). הממצאים של ניסויי השטח והמעבדה במחקר הנוכחי מעידים כי הרחקה של אסטרוגנים טבעיים מתרחשת בעיקר במנגנון של פירוק ביולוגי והתרומה של מנגנון ספיחה הוא נמוך. המיקרואורגניזמים להם יכולת להמיר ביולוגית ולפרק את האסטרוגנים מתפתחים באגן הירוק על פני המצע באופן טבעי. משום כך, זריעה של חיידקים המפרקים אסטרוגנים אינה נדרשת באגן הירוק. פירוק של האסטרוגנים הטבעיים על ידי הביופילם מתבצע ברצף המרות ביולוגיות (מחקר נוכחי). בהקשר זה המחקר הנוכחי הוא הראשון לזהות את המולקולה E2keto17 כתוצר המרה ביולוגית של האסטרוגן הטבעי E3. בשונה מהיכולת של הביופילם לפרק אסטרוגנים טבעיים, מעידים ניסויי המעבדה במחקר הנוכחי על העדר יכולתו לפרק את האסטרוגן הסינטטי EE2. לעומת זאת, קיימות עדויות שקיימת הרחקה גם של אסטרוגן הסינטטי EE2 באגנים ירוקים בתנאי שטח (Huang and Sedlak, 2001; Gray and Sedlak, 2005; Song et al., 2009). ניתן להסביר את העדר הרחקתו של EE2 בניסויי המעבדה שבמחקר הנוכחי והרחקתו בתנאי שטח באגנים ירוקים אחרים במנגנון פירוק של קו-מטבוליזם עם אמוניה (Vader et al., 2000; Ren et al., 2007; Yi and Harper, 2007) או עם אסטרוגנים טבעיים (Pauwels et al., 2008). תנאים אלו לא נבחנו בניסויי המעבדה בעבודה הנוכחית.

ההמרות הביולוגיות של האסטרוגנים על ידי מיקרואורגניזמים באגן הירוק מתרחשות בעיקר בתנאים אירוביים (מחקר נוכחי). לכן, מבין האגנים הירוקים, הרחקה יעילה ביותר של אסטרוגנים צפויה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית. ממצאים דומים של פירוק ביולוגי יעיל בתנאים אירוביים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית מדווחים גם עבור מגוון תרופות ותוצרי טיפוח אישי (Matamoros and Bayona, 2008). עדות אחרת לדומיננטיות של מנגנון ביוטי אירובי בפירוק מיקרו-מזהמים היא קשר חיובי בין שיעור הרחקה של התרופות ותוצרי הטיפול האישי לבין ריכוז החמצן באגן הירוק (Matamoros et al., 2007). מלבד זאת נמצא מתאם בין ריכוז של אסטרוגנים בקולחים הנכנסים ויוצאים מאגנים ירוקים לבין ריכוז של חומר אורגאני (COD ו BOD) ואמוניה בקולחים אלה (מחקר נוכחי). ממצא דומה דווח לגבי תרופות (Matamoros et al., 2007).

הרחקה היעילה של אסטרוגנים ותרופות באגן ירוק בזרימה תת-קרקעית אנכית המתאפיינת בזמן שהייה קצר של הקולחים (שעות, מחקר נוכחי; Song et al., 2009) הופך את הטכנולוגיה לאטרקטיבית שכן לא נדרש בהכרח שטח קרקע גדול (Matamoros et al., 2007; Song et al., 2009).

למרות שהרחקה גבוהה ומהירה של אסטרוגנים ותרופות קשורה בעיקר לתהליכים ביוטיים, לא ניתן לשלול תהליך של ספיחה כמנגנון סילוק חשוב. זאת בעיקר במקרה של חומרים המתאפיינים בערכי $K_{ow} > 5$ גבוהים (Matamoros and Bayona, 2006; Matamoros et al., 2007; $K_{ow} > 5$) ובתנאים בהם

שטח הפנים רב והמצע עשיר בחומר אורגאני (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003; White et al., 2006).

למרות העדר עדות ישירה הוצע כי צמחייה באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעי ועילי תורמת להרחקה של אסטרונגים (Gray and Sedlac, 2005; Song et al., 2009). מאידך, במחקר הנוכחי בו נבחן שיעור הרחקה של אסטרונגים טבעיים באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית אנכית בנוכחות ובהעדר צומח ובמחקר נוסף בו נבחן שיעור הרחקה של תרופות ותוצרי טיפוח אישי באגנים ירוקים בדפוס ומבנה דומים (Matamoros et al., 2007) לא נמצאה עדות להשפעת הצומח.

8.4 המלצות למבנה ותפעול של אגנים ירוקים

למבנה האגן הירוק, הרכב ועומס המזהמים, סוג והרכב הצומח, תנאי האקלים כמו גם לממשק ולאופן תפעול האגן קיימת השפעה על יעילות הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים (Verhoeven and Meuleman, 1999) ומיקרו-מזהמים. משום כך, דפוס המבנה ואופן התפעול האופטימאליים של אגנים ירוקים צפוי להשתנות בסיטואציות שונות. במסגרת המחקר הנוכחי נצבר ניסיון על תפקוד מערך אגנים ירוקים בדפוסים שונים של מבנה וזרימה. ההמלצות שלהלן מתייחסות רק להיבטים רלוונטיים למחקר הנוכחי.

מבנה האגן ירוק היברידי לליטוש קולחים באיכות גבוהה

המערכת המומלצת לליטוש של קולחים שניוניים באיכות גבוהה היא מערכת אגנים ירוקים היברידיים. כטיפול ראשון מתאים אגן ירוק בזרימה תת-קרקעית אנכית המרחיק ביעילות מזהמים קונבנציונאליים (חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ואמוניה) ואסטרונגים (Song et al., 2009; מחקר נוכחי). כמו כן גם תרופות ותוצרי טיפוח אישי רבים מסולקים ביעילות באגנים ירוקים בדפוס זרימה זה (Matamoros et al., 2007). כדי לתת מענה להרחקה של ניטראט וחנקן כללי מומלץ לשלב טיפול שני של אגן ירוק המקיים תנאים אנאירוביים. תנאים אלו נדרשים לדניטריפיקציה של ניטראט (Vymazal, 2007). מבין הטיפוסים של אגנים ירוקים בהם נישות אנאירוביות יש יתרון לשלב אגן ירוק בזרימה עילית על פני אגן בזרימה תת-קרקעית אופקית. זאת משום שנוכחות צומח טבול ומזדקר תורמים פחמן אורגאני ומשפרים על ידי כך את שיעור הדניטריפיקציה (ראה לעיל). כמו כן, נוכחות צמחייה צפה וטבולה יכולה לתרום להרחקה של נוטריאנטים ומיקרו-מזהמים באמצעות מנגנון של קליטה לצומח. יתרה מכך, בשונה מאגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית, באגנים ירוקים בזרימה עילית קיימים אזורים של מים חשופים המאפשרים פירוק של מיקרו-מזהמים גם במנגנון פוטו-כימי (למשל התרופה Ketoprofen, Matamoros et al., 2008).

הרכב וממשק צמחייה באגנים ירוקים

במחקר הנוכחי אין עדות לתרומה משמעותית של צומח בשילובים שונים, לשיפור הליטוש של קולחים שניוניים באיכות גבוהה באגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית. יתכן ועובדה זו קשורה

לאיכות הגבוהה של הקולחים המטופלים. מחקר נוסף, ארוך טווח, נדרש לאשש ממצאים אלה. אם יתברר שאכן כך, הרי שבאזורי אקלים יובשניים יש יתרון לאגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית נטולי צומח בשל צמצום איבוד המים באופוטורנספירציה. עם זאת, קיימות עדויות שבאגנים ירוקים בזרימה תת-קרקעית תורמת הצמחייה לשמירה על מוליכות הידראולית ומאפשרת יעילות טובה של הרחקת מזהמים לאורך זמן (Haberl et al., 2003). היבט זה לא נבחן במחקר הנוכחי. כמו כן לצומח ערך אסטטי ואקולוגי (Yeh and Wu, 2009).

באגנים בזרימה עילית חשיבות הצומח גבוהה מאשר באגנים בזרימה תת-קרקעית בין השאר משום שהם תורמים מצע להתפתחות מיקרו-אורגניזמים (Brix, 2003). בנוסף לכך, ממצאי המחקר הנוכחי מעידים כי לצומח באגנים ירוקים בזרימה עילית השפעה חיובית על יעילות הרחקה של זרחן. שיפור הרחקה של זרחן באגנים ירוקים בזרימה עילית יכול להתקבל באמצעות שילוב של צמחים להם קצב צימוח מהיר, תכולה גבוהה של נוטריאנטים ברקמות הצמח, ביומסה גבוהה ליחידת שטח וסילוק תקופתי של ביומסה זו (למשל, Reddy and DeBusk, 1987). כאמור לעיל הצומח משפר הרחקה של ניטראט בתהליך הדניטריפיקציה על ידי תרומה של פחמן אורגאני. שילוב של צמחי מים בעלי קצב צימוח מהיר וקלות פירוק על ידי מיקרו-אורגאניזמים עשוי לשפר את יעילות הרחקה של הניטראט (Bachand and Horne, 2000b).

מגוון הצומח

הניסיון המצטבר במערכת האגנים הירוקים בשפד"ן מעיד כי במערכת בה נשתלים מגוון רב של צמחי מים, מתפתחת דומיננטיות של הצמחים המותאמים ביותר לתנאי המערכת (למשל זרימה רוויה או בלתי רוויה ומפלס המים). בעקבות זאת פוחת מגוון הצומח בהדרגה ואף תתכן השתלטות של מין צומח אחד (mono-culture). כך למשל, בבריכות בזרימה עילית שנשתלו ב-5 מיני צומח (סעיף 6.3) נותרו כעבור כ-2-3 עונות צימוח 3 מינים בלבד (אלף עלה, אירוס צר עלים ופונטדריה איזמלנית; איור 7, נספח 4). דוגמא נוספת, בבריכות בזרימה תת-קרקעית בהם נשתלו 5 מיני צומח (סעיף 6.3) הייתה כעבור כ-2-3 עונות השתלטות מוחלטת של גומא פפירוס (איור 6, נספח 4). לכן כאשר בנוסף לשיפור של איכות הקולחים מיועדת מערכת האגנים הירוקים גם להעשרה של מגוון בתי גידול לחים אנו ממליצים להעשיר את מורכבות המבנה של האגן הירוק. המלצה זו מבוססת על הטענה כי מורכבות גבוהה של בית הגידול תומכת במגוון רחב של מיני צומח (גזית, מידע אישי). ניתן להעשיר את מגוון בתי הגידול באגן הירוק בזרימה עילית למשל באמצעות שילוב שיפועים שונים של הגדות וגרדיאנט של עומק המים. אפשרות אחרת היא חלוקה של אגן ירוק גדול למספר בריכות קטנות יותר ושתילה של מין צומח נבחר בכל בריכה.

ממשק קצירה

כאמור, במחקר הנוכחי קיימת עדות לתרומה נמוכה של נוכחות הצומח להרחקה של נוטריאנטים באגנים ירוקים בדפוס זרימה תת-קרקעית המוזנים בקולחים שניוניים באיכות גבוהה. קיימים דיווחים כי שילוב ממשק קצירה משפר את יעילות ההרחקה של תרכובות חנקן וזרחן באגנים ירוקים

(Healy and Cawley, 2002; Mitsch et al., 2005). עם זאת במרבית המקרים שיעור התרומה של קצירת הצומח לעילות ההרחקה של הנוטריאנטים הוא נמוך (למשל, Tuncsiper et al., 2005; Toet et al., 2006). משום כך ובהתחשב בשיקולים כלכליים נראה כי שילוב ממשק קצירה עונתי למטרות של הרחקת נוטריאנטים בלבד אינו כדאי (Toet et al., 2005). מאידך, במקרים בהם קיימת התפתחות בלתי מבוקרת של צמחיה באגנים ירוקים בזרימה עילית תתכן תרומה מוגברת של חומר אורגני שלאחר פירוקו משחרר חומר חלקיקי ונוטריאנטים (מחקר נוכחי; Haberl et al., 2003). במקרה זה, קצירה תקופתית של הצומח באגנים ירוקים בדפוס זרימה עילי צפויה לצמצם את התרומה של החומר האורגני, מוצקים מרחפים ואמוניה (Yeh and Wu, 2009). לצמצום ההשפעות השליליות של צמיחה עודפת באגנים ירוקים בזרימה עילית מומלץ לשלב ממשק קצירה של צומח ומניעה של כיסוי מלא של שטח הבריכה בצמחיה למשל על ידי אזורי מים עמוקים (Thullen et al., 2005).

8.5 התאמה של הקולחים המטופלים באגנים ירוקים להזרמה לנחלים ולהשקיה

אחת ממטרות המחקר היא לבחון התאמה של קולחים שניוניים שטופלו באגנים ירוקים לצורכי הזרמה לנחלים ושיקום ולצרכי השקיה חקלאית.

מזהמי מים קונבנציונאליים

בישראל מופנים עיקר הקולחים להשקיה של גידולים וכן לפארקים (כדוגמת פארק הרצליה, גזית מידע אישי). כמו כן חלק ניכר מהקולחים מוזרמים לנחלים, לרוב כברירת מחדל (רט"ג, 2008) ולשיקום נחלים (Bar-Or, 2000). איכות הקולחים המותרת להשבה בישראל מתבססת במקרים רבים על הנחיות "ועדת ענבר" לאיכות קולחים המיועדים להשקיה ללא הגבלה או הזרמה לנחלים (תקן ענבר, טבלה 8.1).

במחקר הנוכחי לוטשו קולחים שניוניים שהופקו במט"ש השפד"ן. איכות קולחים אלו גבוהה מאשר איכות של קולחים שניוניים המופקים במפעלים אחרים לטיפול בשפכים בישראל (רט"ג, 2005). יש מקום לבחון יעילות של אגנים ירוקים בהרחקה של מזהמים מקולחים שניוניים באיכות נמוכה יותר. היבט זה נבחן לאחרונה בשלושה טיפוסים של אגני מודל בנחל אלכסנדר אך התוצאות טרם פורסמו (גזית, מידע אישי).

ניתן לבחון את ההתאמה של טיפול באגנים ירוקים בהשוואה לקריטריונים של "ועדת ענבר" המתייחסים להשקיה חקלאית ולהזרמה לנחלים. בהשוואה בין ריכוז המזהמים בקולחים הנכנסים ויוצאים מהאגנים הירוקים בשפד"ן לבין קריטריונים של "ועדת ענבר" (טבלה 8.1) ניתן להבחין בהשפעה שונה של הטיפול באגנים הירוקים על משתנים שונים של איכות הקולחים. נמצא שיפור של איכות הקולחים בהשוואה לקריטריון "ועדת ענבר" לנחלים בריכוז האמוניה ומיתון חריגות (ריכוזי מקסימום) בריכוז חומר אורגני קל פירוק ומוצקים מרחפים בהשוואה לקריטריון הזרמה לנחלים ולהשקיה. הטיפול באגנים הירוקים בשפד"ן לא תרם להרחקה של זרחן ולכן הקולחים אינם עומדים

בקריטריון להזרמה לנחלים במשתנה זה. עם זאת יש לציין כי לא קיימת טכנולוגיה אחת לטיפול בשפכים שיכולה להתמודד עם כל מגוון המזהמים שבקולחים. משום כך מבוסס לרוב הטיפול בשפכים על שילוב של מספר טכנולוגיות. במקרה האמור ניתן להציע שיפור של סילוק זרחן מהקולחים השניוניים באמצעות שילוב של האגן הירוק עם טכנולוגיה של אלקטרופלוקולציה. כך למשל נמצא כי שילוב אלקטרופלוקולטור עם פילטר חצץ תרם להרחקה של זרחן הכללי בשעור של כ- 97% מקולחים השניוניים במפעל טיפול השפכים שפד"ן (ריכוז זרחן כללי בתום התהליך היה נמוך מ- 0.4 מ"ג בליטר; Barash et al., 2009).

ראוי לציין שלדעתנו קריטריון "ועדת ענבר" אינו מספק את הדרישות האקולוגיות של איכות קולחים לשיקום נחלים בחומר אורגאני, ריכוז זרחן ותקן לניטראט (טבלה 8.1). קולחי השפד"ן היוצאים מטיפול באגנים הירוקים מתאימים לשיקום אקולוגי של נחלים בהיבט של חומר אורגאני קל פירוק וניטראט.

טבלה 8.1: ריכוז מזהמי מים נבחרים ב"תקן ענבר" עבור קולחים המיועדים להשקיה ללא הגבלה ולהזרמה לנחלים (במ"ג/ליטר) וריכוז מומלץ לשיקום אקולוגי של נחלים. כמו כן מוצג ריכוז ממוצע, סטטית תקן (וערך מקסימאלי) של המזהמים בקולחים הנכנסים ויוצאים מהאגנים הירוקים בשפד"ן (מחקר נוכחי)

Variable	Inbar criteria		Ecologically recommended*	Shafdan constructed wetland		
	irrigation	discharge into streams	discharge into streams	inflow	Effluent after two consecutive subsurface flow wetland cells	Effluent after two consecutive subsurface cells and one surface flow cell
BOD	10	10	5	6.1±4.0 (18.6)	2.1±1.0 (4.3)	2.7±1.0 (5.6)
TSS	10	10		5.2±3.1 (16.8)	1.2±1.2 (9.2)	2.3±1.9 (7.0)
NH ₄	20	1.5	1.5	2.2±1.1 (4.0)	0.06±0.08 (0.41)	0.19±0.23 (0.98)
NO ₃	-	-	<1	0.6±0.2 (1.1)	2.1±1.2 (4.9)	0.7±0.6 (2.0)
TN	25	10		4.8±1.1 (6.3)	3.6±1.6 (6.2)	2.3±1.0 (4.6)
TP	5	1	<0.1	1.2±0.4** (2.1)	1.5±0.5** (2.8)	1.3±1.3** (1.9)

* גזית, מידע אישי
** זרחן מומס (PO₄-P)

אחד ההיבטים החשובים של שילוב אגנים ירוקים לליטוש קולחים הוא ביכולתם למתן חריגות באיכות הקולחים. חריגות באיכות קולחים הן הרסניות למערכות אקולוגיות של נחלים. חריגות באיכות הקולחים בולטות במיוחד במפעלים קונבנציונאליים קטנים יחסית לטיפול בשפכים (עד כ 1000 people equivalent) המתאפיינים בכשלים תפעוליים תכופים משום שונות גבוהה בנפח

ובאיכות הקולחים (Masi et al., 1999). אגנים ירוקים עשויים להתאים במיוחד לליטוש קולחים של מפעלים מסוג זה.

אסטרוגנים

עדות ברורה להשפעות שליליות של זיהום במיקרו-מזהמים קיימת בעיקר על מאכלסי הנחלים, בניהם קיים המידע הרב ביותר על דגים. משום כך ביצעתי השוואה בין ריכוז אסטרוגנים בקולחים השניוניים הנכנסים ויוצאים מבריכות האגנים הירוקים בשפד"ן לבין ריכוז הנמוך ביותר הגורם להשפעה שלילית בדגים (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC). בריכוזים הנכנסים של E1 ו E2 מדווחות 5 השפעות שליליות שונות על דגים. בריכוזים היוצאים מהאגנים הירוקים בשפד"ן נותרות 2 השפעות בלבד (הפחתה באיכות הזרע ואינדוקציה של ויטלוגנין; טבלה 8.2).

טבלה 8.2: טווח ריכוזים (וחציון) של E1 ו E2 (ננוגרם בליטר) בקולחים שניוניים של השפד"ן ובמוצא בריכות טיפול בזרימה תת קרקעית אנכית והשפעות ביולוגיות על דגים להם ערכי LOEC בטוחים אלו

Compound	Wetland inflow concentration (ng/l)	Effect of inflow concentration	Wetland 1 st cell outflow (ng/l)	Effect of outflow concentration
E2	3.7-38.7 (7.7)	<ul style="list-style-type: none"> • Reduction in semen volume, density and sperm fertility¹ • Induction of vitellogenin² • Intersex (10%)³ • Sex alternation (all females)⁴ • Males with testis- ova⁵ 	<1-8.1 (2.4)	<ul style="list-style-type: none"> • Reduction in semen volume, density and sperm fertility¹ • Induction of vitellogenin²
E1	4.9-64.0 (22.9)	<ul style="list-style-type: none"> • Induction of vitellogenin⁶ • Induction of vitellogenin⁷ • Induction of vitellogenin⁸ • Intersex³ 	≤2-4 (2)	<ul style="list-style-type: none"> • Induction of vitellogenin⁶

¹Lahnsteiner et al., 2006; ² Hutchinson et al., 2001; ³ Metcalfe et al., 2001; ⁴ Nimrod and Benson 1998; ⁵ Kang et al., 2002; ⁶Young et al., 2002 cited in Bachmann Christiansen et al., 2002; ⁷Routledge et al., 1998 cited in Bachmann Christiansen et al., 2002; ⁸Panter et al., 1998;

רעילותו של EE2 גבוהה בהשוואה לזו של אסטרוגנים הטבעיים (למשל, Metcalfe et al., 2001; Jobling et al., 2003). מאידך, במקרה של האסטרוגן הסינטטי EE2 אין אפשרות להסיק מסקנות משום שריכוזו בקולחי השפד"ן ובקולחים היוצאים מהאגנים הירוקים נמוך מסף הזיהוי.

ההנחיה הכללית של ה European Commission (EC, 1996) היא שבמים המוזרמים לנחלים ריכוז המזהם יהיה עשירית מריכוז ה LOEC. אם נניח שהנחיה זו תקפה גם למיקרו-מזהמים הרי שהקולחים שטופלו באגנים הירוקים בשפד"ן יתאימו להזרמה לנחלים לאחר מיהול בסדר גודל במי מקור. ללא הטיפול באגנים הירוקים יידרש מיהול בשני סדרי גודל. חלופה אפשרית למיהול במי מקור היא שיפור יכולת ההרחקה של אסטרוגנים על ידי האגנים הירוקים. זאת ניתן להשיג באמצעות הרחבה של שטח הטיפול האירובי בו קיים פירוק ביולוגי מהיר יחסית של האסטרוגנים (שעות בודדות). אפשרות נוספת היא על ידי הארכה של משך זמן שהייה ההידראולי (מחקר נוכחי; Colucci et al., 2001; Lee and Liu, 2002; Shi et al., 2004a, Yoshimoto et al., 2004).

8.6 סיכום המחקר והמשכו

- במחקר הנוכחי מוצגת יכולת הרחקה של מזהמי מים קונבנציונאליים מקולחים שניוניים באיכות גבוהה (ליטוש קולחים) באמצעות מערכת היברידית של אגנים ירוקים (שילוב מספר דפוסים של מבנה זרימה). בניגוד למחקרים אחרים בהם מרבית המידע מתבסס על השלבים הראשוניים של התפתחות מערך האגנים הירוקים (Jin et al., 2002), במחקר הנוכחי מתבסס המידע על תפקוד המערכת גם לאחר הבשלה של שלוש שנים.
- המחקר הנוכחי נבחנה הרחקה של האסטרוגנים מקולחים מוניציפאליים באמצעות טכנולוגיה של אגנים ירוקים, בעיקר בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי (Milstein et al., 2009). נבחנה היכולת של ביופילם ממקור של אגנים ירוקים להמיר ביולוגית ולפרק אסטרוגנים בתנאי מעבדה מבוקרים (זיהוי המנגנונים) וכן תרומת הצומח ליעילות הרחקה של האסטרוגנים.
- קיים צורך בהעמקת הידע על הקשר בין עומס הידראולי ועומס האסטרוגנים באגנים ירוקים לבין קצב ויעילות הרחקתם.
- נדרש מידע על השפעה של תנאי אקלים (למשל, טמפרטורה) על יעילות הרחקה של אסטרוגנים באגנים ירוקים.
- נדרש מידע על יכולת הרחקה של אסטרוגנים במערכת אגנים ירוקים בטווח זמן ארוך (מעבר לשלוש שנים).

המחקר הנוכחי מצביע על יכולת של אגנים ירוקים במערך היברידי ללטש ולהרחיק מזהמים קונבנציונאליים הכוללים חומר אורגאני, מוצקים מרחפים ותרכובות חנקן וכן אסטרוגנים מקולחים שניוניים באיכות גבוהה. יכולת אגנים ירוקים להרחיק זרחן היא מוגבלת. במקרים שנדרשת הרחקה של זרחן (למשל הזרמה של קולחים לנחלים) ניתן לשפרה באמצעות שילוב עם טכנולוגיה משלימה (למשל, אלקטרופלוקולציה). בהתאם ראוי שאגנים ירוקים או מערך טכנולוגיות המשלב גם אגנים ירוקים יבחן כטיפול משלים ליצירת קולחים הראויים לשימוש חוזר לשיקום נחלים ולהשקיה.

Reference

- אשכנזי, מ. 2009. איבוד מים באוופוטנספירציה והמלחה במערכת אגנים ירוקים לטיפול בקולחים בתנאי אקלים ים תיכוני במישור החוף בישראל. עבודה לתואר מוסמך במדעים (MS.c). ביה"ס ללימודי הסביבה ע"ש פורטר והמחלקה לזואולוגיה, אוניברסיטת ת"א.
- רט"ג, 2005. ניטור מים ונחלים, דו"ח פעילות מסכם לשנת 2004 (עבור המשרד להגנת הסביבה). היחידה לניטור סביבתי, מדור ניטור נחלים, רשות הטבע והגנים הלאומיים, ירושלים, ישראל.
- רט"ג, 2008. איסוף וטיפול בשפכים וניצול קולחים להשקיה חקלאית, סקר ארצי 2006/7 (עבור רשות המים). מדור סקרים ומחקרים, היחידה הסביבתית, רשות הטבע והגנים הלאומיים, ירושלים, ישראל.
- Abdel-EI-Haleem, D. 2003. *Acinetobacter*. environmental and biotechnological applications. African Journal of Biotechnology 2: 71-74.
- Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B. and Ternes, T.A. 2003. Fate of Estrogen in municipal sewage treatment plant. Environmental Science and Technology 37: 4021-4026.
- Andersen, H.R., Kjolholt, J., Hansen, M., Stuer-Lauridsen, F., Dueholm Blicher, T., Ingerslev, F. and Halling-Sørensen, B. 2004. Degradation of estrogens in sewage treatment processes. Environmental Project No. 899. Danish Environmental Protection Agency.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF).
- Austin, D.C. and Lohan, E. 2005. Patent. Tidal vertical flow wastewater treatment system and method. United States US 6,863,816 B2, June 17, 2003.
- Avisar, D., Lester Y., and Ronen, D., 2009. Sulfamethoxazole detected in a deep phreatic aquifer beneath effluent irrigated land The Science of the the Total Environment 407: 4278- 4282.
- Avisar, D., Lester Y. and Mamane, H., 2010. pH induced polychromatic UV treatment for the removal of micro-pollutants from water. Journal of Hazardous Material 175: 1068–1074.
- Ayaz, S.C. 2008. Post treatment and reuse of tertiary treated wastewater by constructed wetlands. Desalination 226: 249-255.
- Bachand, P.A.M. and Horne A.J. 2000a. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: I. Very high nitrate removal rates in a macrocosm study. Ecological Engineering 14: 9–15.
- Bachand, P.A.M. and Horne A.J. 2000b. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. Ecological Engineering 14: 17–32.
- Bachmann Christiansen, L., Winther-Nielsen, M. and Helweg, C. 2002. Feminization of fish- the effect of estrogenic compound and their fate in sewage treatment plants and nature. Environmental Project No. 729. Danish Environmental Protection Agency. pp: 155.

- Barash, A., Adin, A., Ozer, K., Milstein, D and Gasith, A. 2009. Electroflocculation-Constructed wetland hybrid for improved phosphate removal in effluent reuse. 4th SWITCH Scientific Meeting, Delf, Netherland.
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A. And Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology* 34: 5059-5066.
- Bar-Or, Y. 2000. Restoration of the rivers in Israel coastal plain. *Water Air and Soil Pollution* 123: 311-321.
- Behrends, L.L., Sikora, F., Coonrod, H., Bailey, E. and Bulls, M. 1996. Reciprocating sub-surface constructed wetland for removing ammonia, nitrate, and chemical oxygen demand: Potential for treating domestic, industrial and agricultural wastewater. In: Proceeding of the 69th Annual WEFTEC Conference, Water Environment Federation: Alexandria, Virginia.
- Behrends, L.L., Houke, L., Bailey, E., Jansen, P. and Brown, D. 2001. Reciprocating constructed wetland for treating industrial, municipal, and agricultural wastewater. *Water Science and Technology* 44: 399-405.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Negener, J. and Cofino, W.P. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Science of the Total Environment* 225: 101-108.
- Benijts, T., Dams, R., Gunther, W., Lambert, W. and Leenheer, A. 2002. Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 1358-1364.
- Birkett, J.W. and Lester, J.N. 2003. Endocrine disrupters in wastewater and sludge Treatment Processes. IWA Publishing and Lewis Publishers, Washington, DC.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R. and Matsuura, T. 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and option for their removal. *Desalination* 239: 229-246.
- Brix, H. 1990. Gas exchange through the soil atmosphere interrphase and through dead culms of *Phragmites australis* in a constructed reed bad wetland receiving domestic sewage. *Water Research* 24: 259-266.
- Brix, H. 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands? *Water Science and Technology* 35(5): 11-17.
- Brix, H. 2003. Plants used in constructed wetland and their function. In: 1st International Seminar on the Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands. Dias, V. and Vymazal, J. (Eds.). Lisboa, Portugal. pp: 81-108.
- Bronti, C., Curini, R., D'ascenzo, G., Di Coracia, A., Gentili, A. And Samperi, R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment

- Plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology* 34: 5059-5066.
- Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F. and Marcé, R.M. 2004. Solid phase extraction/high performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples. *Chromatographia* 59: 419-423.
- Calle, E.E., Frumkin, H., Henley, J.S., Savitz, D.A. and Thun, M.J. 2002. Organochlorines and breast cancer risk. *CA Cancer Journal of Clinicians* 52: 301-309.
- Colucci, M.S. and Topp, E. 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soil. II 17 alpha-ethynylestradiol. *Journal of Environmental Quality* 30: 2077-2080.
- Colucci, M.S., Bork, H. And Topp, E. 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soil: I. 17 β estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality* 30: 2070-2076.
- Conkle, J.L., White, J.R. and Metcalfe, C.D. 2008. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere* 73: 1741-1748.
- Cooper, P.F., Job, G.D., Green, B. and Shutes, R.B.E. 1996. Reed beds and constructed wetland for wastewater treatment. WEc Publications. Swindon, United Kingdom.
- Cooper, P.F., Griffin, P., Humphries, S. and Pound, A. 1999. Design of a hybrid reed bed system to achieve complete nitrification and denitrification of a domestic sewage. *Water Science and Technology* 40: 283-289.
- Croley, T.R., Hughes, R.J., Koenig, B.G., Metcalfe, C.D. and March, R.E. 2000. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 14: 1087-1093.
- Cui, C.W., Ji, S.L. and Ren, H.Y. 2006. Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory. *Environmental Monitoring and Assessment* 121: 409-419.
- Czajka, C.P. and Londry, K.L. 2006. Anaerobic biotransformation of estrogens. *Science of the Total Environment* 367: 932-941.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. and Samperi, R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment* 302: 199-209.
- Davis, L.C., Carias, C.C., Novais, J.M. and Martins-Dias, S. 2005. Photoremediation of textile effluents containing azo dye by using *phragmites australis* in a vertical flow intermittent feeding constructed wetland. *Ecological Engineering* 25: 594-605.
- de Mes, T., Zeeman, G. And Lettinga, G. 2005. Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 4: 275-311.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation

- and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* 32: 1549-1558.
- Dévai, I., Felföldy, L., Wittner, I. and Plósz, S. 1988. Detection of Phosphine: new aspects of the phosphorus cycle in the hydrosphere. *Nature* 333: 343-345.
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., López, R., and Barceló, D. 2003. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry* 38: 917-923.
- Dowd, S.E., Herman, D.C. and Maier, R.M. 2000. Aquatic and extreme environments (Ch.6). In: *Environmental Microbiology*, 2nd Ed. Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P (Eds.). Academic Press. pp:123-146.
- Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L. Chen, Z., Herrick, R.F., Christiani, D.C. and Hauser, R. 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14: 269-77.
- EA, Environment Agency, 2002. The identification of oestrogenic effects in wild fish – Phase II. R&D Technical Report W2-014/TR. Environment Agency, Bristol, United Kingdom.
- EC, European Commission, 1996, Technical guidance document in support of the commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the commission regulation (EC) 1488/94 On risk assessment for existing substances. The European Commission, Brussels, Belgium.
- Erickson, B.E. 2002. Analyzing the ignored environmental contaminants. *Environmental Science and Technology* 36: 140A-145A.
- Esperanza, M., Suidan, M.T., Nishimura, F. Wang, Z.M., Sorial, G.A., Zaffiro, A., McCauley, P., Brenner, R. And Sayles, G. 2004. Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology* 38: 3028-3035.
- Esperanza, M., Suidan, M.T., Marfil-Vega, R., Gonzalez. C., Sorial, G.A., McCauley, P. and Brenner, R. 2007. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. *Chemosphere* 66: 1535–1544.
- Falconer, I.R., Chapman, H.F., Moore, M.R. and Ranmuthugala, G. 2006. Endocrine-Disrupting Compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environmental Toxicology* 21: 181-191.
- Farré, M., Brix, R., Kuster, M., Rubio, F., Goda, Y., Lopez de Alda, M.J. and Barceló, D. 2006. Evaluation of commercial immunoassay for detection of estrogens in water by comparison with high-performance liquid chromatograph tandem mass spectrometry HPLC-MS/MS (QqQ). *Analytical and Bioanalytical chemistry* 385: 1001-1011.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., McElroy, A.E. and Brownawell, B.J. 2001. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-electrospray-MS. *Analytical Chemistry* 73: 3890-3895.

- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, A.P. and Thybaud, E. 2000. Induction of fish vitellogenin and alteration in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology* 9: 127-135.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J. and Guillette, L.J.Jr 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus Carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104: 1096-1101.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C.D. and Guillette, L.J. 2001a. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 392-398.
- Folmar, L.C., Gardner, G.R., Schreiber, M.P., Magliulo-Cepriano, L., Mills, L.J., Zarogian, G., Gutjahr-Gobell, R., Haebler, R., Horowitz, D.B. and Denslow, N.D. 2001b. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology* 51: 431-441.
- Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N. and Morita, N. 2002. Degradation of 17- β estradiol by a gram negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokio, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2057-2060.
- Fujii, K., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T. and Kikuchi, S. 2003. *Novosphingobium tardaugens* sp. Nov., an oestradiol degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokio. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 47-52.
- Garver, E.G., Dubbe, D.R. and Pratt, D.C. 1988. Seasonal patterns in accumulation and partitioning of biomass and macronutrients in *Typha* spp. *Aquatic Botany* 32: 115-130.
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Mastropasqua, R., Curini, R. and Di Corsia, A. 2002. Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 56: 25-32.
- Ghermandi, A., Bixio, D. and Thoeye, C. 2007. The role of water surface constructed wetland as polishing step in municipal wastewater reclamation and reuse. *Science of the Total Environment* 380: 247-258.
- Giraldi, D., de'Michieli, M., Zaramella, M., Marion, A and Iannelli, R. 2009. Hydrodynamics of vertical subsurface flow constructed wetland: Tracer tests with rhodamine WT and numerical modeling. *Ecological Engineering* 35: 265-273
- Gomes, R.L., Deacon, H.E., Lai, K.M., Birkett, J.W., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. 2004. An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 105-108.

- Gomes, R.L., Birkett, J.W., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. 2005. Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 85: 1-14.
- Gray, J.L. and Sedlak, D.L. 2005 The fate of estrogenic hormones in an engineered treatment wetland with dense macrophytes. *Water Environment Research* 77: 24-31.
- Green, M., Friedler, E., Ruskol, Y. and Safrai, I. 1997. Investigation of alternative method for nitrification in constructed wetlands. *Water Science and Technology* 35: 63-70.
- Greenway, M. 1997. Nutrient content of wetland plants in constructed wetlands receiving municipal effluent in tropical Australia. *Water Science and Technology* 35: 135-142.
- Greenway, M. and Woolley, A. 1999. Constructed wetlands in Queensland: Performance efficiency and nutrient bioaccumulation. *Ecological Engineering* 12: 39-55.
- Greenway, M. and Woolley, A. 2001. Changes in plant biomass and nutrient removal over 3 years in a constructed wetland in Cairns, Australia. *Water Science and Technology* 44: 303-310.
- Guang-Guo, Y., Kookana, R.S. and Dillon, P. 2003. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* 37: 3785-3791.
- Guillette, L.J. Jr. and Iguchi, T. 2003. Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *Pure and Applied Chemistry* 75: 2275-2286.
- Haberl, R., Grego, S., Langergraber, G., Kadlec, R.H., Cicalini, A.R., Martins Dias, S., Novais, J.M., Aubert, S., Gerth, A., Thomas, H. Hebner, A. 2003. Constructed wetlands for the treatment of organic pollutants. *Journal of Soils and Sediments* 3: 109-124.
- Hamersley, M.R. and Howes, B.L. 2002. Control of denitrification in a septage treating artificial wetland: the dual role of particulate organic carbon. *Water Research* 36: 4415-4427.
- Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Xiong, X., Kreidi, S.L., Benke, K.K. and Maher, P. 2007. Wastewater irrigation: the state of play. *Vadose Zone Journal* 6: 832-840.
- Hardell, L., van Bavel, B., Lindstrom, G., Carlberg, M., Dreifaldt, A.C., Wijkstrom, H., Starkhammer, H., Eriksson, M., Hallquist, A. and Kolmert, T. 2003. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environmental Health Perspectives* 111: 930-934.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T. and Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom Rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 534-542.

- Harris, C.A., Santos, E.M., Janbakhsh, A., Pottinger, T.G., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. 2001. Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environmental Science Technology* 35: 2909-2916.
- Harshbarger, J.C., Coffey, M.J. and Young, M.Y. 2000. Intersexes in Mississippi River shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis Missouri, USA. *Marine Environmental Research* 50: 247-250.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49: 37-53
- Hashimoto, T. and Murakami, T. 2009. Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments. *Water Research* 43: 573-582.
- Hauck, R.D. 1984. Atmospheric nitrogen chemistry, nitrification, denitrification and their relationships. In: *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 1, Part C. The Natural Environment and Biogeochemical Cycles*. Hutzinger, O. (Ed.), Springer-Verlag. Berlin, pp: 105-127.
- Healy, M. and Cawley, A.M. 2002. Wetlands and aquatic processes. Nutrient processing capacity of a constructed wetland in western Ireland. *Journal of Environmental Quality* 31: 1739-1747.
- Hecker, M., Tyler, C.R., Hoffmann, M., Maddix, S. and Karbe, L. 2002. Plasma biomarkers in fish provide evidence for endocrine modulation in the Elbe River, Germany. *Environmental Science and Technology* 36: 2311-2321.
- Hemming, J.M., Waller, W.T., Chow, M.C., Denslow, N.D. and Venables, B. 2001. Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas Rafinesque*, 1820). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2268-2275
- Herman, R.L. and Kincaid, H.L. 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72: 165-172.
- Holland, P.T., 2003. Analysis of endocrine active substances in food and the environment. *Pure and Applied Chemistry* 75: 1843-1857.
- Huang, C. H. and Sedlak, D.L. 2001 *Environmental Chemistry - Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 133-139.
- Hume N.P., Fleming M.S. and Horne, A.J. 2002. Denitrification potential and carbon quality of four aquatic plants in wetland microcosms. *Soil Science Society of America Journal* 66: 1706-1712.
- Huyghe, E., Matsuda, T. and Thonneau, P. 2003. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *The Journal of Urology* 170: 5-11.

- Imfeld, G., Braeckevelt, M., Kuschik, P. and Richnow, H.H. 2009. Monitoring and assessing processes of organic chemical removal in constructed wetlands. *Chemosphere* 74: 349-362.
- Ingerslev, F. and Halling-Sørensen, B. 2003. Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. Working report no. 44. Danish Environmental Protection Agency.
- Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J. and De Roubin, M.R. 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1020: 99–104.
- Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H and Morita, M. 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid- phase extraction followed by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 984: 195-202.
- Järvenpää, P, Kosunen, T., Totsis, T. and Adlercreutz, H. 1980. *In vitro* metabolisms of estrogens by isolated intestinal micro-organisms and by human faecal microflora. *Journal of Steroid Biochemistry* 13: 345-349.
- Jin, G., Kelley, T., Freeman, M. and Callahan, M. 2002. Removal of N, P, BOD₅ and coliform in pilot-scale constructed wetland system. *International Journal of Phytoremediation* 4: 127-141.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32: 2498-2506.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. and Tyler, C.R. 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65:205–20.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. and Tyler, C.R. 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66: 207–222.
- Johnson, A.C. and Sumpter, J. P. 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science and Technology* 35: 4697-4703.
- Johnson, A.C., Belfroid, A., and Di Corcia, A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the total Environment* 256: 163-173.
- Johnson, A.C., Williams, R.J., Simpson, P. and Kanda, R. 2007. What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environmental Pollution* 147: 194-202
- Jones, O.A., Lester, J.N. and Voulvoulis, N. 2005. Pharmaceuticals: a threat to drinking water?. *Trends in Biotechnology* 23: 163-167.

- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P.R. and Siegrist, H. 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environmental Science and Technology* 38: 3047-3055.
- Jürgens, M.D., Williams, R.J. and Johnson, A.C. 1999. Fate and behavior of steroid oestrogens in rivers: a scoping study. Bristol, U.K. Institute of Hydrology, Environmental Agency. Report 161 pp.
- Jürgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M. and Williams, R.J. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicity and Chemistry* 21: 480-488.
- Kadlec, R.H. 1992. Hydrologic factors in wetland water treatment. In: Hammer, D.A. (Ed.), *Constructed Wetland for Wastewater Treatment: Municipal, Industrial and Agricultural*. Lewis Publishers, Chelsea, USA. pp: 21-40.
- Kadlec, R.H. 1994. Overview: Surface flow constructed wetlands. In: *Proceeding of the 4th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control*, Guangzhou, China. pp: 1-12.
- Kadlec, R.H. 2009. Comparison of free water and horizontal subsurface treatment wetlands. *Ecological Engineering* 35: 159-174.
- Kadlec, R.H. and Knight, R.L. 1996. *Treatment Wetland*. First Edition. CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Kadlec, R.H. and Wallace, S.D. 2008. *Treatment wetland*, Second edition. CRC Press. INC, U.S.A.
- Kadlec, R.H., Knight, R.L., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. and Haberl, R. 2000. *Constructed wetlands for pollution control: Processes, performance, design and operation*. IWA Scientific and Technical report No. 8. IWA Publishing, London, UK. 156 pp.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T. Maeda, M. Imada, N., Tadokoro, H. and Honjo, T. 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- Kayillo, S., Dennis, G.R. and Shalliker, R.A. 2007. An assessment of the retention behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases—Thermodynamic behavior on C18 and phenyl-type surfaces. *Journal of Chromatography A* 1145: 133–140.
- Ke, J., Zhuang, W., Gin, K.Y-H., Reinhard, M., Hoon, L.T. and Tay, J-H. 2007. Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 1163-1171.
- Keeney, D.R. 1973. The nitrogen cycle in sediment-water system. *Journal of Environmental Quality* 2: 15-29.

- Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S-K. and Van Leeuwen, J. 2006. Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environmental Science and Technology* 40: 6537-6546.
- Knörr, S and Braunbeck, T. 2002. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 187-196.
- Knudsen, F.R., Schou, A.E., Wiborg, M.L., Mona, E., Tollefsen, K-E., Stenersen, J. and Sumpter, J.P. 1997. Increase of plasma vitellogenin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 59: 802-806.
- Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A., Cartmell, E., Lester, J.N. and Scrimshaw, M.D. 2007. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1173: 81-87.
- Kolodziej, E.P., Gray, J.L. and Sedlak, D.L. 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2622-2629.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36: 1202-1211.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. and Hagenmaier, H. 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Science of the Total Environment* 225: 33-48.
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V. and Hagenmaier, H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40: 1131-1142.
- Körner, W., Spengler, P., Bolz, U., Schuller, W., Hanf, V. and Metzger, J.W. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2142-2151.
- Kozub, D.D. and Liehr, S.K. 1999. Assessing denitrification rate limiting factors in a constructed wetland receiving landfill leachate. *Water Science and Technology* 40: 75-82
- Labadie, P. and Budzinski, H. 2005a. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science and Technology* 39: 5113-5220.
- Labadie, P. and Budzinski, H. 2005b. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical chemistry*. 381: 1199-1205.

- Lagana, A., Bacaloni, A., Fago, G. And Marino, A. 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14: 401-407.
- Lagana, A., Fago, G., Marino, A. And Santarelli, D. 2001. Liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of natural and synthetic steroids in environmental waters. *Analytical Letters* 34: 913-926.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M. and Weismann, T. 2006. Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquatic Toxicology* 79: 124-131.
- Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. 2002. Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 859-864.
- Larsen, T.A., Lienert, J., Joss, A. and Siegrist, H. 2004. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology* 113: 295-304.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. and Förlin, L. 1999. Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45: 91-97.
- Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W. and Sayler, G.S. 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environmental Science and Technology* 34: 3925-3931.
- Lee, H.B. and Liu, D. 2002. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. *Water, Air and Soil Pollution* 134: 353-368.
- Lemon, E., Bis, G., Rozema, L. and Smith, I. 1996. SWAMP Pilot scale wetlands: Design and performance, Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada. Presented at *Constructed Wetlands in Cold Climates: Design, Operation, Performance, Symposium*, The Friends of St. George: Ontario, Canada.
- Lester, Y., Gozlan, I., Avisar, D., Mamane, H., 2008. Photo-degradation of Sulfadimethoxine in Aqueous Solution, *Water Science and Technology* 58: 1147-1154.
- Li, F., Yuasa, A., Obara, A. And Mathews, A.P. 2005. Aerobic batch degradation of 17- β estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperature. *Water Research* 39: 2065-2075.
- Li, F., Desmiarti, R., Yuasa, A and Horio, A. 2008. Behavior of natural estrogens in semicontinuous activated sludge biodegradation reaction. *Bioresource Technology* 99: 2964-2971.
- Liebig, M., Egeler, P., Oehlmann, J. and Knacker, T. 2004. Bioaccumulation of 14C-17 α -ethinyloestradiol by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegates* in spiked artificial sediment. *Chemosphere* 59: 271-280.
- Lima, M. 2003. Biological reaction kinetics. In: *Encyclopedia of agricultural, food and biological engineering*. Heldman ,D.R. (Ed). Marcel Dekker Inc. USA. pp: 75-84.

- Lin, Y.F., Jing, S.R., Lee, D.Y. and Wang, T.W. 2002. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetland system. *Aquaculture* 209: 169-184.
- Lindau, C.W., De Laune, R.D. and Jones, G.L. 1988. Fate of added nitrate and ammonium nitrogen entering a Louisiana gulf coast swamp forest. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 60: 386-390.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 75: 631-681.
- Liu, J., Qiu, C., Xiao, B and Cheng, Z. 2000. The role of plant in channel-dyke and filed irrigation system for domestic wastewater treatment in an integrated eco-engineering system. *Ecological Engineering* 16: 235-241.
- Liu, R., Zhou, J.L. and Wilding, A. 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A* 1038: 19-26.
- Liu, Z.H., Kanjo, Y. and Mizutani, S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the Total Environment* 407: 731-48.
- López de Alda, M.J. and Barcelo, D. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 892: 391-406.
- López de Alda, M.J., Diaz-Cruz S., Petrovic, M. and Baecelo, D. 2003. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000: 503-526.
- Mander, U. and Mitsch, W.J. 2009. Pollution control by wetland. *Ecological Engineering* 35: 153-158.
- Mansell, J., Drewes, J.E. and Rauch, T. (2004). Removal mechanisms of endocrine disrupting compounds (steroids) during soil aquifer treatment. *Water Science and Technology* 50: 229-237.
- Martin, J., Hofherr, E. and Quigley, M.F. 2003. Effects of *Typha latifolia* transpiration and harvesting on nitrate concentrations in surface water of wetland microcosms. *Wetlands* 23: 835-844.
- Masi, F., Martinuzzi, N., Loielle, S., Peruzzi, P. and Bacci, M. 1999. The tertiary treatment pilot plant of Publiser SPA (Florence, Tuscany): a multistage experience. *Water Science and Technology* 40: 195-202.
- Masi, F., Conte, G., Lepri, L., Martellini, T. and Del Bubba, M., 2004. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pathogen removal in an hybrid CW system for a tourist facility wastewater treatment and reuse. In: *Proceedings of the 9th IWA*

- International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, ASTEE, pp: 461–468.
- Matamoros, V. and Bayona, J.M. 2006. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed wetlands. *Environmental Science and Technology* 40: 5811-5816.
- Matamoros, V. and Bayona, J.M. 2008. Behavior of emerging pollutants in constructed wetland. *The Handbook of Environmental Chemistry* 5: 199-217.
- Matamoros, V., Arias, C., Brix, H. and Bayona, J.M. 2007. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from urban wastewater in a pilot vertical flow constructed wetland and a sand filter. *Environmental Science and Technology* 41: 8171-8177.
- Matamoros, V., Garcí'a, J. and Bayona, J. M. 2008. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Research* 42: 653-660.
- Metcalf, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughed, R.J., Croley, T.R., March, R.E. and Potter, T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicity and Chemistry* 20: 297-308.
- Meuleman, A.F.M. 1999. Performance of treatment wetlands. IWA Specialist Group on Use of Macrophytes in Water Pollution Control Newsletter 20: 10-16.
- Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J. and Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonad of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology* 47: 129-145.
- Milnes, M.R. and Guillette, L.J.Jr. 2008. Alligator tales: new lessons about environmental contaminants from a sentinel species. *BioScience* 58: 1027-1036.
- Milstein, D., Gasith, A. and Avisar, D. 2009. Estrogen removal in wetlands – review. International Water Association Specialist Group on Use of Macrophytes in Water Pollution Control Newsletter 35: 17-23.
- Mitsch, W.J. and Gosselink, J.G. 1993. *Wetlands*. 2nd Edition. Van Nostrand Reinhold Publisher, New-York.
- Mitsch, W.J., Day, J.W., Zhang, L. and Lane, R.R. 2005. Nitrate-nitrogen retention in wetlands in the Mississippi River Basin. *Ecological Engineering* 24: 267-278.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J. and Vethaak, D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 16-23.
- Nimrod, A.C. and Benson, W.H. 1998. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicology* 44: 141-156.

- Nivala, J., Hoos, M.B., Cross, C., Wallace, S. and Parkin, G. 2007. Treatment of landfill leachate using an aerated, horizontal subsurface-flow constructed wetland. *Science of the total Environment* 380: 19-27.
- Obarska Pempkowiak, H. 1999. Nutrient cycling and retention in constructed wetland systems in Darzłubia near Puck Bay southern Baltic Sea. In: Nutrient cycling and retention in natural and constructed wetlands. Vymazal, J. (Ed.), Backhuys publishers, the Netherlands. pp: 451-462.
- Okayasu, Y., Komori, K., Yasojima, M. and Suzuki, Y. 2005. Degradation of free estrogens and their conjugates in wastewater treatment process. *Technology 2005: 2nd Joint Specialty Conference for Sustainable Management of Water Quality Systems for the 21st Century: Working to Project Public Health, Water Environment Federation* pp: 291–297.
- Onda, K., Nakamura, Y., Takatoh, C., Miya, A. And Katsu, Y. 2003. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Science and Technology* 47: 109–116.
- Panter, G.H., Thompson, R.S. and Sumpter, J.P. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology* 42: 243-253.
- Panter, G.H., Thompson, R.S., Beresford, N. and Sumpter J.P. 1999. Transformation of a non- oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere* 38: 3579-3596.
- Panter, G.H., Thompson, R.S. and Sumpter, J.P. 2000. Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environmental Science and Technology* 34: 2756-2760.
- Paul, E.A. and Clark, F.E. 1996. *Soil microbiology and Biochemistry*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego, California. pp: 340.
- Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., Van de Wiele, T, Verstraete, W. and Boon, N. 2008. 17 α - ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation* 19: 683-693.
- Peterson, E.W and Lanning, A. 2009. Effectiveness of pilot-scale wetland designs in removing estrogenic compounds from municipal wastewater plant effluent. *Environmental Geosciences*, 16: 61-69.
- Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- Poach, E., Hunt, P.G., Reddy, G.B., Stone, K.C. and Grubbs, J.A. 2007. Effect of intermittent drainage on swine wastewater treatment by marsh-pod-marsh constructed wetland. *Ecological Engineering* 30: 43-50.
- Rajapakse, N., Silva, E. and Kortenkamp, A. 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives* 110: 919-921.

- Reddy, K.R. 1982. Nitrogen cycling in a flooded soil ecosystem planted to rice (*oryza sativa*). *Plant and Soil* 67: 209-220.
- Reddy, K.R. and Patrick, W.H.Jr. 1984. Nitrogen transformations and loss in flooded soils and sediment. *CRC, Critical Reviews in Environmental Control* 13: 273-309.
- Reddy, K.R. and DeBusk, T.A. 1987. State of the art of utilization of aquatic plants in water pollution control. *Water Science and Technology* 19: 61-79.
- Reddy, K.R. and DeLaune, R.D. 2008. *Biogeochemistry of wetlands, Science and applications*. CRC Press, Boca Raton. 774 pp.
- Reddy, K.R., Patrick, W.H. Jr. and Lindau, C.W. 1989. Nitrification-Denitrification at the Plant Root-Sediment Interface in Wetlands. *Limnology and Oceanography* 34: 1004-1013.
- Reddy, S., Iden, C.R. and Brownawell, B.J. 2005. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 77: 7032-7038.
- Reed, S.C., Middlebrooks, E.J. and Crites, R.W. 1988. *Natural systems for waste management and treatment*. McGraw-Hill Publisher, New-York. 310 pp.
- Ren, Y.X., Nakano, K., Nomura, N., Chiba, N. And Nishimura, O. 2007. Effects of bacteria activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Research* 41: 3089-3096.
- Rhue, R.D. and Harriss, W.G. 1999. Phosphorus sorption/desorption reactions in soils and sediments. In: *Phosphorus Biogeochemistry in Subtropical Ecosystems*. Reddy, K.R., O'Connor, G.A. and Schelske, C.L. (Eds.). CRC Press, Boca Ratone, Florida, pp: 187-206.
- Richardson, C.J. 1999. The role of wetland in storage, release and cycling of phosphorus on the landscape: A 25 years retrospective. In: *Phosphorus Biogeochemistry in subtropical ecosystems*. Reddy, K.R., O'conor, G.A. and Schelske, C.L. CRC Press, Boca Ratone, Florida, pp: 47-68.
- Richardson, C.J. and Marshall, P.E. 1986. Processes controlling the movement, storage, and export of phosphorus in a fen, peatland. *Ecological Monographs* 56: 279-302.
- Robb, D.B., Covey, T.R. and Bruins, A.P. 2000. Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72: 3653-3659.
- Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldoock, M.J., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environmental Science and Technology* 34: 1521-1528.
- Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J. and Barcelo, D. 2004. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 67: 6998-7006.

- Rouhani Rankouhi, T., Sanderson, J.T., van Holsteijn, I., van Kooten P., Bosveld, A.T.C. and van den Berg, M. 2005. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*). *Aquatic Toxicology* 71: 97–101.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. and Sumpter, J.P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology* 32: 1559-1565.
- Sartoris, J.J., Thullen, J.S., Barber, L.B. and Salas, D.E. 2000. Investigation of nitrogen transformations in a southern California constructed wastewater treatment wetland. *Ecological Engineering* 14: 49-65.
- Schlüsener, M.P and Bester, K. 2005. Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilizing high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 19: 3269-3278.
- Schröder, P., Navarro-Aviñó, J., Azaizeh, H., Goldhirsh, A.G., DiGregorio, S., Komives, T., Langergraber, G., Lenz, A., Maestri, E., Memon, A.R. and Ranalli, A. Sebastiani, L., Smrcek, S., Vanek, T., Vuilleumier, S. and Wissing, F. 2007. Using technologies to upgrade waste water treatment in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 14: 490-497.
- Schwaiger, J., Spieser, O.H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W. and Negele, R.D. 2000. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 51: 69-78.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., von Gunten, U. and Wehrli, B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313: 1072-1077.
- Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.
- Sharpe, R.M., and Irvine, D.S. 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *British Medical Journal* 328: 447-451.
- Shen, J.H., Gutendorf, B., Vahl, H.H., Shen, L. and Westendorf, J. 2001. Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology* 166: 71-78.
- Shi, J.H., Suzuki, Y., Lee, B.-D., Nakai, S. and Hosomi, M. 2002. Isolation and characterization of the ethinylestradiol biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. *Water Science and Technology* 45: 175-179.
- Shi, J.H., Suzuki, Y. Nakai, S. and Hosomi, M. 2004a. Microbial degradation of estrogens using activated sludge and night soil-composting microorganisms. *Water Science and Technology* 50: 153-159.

- Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S. and Hosomi, M. 2004b. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research* 38: 2323-2330.
- Shioda, T. and Wakabayashi, M. 2000a. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40: 239-243
- Shioda, T. and Wakabayashi, M. 2000b. Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using a 2-week reproduction test. *Water Science and Technology* 42: 53-60.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K.M. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 16: 972-978.
- Solé, M., López de Alda, M.J., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K. and Barceló, D. 2000. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonia area (NE Spain). *Environmental Science and Technology* 34: 5076-5083.
- Solé, M., Barceló, D., and Porte, C. 2002. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology* 60: 233-248.
- Song, H-L., Nakano, K. Taniguchi, T. Nomura, M. and Nishimura, O. 2009. Estrogen removal from treated municipal effluent in small- scale constructed wetland with different depth. *Bioresource Technology* 100: 2945–2951.
- Spain, J.C. and Van Veld, P.A. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotics compounds: effect of concentration, exposure time, inoculums and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 428-435.
- Stoob, K., Singer, H.P., Goetz, C.W., Ruff, M. and Mueller, S.R. 2005. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography – tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal of Chromatography A* 1097: 138-147.
- Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. 1997. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2446–2448.
- Sun, G., Gray, K.R., Biddlestone, A.J. and Cooper, D.J. 1999. Treatment of agricultural wastewater in a combined tidal flow: Downflow reed bed system. *Water Science and Technology* 40: 139-146
- Tanner, C.C., Sukias, J.P.S. and Upsdell, M.P. 1998. Organic matter accumulation during maturation of gravel-bed constructed wetland treating farm dairy wastewaters. *Water Research* 32: 3046-3054.
- Tanner, C.C., D'Eugenio, J., McBride, G.B., Sukias, J.P.S. and Thompson, K. 1999. Effect of water level fluctuation on nitrogen removal from constructed wetland mesocosms. *Ecological Engineering* 12: 67-92.

- Ternes, T.A. and Joss, A. 2006. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The The challenge of micropollutants in urban water management. IWA Publishing, London, UK. 105 pp.
- Ternes, T.A., Kreckel, P. and Mueller, J. 1999a. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* 225: 91-99.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D. and Servos, M. 1999b. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment* 225: 81-90.
- Ternes, T.A., Andersen, H.R., Gilberg, D. and Bonerz, M. 2002. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* 74: 3498-3505.
- Ternes, T.A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampman, M. and Teiser, B. 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research* 37: 1976-1982.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Scholze, M., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R. 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology* 35: 2476-2481.
- Thorstensen, C.W., Lode, O. and Christiansen, A.L. 2000. Development of a solid-phase extraction method for phenoxy acids and bentazone in water and comparison to a liquid-liquid extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5829-5833.
- Thullen, J.S., Sartoris, J.J. and Nelson, S.M. 2005. Managing vegetation in surface flow wastewater-treatment wetland for optimal treatment performance. *Ecological Engineering* 25: 583-593.
- Toet, S., Van Logtestijn, R.S.P., Schreijer, M., Kampf, R. and Verhoeven, J.T.A. 2005. The functioning of a wetland system used for polishing effluent from a sewage treatment plant. *Ecological Engineering* 25: 101-124.
- Torrens, A., Molle, P., Boutin, C. and Salgot, M. 2009. Impact of design and operation variables on the performance of vertical-flow constructed wetland and intermittent sand filters treating pond effluent. *Water Research* 43: 1851-1858.
- Toscano, A., Langergraber, G., Consoli, S. and Cirelli, G.L. 2009. Modelling pollutant removal in a pilot-scale two-stage subsurface flow constructed wetlands. *Ecological Engineering* 35: 281-289.
- Toze, S. 2006a. Water reuse and health risks-real vs. perceived. *Desalination* 187: 41-51.
- Toze, S. 2006b. Reuse of effluent water- benefits and risk. *Agricultural Water Management* 80: 147-159.

- Tuncsiper, B., Ayaz, S.C. and Akca, L. 2006. Modelling and evaluation of nitrogen removal performance in subsurface flow and free water surface constructed wetlands. *Water Science and Technology* 53: 111-120.
- US EPA, 2000. Manuals: Constructed wetlands treatment of municipal wastewaters. EPA 625-R-99-010, U.S. Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268. 165 pp.
- US EPA 2004. Guidelines for water reuse. EPA, 625-R-04-108. Cincinnati, OH, USA, 445 pp.
- Vader, J.S., van Ginkel, C.G., Sperling, F.M.G.M., de Jong, J., de Boer, W, de Graaf, J.S., van der Most, M. and Stokman, P.G.W. 2000. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 41: 1239-1243.
- Van den Belt, K, Verheyen, R. and Witters, H. 2001. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4*t*-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 458-467.
- Van der Meer, J.R., De Vos, W.M., Harayama S. and Zehnder, A.J.B. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological reviews* 56: 677-694.
- Verhoeven, J.T.A. and Meuleman, A.F.M. 1999. Wetlands for wastewater treatment: opportunities and limitations. *Ecological Engineering* 12: 5-12.
- Vymazal, J. 1995. *Algae and element cycling in wetland*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Vymazal, J. 2001. Types of constructed wetlands for wastewater treatment: Their potential for nutrient removal. In: *Transformations of Nutrients in Natural and Constructed Wetlands*. Vymazal, J. (Ed.), Backhuys Publishers, Leiden, pp: 633-646.
- Vymazal, J. 2003a. Types of constructed wetlands. In: *1st International Seminar on the Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands*. Dias, V. and Vymazal, J. (Eds.). Lisboa, Portugal. pp: 35-79.
- Vymazal, J. 2003b. Removal mechanisms in constructed wetland. In: *1st International Seminar on the Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands*. Dias, V. and Vymazal, J. (Eds.). Lisboa, Portugal. pp: 219-263.
- Vymazal, J. 2004. Removal of phosphorus in constructed wetland with horizontal sub-surface flow in the Czech Republic. *Water, Air and Soil Pollution* 4: 657-670.
- Vymazal, J. 2005. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetland systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering* 25: 478-490.
- Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 380: 48-65.
- Vymazal, J. 2009. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering* 35: 1-17.

- Vymazal, J. and Kröpfelová, L. 2008. Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow, *Environmental Pollution*, Vo. 14. Springer, Dordrecht. pp: 566.
- Wang, X.H. and Ivanov, V. 2009. Microbial structure of nitrifying granules and their estrogens degradation properties. *Water Science and Technology* 59: 1855-1862.
- Wang, L., Peng, J., Wang, B. and Cao, R. 2005. Performance of a combined eco-system of pond and constructed wetland for wastewater reclamation and reuse. *Water Science and Technology* 51: 315-323.
- Weber, S., Leuschner, P., Kämpfer, P., Dott, W. and Hollender, J. 2005. degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology Biotechnology* 67: 106-112.
- White, J.R., Belmont, M.A. and Metcalfe, C.D. 2006. Pharmaceutical compounds in wastewater wetland treatment as a potential solution. *The Scientific World Journal* 6: 1731-1736
- Williams, R.J., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Jürgens, M.D. and Holthaus, K. 2001. Fate and behavior of steroid oestrogens in aquatic systems. R&D Technical Report P2-162/TR. Environment Agency, Bristol, England.
- Winer, B.J., Brown, D.R. and Michels, K.M. 1991. *Statistical principles in experimental design*, 3rd edition. McGraw-Hill Education. pp: 1057.
- Witters, H.E., Vangenechten, C., Berckmans, P. 2001. Detection of estrogenic activity in Flemish surface waters using an *in vitro* recombinant assay with yeast cells. *Water Science and Technology* 43: 117-123.
- Xie, L., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O. and Schlenk, D. 2005. Evaluation of wetland and tertiary wastewater treatments for estrogenicity using *in vivo* and *in vitro* assays. *Archives of Environmental, Contamination and Toxicology* 48: 81-86.
- Xuan, R., Blassengale, A.A. and Wang, Q. 2008. Degradation of estrogenic hormones in a silt loam soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9152-9158.
- Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., Kamiura, T. And Miyakoda, H. 2006. Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization source. *Environmental Science and Technology* 40: 4132-4137.
- Yeh, T.Y. and Wu, C.H. 2009. Pollutant removal within hybrid constructed wetland systems in tropical regions. *Water Science and Technology* 59: 233-240.
- Yi, T. and Harper, W.F. JR. 2007. The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science and Technology* 41: 4311-4316.
- Ying, G.G., Kookana, R.S. and Dillon, P. 2003. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* 37: 3785-3791.
- Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H. and Omura, H. 2004. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in

wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5283-5289.

Young, W.F., Whitehouse, P., Johnson, I. and Sorokin, N. 2002. Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters. R&D Technical Report P2-T04/1. Environment Agency, Bristol, England.

Yu, J.T., Bouwer, E.J. and Coelhan, M. 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management* 86: 72–80.

Zehr, J.P. and Ward, B.B. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1015-1024.

Zhou, S., Nakashimada, Y. and Hosomi, M. 2009. Nitrogen transformations in vertical flow systems with and without rice (*Oryza sativa*) studied with a high-resolution soil–water profiler. *Ecological Engineering* 35: 213-220.

Zwiener, C. and Frimmel, F.H. 2003. Short-term tests with a pilot sewage plant and Biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment* 309: 201–211.

נספח 1

השוואה של שיטות אנליטיות לזיהוי אסטרונגנים: שיטות מיצוי וניקוי (Extraction and cleaning) של דגימות מסביבות שונות (Matrix), סוג קולונה ב-HPLC (LC column), מריצים בפאזה נעה (Mobile phase), סוג אנלייזר (Detection method) וערכי רגישות (LOD/LOQ)

Compounds	Matrix	Extraction and cleaning	LC column	Mobile phase	Detection method	LOD/LOQ (ng/l)	Ref.
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	ENVI-CVRB**	Alltima C18 (250X4.6mm, 5µm)	AcN+H ₂ O	APCI (PI)-MS/MS (Triple Quadrupole)	LOQ (E2, EE2)=0.5 LOQ(E1, E3)=1	Lagana et al., 2000
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	ENVI-CVRB**	Reliasil C10 (150X2mm, 5µm)	AcN+H ₂ O	ESI (PI)-MS/MS	LOQ(E2, EE2)=1 LOQ(E1, E3)=2	Cui et al., 2006
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	C18 Or LiChrolut RP-18 <u>Cleaning:</u> Sep-Pac@plus NH ₂	Purospher STAR-RP-18e (125X2mm, 5µm)	AcN+H ₂ O	ESI(NI)-MS/MS (Triple Quadrupole)	LOD(E1)=1 LOD(E2)=0.51 LOD(E3)=3 LOD(EE2)=2	Farré et al., 2006
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	DVB-Phobic Speedisk <u>Cleaning:</u> SEC	Synergi RP-MAX (150X2mm, 4 µm)	MeOH+H ₂ O	APCI(PI)-MS/MS (Triple Quadrupole)	LOQ(MeEE2)=3 LOQ(E2)=8 LOQ(9E1)=2 LOQ(EE2)=6	Schlüsener and Bester, 2005

E1, E2, E3, EE2	River water	ENVI-CVRB* <u>Cleaning:</u> Sep-Pac Florisil	ODS-100S C18 (150X2mm, 5µm)	AcN+H ₂ O (2nM formic acid)	APPI(PI)-MS/MS (Triple Quadrupole)	LOQ(E1)=0.7 LOQ(E2)=0.7 LOQ(E3)=1.5 LOQ(EE2)=0.9	Yamamoto et al., 2006
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	Sep-Pac C18	Synergi Hydro-RP (75X2mm, 4µm)	MeOH+H ₂ O	ESI(NI)-MS	LOD(E1)=2.4 LOD(E2)=2 LOD(E3)=1.5 LOD(EE2)=0.9	Gomes et al., 2005
E1, E2, EE2	Effluent*	LiChrolut EN	LichroCART 250-4 Lichrospher RP 18 (25X0.4cm, 5µm)	AcN+H ₂ O	ESI(NI)-MS	LOD(E1, E2)=30 LOD(EE2)=2	Brossa et al., 2004
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	t C18 <u>Cleaning:</u> GPC and NH ₂	Gemini C18 (100X2mm, 3µm)	MeOH+H ₂ O (NH ₄ OH)	ESI(NI)-MS/MS	LOD(E1)=0.1 LOD(E2, E3, EE2)=0.2	Koh et al., 2007
E1, E2, E3,	Effluent*	Carbograph 4	Alltima C18 (250X4.6mm, 5µm)	AcN+H ₂ O (post-column addition of ammonia)	ESI(NI)-MS/MS (Triple Quadrupole)	LOD(E1)=0.04 LOD(E2)=0.16 LOD(E3)=0.24	Gentili et al., 2002
E1, E2, E3, EE2, MeEE2	Effluent*	LiChrolut RP-18	LiChrospher 100 RP-18 (250X4mm, 5µm)	AcN+H ₂ O	ESI(NI)-MS (SIM)	LOD(E1, E2, E3, EE2, MeEE2)=1	López de Alda and Barceló, 2000
E2, E1	Effluent*	LiChrolut EN+C18 <u>Cleaning:</u>	Betasil C18 (150X2.1mm,	AcN+H ₂ O	ESI(NI)-MS	LOD (E2)=0.18 LOD(E1)=0.07	Ferguson et al., 2001

		Immunoaffinity Extraction	3µm)				
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	C18	Phenomenex Luna C18 (150X4.1mm, 3µm)	H ₂ O+MeOH+ AcN (addition of ammonium acetate 10mM)	ESI(NI)-MS (SIM)	LOD(E1,E2, E3, EE2)=200	Croley et al., 2000
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	C18	Phenomenex Luna C18 (150X4.1mm, 3µm)	H ₂ O+MeOH+ AcN (ammonium acetate 10mM)	ESI(NI)- MS/MS	LOD(E1, E2, E3, EE2)=5	Croley et al., 2000
E1, E2, E3, EE2	Effluent*	Carbograph 4	Alltima C18 (250X4.6mm, 5µm)	AcN+H ₂ O (post-column addition of ammonia)	ESI(NI)- MS/MS Triple Quadrupole	LOQ(E1)=0.08 LOQ(E2, E3)=0.2 LOQ(EE2)=0.3	Baronti et al., 2000
E1, E2, EE2	Effluent*	C18 <u>Cleaning:</u> LLE and Florisil	Hypersil BDS C18 (250×2.1 mm, 3µm)	AcN+H ₂ O	ESI(NI)- MS/MS Ion Trap	LOD(E1)=1 LOQ(E2, EE2)=2	Ingrand et al., 2003
E1, E2, EE2, MeEE2	Effluent*	C18 <u>Cleaning:</u> Florisil	Ace phenyl (250X2.1mm, 1µm)	MeOH+H ₂ O (formic acid 1%)	APCI(PI)- MS/MS Ion Trap	LOD(E2)=1 LOD(E2m EE2, MeEE2)=2	Current study
E1, E2	Effluent*	Carboprep (GCB) <u>Cleaning:</u> NH ₂	Ace phenyl (250X2.1mm, 1µm)	MeOH+H ₂ O (formic acid 1%)	APCI(PI)- MS/MS Ion Trap	LOD(E1)=2 LOD(E2)=1	Current study

* Municipal wastewater effluent

**NVI-CARB-graphitized non porous carbon black

נספח 2

התאמה של שיטה אנליטית לזיהוי וכימות אסטרוגנים בקולחים

1. מבוא

קיים קושי אובייקטיבי באנליזה של אסטרוגנים בדוגמאות של קולחים משום הריכוזים הנמוכים של האסטרוגנים בסביבה (ננו עד מיקרוגרם לליטר) ומשום נוכחות של מגוון רחב של תרכובות אורגניות אחרות בדגימה (Díaz-Cruz et al., 2003). הנספח הנוכחי מציג את השלבים של פיתוח של שיטה אנליטית לזיהוי וכימות של אסטרוגנים מקולחים שניוניים באמצעות HPLC-MS/MS. פיתוח השיטה נדרש היות ובתקופת המחקר לא הייתה בארץ מעבדה שעסקה בכימות של אסטרוגנים באנליזות כימיות כ- HPLC-MS/MS או GC-MS/MS. אנליזה של אסטרוגנים בשיטה אימונו כימית אינה מתאימה ליישום במחקר הנוכחי משום היעדר אפשרות של זיהוי תוצרי פירוק בלתי מוכרים. בעולם קיימים פרוטוקולים שונים לאנליזה של אסטרוגנים בדגימות סביבתיות (נספח 1). בשל הקשיים האנליטיים עדיין נעשים מאמצים לשיפור השיטות (Brossa et al., 2004; Rodriguez-) בגין התלות של רגישות הבדיקה במכשור ובמדיום הנבדק היה צורך בהתאמה של שיטות קיימות לתנאי המחקר. בפרק הנוכחי מוצגים השלבים הכרוכים בפיתוח השיטה לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטיים. אופטימיזציה של השיטה בוצעה בהדרגה לגבי האסטרוגנים הטבעיים (E1 ו E2) והתאמתה נבחנה בהמשך גם לגבי האסטרוגן הטבעי E3 והאסטרוגנים הסינטיים (EE2 ו MeEE2).

2. רקע מדעי

הפרוטוקולים לזיהוי וכימות של אסטרוגנים מבוססים לרוב על גישה רב שלבית הכוללת הכנה מקדימה של הדגימה באמצעות סינון (Filtration), מיצוי (Extraction), ניקוי (Purification), נידוף והמסה מחדש (Evaporation and Reconstitution) ולאחר מכן אנליזה כימית (López de- Alda et al., 2003; Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003).

סינון: הסינון נדרש להרחקה של חלקיקים מרחפים, בעיקר כאשר השלב הבא כולל מיצוי הדוגמא בטכניקה של מיצוי בפאזה מוצקה (Solid Phase Extraction, SPE). בשיטות רבות נעשה שימוש בפילטר זכוכית (Glass Fiber Filter) בקוטר נקבים של 0.22 עד 1.2 מיקרומטר (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003) משום שאינו סופח אסטרוגנים (Ternes et al., 1999a; Huang and Sedlak, 2001; López de Alda et al., 2003).

מיצוי: מיצוי של אסטרוגנים מבוצע לרוב בטכניקה של מיצוי פאזה מוצקה (SPE) ופחות במיצוי בפאזה נוזל-נוזל (Liquid Liquid Extraction, LLE; Ternes and Joss, 2006). החומר המקובל ביותר כפאזה סופחת בתהליך ה- SPE הוא C18 (Octadecyl Bonded Silica) (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003; Holland, 2003; López de-Alda et al., 2003; Ternes and Joss,

(2006), במחסנית (cartridge) או בדיסק. מיצוי של אסטרוגנים מדוגמאות סביבתיות מתבצע גם באמצעות פחם פעיל (Graphitized Carbon Black, GCB, Baronti et al., 2000; Holland, 2003;) Ternes ; Co-Polymers) או בקו-פולימרים (López de-Alda et al., 2003; Ternes and Joss, 2006 off) (and Joss, 2006). תהליך המיצוי באמצעות SPE יכול להיעשות באופן נפרד מהשלב האנליטי (Rodriguez-Mozaz et al., 2004;) (line או בצורה אוטומטית באמצעות המערכת הכרומטוגרפית (Stoob et al., 2005).

ניקוי: בדוגמאות מזוהמות כמיצוי קרקע או שפכים נדרש לעיתים שלב ניקוי נוסף (Ternes and Joss, 2006). קיימות טכניקות ניקוי שונות בניהן ניקוי המבוסס על תהליכים של ספיחה להרחקה של מזהמים פולאריים (למשל חלבונים, חומציות הומיות, חומצות שומן). ניקוי זה כולל למשל Silica Gel SPE (סיליקה עם חומציות חלשה), (Ternes et al., 1999b; Ternes et al., 2002; Andersen et al.,) (basic, natural, acidic) Aluminum Oxides , (al., 2004; Liu et al., 2004 Esperanza et al.,) , (2004; Ternes and Joss, 2006; Esperanza et al., 2007 Ingard et al., 2003;) Florisil או (Isobe et al., 2003; Okayasu et al., 2005). להרחקה של מולקולות שאינן טעונות. להרחקה של חומרים פולאריים ניתן להשתמש גם בניקוי המבוסס על מיצוי נוזל נוזל (Ingard et al., 2003 ; LLE). להרחקה של מולקולות טעונות ניתן להשתמש בניקוי המבוסס על ספיחה למחליף יונים (למשל הרחקה של אניונים כמו חומצות הומיות ע"י SPE הכולל פאזה של אמינו-פרופיל; Okayasu et al., 2005; Labadie and Budziski, 2005a). כמו כן קיים ניקוי המבוסס על הפרדה כרומטוגרפית של תרכובות על פי גודל מולקולה כ Gel Permeation Chromatography (GPC) נקרא גם (SEC) Size Exclusion Chromatography (Holland, 2003;) (De-Mes et al., 2005; Koh et al., 2007). יש המשלבים מספר מהשיטות הנ"ל לניקוי הדגימות לפני השלב האנליטי (Ingard et al., 2003; Okayasu et al., 2005).

נידוף: נידוף לצמצום של נפח הנוזל, הגברת הרגישות (ע"י ריכוז הדגימות) והחלפה של הממס מתבצע ב-Rotary Evaporation עבור נפחים גדולים, ולנפחים קטנים בדרך כלל באמצעות זרם עדין של גז חנקן בליווי חימום (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003).

אנליזה: ב-HPLC-MS/MS ההפרדה הכרומטוגרפית מתבצעת לרוב בקולונה C18 (Octadecyl Silane). ה-HPLC המשולב עם דיטקטור Diod Array (DAD) מסוגל להציג ספקטרום UV של המרכיבים הנבדקים ובמקרה הנוכחי לזהות בליעה אופיינית של אסטרוגנים (280 ננומטר). מגבלתו של ה-DAD היא רגישות נמוכה על רקע של מגוון חומרים אורגניים הקיימים בדגימה (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). שילוב של מערכת הפרדה עם יחידת גילוי מסוג MS ו-MS/MS מאפשרת זיהוי וכימות אסטרוגנים מדוגמאות סביבתיות. שילוב מערכת HPLC עם MS מתבצעת

דרך ממשק (interface) המאפשר יינון מסוג (ESI) Electrospray Ionization המתאים במיוחד במקרה של מולקולות מיוננות (Baronti et al., 2000; D'Ascenzo et al., 2003; Isobe et al., 2003) או באמצעות (APCI) Atmospheric Pressure Ionization, המתאים למולקולות בעלות פולאריות בינונית ונמוכה ושאין מיוננות (Lagana et al., 2000, 2001). לאחרונה התווספה שיטת יינון חדשה (APPI) Atmospheric Pressure Photo Ionization, (Robb et al., 2000). קיימים אנלייזרים שונים המשמשים לזיהוי מסת המולקולות. בשל רגישותו הגבוהה יחסית ה-Quadrupole משמש כאנלייזר הנפוץ ביותר (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). קיים גם גילוי באמצעות Ion-Trap Mass Detection (Benijts et al., 2002).

3. שיטות וחומרים

התאמה של הליך אנליטי לזיהוי וכימות של אסטרוגנים מקולחים באמצעות HPLC-MS/MS בוצעה במעבדה להידרו-כימיה באוניברסיטת תל-אביב. במהלכה פותח פרוטוקול עבודה הכולל סינון, מיצוי, ניקוי ואנליזה של האסטרוגנים. תהליך פיתוח השיטה התבסס על ניסויים עוקבים בהן נבחנה ההתאמה של כל אחד מהשלבים לשיפור רגישות השיטה. בשל ריבוי הניסויים והבדיקות הנדרשים פיתוח של שיטה אמינה, מוצגים קודם החומרים והתהליכים המרכזיים ולאחר מכן תיאור פרטני על אופן ביצוע של ניסויים נבחרים.

חומרים ותהליכים מרכזיים

חומרים: נעשה שימוש במים (H_2O) וממסים אורגאניים באיכות ULC-MS Grad (Bio-Lab LTD, Israel). סטנדרטים אנליטיים של אסטרוגנים (אסטרוגן-E1, אסטרוגן-E2, אסטרוגן-E3, אתינל-אסטרוגן-E2, ומסטרנול-MeEE2) נרכשו ב-Sigma-Aldrich®, ישראל.

קולחים: נעשה שימוש בקולחים שניוניים ממפעל טיפול השפכים של גוש דן (מט"ש השפד"ן) המאופיינים באיכות גבוהה (נספח 3). הקולחים נאספו לאחר סינון מקדים בפילטר בקוטר נקבים של $400\mu m$ להרחקה של חלקיקים גסים (סעיף 6.3). הקולחים נאספו בבקבוקי זכוכית כהה (amber) ונשמרו בקירור ובחושך עד הבאתם למעבדה (לכל היותר שעתיים ממועד האיסוף). במעבדה סוננו הקולחים (ראה להלן) ונשמרו בקירור (כ $4^{\circ}C$) עד למועד הניסוי, תוך 24 שעות.

סינון: סינון קולחים בוצע באמצעות משאבת וואקום אוויר יבשה (0.4bar) בפילטרים חד פעמיים בקוטר $0.45\mu m$ מסוג (Millipore) PVDF.

מיצוי: מיצוי הקולחים באמצעות SPE בוצע במתקן סינון בוואקום (Macherey-Negal Vacuum C18; Manifold for 24 Columns; איור 9, נספח 4). מחסניות SPE עם חומר סופח מסוג C18 (CHROMABOND, Macherey-Negal) שמשו למיצוי האסטרוגנים, אלא אם צוין אחרת. המחסניות הופעלו (activation) באמצעות הזרמה של 5ml אצטוניטריל (AcN) ו-5ml מים. הדוגמא

נטענה (loading) בקצב של 3 עד 5ml/min, לאחריה נשטפה המחסנית ב- 7ml וב- 5ml מים (washing). האסטרוגנים מוצו (extraction) על ידי הזרמה של 7ml אצטוניטריל. בתום הזרמתו של כל ממס יובשה המחסנית באמצעות זרם אוויר למשך מספר דקות. מחסניות SPE הכוללות חומר סופח מסוג פחם פעיל (CARBOPREP 90, 500mg, Resprep) ופחם פעיל משולב עם אמינופופיל (NAX 500mg and CARBON, 500mg, Resprep) הופעלו באמצעות הזרמה של 10ml תמיסה של דיכלורומתאן (DCM):מתנול (MeOH) ביחס של 20:80, 5ml מתנול ו 20ml מים מוחמצים ל pH 2 (חומצה כלורית מרוכזת). הדוגמא הוטענה בקצב של 3 עד 5ml/min. שטיפת המחסנית בוצעה ע"י הזרמה של 50ml מים, 10ml מתנול מוחמץ בחומצה פורמית (50mM) ו- 5ml מתנול. מיצוי הדוגמא בוצע ע"י הזרמה של 10ml דיכלורומתאן-מתנול (MeOH:DCM, 20:80).

ייבוש ונידוף: נידוף ממסים אורגאניים בנפחים קטנים (עד 20ml) בוצע באמצעות הזרמה של גז חנקן 5/9 בזרם עדין (Pierce Reaci-Vap III), בליווי חימום (עד 40°C). נפחים גדולים יותר של ממסים אורגאניים נודפו באמצעות מתקן לנידוף ממסים אורגאניים (Buchi Rotavapore R-200). נידוף של דוגמאות מימיות בוצעו באמצעות לאופיליזר (Ilshin Lab Co., LTD, Freeze Drying) (Lyophilizer), לאחר הקפאה של הנוזל המימי בחנקן נוזלי.

המסה מחדש: המסה של אסטרוגנים בוצעה באמצעות הוספה של 1ml תמיסה של מים: אצטוניטריל (20:80, AcN:H₂O) בשילוב עם סוניקציה (ב Sonic Cleaner) וחימום עדין (כ 40°C) למשך 10 דקות. **אנליזה של אסטרוגנים:** אנליזה של אסטרוגנים בוצעה באמצעות HPLC (Agilent, 1100), איור 10, (נספח 4) ו- MS (Finnigan, LCQ ion trap, איור 10, נספח 4). האסטרוגנים (הזרקה של 100µl) הופרדו בזמן ב- HPLC על פני קולונה מסוג C18 (Ace 5 C-18 250X2.1mm, id 5µm) או מסוג Phenyl (Ace Phenyl 250X2.1mm, id 5µm). במהלך הרצה נשמרו הקולונות ב- HPLC בטמפרטורה של 40°C. מים ואצטוניטריל או מים ומתנול (מוחמצים ל pH 2.6 באמצעות חומצה פורמית) שמשו כמריצים, שהוזרמו במהירות של 0.5 ו 0.4ml/min, בהתאמה. האסטרוגנים זוהו ב- HPLC באמצעות גלאי DOD-UV (אורך גל של 280nm).

זיהוי יונים מולקולאריים (MS) ושברי יונים (MS/MS) טעונים חיובית (PI), בוצע בספקטרוגרף מסות לאחר יינון המולקולות בממשק APCI. משתני ההפעלה של MS/MS כללו Isolation width: 2, Activation Q: 0.25, Activation time: 30msec ו Collision energy: 30%.

ריכוז האסטרוגנים נקבע על פי עקומות כיוול (7 ריכוזים) שהוכנה באמצעות מהולים של סטנדרטים אנליטיים (תחום בין 0.001 ל 0.5µg/ml). באופן עקבי מקדם המתאם שבין השטח לריכוז (R²) היה גבוה מ- 0.999. דוגמאות בלנק (תמיסה של 20:80, AcN:H₂O) שולבה בכל סדרה של הרצות אנליטיות.

מבחנים סטטיסטיים: הבדל בשיעור השבה (Analyte Recovery) נבחן באמצעות t-test, לאחר טרנספורמציה של Arcsin (במקרה של ערכי שיעור השבה המבוטאים באחוזים).

פירוט הניסויים

3.1 תנאי הרצה ב HPLC: הפרדה בין E1 ו E2 על פני קולונה מסוג C18 באמצעות הזרמה של מים ואצטוניטריל כמריצים

הפרדה של האסטרוגנים בזמן נבחנה ב HPLC על פני קולונה מסוג C18. הדוגמאות הוזרקו ל-HPLC בנפח מרבי (100µl) והסיגנאל נקרא באמצעות גלאי DAD-UV באורך גל של 280nm. המריצים (H₂O ו AcN), מוחמצים בחומצה פורמית ל pH 2.6 הוזרמו במהירות של 0.5ml/min, בגרדיאנט הכולל הזרמה של 35% ממס אורגאני למשך 0.5 דקה, עליה ל- 100% ממס אורגאני במשך 3 דקות ושמירה על הרכב מריצים זה למשך 3 דקות נוספות. יעילות ההפרדה (רזולוציה, R) חושבה על פי משוואה 1.

$$R = [t_2 - t_1] / \left[\frac{1}{2} W_1 + \frac{1}{2} W_2 \right] \times \frac{2.35}{2} \quad \text{משוואה 1:}$$

t₁ ו t₂ מייצגים זמן יציאה של הפיק הראשון והשני (בדקות), בהתאמה ו W₁ ו W₂ מייצגים את רוחב הפיק הראשון והשני (בדקות), בהתאמה.

3.2 זיהוי יונים מולקולאריים (MS) ושבריהם (בשיטת MS/MS)

זיהוי m/z של יונים מולקולאריים דומיננטיים (MS) ושברי יונים דומיננטיים (בשיטת MS/MS) של אסטרוגנים טבעיים (E1, E2 ו E3) וסינטיים (EE2 ו MeEE2) בוצע בספקטרוגרף מסות באמצעות הזרקה של תמיסות סטנדרטים אנליטיים של אסטרוגנים (ריכוז 1µg/ml) המומסים בתמיסה של אצטוניטריל ומים (AcN: H₂O, 20:80) ומוחמצים בחומצה פורמית (0.1%). תמיסת האסטרוגנים הוזרקה למכשיר ה MS ישירות בקצב של כ- 270µl/min. מולקולות האסטרוגנים יוננו באמצעות ממשק (interphase) מסוג (APCI) Atomic Pressure Chemical Ionization. יונים מולקולאריים ושברי יונים טעונים חיובית (PI) הופרדו באנלייזר מסוג Ion Trap בסריקה של טווח m/z=50-400 .amu

3.3 הדירות הסיגנל בגלאי UV וב- MS

הדירות של גלאי UV ו MS נבחנו באמצעות מעקב אחר שינויים בעוצמה ושטח של סיגנל אסטרוגנים שהוזרקו ל HPLC-MS/MS לסירוגין עם דוגמאות בלנק (AcN: H₂O 10:90) ולסירוגין עם הזרקות של נוזל שטיפה (AcN, Acetone או Ethanol). סיגנל UV של אסטרוגנים נמדד באורך גל של 280nm. סיגנל ה- MS נמדד באמצעות השטח המתקבל עבור היון מולקולארי של E2 ושל E1 ([MH]⁺=255.5)

$[MH]^+ = 271.4$, בהתאמה). בשלב הראשון הוזרקו האסטרוגנים ל HPLC-MS/MS (E1 ו E2), נפח הזרקה $100\mu\text{l}$ וריכוז $10\mu\text{g/ml}$ ללא קולונה ב HPLC. שטח וגובה הסיגנלים נקבע עבור סדרה הכוללת רצף של 20 הזרקות של דוגמת אסטרוגנים ובלנק לסירוגין, או אסטרוגנים ונוזל שטיפה ($100\mu\text{l}$) לסירוגין. כמו כן נבחן גובה ושטח הסיגנל של האסטרוגנים בסדרה הכוללת שתי הזרקות של שטיפה (AcN, Ethanol או Acetone) בין כל דוגמה המכילה אסטרוגנים. לאחר בחירה של הרצף המתאים, שולבה מחדש קולונה C18 ב HPLC והדירות האסטרוגנים ב UV ו MS נבחנו מחדש.

3.4 מיצוי אסטרוגנים באמצעות SPE

א. מיצוי אסטרוגנים ממים :

נבחנה התאמה של מחסניות SPE הכוללות LiChrolut RP-18, (Mercherey-Negal) Chromabond (Merck) ו- (Strata) Phenomenex למיצוי אסטרוגנים ממים. בכל המחסניות פאזה סופחת מסוג C18 (500mg , 6ml). עבור כך נקבע שיעור השבה של E1 ו E2 בריכוזים בין 5 ל $100\mu\text{g/l}$ מתמיסה מימית בנפח 100ml . המחסניות שופעלו (conditioning) באמצעות הזרמה של 5ml אצטוניטריל (AcN) ו 5ml מים. הדוגמאות הוטענו (loading) בקצב של 3 עד 5ml/min , ולאחר מכן נשטפו ב- $5 + 7\text{ml}$ מים. לאחר ייבוש המחסנית באמצעות זרם אוויר למשך מספר דקות, האסטרוגנים מוצו (extraction) על ידי הזרמה של 5ml אצטוניטריל. הממס (AcN) נודף עד ייבוש מלא באמצעות זרם עדין של גז חנקן בליווי חימום לכ- 40°C . בהמשך הדוגמאות הומסו מחדש (reconstitution) בתמיסה של $10:90$, AcN:H₂O (1ml) וריכוז האסטרוגנים בתמיסה נקבע ב- HPLC-MS/MS (גרדיאנט מריצים ב HPLC כמפורט בסעיף 3.1). שיעור השבה של האסטרוגנים נקבע על פי יחס בין ריכוזם בתום המיצוי לבין ריכוזם בתמיסות ייחוס.

ב. מיצוי אסטרוגנים מקולחים :

התאמה של הליך SPE למיצוי אסטרוגנים מקולחים שניוניים במחסניות המכילות חומר סופח מסוג C18 (Chromabond, 1g , Macherey-Negal) נבחנה באמצעות קביעה של שיעור השבה של האסטרוגנים לאחר המיצוי. האסטרוגנים (0.1 , 0.01 ו $0.005\mu\text{g/ml}$ E1 ו E2) הוספו באופן מבוקר לקולחים שניוניים (100ml) מסוננים (פילטר $0.45\mu\text{m}$ PVDF) ומוצו לפי המפורט בסעיף 3.4 אי לעיל. בכל מחסנית נעשה שימוש עד שלוש פעמים (הטענה של ריכוזים נמוכים קדמה לריכוזים גבוהים). בין העמסות של אותה מחסנית בדוגמאות עוקבות של אסטרוגנים, נשטפה המחסנית ב- 5ml אצטוניטריל (AcN), 5ml אתילאצטט (Ethyl acetate), 5ml אצטוניטריל ו- 5ml מים. קולחים ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמשו לקביעה של ריכוז הרקע של האסטרוגנים בקולחים. אנליזה של ריכוז האסטרוגנים בוצעה ב- HPLC-MS/MS. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין

שטח סינגל האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס.

נבחנה גם התאמה של כמות כפולה של פאזה סופחת מסוג C18 ב SPE (2g) למיצוי אסטרוגנים (E1 ו E2 1µg/l) מנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים (0.45µ PVDF). במקרה זה מחסניות SPE הופעלו (conditioning) באמצעות הזרמה של 5ml אצטוניטריל (AcN) ו 5ml מים. הדוגמאות הועמסו בקצב של 3 עד 5ml/min, ולאחר נשטפו באמצעות הזרמה כפולה של 7ml תמיסה של מים:אצטוניטריל (AcN:H₂O, 5:95). האסטרוגנים מוצו בנפח של 6ml אצטוניטריל. נידוף, המסה מחדש ואנליזה של אסטרוגנים ב HPLC-MS/MS בוצעו כמפורט לעיל.

התאמה של מחסניות המכילות 2 גרם פאזה סופחת מסוג C18 למיצוי אסטרוגנים מליטר קולחים שניוניים נבחנה גם באמצעות קביעה של שיעור השבה של ריכוזים שונים של E1 ו E2 (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 ו 10µg/ml) מקולחים שניוניים מסוננים (1L). תהליך מיצוי ואנליזה כמפורט לעיל.

3.5 שיפור רגישות השיטה

א. אסטרוגנים מומסים במים :

עוצמת סינגל (NL) ושטח פיק (AA) של יונים מולקולאריים (MS) ושברי יונים (MS/MS) של אסטרוגנים נקבעו בנוכחות מתנול (MeOH) או אצטוניטריל (AcN) כמריצים אורגאניים ב HPLC. E1 ו E2 (1µg/ml) הוזרקו ל- HPLC (נפח הזרקה של 100µl) בקולונה מסוג C18. מתנול או אצטוניטריל בשילוב עם מים (כל המריצים מוחמצים בחומצה פורמית, 0.1%) הוזרמו בתכנית גרדיאנט המפורטת בסעיף 3.1. יונים מולקולאריים של אסטרוגנים נסרקו ב MS ב SRM (E1 ו E2, m/z=271.4, m/z=255.4, עבור E1 ו E2, בהתאמה) ושברי יונים ב- SIM (m/z=157.4, m/z=159.4, עבור E1 ו E2, בהתאמה). בנוסף לכך, נבחן השטח של שברי היונים (MS/MS) של ריכוזים שונים של אסטרוגנים (בין 0.0005 ל 1µg/ml E1 ו E2) מומסים במים בנוכחות מתנול ואצטוניטריל כממסים אורגאניים, כמפורט לעיל.

השפעה של מתנול על יעילות הפרדה (רזולוציה) של האסטרוגנים (E1 ו E2 1µg/ml), נפח הזרקה של 100µl בקולונה HPLC מסוג C18 נבחנה גם בתכניות גרדיאנט נוספות הכוללות הרכבים של בין 10 ל- 40% ממס אורגאני שהוזרמו לפרקי זמן של בין 0.5 ל 2 דקות בתחילת הגרדיאנט. לאחר מכן הועלה אחוז הממס האורגאני במריץ עד ל 100%, במשך שלוש דקות. כמו כן נבחנה יעילות הפרדה בין האסטרוגנים על פני אותה קולונה בנוכחות מריץ אורגאני המכיל שילובים שונים של אצטוניטריל ומתנול. הרכב המריץ האורגאני כלל יחס של 70:30 MeOH:AcN ועד 100 MeOH. המריצים הוזרמו בתכנית גרדיאנט המתחילה ב 35% ממס אורגאני למשך 0.5 דקה, עליה הדרגתית ל- 100% ממס אורגאני במשך 3 דקות ו 3 דקות נוספות של 100% ממס אורגאני.

נבחנה גם התאמתה של קולונה מסוג Phenyl (Ace. Phenyl, 250X2.1mm, 5µm) להפרדה של אסטרוגנים (E1 ו E2 1µg/ml מומסים במים) בנוכחות מריצים הכוללים מים ומתנול שהוחמצו בחומצה פורמית (0.1%). סלקטיביות הקולונה נבחנה בהזרמה של המריצים בתכנית גרדיאנט המתחילה ב- 35% ממס אורגאני למשך 0.5 דקה, עליה הדרגתית ל- 100% ממס אורגאני במשך 3 דקות ו- 3 דקות נוספות של 100% ממס אורגאני. שטחי הפיקים של היונים נקבעו ב MS/MS. בהמשך לכך נבחנה סלקטיביות הקולונה גם לאסטרוגן הטבעי E3 ולאסטרוגנים הסינתטיים EE2 ו MeEE2 באמצעות הזרקה של תמיסה מימית של אסטרוגנים אלו (100µl, 1µg/ml) ואנליזה ב HPLC-MS/MS.

ב. אסטרוגנים מומסים בקולחים :

התאמה של השיטה שתוארה לעיל נבחנה באמצעות קביעה של שיעור השבה של E1 ו E2 (0.005), (0.01, 0.05 ו 0.1µg/l) מנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים (PVDF, 0.45µm). קולחים מסוננים, ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמשו להערכה של ריכוז הרקע של האסטרוגנים בקולחים. האסטרוגנים מוצו באמצעות SPE הכולל פאזה הפוכה מסוג C18 (סעיף 3.4 ב'). אנליזה לריכוז האסטרוגנים בוצעה ב HPLC-MS/MS. מים ומתנול (מוחמצים בחומצה פורמית, 0.1%) שמשו כמריצים. הני"ל הוזרמו בתכנית בגרדיאנט המתחילה ב- 35% ממס אורגאני למשך 0.5 דקה, עליה הדרגתית ל 100% ממס אורגאני במשך 3 דקות ו 3 דקות נוספות של 100% ממס אורגאני. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח הסיגנל של האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס.

כמו כן נבחנה ההשפעה של שיפוע גרדיאנט המריצים ב HPLC על שטח וגובה שברי היונים של E2 מומס במיצוי קולחים. E2 הומס בנפח של 1ml שהופק ממיצוי של 500ml קולחים שניוניים (מיצוי ב SPE הכולל C18, כמפורט בסעיף 3.4 ב') לריכוז של 1µg/ml. דוגמא (100µl) הוזרקה ל HPLC-MS/MS והורצה בתכניות גרדיאנט שונות הכוללות עליה מדורגת של מתנול מ- 35 ל- 100% בפרקי זמן של 3, 5, 7, 10 ו 15 דקות. שיעור השבה של E2 נקבע כיחס בין שטח סיגנל של שברי היונים במיצוי הקולחים לבין זה של תמיסות ייחוס, באותו ריכוז.

השפעה של איכות הקולחים על רגישות אנליזה של אסטרוגנים ב MS נבחנה גם באמצעות השוואה של שיפוע עקומות כיוול של E1 ו E2 שהומסו במים (ULC-MS grade) ובנפחים עולים של מיצוי קולחים שניוניים (100, 200, 1000 ו 2000ml). מיצוי הקולחים בוצע ב SPE המכיל C18 כמפורט לעיל (סעיף 4.3 ב'). האסטרוגנים הוספו למים ולקולחים לקבלת ריכוז שבין 1 ל 0.0025µg/ml. שלוש דוגמאות של קולחים שניוניים שרוכזו פי 100 ופי 1000 (ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים) שמשו לקביעה של ריכוז רקע של אסטרוגנים בקולחים. עוצמת סיגנל של שברי היונים נקבעה ב MS/MS. הפרדה של אסטרוגנים בוצעה על פני קולונה מסוג Phenyl בנוכחות מים ומתנול שהוחמצו בחומצה

פורמית (0.1%). המריצים הוזרמו בתכנית גרדיאנט המתחילה ב- 35% ממס אורגאני, לאחריו עליה ל- 100% ממס אורגאני במשך 15 דקות ו 3 דקות נוספות ב- 100% ממס אורגאני.

3.6 ניקוי דוגמאות אסטרוגנים בקולחים שמוצו ב SPE הכולל C18, באמצעות פאזה ישרה
 בניסוי זה בחנתי אפשרות של ניקוי הדגימה ממזהמים ע"י הוספה של שלב מיצוי בפאזה ישרה (Direct Phase, DP) לדוגמאות אסטרוגנים שמוצו מקולחים בפאזה הפוכה (C18). לליטר קולחים שניוניים מסוננים (PVDF, 0.45µm) הוספו אסטרוגנים (0.1µg/l) טבעיים וסינטטיים (E2, E1, EE2 ו MeEE2). קולחים ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמשו לקביעה של ריכוז הרקע בקולחים. בשלב הראשון בוצע מיצוי האסטרוגנים מקולחים באמצעות SPE הכולל פאזה הפוכה מסוג C18 כמפורט לעיל (סעיף 3.4 ב'). בשלב שני נבחן ניקוי הדוגמה הנ"ל על ידי ביצוע מיצוי נוסף במחסניות SPE (Fenomenex, Strata) בהן 1g פאזה מסוג Florisil, Natural Alumina או Aminopropyl. שטח פנים, גודל חלקיקים ונפח חללים של הפאזות הנ"ל מוצג בטבלה 1.

טבלה 1: שטח פנים (Surface area), גודל חלקיקים (Particle size) וגודל נקבים (Pore size) של פאזה מסוג פלוריסיל (Florisil), אלומינה טבעית (Natural Alumina) ואמינופרופיל (Aminopropyl) תוצרת Strata Fenomenex

	Florisil	Aminopropyl	Natural Alumina
Surface area (m ² /g)	266	500	150
Particle size (µm)	140	55	20
Pore size (Å)	83	70	120

הרכב הממסים להמסה של האסטרוגנים בתום שלב מיצוי בפאזה הפוכה והרכב ונפח הממסים בשלבים שונים של SPE בפאזה ישרה מסוג אמינופרופיל (שני פרוטוקולים I ו II), פלוריסיל ואלומינה טבעית מפורטים בטבלה 2.

בתום מיצוי האסטרוגנים בפאזה ישרה נודפו הדוגמאות במלואן באמצעות זרם עדין של גז חנקן בליווי חימום עדין (כ 40°C). האסטרוגנים הומסו מחדש (reconstitution) ב- 1ml תמיסה של מים:אצטוניטריל (20: 80, AcN:H₂O), בשילוב סוניקציה (10min). אנליזה של האסטרוגנים בוצעה ב HPLC-MS/MS וכללה הפרדה של האסטרוגנים על פני קולונה HPLC מסוג Phenyl בנוכחות מים ומתנול מוחמצים בחומצה פורמית (0.1%). המריצים הוזרמו בתכנית גרדיאנט המתחילה בהרכב של 35% ממס אורגאני. לאחריו עליה ל- 100% ממס אורגאני במשך 15 דקות ו- 3 דקות נוספות של 100% ממס אורגאני. שעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח הסינגל של האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס.

טבלה 2: נפח והרכב ממסים להמסה מחדש (Reconstitution), שפעול של מחסניות (Conditioning), שטיפה (Washing) ומיצוי (Elution) של דוגמאות אסטרואגנים בפאזה ישרה (DP מסוג פלוריסיל (Florisol), אלומינה טבעית (Natural Alumina) ואמינופרופיל (Aminopropyl) תוצרת Strata Fenomenex. כמו כן מוצג נפח והרכב מריצים המשמש לשטיפה של מחסניות בין העמסות עוקבות של דוגמאות (Cleaning and Reactivation)

	Aminopropyl (I)	Aminopropyl (II)	Florisol	Alumina*
Reconstitution	1ml Ethyl acetate	1ml Ethyl acetate:MeOH (80:20)	1ml Hexan:DCM (1:1)	1ml DCM:Hexan (15:85)
Conditioning	5ml Ethyl acetate	A. 5ml Ethyl acetate B. 5ml Ethyl acetate:MeOH (80:20)	5ml Hexan:DCM (1:1)	A. 9ml MeOH:Acetone (30:70) B. 9ml DCM:Hexane (15:85)
Loading	**	**		
Washing	2X2ml Ethyl acetate	2X2ml Ethyl acetate	5ml Hexan:DCM (1:1)	A. 9ml Hexane
Elution and Collection			5+2ml DCM:Acetone (95:5)	B. 9ml MeOH:Acetone (30:70)
Cleaning and Reactivation	A. 5 ml MeOH:H ₂ O (95:5) B. 5ml Ethyl acetate	A. 5 ml MeOH:H ₂ O (95:5) B. 5ml Ethyl acetate	A. 5 ml DCM:MeOH (80:20) B. 5 ml DCM:Acetone (95:5) C. 5ml Hexan:DCM (1:1)	A. MeOH:Acetone (50:50) B. DCM:Hexane (15:85)

*Addition of Anhydrous Sodium Sulfate (1g) on top of the sorbent

** Collection of the sample during loading

Reconstitution: resolution of estrogens after extraction with C18

DCM-Dichloromethane, MeOH-Methanol

3.7 קביעה של גבול סף הרגישות (LOD) וכימות (LOQ) במיצוי אסטרואגנים בקולחים שניוניים בפאזה הפוכה (C18) וניקוי בפאזה ישרה (Florisol)

LOD ו LOQ נקבעו על בסיס של יחס מינימאלי של 1:3 ו 1:9, בהתאמה בין גובה הסיגנאל המתקבל עבור שברי יונים וגובה הרעש (Gentili et al., 2002; Gomes et al., 2005; Labadie and Budzinski, 2005a). משום שנדרש העדר נוכחות אסטרואגנים בדוגמאות הקולחים, נאספו קולחים באיכות שלישונית (לאחר טיפול (Soil Aquifer Treatment, SAT) ממט"ש השפד"ן. אסטרואגנים (E2, E1, EE2 ו MeEE2) הוספו לנפחים של ליטר קולחים מסוננים (0.45µm, PVDF) לריכוז של 0, 1, 2 ו 5ng/l. הקולחים מוצו ב SPE הכולל פאזה הפוכה מסוג C18 לאחריו נוקו בפאזה ישרה מסוג פלוריסיל, כמפורט לעיל (סעיף 3.6). בנוסף, הוספו אותם אסטרואגנים (100ng/l) לנפח של ליטר

קולחים שניוניים מסוננים על מנת לקבוע את שיעור השבה. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח הסיגנל של האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס (Gomes et al., 2005). אנליזה של אסטרוגנים בוצעה ב HPLC-MS/MS כמפורט לעיל (סעיף 3.6).

3.8 שיפור ניקוי דגימות קולחים שניוניים עבור אנליזה של אסטרוגנים באמצעות פחם פעיל ופחם פעיל משולב עם מחליף אניונים חלש

בניסיון לשפר את רמת ניקוי דגימות הקולחים מהפרעה של חומרים אורגאניים נבדק מיצוי SPE באמצעות פחם פעיל ופחם משולב עם מחליף אניונים חלש מסוג אמינופרופיל (Aminopropyl). בשלב הראשון הושווה שיעור השבה של אסטרוגנים טבעיים ($0.1\mu\text{g/l}$, E2 ו E1 שהוספו ל 500ml קולחים שניוניים) שמוצו באמצעות פחם פעיל (Resprep, 500mg) ופחם פעיל משולב עם מחליף אניונים (Resprep; 500mg של כל חומר) לשיעור השבה של אסטרוגנים שמוצו ב C18 (Chromabond, 500mg). נפח זהה (500ml) קולחים ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמש לקביעה של ריכוז רקע בקולחים. מיצוי האסטרוגנים באמצעות C18 בוצע כמפורט בסעיף 3.4 ב'. הפעלה של מחסניות פחם פעיל ופחם משולב עם מחליף אניונים בוצעה על ידי הזרמת 10ml תמיסה של דיכלורומתאן:מתנול (MeOH:DCM, 20:80), 5ml מתנול ו-20 מיליליטר מים מוחמצים ל pH 2 בחומצה כלורית מרוכזת. הדוגמא הוטענה בקצב של כ- 5ml/min. שטיפת המחסנית בוצעה ע"י הזרמה של 50ml מים, 10ml מתנול מוחמץ בחומצה פורמית (50mM) 5ml מתנול. מיצוי האסטרוגנים בוצע באמצעות הזרמה של 10ml דיכלורומתאן:מתנול (MeOH:DCM, 20:80). בתום המיצוי נודפו הדוגמאות עד ייבוש מלא באמצעות הזרמה של גז חנקן בליווי חימום עדין (40°C). המסה מחדש בוצעה באופן זהה לזה של דוגמאות שמוצו ב C18. אנליזה של האסטרוגנים בוצעה ב HPLC-MS/MS (הרצה על פני קולונה HPLC, מסוג Phenyl, לפי המפורט בסעיף 3.6).

בשלב שני נבחנו שיעור השבה של אסטרוגנים E1 ו E2 ($0.01\mu\text{g/ml}$ ו $0.05, 0.1, 0.5, 1$) מ 1 ליטר קולחים שניוניים מסוננים באמצעות SPE המכיל פחם פעיל או פחם משולב עם מחליף אניונים. נפח זהה (1 ליטר) של קולחים שניוניים ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמש לקביעה של ריכוז הרקע של האסטרוגנים בקולחים. ההורמונים מוצו במחסניות המכילות פחם פעיל או פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים כפי שתואר לעיל. אנליזה של ריכוז אסטרוגנים בוצעה ב HPLC-MS/MS כמפורט בסעיף 3.6. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח הסיגנל של האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס.

נבדקה ההתאמה של השיטה שתוארה עד כה הכוללת מיצוי SPE עם פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים לזיהוי וכימות של האסטרוגן הטבעי E3 והסינטיים EE2 ו MeEE2. האסטרוגנים E1, E2,

EE2 ו MeEE2 הוספו בארבעה מועדים שונים (100ng/l) לנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים. האסטרוגן הטבעי E3 הוסף לקבלת ריכוז של 200ng/l. קולחים ללא הוספה מבוקרת של אסטרוגנים שמשו לקביעה של ריכוז רקע של אסטרוגנים בקולחים. דוגמאות האסטרוגנים מוצו מהקולחים באמצעות SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים כמפורט לעיל. בתום המיצוי נודפו הדוגמאות עד ייבוש מלא והומסו מחדש בנפח של מיליליטר אחד מים:אצטוניטריל (AcN:H₂O), 20:80. אנליזה של האסטרוגנים בוצעה כמפורט בסעיף 3.6. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח הסיגנל של האסטרוגנים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס.

בתום מיצוי ב-SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים שיעור השבה של אסטרוגנים סינטטיים היה נמוך יחסית לטבעיים. נבחנו סיבות אפשריות ודרכים לשיפור שיעור ההשבה המפורטים להלן.

נבחנה השפעה של משך השהייה של האסטרוגנים על פני הפאזה הסופחת על שיעור השבתם. E2 ו EE2 הומסו ב-100ml מים (ULC-MS grade, 1µg/ml). בחלק מהדגימות בוצע מיצוי ברצף כמתואר לעיל. בחלק נוסף הושהו ההורמונים על פני החומר הסופח, ושלב המיצוי בוצע לאחר 5 או 20 שעות. אנליזה של אסטרוגנים וחישוב שיעור השבה בוצעו כמתואר לעיל.

מאחר והאסטרוגנים הסינטטיים אפולאריים יותר מאשר הטבעיים נבחנה האפשרות שחלקם שקע בקולחים טרם שלב ה-SPE. אסטרוגנים (E1, E2, EE2 ו MeEE2) הומסו ב-100ml לריכוז סופי של 0.1µg/l בקולחים שניוניים מסוננים וב-100ml קולחים שניוניים מסוננים המכילים 10 או 20% מתנול (MeOH). כמו כן נבחן שיעור השבה של אותם אסטרוגנים (0.1µg/l) מנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים ולליטר קולחים שניוניים המכילים 20% מתנול. קולחים באותם נפחים להם לא הוספו האסטרוגנים באופן מבוקר שמשו לקביעה של ריכוז רקע של האסטרוגנים בקולחים. מיצוי האסטרוגנים בוצע ב-SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים, אנליזה של אסטרוגנים וחישוב שיעור השבה בוצעו כמתואר לעיל.

בוצעה השוואה של שיעור השבה של אסטרוגנים (E1, E2, EE2 ו MeEE2, 0.1µg/l) שמוצו מנפח של 1 ליטר קולחים שניוניים בפחם פעיל משולב עם מחליף אניונים לפי הפרוטוקול שפורט לעיל (סעיף 3.8) לבין השבתם לאחר שטיפה נוספת ב-10ml דיכלורומתן (DCM) בשלב המיצוי. כדי לבחון את ההשפעה של השלבים הנ"ל על שיעור ההשבה של האסטרוגנים נבחן גם שיעור השבה של אסטרוגנים (0.1µg/ml) שהוספו לאחר שלב המיצוי.

נבחנה השפעה של סוג והרכב תמיסות מיצוי שונות על שיעור השבה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים. האסטרוגנים (1µg/l) הוספו לנפח של ליטר קולחים שניוניים ומוצו באמצעות SPE המכיל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים (כמפורט בסעיף 3.8). בנוסף לכך נבחנה התאמה של מיצוי נפח זהה (10ml) של דיכלורומתן:אצטוניטריל (AcN:DCM, 20:80), דיכלורומתן:הקסן

(Hexane: DCM, 50:50) או אתיל אצטט (Ethyl acetate). ריכוז רקע של אסטרוגנים בקולחים נקבע בפרוטוקול הרגיל.

בניסיון לשפר את שיעור השבה של אסטרוגנים סינטטיים מנפח של 1 ליטר קולחים שניוניים בהשוואה לטבעיים נבחן מיצוי אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים (E2, E1, EE2 ו MeEE2) ב SPE הכולל רצף של מחליף אניונים מסוג אמינו פרופיל (Phenomenexs, Strata, 500mg), פחם פעיל (500mg) ושוב מחליף אניונים מסוג אמינו פרופיל (500mg).

כמו כן נבחן טיפול הכולל החמצה של הקולחים (pH=6 בחומצה פורמית) טרם הוספה מבוקרת של האסטרוגנים. זאת על מנת לשלול אפשרות של אינטראקציה בין הורמונים סינטטיים שמוספים לקולחים לבין מתכות שעשויות להימצא בהם.

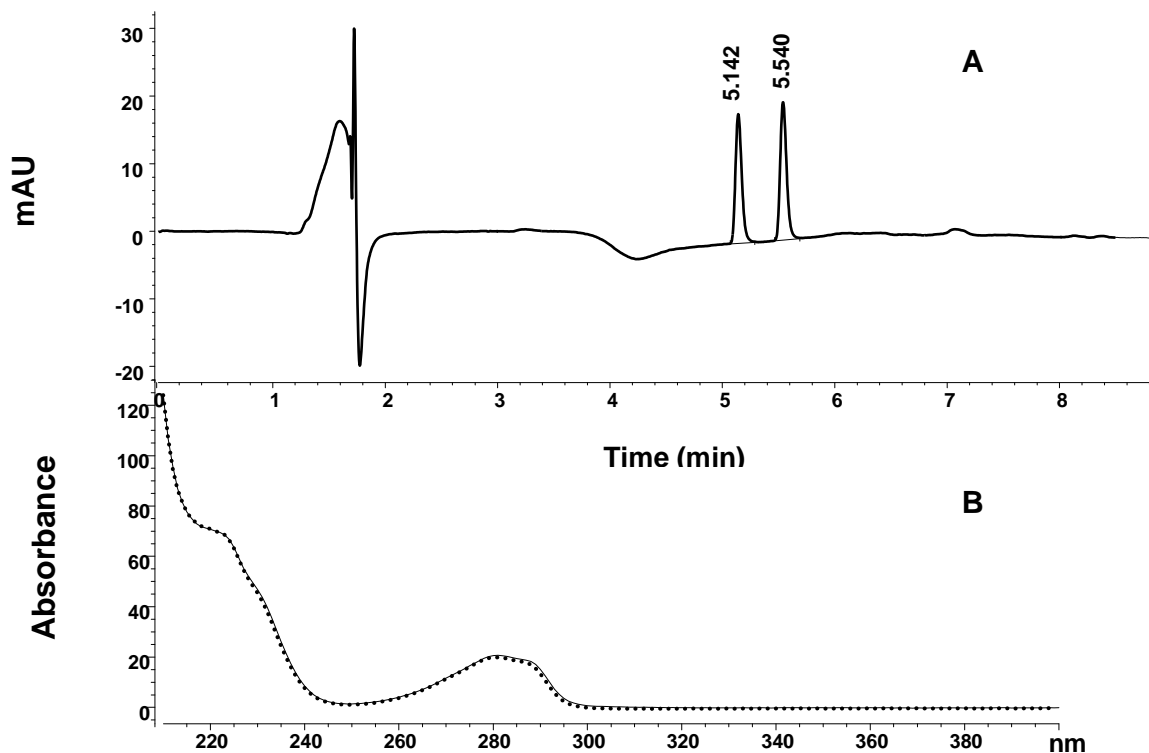
3.9 קביעה של גבול סיף הרגישות (LOD) וכימות (LOQ) במיצוי אסטרוגנים מקולחים שניוניים באמצעות פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים

LOD ו LOQ נקבעו על בסיס של יחס מינימאלי של 1:3 ו 1:9, בהתאמה בין גובה הסיגנאל של שברי יון מולקולאריים וגובה הרעש (Gentili et al., 2002; Gomez et al., 2005; Labadie and Budzinski, 2005a). משום שנדרש העדר נוכחות אסטרוגנים בדוגמאות הקולחים, נאספו קולחים באיכות שלישונית (לאחר טיפול SAT) ממט"ש השפד"ן. אסטרוגנים (E2, E1, E3, EE2 ו MeEE2) הוספו לנפחים של ליטר קולחים מסוננים (PVDF, 0.45µm) לריכוז של 1, 2, 5 ו 10ng/l. הקולחים מוצו ב SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים כמפורט לעיל. כמו כן נקבע שיעור השבה על ידי הוספה של אותם אסטרוגנים (100 ng/l) לנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים. שיעור השבה בתום המיצוי חושב על פי היחס שבין שטח סיגנל הורמונים שהוספו באופן מבוקר לקולחים לאחר תיקון לריכוז הרקע (blank) לבין שטח האסטרוגנים בתמיסות ייחוס (Gomez et al., 2005). אנליזה של אסטרוגנים בוצעה כמפורט לעיל.

4. תוצאות

4.1 תנאי הרצה ב HPLC: הפרדה בין E1 ו E2 על פני קולונה מסוג C18 באמצעות הזרמה של מים ואצטוניטריל כמריצים

הפרדה מתאימה של האסטרוגנים בכרומטוגרמה (רזולוציה $R > 2$, איור 4.1) נתקבלה בהזרמה של המריצים בגרדיאנט שבו 35% ממס אורגאני (AcN) למשך 0.5 דקה, עליה ל- 100% ממס אורגאני במשך 3 דקות ושמירה על 100% ממס אורגאני למשך 3 דקות נוספות.

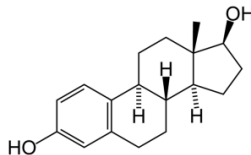


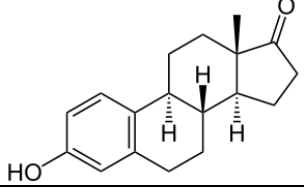
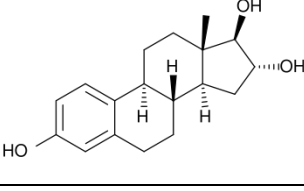
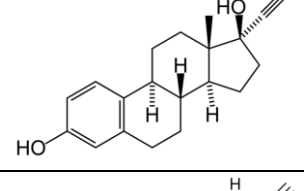
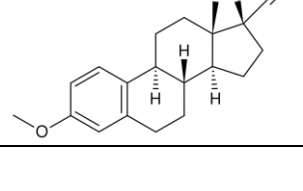
איור 4.1: A. כרומטוגרמת LC/UV (אורך גל 280nm) עבור E2 (RT=5.14min) ו E1 (RT=5.54min). B. ספקטרום הבליעה של שני האסטרוגנים (E2, קו רציף), עם שיאי בליעה באורכי גל של כ 205nm, 225nm ו 280nm.

4.2 זיהוי יונים מולקולאריים (MS) ושבריהם (MS/MS)

יונים מולקולאריים (MS) של אסטרוגנים טעונים חיובית (PI) שיונו ב- APCI ושבריהם (MS/MS), מוצגים בטבלה 4.1. המסה הדומיננטית מבין שברי היון המולקולארי של E1 היא $m/z=253.4$. עם זאת, יון זה לא שמש להמשך זיהוי וכימות של אסטרוגנים בדגימות סביבתיות משום הדומיננטיות שלו גם ברעש רקע בדגימות ממקור של קולחים.

טבלה 4.1: מבנה מולקולארי, נוסחה כימית, משקל מולקולארי, יון מולקולארי (m/z) ושברי יון מולקולארי של אסטרוגנים טבעיים (E2, E1 ו E3) ושל אסטרוגנים סינתטיים (EE2 ו MeEE2). שאובחנו במחקר הנוכחי ב MS לאחר ינון (PI) ב APCI.

Estrogen	Molecular structure	Formula	MW	m/z MS	m/z MS/MS
17 β -stradiol (E2)		$C_{18}H_{24}O_2$	272.4	255.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	159.4 133.4

Estron (E1)		$C_{18}H_{22}O_2$	270.4	271.4 [M+H] ⁺	253.4 157.4 133.4
Estriol (E3)		$C_{18}H_{24}O_3$	288.4	271.4 [M+H-H ₂ O] ⁺	157.4 133.4
Ethinylestradiol (EE2)		$C_{20}H_{24}O_2$	296.4	279.3 [M+H-H ₂ O] ⁺	133.3 159.3
Mestranol (MeEE2)		$C_{21}H_{26}O_2$	310.4	293.3 [M+H-H ₂ O] ⁺	147.3 133.3 173.3

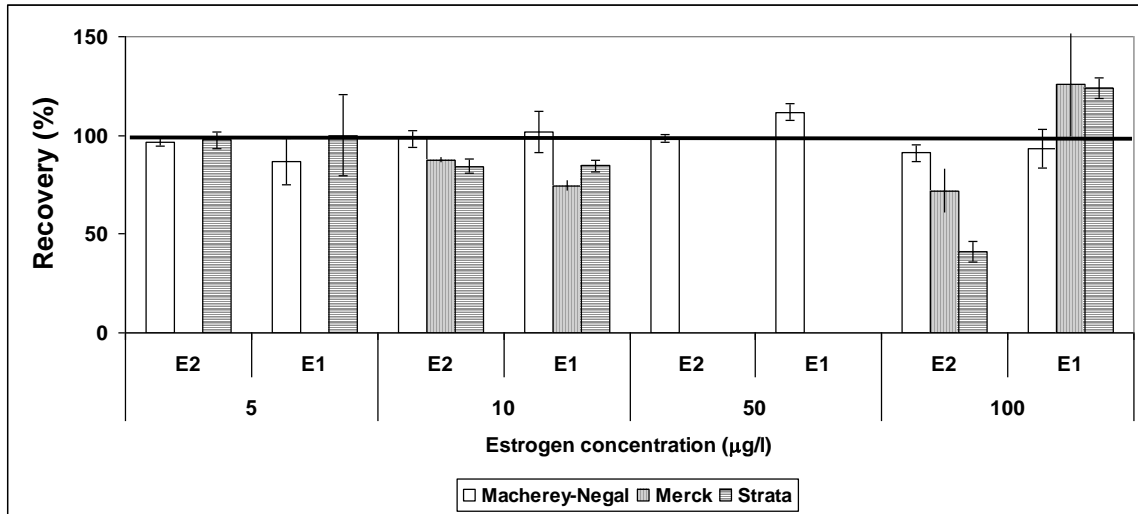
4.3 הדירות הסיגנאל בגלוי UV ו MS

בבדיקה של רצף דוגמאות אסטרוגנים (E1 ו E2) ובלנק לסירוגין בגלוי UV, בהיעדר קולונת HPLC, נתקבלה הדירות גבוהה שהתבטאה במקדם שונות (RSD או CV) נמוך של 0.3%. לעומת זאת הדירות נמוכה ל E1 ו E2 נתקבלה בגלוי ספקטרוגרף מסות (MS ; RSD של 13% ו 16%, בהתאמה) והתבטאה בעליה בשטח שהתקבל עבור היונים המולקולאריים של E1 ו E2 בדוגמאות עוקבות (שטח הפיק בהרצה עשירית גבוה פי 230% ו 308% מזה של הרצה ראשונה, עבור E1 ו E2, בהתאמה). במהלך הרצף הנ"ל זוהתה גם תופעה של "זיכרון" ב-MS, שהתבטאה בהופעה של סיגנלים של היונים המולקולאריים של האסטרוגנים גם עם הזרקה של דוגמאות הבלנק (שטח פיקים כ $1.9 \times 10^4 \pm 5.3 \times 10^3$ ו- $4.5 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$, עבור E1 ו E2, בהתאמה). תופעות אלו התקיימו גם כאשר שולבו שתי שטיפות באצטון או אצטוניטריל בין דוגמאות האסטרוגנים. יציבות בסיגנל האסטרוגנים ב-MS לאורך זמן התקבל רק לאחר שילוב של שתי שטיפות בתמיסה של אתנול (Ethanol) בין דוגמאות האסטרוגנים (סטטיית תקן יחסית שפחתה עד 5% עבור שני האסטרוגנים, נתקבלה לאחר 5 הזרקות של דוגמאות אסטרוגנים עם 2 שטיפות אתנול לסירוגין). נמצא שהטיפול הנ"ל לא שיבש את הדירות סיגנל ה-UV, שכן עם הוספה של קולונה C18 ב-HPLC, נמצאה הדירות גבוהה עם מקדם שונות של 0.1%. על כן, בפרוטוקול השיטה נכלל שילוב שתי שטיפות באתנול בין הזרקה של דוגמאות אסטרוגנים.

4.4 מיצוי אסטרוגנים באמצעות SPE

א. מיצוי אסטרוגנים ממים :

נבחן שיעור השבה של ריכוזים שונים של אסטרוגנים לאחר מיצויים במחסניות SPE המכילה חומר סופח מסוג C18 של חברות שונות. שיעור השבה הגבוה ביותר (>95%) הושג באמצעות מחסניות Chromabond (Mercherey-Negal, איור 4.2). סלקטיביות נמוכה יותר לאסטרוגנים נמצאה במקרה מחסניות (Merck) LiChrolut RP-18 ו-(Strata) Phenomenex, במיוחד בריכוזים הגבוהים. על כן, במחקר הנוכחי אומץ פרוטוקול מיצוי אסטרוגנים ב SPE ובו שימוש במחסניות Chromabond.



איור 4.2: יעילות השבה של ריכוזים שונים של E1 ו E2 לאחר מיצוי באמצעות מחסניות SPE C18 (500mg, 6 ml) הכוללות Chromabond (Mercherey-Negal, עמודות לבנות), Phenomenex, ו-(Merck) LiChrolut RP-18 (עמודות אופקיות) Starata.

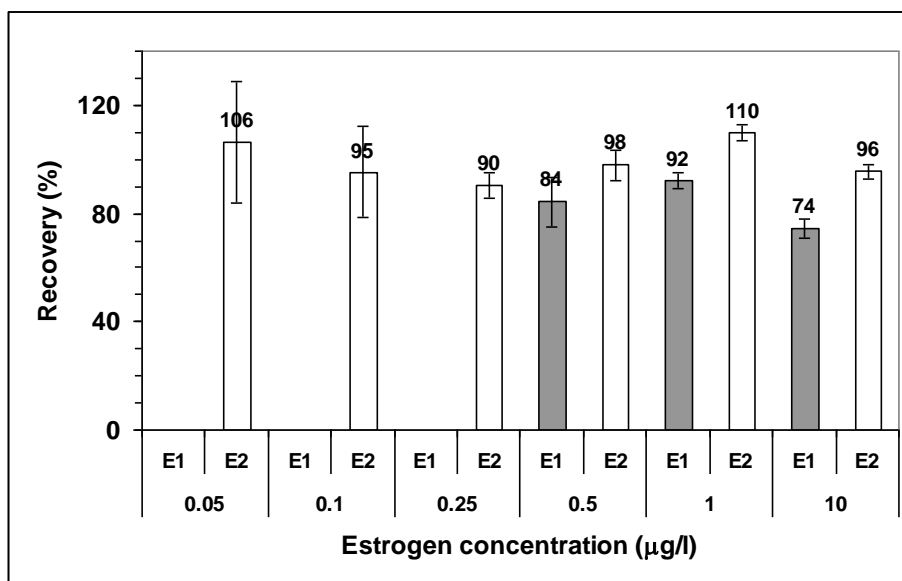
ב. מיצוי אסטרוגנים מקולחים :

שיעור השבה של 90% ויותר התקבל למיצוי ריכוז של 0.005, 0.01 ו- 0.1 µg/l של E1 מקולחים שניוניים בנפח של 100ml (92.1%±4.6, 90.0%±7.6 ו 95.7%±4.3, בתאמה). שיעור השבה הקרוב ל-100% התקבל ל- E2 בריכוזים של 0.005, 0.01 µg/l, מאידך, בריכוז גבוה פי 10 (0.1 µg/l) שיעור ההשבה פחת לכ- 80% בלבד (78.9%±4.3). יתכן כי שיעור השבה נמוך זה נובע משימוש חוזר (3 פעמים) באותן מחסניות למיצוי דוגמאות עוקבות. משום כך הוחלט על שימוש חד פעמי במחסניות SPE במקרה של מיצוי דוגמאות אסטרוגנים מקולחים.

הממצאים הנ"ל נבחנו גם על נפח סינון קולחים גבוה פי 10 (1L) ובמחסניות המכילות 1 ו- 2 גרם חומר סופח מסוג C18. בריכוז של 1 µg/l, שיעור השבה של E2 במחסניות 1 ו 2 גרם היה מעט מעל 100% (106.6 ±3.4% ו 109.7±3.1%, בהתאמה). במקרה של E1 שיעור השבה לאחר מיצוי ב- 1 גרם היה נמוך בהשוואה לזה שהתקבל לאחר מיצוי ב- 2 גרם (70.8±7.6% ו 98.3±3.1%, p<0.05,

בהתאמה). משום כך אומצו מחסניות SPE הכוללות 2 גרם חומר סופח למיצוי אסטרוגנים מנפחים גדולים (1L) של קולחים שניוניים.

שיעור ההשבה של האסטרוגנים בשיטה האחרונה נבחן בששה ריכוזים שונים. בטווח ריכוזים של 0.05 עד $10\mu\text{g/l}$ שיעור ההשבה של E2 היה כ- 100% (איור 4.3). לעומת זאת, E1 לא זוהה בטווח הריכוזים של 0.05 עד $0.25\mu\text{g/l}$ (משום יחס נמוך בין גובה הסיגנל המתקבל עבור שברי יונים של האסטרוגן לבין זה של רעש הרקע). בטווח הריכוזים שבין 0.5 עד $10\mu\text{g/l}$ שיעור ההשבה של E1 היה בין 74 ל-92% (איור 4.3).



איור 4.3: שיעור ההשבה (ממוצע וסטיית תקן) עבור ריכוזים שונים של E2 (עמודות לבנות) ו E1 (עמודות גרעות) שהוספו ל 1L קולחים שניוניים ומוצו באמצעות SPE הכולל 2 גרם C18 ואנליזה באמצעות HPLC-MS/MS (AcN ו H_2O משמשים כמריצים)

ממצאי ביניים I: השיטה שפותחה בשלב זה (אנליזה של אסטרוגנים לאחר מיצוי מליטר של קולחים שניוניים באמצעות מחסנית הכוללת 2 גרם חומר סופח מסוג C18, ואנליזה ב HPLC-MS/MS הכוללת אצטוניטריל כמריץ אורגאני) מאפשרת זיהוי E2 בריכוז 50ng/l ו- E1 בריכוז של 500ng/l . רגישות זו אינה מתאימה לזיהוי אסטרוגנים מדוגמאות סביבתיות ומחייבת שיפור של רגישות השיטה.

4.5 שיפור רגישות השיטה

א. אסטרוגנים מומסים במים:

שלב ראשון נבחנה השפעה של החלפת המריץ האורגאני אצטוניטריל (AcN) במתנול (MeOH) על עוצמת הסיגנל.

בנוכחות מתנול כמריץ אורגאני עוצמת הסיגנל (NL) של יונים מולקולאריים (MS) ושברי יונים (MS/MS) של E1 ו E2 (ריכוז 1µg/ml מומס במים) היה גבוה בסדר גודל מאשר בנוכחות אצטוניטריל (טבלה 4.2).

טבלה 4.2: עוצמת סיגנל (NL) עבור יונים של E1 ו E2 (1µg/ml) m/z=255.4 ו m/z=271.4, MS, PI (בהתאמה) ושברי יונים (m/z=157.3 ו m/z=159.4, MS/MS PI, בהתאמה) בנוכחות מתנול (MeOH) ואצטוניטריל (AcN) מוחמצים (pH=2.6 באמצעות H. פורמית)

Solvent	E1 (MS) m/z= 271.4	E2 (MS) m/z=255.4	E1 (MS/MS) m/z= 157.4	E2 (MS/MS) m/z= 159.4
AcN	1.5*10 ⁵	4*10 ⁴	2*10 ³	2.4*10 ⁴
MeOH	1*10 ⁶	4*10 ⁵	8*10 ⁴	2.3*10 ⁵

בנוסף לכך, יינון טוב יותר של האסטרוגנים בספקטרוגרף מסות בנוכחות מתנול בהשוואה לזה של אצטוניטריל מתבטא גם בשטחים גדולים יותר של שברי יונים (MS/MS) עבור אותם ריכוזים של E2 ו E1 (טבלה 4.3). כלומר, בנוכחות המתנול ניתן לזהות סיגנל לאסטרוגנים בריכוזים נמוכים (בסדר גודל) בהשוואה לאלו שניתנים לזיהוי בנוכחות אצטוניטריל (טבלה 4.4.4).

טבלה 4.3: שטחי הסיגנל (AA) המתקבלים עבור שברי יונים (MS/MS) בריכוזים שונים של תמיסות ייחוס של E1 ו E2 בנוכחות אצטוניטריל (AcN) ומתנול (MeOH) כממיסים אורגאנים

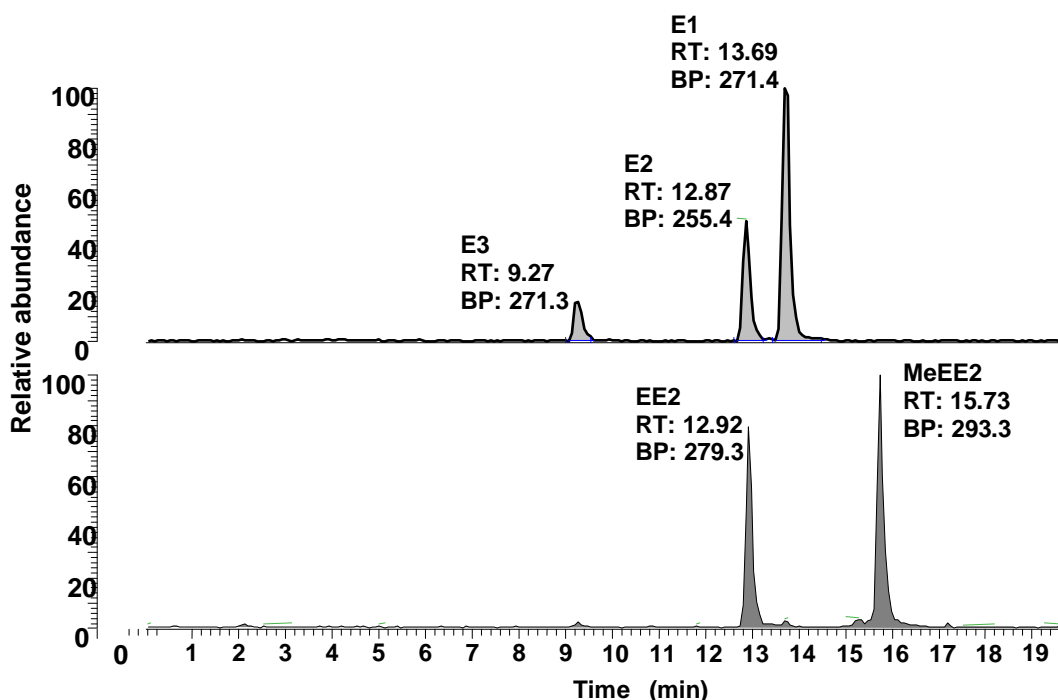
		1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	0.1 µg/ml	0.05 µg/ml	0.001 µg/ml	0.0005 µg/ml
can	E2	2.4E+06	1.6E+06	7.71E+05	2.90E+05	1.46E+05	ND	ND
	E1	7.17E+05	3.76E+05	2.25E+04	ND	ND	ND	ND
MeOH	E2				4.90E+06	2.01E+06	4.11E+05	1.87E+05
	E1				8.31E+05	4.22E+05	3.49E+04	1.53E+04

ND: not detected

הסלקטיביות של הקולונה מסוג C18 נבחנה תוך שימוש במתנול כמריץ. נמצא כי בנוכחות מתנול (בגרדיאנטים שונים שתחילתם בין 10 ל- 40% ממס אורגאני) לא ניתן להפריד בין האסטרוגנים E2 ו E1 (רזולוציה נמוכה מ- 2). כלומר הסלקטיביות לאסטרוגנים של קולונה מסוג C18 בנוכחות מתנול נמוכה. בניסיון לשפר את יכולת ההפרדה נבחנו שילובים של יחסים שונים של אצטוניטריל ומתנול. בניסיון זה התקבל שיפור בהפרדה ($R > 2$) כאשר אחוז אצטוניטריל במריץ האורגאני הוא לפחות 30% ועולה ככל שאחוז אצטוניטריל גדל. ביחס 70:30 אצטוניטריל למתנול (MeOH: AcN) השיפור בשטח של שברי היונים היה פי 2 בהשוואה לזה של אצטוניטריל בלבד. משום שעליה זו אינה משפרת רגישות השיטה באופן משמעותי, הוחלט לבחון החלפה של קולונת C18 בקולונה מסוג אחר. עקב כך, נבחנה התאמה של קולונה מסוג Phenyl ונמצאה הפרדה טובה בין האסטרוגנים E2 לבין E1 ($R > 2$) גם בגרדיאנט הכולל מתנול בלבד כמריץ אורגאני.

עד כה נבחנה היכולת להבחין בין 2 אסטרוגנים בלבד. בשלב זה נבחנה היכולת להפריד בין 5 אסטרוגנים שונים הכוללים גם את האסטרוגן הטבעי E3 והאסטרוגנים הסינטטיים EE2 ו MeEE2.

נמצאה הפרדה טובה ($R > 2$) בין האסטרוגנים הטבעיים והסינטטיים בשימוש בקולונת HPLC מסוג Phenyl, פרט לחפיפה במועד הופעת הסיגנאל של האסטרוגן הטבעי E2 והסינטטי EE2 (איור 4.4)



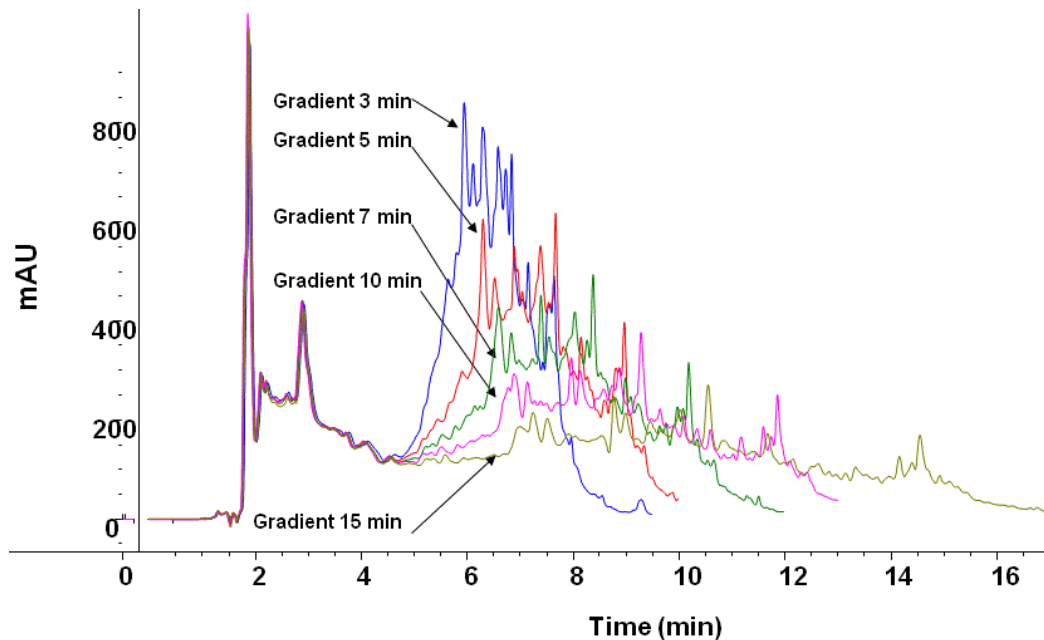
איור 4.4: כרומטוגרמה (LC/MS) של תמיסה מימית ($1\mu\text{g/ml}$) של E1, E2, E3, EE2 ו MeEE2 לאחר הזרקה של $100\mu\text{l}$ לקולונה מסוג Phenyl, בגרדיאנט מריצים של H_2O ו MeOH (מוחמצים ל $\text{pH}=2.6$). זמן יציאה (RT) ומשקל יון מולקולארי (BP, m/z) מוצגים.

ממצאי ביניים II: במדיום נקי (מים באיכות ULC-MS grade) אנליזה של אסטרוגנים בספקטרוגרף מסות רגישה יותר בנוכחות מתנול בהשוואה לזה של אצטוניטריל. בנוכחות מתנול הפרדה כרומטוגרפית של אסטרוגנים אפשרית באמצעות קולונה מסוג Phenyl, שהיא בעלת סלקטיביות גבוהה יותר לאסטרוגנים בהשוואה ל- C18. משום כך נבחרו המריץ מתנול וקולונת HPLC מסוג Phenyl בפרוטוקול השיטה.

ב. אסטרוגנים מומסים בקולחים:

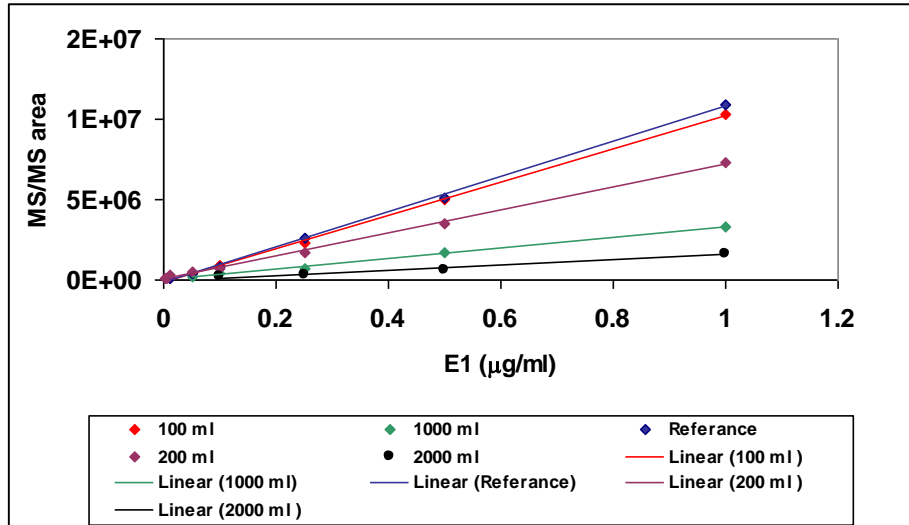
התאמה של הפרוטוקול הנ"ל נבחנה לאנליזה של אסטרוגנים בקולחים. נמצאה שיישום הפרוטוקול שהתאים לאנליזה האסטרוגנים במים אינו מתאים כאשר הם נמצאים בקולחים. כך למשל, במקרה של האסטרוגן E2 התקבל סיגנל ברור לשברי היון המולקולאריים (יחס של מעל 3:1 בין גובה הפיק לבין זה של רעש הרקע, בתאמה) רק עבור הריכוזים הגבוהים שנבחנו (0.1 ו $0.05\mu\text{g/l}$). שיעור השבה של E2 בריכוזים אלו היה נמוך מ- 80% ($76.2\% \pm 6.1$ ו $64.9\% \pm 8.0$, בהתאמה). במקרה של

האסטרוגן E1 לא זוהה סיגנל ברור מעל לרעש הרקע באף לא אחד מהריכוזים שנבחנו. החשד היה שמזהמים אורגניים נלווים הנמצאים בקולחים פוגעים בגילוי האסטרוגנים. לפיכך נבחנה אפשרות לצמצום גובה רעש הרקע הנגרם מנוכחות של מזהמים אורגניים שבדגימה (במטריצה) ע"י מיתון גרדיאנט המריצים ב-HPLC. יחס המריץ האורגאני (מתנול) בגרדיאנט נותר בין 35 ל-100% אך משך הזמן בו יחסו עלה בהדרגה הוארך מ-3 ועד 15 דקות. הארכה של משך הגרדיאנט הורידה את רמת "הרעש" על ידי פיזור הסיגנלים של חומרים אורגאניים שונים שבדגימה (איור 4.5) ושיפרה את ההופעה של הסיגנלים של האסטרוגנים. למשל מיתון הגרדיאנט מ-3 ל-15 דקות גרם לעליה בשטח וגובה של שברי יון מולקולאריים של E2 (פי 4 ו 2, בהתאמה).



איור 4.5: כרומטוגרמה (UV, 280nm) עבור תמיסת קולחים (1 µg/ml) של E1 ו E2 שמוצו באמצעות SPE הכולל חומר סופח מסוג C18.

בגרדיאנט המתון ביותר שנבחן (עליה מ-35% מתנול ל-100% ב-15 דקות) התקבלה רמת ההשבה הטובה ביותר לאסטרוגנים E1 ו E2 (72% ו 61%, בהתאמה). מאידך, רמת השבה זו אינה מספקת וחייבה שיפור נוסף. מעבר לכך נמצא שכאשר המיצוי מבוצע מנפחים עולים של קולחים (החל ממים כבקרה ועד לשני ליטר קולחים) שיפוע היחס שבין שטח הסיגנל לריכוז האסטרוגן (ביטוי של שיעור ההשבה) הולך ופוחת. כלומר שיעור ההשבה מושפע מריכוז המזהמים בקולחים. כך למשל, בעקומת כיוול של E1 שהוסף למיצוי 2 ליטר קולחים התקבל שיפוע הנמוך בכ-85% בהשוואה לבקרה (איור 4.6). היחס שבין ריכוז האסטרוגן לבין שטח הסיגנל היה ליניארי בכל נפחי המיצוי ($R^2 > 0.99$), כלומר ההפרעה של המזהמים קבועה.

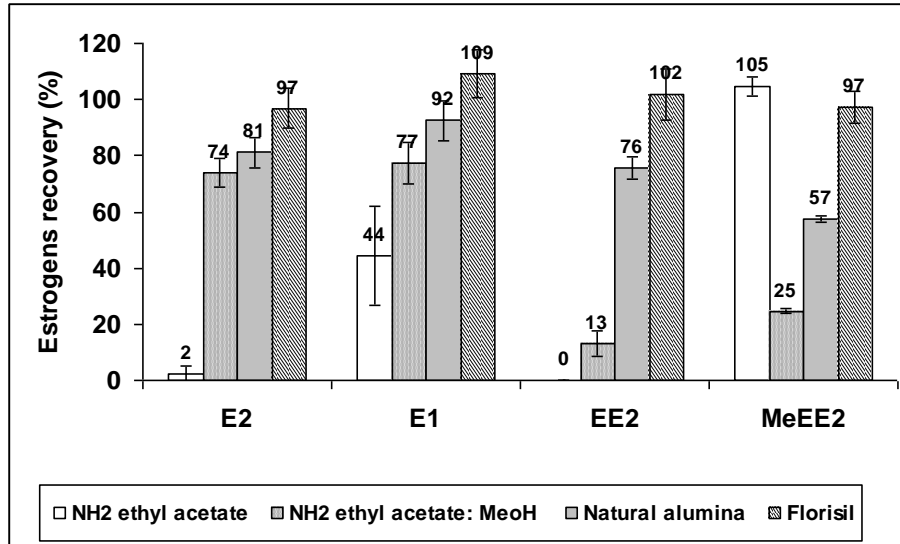


איור 4.6: שטח של שברי יון מולקולאריים של E1 (MS/MS) שהוסף לנפחים שונים של קולחים שמוצו ב SPE הכולל חומר סופח מסוג C18 (כחול=מים נקיים, אדום=מיצוי 100ml, סגול=מיצוי של 200ml, ירוק= מיצוי של 1000ml ושחור= מיצוי של 2000ml) כתלות בריכוז מחושב

עד כה השימוש במתנול ומיתון גרדיאנט המריצים שיפרו את רגישות השיטה, אך עדין לא בשיעור מספק למדידת אסטרוגנים בריכוזים סביבתיים בקולחים.

4.6 ניקוי דוגמאות אסטרוגנים בקולחים שמוצו ב- SPE הכולל C18 באמצעות פאזה ישרה (DP)
עד כה השתמשתי ב-SPE עם קולונה המכילה פאזה הפוכה (Reverse Phase, RP) מטיפוס C18 במיצוי כלומר לכידת המרכיבים האפולאריים בשלב הטעינה של הדגימות. בשלב זה נבחנה אפשרות של ניקוי הדגימה ממזהמים ע"י הוספה של שלב נוסף של מיצוי בפאזה ישרה (Direct Phase, DP) לסילוק של חומרים פולאריים. נבחנו הפאזות אמינו פרופיל (Amino Propyl), פלוריסיל (Florisil) ואלומינה טבעית (Natural Alumina). במיצוי בו שולבו אמינו פרופיל (בפרוטוקול הכולל שימוש באתיל אצטט ופרוטוקול נוסף של שימוש בשילוב אתיל אצטט ומתנול 20:80) ואלומינה טבעית התקבלו תוצאות עם וריאביליות גבוהה (שעור השבה בין 2 ל 105% ובין 57 ל 92%, בהתאמה, איור 4.7). שעור השבה גבוה (>97%) נמצא עבור כל האסטרוגנים כאשר הדוגמאות נוקו באמצעות פלוריסיל (איור 4.7).

III ממצאי בנייים: התברר כי יש צורך בניקוי דגימת הקולחים מהפרעה של חומרים שונים (בעיקר פולאריים). ניקוי זה הושג ע"י מיצוי בפאזה ישרה באמצעות פלוריסיל, לאחר מיצוי ב- SPE המכיל C18.



איור 4.7: יעילות השבה של 0.1µg/l האסטרוגנים הטבעיים E2 ו E1 והסינטטיים EE2 ו MeEE2 מ 1 ליטר קולחים שניוניים לאחר מיצוי בפאזה הפוכה (C18) וניקוי בפאזה ישרה הכוללת אמינו פרופיל, אלומינה טבעית ופלוריסיל.

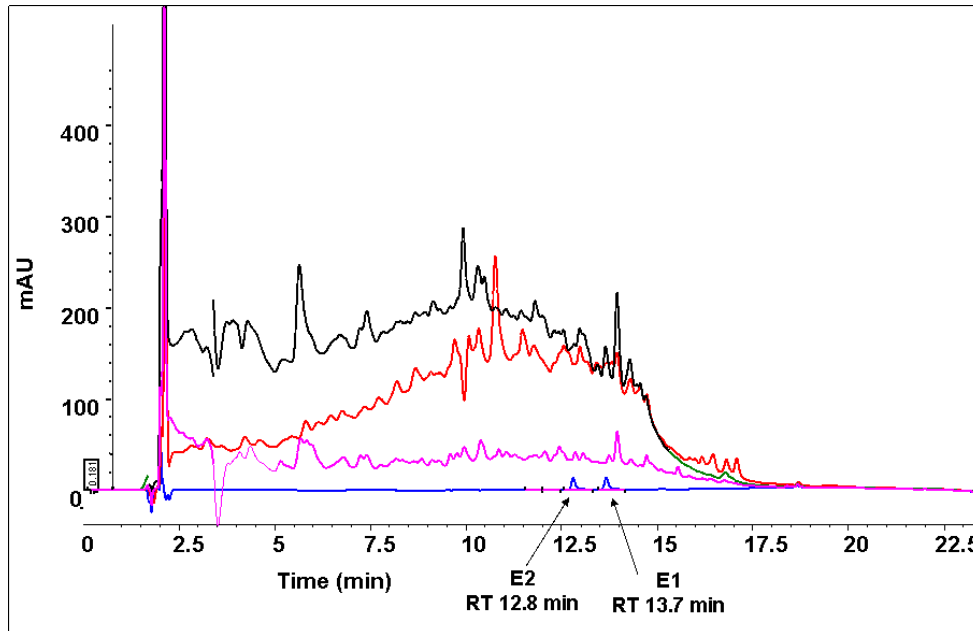
4.7 קביעה של גבול סף הרגישות (LOD) וכימות (LOQ) במיצוי אסטרוגנים מקולחים שניוניים בפאזה הפוכה (C18) וניקוי בפאזה ישרה (Florisil)

ה-LOD וה-LOQ נקבעו על בסיס של יחס מינימאלי של 1:3 ו 1:9, בהתאמה בין גובה הסיגנל וגובה הרעש. נבחן מיצוי אסטרוגנים שהוספו לקולחים בריכוזים נמוכים (1, 2, 5 ו 10ng/l). באסטרוגן E2 היו LOD ו LOQ 1 ו-5ng/l, בהתאמה; ב-E1 והאסטרוגנים הסינטטיים EE2 ו MeEE2 היו LOD ו LOQ 2 ו-5ng/l. בניסוי זה, שעור ההשבה של 100ng/l במיצוי בפאזה הפוכה מסוג C18 ולאחריו ניקוי הדוגמאות בפאזה ישרה מסוג פלוריסיל היה גבוה יחסית (107%±4, 106%±5, 113%±14 ו 108%±10 לאסטרוגנים E2, E1, EE2, MeEE2, בהתאמה). הממצאים הנ"ל מעידים על התאמה של שיטה זו לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים בריכוזים סביבתיים בקולחים.

4.8 שיפור ניקוי דגימות קולחים שניוניים לאנליזה של אסטרוגנים באמצעות פחם פעיל ופחם פעיל משולב עם מחליף אניונים חלש

בניסיון לשפר את רמת ניקוי דגימות הקולחים מהפרעה של חומרים אורגאניים נבדקו מיצוי SPE באמצעות פחם פעיל ופחם פעיל משולב עם מחליף אניונים חלש (אמינו-פרופיל). שעור השבה הגבוה מ-90% נמצא בשני המיצויים ולא היה שונה מזה שהתקבל במיצוי בפאזה הפוכה של C18 (P>0.05). עם זאת רמת הרעש כפי שמשתקף בכרומטוגרמה של UV פחתה בשימוש בפחם פעיל ועוד יותר בפחם פעיל משולב במחליף אניונים (איור 4.8). חיזוק למסקנה זו התקבל גם מסיגנל של הרעש

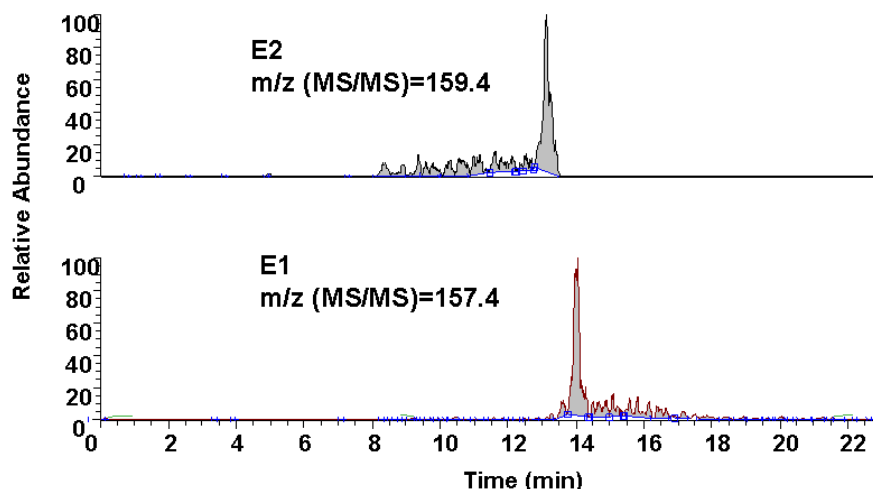
בספקטרוגראף המסות (NL) בתום מיצוי ב C18 הגבוה בסדר גודל בהשוואה לזה שהתקבל בקולחים שמוצו בפחם פעיל.



איור 4.8: כרומטוגרמה UV (280nm) עבור מיצוי 500ml קולחים שניוניים ב C18 (500mg, שחור), פחם פעיל (500mg, אדום) ופחם פעיל (500mg) משולב עם אמינו פרופיל (500mg, סגול). כמו כן מוצגת דוגמת ייחוס הכוללת E2 ו E1 במים (כחול).

במיצוי של אסטרוגנים בטווח ריכוזים של 0.01 עד $1\mu\text{l}$ מנפח כפול של קולחים שניוניים (ליטר) באמצעות פחם פעיל משולב במחליף אניונים שעור ההשבה לא השתנה (>90%). בשיטה זו ניתן היה גם להבחין בסיגנל של האסטרוגנים E2 ו E1 (יחס גובה סיגנל לרעש ≥ 9) בדוגמאות קולחים ללא הוספה של אסטרוגנים (blank, איור 4.9). ריכוז האסטרוגנים שחושב על בסיס עקומת כיוול היה 13.5ng/l ו 12ng/l E2 ו E1, בהתאמה.

נבדקה ההתאמה של השיטה שפותחה עד כה הכוללת מיצוי SPE עם פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים גם לזיהוי וכימות של האסטרוגן הטבעי E3 והסינטיים EE2 ו MeEE2. התברר שהשיטה מתאימה לאנליזה של האסטרוגנים הטבעיים בקולחים (שעור השבה של $93.7\% \pm 1.5$, $88.5\% \pm 4.1$ ו $90.7\% \pm 8.7$, עבור E2, E1 ו E3, בהתאמה) אך לא לסינטיים (שעור השבה $26.6\% \pm 24.6$ ו $44.7\% \pm 16.3$, עבור EE2 ו MeEE2, בהתאמה). בניסיון לשפר את האנליזה של האסטרוגנים הסינטיים נבחנה האפשרות שאסטרוגנים אלו מתפרקים במהלך ספיחתם לפחם הפעיל. נמצא ששיעור השבה של האסטרוגן הסינטי EE2 (מומס במים) היה גבוה כמו של ההורמון הטבעי E2 (טבלה 4.4) ולא השתנה במהלך שהייה ב- SPE עד 20 שעות (טבלה 4.4.5).



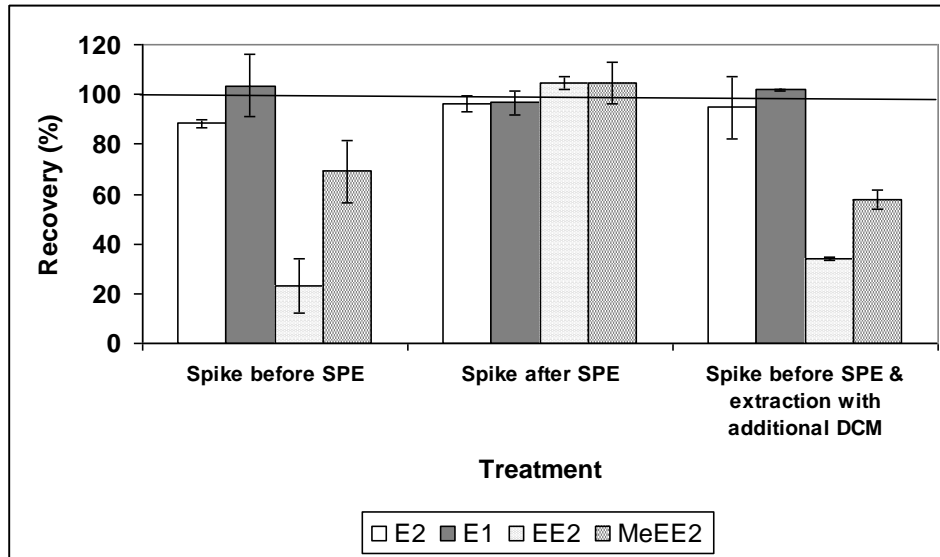
איור 4.9: כרומטוגרמה MS/MS המציגה את ההורמון E2 ($m/z=159.4$) ו E1 ($m/z=157.4$) לאחר מיצוי מ 1L קולחים שניוניים באמצעות SPE הכולל פחם פעיל (500mg) משולב עם מחליף אניונים מסוג אמינו פרופיל (500mg).

טבלה 4.4: ממוצע וסטיית תקן של שיעור השבה (%) של האסטרואגן הטבעי E2 והסינטיי EE2 עם מיצוי בשלב SPE מיד בתום הטענה של הדוגמאות ולאחר השהייתם למשך 5 ו 20 שעות

Time (hr)	0	5	20
E2 recovery (%)	108.7±4.8	101.1±9.7	106.6±23.4
MeEE2 recovery (%)	90.7±5.2	91.3±6.9	107.6±17.3

מאחר והאסטרואגנים הסינטיים אפולריים יותר מאשר הטבעיים (טבלה 2.1) נבחנה האפשרות שחלקם שקע בקולחים טרם שלב ה-SPE. בנפח קולחים קטן (100 ml) שיעור ההשבה של האסטרואגנים E2, E1, EE2 ו MeEE2, היה גבוה יחסית (בין 80 ל- 110%) עם וללא תוספת של מתנול (10 ו 20%). לעומת זאת בנפח גבוה פי 10 שיעור ההשבה של האסטרואגנים הטבעיים לא השתנה ואילו זה של הסינטיים פחת והיה נמוך מ- 50%. ממצאים אלו אינם תומכים במנגנון שקיעה של האסטרואגנים הסינטיים ומעידים ששיעור ההשבה פוחת ככל שנפח המיצוי של הקולחים גדל. הוספה מבוקרת של האסטרואגנים לאחר מיצוי הקולחים ב-SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים שיפר באופן ניכר את שיעור ההשבה של האסטרואגנים הסינטיים והביאו לרמה דומה לזו של הטבעיים (כ- 100%, איור 4.10). ממצא זה מצביע על האפשרות שאיבוד האסטרואגנים הסינטיים מתרחש בשלב המיצוי. הוספת שטיפה של ה-SPE בתמיסה של דיכלורומתאן (DCM) לא שיפרה את שיעור ההשבה (איור 4.10).

כמו כן נמצא כי שטיפה של ה-SPE בשלב המיצוי בתמיסות נוספות (כשילוב דיכלורומתאן עם מתנול, אצטוניטריל או הקסן) לא שיפרה את שיעור ההשבה של האסטרונגנים הסינטטיים (טבלה 4.5).



איור 4.10: שיעור השבה של E2, E1, EE2 ו MeEE2 (0.1µg/l) שהוספו לקולחים שניוניים לפני שלב המיצוי (Spike before SPE), בתום שלב המיצוי (Spike after SPE), לאחר מיצוי בתוספת 10ml דיכלורומתאן (Extraction with addition DCM).

טבלה 4.5: שיעור השבה (% ממוצע וסטיית תקן) של אסטרונגנים טבעיים (E2 ו E1) ואסטרונגנים סינטטיים (EE2 ו MeEE2) לאחר מיצויים מפאזה של פחם פעיל באמצעות דיכלורומתאן מתנול (DCM:MeOH), דיכלורומתאן אצטוניטריל (DCM:AcN), דיכלורומתאן והקסן (DCM:Hexane) ואתיל אצטט (Ethyl acetate)

	E2	E1	EE2	MeEE2
DCM:MeOH (80:20)	84.2±0.3	97.0±4.5	16.5±7.8	45.5±3.7
DCM:AcN (80:20)	71.2±10.1	97.0±4.5	19.0±11.1	50.6±6.2
DCM:Hexane (50:50)	6.7±3.4	11.4±5.0	13.4±4.9	55.1±8.4
Ethyl acetate	30.4±2.3	44.6±4.1	11.8±7.6	49.4±7.1

הוספה של שלב ניקוי באמצעות אמינופרופיל לפני שלב המיצוי ב-SPE הפחיתה את שיעור ההשבה של האסטרונגנים הטבעיים בכ- 15% ושיעור ההשבה של הסינטטיים עדין היה נמוך מ- 50%. כמו כן, נבדקה האפשרות שהאסטרונגנים הסינטטיים נקשרים למתכות בקולחים ולכן לא נקשרים לפחם הפעיל. שיעור ההשבה של אסטרונגנים בקולחים שהוחמצו בטרם המיצוי הפחית את שיעור ההשבה של האסטרונגנים הטבעיים בכ- 15% ושיעור ההשבה של האסטרונגנים הסינטטיים נותר נמוך מ- 20%.

ממצאי ביניים IV: השיטה המבוססת על פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים מתאימה לאנליזה של אסטרונגנים טבעיים בקולחים אך לא לסינטטיים.

4.9 קביעה של סף רגישות השיטה (LOD) וכימות (LOQ) במיצוי אסטרוגנים מקולחים שניוניים באמצעות פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים

ה LOD ו ה LOQ נקבעו על בסיס של יחס מינימאלי של 1: 3 ו 1: 9, בהתאמה, בין גובה הסיגנל וגובה הרעש. נבחן מיצוי אסטרוגנים שהוספו לקולחים בריכוזים נמוכים (1, 2, ו 5 ng/l). באסטרוגן E2 היו ה LOD ו LOQ 1 ו- 2ng/l, בהתאמה; ב- E1 היו ה LOD ו LOQ של 2 ו- 5ng/l, בהתאמה וב- E3 היו 5 ו 10ng/l, בהתאמה. בניסוי זה, שעור ההשבה של 100ng/l במיצוי באמצעות פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים היה גבוה יחסית (11%±90 ו 10%±101, 10%±98 עבור E2, E1 ו E3 בהתאמה). ממצאים אלו מעידים על התאמה של שיטה זו רק לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים בריכוזים סביבתיים בקולחים.

5. דיון ומסקנות

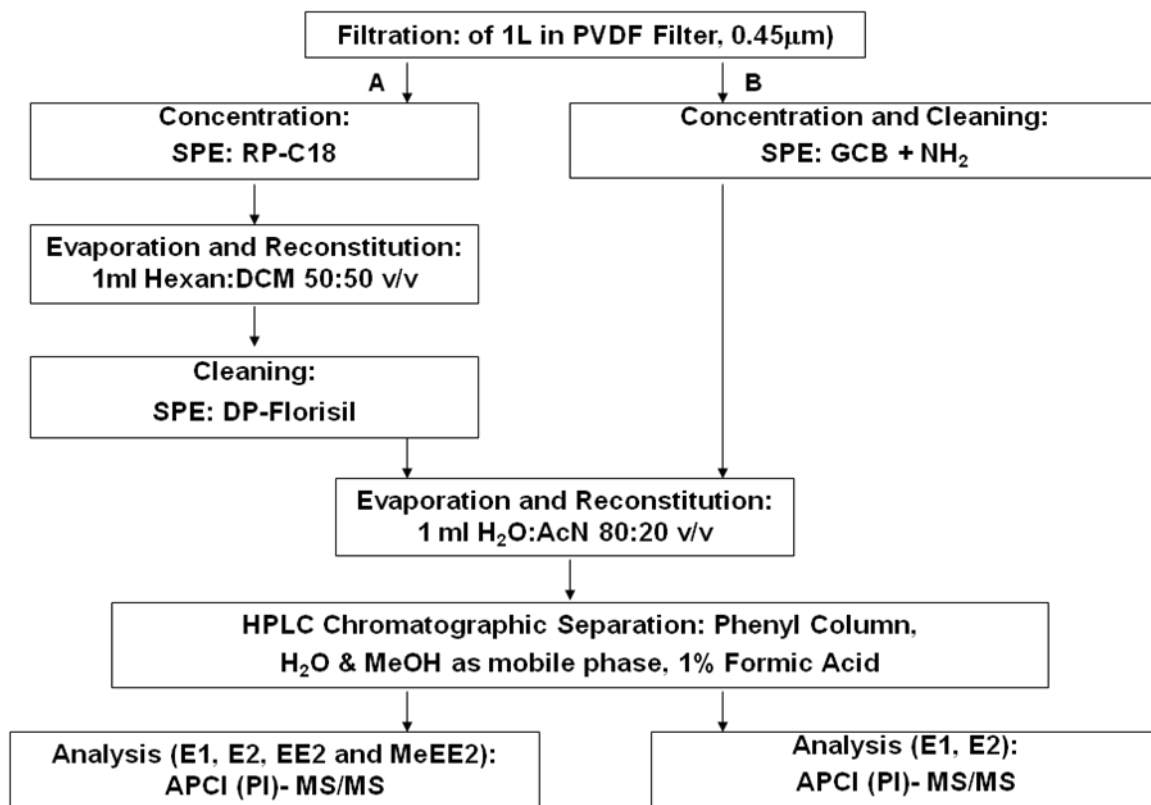
בהעדר פרוטוקול מבוסס בארץ לאנליזה של אסטרוגנים בקולחים באמצעות HPLC-MS/MS נדרשה התאמה של פרוטוקולים אחרים. בעבודה הנוכחית פותחו שני פרוטוקולים לאנליזה של אסטרוגנים בקולחים. האחד (A) לאנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטיים והשני (B) המתאים לאסטרוגנים טבעיים בלבד (איור 5.1). בפרוטוקול השני שלב הכנת הדוגמה לאנליזה קצר יותר.

סינון ואכסון דגימות

ריכוז האסטרוגנים הטבעיים והסינטיים בדגימות קולחים נשאר יציב לאחר סינון הקולחים בפילטר מסוג PVDF (בקוטר נקבים של 0.45µm) ואכסוןם בקירור (ב 4°C) עד 24 שעות. מעבר לתקופה זו דווח על ירידה בריכוז אסטרוגנים כתוצאה מפירוק בקטריאלי (Schlüsener and Bester, 2005; Labadie and Budzinski, 2005b). הוספה של פורמאלדהיד מאפשרת שימור הדגימות עד שבוע ימים (1% v/v, Baronti et al., 2000; Labadie and Budzinski, 2005b).

מיצוי וניקוי

מיצוי בפאזה הפוכה של אסטרוגנים באמצעות חומר סופח מסוג C18 מקובל בפרוטוקולים שונים (נספח 1), אולם נמצא פחות יעיל בקולחים (מחקר נוכחי). על פי ממצאי המחקר ניתן לשער שהירידה בשיעור ההשבה של האסטרוגנים לאחר מיצוי ב C18 היא תוצאה של דיכוי סיגנלים בספקטרוגרף מסות (Ion Suppression) ואינה נובעת מאיבוד האסטרוגנים במהלך המיצוי. דיכוי הסיגנלים נובע מנוכחותם של מזהמים אורגניים נלווים הנספחים גם הם לפאזה הנחה (C18) במהלך ההטענה של דוגמאות האסטרוגנים. המזהמים הנ"ל ממוצים תוך שימוש במס חזק ונאספים עם הדוגמא (קו-אקסטרקטים, Gomes et al., 2005). קו-אקסטרקטים אלו הקיימים בקולחים הם חומרים אורגניים מומסים (Dissolved Organic Matter), הכוללים ממגוון רב של מולקולות במצבי חמצון שונים. בנוסף לדיכוי הסיגנל של האסטרוגנים גורמים הקו-אקסטרקטים לרעש רקע חזק וכתוצאה מכך להפחתה ביחס בין סיגנל האסטרוגנים לזה של רעש הרקע ולפגיעה ברגישות האנליזה (Koh et al., 2007).



איור 5.1 שלבים עיקריים בפרוטוקולים לניקוי ואנליזה של הורמונים אסטרוגנים טבעיים (שיטה A ו B) וסינטטיים (שיטה A) בקולחים שניוניים

תופעה של דיכוי הסיגנלים עשויה להתבטא גם בכימות שגוי של ריכוז האסטרוגנים (Koh et al., 2007). מכלול השפעות שליליות הנ"ל של קו-אקסטרקטים על אנליזה של אסטרוגנים ב HPLC-MS ו HPLC-MS/MS נקראים Matrix Effect (Gomes et al., 2005). מבין החומרים האורגניים נחשבות החומציות ההומיות כגורם מרכזי התורם לתופעה זו (Gomes et al., 2005). החומציות ההומיות הן מולקולות א-פולאריות גדולות (>300,000Da), בעלות קבוצות ארומטיות ואלפטיות וכוללות שיירים קרבוקסיליים רבים. חומצות הומיות נקשרות היטב לפאזה הפוכה (לרוב Thorstensen et al., 2000) ולכן שיפור רגישות השיטה מחייב את סילוקם לפני השלב האנליטי. הרחקה של מולקולות א-פולאריות אורגניות אלו ניתנת להשגה באמצעות מיצוי בפאזה ישרה מסוג פלוריסיל (מחקר נוכחי, Yamamoto et al., 2006).

בנוסף לפאזה הפוכה מסוג C18, גם פחם פעיל (Graphitized Carbon Black, GCB) מתאים למיצוי אסטרוגנים (מחקר נוכחי, Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003) והשימוש בו יחסית נפוץ (נספח 1). הפחם הפעיל הינו חומר סופח על בסיס הידרופוביות (Gentili, 2002). הוא מכיל קבוצות ארומטיות ולכן סלקטיבי יותר בספיחה של מולקולות ארומטיות אחרות, זאת בשונה מ C18. לפחם הפעיל קיימים גם שיירים טעונים חיובית (Oxonium Groups) ולכן פועל כמחליף אניונים

למולקולות טעונות שלילית. בנוסף ליכולתו למצות אסטרוגנים, מתאים הפחם הפעיל גם לסילוק מזהמים אורגאניים (Gentili, 2002; Ternes and Joss, 2006). מיצוי רב שלבי הכולל מים, מתנול מוחמץ, מתנול ודיכלורומתאן: מתנול (MeOH: DCM, 20: 80) מאפשר הפרדה (פרקציוניזציה) של מולקולות נטרליות- חומציות הספוחות על פני הפחם הפעיל וקבלת מיצוי נקי יותר בהשוואה לזה של C18 (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). למרות האמור לעיל, עדיין ניכר במחקר הנוכחי הצורך בהשלמת השיטה לניקוי דוגמאות האסטרוגנים שמקורם בקולחים גם לאחר מיצוי בפחם פעיל, טרם השלב האנליטי.

קולונה הכוללת פאזה של פחם פעיל המקדימה פאזה של אמינו-פרופיל מתאימה למיצוי של אסטרוגנים טבעיים (מחקר נוכחי). אמינו-פרופיל הוא מחליף אניונים חלש, ובעל pKa של כ-9.8 ולכן יעיל להרחקה של אניונים להם מטען שלילי בערך הגבה של 7.8 או נמוך יותר. עם הטענה של הקולחים על פני הפחם הפעיל נספחים עליו גם האסטרוגנים וגם חומציות הומיות. במהלך שלב המיצוי (בתמיסה של MeOH: DCM, 20: 80) משתחררים האסטרוגנים והחומציות ההומיות מהפאזה של הפחם הפעיל. משום שלאסטרוגנים ערך pKa גבוה (כ-10), הן אינן מיוננות ולכן גם אינן מעוכבות על פני פאזה של אמינו-פרופיל (Labadie and Budzinski, 2005a), נשטפות דרכו ונאספות. בשונה מכך, החומציות ההומיות טעונות שלילית, ומשום כך נקשרות לפאזה של אמינו-פרופיל ומעוכבות עליו. בדרך זו מתקבל מיצוי נקי יותר המתבטא בשקיפות בהשוואה למיצוי הכולל את החומצות היומיות, לו גוון צהבהב. התאמתה של המחסנית המשלבת פאזה של פחם פעיל ותחתיו פאזה של אמינופרופיל למיצוי אסטרוגנים מקולחים שניוניים התבטאה בשיעור השבה גבוה לאסטרוגנים הטבעיים E1 ו E2 (טבלה 4.5.1). ממצאים אלו תומכים גם את ממצאיהם של Labadie and Budzinski (2005 a and b) ו Koh et al (2007). עם זאת יש לציין כי כאשר שולבה בעבודה הנוכחית מחסנית מסוג אמינופרופיל לניקוי דוגמאות שמקורן במיצוי קולחים בפאזה C18, התקבל שיעור השבה נמוך לאסטרוגנים טבעיים (נמוך מ-44% במיצוי Ethyl acetate ונמוך מ-77% במיצוי בתמיסה של MeOH: Ethyl acetate, 20: 80). ממצאים אלו עשויים להעיד על השפעה הקיימת לאיכות הקולחים כמו גם לסוג והרכב המריצים על יעילות תהליך הניקוי ומשום כך על הצורך להתאמה סלקטיבית של שיטה לניקוי דגימות ממקורות שונים.

בעבודה הנוכחית נמצא כי המחסנית המשלבת פחם פעיל ואמינופרופיל אינה מתאימה למיצוי אסטרוגנים סינטטיים (שיעור השבה לרוב נמוך מ-60% עבור EE2 ו MeEE2). במהלך העבודה נערכו ניסיונות לבחון את הסיבה להעדר התאמה של התהליך הני"ל למיצוי אסטרוגנים סינטטיים, אולם ללא הצלחה. יש לציין כי תופעה זו לא קיימת במיצוי האסטרוגנים ממים באיכות טובה או נפחים קטנים של קולחים (עד 100 מ"ל). ממצאים אלו עשויים להעיד כי גורם ההפרעה הוא אינטראקציה בין חומרים הקיימים בקולחים לבין אחת מהפאזות ב SPE. Lagana et al (2000) שהשתמשו גם הם בפחם פעיל למיצוי אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים מקולחים הפכו את הקולונה טרם שלב המיצוי. מטרתה של פעולה זו, שאינה מקובלת לרוב, אינה מוסברת בעבודתם ועשויה להצביע על קושי במיצוי

האסטרוגנים הסינטטיים מפאזה זו. רוויה של אתרי ספיחה על פני הפחם הפעיל יכולה להיות סיבה נוספת לשיעור השבה נמוך (Gomes et al., 2005). במחקר הנוכחי, ההסבר הנ"ל מתאים פחות עקב איבוד סלקטיבי של אסטרוגנים סינטטיים. כאמור, האסטרוגנים הסינטטיים הידרופוביים יותר בהשוואה לטבעיים (K_{ow} : natural 2.81 - 3.94, synthetic 4.15 - 4.67) ולכן צפוי היה מנגנון הנ"ל לגרום להשבה נמוכה יותר דווקא של האסטרוגנים הטבעיים.

HPLC-MS/MS אנליזה ב

במרבית המחקרים משתמשים בקולונה C18 (Alkyl-Bonded Reversed Phase Columns) כפאזה נחה להפרדה כרומטוגרפית ומתנול (MeOH) או אצטוניטריל (AcN) כפאזה אורגנית נעה (נספח 1). במקרה זה קיים יתרון לשימוש באצטוניטריל כממס אורגני משום היותו מריץ סלקטיבי יותר בהשוואה למתנול המאפשר הפרדה טובה של האסטרוגנים על פני הקולונה. עם זאת, לקולונה מסוג C18 חסרה סלקטיביות להפרדה יעילה של האסטרוגנים בנוכחות מתנול כמריץ אורגני. סלקטיביות גבוהה לאסטרוגנים קיימת לקולונה מסוג Phenyl. סלקטיביות זו קשורה לאינטראקציות המתקיימות בין אלקטרון π של הטבעת הפנילית בפאזה הקשורה לבין אלקטרוני π של ההורמון (באזור הארומאטי של המולקולה). אינטראקציות π - π שנוצרות כוללת תורם ומקבל אלקטרונים ומביאות לעיכוב רב יותר של מולקולות האסטרוגנים על פני הפאזה הנחה הפנילית, בהשוואה לזה הקיים בפאזה C18 (Kayillo et al., 2007). יתרה מכך, אינטראקציות אלו פעילות בנוכחות מתנול ומדוכאות בנוכחות אצטוניטריל (Kayillo et al., 2007).

במחקר הנוכחי נמצא מתנול כמריץ אורגני מתאים יותר לאנליזה של אסטרוגנים בספקטרוגרף מסות בהשוואה לאצטוניטריל. ממצא זה תומך במסקנות של Gentili et al (2002) ו Koh et al (2007).

בנוסף להרכב המריצים גם לסוג הממשק בספקטרוגרף המסות השפעה על רגישות השיטה. במרבית המחקרים משולב ממשק מסוג ESI והאנליזה מתבצעת ליונים של אסטרוגנים להם מטען שלילי (נספח 1). למעשה, קיימים אף דיווחים כי התקן הנ"ל בלבד מאפשר זיהוי של אסטרוגנים מדוגמאות סביבתיות (López de Alda and Barceló, 2000). לעומת זאת, מספר עבודות מהעת האחרונה, כמו גם העבודה הנוכחית, מעידות גם על התאמה של מתקן יינון מסוג APCI לזיהוי אסטרוגנים טעונים חיובית (למשל, Díaz-Cruz et al., 2003). יתרה מכך ל ESI חסרון באנליזה של דוגמאות סביבתיות משום רגישותו לנוכחות קו-אקסטרקטים המתבטאת בדיכוי סיגנלים (Ion Suppression, Gomes et al., 2005; Schlüsener and Bester 2005). תופעה זו קיימת גם במקרה של מתקן יינון מסוג APCI, כפי שמעידים הממצאים של העבודה הנוכחית, אם כי בשיעור נמוך בהשוואה לזה של ESI (Schlüsener and Bester, 2005). על כן, על אף הרגישות הנמוכה של APCI לאנליזה של אסטרוגנים במים בהשוואה לזו של ESI, יתכן ויש לו יתרון באנליזה של אסטרוגנים בקולחים ושפכים (Schlüsener and Bester, 2005). מתקן יינון חדש (APPI) נכנס אף הוא לאחרונה לשימוש באנליזה

של אסטרוגנים בדוגמאות סביבתיות. ממצאים ראשוניים מעידים כי מתקן זה אף רגיש יותר מ ESI (Yamamoto et al., 2006, נספח 1).

פרמטרים נוספים להם השפעה על רגישות השיטה כוללים את סוג האנלייזר (למשל, Quadrupole, Triple Quadrupole או Ion Trap), זיהוי יונים מולקולאריים (MS) או שברי יון מולקולאריים (MS/MS Tandem Mass Spectrometry) ואופן סריקה של היונים למשל טווח משקלים מולקולאריים (SRM, Selected Reaction Monitoring) או משקל מולקולארי של יון יחיד (SIM, Selected Ion Monitoring). מבין האנלייזרים נחשב ה Triple Quadrupole כמתאים ביותר לאנליזה של אסטרוגנים ולו רגישות גבוהה עד פי 10 בהשוואה לזה של Single Quadrupole (Díaz-Cruz et al., 2003). אנלייזר מסוג Ion Trap, בו בוצעה האנליזה בעבודה הנוכחית, נחשב רגיש פחות בהשוואה לאנלייזרים הנ"ל (Croley et al., 2000). משום כך השימוש בו לאנליזה של אסטרוגנים אינו נפוץ (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003, נספח 1). מגבלה של אנלייזר מסוג Ion Trap בלטה במקרה של E3 שעבורו נתקבלו סיגנלים נמוכים בהשוואה לאסטרוגנים הטבעיים האחרים בריכוזים זהים של סטנדרטים אנליטיים המומסים במים באיכות גבוהה (ULC-MS grade). כך למשל בתנאים אלה, במועדים שונים, היה שיפוע עקומות כיוול של E2 גבוה פי 12.5 - 22.6 בהשוואה לזה של E3 (n=10). אנליזה באמצעות MS/MS מגבירה את הרגישות בהשוואה לזו המתקבלת ב MS בלבד (Croley et al., 2000; Benijts et al., 2002; Díaz-Cruz et al., 2003). עם זאת קיימים מחקרים המדווחים על ערכי LOD נמוכים מ 1 ננוגרם בליטר גם באנליזה הכוללת MS (López de-) (Alda and Barcelo, 2000; Ferguson et al., 2001). במקרים אלו, הקדים לשלב האנליטי ניקוי יעיל וסלקטיבי של הדוגמא. למשל ניקוי באמצעות מיצוי בנוגדנים ספציפיים לאסטרוגנים (Immuno-) (Affinity Extraction, Ferguson et al., 2001) או הפרדות כרומטוגרפיות להן רזולוציה גבוהה (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2003). באופן כללי ניתן לומר כי באנליזה המתבססת על HPLC-ESI-MS/MS התקבלו עד כה הרגישויות הגבוהות ביותר ($LOD < 0.5 \text{ ng/l}$), למשל, Baronti et al., 2000; Gentili et al., 2002; Koh et al., 2007). באנליזה של אסטרוגנים טבעיים וסינטטיים שבוצעה בעבודה הנוכחית באמצעות HPLC-APCI(PI)-MS/MS התקבלה רגישות (LOD) בין 1 ל 2 ננוגרם בליטר למרבית האסטרוגנים. רגישות זו נמצאת בטווח הרגישויות של שיטות שפותחו לאנליזה של אסטרוגנים בקולחים, כולל אנליזות שבוצעו ב HPLC-ESI(NI)- Triple Quadrupole MS/MS (נספח 1).

קיימים פרמטרים נוספים הקשורים באופן הפעלה של HPLC-MS ו HPLC-MS/MS המסייעים לשיפור רגישות המכשיר. פרמטרים אלו כוללים למשל, נפח הזרקה של הדוגמא ל HPLC (בעבודה הנוכחית $100 \mu\text{l}$), טמפרטורה במתקן יינון האלקטרוני (בעבודה הנוכחית 350°C) וכך האנרגיה המושקעת ביינון ושבירה של המולקולות (Collision Energy, בעבודה הנוכחית 30%). גם לערך

הגבה של הפאזה הנעה השפעה על יעילות יינון מולקולות האסטרואגנים וכתוצאה מכך השפעה על עוצמת הסיגנל. בהתאם, בעבודה הנוכחית השתמשנו במריצים שהוחמצו (0.1% חומצה פורמית) ועוצמת הסיגנל שופרה כבסדר גודל בהשוואה למריצים שאינם מוחמצים.

סטנדרט חיצוני ופנימי

על מנת לקבוע את ריכוז האסטרואגנים בדוגמאות קולחים נהוג להשתמש בסטנדרט חיצוני ופנימי. הסטנדרט החיצוני מייצג את עקומת הכיול המשמשת להערכה של ריכוז ההורמון בדוגמאות סביבתיות על בסיס מתאם בין ריכוז מחושב של סטנדרטים אנליטיים לבין שטחם (Cui et al., 2006). עקומות הכיול בעבודה הנוכחית כללו טווח ריכוזים של בין 0.001 ל 0.5µg/ml. בטווח ריכוזים הנ"ל התקבלה ליניאריות בין ריכוז האסטרואגנים לבין שטחם ומקדם המתאם היה גבוה ($R^2=0.999$; $n \geq 10$). עם זאת, עבור כל האסטרואגנים נמצאה שונות של עד 25% בשיפוע של המשוואה הליניארית שנתקבלה בכיולים שונים. שונות זו, מבטאת את הבדלים ברגישות המכשיר במועדים שונים. משום כך, בכל הרצה של דוגמאות אסטרואגנים שולבה גם עקומת כיול. חישוב ריכוז האסטרואגנים התבסס על העקומה שהורצה באותו מועד.

סטנדרט פנימי משמש לתיקון של ריכוז האסטרואגנים שאבדו מרגע איסוף הדוגמא, במהלך אכסונה והכנתה לאנליזה. בעבודה הנוכחית, האסטרואגנים עצמם שימשו כסטנדרטים פנימיים והוספו לדוגמאות הקולחים בריכוז של 100 ננוגרם בליטר. שיעור ההשבה נקבע כיחס בין הפרש שטח הסיגנלים של אסטרואגנים שהוספו לקולחים ושטח רעש הרקע (דוגמאות blank) לבין השטח הצפוי שחושב מתוך עקומת כיול. בשיטה זו נעשה שימוש גם על ידי אחרים (Gomes et al., 2005; Cui et al., 2006). לאסטרואגנים טבעיים התקבל שיעור השבה גבוה לאחר מיצוי מקולחים שניוניים באמצעות מחסנית המשלבת פחם פעיל ואמינופרופיל. שיעור השבה גבוה לאסטרואגנים הטבעיים והסינטטיים התקבל במיצוי קולחים שניוניים באמצעות מחסנית C18 וניקוי בפלוריסיל (טבלה 4.5.1). מקדם שונות נמוך (RSD לרוב נמוך מ 10%, טבלה 5.1) מעיד על הדירות גבוהה והתאמה של השיטה לאנליזה של אסטרואגנים מקולחים שניוניים.

יש לציין כי סטנדרט פנימי אופטימאלי הינו מולקולה בעלת מאפיינים כימיים דומים לאנליט הרצוי ונעדרת מהקולחים. בהיבט זה המולקולה האופטימאלית לשימוש הם אותן אנליטים עצמם (אסטרואגנים) בהם מוחלפים חלק מאטומי המימן בדאוטריום (Reddy et al, 2005). זאת בתנאי שאיכות הסטנדרט האנליטי 95% או גבוה יותר (Schlüsener and Bester, 2005). בעבודה הנוכחית לא נעשה שימוש במולקולות אלו משום עלותן הגבוהה. לכאורה קיימת אפשרות של שימוש באסטרואגנים סינטטיים כסטנדרט פנימי לאסטרואגנים הטבעיים משום שלא נמצאה עדות לנוכחותם בקולחים השניוניים (סעיף 7.4). עם זאת, העבודה הנוכחית מעידה על היעדר התאמתם בשל שיעור השבה שונה בינם לבין האסטרואגנים הטבעיים במיצוי באמצעות SPE הכולל פחם פעיל ואמינופרופיל.

5.1 שיעור השבה (%) ממוצע ומקדם שונות) של אסטרוגנים טבעיים (E1, E2 ו E3) וסינטטיים (EE2 ו MeEE2) לאחר הוספה מבוקרת של האסטרוגנים (100 או 200ng/l) לנפח של ליטר קולחים שניוניים מסוננים שנאספו בשפד"ן ולאחר מכן מיצוי האסטרוגנים ב SPE הכולל פחם פעיל משולב עם מחליף אניונים (GCB+NH₂, n=10) או C18 משולב עם פלוריסיל (n=5, C18+Florisil).

Compound	SPE method	Added (ng/l)	Recovery (%)	RSD (%)
E2	GCB + NH ₂	100	98	6
E1	GCB + NH ₂	100	95	8
E3	GCB + NH ₂	200	95	11
E2	C18+florisil	100	102	4
E1	C18+florisil	100	103	6
EE2	C18+florisil	100	104	6
MeEE2	C18+florisil	100	95	4

לסיכום, בעבודה הנוכחית הותאמה שיטה לאנליזה של אסטרוגנים בקולחים שניוניים עד סף מדידה (LOD) של 1 או 2 ננוגרם בליטר עבור האסטרוגנים הטבעיים E1 ו E2 והאסטרוגנים הסינטטיים EE2 ו MeEE2. סף מדידה גבוה יותר של 5 ננוגרם בליטר התקבל עבור האסטרוגן הטבעי E3. השיטה פותחה בספקטרוגרף מסות הזמין בו אנלייזר מסוג Ion Trap. אנלייזר זה שנחשב רגיש פחות בהשוואה ל Quadrupole (Croley et al., 2000) ולכן השימוש בו לאנליזה של אסטרוגנים נפוץ פחות. מכאן שיתכן כי יישום השיטה שפותחה בעבודה הנוכחית להכנה של דגימות הקולחים ואנליזה בספקטרוגרף מסות הכולל אנלייזר מסוג Quadrupole יאפשר זיהוי אסטרוגנים גם בריכוזים נמוכים יותר. עם זאת, ריכוז האסטרוגנים ובעיקר הטבעיים (E1 ו E2) בקולחים שניוניים לרוב גבוה בסדר גודל מערכי סף המדידה שהתקבלו בעבודה הנוכחית. לפיכך, השיטה שפותחה מתאימה לבחינה של ריכוז האסטרוגנים בקולחים שניוניים ובחינה של שיעור הרחקתם באגנים ירוקים.

נספח 3

ערכים חודשיים ושנתיים של משתני איכות מים נבחרים בקולחים שניוניים במט"ש שפד"ן בשנת 2008

Parameter	Units	No. of Monthly Data	2008												Annual average 1-12
			Arithmetic monthly means												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Suspended Solids 105°	mg/L	25-31	7	7	6	6	7	4	5	4	4	4	4	6	5
Suspended Solids 550°	mg/L	1-18	1.7	1.7	1.8	1.7	1.9	1.4	1.1	1.2	0.6	1.4	1.2	1.9	1.5
pH	-	14-22	7.53	7.58	7.50	7.57	7.52	7.58	7.60	7.62	7.52	7.57	7.57	7.52	7.56
Alkalinity, as CaCO ₃	mg/L	2-9	275	286	279	259	221	224	258	233	230	214	263	271	251
BOD	mg/L	8-14	7	6	7	5	5	5	5	4	4	5	4	7	5
BOD f	mg/L	1-18	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
COD	mg/L	9-22	42	42	46	43	44	40	37	36	35	36	38	45	40
COD f	mg/L	5-30	32	33	38	35	35	35	31	30	30	30	30	34	33
DOC	mg/L	0-1	10.0	11.6	11.8	12.1	12.7		10.0	10.3	10.3	9.7	9.5	10.9	10.8
UV 254 Absorbance	cm ⁻¹ x10 ³	4-13	207	212	222	220	222	209	210	206	208	221	209	195	212
Ammonia, as N	mg/L	20-31	4.34	6.44	6.09	2.43	3.24	3.26	3.79	2.79	1.62	1.58	2.63	3.18	3.45

Kjeldahl Nitrogen	mg/L	5-17	6.0	8.1	9.0	5.1	4.5	9.8	5.7	4.3	2.6	3.1	4.0	4.9	5.6
Kjeldahl Nitrogen f	mg/L	2-21	5.4	7.8	8.3	4.4	5.2	5.1	5.7	4.0	2.6	2.9	3.9	4.3	5.0
Nitrate, as N	mg/L	5-26	1.13	1.00	0.79	0.48	0.43	0.56	0.34	0.61	0.63	0.68	0.63	1.00	0.69
Nitrite, as N	mg/L	4-25	2.07	1.141	0.992	0.812	0.787	0.844	0.373	0.807	0.643	0.844	0.77	0.998	0.923
Phosphorus	mg/L	3-9	1.9	1.6	2.0	1.6	1.2	1.1	1.5	1.7	1.2	1.0	1.0	1.3	1.4
Phosphorus f	mg/L	3-9	1.6	1.5	1.8	1.5	0.9	1.2	1.4	1.7	1.1	1.0	0.9	1.1	1.3
Phosphate, as P	mg/L	3-9	1.5	1.3	1.6	1.4	0.8	1.1	1.3	1.5	1.1	0.9	0.8	0.9	1.2
Turbidity	NTU	25-31	3.2	3.3	3.4	3.0	2.6	2.1	2.0	1.6	1.7	1.7	1.8	3.2	2.5
Temperature	°C	1-4	19.0	18.0	17.8	19.0	20.7	24.3	29.7	31.0	31.0	24.5	22.1	21.0	23.2
Dissolved Oxygen	mg/L	1	0.6	0.7	0.9	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3
Dissolved solids 105°	mg/L	1-9	868	834	917	970	914	951	937	933	915	840	891	894	905
Dissolved solids 550°	mg/L	0-9	753	729	787	852	831	830		820	808	749	799	793	795
Electrical conductivity	µmhos/cm	3-9	1,491	1,471	1,583	1,665	1,643	1,677	1,605	1,609	1,612	1,481	1,565	1,520	1,577
Hardness, as CaCO ₃	mg/L	2-5	310	306	302	325	299	302	299	303	301	296	308	298	304
Calcium	mg/L	2-5	79	80	82	78	70	71	73	72	73	73	77	74	75
Magnesium	mg/L	2-5	28	26	24	32	30	30	28	30	29	14	28	27	27
Chloride	mg/L	3-9	249	242	282	316	319	326	301	305	303	259	282	264	287
Sulfate	mg/L	0-1		89		106		104		96					99
Fluoride	mg/L	0-1		0.51		0.62		0.75	0.58	0.70	0.81	0.63	0.55	0.66	0.65
Detergents	mg/L	1-5	0.14	0.13	0.16	0.15	0.14	0.15	0.15	0.12	0.14	0.12	0.11	0.13	0.14

Phenol	µg/L	1	3	10	4	2	5	3	2	3	2	2	1	13	4
Fats	mg/L	1-5	2.1	5.5	2.5	2.1	3.6	3.6	1.1	1.6	1.3	2.2	1.6	1.9	2.4
Mineral Oils	mg/L	1-5	<0.3	<1.1	<1.2	1.1	2.0	<0.6	<0.4	<0.5	<0.5	<0.3	<0.8	<0.8	<0.8
Color	Unit	0-1		60		43		44		58	64		60		55
Arsenic	µg/L	0-1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2		<2		<2
Cadmium	µg/L	1	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Cyanide	µg/L	0-1	7	10	6	6	<3	6	12	7	<3		7	6	<7
Lead	µg/L	1	<2	<2	<2	3	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Mercury	µg/L	1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Selenium	µg/L	0-1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Chromium	µg/L	1	<3	3	3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	<3
Barium	µg/L	1	55	54	49	48	55	51	53	64	50	47	50	48	52
Silver	µg/L	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	<1	<1	<1
Copper	µg/L	1	20	32	38	76	16	11	16	14	19	17	13	32	25
Iron	µg/L	1	84	87	118	158	80	87	98	77	75	86	52	68	89
Manganese	µg/L	1	17	18	23	31	23	21	33	<3	19	21	18	44	22
Zinc	µg/L	1	59	70	68	84	46	35	38	24	37	40	29	43	48
Sodium	mg/L	1	179	195	204	207	224	226	207	196	216	178	198	202	203
Potassium	mg/L	0-1		17.3		23.0		21.7	19.3	22.4	19.7	23.0	25.5	23.0	21.7
Boron	mg/L	1	0.20	0.23	0.21	0.16	0.16	0.15	0.23	0.23	0.18	0.16	0.19	0.21	0.19

Cobalt	µg/L	1	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Nickel	µg/L	1	5	8	11	8	9	9	7	7	7	6	4	13	8
Strontium	µg/L	1	711	757	588	724	670	623	647	644	650	552	676	625	656
Molybdenum	µg/L	1	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	3	<3	3	<3
Tin	µg/L	1	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Silicon	mg/L	0-1		9.1		7.6		7.7			6.3		8.1		7.8
Lithium	µg/L	1	<3	3	4	5	4	5	5	5	5	6	4	5	<5
Aluminum	µg/L	1	24	22	23	48	42	44	54	45	38	33	23	34	36
Antimony	µg/L	0-1									<5	<5	<5	<5	<5
Thallium	µg/L	0-1									<3	<3	<3	<3	<3
Vanadium	µg/L	0-1									<3	<3	<3	<3	<3
Beryllium	µg/L	0-1									<0.4	0.4	<0.4	<0.4	<0.4

נספח 4 צילומי מחקר



איור 1: יחידות (קולונות) לגידול ביופילם במפעל טיפול שפכים שפד"ן. מימין מערכת צינורות לניקוז הקולחים במוצא יחידות הגידול המאפשר זרימה רוויה או בלתי רוויה. משמאל, צנרת שזורה בטפטפות המזינה את יחידות הגידול בקולחים שניוניים. בתחתית יחידות גידול זו ניתן לראות את המצעה בזלת (שכבה שחורה) עליו התפתחה אוכלוסייה של ביופילם.



איור 2: שייקר אורביטאלי וכלי הניסוי בהם נבדקו פירוק והמרה ביולוגית של אסטרואגנים במעבדה. בכל כלי צינור זכוכית דרכו מוזרמים אוויר או גז חנקן לשמירה על תנאים איירוביים או היפוקסיים. (במהלך הניסוי מכוסה השייקר לבקרת טמפרטורה ולמניעת כניסת אור).



איור 3: מערכת לבקרת זרימה ופיזור קולחים לבריכות האגנים הירוקים בשפד"ן. המערכת כוללת 7 עמדות המזרימות קולחים ל 7 טיפולים. בכל עמדה צנרת כפולה המיועדת להזרמה של קולחים בספיקה גבוהה או נמוכה. על פני הצנרת מדי ספיקה ובצדה בקרים (Gavish) לקביעת דפוס הזרימה.



איור 4: בריכה 1-3 המוזנת בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי (vertical subsurface flow) ללא צומח. רשת צינורות שחורים מיועדים לפיזור קולחים בספיקות נמוכות. זקיפים אפורים על פני הצנרת הכתומה משמשים לפיזור והצפה של הקולחים בספיקות גבוהות.



איור 5: בריכה 1-6 המוזנת בדפוס זרימה תת-קרקעי אנכי (vertical subsurface flow) ובה צמחיה עשבונית (יבלית)



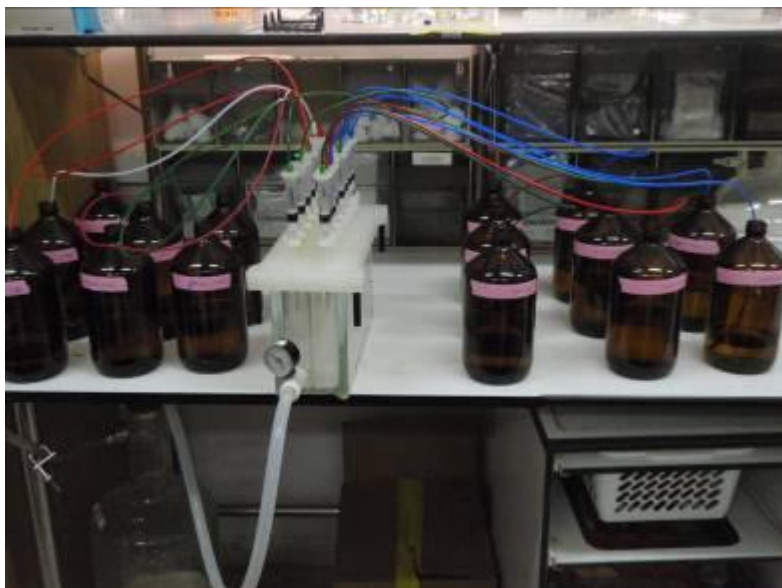
איור 6: בריכה 1-7 המוזנת בדפוס זרימה תת קרקעי אנכי (vertical subsurface flow). בבריכה נשתלו מגוון צמחים. בתהליך ההבשלה השתלט בבריכה גומא פפירוס.



איור 7: בריכה 2-3 המוזנת בדפוס זרימה עילי (free flow/surface flow) ובה דומיננטיות של אלף עלה. מימין עומד של אירוס צר עלים (פריחה צהובה) ומשמאל עומד של פונטדריה איזמלנית (פריחה סגולה).



איור 8: איסוף קולחים לאנליזה מתוך צינור ניקוז של אחת הבריכות הנמצא במיכל איזון שבמוצא הבריכה.



איור 9: מתקן מיצוי SPE (Macherey-Negal vacuum manifold for 24 columns) בשלב העמסה של דוגמאות קולחים בנפח 1 ליטר (בבקבוקים כהים). מעל למתקן נראות מחסניות SPE המכילות פחם פעיל (שכבה שחורה במחסנית) משולב עם מחליף אניונים מסוג אמינופרופיל.



איור 10: מתקן HPLC (Agilent 1100) ו-MS (Finnigan, LCQ) במעבדה להידרו-כימיה באוניברסיטת תל-אביב.

נספח 5

מאפייני איכות מים בכלי הניסוי, במדיום מימי מועשר בנוטריאנטים ובקולחים שניוניים, בתחילתה ובתום הניסוי (4 ימים)

	NH ₄ -N		NO ₃ -N		TN	pH		COD
	t=0	t=4days	t=0	t=4days	t=0	t=0	t=4days	t=0
Aerobic E2								
H ₂ O cont	0.46±0.00	0.011±0.001	0.09±0.00	0.13±0.06	1.03±0.00	6.93±0.00	5.74±0.27	6.67±0.0
H ₂ O test	0.46±0.00	0.004±0.001	0.09±0.00	0.11±0.03	1.03±0.00	6.93±0.00	6.70±0.13	6.67±0.0
H ₂ O blank								
EFF cont	2.67±0.00	0.012±0.005	1.51±0.00	5.38±1.44	6.63±0.00	7.50±0.00	8.54±0.05	34.0±0.0
EFF test	2.67±0.00	0.018±0.020	1.51±0.00	0.54±0.13	6.63±0.00	7.50±0.00	8.50±0.16	34.0±0.0
EFF blank								
Hypoxic E2								
H ₂ O cont	0.42±0.00	0.11±0.04	9.79±0.00	9.56±0.42	10.58±0.00	7.20±0.00	6.44±0.03	4.2±0.0
H ₂ O test	0.42±0.00	0.12±0.02	9.79±0.00	0.21±0.05	10.58±0.00	7.20±0.00	7.09±0.10	4.2±0.0
H ₂ O blank	0.42	0.009	9.79±0.00	3.42	10.58±0.00	7.20±0.00	6.88	4.2±0.0
EFF cont	4.34±0.00	3.69±0.83	0.64±0.00	0.43±0.12	6.77±0.00	8.84±0.00	7.99±0.18	34.2±0.0
EFF test	4.34±0.00	2.15±0.07	0.64±0.00	0.20±0.05	6.77±0.00	8.84±0.00	7.86±0.11	34.2±0.0
EFF blank	4.34	1.47	0.64±0.00	0.44	6.77±0.00	8.84±0.00	8.14	34.2±0.0
Aerobic E1								
H ₂ O cont	0.46±0.00	0.038±0.005	0.04±0.00	0.12±0.05	1.18±0.00	6.69±0.00	6.29±0.79	5.01±0.00
H ₂ O test	0.46±0.00	0.034±0.004	0.04±0.00	0.18±0.08	1.18±0.00	6.69±0.00	6.65±0.49	5.01±0.00
H ₂ O blank	0.46±0.00	0.049	0.04±0.00	0.26	1.18±0.00	6.69±0.00	6.91	5.01±0.00
EFF cont	3.98±0.00	0.037±0.040	0.58±0.00	8.96±2.52	5.90±0.00	7.60±0.00	8.44±0.3	35.30±0.00
EFF test	3.98±0.00	0.007±0.002	0.58±0.00	9.97±1.70	5.90±0.00	7.60±0.00	8.42±0.20	35.30±0.00
EFF blank	3.98±0.00	0.003	0.58±0.00	10.02	5.90±0.00	7.60±0.00	8.20	35.30±0.00
Hypoxic E1								
H ₂ O cont	0.41±0.00	0.24±0.066	9.68±0.00	10.08±0.80	11.45±0.00	7.32±0.00	6.80±0.16	9.68±0.00

H₂O test	0.41±0.00	0.14±0.006	9.68±0.00	8.97±0.53	11.45±0.00	7.32±0.00	7.49±0.10	9.68±0.00
H₂O blank	0.41±0.00	0.12	9.68±0.00	8.14	11.45±0.00	7.32±0.00	7.88	9.68±0.00
EFF cont	9.69±0.00	6.290±0.563	2.42±0.00	5.68±2.98	17.75±0.00	8.44±0.00	8.37±0.20	48.65±0.00
EFF test	9.69±0.00	6.367±0.042	2.42±0.00	3.39±0.05	17.75±0.00	8.44±0.00	8.16±0.17	48.65±0.00
EFF blank	9.69±0.00	6.610	2.42±0.00	3.442	17.75±0.00	8.44±0.00	8.10	48.65±0.00
Aerobic E3								
H₂O cont	0.376±0.00	0.178±0.149	0.08±0.00	0.11±0.03	0.52±0.00	7.00±0.00	6.941±0.27	1.96±0.00
H₂O test	0.376±0.00	0.010±0.004	0.08±0.00	0.11±0.02	0.52±0.00	7.00±0.00	6.81±0.26	1.96±0.00
H₂O blank	0.376±0.00	0.006	0.08±0.00	0.08	0.52±0.00	7.00±0.00	6.88	1.96±0.00
EFF cont	14.400±0.00	1.966±2.942	1.49±0.00	14.30±2.25	20.75±0.00	7.91±0.00	8.36±0.24	33.90±0.00
EFF test	14.400±0.00	1.478±2.080	1.49±0.00	8.89±0.85	20.75±0.00	7.91±0.00	6.18±1.36	33.90±0.00
EFF blank	14.400±0.00	1.150	1.49±0.00	7.14	20.75±0.00	7.91±0.00	5.20	33.90±0.00
Hypoxic E3								
H₂O cont	0.378±0.00	0.243±0.195	9.42±0.00	9.98±0.47	10.50±0.00	7.50±0.00	7.35±0.16	5.83±0.00
H₂O test	0.378±0.00	0.203±0.030	9.42±0.00	6.36±1.34	10.50±0.00	7.50±0.00	7.49±0.10	5.83±0.00
H₂O blank	0.378±0.00	0.203	9.42±0.00	6.45	10.50±0.00	7.50±0.00	7.29	5.83±0.00
EFF cont	2.480±0.00	1.046±0.503	2.55±0.00	7.38±2.91	10.65±0.00	8.50±0.00	8.80±0.58	30.05±0.00
EFF test	2.480±0.00	1.310±0.095	2.55±0.00	9.03±1.84	10.65±0.00	8.50±0.00	9.26±0.13	30.05±0.00
EFF blank	2.480±0.00	1.160	2.55±0.00	5.61	10.65±0.00	8.50±0.00	8.90	30.05±0.00
Aerobic EE2								
H₂O cont	0.736±0.000	0.023±0.004	0.11±0.00	1.10±0.60	1.91±0.00	7.20±0.00	6.52±0.24	2.88±0.00
H₂O test	0.736±0.000	0.016±0.003	0.11±0.00	3.10±0.60	1.91±0.00	7.20±0.00	6.54±0.17	2.88±0.00
H₂O blank	0.736±0.000	0.010	0.11±0.00	2.07	1.91±0.00	7.20±0.00	6.96	2.88±0.00
EFF cont	2.400±0.000	0.195±0.150	1.61±0.00	16.87±3.01	8.53±0.00	8.75±0.00	8.25±0.39	28.75±0.00
EFF test	2.400±0.000	0.079±0.050	1.61±0.00	3.37±2.59	8.53±0.00	8.75±0.00	8.28±0.33	28.75±0.00
EFF blank	2.400±0.000	0.099	1.61±0.00	1.04	8.53±0.00	8.75±0.00	8.60	28.75±0.00
Hypoxic EE2								

H₂O cont	0.330±0.00	0.427±0.006	9.11±0.00	9.85±0.35	11.70±0.00	7.08±0.00	7.30±0.14	1.78±0.00
H₂O test	0.330±0.00	0.356±0.054	9.11±0.00	10.41±0.93	11.70±0.00	7.08±0.00	7.21±0.25	1.78±0.00
H₂O blank	0.330±0.00	0.260	9.11±0.00	8.94	11.70±0.00	7.08±0.00	7.13	1.78±0.00
EFF cont	1.845±0.00	1.375±0.262	1.81±0.00	3.53±1.02	6.72±0.00	7.88±0.00	9.24±0.28	29.15±0.00
EFF test	1.845±0.00	1.350±0.279	1.81±0.00	3.60±0.90	6.72±0.00	7.88±0.00	9.61±0.07	29.15±0.00
EFF blank	1.845±0.00	1.390	1.81±0.00	2.97	6.72±0.00	7.88±0.00	9.30	29.15±0.00

H₂O cont. =control of water supplemented with nutrients; with estrogen; no biofilm

H₂O test =test of water supplemented with nutrients; with estrogen; with biofilm

H₂O blank =blank of water supplemented with nutrients; no estrogen; with biofilm

EFF cont. =filtered secondary effluent; with estrogen; no biofilm

EFF test = filtered secondary effluent; with estrogen; with biofilm

EFF blank = filtered secondary effluent; no estrogen; with biofilm

נספח 6

**מדדי איכות מים נבחרים בכניסה ובמוצא אגנים ירוקים נבחרים בזרימה עילית ותת קרקעית בעולם. שטח המערכת (Area),
ספיקה (Flow), עומס הידראולי (HLR) וזמן שהיה הידראולי (HRT) מוצגים.**

Location	Area (m ²)	Flow (m ³ /d)	HLR (cmd ⁻¹)	BOD in (mg/l)	BOD out (m/l)	TSS in (mg/l)	TSS out (mg/l)	NH ₄ in (mg/l)	NH ₄ out (mg/l)	NO ₃ in (mg/l)	NO ₃ out (mg/l)	TN in (mg/l)	TN out (mg/l)	TP in (mg/l)	TP out (mg/l)	Ref
Surface Flow																
USA	34000	1457.3	4.3	14.4	10.8	85.0	81.0	0.13	0.08					0.85	0.69	Kadlec and Knight. 1996
USA	283000	876.63	0.3	13.5	1.9	16.4	2.7	2.43	0.27			17.58	2.35	3.88	0.4	Kadlec and Knight. 1996
USA	15000	814.5	5.4	25.6	9.7	57.4	10.7	5.04	7.98			13.3	9.81	4.54	4.22	Kadlec and Knight. 1996
USA	15000	818.5	5.5	25.6	12.2	57.4	16.6	7.69	6.43			14.05	9.44	4.54	3.98	Kadlec and Knight. 1996
USA	202000	5826.8	2.9	6.3	3.0	10.7	3.0	4.05	1.96			11.22	3.53	4.26	3.35	Kadlec and Knight. 1996
USA	466000	724.5	0.2	2.5	3.5	5.4	12.4	0.99	0.41			6.89	2.92	3.67	1.02	Kadlec and Knight. 1996
USA	70000	1089.5	1.6	26.8	5.5	45.2	8.0	6.0	6.0					11.77	5.57	Kadlec and Knight. 1996
USA	1560000			26.8	6.7	112.0	57.6							3.29	2.56	Kadlec and Knight. 1996
USA	320000	5198.2	1.6	17.1	12.0	21.0	13.1	14.01	3.68			19.51	5.33	4.77	2.43	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	49.42	4.9	20.7	4.6	36.2	28.0	2.95	1.04			6.98	3.38	1.68	0.77	Kadlec and Knight. 1996
USA	337000	439.95	0.1	8.7	5.0			1.99	0.60			5.63	8.75	2.01	0.33	Kadlec and Knight. 1996
USA	1210000	6689.7	0.6	0.7	1.2	0.7	3.0	0.53	0.07			2.30	1.45	0.27	0.09	Kadlec and Knight. 1996
USA	30000			2.7	3.0	6.4	13.0	0.05	0.05			0.58	0.66	0.07	0.16	Kadlec and Knight. 1996
USA	40000	197.0	0.5	13.2		17.2	n.a.	5.00	0.26					3.06		Kadlec and Knight. 1996
USA	637000	3355.6	0.5	2.2	0.3			0.39	0.2					2.48	0.66	Kadlec and Knight. 1996

USA	139000	1043.0	0.8	18.4	8.5	16.3	16.2	15.96	1.22					23.19	3.62	Kadlec and Knight. 1996
USA	4775000	45485	1.0	2.7	2.0	4.3	2.8	1.04	0.18			2.29	0.95	0.26	0.08	Kadlec and Knight. 1996
USA	63000	1647.4	2.6	5.1	3.0	6.1	6.8	9.95	2.94					7.31	4.28	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	114.0	11.4	20.0	8.0	32.0	7.5	9.0	7.0					7.0	5.50	Kadlec and Knight. 1996
USA	5000	114.0	2.3	20.0	8.0	32.0	7.5	9.0	7.0					7.0	5.50	Kadlec and Knight. 1996
USA	1100000	1350	0.1	28.0	10.0	36/0	2.0	10.0	0.24							Kadlec and Knight. 1996
USA	210000	1362.7	0.6	11.6	2.6	6.0	1.5					20.0	1.60	6.2	5.2	Kadlec and Knight. 1996
USA	4980000	29192	0.6	3.2	2.6	6.7	5.4	0.39	0.29			5.25	2.18	6.70	5.87	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	84.14	8.4	19.2	11.5	80.6	36.8							2.58	1.72	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	129.35	12.9	19.0	12.3	79.8	35.6							2.59	2.07	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	162.5	16.3	19.7	13.8	80.6	40.3							2.58	2.23	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	26.0	2.6	19.6	11.3	22.8	9.0	7.15	5.1			12.2	8.11	1.05	0.76	Kadlec and Knight. 1996
USA	1000	27.0	2.7	19.6	7.6	22.8	9.2	7.15	3.78			12.2	6.28	1.05	0.76	Kadlec and Knight. 1996
USA	2000	57.0	2.9	17.5	18.2	12.8	12.2	19.65	12.85							Kadlec and Knight. 1996
USA	352000	12746	3.6	3.3	1.8	5.1	4.5	3.76	0.08			8.23	1.33	0.69	0.38	Kadlec and Knight. 1996
USA	59000	3533.5	6.0	7.0	1.6	9.7	1.7					7.80	1.10	1.70	2.20	Kadlec and Knight. 1996
USA	25000	622.2	2.5	19.0	5.0	11.0	14.3	4.17	1.30							Kadlec and Knight. 1996
USA	365000	1862	0.5	4.5	3.0	9.0		3.03	0.12							Kadlec and Knight. 1996
Location	HRT (d)	HLR (cm d⁻¹)	BOD in (mg/l)	BOD out (m/l)	TSS in (mg/l)	TSS out (mg/l)	NH₄ in (mg/l)	NH₄ out (mg/l)	NO₃ in (mg/l)	NO₃ out (mg/l)	TN in (mg/l)	TN out (mg/l)	TP in (mg/l)	TP out (mg/l)	Ref	
Arcata,	9		22.8	9.5	26.9	9.9									Ghermandi et al.,	

USA																2007
Arcata, USA	6.5		25.2	12.8	34.9	n.a.										Ghermandi et al., 2007
USA	>3.5		14.4	10.8	85	81										Ghermandi et al., 2007
USA	4.9		25.6	9.7	54.7	10.7										Ghermandi et al., 2007
USA	4.9		25.6	12.2	54.7	15.6										Ghermandi et al., 2007
AUS	4.6-5.4		21	12	34	22										Ghermandi et al., 2007
ITA	3.8		3.2	1.6												Ghermandi et al., 2007
USA	10-14		27	6	51	11										Ghermandi et al., 2007
CAN	<7.5		20.7	4.6	36.2	28.0										Ghermandi et al., 2007
AUS	12.3		6.6	6.7	4.8	4.5										Ghermandi et al., 2007
SWE	7		3.8	4.1												Ghermandi et al., 2007
NED	7-12		20	12	21	14										Ghermandi et al., 2007
USA	4-27		5.1	3	7.7	9.6										Ghermandi et al., 2007
NZ	3.8-11.3		30	12	84	23										Ghermandi et al., 2007
AUS	4.3		23	16	24	16										Ghermandi et al., 2007
USA	3.5		4.4	1.3	3.7	3.8										Ghermandi et al., 2007
USA	16.1		20	11	32	11										Ghermandi et al., 2007
USA	3.7		3.88	3.12	5.6	4.7										Ghermandi et al., 2007
AUS	3.2		18	14	23	55										Ghermandi et al., 2007
SWE	6		2.9	5.4	1.9	9.1										Ghermandi et al., 2007
SWE	6-8		21.9	3.9												Ghermandi et al.,

																2007	
USA	n.a.			24.2	6.5	9.2	11.9									Ghermandi et al., 2007	
USA	>5.7			19.0	5.0	11.0	14.3									Ghermandi et al., 2007	
USA	<8.5			11.6	2.6	6	1.5									Ghermandi et al., 2007	
NZ	5.8-17.4			30	7	75	12									Ghermandi et al., 2007	
AUS	7-10			27	8.8	25	8.6									Ghermandi et al., 2007	
USA	12			26	7.4	41.6	14.1									Ghermandi et al., 2007	
Queensland, AUS	17	2.69 or 4.58		9	7	5	4	0.3	0.2	5.7	<0.1	9.2	1.6	1	2	Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	10	3.2 or 4.88		4	9	2	5	0.2	0.2	4.2	<0.1	5.9	1.7	8.3	7.2	Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	12			3.91	22	11		7.7	5.4	9.7	2.9	19.5	7.9	6.8	6.2	Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	2			12.1	19	11	24	16			2.2	1.0				Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	7-10			18	8	25	7	11.5	2.2	15.8	0.3	31.5	6.9	6.8	7.1	Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	3			13.55	18	19	23	76	20.7	6.2	6.6	1.1				Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	3			11.19	18	11	21	18	23.5	14.0	6.3	1.0	35.9	18.0		Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	7			0.2	15	12		2.0	0.15	14.5	0.85					Greenway and Woolley, 1999	
Queensland, AUS	3			7.36	12	10	24	22	9.5	8.7	3.4	0.2	16.6	13.6	3	4	Greenway and Woolley, 1999
Queensland, AUS	5			12.15	13	8	32	22	8.6	7.8	5.0	0.1	17.8	11.0	3.3	4.2	Greenway and Woolley, 1999
Subsurface flow																	
Location	Area (m²)	Flow (m³/d)	HLR (cm d⁻¹)	BOD in (mg/l)	BOD out (m/l)	TSS in (mg/l)	TSS out (mg/l)	NH₄ in (mg/l)	NH₄ out (mg/l)	NO₃ in (mg/l)	NO₃ out (mg/l)	TN in (mg/l)	TN out (mg/l)	TP in (mg/l)	TP out (mg/l)	Ref	
USA	4000	463.5	11.6	13.3	9.0	9.6	3.2	9.69	6.48			34.18	16.16	6.01	4.31	Kadlec and Knight. 1996	

USA	5000			15.3	6.3	34.6	11.3	5.28	2.74								Kadlec and Knight. 1996
USA	21000	2547.8	12.1	25.5	9.8	47.5	14.4		4.33								Kadlec and Knight. 1996
USA	6000			14.3	4.9	34.6	6.1	1.10	3.03								Kadlec and Knight. 1996
USA	25000	2369.2	9.5	27.0	27.8	28.0	26.0	1.95	4.06			7.11	11.56	3.44	3.94		Kadlec and Knight. 1996
USA	2000	191.14	9.6	7.8	2.2	7.7	2.7		2.05								Kadlec and Knight. 1996
USA	2000	58.7	2.9	15.3	1.0	63.7	2.0	11.0	1.7			51.0	6.67	6.0	0.33		Kadlec and Knight. 1996
USA	16000	1308.7	8.2	19.5	17.8	28.0	20.3	3.47	1.85			9.33	8.56	2.78	2.34		Kadlec and Knight. 1996
USA	4000	228.7	5.7	29.0	9.9	35.3	15.2	5.4	2.83			13.0	6.21				Kadlec and Knight. 1996
USA	6000	875.7	14.6	26.6	13.7	61.3	17.2	2.26*	3.85			8.26	7.32	2.12	2.00		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	900	37.0	4.1	13	2	13	5					42.6	26.1	11.4	8.0		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	1500	37	2.5	30	3	58	4		2.6*			19.0	6.3	2.5	0.7		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	2125			15	2	852	750	12.0*	2.7*			33.4	24.3	0.5	0.2		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	1200	74.0	6.2	15	10	16	27	10.0*	10.8*	9.7**	2.0**	27.3	19.9	3.3	2.1		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	400	18.5	4.6	21	14	26	12	5.8*	7.6*	0.8**	0.6**	24.7	14.7	8.8	6.5		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	3600	444.0	12.3	12	6	11	10	1.6*	1.5*	6.3**	4.4**	8.3	6.0	4.6	4.3		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	1800	74	4.1	19	7	11	8	7.6*	4.2*	3.3**	1.9**	13.4	6.8	4.1	3.6		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	1008			10	3	7	8	1.1	0.1	6.5	3.5	9.6	4.7	3.2	1.6		Kadlec and Knight. 1996
Denmark				10	9	7	18	1.1	0.1	6.5	3.7	9.6	5.3	3.2	3.3		Kadlec and Knight. 1996
Denmark				10	2	7	2	1.1	0.1	6.5	4.3	9.6	6.1	3.2	2.2		Kadlec and Knight. 1996
Denmark	13000	2220	17.1	3	5	4	10	0.1	0.7	3.4	3	4.1	8.4	2.2	4.1		Kadlec and Knight. 1996

England	782	156	19.9	15	3	61	8	3.2	4.1			17.9	16.7	6.6	3.9	Kadlec and Knight. 1996
England	782	156	19.9	18	3	26	4	8	7			15.8	12.2			Kadlec and Knight. 1996
England	864	148	17.1	14	2	39	5	2.5	0.9			18.5	15.7	8.6	7.8	Kadlec and Knight. 1996
England	864	148	17.1	27	4	39	5	1.4	1.5			6.0	0.2			Kadlec and Knight. 1996
England	900	230	25.6	13	4	20	4	5.0	3.1			33.0	22.8	13.2	12.8	Kadlec and Knight. 1996
England	900	230	25.6	12	2	21	5	5.8	1.9			33.2	20.8			Kadlec and Knight. 1996
England	450	80	17.8	12	3	26	6	3.4	0.7			20.8	14.6	11.2	9.6	Kadlec and Knight. 1996
England	450	80	17.8	13	2	26	5	5.1	0.5			17.2	12.1			Kadlec and Knight. 1996
England	600	126	21.0	15	4	35	6	5.1	4.3			18.5	13.7	7.6	4.8	Kadlec and Knight. 1996
England	600	126	21.0	15	3	34	6	8.3	6.4			29.9	23.7			Kadlec and Knight. 1996

*NH₄-N

** NO₂₃-N

נספח 7

אפיון לימנולוגי של בריכות אגנים ירוקים בשפד"ן בשנות התפעול הראשונה והשלישית

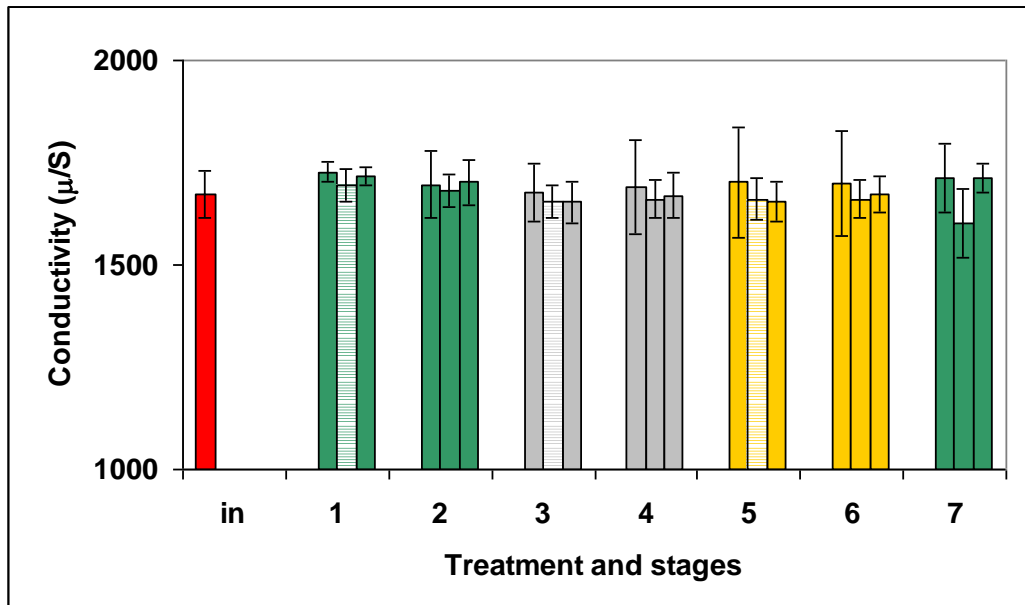
מוליכות חשמלית

בשני מצבי ההבשלה בוצעו המדידות בין החודשים מאי לספטמבר.

מפלס ראשון: בשנת ההפעלה הראשונה והשלישית המוליכות החשמלית הממוצעת בקולחים הנכנסים לבריכות הייתה דומה ($p=0.052$, t-test; 1778 ± 111 ו 1673 ± 59 μS , בהתאמה). המוליכות החשמלית בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון עם וללא צמחים הייתה דומה ($p=0.59$, oneway ANOVA) ולא שונה ממוליכות הקולחים הנכנסים ($p>0.64$, Dunnett) ו $p>0.61$ עבור כל הרכבי הצומח, בשנת הניטור הראשונה והשלישית, בהתאמה).

מפלס שני: המוליכות החשמלית בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני עם וללא צמחים ובקולחים היוצאים מבריכות בדפוס זרימה אופקי ואנכי הייתה דומה ($p=0.69$, threeway ANOVA) ו- $p=0.31$, בהתאמה).

מפלס שלישי: המוליכות החשמלית בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי הייתה דומה לזו של הקולחים הנכנסים אליהן ($p=0.08$, fourway ANOVA).



איור 6.4.17: ממוצע (\pm SD) מוליכות חשמלית בשנת התפעול השלישית בקולחים הנכנסים למערכת אגנים ירוקים בשפד"ן (אדום) ובקולחים היוצאים מהבריכות. בכל טיפול העמודה השמאלית מייצגת מפלס ראשון (בריכות בזרימה תת קרקעית אנכית); עמודה אמצעית מייצגת מפלס שני (בריכות בזרימה תת קרקעית אופקית - קווים אופקיים ואנכית); עמודה ימנית מייצגת מפלס שלישי (בריכות בזרימת מים עילית). הצבעים ירוק, אפור וצהוב מייצגים את הרכב הצומח בבריכות בזרימה תת קרקעית: מגוון צומח (טיפול 1, 2 ו 7), ללא צומח (טיפול 3 ו 4) וצמחיה עשבונית (טיפול 5 ו 6), בהתאמה. ($n=6$)

הגבה (pH)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ערך הגבה דומה בקולחים הנכנסים לבריכות ($p=0.33$, t-test ; 7.3 ± 0.2 ו 7.5 ± 0.3 , בהתאמה). בשנת התפעול הראשונה ערך ההגבה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס הראשון עם וללא צמחים היה דומה לזה של הקולחים הנכנסים ($p=0.07$, Dunnett). בשנת התפעול השלישית היה ערך הגבה בקולחים הנכנסים דומה לזה של הקולחים היוצאים מבריכות ללא צמחיה בלבד ($p=0.52$, Dunnett). בקולחים היוצאים מבריכות עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים היה ערך ההגבה נמוך בכ- 0.4 יחידות pH מהקולחים הנכנסים אליהם ($p=0.01$ ו $p=0.04$, Dunnett, בהתאמה).

מפלס שני: בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני היה ערך ההגבה דומה לזה שבקולחים הנכנסים אליהם ($p=0.68$, threeway ANOVA). ערך ההגבה בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השני עם צמחים היה נמוך בהשוואה לבריכות ללא צמחים ($p=0.002$, Tukey). ההפרש הממוצע בערך הגבה בין בריכות עם וללא צמחים קטן מ 0.2 יחידות pH. ערך הגבה בקולחים היוצאים בריכות בהן דפוסי זרימה שונים (אופקי או אנכי), היה דומה ($p=0.72$, threeway ANOVA). מפלס שלישי: בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי ערך הגבה היה נמוך בכ 0.28 יחידות pH מאשר בקולחים הנכנסים אליהם ($p<0.001$, fourway ANOVA).

חמצן מומס (D.O.)

מפלס ראשון: בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה ערך דומה של רוויה בחמצן בקולחים הנכנסים לבריכות ($P=0.99$, t-test ; $36.9\% \pm 14.3$ ו $36.6\% \pm 13.7$, בהתאמה). בשנת התפעול הראשונה הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות ללא צמחיה, עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים הייתה דומה לזו שבקולחים הנכנסים ($p>0.22$, oneway ANOVA ; $32\% \pm 16$, $34\% \pm 16$ ו $28\% \pm 12$, בהתאמה). בשנת התפעול השלישית הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות ללא צמחיה הייתה דומה לזו שבקולחים הנכנסים ($p=0.08$, Dunnett ; $20\% \pm 12$). הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות עם צמחיה עשבונית ומגוון צמחים הייתה נמוכה מזו שבקולחים הנכנסים ($17\% \pm 10$ ו $17\% \pm 14$, בהתאמה ; $p<0.01$ ו $p<0.02$, Dunnett). בשני מצבי ההבדלה הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות עם ובלי צמחים הייתה דומה ($p=0.45$, twoway ANOVA).

מפלס שני: בשנת התפעול הראשונה והשלישית הייתה הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים בריכות עם מגוון צמחים גבוהה מאשר בבריכות ללא צמחים (הפרש של 4.1% ו 9.3% , בהתאמה ; Tukey, $p=0.04$). בשתי התקופות היה אחוז רוויה נמוך יותר של חמצן בקולחים היוצאים מבריכות בדפוס זרימה תת קרקעית אופקית מאשר באנכית ($p=0.01$, threeway ANOVA). ההבדל ברוויה בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות בזרימה אופקית ואנכית בשנת התפעול הראשונה והשלישית היה כ 6.4%

2.4%, בהתאמה. בשנת התפעול הראשונה הייתה הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מהבריכות נמוכה מזו שבשנה השלישית ($p < 0.01$, threeway ANOVA; בין 10%-16% ובין 17%-27%, בהתאמה).
מפלס שלישי: בשנת התפעול הראשונה טווח הרוויה הממוצעת בחמצן בקולחים היוצאים מבריכות המפלס השלישי נעה בין 5 ל 13%. בשנת התפעול השלישית הייתה הרוויה בחמצן בקולחים היוצאים מהבריכות גבוהה יותר (בין 14 ל 21%).

Abstract

This study examines the feasibility of using constructed wetland technology in order to upgrade relatively high quality secondary municipal effluents. In addition to removal of conventional water pollutants the study focuses on the attention of estrogenic hormone contaminants.

Conventional (biological) treatment of municipal sewage results in a secondary effluent containing contaminants such as organic matter (BOD), suspended solids (TSS) and nutrients (N and P). The levels of these contaminants are usually in the range of milligrams per liter. In addition, the effluent contains micro amounts (nanograms up to a few micrograms per liter) of organic compounds such as estrogens, pharmaceuticals and personal care products. Discharge of effluents into streams as well as their use in irrigation introduces the conventional and micro-pollutants into the environment, posing a threat to the wellbeing of wildlife and to human health.

Constructed wetland (CW) is an extensive wastewater treatment technology in which polluted water is treated in shallow ponds lined with a porous substrate and planted with water vegetation (macrophytes). As the wastewater flows through the ponds, the pollutants interact with the substrate, the vegetation and the associated microbial communities (biofilm) in multiple processes (e.g. volatilization, filtration, sedimentation, adsorption, biotic and abiotic transformation and biological degradation). As a result the contaminants are attenuated and the effluent is upgraded.

CWs are divided into surface (SF) and subsurface (SSF) flow systems in which water flows either above or through the substrate, respectively. In the latter, the effluent can flow through the system vertically (VSSF) or horizontally (HSSF), maintaining mostly aerobic or anaerobic conditions, respectively. Different microbial assemblages and thus diverse physiological capabilities develop accordingly. The wastewater can be treated in a hybrid CW system integrating different structures and flow patterns.

In order to conduct the study a complex of 21 CW ponds (ca. 30 m² each) representing different structure and flow patterns was built in the Dan metropolitan region wastewater treatment plant (Shafdan WWTP). The experimental system was financed by the Ministry of Environment and Territory of Italy, under the auspices of the Porter School of Environmental Studies, Tel-Aviv University. I compared conventional and estrogenic

compounds attenuation in seven series of three consecutive ponds with different structure, flow pattern and vegetation composition. After three years of operation the "mature" ponds were dominated by either Papyrus sedge (*Cyperus papyrus*) or Bermuda grass (*Cynodon dactylon*). Two series of ponds had no vegetation and served as a control. I found that a hybrid wetland system of two consecutive subsurface ponds is capable of upgrading a relatively high quality secondary effluent removing 66% BOD (mean inflow concentration 6.1 mg/l); 77% TSS (mean inflow concentration 5.2 mg/l); and 98% ammonia-nitrogen (mean inflow concentration 2.2 mg/l). Treatment in two subsurface flow ponds followed by a surface flow pond removed 52% total nitrogen (inflow concentration 4.8 mg/l). Nitrate concentration increased in the aerobic stage of the system (VSSF ponds) and decreased in the anaerobic treatment of the SF ponds, resulting in no overall significant change in concentration. In the mature wetland ponds reactive phosphate remained unchanged.

In addition to structure and flow pattern the study showed that the removal efficiency of conventional contaminants is influenced by maturation stage (duration of operation), effluent quality and vegetation composition. For example, in VSSF ponds maturation improves removal efficiency of both BOD and ammonia. Effluent quality seems to negatively affect removal of nitrate in HSSF ponds, possibly due to limitation of denitrification by organic carbon deficiency. The presence of vegetation has little or no effect on the removal efficiency of conventional pollutants in subsurface systems. In contrast, in SF ponds substantial development of vegetation reduces removal efficiency of BOD, TSS and ammonia and improves removal efficiency of nitrate.

Concentrations of pollutants entering and exiting the CW were compared to the Israeli guidelines for effluent discharge into streams or for irrigation ("Inbar's Criteria for Rivers and Irrigation"; hereafter "Inbar guideline"). The Shafdan's WWTP secondary effluent exceeded the Inbar guideline for streams with respect to ammonia and was compatible with the guideline after the CW treatment. Average BOD and TSS concentration of the secondary effluent was compatible with the Inbar guidelines for stream and for irrigation, but maximum values exceeded the guidelines. Water quality fluctuations were reduced by the CW treatment and effluent quality remained within the guidelines. Based on the above results it appears that CW treatment is capable of polishing high quality effluent

according to the Inbar guideline; however, it fails with respect to the requirement of phosphorous removal for stream discharge.

The main contribution of this study lies in providing information on the ability of CWs to eliminate estrogenic micro-pollutants and on the mechanisms involved. This was achieved by controlled laboratory experiments as well as field measurements. Estrogens are natural or synthetic molecules. Natural estrogens such as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and estriol (E3) are synthesized by vertebrates. Synthetic estrogens such as 17 α -ethinylestradiol (EE2) and mestranol (MeEE2) are used as pharmaceuticals (e.g., contraceptives). Estrogens excreted by humans enter sewage treatment plants with wastewater. These estrogens are removed to a high degree by conventional wastewater treatments; however, the residual concentration still threatens the integrity of stream ecosystems. Exposure of biota to environmental estrogens interferes with their naturally-regulated endocrine functions, resulting among others in feminization of male fish.

For identification and quantification of environmental concentration of estrogenic compounds in municipal effluent I modified an existing methodology of HPLC-MS/MS. The analysis included concentration and clean-up of estrogen by Solid Phase Extraction. Laboratory experiments were conducted in order to shed light on estrogen removal mechanisms in constructed wetlands. They involved the examination of estrogen (E1, E2, E3 and EE2) fate in the presence and absence of wetland biofilm, under aerobic and hypoxic conditions, in a medium of enriched water and secondary effluent. The results indicate that in the absence of biofilm, estrogens are persistent (residual concentration \geq 90%). Under aerobic conditions and presence of wetland biofilm the concentration of estrogens is reduced significantly. For example, a first-order degradation rate constant (k) of the natural estrogens (E2, E1 and E3) in secondary effluent was 0.014hr⁻¹, 0.003hr⁻¹ and 0.003hr⁻¹, respectively and that of the synthetic estrogen EE2 was 0.0007hr⁻¹. Under the above conditions the degradation rate of estrogens in secondary effluent was similar to that measured in a nutrient-enriched medium. Under hypoxic conditions the degradation rates were lower (e.g. K of E2 was 0.001 hr⁻¹, an order of magnitude lower than aerobic conditions). Biotransformation was recognized as the main removal mechanism. The present study is the one to identify (by ¹H NMR and MS/MS) 17-ketoestradiol as a biotransformation metabolite of the natural estrogen E3.

Average concentrations of 10.6 ± 8.4 and 24.2 ± 14.5 ng/l of E2 and E1 respectively, were detected in the Shafdan's secondary effluent. A single VSSF treatment (aerobic conditions) reduced E2 and E1 concentration by at least 60% and 81%, respectively. Presence and nature of the vegetation in the VSSF ponds had no effect on estrogen removal efficiency. Additional treatment by HSSF and SF failed to further reduce estrogen concentration in the effluent.

A positive correlation was observed between total estrogen concentration and the concentration of BOD and ammonia in the wetland system suggesting similar and/or related removal mechanisms (e.g., aerobic biodegradation and co-metabolism, respectively).

Both laboratory and field studies indicate that in wetlands estrogens are attenuated from the effluent in the presence of 6 orders of magnitude higher concentrations of degradable organic matter (BOD). Biological degradation is the main mechanism of removal of natural estrogens from municipal effluent. The contribution of sorption to attenuation of estrogen in VSSF wetlands is marginal. The microorganisms that biotransform and degrade estrogens are natural components of the wetland biofilm. Biotransformation of estrogen in wetlands occurs mainly under aerobic conditions. These findings indicate that among wetland types, highest removal efficiency may be expected in VSSF wetlands. The short hydraulic residence time (hours) characteristic of vertical flow wetlands suggests that they can perform successfully in relatively small pond units. This makes these wetlands an attractive technology for polishing wastewater effluent.

In summary, the present study indicates that hybrid constructed wetlands are capable of efficiently removing conventional wastewater pollutants (e.g. BOD, TSS and nitrogenous compounds) as well as micro-pollutant such as estrogens. This can be achieved even for high-quality secondary municipal effluent. The constructed wetland is not capable of efficiently removing phosphate. In case that low phosphate standard should be met it removal can be improved by coupling to adjacent technology (e.g electroflocculation). The finding supports the approach of using constructed wetland technology as stand alone or coupled with other technologies for upgrading secondary effluent prior to reuse.

This work was carried out under the supervision of

Prof. Avital Gasith, Zoology department, Faculty of Life Sciences, Tel-Aviv University

Dr. Dror Avisar, Faculty of Humanities

Tel Aviv University
The George S. Wise Faculty of Life Sciences

Removal of estrogens and conventional water contaminants from municipal
secondary effluent by constructed wetlands for water reuse

THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE “DOCTOR OF PHILOSOPHY”

by

Dana Milstein

SUBMITTED TO THE SENATE OF TEL AVIV UNIVERSITY
(March, 2010)