ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάλυση, προσρόφηση και βιοαποδόμηση επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών σε ενεργό ιλύ.

ΜΑΖΙΩΤΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΑΝΝΑ

ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΨΥΛΛΑΚΗ

ΞΕΚΟΥΚΟΥΛΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΧΑΝΙΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2011

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Ευάγγελο Διαμαντόπουλο, για την ανάθεση της μεταπτυχιακής διατριβής και για την καθοδήγησή του κατά την διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Επιπλέον για το πραγματικό ενδιαφέρον που έδειξε και την συμβουλευτική υποστήριξη που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του εργαστηρίου κα. Ελισάβετ Κουκουράκη για την πολύτιμη βοήθεια και την υποστήριξη της. Επιπλέον, για την άρτια εκπαίδευση που μου παρείχε πάνω στον χειρισμό του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Βακόνδιο για την βοήθεια του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και την άψογη συνεργασία. Επίσης για την βοήθεια κατά τη συλλογή των δειγμάτων από τις διάφορες μονάδες επεξεργασίας λυμάτων.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κα. Ελευθερία Ψυλλάκη και Νικόλα Ξεκουκουλωτάκη για την μελέτη και αξιολόγηση της δουλειάς μου.

Τέλος, τους γονείς μου, οι οποίοι με στήριξαν καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησης μου και μου έδειξαν την εμπιστοσύνη τους.

Χανιά, Δεκέμβριος 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού ενδοκρινικών διαταρακτών στην ιλύ. Οι ουσίες που μελετήθηκαν είναι το triclosan καθώς και δυο μεταβολίτες του, οι 2,4dichloro-phenol και 2,3,4 trichlorophenol. Επίσης, εξετάστηκαν και οι ορμόνες estrone και 17-α-ethinylestradiol. Η μέθοδος στηρίζεται στην υπερηχητική εκχύλιση των ουσιών από την ιλύ με χρήση κατάλληλου διαλύτη. Στη συνέχεια με κατάλληλη μείωση του όγκου το εκχύλισμα αναλύεται με SPME (Solid Phase MicroExtraction). Η μέτρηση των ουσιών γίνεται με αέριο χρωματογράφο ο οποίος διαθέτει ανιχνευτή μάζας (GC/MS). Η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε στο πλέγμα της ιλύος. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμαινόταν από 2.8-6.2 ng/g ξηρής βιομάζας. Η μέθοδος είχε πολύ καλή επαναληψιμότητα καθώς το RSD% κυμαινόταν από 6.8-11.8%.

Με χρήση της μεθόδου αναλύθηκαν δείγματα ιλύος από διαφορετικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων ανά την Κρήτη. Στο σύνολο των δειγμάτων όλες οι ουσίες ανιχνεύτηκαν. Το triclosan ήταν η ουσία που ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, της τάξης του ενός μg/g. Οι υπόλοιπες ουσίες ανιχνεύτηκαν στην τάξη των μερικών, έως και μερικών δεκάδων ng/g. Μετρήσεις έγιναν επίσης και στην εισροή των μονάδων επεξεργασίας, όπου σε ελάχιστες περιπτώσεις οι ουσίες ανιχνεύτηκαν.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένα μεγάλο κομμάτι της ακαδημαϊκής έρευνας έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην μελέτη των επιδράσεων ,τόσο στην υγεία όσο και στο περιβάλλον, διάφορων χημικών ουσιών και ορμονών που εισέρχονται στο περιβάλλον. Τέτοιες ουσίες εμφανίζονται στα λύματα μέσω της χρήση προϊόντων καθαρισμού, καλλυντικών, φαρμάκων κ.α. Οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι σταθερές ενώσεις που φτάνουν αναλλοίωτες στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και συχνά ανιχνεύονται και στην έξοδό τους. Αν και σε μικρές συγκεντρώσεις οι ρύποι αυτοί είναι ικανοί να προκαλέσουν διαταραχές σε διάφορους οργανισμούς.

Εκτός από τις επιδράσεις στην υγεία, είναι βασικό να ερευνηθεί η συμπεριφορά των ουσιών στο περιβάλλον ώστε να υπάρχει σφαιρική προσέγγιση και αντιμετώπιση του προβλήματος. Όσον αφορά την τύχη των ουσιών κατά την επεξεργασία των λυμάτων, εύκολα διαπιστώνεται με την μέτρηση της υγρής φάσης στην εισροή και την εκροή πως οι συγκεντρώσεις των περισσοτέρων ουσιών μειώνονται αισθητά. Ένα όμως περίπλοκο θέμα είναι ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η μείωση.

Έχει διαπιστωθεί ότι η απομάκρυνση διεξάγεται σε δυο στάδια: αρχικά η ουσία προσροφάται στα συσσωματώματα της ενεργού ιλύος και στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί τη διασπούν. Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε το βαθμό απόδοσης κάθε σταδίου, ώστε να μπορέσουμε στη συνέχεια να διαχειριστούμε ορθά την ιλύ που απομακρύνεται από το σύστημα. Επιπλέον, περαιτέρω έρευνα μπορεί να βελτιστοποιήσει τις συνθήκες προσρόφησης και τη δράση του μεταβολισμού των μικροοργανισμών επιτυγχάνοντας μικρότερες ή μηδενικές συγκεντρώσεις στην εκροή.

Ένα βασικό εργαλείο για την ανίχνευση και μελέτη τέτοιων ουσιών είναι οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ποσοτικοποίηση τους. Οι δυσκολίες που παρουσιάζουν η ανάπτυξη και η χρήση τέτοιων μεθόδων ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό στην έλλειψη γνώσεων για την τύχη των ουσιών στην ενεργό ιλύ.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος για την μέτρηση ουσιών στην ενεργό ιλύ. Με βάση τη μέθοδο αυτή μελετήθηκε η συμπεριφορά κάποιων ουσιών σε βιολογικούς καθαρισμούς της Κρήτης. Μετρήθηκαν δείγματα από διαφορετικές φάσεις επεξεργασίας σε κάθε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Ενδοκρινικοί διαταράκτες

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι ένα θέμα που έχει απασχολήσει σοβαρά τους επιστήμονες ανά τον κόσμο τις τελευταίες δυο δεκαετίες. Αναφορές στους κινδύνους που ενέχεται να κρύβουν κάποιες χημικές ουσίες υπήρξαν ήδη από την δεκαετία του ‘60, χωρίς όμως να προσελκύσουν έντονα το ερευνητικό ενδιαφέρον, με εξαίρεση κάποια παρασιτοκτόνα όπως το DDT. Ειδικά την τελευταία πενταετία διενεργήθηκε μεγάλος αριθμός ερευνών για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες, με αποτέλεσμα να λυθούν πολλές απορίες γύρω από το θέμα και να δημιουργηθεί μια σαφέστερη εικόνα του προβλήματος.

Το 1996 ήταν μια χρονιά που μεγάλοι διοικητικοί οργανισμοί άρχισαν να εξετάζουν το πρόβλημα των ενδοκρινικών διαταρακτών, οργανώνοντας σχέδια δράσης και ορίζοντας λεπτομερέστερα τις ιδιότητες που καθορίζουν μια ουσία ως ενδοκρινικό διαταράκτη. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission, 1996) ενδοκρινικός διαταράκτης ορίζεται *«μια εξωγενής ουσία ή ένα μίγμα που μεταβάλει τις λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος, με αποτέλεσμα να προκληθούν δυσμενείς επιπτώσεις σε έναν υγιή οργανισμό ή στους απογόνους του».* [1] Σύμφωνα με την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α (EPA, 1996) ως ενδοκρινικός διαταράκτης ορίζεται *«ένας εξωγενής παράγοντας που παρεμβαίνει με την σύνθεση, απέκκριση, μεταφορά, πρόσδεση, κίνηση ή εξάλειψη φυσικών ορμονών στο σώμα που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης, αναπαραγωγής, ανάπτυξης και συμπεριφοράς».* Ο ορισμός της EPA, αν και λεπτομερέστερος, αντικαταστάθηκε την επόμενη χρονιά από έναν γενικότερο, όμοιο σχεδόν με τον ορισμό που εξέδωσε η Ευρωπαϊκή Επιτροπή. [2]

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες χωρίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: Η πρώτη περιλαμβάνει τις στεροειδείς ουσίες που χρησιμοποιούνται κυρίως σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα φυσικά οιστρογόνα, τα χημικά οιστρογόνα, τα φυτο-οιστρογόνα και ένα πλήθος χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε αντιβιοτικά, αναλγητικά, αντιφλεγμονώδη και άλλα σκευάσματα . Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει προϊόντα περιποίησης, όπως καθαριστικά, αρώματα και συντηρητικά. Η τρίτη περιλαμβάνει χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως παρασιτοκτόνα, και η τελευταία διάφορα βιομηχανικά χημικά παραπροϊόντα. [3] [4]

Οι πιθανοί ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι πολλοί. Λόγω της δυσκολίας να προσδιοριστούν μεμονωμένα οι επιδράσεις μιας ουσίας στην υγεία, ειδικά όταν πρόκειται για μικρές συγκεντρώσεις, πολλές είναι οι ουσίες που χαρακτηρίζονται ενδοκρινικοί διαταράκτες, χωρίς όμως να είμαστε απόλυτα βέβαιοι για την επικινδυνότητα τους. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία φαίνεται να προκύπτει όταν οι ουσίες εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και καταναλώνονται, καθώς συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των οργανισμών. Έρευνες και μακροχρόνιες παρατηρήσεις δείχνουν πως οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να προκαλέσουν σε ένα βαθμό τα ακόλουθα.

- Μείωση του σπέρματος
- Δυσμορφίες που εμφανίζονται εκ γενετής σε παιδιά
- Καρκίνος, κυρίως του στήθους και της μήτρας στης γυναίκες και του προστάτη στους άντρες
- Καθυστερημένη νευρολογική και σεξουαλική ανάπτυξη σε παιδιά και εφήβους
- Παχυσαρκία

Οι παραπάνω περιπτώσεις εξετάζονται κυρίως σε επιβαρυμένα αστικά περιβάλλοντα, συνεπώς είναι δύσκολη η απόλυτη συσχέτιση των παθήσεων με συγκεκριμένες χημικές ουσίες. Το γεγονός αυτό διχάζει την επιστημονική κοινότητα καθώς υπάρχουν πολλές αντικρουόμενες έρευνες που δυσκολεύουν τη διαδικασία εκτίμησης του κινδύνου. [5][6]

Εξαιτίας της έλλειψης γνώσεων όσον αφορά στις επιπτώσεις κάποιων ουσιών, δεν υπάρχει νομοθετικό πλαίσιο που να προβλέπει κάποια σαφή όρια στην διαχείριση τους. Για λίγες ουσίες έχουν θεσπιστεί κάποια όρια όσον αφορά στη χρήση τους, ενώ υπάρχουν κάποιες που έχουν απαγορευτεί πλήρως. [3]

Οι περισσότεροι ενδοκρινικοί δαταράκτες διοχετεύονται στο περιβάλλον μέσω των λυμάτων (αστικά, βιομηχανικά) καθώς και μέσω των στερεών αποβλήτων, όταν αυτά δεν ανακυκλώνονται. Σημαντική είναι η επιβάρυνση που προκύπτει από τα επεξεργασμένα αστικά λύματα, καθώς ποσότητες των ουσιών αυτών ανιχνεύονται στην υγρή φάση αλλά και στην στερεή (ιζήματα). Όσον αφορά στα βιομηχανικά απόβλητα, η επιβάρυνση μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερη, ανάλογα με τα υλικά και τις ουσίες που επεξεργάζονται. Άλλη μια πηγή εισροής ουσιών στο περιβάλλον, κυρίως ορμονών, είναι τα απόβλητα από μονάδες εκτροφής ζώων. Στις περισσότερες μονάδες χορηγούνται στα ζώα ορμόνες για την αύξηση της παραγωγής κρέατος και ζωικών προϊόντων, με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες να βρίσκονται και στα λύματα. Ποσότητες ανιχνεύονται συχνά και στην ιλύ, γεγονός που δυσκολεύει ακόμα περισσότερο τη διαχείριση και διάθεσή της. Στην περίπτωση των στερεών αστικών αποβλήτων το πρόβλημα συνήθως λύνεται με τη σωστή διαχείριση και διάθεση τους, χωρίς να υπάρχουν σοβαρές, ανεξέλεγκτες συνέπειες. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες στην περίπτωση που γίνεται σωστή διάθεση σε ΧΥΤΑ υπάρχουν στο περιβάλλον, αλλά παραμένουν στατικοί, χωρίς να αλληλεπιδρούν με στοιχεία του περιβάλλοντος. Μικρή είναι η συνεισφορά μέσω του αέρα και οφείλετε κυρίως σε βιομηχανικές δραστηριότητες.

2.2. Ουσίες που μελετήθηκαν

Οι ουσίες που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία είναι το triclosan(TCS) καθώς και δυο μεταβολίτες του, η 2,4dichloro-phenol και η 2,3,4 trichlorophenol. Επίσης, εξετάστηκαν και οι ορμόνες estrone (E1) και 17-α-ethinylestradiol (EE2).

Το triclosan ή αλλιώς 5-χλωρο-2(2,4-διχλωρο-φαινοξυ)-φαινόλη, χρησιμοποιείται ευρέως από την δεκαετία του ’70 ως συστατικό ειδών απολύμανσης και καθαρισμού.

Σήμερα υπάρχει σε πολλά σαπούνια, απορρυπαντικά, οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα, αποσμητικά, ακόμα και σε είδη ένδυσης και παιδικά παιχνίδια. Το 2010 η ουσία κρίθηκε ακατάλληλη και αποσύρθηκε από τη λίστα που περιέχει τα προσθετικά πλαστικών που μπορούν να χρησιμοποιούνται για προϊόντα που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (απόφαση της επιτροπής 2010/169/EU). [7] Σε περίπτωση φωτοαποδόμησης του triclosan ένα παράγωγο που σχηματίζεται είναι η 2,4dichloro-phenol, ενώ είναι πολύ πιθανό να σχηματίζεται και η 2,3,4 trichlorophenol. [8] [9]

Όσον αφορά στις ορμόνες, η estrone είναι ένα φυσικό οιστρογόνο που δημιουργείται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε θηλυκούς οργανισμούς. [10] Η 17-α-ethinylestradiol είναι μια τεχνητή ορμόνη που χρησιμοποιείται στα αντισυλληπτικά χάπια. Ανιχνεύεται στην ιλύ σε μικρότερες συγκεντρώσεις απ’ ό,τι η Ε1. [11]

2.3. Συμπεριφορά ενδοκρινικών διαταρακτών σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Η επιβάρυνση των υδατικών επιφανειών με ενδοκρινικούς διαταράκτες γίνεται κυρίως μέσω σημειακών πηγών, όπως η διάθεση των ανθρωπογενών αστικών λυμάτων. [12] Μέσω των ανθρώπινων εκκρίσεων αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες φυσικών ορμονών, αλλά και μεγάλες ποσότητες ουσιών που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά σκευάσματα, καθώς το ποσοστό που συνήθως απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι μικρό. Πολλές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές περιέχονται σε καθαριστικά και απολυμαντικά και εισέρχονται συχνά σε μεγάλες ποσότητες στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Δεν είναι τυχαίες οι παρατηρήσεις που έγιναν στην αρχή της δεκαετίας του ‘90 που περιλάμβαναν οργανισμούς, με διαταραγμένα φυλετικά χαρακτηριστικά κοντά σε εκροές μεγάλων μονάδων επεξεργασίας αστικών λυμάτων. [13]

Ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης ενδοκρινικών διαταρακτών σε μια μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων λαμβάνει χώρα στο στάδιο επεξεργασίας των αποβλήτων με ενεργό ιλύ. Οι αρχικές συγκεντρώσεις μειώνονται μέσω της προσρόφησης των ουσιών στην βιομάζα και στη συνέχεια μέσω της αποδόμησης από τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα υπό αερόβιες συνθήκες να χρησιμοποιήσουν στεροειδή ως εναλλακτική πηγή άνθρακα. Η απόδοση στην απομάκρυνση τέτοιων μικρορρύπων ποικίλει σε κάθε μονάδα επεξεργασίας. Η απόδοση της απομάκρυνσης επηρεάζεται άμεσα από παραμέτρους λειτουργίας της μονάδας, όπως είναι η θερμοκρασία, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής, η ηλικία και η σύσταση της ιλύος. Αύξηση του υδραυλικού χρόνου παραμονής και της ηλικίας της ιλύος σε συνδυασμό με τη μείωση του συντελεστή τροφής/μικροοργανισμών (F/M) μπορεί να αυξήσουν την απομάκρυνση μικρορρύπων σε μια συμβατική μονάδα. [3] [14]

Σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την απομάκρυνση κάποιων ουσιών είναι η σύσταση της ιλύος όσον αφορά στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών. Κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν αυξημένη δυνατότητα διάσπασης των ουσιών που εξετάζουμε. [15] Ειδικά για το θέμα των ορμονών, κάποια ετεροτροφικά βακτήρια όπως τα *Rhodococcus* *erythropolis* και *Mycobacterium fortuitum* έχουν απομονωθεί από την ενεργό ιλύ και έχουν την ικανότητα να αποδομούν με γρήγορους ρυθμούς φυσικά και συνθετικά στεροειδή (Ε1, Ε2, Ε3 και ΕΕ2). [16] Πρόσφατα, απομονώθηκε το *Sphingobacterium sp.* JCR5 από την ενεργό ιλύ και αποδείχθηκε ότι αποδομεί την ΕΕ2. [17] Άλλο ένα παράδειγμα μικροοργανισμών είναι οι *Achromobacter xylosoxidans* και *Ralstonia Picketii* οι οποίοι χρησιμοποιούν τις Ε1 και Ε2 για να αναπτυχθούν. [18]

Στον πίνακα 2.1 παρατίθενται παρατηρήσεις από έρευνες για την απομάκρυνση των ουσιών που μελετήθηκαν. Σε όλες τις περιπτώσεις η επεξεργασία των αποβλήτων γίνεται με ενεργό ιλύ. Παρατηρούμε ότι για όλες τις ουσίες η απομάκρυνση είναι αρκετά μεγάλη. Κρίσιμης όμως σημασίας είναι η συγκέντρωση των ουσιών στην εισροή, καθώς ακόμα και μεγάλο ποσοστό απομάκρυνσης δεν διασφαλίζει ότι η συγκέντρωση στην εκροή θα είναι αμελητέα.

Πίνακας 2.1: Απομάκρυνση ουσιών που μελετήθηκαν σε βιολογικούς καθαρισμούς με τη διεργασία της ενεργού ιλύος.

Ουσία	**Περιοχή**	**Μονάδα επεξεργασίας**	**Απομάκρυνση**	**Βιβλιογραφία**
TCS	Greece	διάφορες μονάδες	91%	[19]
	Georgia, USA	αστικά λύματα	96%	[20]
	Ulsan, Korea	αστικά λύματα	79.6%	[21]
E1	Rome, Italy	αστικά λύματα	61%	[22]
	Ohio, USA	πιλοτική μονάδα	60%	[23]
	Wiesbaden, Germany	αστικά λύματα	98%	[24]
	Ulsan, Korea	αστικά λύματα	87.1%	[21]
E2	Rome, Italy	αστικά λύματα	86%	[22]
	Ohio, USA	πιλοτική μονάδα	94%	[23]
	Wiesbaden, Germany	αστικά λύματα	98%	[24]
	Ulsan, Korea	αστικά λύματα	100%	[21]
EE2	Rome, Italy	αστικα λύματα	85%	[22]
	Ohio, USA	πιλοτική μονάδα	65%	[23]
	Wiesbaden, Germany	αστικά λύματα	90%	[24]

Είναι πολύ σημαντικό η συμπεριφορά των ενδοκρινικών διαταρακτών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων να μελετηθεί εκτενέστερα. Η προσθήκη νέων σταδίων επεξεργασίας πριν την τελική διάθεση των αποβλήτων μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά ασύμφορη επένδυση. Η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού απομάκρυνσης μπορεί να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση της απόδοσης των μονάδων με μικρές αλλαγές που μπορούν εύκολα να επιτευχθούν σε κάθε μονάδα. [25]

2.4. Υπάρχουσες έρευνες και αναφορές

Οι έρευνες που επικεντρώνονται στην παρουσία και την ποσοτικοποίηση ενδοκρινικών διαταρακτών στην ιλύ είναι λίγες. Η μέτρηση των ουσιών στην κλίμακα ng/g σε ένα περίπλοκο πλέγμα, όπως είναι το πλέγμα της ιλύος, καθιστούν τις αναλυτικές μεθόδους δύσχρηστες και χρονοβόρες. [26] Αν και οι περισσότερες έρευνες τείνουν να συμφωνούν μεταξύ τους όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των διαταρακτών που ανιχνεύονται στην ιλύ δεν εκλείπουν αναφορές για αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. [14] [27] Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται μετρήσεις από 8 έρευνες που μας δίνουν στοιχεία για τις συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν στην ιλύ.

Πίνακας 2.2: Συγκεντρώσεις ουσιών στην ιλύ όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

ng (ουσίας)/g (ξηρής βιομάζας)					
TCS	πηγή	E1	E2	EE2	πηγή
2480-7790	[28]	2-37	5-49	2-17	[31]
272-2640	[29]	7	1.7	3	[24]
4400	[30]	12-14	< 1	< 1	[32]
		2-8	1-10	1-18	[33]
		60-120			[34]

Στις περισσότερες έρευνες οι ουσίες εμβολιάζονται σε ξηρή (freeze-dried) ιλύ και πολύ συχνά αναλύονται σχεδόν αμέσως μετά τον εμβολιασμό . [35][36][37][38] Η τεχνική όμως αυτή δεν εξασφαλίζει ότι οι δεσμοί που θα αναπτυχθούν μεταξύ του πλέγματος της ιλύος και των ουσιών θα είναι οι ίδιοι που πραγματοποιούνται στο φυσικό περιβάλλον της ενεργού ιλύος. Επιπλέον, ο μηχανισμός της προσρόφησης χρειάζεται κάποιο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί. Η απευθείας ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων δεν εγγυάται ότι η προσρόφηση έχει πραγματοποιηθεί. Συνεπώς είναι πολύ πιθανόν η ανάκτηση που υπολογίζεται στις παραπάνω περιπτώσεις να είναι μεγαλύτερη από την πραγματική, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται να είναι στην πραγματικότητα μεγαλύτερες από αυτές που αναφέρονται στις έρευνες. [39]

Κάποια προβλήματα που έχουν παρατηρηθεί όσον αφορά στην ακρίβεια των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην ποσοτικοποίηση ενδοκρινικών διαταρακτών στο περιβάλλον (υγρά και στερεά δείγματα) συνοψίζονται παρακάτω.

- Οι περισσότερες έρευνες εξετάζουν την γραμμικότητα με standard διαλύματα.
- Τα όρια ανίχνευσης συνήθως εντοπίζονται σε απιονισμένο νερό και πιο σπάνια στο πραγματικό πλέγμα που γίνεται η ανάλυση.
- Οι ανακτήσεις υπολογίζονται όχι πάντα στο πραγματικό πλέγμα που γίνεται η ανάλυση και πολύ συχνά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. [40]

Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα εργασία, εξετάστηκαν πολύ προσεκτικά δυο βασικές παράμετροι: Καταρχάς ο τρόπος με τον οποίο έγινε ο εμβολιασμός της ιλύος, ώστε οι συνθήκες να είναι όμοιες με τις πραγματικές συνθήκες προσρόφησης των ουσιών στην ιλύ σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων. Κατά δεύτερον, η καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου, η οποία δημιουργήθηκε στο πραγματικό πλέγμα που απαντώνται οι ουσίες, με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται να διερευνηθεί το θέμα της ανάκτησης. Η γραμμικότητα της μεθόδου συνολικά (συμπεριλαμβανομένου της εκχύλισης και της χρωματογραφικής ανάλυσης) εξετάστηκε στο πλέγμα της ιλύος, εμβολιάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίστηκαν κάποιες συνθήκες οι οποίες επηρεάζουν άμεσα την αξιοπιστία της μεθόδου.

2.5. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης, SPME (Solid Phase MicroExtraction)

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της SPME για την απομόνωση των ουσιών από τα δείγματα και την ανάλυσή τους στην συνέχεια στον αέριο χρωματογράφο.

Η SPME είναι μια αρκετά γρήγορη διαδικασία για την ανάλυση μικρορρύπων. Για την απομόνωση των ουσιών χρησιμοποιείται μια ίνα επικαλυμμένη με το κατάλληλο υλικό που περιέχεται σε σύριγγα. Σε μια ειδική διάταξη η ίνα είτε βυθίζεται στο δείγμα είτε εκτίθεται στον υπερκείμενο όγκο του δείγματος, ώστε να προσροφηθούν οι ουσίες που θέλουμε να αναλύσουμε. Στην συνέχεια η ίνα αποσύρεται από το δείγμα και εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου, όπου οι ουσίες εκροφώνται θερμικά και αναλύονται. [41]

2.6. Βασικές αρχές SPME

Η μεταφορά των ουσιών από το δείγμα στο υλικό επικάλυψης ξεκινάει μόλις γίνει η εισαγωγή της ίνας στο δοχείο που περιέχεται το δείγμα. Η εκχύλιση ολοκληρώνεται μόλις επέλθει ισορροπία στην κατανομή των ουσιών στο δείγμα και την ίνα. Πρακτικά σημαίνει πως αφού επέλθει ισορροπία το ποσό που εκχυλίζεται είναι σταθερό, στα όρια του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητο από την αύξηση του χρόνου εκχύλισης.

Η SPME είναι μια μέθοδος ισορροπίας πολλαπλών φάσεων. Θεωρούμε ότι οι φάσεις που αλληλεπιδρούν είναι η επικάλυψη της ίνας, ο όγκος του δείγματος και ο υπερκείμενος όγκος. Η μάζα των προς ανάλυση ουσιών που εκχυλίζεται από μια επικάλυψη με πολυμερικό υλικό σχετίζεται με την όλη ισορροπία της προς ανάλυση ουσίας με τις τρείς φάσεις. Η συνολική μάζα που υπάρχει στο δοχείο είναι σταθερή καθ’όλη τη διάρκεια της εκχύλισης.

Ισχύει:

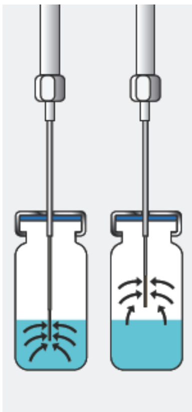
$C_0 V_s = C_f V_f + C_h V_h + C_s V_s$

C_0 : αρχική συγκέντρωση μιας ουσίας στο δείγμα

C_f , C_h , C_s : οι συγκεντρώσεις της ουσίας στην ισορροπία στις τρεις φάσεις αντίστοιχα (επικάλυψη ίνας, υπερκείμενο όγκο και όγκο δείγματος)

V_f , V_h , V_s : όγκος επικάλυψης ίνας, όγκος υπερκείμενου χώρου και όγκος δείγματος αντίστοιχα.

Ανάλογα με τις ιδιότητες της ένωσης που εξετάζεται, η εκχύλιση μπορεί να γίνει με δυο τρόπους: Με απευθείας βύθιση της ίνας στον όγκο του δείγματος (Direct SPME) ή με έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο όγκο (Headspace SPME). Σε κάποιες περιπτώσεις που εξετάζονται πολύπλοκα δείγματα μπορεί να γίνει και χρήση προστατευτικής μεμβράνης.



Σχήμα 2.1: Direct και Headspace SPME

Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι ο τύπος της ίνας, η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης, το PH του δείγματος, η προσθήκη άλατος, ο όγκος της οργανικής φάσης και ο χρόνος εκρόφησης.

Η επιλογή του κατάλληλου τύπου ίνας εξαρτάται από την φύση των ουσιών που θέλουμε να απομονώσουμε από το δείγμα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι επικαλύψεων και σε διαφορετικά πάχη επίστρωσης. Το πάχος της επικάλυψης επηρεάζει τον χρόνο εκχύλισης, συνεπώς είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η λεπτότερη επικάλυψη η οποία δίνει αποδεκτή ευαισθησία.

Η θερμοκρασία επηρεάζει την ευαισθησία και την κινητική της εκχύλισης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται αύξηση στον ρυθμό της εκχύλισης και ταυτόχρονα μείωση του συντελεστή κατανομής. Συνεπώς πρέπει να χρησιμοποιείται η μέγιστη επιτρεπτή θερμοκρασία κατά την εκχύλιση.

Ο χρόνος εκχύλισης είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να έλθει το σύστημα σε ισορροπία. Η ποσότητα της ουσίας που απομονώνεται στη ίνα στον χρόνο εκχύλισης που θα επιλέξουμε τελικά πρέπει να ισοδυναμεί με την ποσότητα που θα είχαμε εάν ο χρόνος εκχύλισης ήταν άπειρος. Η συγκέντρωση του δείγματος δεν επιδρά στον χρόνο που χρειάζεται για να επέλθει ισορροπία. Το πάχος της επικάλυψης και ο συντελεστής κατανομής είναι οι βασικές παράμετροι που καθορίζουν τον χρόνο εκχύλισης.

Η ρύθμιση του PH μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία για όξινες και βασικές ουσίες. Το PH του δείγματος επηρεάζει την ισορροπία διάστασης σε υδατικά μέσα. Για παράδειγμα, μείωση του PH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της ουδέτερης μορφής των όξινων ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα και άρα αύξηση στο ποσοστό τους που εκχυλίζεται. Προσοχή χρειάζεται στην απευθείας SPME, καθώς πολύ υψηλά ή πολύ χαμηλά PH μπορούν να καταστρέψουν την ίνα.

Η προσθήκη άλατος βελτιώνει την εκχύλιση των ουσιών. Με την προσθήκη άλατος σε υδατικά δείγματα αυξάνει η σταθερά κατανομής ίνας/δείγματος των ουδέτερων οργανικών μορίων. Η επίδραση του άλατος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητας της ουσίας με αποτέλεσμα την αύξηση του βαθμού εκχύλισης.

Η παρουσία του οργανικού διαλύτη στο νερό μπορεί να αλλάξει την σταθερά κατανομής και της ιδιότητες του νερού. Για μην γίνει κάτι τέτοιο πρέπει η συγκέντρωση του διαλύτη στο δείγμα να είναι μικρότερη από 1%.

Ο χρόνος εκρόφησης καθορίζεται από τη θερμοκρασία του εισαγωγέα. Η χρήση πολύ υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να μειώσει τη διάρκεια ζωής της ίνας. [41]

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Αντιδραστήρια

2,4-Dichlorophenol, Supelco, CAS No: 120-83-2
2,3,4-Trichlorophenol, Supelco, CAS No: 15950-66-0
Triclosan, Dr.Ehrenstorfer, CAS No: 3380-34-5
Estrone, Dr.Ehrenstorfer, CAS No: 53-16-7
17-beta-Estradiol, Dr.Ehrenstorfer, CAS No: 50-28-2
17-alpha-Ethinylestradiol, Dr.Ehrenstorfer, CAS No: 57-63-6
Sodium Azide, Sigma-Aldrich
Silica gel 60 (0,040-0,063nm) for column chromatography, Merck
Sodium Sulphate, anhydrous(Na_2SO_4), Riedel-deHaen
Methanol, Pestanal, Riedel-deHaen
Acetonitrile, Chromasolv for HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich
Sodium Chloride, Panreac

3.2. Εξοπλισμός

Ultrasonic bath, Julabo USR3
Rotovapor, Heidolph WB 2000, VV2000
Centrifuge, Thermo Scientific CL10
Vortex, Heidolph REAX2000
PH-meter Crison 2002
Magnetic stirring hotplate, Heidolph MR3003 control
Electronic balance, Shimadzu, Libror EAG220
GC-17A, Gas Chromatograph, Shimadzu
GCMS-QP5050A, Gas Chromatograph Mass Spectometer, Shimadzu

3.3. Υλικά – Δείγματα

3.3.1. Ενεργός ιλύς για την ανάπτυξη της μεθόδου

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε ενεργός ιλύς από την μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων Χανίων. Ποσότητες ιλύος συλλέχθηκαν στις 13 Ιουλίου 2011 από την ανακυκλοφορία, για τη βαθμονόμηση της μεθόδου. Οι ουσίες που μελετώνται δεν ανιχνεύτηκαν στην συγκεκριμένη ενεργό ιλύ. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης έγινε εμβολιασμός των ουσιών στην ιλύ. Η μέθοδος αναπτύχθηκε στην ενεργό ιλύ, ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη ανάκτηση και οι τελικές μετρήσεις να είναι ακριβείς και αντιπροσωπευτικές.

3.3.2. Δειγματοληψία

Λήφθηκαν δείγματα από τέσσερεις διαφορετικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων της Κρήτης: Μονάδα Χανίων, μονάδα Βορείου άξονα νομού Χανίων, μονάδα Ρεθύμνου και μονάδα Ηρακλείου. Τα δείγματα συλλέχτηκαν σε πλαστικά μπουκάλια χωρητικότητας 0.75L, στα οποία προστίθονταν κατάλληλη ποσότητα sodium azide, ώστε να ανασταλεί η βιοδιάσπαση των ουσιών. Στην συνέχεια μεταφέρονταν στο εργαστήριο και αναλύονταν την ίδια ημέρα. Από την μονάδα Χανίων συλλέχθηκε ποσότητα ιλύος από τα στάδια της ανακυκλοφορίας και της χώνευσης. Από την μονάδα του Βορείου άξονα συλλέχθηκαν δείγματα από την εισροή και την εκροή της λιποσυλλογής, για την ανάλυση της υγρής φάσης. Επίσης συλλέχθηκε ιλύς από τις τρείς διαφορετικές δεξαμενές του συστήματος. Από την μονάδα του Ρεθύμνου συλλέχθηκαν δείγματα από την εισροή, καθώς και ιλύς από το στάδιο της ανακυκλοφορίας, και τις δυο δεξαμενές χώνευσης.

3.4. Ανάπτυξη της μεθόδου εκχύλισης

3.4.1. Εμβολιασμός ενεργού ιλύος

Για κάθε ουσία που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε ένα αρχικό διάλυμα (stock) συγκέντρωσης 2000mg/L σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Από αυτό και με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάζονταν τα κατάλληλα διαλύματα, όγκου 1ml για τον εμβολιασμό των δειγμάτων. Για την ομογενοποίηση του τελικού διαλύματος γινόταν ανάδευση με vortex για ένα λεπτό. Οι ορμόνες διαλύθηκαν σε ακετονιτρίλιο ενώ οι υπόλοιπες ουσίες σε μεθανόλη. Το διάλυμα των ορμονών παρασκευαζόταν μια μέρα πριν χρησιμοποιηθεί για τον εμβολιασμό καθώς έτσι επιτεύχθηκε η βέλτιστη διάλυση των ουσιών.

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα αφυδατωμένης ιλύος που αντιστοιχούσε σε ένα γραμμάριο ξηρής. Σε γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 40ml μη διαπερατά από την ηλιακή ακτινοβολία προστίθονταν η ιλύς. Μελετήθηκε η επίδραση του sodium azide στους μικροοργανισμούς, με στόχο την εύρεση της βέλτιστης δόσης για την αναστολή της μεταβολικής τους δραστηριότητας. Κάθε δείγμα εμβολιαζόταν με υδατικό διάλυμα όγκου 5ml που περιείχε sodium azide 2% w/v. Ακολουθούσε ανάδευση με vortex για 1min. Στη συνέχεια γινόταν εμβολιασμός με υδατικό διάλυμα όγκου 5ml με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις των ουσιών και ανάδευση με vortex 1min. Μελετήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος παραμονής των δειγμάτων για την προσρόφηση των ουσιών. Τα δοχεία με τα δείγματα φυλάσσονταν σφραγισμένα στο ψυγείο στους 4 ^{o}C για 24h οπότε και η προσρόφηση των ουσιών στην ιλύ είχε ολοκληρωθεί.

3.4.2. Στάδια – Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα βασικά στάδια επεξεργασίας.

3.4.2.1. Πρώτο στάδιο-Διαχωρισμός φάσεων

Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν ώστε η υγρή και η στερεή φάση να διαχωριστούν. Για την ανάλυση της υγρής φάσης, όπου αυτή γινόταν, το υπερκείμενο νερό συλλέγονταν και διηθούνταν. Η στερεή φάση συλλεγόταν για να επεξεργαστεί περαιτέρω.

3.4.2.2. Δεύτερο στάδιο- Εκχύλιση ουσιών από την ιλύ

Η στερεά φάση μεταφερόταν σε γυάλινα δοχεία μη διαπερατά από την ηλιακή ακτινοβολία και προστίθονταν κατάλληλος διαλύτης. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονταν σε λουτρό υπερήχων και οι ουσίες εκχυλίζονταν στον διαλύτη. Έπειτα φυγοκεντρούνταν εκ νέου, ώστε να διαχωριστεί ο διαλύτης με τις επιθυμητές ουσίες από την στερεή φάση .

3.4.2.3. Τρίτο στάδιο- Καθαρισμός εκχυλίσματος

Η υπερκείμενη υγρή φάση συλλεγόταν για να διοχετευθεί σε αυτοσχέδια χρωματογραφική στήλη καθαρισμού. Δοκιμές έγιναν ως προς τις διαστάσεις και το υλικό πλήρωσης της στήλης.

3.4.2.4. Τέταρτο στάδιο- Μείωση όγκου του εκχυλίσματος

Η καθαρισμένη πλέον υγρή φάση μεταφερόταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα ώστε να μειωθεί ο όγκος του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια η εξάτμιση συνεχιζόταν σε ήπιο ρεύμα αζώτου ώστε ο όγκος να μειωθεί ακόμα περισσότερο, μέχρι τα 50μl περίπου. Ο όγκος αυτός είναι στα αποδεκτά όρια της θεωρίας της SPME και στη συνέχεια αναλυόταν.

3.4.2.5. Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης

Διάφορες παράμετροι μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν, τόσο κατά την προετοιμασία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου, όσο και για τα επιμέρους στάδια που αναλύθηκαν παραπάνω. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι συνθήκες.

Πίνακας 3.1: Πίνακας συνθηκών που βελτιστοποιήθηκαν.

Συνθήκες που βελτιστοποιήθηκαν			
Προετοιμασία δειγμάτων		Μέθοδος Επεξεργασίας	
Διάλυση ουσιών	0,1,2,3 days	Χρόνος φυγοκέντρησης	5,10,15min
Επίδραση υπερήχων	0,30min	Διαλύτης εκχύλισης	ακετόνη, μεθανόλη, μίγμα
Δόση Sodium Azide	0.05,0.1,0.15g/g(ιλύος)	Χρονος υπερηχιτικής εκχύλισης	15,30,60min
Τύπος ιλύος	αφυδατωμένη, ξηρή	Υλικά πλήρωσης και διαστάσεις χρωματογραφικής στήλης καθαρισμού	μικρή, μεγάλη σύριγγα, silica gel

3.4.3. Μέτρηση δειγμάτων από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων

Τα δείγματα που συλλέχτηκαν από τους βιολογικούς επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την ανάπτυξη της μεθόδου. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά μπουκάλια. Μόλις το δείγμα συλλεγόταν από τον βιολογικό προστίθονταν 0.1g sodium azide/g στερεών. Το δείγμα μεταφερόταν άμεσα στο εργαστήριο για να επεξεργαστεί. Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε πλαστικά tubes των 20ml για 15min με 4000rpm. Η στερεή και υγρή φάση διαχωρίζονταν για τις επιμέρους αναλύσεις. Για την ανάλυση της υγρής φάσης το υπερκείμενο συλλέγονταν και διηθούνταν και στη συνέχεια γινόταν ανάλυσή του με SPME (3.5.). Η στερεή φάση μεταφερόταν σε γυάλινα δοχεία χωρητικότητας 22ml μη διαπερατά από την ηλιακή ακτινοβολία και προστίθονταν 6ml MeOH. Στη συνέχεια τα δείγματα παρέμεναν για 15min σε λουτρό υπερήχων. Έπειτα μεταφέρονταν εκ νέου σε πλαστικά tubes των 20ml για να φυγοκεντρηθούν και πάλι για 15min με 4000rpm. Η υπερκείμενη υγρή φάση συλλεγόταν για να διοχετευθεί σε χρωματογραφική στήλη καθαρισμού. Η στήλη ήταν αυτοσχέδια, διαστάσεων 2,5x9cm . Από κάτω προς τα πάνω τα υλικά πλήρωσης ήταν υαλοβαμβάκας (wool cotton), silica gel (2g) και sodium sulfate (2g). Αρχικά η στήλη ξεπλενόταν με 10ml MeOH, τα οποία απομακρύνονταν, στην συνέχεια περνούσε το δείγμα, το οποίο συλλέγονταν, και στο τέλος προστίθονταν 10ml MeOH, τα οποία επίσης συλλέγονταν. Η καθαρισμένη πλέον υγρή φάση θερμαινόταν στους 95 ^{o}C σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι ο όγκος να μειωθεί στα 2ml. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφερόταν σε γυάλινο δοχείο όγκου 14ml και η εξάτμιση συνεχιζόταν σε ήπιο ρεύμα αζώτου μέχρι ο όγκος να μειωθεί στα 50μl περίπου. Ο τελικός αυτός όγκος αναλύοταν.

3.5. Ανάλυση ουσιών στην υγρή και στερεή φάση με SPME

Για την μέτρηση των ουσιών στην υγρή φάση χρησιμοποιήθηκε αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής. [42] Η μέθοδος περιλαμβάνει ανάλυση των δειγμάτων με SPME. Δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης στις συνθήκες που περιγράφονται στην διατριβή. Η ανάκτηση ήταν αρκετά καλή (>75%) για όλες τις ουσίες που μελετήθηκαν και σε όλες τις φάσεις της δειγματοληψίας.

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή SPME (SPME holder) και ίνα με επικάλυψη 85μm polyacrylate (85μm PA) της Supelco. Πριν από την πρώτη χρήση μιας ίνας γινόταν conditioning για την ενεργοποίηση των πόρων της ίνας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν καθαρισμός της ίνας στον αέριο χρωματογράφο.

Η αναλυτική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε όπως ακριβώς περιγράφεται. [42] Χρησιμοποιήθηκε όγκος δείγματος 10ml σε γυάλινο δοχείο όγκου 14ml. Στο δοχείο προστίθονταν 23% w/v αλάτι NaCl. Το δοχείο βρισκόταν σε υδατόλουτρο για να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του δείγματος. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 60^{o} C και η ανάδευση γινόταν στις 530rpm με μαγνητική ράβδο. Το PH ρυθμιζόταν στο 2-2.5 με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος. Το δοχείο έκλεινε με βιδωτό καπάκι και septum από PTFE-silicon. Για την ομογενοποίηση του δείγματος γινόταν ανάδευση με vortex για 1min. Η ίνα βυθιζόταν στο δείγμα (direct SPME) για 60min. Στη συνέχεια η ίνα επανατραβιόταν στη σύριγγα και η σύριγγα εισάγονταν στον εισαγωγέα όπου γινόταν θερμική εκρόφηση των ουσιών για 10min. Το μήκος της ίνας που εισερχόταν στον εισαγωγέα του χρωματογράφου ήταν 3.5cm. Στην συνέχεια γινόταν η ανάλυση των ουσιών στον χρωματογράφο.

Πίνακας 3.2: Συνθήκες GC/MS της αναλυτικής μεθόδου όπως χρησιμοποιήθηκαν. [42]

Συνθήκες GC/MS	
Φέρον αέριο	Ήλιο, 1.3mL/min
Split mode	Splitless, 3min
Χρωματογραφική στήλη	DB5-ms 30m×0.25mm×0.25μm
Χρόνος εκρόφησης	10min
Θερμοκρασία εισαγωγέα	290 ^{o}C
Θερμοκρασία Interface	300 ^{o}C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου	αρχική 80 ^{o}C, άνοδος με 10 ^{o}C /min στους 265 ^{o}C για 1min, άνοδος με 2 ^{o}C /min στους 290 ^{o}C για 5min
Ionization mode	electrone impact 70eV
Δυναμικό ανιχνευτή MS	1.65 KV
Σάρωση	90-310 Amu με ρυθμό 0.5 scan/sec
Solvent delay	2 min
Software	GC-MS Solution

Για την μέτρηση των ουσιών στην στερεή φάση προσδιορίστηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου και παρουσιάζονται στα αποτελέσματα των πειραμάτων. Η βαθμονόμηση έγινε στο πλέγμα της ιλύος μέσω εμβολιασμού της με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η τελική ανάλυση έγινε με SPME, όπως περιγράφεται παραπάνω. Η μόνη διαφοροποίηση είναι κατά την αρχική προετοιμασία του δείγματος. Στην ανάλυση της υγρής φάσης, οι ουσίες περιέχονται στα 10ml υγρού, ενώ στην ανάλυση της στερεής οι ουσίες περιέχονται σε 50μl διαλύτη και αναμιγνύονται με 10ml υπερκάθαρο νερό για να αναλυθούν περαιτέρω.

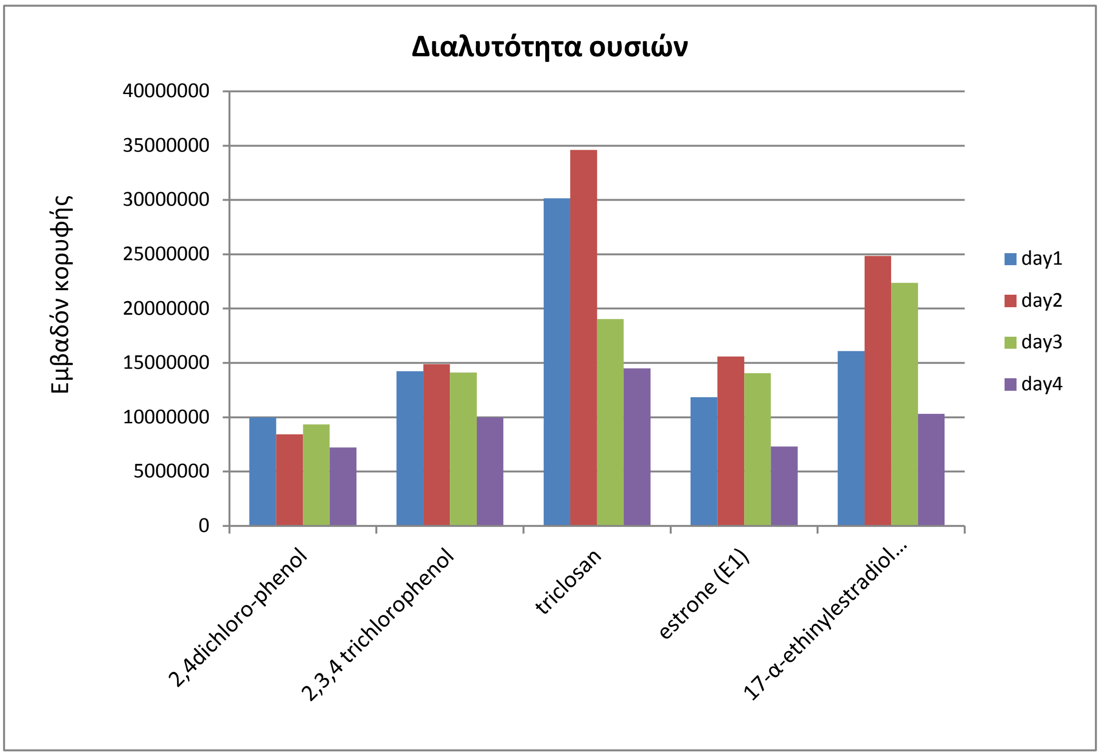
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Διάλυση των πρότυπων ουσιών

Η δυσκολία διάλυσης των στεροειδών ορμονών στο νερό είναι γνωστή. Ακόμα και σε συγκεντρώσεις της τάξης του ενός ppm υπάρχουν αναφορές για προετοιμασία του διαλύματος έως και 12 ημέρες πριν την ανάλυση. [43] Ακόμα όμως και σε οργανικούς διαλύτες σημειώνονται διαφοροποιήσεις στο ποσοστό διάλυσης των ουσιών, ανάλογα με τον διαλύτη και τη θερμοκρασία διάλυσης. Ο ρυθμός διάλυσης είναι μια σημαντική παράμετρος και επηρεάζει άμεσα τον χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί ισορροπία. [44]

Για την επίτευξη της βέλτιστης διάλυσης των ουσιών στο ενδιάμεσο διάλυμα που παρασκευαζόταν κάθε φορά για τον εμβολιασμό των δειγμάτων, εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου παραμονής, με στόχο να προσδιοριστεί ο χρόνος ισορροπίας. Παρασκευάστηκαν ένα διάλυμα μεθανόλης, όγκου 1ml, καθώς και ένα διάλυμα ακετονιτριλίου όγκου 1ml. Τα δυο διαλύματα αναδεύτηκαν με vortex για 1min και στη συνέχεια έγινε ανάλυση με direct SPME σε νερό. Οι συγκεντρώσεις στην SPME ήταν 20μg/L για τις 2,4dichloro-phenol και 2,3,4trichlorophenol, και 50μg/L για το triclosan, την E1, E2 και EE2. Η πρώτη μέτρηση που έγινε μόλις παρασκευάστηκαν τα διαλύματα αντιστοιχεί στις τιμές με δείκτη day1. Στη συνέχεια τα διαλύματα αναλύονταν κάθε 24 ώρες.

Το σχήμα 4.1 παρουσιάζει τα εμβαδά κορυφών για κάθε ουσία σε συνάρτηση με το χρόνο. Όσον αφορά στο διάλυμα μεθανόλης παρατηρούμε ότι οι φαινόλες δεν παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις τα πρώτα εικοσιτετράωρα. Το triclosan παρουσιάζει μια μικρή αύξηση μεταξύ της πρώτης και δεύτερης μέτρησης και στη συνέχεια μια απότομη μείωση. Όσον αφορά στο διάλυμα ακετονιτριλίου, που περιείχε τις ορμόνες, παρατηρούμε ότι η δεύτερη μέτρηση (κόκκινη στήλη) δίνει μεγαλύτερες τιμές εμβαδού κορυφής και για τις τρεις ορμόνες. Με την πάροδο 48 ωρών οι τιμές αυτές μειώνονται. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε η παρασκευή του διαλύματος μεθανόλης να γίνεται ακριβώς πρίν τον εμβολιασμό των δειγμάτων, ενώ του διαλύματος ακετονιτριλίου 24 ώρες νωρίτερα.



Σχήμα 4.1: Διάγραμμα που αναπαριστά τα εμβαδά κορυφής κάθε ουσίας που αναλύθηκαν σε δείγματα νερού για τέσσερεις συνεχόμενες ημέρες.

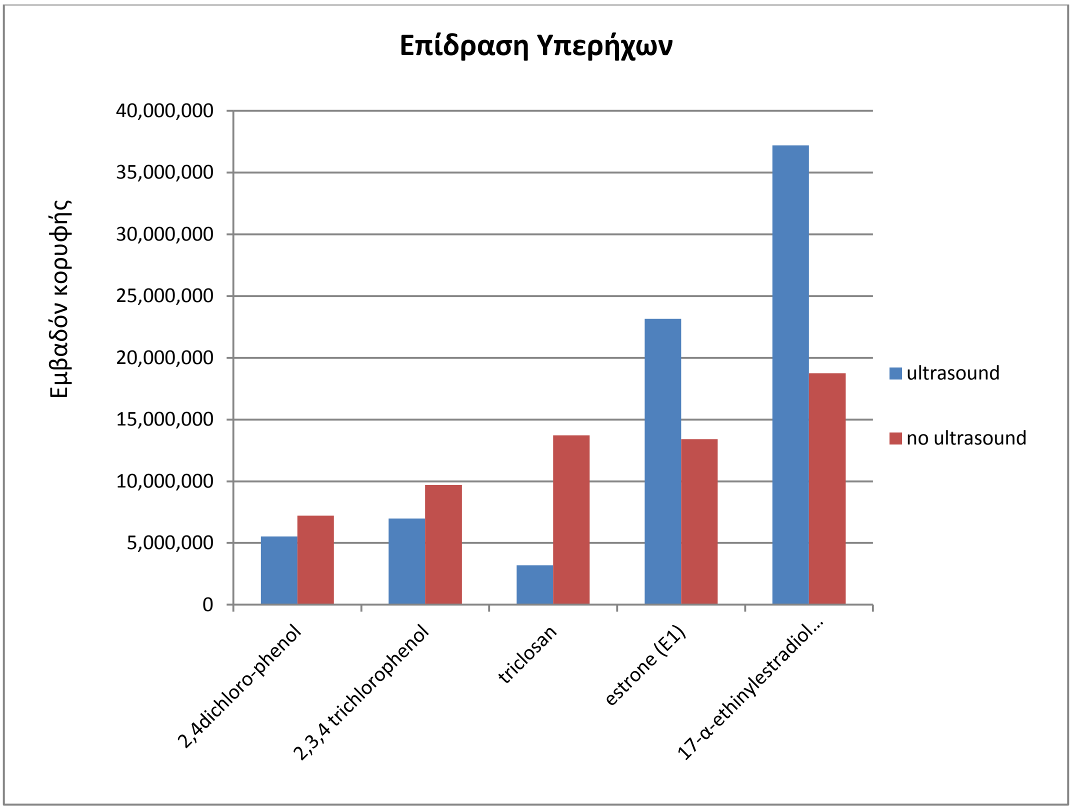
4.2. Επίδραση υπερήχων στις ουσίες

Η επίδραση των υπερήχων δεν είναι γνωστή σε όλες τις υπό μελέτη ουσίες. Υπάρχουν αναφορές για την αποδόμηση του triclosan με την βοήθεια υπερήχων. [45] Για να διαπιστωθεί τυχόν αρνητική επίδραση στις ουσίες διεξήχθη ένα πείραμα σε υδατικό διάλυμα.

Δυο διαλύματα μεθανόλης και ακετονιτριλίου, όγκου 1ml το καθένα, παρασκευάστηκαν από τα αρχικά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (stock). Στη συνέχεια με κατάλληλη αραίωση παρασκευάστηκαν δυο ίδια υδατικά διαλύματα όγκου 10ml σε αδιαφανή δοχεία, τα οποία κλείστηκαν αεροστεγώς. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών σε κάθε υδατικό διάλυμα ήταν 10μg/L για τις φαινόλες, 20μg/L για το triclosan και 50μg/L για τις ορμόνες. Ένα διάλυμα αναλύθηκε απευθείας με SPME, ενώ το άλλο τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30min και αναλύθηκε στην συνέχεια με όμοιο τρόπο.

Στο σχήμα 4.2 παρουσιάζονται τα εμβαδά κορυφής για κάθε ουσία στα δυο διαλύματα. Παρατηρούμε ότι το triclosan παρουσιάζει μεγάλη μείωση στο διάλυμα που υπέστη τους υπέρηχους (μπλε στήλη). Συνεπώς είναι πολύ πιθανό να αλλοιώνεται η δομή του, όπως περιγράφεται και στην βιβλιογραφία. [45] Ομοίως και οι φαινόλες παρουσιάζουν μια μείωση στο εμβαδόν, που όμως είναι πολύ μικρό και θεωρείται αμελητέο. Αντίθετη συμπεριφορά παρουσιάζουν οι ορμόνες, οι οποίες παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση στο δείγμα, στο οποίο οι υπέρηχοι προηγήθηκαν της ανάλυσης. Είναι πολύ πιθανό οι υπέρηχοι σε αυτή την περίπτωση να βοηθούν το διάλυμα ακετονιτριλίου με τις ουσίες να αναμιχθεί καλύτερα στο νερό.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, πιθανές διαφοροποιήσεις μπορούν να προκύψουν κατά την ανάλυση του triclosan με χρήση υπερήχων. Η ποσότητα που θα ποσοτικοποιηθεί είναι πολύ πιθανόν να είναι μικρότερη από την πραγματική ποσότητα που περιείχε αρχικά το δείγμα, καθώς ένα ποσοστό μπορεί να διασπαστεί κατά την επεξεργασία. Το γεγονός όμως αυτό δεν επηρεάζει την ακρίβεια της μεθόδου που αναπτύχθηκε, καθώς η καμπύλη έγινε στις ίδιες συνθήκες επεξεργασίας. Συνεπώς κάποια ποσότητα triclosan που πιθανόν να διασπάται έχει ληφθεί υπόψη κατά την κατασκευή της καμπύλης και εάν προσθέτει κάποιο σφάλμα θα είναι πολύ μικρό. Αντίθετα στην περίπτωση των ορμονών δεν υπάρχει διάσπαση των ουσιών, συνεπώς δεν προκύπτουν προβλήματα κατά την ανάλυση.

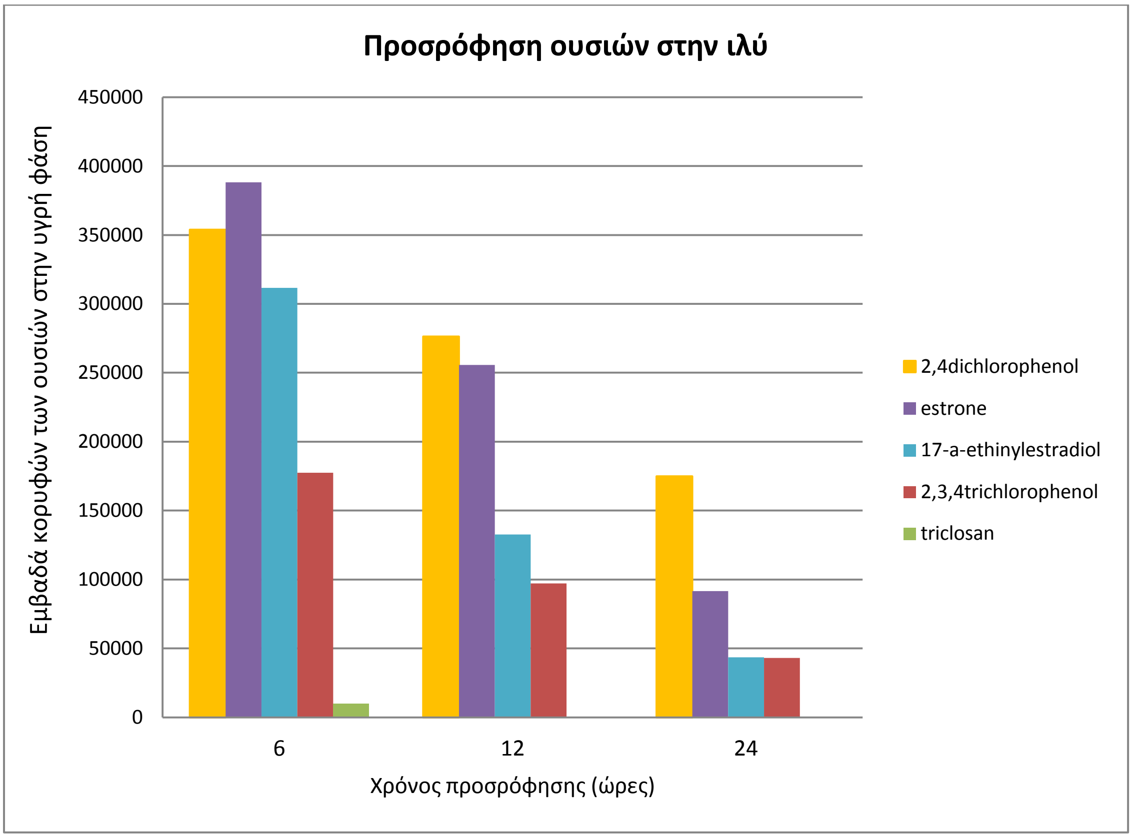


Σχήμα 4.2: Διάγραμμα που αναπαριστά τα εμβαδά κορυφής για κάθε ουσία που αναλύθηκαν σε δείγματα νερού, το ένα εκ των οποίων τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30min.

4.3. Προσρόφηση των ουσιών στην ιλύ

Για να βαθμονομηθεί η μέθοδος στο πλέγμα της ιλύος εξετάστηκε πρώτα ο βαθμός προσρόφησης των ουσιών στην ιλύ. Παρασκευάστηκαν τρία δείγματα με συγκεντρώσεις ουσιών 500ng/g ξηρής βιομάζας(dry weight) για τις ορμόνες και το triclosan και 200ng/g(dw) για τις φαινόλες και αναλύθηκε η υγρή φάση. Το πρώτο δείγμα αναλύθηκε με την πάροδο 6 ωρών. Το επόμενο δείγμα αναλύθηκε με την πάροδο 12 ωρών, ενώ το τελευταίο μετά από 24 ώρες. Η υγρή φάση αναλύθηκε για την παρακολούθηση του ρυθμού μείωσης των συγκεντρώσεων στο νερό.

Στο σχήμα 4.3 απεικονίζονται τα εμβαδά κορυφής των ουσιών στην υγρή φάση για τους τρείς διαφορετικούς χρόνους παραμονής των δειγμάτων από την στιγμή της προετοιμασίας τους. Παρατηρούμε ότι οι ουσίες συνεχώς μειώνονται στην υγρή φάση. Ειδικά το triclosan ανιχνεύτηκε μόνο στο πρώτο δείγμα των 6 ωρών και δεν ανιχνεύτηκε με την πάροδο 12 και 24 ωρών. Οι ορμόνες επίσης παρουσιάζουν έντονη μείωση, καθώς με την πάροδο 24 ωρών το εμβαδόν κορυφής έχει μειωθεί στο 1/3 του αρχικού. Οι φαινόλες είναι οι ουσίες που μειώνονται λιγότερο έντονα, καθώς στο τελευταίο δείγμα το εμβαδόν έχει μειωθεί στο μισό.



Σχήμα 4.3: Διάγραμμα που αναπαριστά τα εμβαδά κορυφής για κάθε ουσία όπως μετρήθηκαν στην υγρή φάση δειγμάτων για τρείς διαφορετικούς χρόνους προσρόφησης.

Πίνακας 4.1: Ποσότητες ουσιών που απέμειναν στην υγρή φάση σε κάθε μέτρηση.

	ng ουσίας στην υγρή φάση		
	6 ώρες	12 ώρες	24 ώρες
2,4phenol	5,4	4,5	3,4
2,3,4phenol	2,0	1,6	1,3
triclosan	< 0.1	0,0	0,0
estrone	7,6	5,6	2,2
ethinylestradiol	6,7	4,4	3,3

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα του πειράματος συμπεραίνουμε ότι όλες οι ουσίες προσροφόνται σε μεγάλο βαθμό στην ιλύ (πίνακας 4.1). Συγκρίνοντας τις αρχικές ποσότητες που προσθέσαμε με τις τελικές που ανιχνεύτηκαν στην υγρή φάση, βλέπουμε ότι μετά από 24 ώρες η 2,4διχλωροφαινόλη προσροφήθηκε κατά 98.3%, η 2,3,4τριχλωροφαινόλη κατά 99.3%, το triclosan κατά 100%, η estrone κατά 99.5% και τέλος η 17-a-ethinylestradiol κατά 99.3%. Σε δημοσιευμένες έρευνες δεν υπάρχουν πληροφορίες για την συμπεριφορά των δυο φαινολών που εξετάζουμε στην ιλύ. Όσον αφορά στις ορμόνες υπάρχουν αναφορές για ταχύτατη προσρόφηση, εντός 10 λεπτών, του μεγαλύτερου μέρους της αρχικής ποσότητας. [46] Άλλη έρευνα αναφέρει ότι οι E1 και EE2 προσροφόνται κατά 60-75% στην ιλύ εντός 30 λεπτών. [47] Τέλος παρατηρήθηκε ότι το βέλτιστο PH στο οποίο προσροφήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό (70%) η E1 είναι το ουδέτερο (PH=7).[48] Όσον αφορά στο triclosan αναφέρεται ότι προσροφάται κατά 45-60% εντός 30 λεπτών και μπορεί να προσροφηθεί έως και 80% εάν αυξηθεί η συγκέντρωση των στερεών. [49] Άλλη έρευνα αναφέρει ότι προσροφάται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% σε διάστημα 5 ωρών. [50] Τέλος μια έρευνα αναφέρει ότι διασπάται σε μια μονάδα καθαρισμού κατά 79% και απομακρύνεται με την περίσσεια ιλύος σε ποσοστό 15%, ενώ το 6% ανιχνεύεται στη εκροή. [51]

Οι έρευνες αυτές δυστυχώς δεν είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους, διότι πολλές παράμετροι διαφοροποιούνται. Μια βασική διαφορά είναι στις αρχικές συγκεντρώσεις. Στις περισσότερες έρευνες χρησιμοποιούνται μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις στα πειράματα προσρόφησης με αποτέλεσμα η αναλογία προσρόφημα-προσροφητής να είναι πολύ μεγάλη. Κάτι τέτοιο μπορεί να μειώσει την αριθμητική τιμή του ποσοστού προσρόφησης και δεν αποτελεί αντιπροσωπευτική παρατήρηση καθώς στη φύση παρατηρούνται πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον πολλές παράμετροι όπως το PH, η θερμοκρασία και η σύσταση της ιλύος διαφοροποιούνται σε κάθε έρευνα και διαφοροποιούν και το ποσοστό στο οποίο προσροφάται μια ουσία.

4.4. Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης από ενεργό ιλύ

4.4.1. Επιλογή ιλύος για την δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης

Αρχικά δοκιμάστηκε η χρήση ιλύος που παρήχθηκε σε αντιδραστήρα στο εργαστήριο. Με τον τρόπο αυτό θα εξασφαλιζόταν η καθαρότητα της ιλύος ως προς τις υπό μελέτη ουσίες. Συγκρίνοντας όμως τη δομή της εργαστηριακής ιλύος με την πραγματική διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορές. Η ιλύς που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο είχε μικρότερη συγκέντρωση στερεών, μικρότερα flocks και πολύ μεγαλύτερη ειδική αντίσταση. Συνεπώς απορρίφτηκε καθώς δεν θα προσομοίαζε ικανοποιητικά τις φυσικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε ένα πραγματικό σύστημα.

Συνεπώς επιλέχθηκε η χρήση ιλύος από την μονάδα επεξεργασίας λυμάτων Χανίων. Σε κάθε ποσότητα ιλύος γινόταν ένας αρχικός έλεγχος για να διαπιστωθεί εάν εμπεριέχονταν μεγάλες ποσότητες των υπό μελέτη ουσιών. Τέλος, αρκετά δοκιμαστικά πειράματα έγιναν για να επιλεγεί η καταλληλότερη μορφή στην οποία θα επεξεργαζόταν η ιλύς. Οι δοκιμές έγιναν σε αποξηραμένη ιλύ στους 60 ^{o}C και 100 ^{o}C καθώς και σε αφυδατωμένη ιλύ.

Στην περίπτωση της ξηρής βιομάζας τα πλεονεκτήματα ήταν:

I. Εξουδετέρωση των μικροοργανισμών και απαλοιφή του παράγοντα της βιοδιάσπασης.
II. Εύκολος χειρισμός και ακριβής μέτρηση της ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα.

Ενώ τα μειονεκτήματα:

I. Αυξημένος θόρυβος στα χρωματογραφήματα.
II. Διαφοροποίηση του πλέγματος της ιλύος, καθώς έχει υποστεί ξήρανση, με πιθανές διαφοροποιήσεις στον μηχανισμό της προσρόφησης συγκριτικά με την φυσική διαδικασία που πραγματοποιείται.
III. Πιθανή επανενεργοποίηση κάποιων μικροοργανισμών μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

Με τη χρήση αφυδατωμένης ιλύος (cake) τα πλεονεκτήματα ήταν τα ακόλουθα:

I. Ικανοποιητική προσομοίωση της φυσικής διεργασίας της προσρόφησης.
II. Ευκολία στην άμεση μέτρηση πραγματικών δειγμάτων, χωρίς το χρονοβόρο στάδιο της ξήρανσης.
III. Αποφυγή αλλοίωσης του δείγματος και των ουσιών με τη διαδικασία της ξήρανσης.
IV. Καθαρότερα χρωματογραφήματα.

Ενώ τα μειονεκτήματα:

I. Δυσκολία στην μέτρηση της επιθυμητής ποσότητας ιλύος.

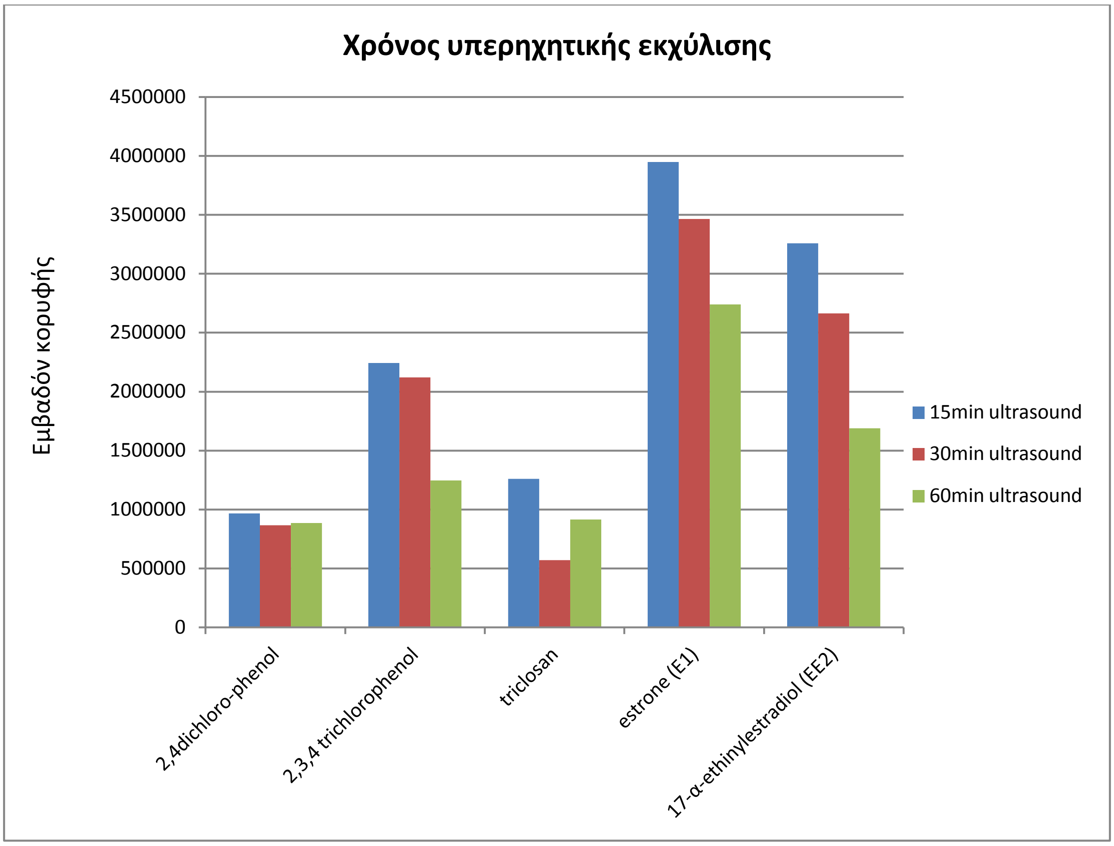
Με βάση τα παραπάνω, κρίθηκε καταλληλότερη η χρήση αφυδατωμένης ιλύος για τις αναλύσεις. Η αφυδάτωση της ιλύος γινόταν με χρήση συσκευής διήθησης τύπου Büchner με φίλτρα τύπου A/E (διαμέτρου πόρων ≈1μm).

4.4.2. Χρόνος παραμονής σε λουτρό υπερήχων

Εξετάστηκε η επίδραση, που είχε ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στο λουτρό υπερήχων, στο ποσοστό εκχύλισης των ουσιών. Παρασκευάστηκαν τρία ίδια δείγματα σε γυάλινα αδιαφανή φιαλίδια. Κάθε φιαλίδιο περιείχε ποσότητα αφυδατωμένης ιλύος που αντιστοιχούσε σε 1g ξηρής βιομάζας, 0,1g sodium azide και υδατικό διάλυμα όγκου 10ml που περιείχε τις ουσίες. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία 4 ^{o}C για 24 ώρες, ώστε οι ουσίες να προσροφηθούν στην βιομάζα. Θεωρώντας ότι όλη η αρχική ποσότητα από κάθε ουσία προσροφήθηκε, οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν ανά g ξηρής ιλύος ήταν: 1000ng/g για κάθε ορμόνη και για το triclosan και 400ng/g για κάθε φαινόλη. Επιλέχθηκαν τρείς χρόνοι παραμονής των 15min, 30min και 60min.

Στο σχήμα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Απεικονίζεται το εμβαδόν κορυφής για κάθε ουσία που μετρήθηκε για τους τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής. Για την 2,4diclorophenol βλέπουμε πως και οι τρείς χρόνοι επιφέρουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα στην εκχύλιση, με λίγο μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής στα 15min παραμονής σε λουτρό υπερήχων. Η 2,3,4 trichlorophenol παρουσιάζει περίπου ίδια ποσοστά εκχύλισης στα 15min και 30min παραμονής, ενώ το εμβαδόν κορυφής μειώνεται έντονα μετά από 60min. Το triclosan αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση, καθώς όπως φαίνεται σε προηγούμενο πείραμα, πιθανότατα διασπάται από τους υπέρηχους. Το μέγιστο εμβαδό κορυφής παρατηρήθηκε στα 15min εκχύλισης. Η E1 και EE2 παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, με μέγιστο εμβαδόν κορυφής στα 15min υπερηχητικής εκχύλισης. Μέτρια μείωση παρουσιάζεται με την πάροδο 30min και ανάλογη μείωση παρουσιάζεται στα αποτελέσματα τη τελευταίας μέτρησης, στα 60min. Τέλος, η E2 παρουσιάζει τα ίδια σχεδόν εμβαδά κορυφής στα 15min και 30min χρόνου εκχύλισης, ενώ μειώνεται αρκετά όταν ο χρόνος φτάσει τα 60min.

Συμπερασματικά, οι μετρήσεις που συνοψίζονται στο διάγραμμα υποδεικνύουν τα 15min σαν βέλτιστο χρόνο παραμονής του δείγματος σε λουτρό υπερήχων. Στο χρόνο αυτό παρατηρήθηκαν τα μέγιστα εμβαδά κορυφών.



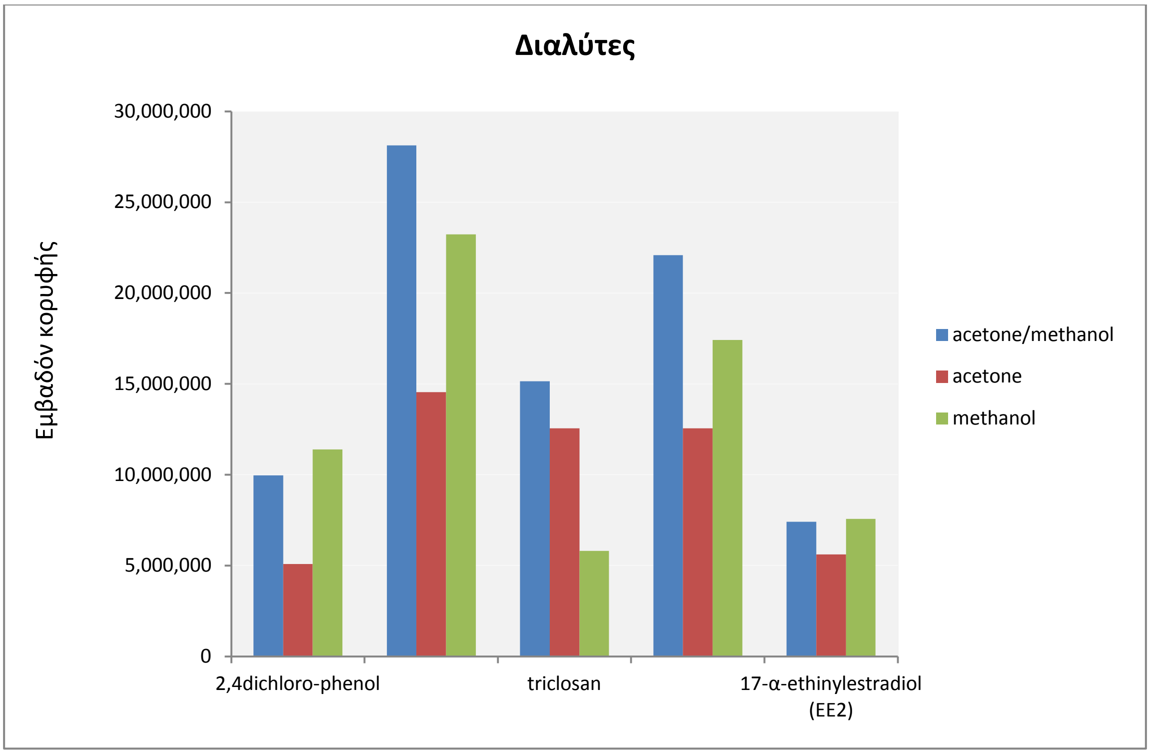
Σχήμα 4.4: Διάγραμμα που απεικονίζει τα εμβαδά κορυφής κάθε ουσίας για τρείς διαφορετικούς χρόνους υπερηχητικής εκχύλισης.

4.4.3. Επιλογή διαλύτη εκχύλισης των ουσιών από την ιλύ

Διαφορετικοί διαλύτες δοκιμάστηκαν στο στάδιο της υπερηχητικής εκχύλισης για να χρησιμοποιηθεί ο αποτελεσματικότερος. Τρία δείγματα παρασκευάστηκαν με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις ουσιών ανά γραμμάριο βιομάζας, 500ng/g(dw) για κάθε ορμόνη, 800ng/g(dw) για το triclosan και 400ng/g(dw) για κάθε φαινόλη. Οι διαλύτες που εξετάστηκαν ήταν: καθαρή μεθανόλη, καθαρή ακετόνη και συνδυασμός των δύο σε ίση αναλογία (50%v/v).

Στο σχήμα 4.5 παρουσιάζονται τα εμβαδά κορυφής για κάθε ουσία με τους διαφορετικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι 2,4dichlorophenol, 2,3,4trichlorophenol, E1 και EE2 παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα μεγαλύτερα εμβαδά κορυφής να εμφανίζονται όταν χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών (μεθανόλη/ακετόνη). Η επόμενη ικανοποιητική εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση της μεθανόλης, ενώ η ακετόνη είχε τα μικρότερα εμβαδά κορυφής για τις παραπάνω ουσίες. Όσον αφορά στο triclosan παρόμοια απόδοση παρουσίασαν το μίγμα διαλυτών και η καθαρή ακετόνη, με το πρώτο να εμφανίζει λίγο μεγαλύτερο εμβαδόν κορυφής. Σχετικά χαμηλή ήταν η απόδοση της μεθανόλης στην εκχύλιση του triclosan. Τέλος, η E2 παρουσίασε βέλτιστη εκχύλιση με την χρήση καθαρής ακετόνης.

Με βάση το σχήμα 4.5 το μίγμα ακετόνης/μεθανόλης βελτιώνει αισθητά την εκχύλιση. Με τη χρήση όμως του μίγματος αυτού αυξήθηκε πολύ έντονα ο θόρυβος στα χρωματογραφήματα, με αποτέλεσμα πιθανά σφάλματα στις μετρήσεις και κακή επαναληψιμότητα. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκε ο αμέσως επόμενος αποδοτικότερος διαλύτης, η καθαρή δηλαδή μεθανόλη.



Σχήμα 4.5: Διάγραμμα που απεικονίζει τα εμβαδά κορυφής κάθε ουσίας για τρείς διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης.

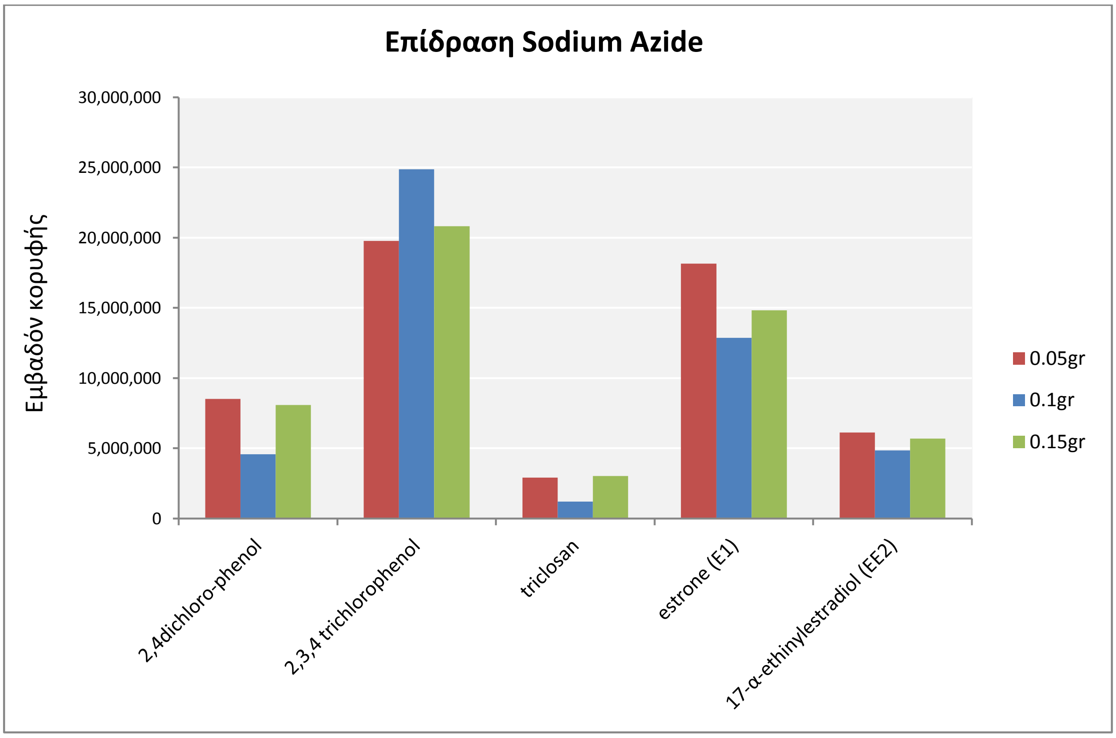
4.4.4. Αναστολή μικροβιολογικής δραστηριότητας

Από τη στιγμή που επιλέχθηκε η χρήση αφυδατωμένης ιλύος (cake) χρειάστηκε να απαλειφθεί ο παράγοντας της βιοδιάσπασης. Η παράμετρος αυτή ήταν απαραίτητη για να διασφαλιστούν οι σταθερές συγκεντρώσεις στα δείγματα. Μια εύχρηστη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν με την προσθήκη sodium azide. Η ουσία αυτή προκαλεί αναστολή της μικροβιακής δραστηριότητας χωρίς να προκαλεί λύση της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, παρεμποδίζεται η αναπνοή των μικροοργανισμών και η δημιουργία ATP. [52] Η κατάλληλη ποσότητα που απαιτείται για την αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας διαφέρει ανάλογα με τις ιδιότητες και την σύσταση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στην ενεργό ιλύ. [53] [50]

Στην προκειμένη περίπτωση η προσθήκη του sodium azide δεν ήταν ο μόνος παράγοντας που επηρέαζε την δράση των μικροοργανισμών. Τα δείγματα διατηρούνταν στους 4^{o}C, θερμοκρασία μη ευνοϊκή για τους μικροοργανισμούς, χωρίς αερισμό και σε σκοτεινό περιβάλλον. Συνεπώς η χρήση του sodium azide είχε συμπληρωματικό χαρακτήρα και ο καθορισμός της κατάλληλης ποσότητας έγινε λαμβάνοντας υπόψη και τις παραπάνω συνθήκες.

Ένα απλό πείραμα έγινε σε πρώτη φάση για να διαπιστωθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του sodium azide. Τρία δείγματα παρασκευάστηκαν με διαφορετικές ποσότητες sodium azide στο κάθε ένα (0.05g, 0.1g και 0.15g). Οι συγκεντρώσεις των ουσιών ήταν ίδιες σε κάθε δείγμα, 400ng/g(dw) για τις φαινόλες, 500ng/g(dw) για τις ορμόνες και 800ng/g(dw) για το triclosan. Τα δείγματα αφέθηκαν για 24 ώρες στους 4^{o}C σε σκοτεινό περιβάλλον ώστε να προσροφηθούν οι ουσίες στην βιομάζα. Στην συνέχεια έγινε η ανάλυσή τους.

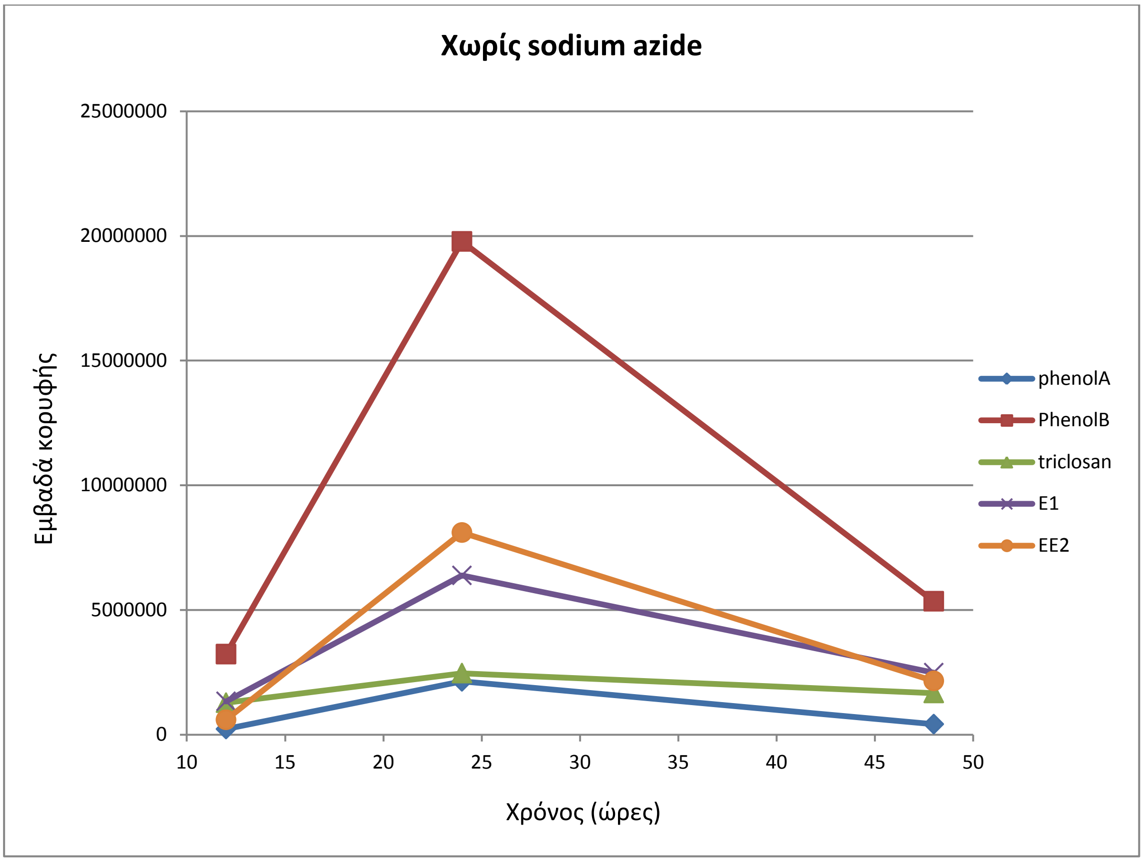
Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Για κάθε ουσία καταγράφεται το εμβαδόν κορυφής ανάλογα με την ποσότητα sodium azide που χρησιμοποιήθηκε. Παρατηρούμε ότι οι κορυφές είναι περίπου ίδιες για την μικρότερη και μεγαλύτερη ποσότητα sodium azide, ενώ εμφανίζονται μικρότερες στην περίπτωση που προσθέσαμε 0.1g ουσίας. Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι λογικό και δεν επιτρέπει την επιλογή βέλτιστης ποσότητας sodium azide συνεπώς διεξήχθη και ένα δεύτερο πείραμα για την μελέτη του χρόνου δράσης της ουσίας.



Σχήμα 4.6: Διάγραμμα που απεικονίζει τα εμβαδά κορυφής κάθε ουσίας με την προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων sodium azide κατά την παρασκευή των δειγμάτων.

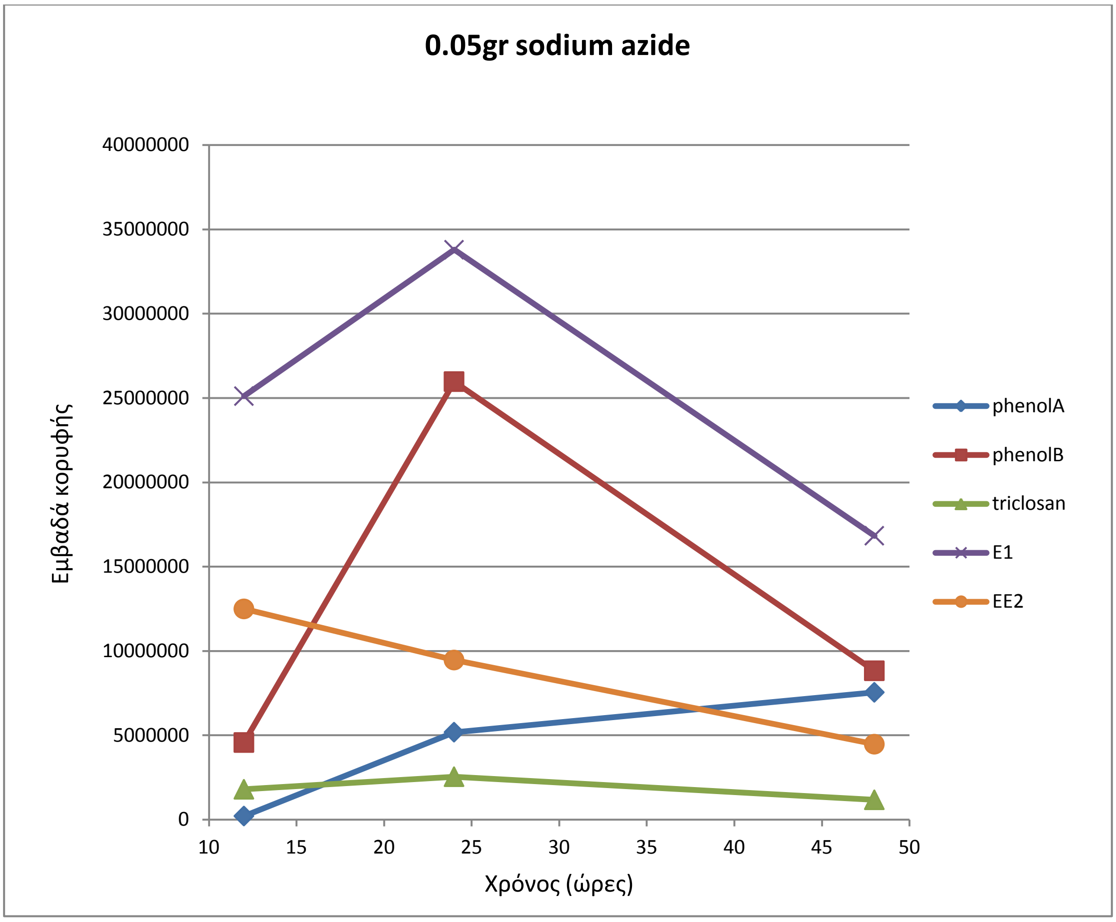
Σε δεύτερη φάση μελετήθηκε η επίδραση του sodium azide για τρείς διαφορετικές συγκεντρώσεις και για τρείς διαφορετικούς χρόνους προσρόφησης. Παρασκευάστηκαν 9 δείγματα με ίση ποσότητα αφυδατωμένης ιλύος που αντιστοιχούσε σε ένα γραμμάριο ξηρής βιομάζας, καθώς και ίδιες συγκεντρώσεις ουσιών (1000ng/g(dw) για την κάθε μια). Σε τρία δείγματα δεν προστέθηκε sodium azide, σε τρία προστέθηκαν 0.05g (διαλυμένα σε 5ml νερό) και σε άλλα τρία 0.1g (διαλυμένα στ 5ml νερό). Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε αδιαφανή γυάλινα δοχεία και παρέμειναν σε θερμοκρασία 4^{o}C μέχρι να αναλυθούν. Μετά από 12 ώρες αναλύθηκαν τα τρία πρώτα δείγματα, ένα από κάθε διαφορετική συγκέντρωση. Μετά από 24 ώρες άλλα τρία και τα τρία τελευταία μετά από 48 ώρες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων συνοψίζονται στα σχήματα 4.7, 4.8 και 4.9.

Στο σχήμα 4.7 παρουσιάζεται η περίπτωση στην οποία δεν προστέθηκε sodium azide. Απεικονίζονται τα εμβαδά κορυφής σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε ουσία. Παρατηρούμε ότι στις 12 ώρες παραμονής των δειγμάτων τα εμβαδά κορυφής είναι σχετικά μικρά, συγκριτικά με τις 24 ώρες παραμονής, όπου σχεδόν τριπλασιάζονται. Στη συνέχεια, για χρόνο παραμονής 48 ωρών οι τιμές των εμβαδών μειώνονται και αγγίζουν τιμές λίγο μεγαλύτερες από αυτές στην πρώτη μέτρηση των 12 ωρών.



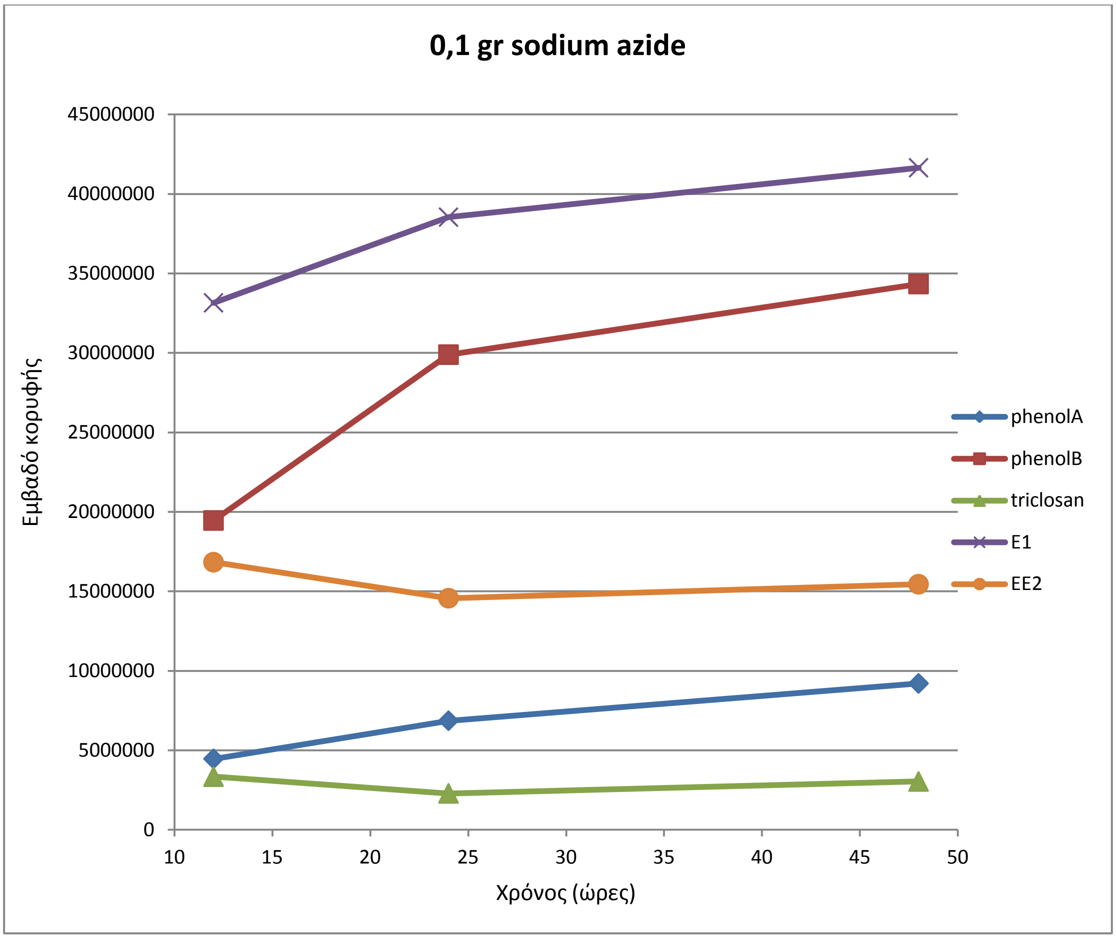
Σχήμα 4.7: Διάγραμμα που απεικονίζει τη διακύμανση των εμβαδών κορυφής κάθε ουσίας σε συνάρτηση με το χρόνο, χωρίς να πραγματοποιηθεί προσθήκη sodium azide.

Στο σχήμα 4.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων στην περίπτωση που προσθέσαμε 0.05g sodium azide (δηλαδή 0.05g/g ξηρής βιομάζας(dw)). Απεικονίζονται τα εμβαδά κορυφής σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε ουσία. Παρατηρούμε ότι στις 12 ώρες παραμονής των δειγμάτων τα εμβαδά κορυφής είναι αρκετά υψηλά. Στην επόμενη μέτρηση, για χρόνο παραμονής 24 ώρες τα εμβαδά παρουσιάζουν μια μικρή ακόμα αύξηση, με μόνη εξαίρεση την EE2. Στην συνέχεια, στην τελευταία μέτρηση τα εμβαδά μειώνονται έντονα για να φτάσουν σε τιμές ακόμα μικρότερες από την πρώτη μέτρηση.



Σχήμα 4.8: Διάγραμμα που απεικονίζει τη διακύμανση των εμβαδών κορυφής κάθε ουσίας σε συνάρτηση με το χρόνο, με την προσθήκη 0.05g sodium azide ανά g ξηρής βιομάζας.

Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων στην περίπτωση που προσθέσαμε τη διπλάσια ποσότητα sodium azide (δηλαδή 0.1g/g ξηρής βιομάζας). Απεικονίζονται τα εμβαδά κορυφής σε συνάρτηση με το χρόνο για κάθε ουσία. Παρατηρούμε ότι στις 12 ώρες παραμονής των δειγμάτων τα εμβαδά κορυφής είναι αρκετά υψηλά. Στην επόμενη μέτρηση, για χρόνο παραμονής 24 ώρες τα εμβαδά παρουσιάζουν μια μικρή ακόμα αύξηση, με εξαίρεση την EE2 και το triclosan που μειώνονται λίγο. Στην συνέχεια, στην τελευταία μέτρηση τα εμβαδά παραμένουν περίπου σταθερά, με μικρές αυξήσεις για τις φαινόλες και την E1.



Σχήμα 4.9: Διάγραμμα που απεικονίζει τη διακύμανση των εμβαδών κορυφής κάθε ουσίας σε συνάρτηση με το χρόνο, με την προσθήκη 0.1g sodium azide ανά g ξηρής βιομάζας.

Με βάση το παραπάνω πείραμα και τα αποτελέσματά του μπορούμε να εξάγουμε αρκετά συμπεράσματα για τον μηχανισμό της προσρόφησης των συγκεκριμένων ουσιών στην βιομάζα καθώς και την συμπεριφορά των μικροοργανισμών. Όσον αφορά στην προσρόφηση, παρατηρούμε ότι και στα τρία διαγράμματα οι μεγαλύτερες κορυφές παρουσιάζονται για χρόνο παραμονής των δειγμάτων 24 ώρες. Συνεπώς ο βέλτιστος χρόνος στον οποίο η προσρόφηση έχει ολοκληρωθεί στις συνθήκες υπό τις οποίες βρίσκονται τα δείγματα είναι οι 24 ώρες.

Όσον αφορά στη δράση των μικροοργανισμών, παρατηρούμε ότι η απουσία φωτός και η χαμηλή θερμοκρασία δεν είναι αρκετά για να τους απενεργοποιήσουν και να αναστείλουν την μεταβολική τους δραστηριότητα. Μετά από 12 ώρες παραμονής των δειγμάτων, το δείγμα με την μεγαλύτερη ποσότητα sodium azide παρουσιάζει εμβαδά κορυφής πολύ μεγαλύτερα από το δείγμα που δεν περιείχε την ουσία (από 2.5 έως 30 φορές μεγαλύτερες). Διαφορές παρατηρούνται και συγκριτικά με το δείγμα που περιείχε την μισή ποσότητα της ουσίας, σε μικρότερο όμως βαθμό. Στην περίπτωση αυτή το δείγμα με την μεγαλύτερη ποσότητα sodium azide παρουσιάζει και πάλι μεγαλύτερες κορυφές για όλες τις ουσίες, με λίγο μεγαλύτερα εμβαδά (1.2-1.8 φορές μεγαλύτερα) για το triclosan και τις ορμόνες, περίπου τετραπλάσια για την 2,3,4trichlorophenol και 20 φορές μεγαλύτερα για την 2,3dichlorophenol. Βλέπουμε λοιπόν ότι προσθέτοντας sodium azide αναστέλλεται η μικροβιολογική δραστηριότητα και στις δυο περιπτώσεις, με λίγο καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση που προσθέσαμε 0.1g της ουσίας.

Με την πάροδο 24 ωρών, όπου έχει ολοκληρωθεί η προσρόφηση των ουσιών στην ιλύ, παρατηρούμε και πάλι διαφορές ανάμεσα στα τρία δείγματα. Μεγαλύτερα εμβαδά εμφανίζονται και πάλι στο δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση sodium azide. Συγκρίνοντας το δείγμα αυτό με το δείγμα που δεν περιείχε την ουσία παρατηρούμε έως και 6 φορές μεγαλύτερα εμβαδά κορυφής. Συγκρίνοντας τα δείγματα που περιείχαν την ουσία παρατηρούμε ότι εμφανίζονται ίσα ή λίγο μεγαλύτερα εμβαδά (έως 1.5 φορά μεγαλύτερα) στο δείγμα με την μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας. Συνεπώς το συμπέρασμα που διατυπώθηκε παραπάνω επιβεβαιώνεται. Ότι η προσθήκη της ουσίας παρεμποδίζει την φυσιολογική λειτουργία των μικροοργανισμών, με μικρές διαφορές ως προς την ποσότητα που χρησιμοποιείται.

Τέλος, με την πάροδο 48 ωρών από την παρασκευή των δειγμάτων παρατηρούμε και πάλι έντονες διαφορές μεταξύ τους. Το δείγμα με τα μεγαλύτερα εμβαδά είναι και πάλι το δείγμα με την μεγαλύτερη ποσότητα sodium azide. Συγκρίνοντας το δείγμα αυτό με το δείγμα που δεν περιείχε την ουσία διαπιστώνουμε ότι τα εμβαδά στο πρώτο είναι από 2 έως 20 φορές μεγαλύτερες. Συνεπώς οι ουσίες έχουν μειωθεί κατά πολύ στο δείγμα που δεν περιείχε την ουσία. Συγκρίνοντας τώρα τα δύο δείγματα που περιείχαν την ουσία παρατηρούμε ότι σημειώνονται μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ τους. Στο δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση του sodium azide τα εμβαδά κορυφής ήταν περίπου 1.5 φορά μεγαλύτερο για την 2,3dichlorophenol, 2.5-4 φορές μεγαλύτερες για την 2,3,4trichlorophenol, triclosan, E1 και EE2 και 7 φορές μεγαλύτερο για την E2.

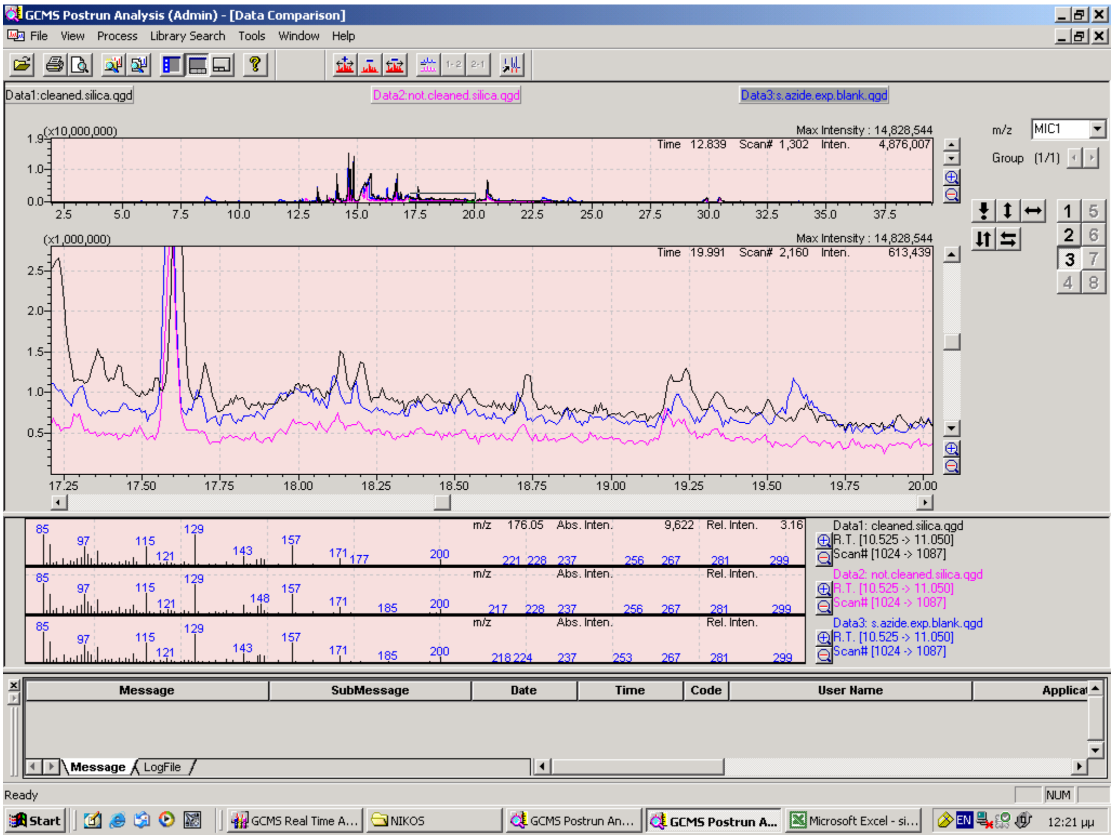
Με βάση τα παραπάνω οδηγούμαστε στα ακόλουθα συμπεράσματα. Ακόμα και σε χαμηλή θερμοκρασία και υπό την απουσία φωτός ένα ποσοστό των ουσιών που προστέθηκαν διασπώνται από τους μικροοργανισμούς. Κάτι τέτοιο είναι πολύ πιθανόν να συμβαίνει καθώς έχει ήδη παρατηρηθεί πως μικροοργανισμοί στην ενεργό ιλύ διασπούν ταχύτατα κάποιες από τις ουσίες που μελετώνται όταν υπάρχει έλλειψη σε εύκολα διασπάσιμες ουσίες όπως η γλυκόζη και η πεπτόνη. [54] Με την προσθήκη sodium azide στα δείγματα επιτυγχάνεται η αναστολή της λειτουργίας του μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Η πρώτη ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε (0.05g/g ξηρής βιομάζας) φαίνεται να επιτυγχάνει καλά αποτελέσματα κατά το πρώτο 24ωρο του πειράματος, στην συνέχεια όμως είναι πιθανόν οι μικροοργανισμοί να προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον και να δραστηριοποιούνται και πάλι, διότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών μειώνονται αισθητά το δεύτερο 24ωρο. Αντίθετα, προσθέτοντας 0.1g/g(dw) sodium azide επιτυγχάνονται σταθερότερες συνθήκες και κατά το δεύτερο 24ωρο. Φαίνεται καθαρά στο σχήμα 4.9 πως οι ουσίες αφού προσροφηθούν με την πάροδο 24 ωρών παραμένουν σε σταθερή συγκέντρωση στην βιομάζα για άλλες 24 ώρες. Με βάση την διαπίστωση αυτή, η δόση των 0.1g/g(dw) κρίθηκε επαρκής ώστε να παρεμποδιστεί η βιοδιάσπαση των ουσιών από τους μικροοργανισμούς. Πιθανόν να ήταν επαρκής και η μικρότερη δόση καθώς ο βέλτιστος χρόνος προσρόφησης ήταν οι 24 ώρες, όμως χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη δόση ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη βεβαιότητα ότι δεν θα υπάρξει διάσπαση των ουσιών.

4.4.5. Καθαρισμός εκχυλίσματος

Δοκιμάστηκε ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με αυτοσχέδια χρωματογραφική στήλη. Ελέγχθηκαν τρία δείγματα ως προς το θόρυβο που παρατηρήθηκε στο χρωματογράφημα του κάθε δείγματος. Το ένα δείγμα αναλύθηκε κανονικά χωρίς να υποστεί το εκχύλισμα καθαρισμό, ενώ τα άλλα δυο καθαρίστηκαν στην στήλη. Η στήλη κατασκευάστηκε με τη βοήθεια μιας γυάλινης σύριγγας μήκους 9cm και διαμέτρου 2.5cm . Η στήλη πληρώθηκε στη βάση της με υαλοβάμβακα (glass wool) ώστε να μην διαφεύγουν τα επικείμενα υλικά. Το επόμενο στρώμα αποτελούταν από 2g silica gel και πάνω από αυτό ένα στρώμα με 2g sodium sulfate. Η στήλη καθαριζόταν αρχικά με 10ml μεθανόλης η οποία δεν συλλεγόταν. Αφού το δείγμα διαπερνούσε τη στήλη άλλα 10ml μεθανόλης προστίθενται και συλλέγονταν.

Δοκιμάστηκε η χρήση της silica gel με δυο τρόπους, στην πρώτη περίπτωση το υλικό χρησιμοποιήθηκε χωρίς να επεξεργαστεί, ενώ στην δεύτερη υπέστη μια σειρά σταδίων επεξεργασίας, όπως περιγράφονται σε βιβλιογραφικές πηγές. Κατά την επεξεργασία η silica gel παρέμεινε για 48 ώρες σε διχλορομεθάνιο. [55] Δοκιμάστηκε επίσης μια σύριγγα μεγαλύτερων διαστάσεων, η οποία όμως απορρίφτηκε διότι οι στρώσεις των υλικών πλήρωσης δημιουργούσαν μικρά πάχη με αποτέλεσμα ο χρόνο επαφής του δείγματος με τα υλικά να είναι πολύ μικρός.

Η σύγκριση των τριών χρωματογραφημάτων που προέκυψαν έδειξε πώς ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με silica gel, η οποία δεν έχει υποστεί επεξεργασία μειώνει τον θόρυβο που προκύπτει από ακαθαρσίες του δείγματος. Το σχήμα 4.10 παρουσιάζεται ένα τμήμα από τα χρωματογραφήματα που συγκρίθηκαν. Στο κέντρο της εικόνας και με ροζ χρώμα παρατηρούμε το χρωματογράφημα που προέκυψε με τον απλό καθαρισμό του δείγματος με silica gel. Με μπλέ χρώμα, λίγο ψηλότερα, εμφανίζεται το χρωματογράφημα που έδωσε η ανάλυση του δείγματος χωρίς καθαρισμό. Τέλος, με μαύρο χρώμα αποδίδεται το χρωματογράφημα στο οποίο το δείγμα καθαρίστηκε με silica gel η οποία είχε υποστεί επεξεργασία.



Σχήμα 4.10: Εικόνα από την ανάλυση των δεδομένων του αέριου χρωματογράφου στο πρόγραμμα GC-MS Solution. Συγκρίνονται τρία διαφορετικά χρωματογραφήματα ως προς την βάση τους (baseline) και τον θόρυβο. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το χρωματογράφημα για την περίπτωση που το δείγμα καθαρίστηκε με επεξεργασμένη silica gel. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το χρωματογράφημα στο οποίο το δείγμα δεν υπέστη επεξεργασία για να καθαριστεί. Με ροζ χρώμα απεικονίζεται το χρωματογράφημα στο οποίο έγινε καθαρισμός του δείγματος με ανεπεξέργαστη silica gel.

Συνολικά, οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που προέκυψαν μετά από τα κατάλληλα πειράματα συνοψίζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Πίνακας βέλτιστων συνθηκών.

Βέλτιστες συνθήκες	
Δειγματοληψία	Προσθήκη 0.1g sodium azide/g στερεών
Ιλύς	Αφυδατωμένη, ποσότητα ισοδύναμη με 1g ξηρής βιομάζας
Εκχύλιση	Υπερηχητική, 15min με προσθήκη 6ml μεθανόλης
Φυγοκέντρηση	15min, 4000rpm
Καθαρισμός εκχυλίσματος	Χρωματογραφική στήλη με υαλοβάμβακα,2g silica gel και 2g sodium sulfate

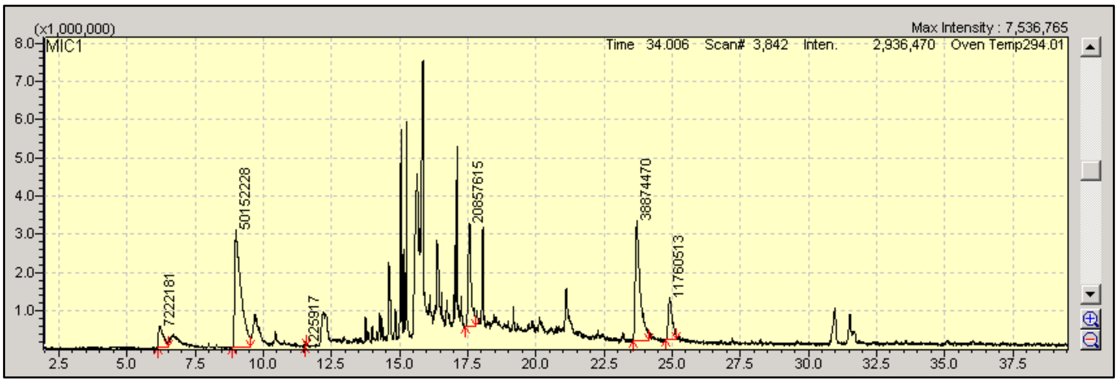
4.5.Ποιοτικά χαρακτηριστικά της αναλυτικής μεθόδου

Ο χρόνος συγκράτησης των ουσιών, η γραμμική περιοχή και τα όρια ανίχνευσης για κάθε ουσία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3: Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

‘Ενωση	Χρόνος συγκράτησης (min)	Γραμμική περιοχή (ng/g)	R^2	RSD%	LOD (ng/g)
2,4-dichlorophenol	6.1	25-4000	0.992	11.4	6.2
2,3,4-trichlorophenol	8.9	10-4000	0.993	9.5	2.6
Triclosan	17.5	10-6400	0.990	11.8	3.4
Estrone	23.5	10-4000	0.999	6.8	2.8
17-α-ethinylestradiol	24.7	10-4000	0.996	6.9	2.8

Η μέθοδος είχε πολύ καλή επαναληψιμότητα καθώς το RSD% των ενώσεων κυμαίνονταν από 6.8 μέχρι 11.8%. Οι καμπύλες αναφοράς όλων των ουσιών ήταν γραμμικές σε μια ευρεία περιοχή από ng/g έως μg/g. O συντελεστής συσχέτισης (R^2) ήταν καλός καθώς κυμαίνονταν από 0.990 μέχρι 0.999. Τα όρια ανίχνευσης της 2,4dichlorophenol ήταν 6.2 ng/g, του triclosan 3.4ng/g, της 2,3,4trichlorophenol 2.6 ng/g και τέλος της estrone και 17-a-ethinylestradiol 2.8 ng/g.



Σχήμα 4.11: Χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση δείγματος ιλύος κατά την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών ήταν 1600ng/g(dw) για τις2,4dichlorophenol και 2,3,4trichlorophenol, 2000ng/g(dw) για τις estrone και 17-a-ethinylestradiol και 3200ng/g(dw) για το triclosan.

4.6. Εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην μέτρηση δειγμάτων από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων: των Χανίων, του Βορείου άξονα (του νομού Χανίων), του Ρεθύμνου και του Ηρακλείου. Κατά τις δειγματοληψίες που έγιναν τη θερινή περίοδο δεν ανιχνεύτηκαν οι ουσίες που μελετήσαμε.

Κατά τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν τη φθινοπωρινή και χειμερινή περίοδο ανιχνεύτηκαν αρκετές από τις ουσίες σε διάφορα στάδια των βιολογικών καθαρισμών.

Υψηλές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ουσιών ανιχνεύτηκαν στην πρώτη δειγματοληψία που έγινε στην μονάδα επεξεργασίας των Χανίων (πίνακας 4.4). Όλες οι ουσίες ανιχνεύτηκαν στην ιλύ. Σε μια δεύτερη δειγματοληψία αναλύθηκαν η εισροή στην μονάδα, καθώς και η υγρή και στερεή φάση στην ανακυκλοφορία και την χώνευση (πίνακας 4.5). Στην περίπτωση αυτή οι συγκεντρώσεις ήταν μικρότερες. Και στις δυο δειγματοληψίες το triclosan ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Πίνακας 4.4: Συγκεντρώσεις ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε δύο σημεία δειγματοληψίας στις 11 Νοεμβρίου 2011 στην μονάδα επεξεργασίας του δήμου Χανίων.

Χανιά 11 Νοεμβρίου 2011	Συγκέντρωση ουσιών σε ng/g(dw)	
	ανακυκλοφορία	χώνευση
2,4phenol	< 25	< 25
2,3,4phenol	64,8	< 10
triclosan	396,7	1940,4
estrone	95,9	22,3
ethinylestradiol	116,8	65,6

Πίνακας 4.5: Συγκεντρώσεις ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε σημεία δειγματοληψίας στις 13 Δεκεμβρίου 2011 στην μονάδα επεξεργασίας Χανίων.

Χανιά 13 Δεκεμβρίου 2011	Συγκέντρωση ουσιών στην υγρή φάση σε μg/L			Συγκέντρωση ουσιών στην ιλύ σε ng/g(dw)	
	Εισροή λυμάτων	Υγρή φάση ανακυκλοφορίας	Υγρή φάση χώνευσης	Ανακυκλοφορία	Χώνευση
2,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
2,3,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
triclosan	0,18	0,33	0,23	< 10	897,4
estrone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	< 10
ethinylestradiol	δ.α.	δ.α.	0,33	δ.α.	62,8

Στην μονάδα επεξεργασίας του Βορείου άξονα νομού Χανίων αναλύθηκαν η εισροή των λυμάτων και εκροή της λιποσυλλογής. Επιπλέον, αναλύθηκε ιλύς από τρείς διαφορετικές δεξαμενές (πίνακας 4.6). Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που ανιχνεύτηκαν ήταν πολύ χαμηλές, με τις υψηλότερες να εμφανίζονται στην δεξαμενή 1 στην οποία γινόταν η χώνευση.

Πίνακας 4.6: Συγκεντρώσεις ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε σημεία δειγματοληψίας στις 16 Νοεμβρίου 2011 στην μονάδα επεξεργασίας Βορείου άξονα του δήμου Χανίων (Γεράνι).

Β.Άξονας 16 Νοεμβρίου 2011	Συγκέντρωση ουσιών στην υγρή φάση σε μg/L		Συγκέντρωση ουσιών στην ιλύ σε ng/g(dw)		
	Εισροή λυμάτων	Εκροή λιποσυλλογής	δεξαμενή 1	δεξαμενή 2	δεξαμενή 3
2,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
2,3,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
triclosan	δ.α.	δ.α.	< 10	< 10	< 10
estrone	δ.α.	δ.α.	< 10	δ.α.	δ.α.
ethinylestradiol	δ.α.	δ.α.	13,6	δ.α.	δ.α.

Στην μονάδα επεξεργασίας του Ρεθύμνου αναλύθηκαν η εισροή των λυμάτων καθώς και ιλύς σε τρία διαφορετικά στάδια (πίνακας 4.7). Οι συγκεντρώσεις και σε αυτήν την μονάδα ήταν χαμηλές.

Πίνακας 4.7: Συγκεντρώσεις ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε σημεία δειγματοληψίας στις 17 Νοεμβρίου 2011 στην μονάδα επεξεργασίας του δήμου Ρεθύμνου.

Ρεθύμνου 17 Νοεμβρίου 2011	Συγκέντρωση ουσιών στην υγρή φάση σε μg/L	Συγκέντρωση ουσιών στην ιλύ σε ng/g(dw)		
	Εισροή λυμάτων	ανακυκλοφορία	χώνευση (δεξ.1)	χώνευση (δεξ.3)
2,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
2,3,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
triclosan	0,1	< 10	< 10	< 10
estrone	0,2	< 10	<10	< 10
ethinylestradiol	δ.α.	δ.α.	31,2	δ.α.

Τέλος αναλύθηκαν δείγματα από την μονάδα επεξεργασίας του Ηρακλείου. Στην μονάδα αυτή ανιχνεύτηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην εισροή (πίνακας 4.8). Υψηλές ήταν επίσης οι συγκεντρώσεις του triclosan.

Πίνακας 4.8: Συγκεντρώσεις ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε σημεία δειγματοληψίας στις 17 Δεκεμβρίου 2011 στην μονάδα επεξεργασίας Ηρακλείου.

Ηράκλειο 17 Δεκεμβρίου 2011	Συγκέντρωση ουσιών στην υγρή φάση σε μg/L		Συγκέντρωση ουσιών στην ιλύ σε ng/g(dw)		
	Εισροή λυμάτων	Υγρή φάση ανακυκλοφορίας	Ανακυκλοφορία	Αναερόβια Χώνευση	Ταινιοφιλτρό-πρεσες (Αναερόβια)
2,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α
2,3,4phenol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α
triclosan	0,5	0,2	689,4	1769,8	1575,2
estrone	0,55	δ.α.	δ.α.	δ.α.	< 10
ethinylestradiol	0,65	δ.α.	δ.α.	δ.α.	42,2

Εκτός από τις ουσίες που μελετήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε, διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο πλήθος ουσιών ανιχνεύονται στην ιλύ. Κάποιες από αυτές είναι οι: Cholestanol, Androsterone, Norethindrone, Stanolone, Cortisone, Pregnane και Danazol. Οι περισσότερες από αυτές είναι ορμόνες ή περιέχονται σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Οι ουσίες αυτές ανιχνεύτηκαν τυχαία, κατά την ανάλυση δειγμάτων ιλύος, εφαρμόζοντας την μέθοδο που αναπτύχθηκε.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός 5 ενδοκρινικών διαταρακτών στην ιλύ. Αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της συμπεριφοράς των ουσιών αυτών σε μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Μπορεί έτσι να ερευνηθεί εκτενέστερα η απόδοση στην απομάκρυνση των ουσιών και να κατανοηθεί ο μηχανισμός της προσρόφησης-βιοδιασπασης που ευθύνεται για την απομάκρυνση.

Η μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα απλή διότι το πλέγμα της ιλύος είναι αρκετά δύσχρηστο στην επεξεργασία. Ο συνολικός χρόνος επεξεργασίας είναι αρκετά μεγάλος αλλά με οργανωμένες διατάξεις είναι δυνατόν να επεξεργάζονται αρκετά δείγματα ταυτόχρονα. Αρκετά χρονοβόρα είναι η ανάλυση των δειγμάτων με SPME καθώς κάθε δείγμα χρειάζεται 70min και μπορεί να αναλύεται μόνο ένα δείγμα τη φορά. Το κόστος ανάλυσης είναι αποδεκτό καθώς κάθε ίνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περίπου 40 δείγματα (κάθε ίνα κοστίζει περίπου 200€) και μια φιάλη αζώτου επαρκούσε επίσης για περίπου 40 δείγματα (κόστος φιάλης περίπου 50€).

Η μέθοδος παρουσιάζει καλή ακρίβεια, ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Οι ουσίες μπορούν να ανιχνεύονται σε επίπεδα μερικών ng/g ξηρής βιομάζας. Το γεγονός ότι η βαθμονόμηση έγινε στο πλέγμα της ιλύος την καθιστά αξιόπιστη. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει δημοσιευμένη μέθοδος για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταρακτών με SPME στην οποία η βαθμονόμηση να γίνεται στο πλέγμα της ιλύος. Παρόλο που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μόνο 5 ουσίες ανιχνεύτηκαν πολλές ακόμα ουσίες οι οποίες θα μπορούσαν θα συμπεριληφθούν, χωρίς να γίνουν αλλαγές στην μέθοδο.

Όσον αφορά στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στη μονάδα των Χανίων και στη μονάδα του Ηρακλείου. Οι δύο αυτές μονάδες είναι οι μεγαλύτερες από αυτές που μελετήθηκαν και δέχονται τη μεγαλύτερη ημερήσια παροχή λυμάτων. Αντιθέτως, στην μονάδα του Ρεθύμνου και του Βορείου άξονα οι συγκεντρώσεις ήταν πολύ μικρότερες. Το triclosan ήταν η ουσία που ανιχνεύτηκε σε μεγαλύτερο βαθμό και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τέλος, με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, οι συγκεντρώσεις στην χώνευση φαίνεται να αυξάνονται. Περισσότερες όμως δειγματοληψίες είναι απαραίτητες για να εξαχθεί ένα βέβαιο συμπέρασμα.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

- Μελέτη της ανάκτησης της μεθόδου σε διαφορετικού τύπου ιλύ.
- Εποχιακή μελέτη της συμπεριφοράς των ουσιών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων.
- Μελέτη της προσρόφησης των ουσιών μετρώντας την συγκέντρωση των ουσιών στην στερεή και υγρή φάση, προσομοιάζοντας πραγματικές συνθήκες (αρχική συγκέντρωση, θερμοκρασία, pH, ακτινοβολία).
- Μελέτη βιοδιάσπασης που πραγματοποιείται σε μονάδες επεξεργασίας και βελτιστοποίηση συνθηκών για την αύξηση της απομάκρυνσης.
- Επέκταση της μεθόδου για την ανίχνευση ουσιών που διαπιστώθηκε ότι εντοπίζονται στην ιλύ.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.htm

2. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC) Final Report August 1998 http://www.epa.gov/oscpmont/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm

3. Basile T., Petrella A., Petrella M., Boghetich G., Petruzzelli V., Colasuonno S., et al. (2011). Review of endocrine-disrupting-compound removal technologies in water and wastewater treatment plants: An EU perspective. *Industrial and Engineering Chemistry Research, 50*(14), 8389-8401

4. Frontistis Z., Xekoukoulotakis N.P., Hapeshi E., Venieri D., Fatta-Kassinos D., Mantzavinos D. (2011) Fast degradation of estrogen hormones in environmental matrices by photo-Fenton oxidation under simulated solar radiation, *Chemical Engineering Journal*, 178, 175-182

5. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/affect_en.htm

6. Janesick, A., & Blumberg, B. (2011). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews, 93*(1), 34-50

7. Bedoux, G., B. Roig, O. Thomas, V. Dupont, and B. Le Bot. 2011. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* : 1-22. Database on-line. Available from Scopus

8. Canosa, P., Morales, S., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., & Gómez, M. (2005). Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine.*Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383*(7-8), 1119-1126

9. Canosa, P., Rodriguez, I., Rubí, E., & Cela, R. (2005). Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. *Journal of Chromatography A, 1072*(1), 107-115

10. USEPA (United States Environmental Protection Agency) *Targeted national sewage sludge survey and analysis technical report, EPA-822-R-08-016. U.S*, Environmental Protection Agency, Washington, USA (2009)

11. T.A. Ternes, H. Andersen, D. Gilberg and M. Bonerz, (2002) Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.*, 74, 3498–3504

12. Zhang, Z., Y. Feng, P. Gao, C. Wang, and N. Ren. 2011. Occurrence and removal efficiencies of eight EDCs and estrogenicity in a STP. *Journal of Environmental Monitoring* 13, no. 5: 1366-1373. Database on-line. Available from Scopus

13. J.A. Citulski and K.Farahbakhsh (2010) Fate of Endocrine-Active Compounds during Municipal Biosolids Treatment: A Review, *Environ. Sci. Technol.*, *44* (22), 8367–8376

14. Muller, M., Combalbert, S., Delgenès, N., Bergheaud, V., Rocher, V., Benoît, P., et al. (2010). Occurrence of estrogens in sewage sludge and their fate during plant-scale anaerobic digestion. *Chemosphere,81*(1), 65-71

15. Y.K.K. Koh, T.Y. Chiu, A. Boobis, E. Cartmell, M.D. Scrimshaw & J.N. Lester (2008) Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater, *Environmental Technology*, 29(3), 245-267

16. 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. *Appl. Environ. Microbiol.,* 70, 5283-5289

17. Haiyan, R., Shulan, J., ud din Ahmad, N., Dao, W. and Chengwu, C.(2007) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17-alpha-ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere,* 66, 340-346

18. Weber, S., Leuschner, P., Kampfer, P., Dott, W. and Hollender, J. (2005) Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 67, 106-112

19. Stasinakis, A. S., Gatidou, G., Mamais, D., Thomaidis, N. S., & Lekkas, T. D. (2008). Occurrence and fate of endocrine disrupters in greek sewage treatment plants. *Water Research*, 42(6-7), 1796-1804

20. Xin Yang, Riley C. Flowers, Howard S. Weinberg, Philip C. Singer, (2011) Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant, *Water Research*, 45(16), 5218-5228

21. Shishir Kumar Behera, Hyeong Woo Kim, Jeong-Eun Oh, Hung-Suck Park, (2011) Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea, *Science of The Total Environment*, 409(20), 4351-4360

22. 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. *Environ. Sci. Technol*., 34, 5059-5066

23. 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. *Environ. Sci. Technol*., 38, 3028-3035

24. Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., & Ternes, T. A. (2003). Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 37(18), 4021-4026.

25. Teske S. S., Arnold R. G.(2008) Removal of natural and xeno-estrogens during conventional wastewater treatment *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7 (2), 107– 124

26. M. Kuster, M.J. Lopez, M.J.L. de Alda and D. Barcelo (2004) Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *Trac Trends Anal. Chem.*, 23**,** 790–798

27. Langdon K. A., Warne M. St. J., Smernik R. J., Shareef A., Kookana R.S., (2011) Selected personal care products and endocrine disruptors in biosolids: An Australia-wide survey, *Science of The Total Environment*, 409(6),1075-1081

28. Karnjanapiboonwong A., Suski J. G., Shah A. A., Cai Q., Morse A. N., Anderson T. A. (2011). Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site. *Water, Air, and Soil Pollution*, 216(1-4), 257-273

29. González-Mariño, I., Rodríguez, I., Quintana, J. B., & Cela, R. (2010). Matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of triclosan and methyl triclosan in sludge and sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 398(5), 2289-2297

30. Chen, X., & Bester, K. (2009). Determination of organic micro-pollutants such as personal care products, plasticizers and flame retardants in sludge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 395(6), 1877-1884

31. Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D., Bonerz, M.(2002). Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem*. 74, 3498–3504

32. Braga, O., Smythe, G.A., Schafer, A.I., Feitz, A.J. (2005). Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol*. 39, 3351–3358

33. Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barcelo, D., De Alda, M.L., Kuster, M., Delgenes, J.P., Hernandez-Raquet, G. (2008). Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem*. 27, 1649–1658

34. Nieto A., Borrull F., Pocurull E., Marcé R. M. (2008). Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1213(2), 224-230

35. Petrovic, M., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D.(2002). Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment. *J. Chromatogr. A* 959, 15–23.

36. Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Loffler, D., Keller, E., Lacida, B.B., Alder, A.C. (2005). Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS. *J. Chromatogr. A* 1067, 213–223.

37. Cespedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D. (2004). Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI–MS. *Anal. Bioanal. Chem*. 378, 697–708.

38. Gatidou G., Thomaidis N. S., Stasinakis A. S., Lekkas T. D. (2007) Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1138(1-2), 32-41

39. Miege, C., Dugay, J., Hennion, M.C., (2003). Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 995, 87–97.

40. Virginie Gabet, Cécile Miège, Philippe Bados, Marina Coquery(2007) Analysis of estrogens in environmental matrices, TrAC *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1113-1131

41. Pawliszyn J., Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York 1997

42. «Ανάπτυξη ταχέος αναλυτικού πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό ευρέως φάσματος οργανικών μικρορρύπων σε υγρά απόβλητα και νερά» Διδακτορική διατριβή, Αντωνίου Χρυσούλα, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2007

43. Jie Han, Wei Qiu, Wei Gao, (2010) Adsorption of estrone in microfiltration membrane filters, *Chemical Engineering Journal*, 165(3), 819-826

44. Maryon W. Ruchelman, (1967) Solubility studies of estrone in organic solvents using gas-liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, 19(1), 98-108

45. Sanchez-Prado L., Barro R., Garcia-Jares C., Llompart M., Lores M., Petrakis C., Kalogerakis N., Mantzavinos D., Psillakis E. (2008) Sonochemical degradation of triclosan in water and wastewater, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 689-694

46. Yong-Xiang Ren, Kazunori Nakano, Munehiro Nomura, Nobuo Chiba, Osamu Nishimura (2007) A thermodynamic analysis on adsorption of estrogens in activated sludge process, *Water Research*, 41(11), 2341-2348

47. Henrik Rasmus Andersen, Martin Hansen, Jesper Kjølholt, Frank Stuer-Lauridsen, Thomas Ternes, Bent Halling-Sørensen, (2005) Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment, *Chemosphere*, 61(1), 139-146

48. Chen, X., & Hu, J. (2010). Adsorption of natural estrogens and their conjugates by activated sludge. *Water, Air, and Soil Pollution, 206*(1-4), 251-261

49. Shi, L., Zho, X., Zhou, S., & Zhang, Y. (2011). Adsorption isotherm and thermodynamic of triclosan on activated sludge. Paper presented at the *2011 International Conference on Electric Technology and Civil Engineering, ICETCE 2011 - Proceedings,* 975-978

50. Wick, A., Marincas, O., Moldovan, Z., & Ternes, T. A. (2011). Sorption of biocides, triazine and phenylurea herbicides, and UV-filters onto secondary sludge. *Water Research, 45*(12), 3638-3652

51. Heinz Singer, Stephan Müller,Céline Tixier, and, and Laurent Pillonel (2002). Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments *Environmental Science & Technology*, *36* (23), 4998-5004

52. E. Barbot, I. Seyssiecq, N. Roche, B. Marrot,(2010). Inhibition of activated sludge respiration by sodium azide addition: Effect on rheology and oxygen transfer, *Chemical Engineering Journal*, 163(3), 230-235

53. Kai Xu, Willie F. Harper Jr, Dongye Zhao, (2008). 17α-Ethinylestradiol sorption to activated sludge biomass: Thermodynamic properties and reaction mechanisms, *Water Research*, 42(12), 3146-3152

54. Urase, T. & Kikuta, T. (2005). Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process, *Water research,* 39(7), 1289-1300

55. Shan Liu, Guang-Guo Ying, Jian-Liang Zhao, Feng Chen, Bin Yang, Li-Jun Zhou, Hua-jie Lai, (2011) Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218(10), 1367-1378

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

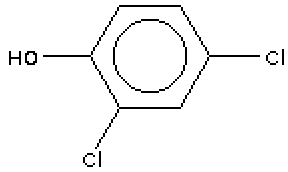
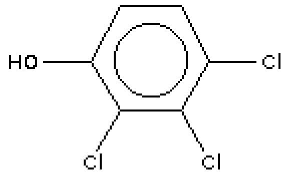
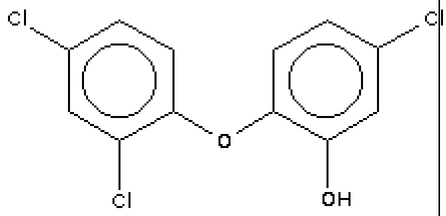
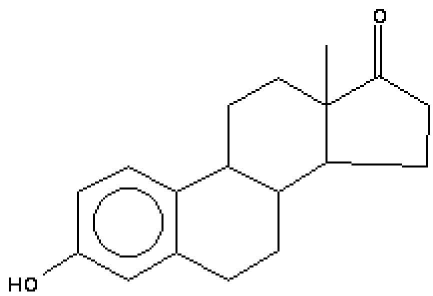
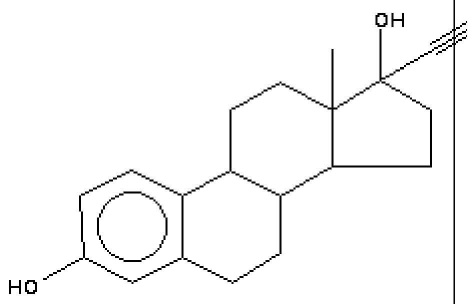
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: Ονομασίες, χημικοί τύποι και φάσματα μάζας ουσιών

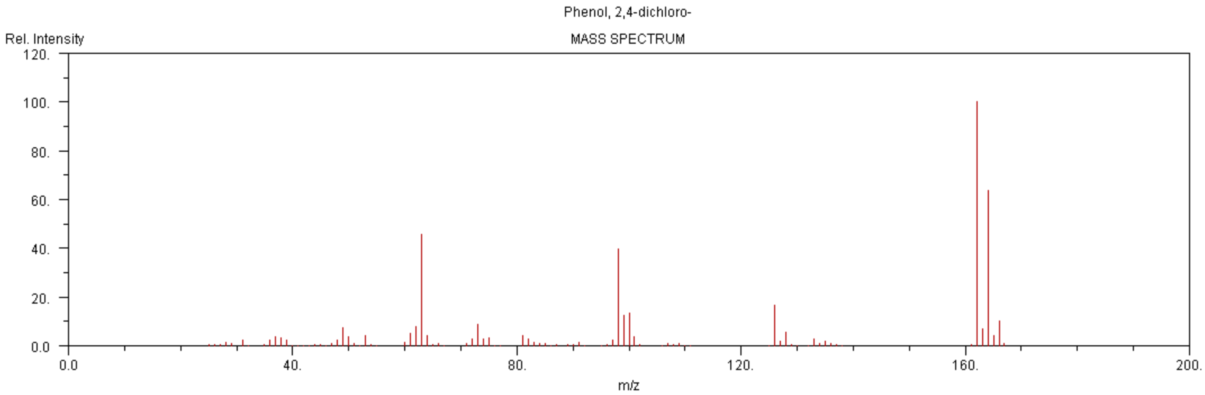
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Μονάδες Επεξεργασίας αστικών λυμάτων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ: Καμπύλες βαθμονόμησης

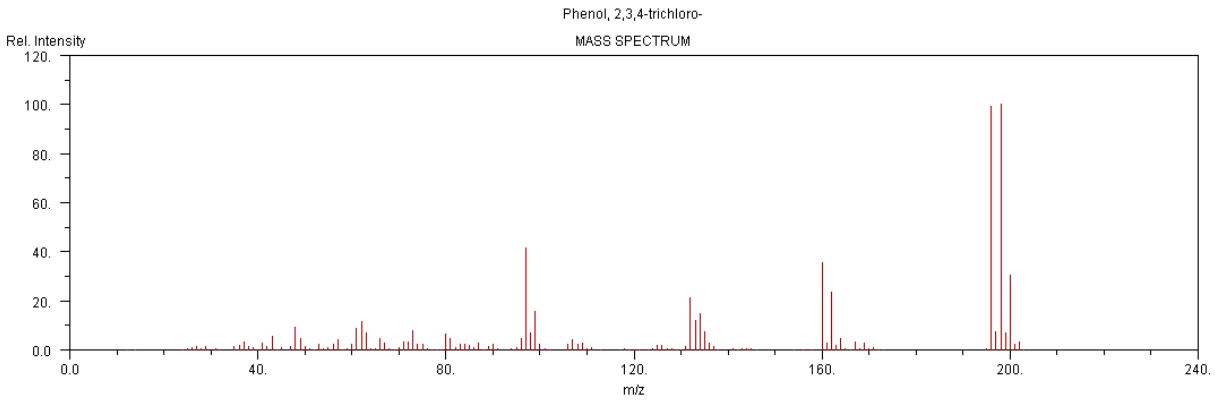
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Πίνακας 1: Ονομασία κατά IUPAC, μοριακό βάρος, μοριακός και συντακτικός τύπος ενώσεων.

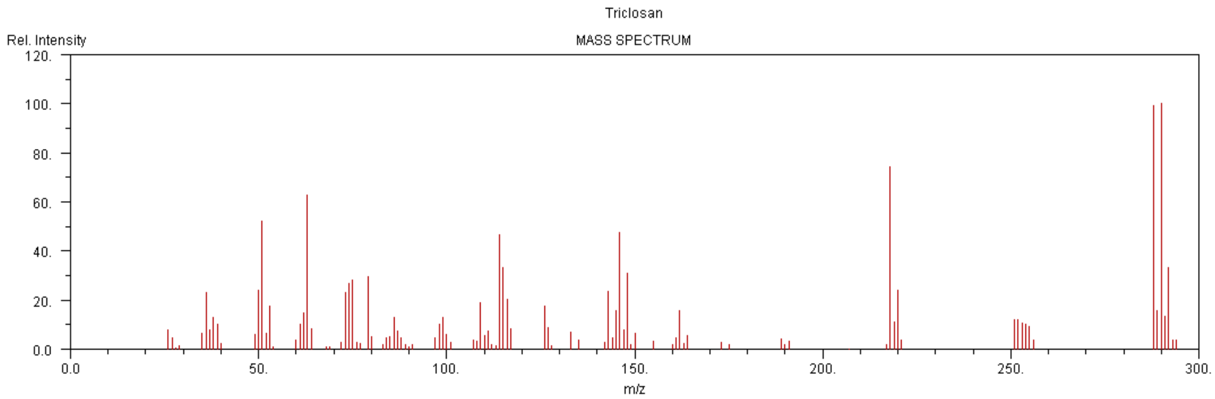
Ένωση	**Ονομασία κατά IUPAC**	**Μοριακό Βάρος**	**Μοριακός Τύπος**	**Συντακτικός Τύπος**
2,4-dichloro-phenol		163.0	$C_6H_4Cl_2O$	
2,3,4-trichlorophenol		197.4	$C_6H_3Cl_3O$	
Triclosan	5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)-phenol	289.5	$C_{12}H_7Cl_3O_2$	
Estrone	3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17- one	270.4	$C_{18}H_{22}O_2$	
17-α-ethinyl-estradiol	17-ethynyl-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a] phenanthrene-3,17-diol	296.4	$C_{20}H_{24}O_2$	



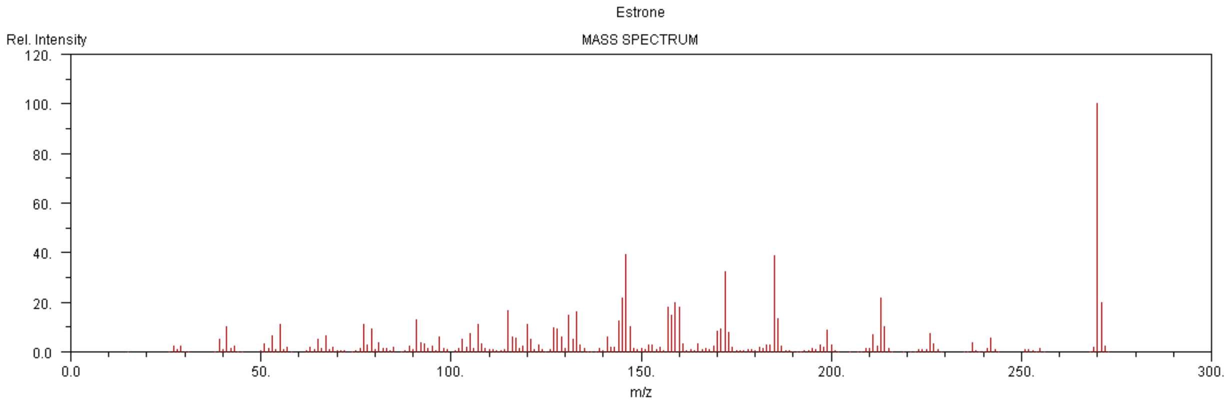
Σχήμα 1: Φάσμα μάζας της 2,4dichlorophenol (http://webbook.nist.gov/chemistry/)



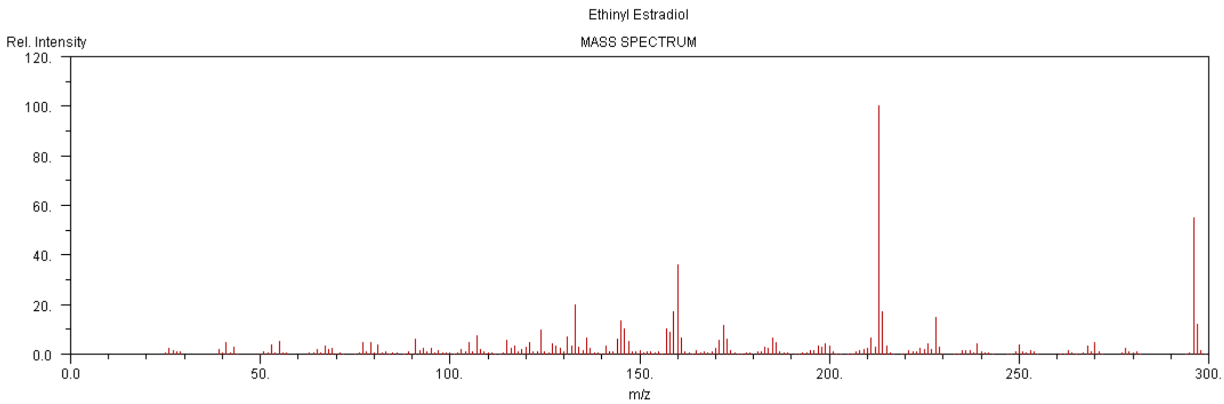
Σχήμα 2: Φάσμα μάζας της 2,3,4trichlorophenol (http://webbook.nist.gov/chemistry/)



Σχήμα 3: Φάσμα μάζας του triclosan (http://webbook.nist.gov/chemistry/)



Σχήμα 4: Φάσμα μάζας της estrone (http://webbook.nist.gov/chemistry/)



Σχήμα 5: Φάσμα μάζας της ethinylestradiol (http://webbook.nist.gov/chemistry/)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Α. Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Πόλεως Χανίων

Η εγκατάσταση βρίσκεται σε λειτουργία από το 1995 και προβλέπει την επεξεργασία αστικών λυμάτων που αντιστοιχούν σε 105.500 κατοίκους, βιομηχανικά απόβλητα που αντιστοιχούν σε 5.000 ισοδύναμους κατοίκους και βοθρολύματα που αντιστοιχούν σε 7.000 ισοδύναμους κατοίκους, δηλαδή συνολικά εξυπηρετεί 117.500 ισοδύναμους κατοίκους και 26.000 m^3/d.

Η επεξεργασία των λυμάτων γίνεται με τη μέθοδο της ενεργού ιλύος και η επεξεργασία της λάσπης με την μέθοδο της αναερόβιας χώνευσης με παράλληλη αξιοποίηση του παραγόμενου βιοαερίου για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Η εγκατάσταση έχει σχεδιαστεί για την απομάκρυνση του BOD5 κατά 96% και των αιωρούμενων στέρεων κατά 95% Τα βασικά τμήματα της εγκατάστασης είναι:

1. Αντλιοστάσιο Εισόδου Εγκατάστασης Τα λύματα αφού περάσουν μέσω δύο εσχάρων χονδρόκοκκων ανυψώνονται μέσω τεσσάρων αντλιών κατά 5.6m και από εκεί συνεχίζουν μέχρι την έξοδο με φυσική ροή. Η παροχή κάθε αντλίας είναι 830 m^3/d.

2. Εγκατάσταση Υποδοχής Βοθρολυμάτων Η δεξαμενή βοθρολυμάτων αποτελείται από 2 θαλάμους συνολικού όγκου 420 m^3. Πριν τις δεξαμενές έχει εγκατασταθεί συγκρότημα προεπεξεργασίας των βοθρολυμάτων (εσχαρισμός, εξάμμωση). Αυτό δέχεται μέσω τριών στεγανών υποδοχών τα βοθρολύματα των κατοίκων που δεν είναι συνδεδεμένοι με το δίκτυο αποχέτευσης της πόλεως καθώς και τα βοθρολύματα όλου του υπόλοιπου Νομού, τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται προς τις δεξαμενές βοθρολυμάτων.

3. Εσχάρωση Η εσχάρωση γίνεται με τρεις αυτόματες εσχάρες (η μία είναι εφεδρική) με διάκενο μεταξύ ράβδων 6mm.

4. Εξάμμωση - Αφαίρεση Λιπών Λειτουργούν δύο δεξαμενές εξάμμωσης, αφαίρεσης λιπών. Ο συνολικός όγκος της κάθε δεξαμενής είναι 118m^3 από τα οποία τα 75 m^3 είναι περιοχή εξάμμωσης και 43m^3 ο όγκος της περιοχής αφαίρεσης λιπών. Στα λύματα διοχετεύεται αέρας μέσω 11 κεραμικών διαχυτήρων. Με προβλεπόμενο χρόνο παραμονής των λυμάτων στην περιοχή εξάμμωσης μεγαλύτερο από 7min επιτυγχάνεται η αφαίρεση του 90% του αριθμού των σωματιδίων που έχουν διάμετρο μεταξύ 0.16 και 0.20 mm. Τα επιπλέοντα υλικά απομακρύνονται μέσω ειδικού μηχανισμού και συγκεντρώνονται σε φρεάτιο συλλογής. Επίσης λειτουργεί ειδική διάταξη έκπλυσης οργανικών και απομάκρυνσης της υγρασίας από την άμμο.

5. Πρωτοβάθμια Καθίζηση Υπάρχουν δύο δεξαμενές, διαμέτρου 22 μέτρων η καθεμία. Τα λύματα εισέρχονται στο κέντρο της δεξαμενής και εξέρχονται ακτινικά μέσω υπερχειλιστών. Η κάθε δεξαμενή είναι εφοδιασμένη με περιστρεφόμενη γέφυρα και φέρει ξέστρο στον πυθμένα για να παρασύρει την λάσπη στο κεντρικό φρεάτιο. Η μέση απόδοση της πρωτοβάθμιας καθίζησης είναι απομάκρυνση BOD5 κατά 33% και αιωρούμενων στερεών κατά 60%.

6. Δεξαμενή Επιλογής Στην δεξαμενή που έχει όγκο 485 m^3 αναμιγνύονται υπό ανοξικές συνθήκες τα πρωτοβάθμια λύματα με την ανακυκλοφορία από τις δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης. Η δεξαμενή έχει κατασκευαστεί για να εμποδίσει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων νηματοειδών βακτηριδίων στα επόμενα στάδια της εγκατάστασης.

7. Δεξαμενές Αερισμού Τα λύματα από την δεξαμενή επιλογής οδηγούνται μέσω μεριστών ροής στις τέσσερις δεξαμενές αερισμού που κάθε μια έχει διαστάσεις 60m μήκος 8.4m πλάτος και 4.5m ωφέλιμο βάθος. Σε κάθε δεξαμενή υπάρχει ανοξική και αερόβια ζώνη. Τα λύματα οξυγονώνονται μέσω διαχυτήρων μεμβράνης λεπτής φυσαλλίδος που βρίσκονται στον πυθμένα των δεξαμενών. Παράλληλα με την αφαίρεση του οργανικού φορτίου γίνεται και νιτρικοποίηση. Για την απομάκρυνση του αζώτου γίνεται μερική απονιτρικοποίηση στην ανοξική ζώνη μέσω ανακυκλοφορίας των νιτρικοποιημένων εκροών. Ο συνολικός όγκος των δεξαμενών είναι 9072 m^3.

8. Δεξαμενές Δευτεροβάθμιας Καθίζησης Υπάρχουν τρεις δεξαμενές διαμέτρου 33m και όγκου 2130 m^3 η κάθε μια. Η ροή εισόδου των λυμάτων έχει την ίδια μορφή με την πρωτοβάθμια, ενώ για την εκροή οι δύο (παλαιότερες δεξαμενές) φέρουν περιμετρικούς επιφανειακούς υπερχειλιστές και η νεότερη υποεπιφανειακούς ακτινικούς σωλήνες υπερχείλισης. Η πλεονάζουσα ιλύς αντλείται προς την μηχανική πάχυνση και η ιλύς ανακυκλοφορίας αντλείται προς τη δεξαμενή επιλογής.

9. Δεξαμενή Χλωρίωσης Η απολύμανση των λυμάτων επιτυγχάνεται μέσω τροφοδοσίας διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου με 15% ενεργό χλώριο. Ο χρόνος επαφής είναι 30 min με σχεδιαζόμενη συγκέντρωση. Στο τέλος την δεξαμενής χλωρίου γίνεται και αποχλωρίωση των λυμάτων. Ο υποθαλάσσιος αγωγός διάθεσης από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας διαμέτρου 710 mm έχει μήκος 110 m και καταλήγει σε βάθος 16m.

10. Μηχανική Πάχυνση της Λάσπης Η δευτεροβάθμια λάσπη υφίσταται πάχυνση με δύο φυγόκεντρους δυναμικότητας κάθε μιας 25 m^3/h και 175 kg/h και ακολούθως οδηγείται στην προπάχυνση, ενώ υπάρχει δυνατότητα απ' ευθείας παροχέτευσης και στους χωνευτές ή στην μεταπάχυνση.

11. Προπάχυνση Πρωτοβάθμια & Δευτεροβάθμια λάσπη τροφοδοτείται στο κέντρο δύο δεξαμενών διαμέτρου 8.5m η κάθε μια. Η ιλύς κινούμενη ακτινικά προς την περιφέρεια της δεξαμενής καθιζάνει υποβοηθούμενη από μια περιστρεφόμενη γέφυρα που φέρει κάθετους ράβδους υπό μορφή κτένας. Ο κάθε προπαχυντής έχει όγκο 200 m^3. Από τον πυθμένα των δεξαμενών η λάσπη τροφοδοτείται προς τους χωνευτές.

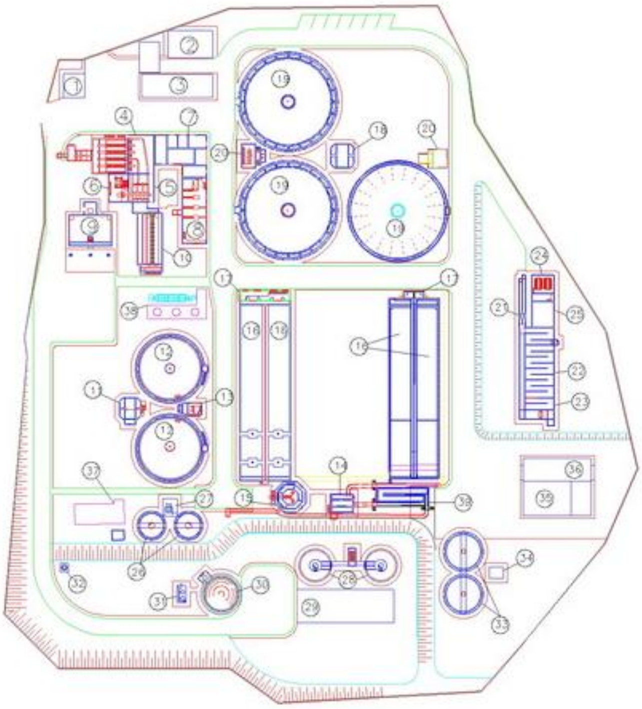
12. Αναερόβιοι Χωνευτές Η παχυμένη ιλύς με δύο περιστροφικές ογκομετρικές αντλίες (Mohno) μέγιστης παροχής 22 m^3/h και μανομετρικού 40m αντλείται προς τους δύο χωνευτές συνολικού όγκου 3100 m^3 αφού θερμανθεί μέσω δύο εναλλακτών σε θερμοκρασία 35oC (Μεσοφιλική ζώνη). Με την αναερόβια χώνευση επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση της λάσπης με την αποσύνθεση των οργανικών ενώσεων απουσία αέρος. Παράλληλα, το παραγόμενο αέριο (βιοαέριο) που περιέχει μεθάνιο σε ποσοστό περίπου 70%, αφού υποστεί αποθείωση, μεταφέρεται στο αεριοφυλάκιο μεταβλητού διαμέτρου 12.8m και όγκου 650m^3 . Το βιοαέριο χρησιμοποιείται για τη θέρμανση των χωνευτών και για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας που επαναχρησιμοποιείται για τις ανάγκες του έργου.

13. Μεταπάχυνση Η σταθεροποιημένη ιλύς οδηγείται από τους χωνευτές σε δύο κυκλικές δεξαμενές διαμέτρου 11m οι οποίες λειτουργούν όπως οι δεξαμενές προπάχυνσης. Η λάσπη παχύνεται και στη συνέχεια οδηγείται προς αφυδάτωση. Η κάθε δεξαμενή έχει όγκο 300 m^3.

14. Αφυδάτωση Λάσπη από την μεταπάχυνση τροφοδοτείται προς την αφυδάτωση. Η αφυδάτωση επιτυγχάνεται με δύο ταινιοφιλτρόπρεσσες μετά από κροκίδωση της λάσπης με πολυηλεκτρολύτη. Η συγκέντρωση στερεών της αφυδατωμένης λάσπης είναι περίπου 20%.

Πίνακας 2: Τιμές παροχών της μονάδας επεξεργασίας Χανίων για το έτος 2007.

Παράμετρος	Μονάδες	Τιμή
Δυναμικότητα μονάδας	m^3/d	26.000
Μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	18.329
Μέγιστη ημερήσια παροχή	m^3/d	22.194
Θερινή παροχή	m^3/d	20.725
Χειμερινή παροχή	m^3/d	15.820
Παραγωγή αφυδατωμένης ιλύος	tn/month	474



1. ΦΥΛΑΚΙΟ ΕΙΣΟΔΟΥ
2. ΚΑΤΟΙΚΙΑ ΦΥΛΑΚΑ
3. ΔΙΟΙΚΗΤΗΡΙΟ - ΧΗΜΙΚΟ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
4. ΑΙΘΟΥΣΑ ΚΙΝΗΤΗΡΩΝ ΚΟΧΛΙΩΝ ΑΡΧΙΜΗΔΗ
5. ΑΙΘΟΥΣΑ ΕΣΧΑΡΩΝ
6. ΚΤΙΡΙΟ ΠΛΥΣΗΣ ΑΜΜΟΥ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΕΣΧΑΡΩΜΑΤΩΝ
7. ΚΤΙΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΣΙΟΥ
8. ΚΤΙΡΙΟ ΑΕΡΟΣΥΜΠΙΕΣΤΩΝ
9. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΚΑΙ ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ ΒΟΘΡΟΛΥΜΑΤΩΝ
10. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΑΜΜΟΣΥΛΟΓΗΣ ΛΙΠΟΣΥΛΛΟΓΗΣ
11. ΜΕΡΙΣΤΗΣ ΡΟΗΣ ΠΡΟΣ Α ΚΑΘΙΖΗΣΗ
12. ΔΕΞΑΜΕΝΗ Α ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ
13. ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ Α' ΒΑΘΜΙΑΣ ΛΑΣΠΗΣ
14. ΠΡΟΜΕΡΙΣΤΗΣ ΑΕΡΙΣΜΟΥ
15. ΜΕΡΙΣΤΗΣ ΑΕΡΙΣΜΟΥ
16. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΑΕΡΙΣΜΟΥ
17. ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ ΕΠΑΝΑΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ ΑΕΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ
18. ΜΕΡΙΣΤΗΣ ΡΟΗΣ Β ΚΑΘΙΖΗΣΗ
19. ΔΕΞΑΜΕΝΗ Β ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ
20. ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ ΕΠΑΝΑΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ ΑΕΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ
21. ΜΕΤΡΗΤΗΣ ΠΑΡΟΧΗΣ (VERTURI)
22. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΧΛΩΡΙΩΣΗΣ
23. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΑΝΑΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΦΡΕΑΤΙΟ ΦΟΡΤΙΣΗΣ ΥΠΟΘΑΛΑΣΣΙΟΥ
24. ΚΤΙΡΙΟ ΧΛΩΡΙΩΣΗΣ
25. ΚΤΙΡΙΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΟΥ ΝΕΡΟΥ
26. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΠΡΟΠΑΧΥΝΣΗΣ
27. ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ ΠΡΟΠΑΧΥΝΣΗΣ
28. ΧΩΝΕΥΤΗΣ ΙΛΥΟΣ
29. ΚΤΙΡΙΟ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ
30. ΑΕΡΟΦΥΛΑΚΙΟ
31. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΠΟΘΕΙΩΣΗΣ
32. ΔΑΥΛΟΣ ΚΑΥΣΗΣ
33. ΔΕΞΑΜΕΝΗ ΜΕΤΑΠΑΧΥΝΣΗΣ
34. ΑΝΤΛΙΟΣΤΑΣΙΟ ΜΕΤΑΠΑΧΥΝΣΗΣ
35. ΚΤΙΡΙΟ ΑΦΥΔΑΤΩΣΗΣ
36. ΚΤΙΡΙΟ ΣΥΝΕΡΓΕΙΟΥ ΟΧΗΜΑΤΩΝ – ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΩΝ
37. ΣΥΓΚΡΟΤΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΠΑΧΥΝΣΗΣ
38. ΚΤΙΡΙΟ ΑΠΟΣΜΗΣΗΣ

Σχήμα 6: Υπόμνημα βιολογικού Χανίων. (http://www.deyax.org.gr/)

Β. Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Βορείου Άξονα (Νομός Χανίων)

Τα λύματα φτάνουν στην εγκατάσταση από το κεντρικό αντλιοστάσιο, μέσω καταθλιπτικού αγωγού στο φρεάτιο εισόδου. Το στάδιο της προεπεξεργασίας στεγάζεται σε ένα κτίριο 325 m^2 , που διαθέτει σύστημα απόσμησης για την κατακράτηση των οσμών.

1.Χονδροεσχάρες Με ειδικά κανάλια τα λύματα οδηγούνται στις χονδροεσχάρες, όπου και συγκρατούνται τα ογκώδη αντικείμενα, που μπορεί να υπάρχουν στον όγκο των λυμάτων.

2.Προαερισμός Στη συνέχεια τα λύματα φτάνουν στο φρεάτιο προαερισμού, όπου μέσω διαχυτήρων γίνεται μία πρώτη οξυγόνωση. Μηχανοκίνητες σχάρες Κατόπιν, μέσω καναλιών τα λύματα φτάνουν σε δύο αυτόματες μηχανοκίνητες περιστρεφόμενες σχάρες, όπου απομακρύνονται τα μικρότερου όγκου στερεά.

3.Εξάμμωση Μετά τις σχάρες τα λύματα εισέρχονται στα 2 κανάλια του εξαμμωτή, μήκους 16m, όπου κατακρατείται η άμμος και τα άλλα στερεά σωματίδια. Στα κανάλια αυτά, τα λύματα αερίζονται συνεχώς, ώστε να μην κατακάθονται οι οργανικές ουσίες ενώ η άμμος καθιζάνει στον πυθμένα και απομακρύνεται από ειδικό ξέστρο, που μετακινείται σε όλο το μήκος των καναλιών.

4.Λιποσυλλογή Παράλληλα με τα κανάλια εξάμμωσης βρίσκονται 2 ακόμα κανάλια, μέσα στα οποία το λύμα ηρεμεί και με ειδικό επιφανειακό μετακινούμενο ξέστρο απομακρύνονται τα επιπλέοντα λίπη.

5.Μετρητής ροής Τα λύματα στη συνέχεια διέρχονται από δίαυλο τύπου Parchall, όπου με ένα αισθητήρα υπερήχων γίνεται η μέτρηση της ροής.

6.Σύστημα απόσμησης Ειδικοί αεραγωγοί απορροφούν από το κτίριο προεπεξεργασίας τον αέρα και τον διοχετεύουν στη χημική πλυντηρίδα, όπου με την προσθήκη κατάλληλων χημικών, απομακρύνονται οι ενώσεις, που προκαλούν δυσοσμία. Η χημική πλυντηρίδα είναι 3 βαθμιδών. Στο 1ο στάδιο διοχετεύεται διάλυμα καυστικού νατρίου, οπότε και παρακρατούνται οι ενώσεις του θείου ενώ στο 2ο και 3ο στάδιο διοχετεύεται μίγμα διαλύματος καυστικού νατρίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου όπου γίνεται οξείδωση των ενώσεων του θείου. Το αποτέλεσμα είναι η απόσμηση του αέρα σε ποσοστό τουλάχιστον 99,5%.

7.Δεξαμενές αερισμο Τα λύματα μετά από το στάδιο προεπεξεργασίας οδηγούνται σε τρείς δεξαμενές αερισμού, συνολικού όγκου 13.000 m^3 (δυο δεξαμενές όγκου 3250m^3 και μια όγκου 6500m^3). Προστίθεται συνεχώς οξυγόνο, μέσω 4 ζευγαριών περιστρεφόμενων επιφανειακών αεριστήρων. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται η νιτροποίηση & η απονιτροποίηση των λυμάτων για την απομάκρυνση του αζώτου. Στις περιοχές των δεξαμενών αερισμού που υπάρχει περίσσεια οξυγόνου (κοντά στους ρότορες), κατάλληλοι νιτροποιητικοί μ/ο οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρικά (νιτροποίηση). Στη συνέχεια σε ανοξικές ζώνες απονιτροποιητικοί μ/ο καταναλώνουν το οξυγόνο των νιτρικών (NO3) με αποτέλεσμα την αναγωγή των νιτρικών σε αέριο άζωτο που εκλύεται στην ατμόσφαιρα. Με την διεργασία της ταυτόχρονης νιτροποίησης και απονιτροποίησης, απομακρύνεται το άζωτο από τα λύματα.

8.Δεξαμενές καθίζισης Σε δύο κυκλικές δεξαμενές διαμέτρου 30m και συνολικού όγκου 3.974,4m^3 διοχετεύεται η βιομάζα , όπου καθιζάνει σε συνθήκες ηρεμίας με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται το καθαρό νερό υπερχειλίζοντας από το πάνω μέρος προς τη χλωρίωση, ενώ η λάσπη να παραμένει στον πυθμένα, που με ειδικό περιστρεφόμενο ξέστρο οδηγείται στα αντλιοστάσια ανακυκλοφορίας & περίσσειας. Μέρος της λάσπης από την καθίζηση επιστρέφει στις δεξαμενές αερισμού με τις αντλίες ανακυκλοφορίας. Η επιπλέον λάσπη οδηγείται με τις 2 αντλίες προς το στάδιο της αφυδάτωσης.

9.Παχυντές Από τον πυθμένα των δεξαμενών καθίζησης η λάσπη οδηγείται σε 2 δεξαμενές πάχυνσης. Πρόκειται για δύο κυλινδρικές δεξαμενές διαμέτρου 8m και συνολικού όγκου 352 m^3 , όπου η λάσπη εισέρχεται με συγκέντρωση περίπου 1%, συμπυκνώνεται με τη βοήθεια της βαρύτητας και εξέρχεται προς το στάδιο της αφυδάτωσης με συγκέντρωση 3 – 4,5%.

10.Ταινιόφιλτρόπρεσσες Η αφυδάτωση της παχυμένης λάσπης γίνεται μηχανικά με τη χρήση 2 ταινιοφιλτροπρεσσών. Η λάσπη από τους παχυντές, αφού αναμιχθεί με ειδικό πολυηλεκτρολύτη που τη βοηθάει να κροκιδωθεί, περνάει από τις ταινίες των 2 πρεσσών, συμπιέζεται και αφυδατώνεται. Η συγκέντρωση της λάσπης είναι περίπου 20% στερεά και 80% υγρασία. Κατά την έξοδο της ιλύος από τις πρέσσες προστίθεται ασβέστης για απολύμανση και καλύτερη σταθεροποίηση της.

http://www.deyaba.gr/

Πίνακας 3: Τιμές παροχών της μονάδας του Βορείου άξονα νομού Χανίων.

Παράμετρος	Μονάδες	Τιμή
Δυναμικότητα μονάδας	m^3/d	16.000
Θερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	6.500
Χειμερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	2.500
Παραγωγή αφυδατωμένης ιλύος	tn/month	360

Γ. Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Ρεθύμνου.

Πίνακας 4: Τιμές παροχών της μονάδας του Ρεθύμνου.

Παράμετρος	Μονάδες	Τιμή
Δυναμικότητα μονάδας	m^3/d	17.880
Θερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	13.000
Χειμερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	9.000
Παραγωγή αφυδατωμένης ιλύος	tn/month	180

Δ. Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Ηρακλείου.

Πίνακας 5: Τιμές παροχών της μονάδας του Ηρακλείου.

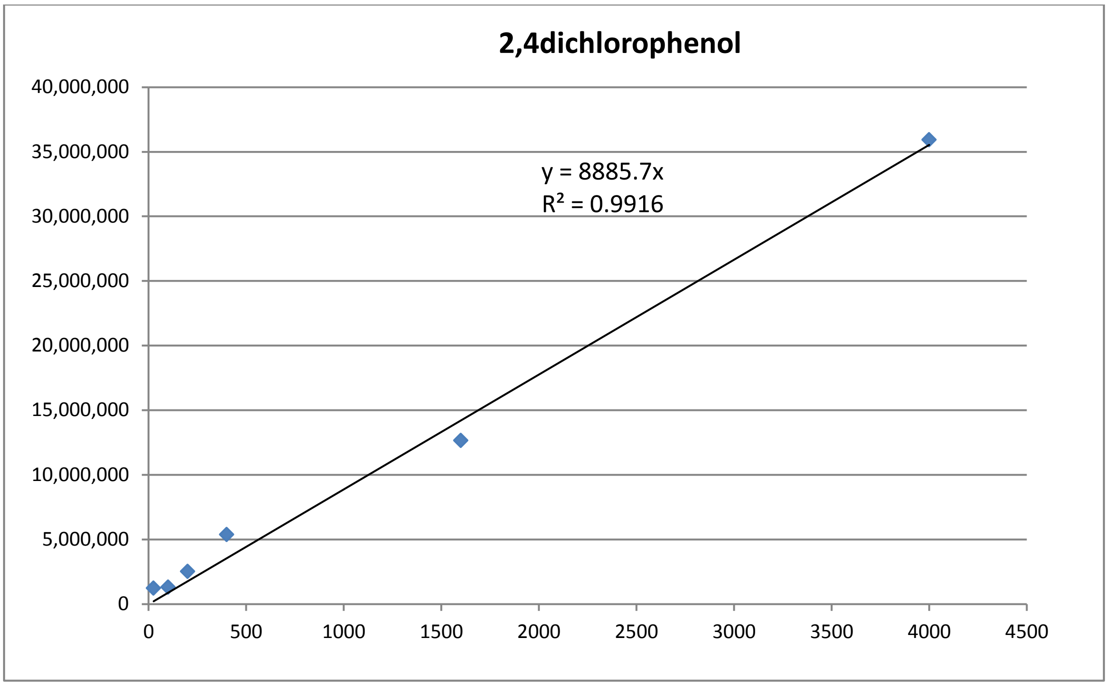
Παράμετρος	Μονάδες	Τιμή
Δυναμικότητα μονάδας	m^3/d	32.000
Θερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	47.089
Χειμερινή μέση ημερήσια παροχή	m^3/d	30.530

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

1. Καμπύλες βαθμονόμησης στην ιλύ

Πίνακας 6: Μετρήσεις εμβαδών της 2,4dichlorophenol για συγκεντρώσεις 25-4000 ng/g(dw).

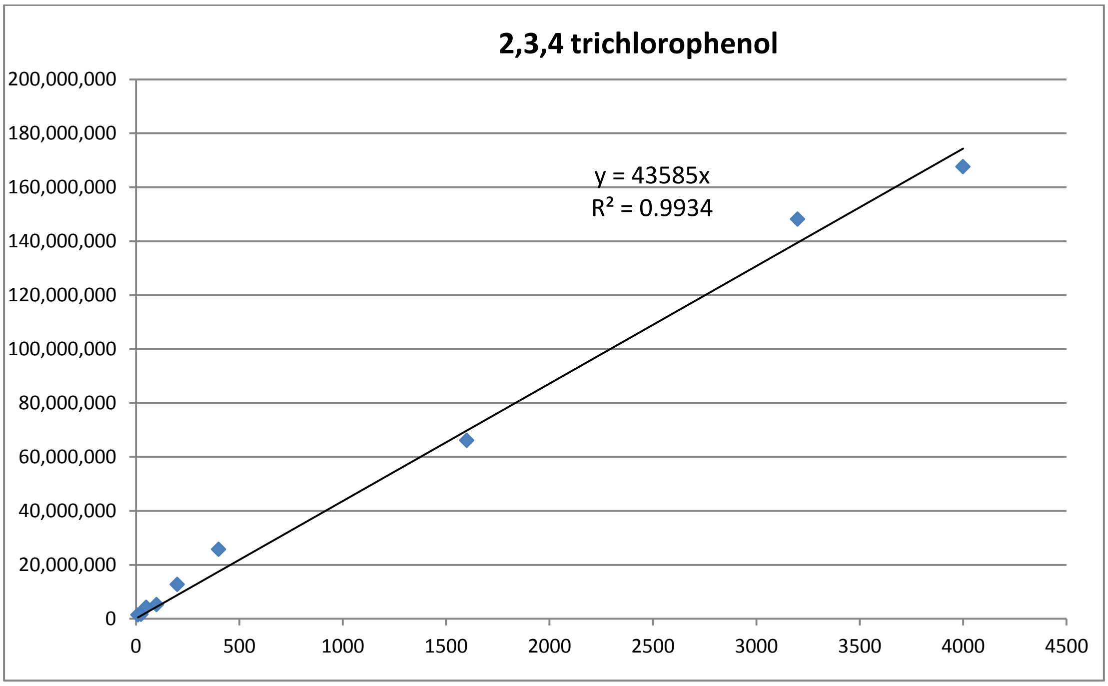
Συγκέντρωση ng/g(dw)	Εμβαδόν
25	1.228.098
100	1.305.449
200	2.522.273
400	5.376.453
1600	12.656.123
4000	35.931.020



Σχήμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης της 2,4dichlorophenol.

Πίνακας 7: Μετρήσεις εμβαδών της 2,3,4trichlorophenol για συγκεντρώσεις 10-4000 ng/g(dw).

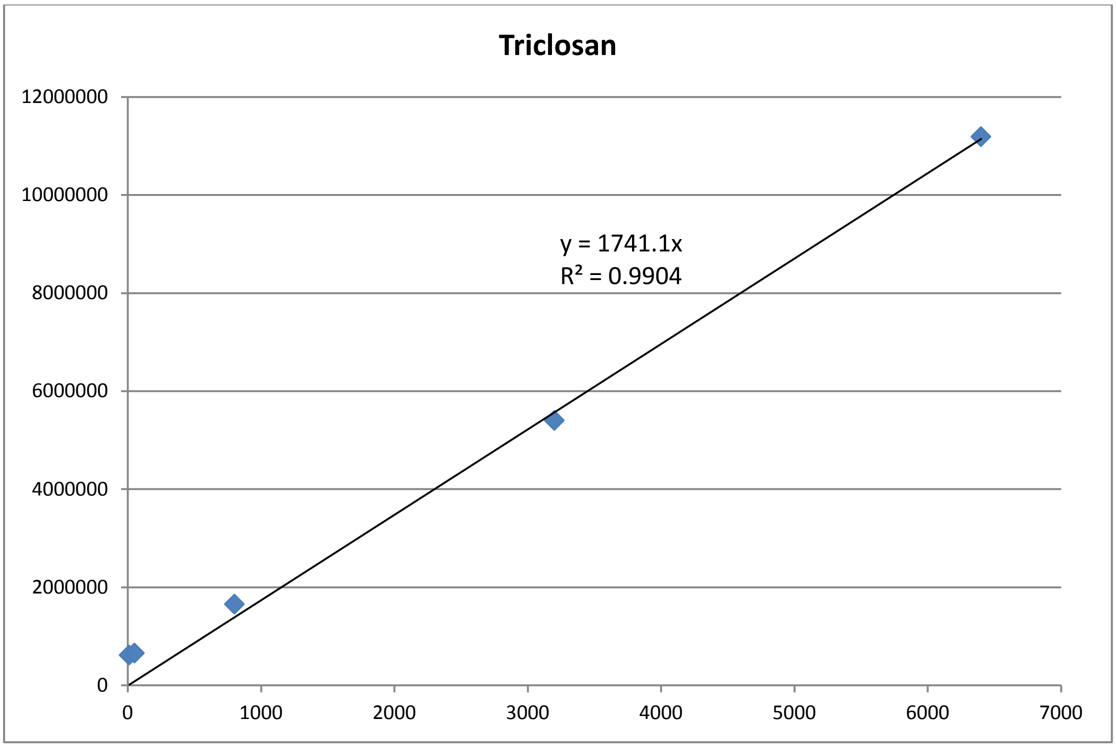
Συγκέντρωση ng/g(dw)	Εμβαδόν
10	1.460.322
25	1.660.256
50	4.285.428
100	5.294.059
200	12.761.987
400	25.777.885
1600	66.174.630
3200	148.223.645
4000	167.674.199



Σχήμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης της 2,3,4trichlorophenol.

Πίνακας 8: Μετρήσεις εμβαδών του triclosan για συγκεντρώσεις 10-4000 ng/g(dw).

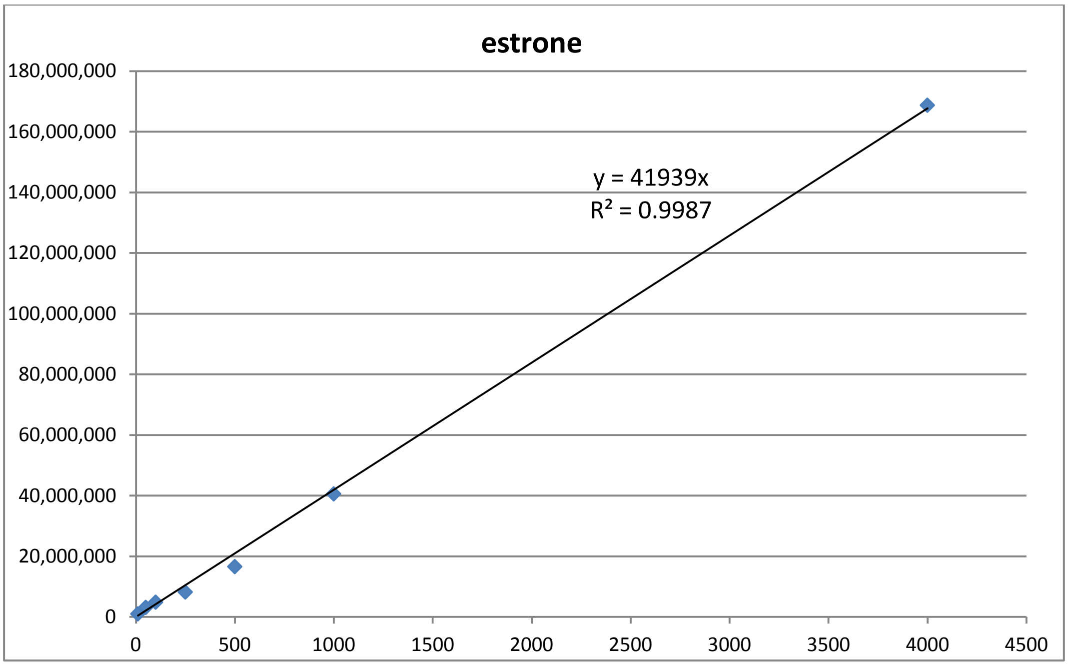
Συγκέντρωση ng/g(dw)	Εμβαδόν
10	617.021
50	658.014
800	1.656.141
3200	5.402.003
6400	11.189.362



Σχήμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης του triclosan.

Πίνακας 9: Μετρήσεις εμβαδών της estrone για συγκεντρώσεις 10-4000 ng/g(dw).

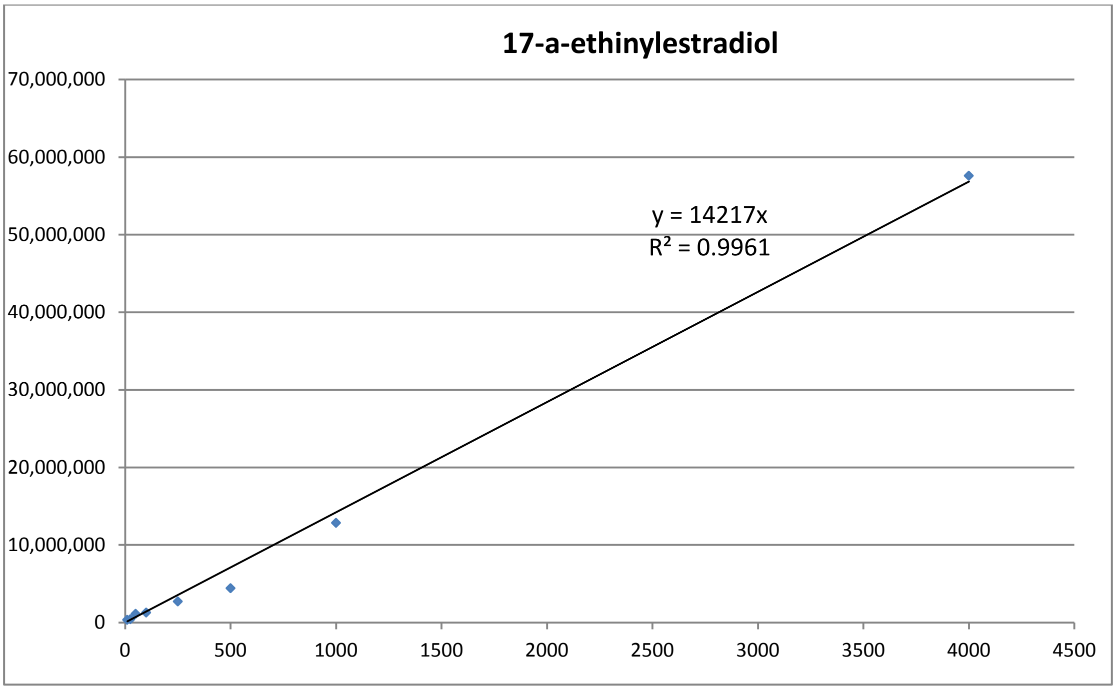
Συγκέντρωση ng/g(dw)	Εμβαδόν
10	1.000.341
50	3.149.820
100	4.864.671
250	8.204.510
500	16.585.981
1.000	40.577.641
4.000	168.753.322



Σχήμα 10: Καμπύλη βαθμονόμησης της estrone.

Πίνακας 10: Μετρήσεις εμβαδών της 17-α-ethinylestradiol για συγκεντρώσεις 10-4000 ng/g(dw).

Συγκέντρωση ng/g(dw)	Εμβαδόν
10	337.737
25	412.275
50	1.110.549
100	1.270.442
250	2.703.436
500	4.412.008
1.000	12.838.695
4.000	57.599.394



Σχήμα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης της 17-α-ethinylestradiol.

Πίνακας 11: Πίνακας υπολογισμών ορίων.

	LOQ	peak area	noise1	noise2	average noise	peak/avg	LOD
2,4dichloro-phenol	25ng/g	1.228.098	122740	79620	101180	12,1	6,2
2,3,4 trichlorophenol	10ng/g	1.460.322	127674	125853	126763,5	11,5	2,6
triclosan	10ng/g	617.021	35806	103195	69500,5	8,9	3,4
estrone	10ng/g	1.000.341	95069	88562	91815,5	10,9	2,8
17-a-ethinylestradiol	10ng/g	337.737	28301	33786	31043,5	10,9	2,8

Πίνακας 12: Πίνακας υπολογισμών RSD%

	Concentration	average area	standar deviation	RSD%
2,4dichloro-phenol	200ng/g	2.522.273	238.767	9,5
	400ng/g	5.376.453	804.903	15,0
	1600ng/g	12.656.123	1.220.369	9,6
			average:	**11,4**
2,3,4 trichlorophenol	50ng/g	4.966.171	637.943	12,8
	200ng/g	12.761.987	385.775	3,0
	400ng/g	25.777.885	3.277.466	12,7
			average:	**9,5**
triclosan	800ng/g	1.656.141	410.986	24,8
	3200ng/g	5.402.003	520.450	9,6
	6400ng/g	11.189.362	121.267	1,1
			average:	**11,8**
estrone (E1)	250ng/g	8.204.510	872.065	10,6
	500ng/g	16.585.981	1.462.342	8,8
	4000ng/g	168.753.322	1.492.769	0,9
			average:	**6,8**
17-a-ethinylestradiol (EE2)	500ng/g	4.412.008	269.699	6,1
	1000ng/g	12.838.695	1.563.927	12,2
	4000ng/g	57.599.394	1.396.158	2,4
			average:	**6,9**

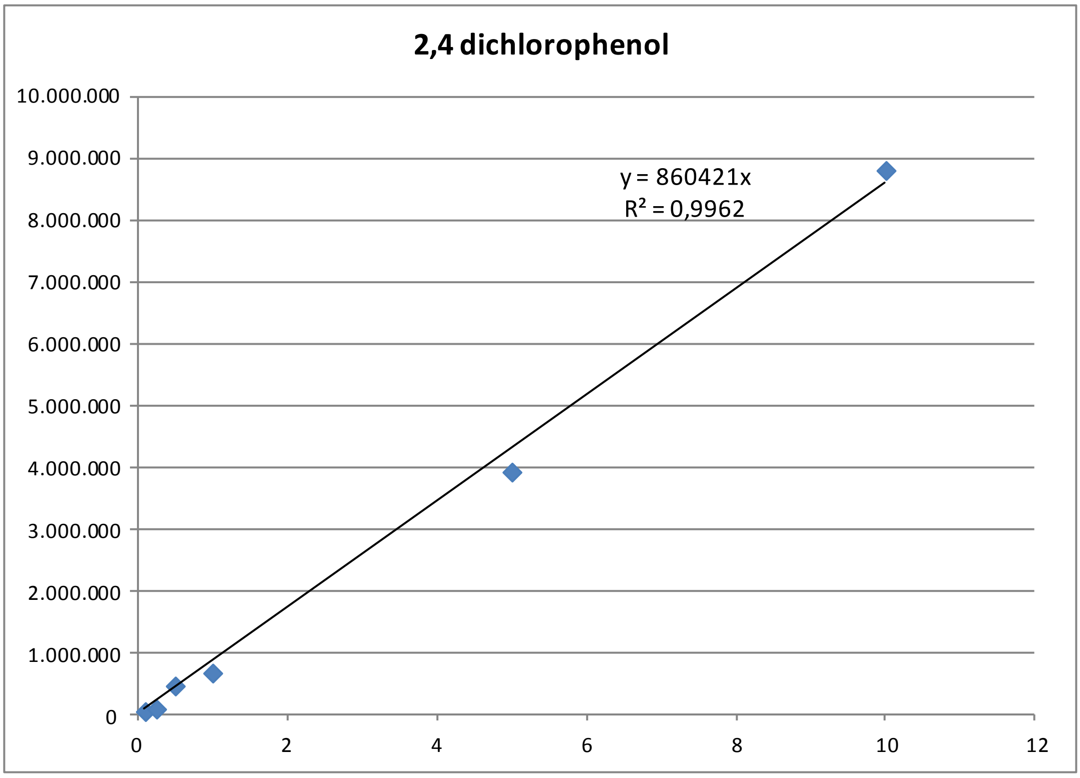
RSD% = $\overline{}$

Σχήμα 12: Εξίσωση υπολογισμού RSD%.

2. Καμπύλες βαθμονόμησης στην υγρή φάση

Πίνακας 13: Μετρήσεις εμβαδών της 2,4dichlorophenol για συγκεντρώσεις 0.1-10 μg/L.

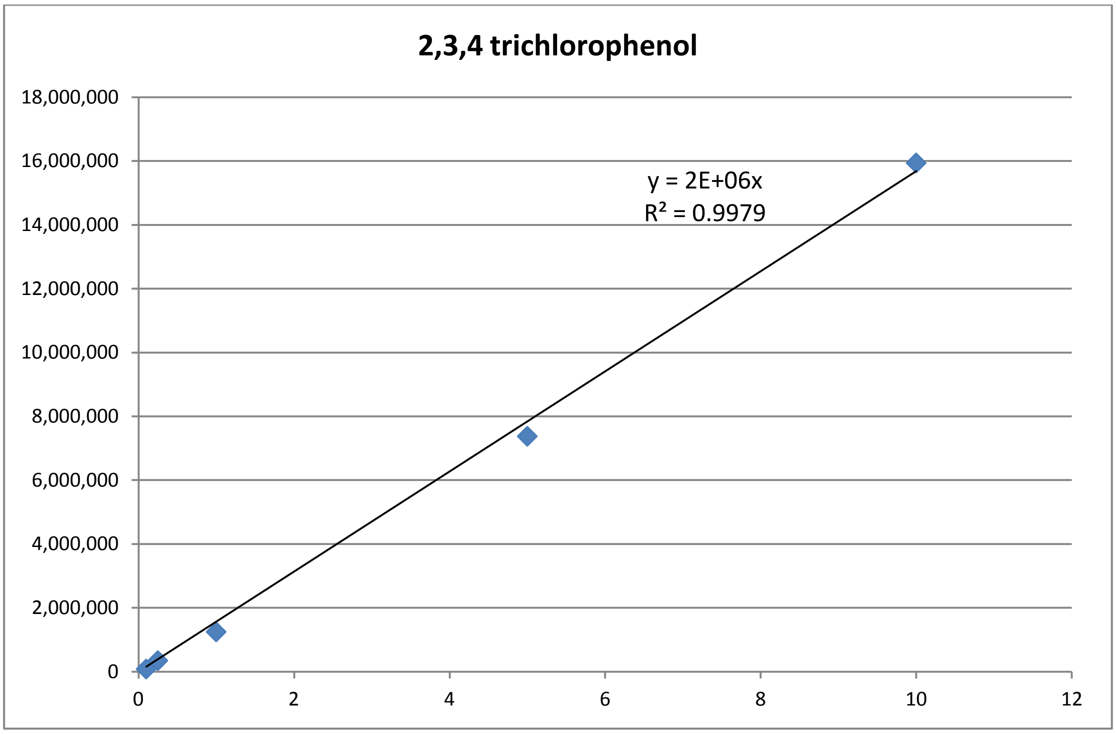
Συγκέντρωση (μg/L)	Εμβαδόν
0,1	56.230
0,25	96.442
0,5	470.439
1	679.203
5	3.930.500
10	8.809.392



Σχήμα 13: Καμπύλη βαθμονόμησης της 2,4dichlorophenol.

Πίνακας 14: Μετρήσεις εμβαδών της 2,3,4trichlorophenol για συγκεντρώσεις 0,1-10 μg/L.

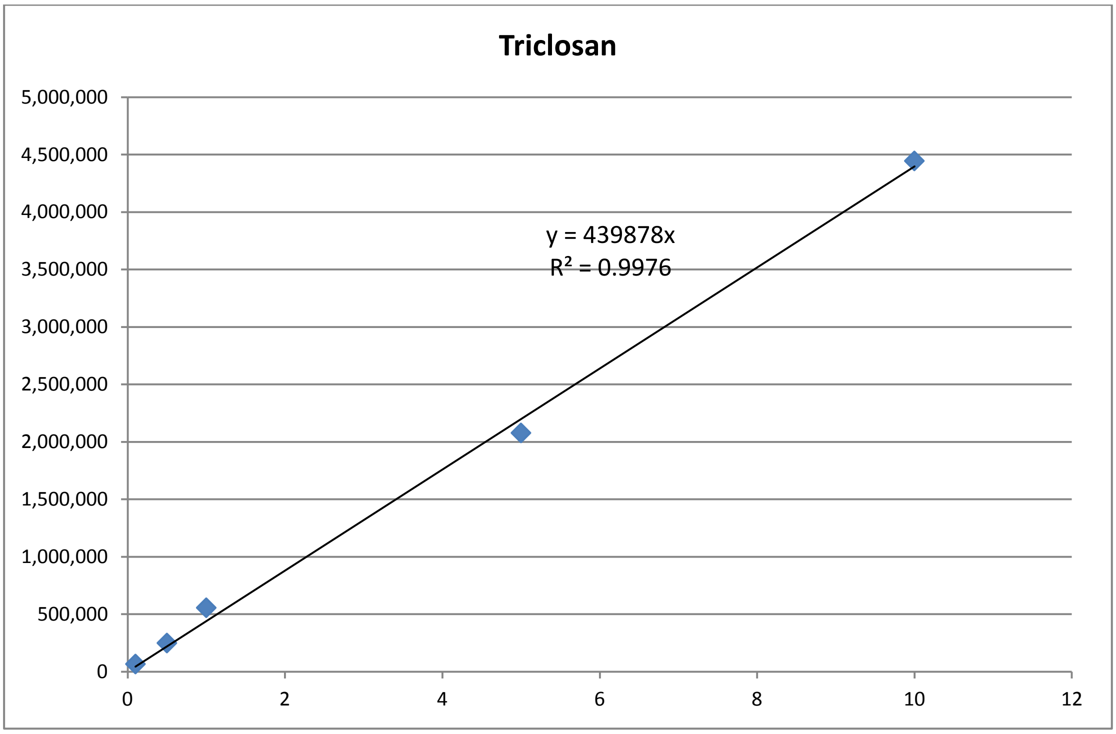
Συγκέντρωση (μg/L)	Εμβαδόν
0,1	85.030
0,25	348.105
1	1.249.845
5	7.376.857
10	15.942.428



Σχήμα 14: Καμπύλη βαθμονόμησης της 2,3,4trichlorophenol.

Πίνακας 15: Μετρήσεις εμβαδών του triclosan για συγκεντρώσεις 0.1-10 μg/L.

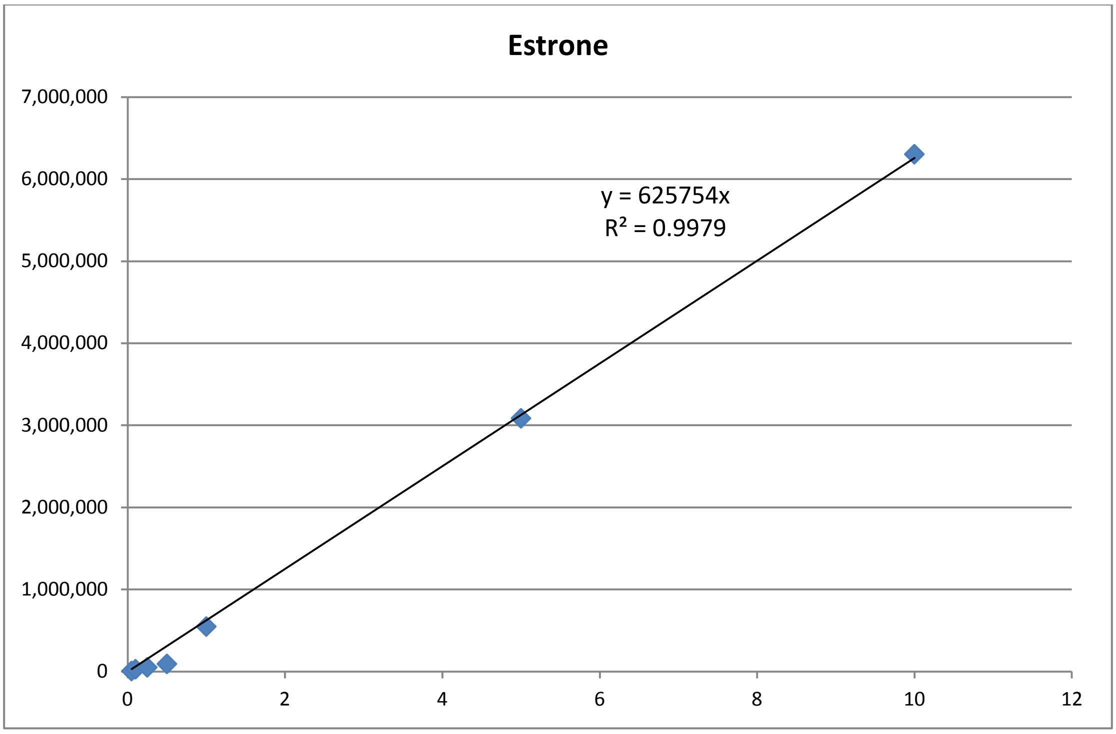
Συγκέντρωση (μg/L)	Εμβαδόν
0,1	67.049
0,5	249.767
1	556.967
5	2.078.566
10	4.445.764



Σχήμα 15: Καμπύλη βαθμονόμησης του triclosan.

Πίνακας 16: Μετρήσεις εμβαδών της estrone για συγκεντρώσεις 0.05-10 μg/L.

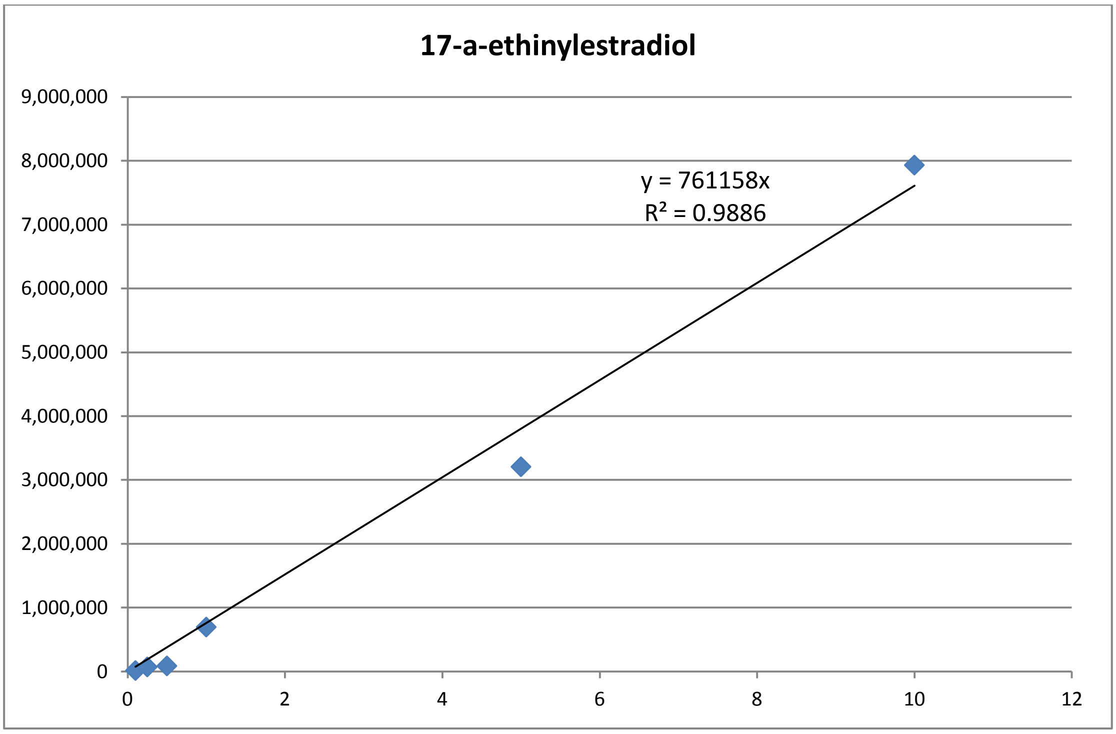
Συγκέντρωση (μg/L)	Εμβαδόν
0,05	4.591
0,1	26.602
0,25	49.198
0,5	91.391
1	546.780
5	3.084.293
10	6.301.930



Σχήμα 16: Καμπύλη βαθμονόμησης της estrone.

Πίνακας 17: Μετρήσεις εμβαδών της 17-α-ethinylestradiol για συγκεντρώσεις 0.1-10 μg/L.

Συγκέντρωση (μg/L)	Εμβαδόν
0,1	16.574
0,25	72.766
0,5	88.638
1	697.327
5	3.208.888
10	7.934.543



Σχήμα 17: Καμπύλη βαθμονόμησης της 17-α-ethinylestradiol.