

**השפעת תוספת בוצות מטופלות בשטחים חקלאיים על גורל PPCPs בקרקע ובצמח**

**The effect of biosolids application to agricultural soils on the fate of PPCPs in soils and plants**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

זאב גרסטל	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
אחמד נאסר	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
פנחס פיין	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
דניאל קורצמן	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
מיכאל בוריסובר	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
אדי סיטרין	מדעי הקרקע, המים והסביבה, מינהל המחקר החקלאי
אריה בוסק	אגודת מגדלי דרום יהודה
משה ברוקנטל	אגודת מגדלי דרום יהודה

Zev Gerstl, Institute of Soil, Water & Environmental Sciences, Volcani Center, POB 6, Bet Dagan 50250.

E-mail: [zgerstl@agri.gov.il](mailto:zgerstl@agri.gov.il)

Ahmed Nasser, Institute of Soil, Water & Environmental Sciences, Volcani Center, POB 6, Bet Dagan

50250. E-mail: [nasser@agri.gov.il](mailto:nasser@agri.gov.il)

50250. E-mail: [finep@agri.gov.il](mailto:finep@agri.gov.il)

Daniel Kurtzman, Institute of Soil, Water & Environmental Sciences, Volcani Center, POB 6, Bet Dagan

50250. E-mail: [daniel@agri.gov.il](mailto:daniel@agri.gov.il)

Michael Borisover, Institute of Soil, Water & Environmental Sciences, Volcani Center, POB 6, Bet

Dagan 50250. E-mail: [vwmichel@agri.gov.il](mailto:vwmichel@agri.gov.il)

Eddie Cytryn, Institute of Soil, Water & Environmental Sciences, Volcani Center, POB 6, Bet Dagan

50250. E-mail: [eddie@agri.gov.il](mailto:eddie@agri.gov.il)

Aryeh Bosik, South Yehuda Growers Cooperative Society Ltd. E-mail: [bosak@bezeqint.net](mailto:bosak@bezeqint.net)

Moshe Bruckental, South Yehuda Growers Cooperative Society Ltd. E-mail: [moshe\\_b@mhadarom.co.il](mailto:moshe_b@mhadarom.co.il)

.....

**הצהרת החוקר הראשי:**

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

תאריך:

חתימת החוקר

	<b>תוכן עניינים</b>
<b>3</b>	<b>תקציר מדעי</b>
<b>4</b>	<b>מבוא כללי</b>
<b>6</b>	<b>פרק א': ניסוי ליזימטרים וקליטת הורמונים בצמח</b>
<b>28</b>	<b>פרק ב': קשירת PPCPs ע"י קרקעות ותוספים אורגניים</b>
<b>41</b>	<b>פרק ג': קליטת PPCPs ע"י צמחים</b>
<b>55</b>	<b>נספח 1</b>
<b>58</b>	<b>נספח 2</b>
<b>59</b>	<b>References</b>
<b>62</b>	<b>סיכום עם שאלות מנחות</b>

**תקציר מדעי:** הסיכון מחדירת PPCPs לשרשרת המזון יכול להיות מקליטה ישירה של חומרים אלה לצמחים המשמש למאכל אדם, מקליטתם בצמחי מספוא המשמשים להאבסת בע"ח, ומהגעתם למקורות המים. המטרה העיקרית של המחקר הנוכחי היא ללמוד את השפעת תוספת בוצות שפכים מטופלות לגידולים המושקים במי-קולחים על הגורל של מספר PPCPs אופייניים, זמינותם והצטברותם בצמחים חקלאיים.

אחד החששות העיקריים לבריאות אדם בעשור האחרון הוא הסכנות הפוטנציאליות טמונות בריכוזים מוגברים של הורמוני סטרואידים בקרקעות ומים. הורמונים אלה נחשבים לתרכובות משבשי אנדוקרינית (EDCs), שעלולה לפגוע בבריאות אדם בעת חשיפה לריכוזים גבוהים, או במקרה של חשיפה לטווח ארוכה לריכוזים נמוכים יותר. במחקר שנערך 3 שנים, שני סטרואידים, אסטרו וסטטוסטרון, נמדדו בצמחי חסה מושקים בקולחין ומים מתוקים וטופל במספר סוגים של תוספים אורגניים. התרומה היחסית של הגורמים השונים, בעיקר מים להשקיה והתוספים, לרמות ההורמונים בצמחי החסה נקבעה. נמצא כי מי השקיה, שהכיל כמויות משמעותיות של הורמונים, הייתה ההשפעה המשמעותית ביותר, ואילו לתוספים האורגניים השפעה מועטת בלבד על רמות הורמונים בחסה. רמות ההורמונים בצמחים בהשוואה להמלצת FDA לצריכה יומית במזון, ונמצאו מעבר לרמה המומלצת (כאשר הוא נצרך על ידי אדם טיפוסי), ולכן יכולות להיות השפעות פיסיוולוגיות שליליות.

תוספים אורגניים שמקורם בבוצות הם מקור אחד להמצאות ג'מפיברוזיל בקרקע. על סמך התוצאות ניתן להסיק שהוספת תוסף אורגני לקרקע יגביר במידה ניכרת את הספיחה של ג'מפיברוזיל בקרקע כולה. מאידך תוספת בוצה/קומפוסט המכיל ג'מפיברוזיל יגדיל את ריכוז החומר בתמיסת הקרקע. כתוצאה מהספיחה היחסית חלשה שלה וכן בגלל הקשירה שלה לחומר אורגני מומס יתכן שלאחר השקיה ריכוז הג'מפיברוזיל בתמיסת הקרקע עלולה להיות גבוה. תופעה זאת יהיה חשובה בעיקר בקרקעות קלות. נוכחות DOM בתמיסת הקרקע יגביר שחרור הג'מפיברוזיל לתמיסת הקרקע מהקרקע עצמה. מקדם הקשירה על בסיס פחמן אורגני ( $K_{oc}$ ) של הג'מפיברוזיל עם DOM גבוה בסדר גודל ממקדם הספיחה שלה עם הקרקע או עם הקרקע שקיבל תוסף אורגני כך שהוספת בוצות/קומפוסט לקרקע עלולה להגביר תנועת ג'מפיברוזיל לעומק הקרקע ולמי-התהום.

בניסוי ליזימטרים נבדק קליטת PPCPs ע"י חסה שגדלו במספר קרקעות עם תוספים אורגניים שונים. השקית החסה נעשתה עם קולחין ו/או מים שפירים. נמצא רק 2 חומרים בחסה – הקרבמזפין והקפאין (בניסוי שדה סמוך לא נמצא קליטה של אף חומר ע"י חיתה). לא נמצא השפעה משמעותית של סוג הקרקע ו/או התוסף האורגני אבל נמצא השפעה של השקיה בקולחין בדומה בקליטת ההורמונים. בדיקה של חסות מסחריות הראו שהריכוזים הגבוהים ביותר היו דווקא בחסה האורגנית.

**מבוא כללי:** מספר עבודות מהארץ דיווחו על הופעה של חומרי רפואה וחומרי טיפוח אישי (PPCPs; pharmaceuticals & personal care products במקורות המים בעיקר באקוויפר החוף, (Arnon et al., 2009; Avisar et al., 2008). ההשערה היא שחומרים אלה הגיעו למי התהום משדות שהושקו במי-קולחים. אולם, עבודות רבות הראו שריכוזי ה- PPCPs בקולחים מטופלים לרמת תקן ענבר נמוכים מאד, וקליטתם ע"י צמחים שהושקו בקולחים אלא לא הגיעה לריכוזים המסכנים את בריאות הציבור (Boxall et al., 2014; Malchi et al., 2014; Bruce et al., 2010; al., 2006). לעומת זאת, בוצות שפכים המיושמות בחקלאות יכולות להכיל PPCPs בריכוזים גבוהים למדי.

השימוש החקלאי בבוצות שפכים מטופלות הולך ומתרחב. הרשויות ברוב ארצות המערב ובארץ, מעודדות את השימוש בבוצות בגלל ההכרה בתועלות לכל המגזרים המעורבים: החקלאי, העירוני והסביבתי. בארץ מותר השימוש בבוצות מפוסטרות בלבד והמחקר הנוכחי מתמקד בסיכון האפשרי מנוכחות של PPCPs בבוצות שפכים מפוסטרות המוספות לקרקעות חקלאיות. מרבית התקנים לשימוש חקלאי בבוצות שפכים בעולם לא מתייחסים למיקרו-מזהמים אורגניים, כגון PPCPs, בבוצות. בישראל רצוי להיערך להתייחסות כזאת בעיקר לאור ההרחבה הצפויה ביישום בוצות שפכים בחקלאות עם התחלת ההסבה של בוצת השפד"ן מהטלה לים לשימוש חקלאי. שיטות פיטור בוצה הנהוגות בארץ הן קומפוסטציה (מרבית הבוצות בארץ) והגבה עם סיד. כיום אין כמעט ידע על תכולת ה- PPCPs בבוצות שפכים בארץ. עיכול בוצה יגרום לפירוק מסוים של החומרים הללו, אך הפיטור, כגון קומפוסטציה, עשוי להקטין את ריכוזיהם במידה משמעותית ולשנות. להוספת בוצות שפכים לשטחים חקלאיים יכולה להיות השפעה ישירה ועקיפה בהגדלת זמינות ה- PPCPs לצמחים ולאפשרות תנועתם לעבר מקורות המים. ההשפעה הישירה של בוצות יכולה לנבוע מהוספת כמויות משמעותיות של PPCPs לקרקע מרבית שטחי הזיבול בבוצות גם מושקים במי-קולחים המכילים חא"מ (בריכוזים התלויים במקורם ובמידת הטיפול בהם). העלייה בריכוז החא"מ בתמיסת הקרקע (Fine et al., 2002; 2006) תגדיל ככל הנראה את המסיסות, הזמינות לצמח

והתנועתיות של ה- PPCPs בקרקע. ייצוב, כגון בקומפוסטציה, מקטין את ריכוזי החא"מ בבוצה ועשוי להגדיל את כושרו של המרכיב הנייח לספוח מיקרומזהמים אורגניים ובכללם ה-PPCPs.

הסיכון מחדירת ה- PPCPs לשרשרת המזון יכול להיות מקליטה ישירה של חומרים אלה לצמחים המשמש למאכל אדם, מקליטתם בצמחי מספוא המשמשים להאבסת בע"ח, ומהגעתם למקורות המים. המטרה העיקרית של המחקר הנוכחי היא ללמוד את השפעת תוספת בוצות שפכים מטופלות לגידולים המושקים במי-קולחים על הגורל של מספר PPCPs אופייניים, זמינותם והצטברותם בצמחים חקלאיים.

## פרק א': ניסוי ליזימטרים וקליטת הורמונים בצמח

### 1 מבוא

אחת מהדאגות שקשורות לבריאות האדם במאה הנוכחית היא פוטנציאל החשיפה לחומרים שמשבשים את המערכת האנדוקרית (Endocrine Disrupting Compounds (EDCs). חומרים אלה יכולים לגרום לחיקוי פעולת ההורמונים או לשיבוש יצור ההורמונים ובכך להחליש או להגביר את הפעילות האנדוקרינית. בין אותם חומרים נמנים גם הורמונים סטרואידלים כגון אסטרוגן וסטטוסטרון. לחשיפה להורמונים אלה, אף שהם מיוצרים באופן טבעי בגוף האדם, מיוחסות תופעות פיזיולוגיות שליליות כמו הקדמה של גיל ההתבגרות, ועליית הסיכון לתחלואה במספר סוגי סרטן.

חומרים אלה מופרשים דרך קבע ממערכת העיכול, הם עמידים יחסית, ולכן יופיעו בתוצרי מערכת הטיפול בשפכים (קולחים ובוצות). קביעת הספיגה הכימית המזהמת על ידי שורשי צמח, ולאחר מכן טרנסלוקציה לתוך רקמה מעל הקרקע הן קריטיות להערכת סיכונים פוטנציאליים לבריאות האדם ופגיעה אקולוגית. לרוב מזהמים אורגניים נספגים לתוך הצמח דרך השורשים בצורה פסיבית יחד עם המים בתהליך הדיות. משמעות הדבר היא שככל שגוברת חשיפת המזהמים וכמות המים הזמינים, כך תגדל הספיגה של אותו מזהם על ידי הצמח (Dettenmaier et al., 2009). בעבודה זו נוטרו חומרים מסוג הורמונים סטרואידלים: אסטרוגן וסטטוסטרון בצמחי החסה שטופלו בטיפול בוצה שונים.

**סטטוסטרון:** הוא הורמון סטרואידלי מקבוצת אנדרוגן, שנמצא ביונקים, זוחלים, עופות ובעלי חוליות אחרים. אצל יונקים, סטטוסטרון מופרש בעיקר באשכים של זכרים ומהשחלות של נקבות, והוא מופרש גם ע"י בלוטת יותרת הכליה אם כי בכמויות קטנות. רמות הסטטוסטרון הכללי בדם אצל גברים מעל גיל 16 הן  $9-40 \text{ nMol/L}$ . הורמון זה משחק תפקיד מפתח בהתפתחות של רקמות

רבייה זכריות כגון אשכים וערמונית, כמו גם קידום מאפיינים מיניים משניים כגון שרירים מוגברים, מסת עצם, וצמיחה של שיער גוף. בנוסף, טסטוסטרון חיוני לבריאות ורווחה, כמו גם מניעת אוסטיאופורוזיס. מחקרים רבים מראים את הקשר בין סרטן הערמונית לרמות ההורמון (Bassil et al., 2008), ואכן כחלק מהטיפול בסרטן הערמונית נעשה סירוס הורמונאלי או פיזיולוגי על מנת להפחית את ההשפעה השלילית של ההורמון על הגידול (Huggins et al., 1941).

**אסטרוגן:** אסטרוגנים או אסטרוגן, הם הורמוני המין הנשיים הראשיים, ולהם חשיבות גדולה במחזור הייחום בבני אדם ובבעלי חיים רבים. אסטרוגנים טבעיים הם הורמונים סטרואידים, בעוד שהאסטרוגנים הסינטטיים אינם סטרואידים. כמות האסטרוגן המופרשת בנשים היא כ- 50-150 pg/ml בדם. בעשורים האחרונים נמצאו עדויות לכך שחשיפה לאסטרוגן, בין אם ממקור חיצוני ובין אם ממקור פנימי, מעלה את הסיכוי לסרטן השד (Zumoff 1998). כמו כן חשיפה לכמות מוגברת של אסטרוגן יכולה לגרום להתבגרות מינית מוקדמת אצל נערות. בגברים, אסטרוגן מופרש מן האשכים בכמויות קטנות יותר (12-34 pg/ml). יצירה מוגברת של אסטרוגן או נטילה של אסטרוגן באופן מלאכותי על ידי גברים גורמת לסימני מין נשיים כגון שדיים, זאת בין היתר בזכות דיכוי הפרשת הטסטוסטרון.

## 2 יעדי המחקר בניסוי הליזימטרים

ניסוי הליזימטרים נועד לבחון את גורל ההורמונים הסטרואידים במערכת מבוקרת מחד, אך קרובה לתנאי השדה (וניסוי השדה) מאידך. במסגרת חלק זה של הפרויקט היעדים הם:

הקמת מערכת ניסיונית של 52 ליזימטרים גדולים (40 בשדה הניסויים בשדות קיבוץ רבדים ו-12 במנהל המחקר החקלאי-וולקני).

- בדיקה שאריות הורמונים סטרואידלים: אסטרוגן וטסטוסטרון בבוצות המיושמות, במי ההשקיה ובעיקר בתוצרת הצמחית, שגודלה בליזימטרים בהם יושמו תוצרי בוצה שונים.

### 3 שיטות וחומרים

#### 3.1 המערכת הניסיונית

הניסוי נערך במקביל בשני מוקדים:

בתחום מינהל המחקר החקלאי קמפוס וולקני (בית דגן) - השקיה במים שפירים (12 ליזימטרים – 3 טיפולים ב-4 חזרות). כל הליזימטרים מולאו בקרקע חולית.

בשדות קיבוץ רבדים (בסמוך לניסוי השדה) – השקיה בקולחים (40 ליזימטרים - 10 טיפולים ב-4 חזרות) בעונת הקיץ. בתקופת של יובש בעונת החורף הליזימטרים הושקו במים שפירים שסופקו מקיבוץ רבדים.

16 ליזימטרים מולאו בקרקע חולית (94% חול, 1% סילט ו- 5% חרסית).

8 ליזימטרים מולאו בקרקע לס מאזור נחל עוז (51% חול 20% סילט ו-29% חרסית).

16 ליזימטרים מולאו בקרקע חרסיתית מרבדים (37% חול, 21% סילט ו-42% חרסית).

בעונות הקיץ נפרסה רשת צל (30%) מעל מתחם הליזימטרים.

#### 3.2 תיאור הליזימטרים

חביות פלסטיק צילינדריות (פחמס-קיבוץ עין חורש) בנפח 220 ליטר, קוטר 58 ס"מ, שטח פני הקרקע 0.264 מ"ר, גובה 90 ס"מ, משקל 10 ק"ג. החביות נצבעו לבן (כדי למנוע התחממות). מכל ליזימטר יוצא צינור ניקוז צידי (2 צול) אל מיכל איסוף בנפח של 25 ליטר. בניסוי השתמשנו בשני אורכים של צינור נקז - 50 ס"מ ו- 80 ס"מ. הליזימטרים שמכילים קרקע מסוג לס וחול מנוקזים על-ידי הנקזים הקצרים, והנקזים הארוכים יותר משמשים בליזימטרים שמכילים קרקע חרסיתית Ben- (Ben-Gal & Shani 2002). כל ארבעה ליזימטרים מוצבים על שולחן מתכת באורך של 3 מ',



ברוחב 60 ס"מ ובגובה של 60 ס"מ. בבסיס כל חבית נבנה שיפוע של 5-10 מעלות לכיוון הנקז, בעזרת יציקת בטון בנפח של 30 ליטר. הדפנות הפנימיות והתחתית של הליזימטרים כוסו ביריעת ניילון, והבסיס של כל חבית רופד בצמר סלעים (להאצת הניקוז) במשקל של 2 ק"ג. רצף של צמר סלעים נשמר מתחתית החבית לאורך צינור הניקוז (Ben-Gal & Shani 2002).

מתחת לשלושה מהליזימטרים אשר בבית דגן הונחו משקלים דיגיטליים (עד 600 ק"ג) המחברים לאוגר נתונים רב תכליתי (CR1000, Campbell Scientific). בכל אחד משלושת הליזימטרים האלה הוטמנו שלושה חישני רטיבות-מוליכות חשמלית – טמפ' (5TE Decagon) בעומקים של 10, 40 ו-70 ס"מ, וחוברו לאוגרי נתונים יעודים. הנתונים נקראו בכל 15 דקות באופן רציף. ברבדים הוטמנו טנסיומטרים המחברים לאוגר נתונים ותקשורת סולארית (Mottes) בעומק 20 ס"מ בשלושה מהליזימטרים (אחד מכל סוג קרקע), והם איפשרו מעקב אחר רמת הרטיבות של הקרקע בזמן אמת.

### 3.3 יישום הבוצות

שלושה תוצרי בוצה הוספו כדשן יסוד לליזימטרים בכל שנה בחודש מאי בין השנים 2011-2013. **קומפוסט בוצה:** פסולת אורגנית שמקורה בבוצת שפכים, שעברה טיפול ביולוגי באמצעות קומפוסטציה. מקור הקומפוסט בו נעשה שימוש בניסוי זה הוא במתקן "דלילה" - מחזור חומרים בע"מ.

**N-Viro:** הינה בוצה שטופלה בטכנולוגיה למחזור שפכים ע"י הוספה של אפר פחם (מתחנות כח) וסיד להעלאת ה pH למעל 12. מקור הבוצה - השפד"ן.

**בוצה סוג ב':** בוצה שלא עברה שום תהליך קוטל חיידקים כמו קומפוסטציה או ייצוב בסיד. מקור הבוצה - מתקן טיהור שפכים חיפה.

כל אחד מתוצרי הבוצה (bio-solid) יושם במינן שקול ל-50 ק"ג חנקן לדונם לשנה (בהתאם לתקנות המשרד לאיכות הסביבה). בטיפול אחד ב N-Viro שולש הריכוז ל-150 ק"ג חנקן לדונם,

לשם השוואה לטיפול דומה בניסוי השדה (150 N-viro להלן) . יישום הבוצות בליזימטרים היה ידני באמצעות תיחוח לעומק של 15-20 ס"מ. כל טיפול נעשה ב- 4 חזרות (4 ליזימטרים). החזרות פוזרו באקראי כך שכל חזרה תמוקם במקום שונה על שולחן הליזימטרים.

טבלה מס 1: הטיפולים השונים בניסוי – מיקום, סוג מי ההשקיה וישום הבוצות (כל הבוצות יושמו בריכוז של 50 ק"ג חנקן לדונם למעט טיפול אחד שיושם בריכוז 150 ק"ג לדונם-NVS-150).

<b>Soil type</b>	<b>Biosolids</b>	<b>Summer Irrigation*</b>	<b>Location</b>
Sand	Not amended control	Fresh	Beit Dagan
Sand	NVS-50	Fresh	Beit Dagan
Sand	Biosolidscompost	Fresh	Beit Dagan
Sand	Not amended control	Effluents	Revadim
Sand	NVS-50	Effluents	Revadim
Sand	Class B sludge	Effluents	Revadim
Sand	Biosolids compost	Effluents	Revadim
Loess	Not amended control	Effluents	Revadim
Loess	NVS-50	Effluents	Revadim
Clay	Not amended control	Effluents	Revadim
Clay	NVS-50	Effluents	Revadim
Clay	NVS 150	Effluents	Revadim
Clay	Biosolids compost	Effluents	Revadim

בוצעה אנליזה של חומרי הזנה, יונים ומתכות בבוצות השונות שיושמו בניסוי ובמי הקולחים ששימשו להשקיה ברבדים. ניתן לשים לב לרמות הנמוכות יחסית של חומרי ההזנה והפחמן האורגני ב NVS תוצאות הבדיקה מוצגות בטבלה מס' 2.

טבלה מס' 2: הערך הממוצע של ערכי היונים בבוצות ובמי הקולחים.

Component	Units (per dry weight)	Class B	Compost	NVS	Wastewater effluent (mg L-1)
Dry weight	g kg-1 (per moist)	200	590	710	
Ash	g kg-1	240	530	880	
COrganic	g kg-1	387	222	80	14
NTotal	g kg-1	63	21	7.0	6.8
PTotal	g kg-1	23	13	3.6	2.4
K	g kg-1	2.2	5.9	1.8	32
pH		6.50	6.62	11.45	8.4
EC (1:5 water extract)	dS/m	7.8	6.6	2.6	1.83
Cl	mg kg-1	363	653	37	340
B	mg kg-1	29	53	332	0.35
Ca	mg kg-1	39,386	70,522	55,984	70
Cd	mg kg-1	5.0	1.1	0.5	
Cu	mg kg-1	540	234	36	0.01
Fe	mg kg-1	6,136	8,034	18,695	0.20
Hg	mg kg-1	< 0.5	< 0.5	< 0.5	
Mg	mg kg-1	5,584	9,935	6,366	30
Mn	mg kg-1	243	195	155	0.04
Mo	mg kg-1	9.6	3.1	4.2	0.03
Na	mg kg-1	1,681	1,869	825	282
Ni	mg kg-1	108	63	42	
Pb	mg kg-1	32	39	30	
S	mg kg-1	11,731	7,698	2,641	35
Zn	mg kg-1	3,366	1,170	144	0.06

### 3.4 המודל הצמחי

יישום הבוצות בוצע בכל שנה בחודש מאי במהלך שלוש שנות הניסוי. בקיץ הראשון גודל תירס במערך הניסוי, מאחר והוחלט להחליף את המודל הצמחי, בשנים העוקבות נעשה שימוש בחסה והוחלט להתמקד בהורמונים (דו"ח זה לא יציג את נתוני התירס, שדווחו). החל מהשנה השנייה, שבועיים לאחר היישום נשתלו שני שתילי חסה (*Lactuca sativa L*) בכל ליזימטר, ולאחר כחצי שנה, בחודש דצמבר, נשתל מחזור נוסף.

המשקל הממוצע של החסות, נפח ההשקיה, כמות המשקעים בכל עונת גידול לכל ליזימטר ואורך העונה מסוכמים בטבלה מס' 3.

טבלה מס' 3: סיכום נתוני ארבע עונות החסה – משקל חסות, נפח ההשקיה וכמות המשקעים ואורך העונה

Season #	Dates of planting and harvest	Number of days	Average weight(g)	Irrigation/lysimeter (L)	Rain/lysimeter (L)
1	18/12/11-25/03/12	98	1109	24	125
2	13/05/12-17/06/12	35	621	59	0
3	18/11/12-11/02/13	86	766	15	135
4	05/06/13-14/07/13	39	715	48	0

### 3.5 מיצויי ההורמונים וניטורם

#### 3.5.1 מיצוי ובדיקת הורמונים מהבוצות שיושמו

שלוש דוגמאות מכל בוצה יובשו בהקפאה (שלושה ימים), נטחנו ונופו (1mm). חצי גרם מכל דגימה הוכנסה למבחנת זכוכית, ולה הוספו 8 מ"ל של אצטונטריל מהול (5:3) (Yu et al., )

(2011). התרחיף עורבב במשך 2 דקות ומיד אח"כ עבר סוניקציה (MRC Ultrasonic Cleaner) במשך רבע שעה. לאחר הסוניקציה סורכזו המבחנות במשך 5 דקות במהירות 3000 rpm בטמפ' של 4 מעלות. תהליך ההפקה חזר על עצמו עוד פעמיים. לאחר כל הפקה נאסף הנוזל העליון לתוך כלי כהה (1 ליטר) – נעשה איחוד של כל התרחיפים משלוש ההפקות. התרחיפים דוללו עם DDW כדי להפחית את ריכוז האצטונטריל (<2%). ה-pH של התמיסה תוקן ל-7 ע"י PAB 10mmol/L ו-STBB. לניקוי וריכוז סופי, הדגימות הועברו דרך SPE Strata X 200 mg/3mL- (Phenomenex, Israel).

הקולונה יובשה למשך כ-10 דקות תחת אוויר הואקום, ותרכובת היעד שוחררה מהקולונה תוך שימוש ב-10 מ"ל מתנול. הדגימות נשמרו בכלי זכוכית בהקפאה עד לניטור ההורמונים.

### 3.5.2 מיצוי ובדיקת הורמונים בצמחי החסה

כ- 50 גרם חסה נכתשו (דגימת החסה הופקה מחתך אורך בחסה כך שהיו בה עלים משלבים שונים בהתפתחות הצמח) עם 200 מ"ל מתנול (100%). לאחר הכתישה הדוגמאות הודגרו ב-4 מעלות למשך הלילה (Arkhipova et al., 2005; Vysotskaya et al., 2001).

דגימה של 10 מ"ל מנוזל הכתישה, עורבבה במשך 2 דקות ומיד אח"כ עברה סוניקציה במשך 20 דקות, הדגימה סורכזה במשך 15 דקות במהירות 3000 rpm בטמפ' של 4 מעלות.

הנוזל העליון נאסף לתוך כלי כהה (1 ליטר) ודולל עם DDW לנפח סופי של 750 מ"ל. ה-pH של התמיסה תוקן ל 7 ע"י PAB 10mmol/L ו-STBB. לניקוי וריכוז סופי הדגימות הועברו דרך SPE (200 mg/3mL- Strata X Phenomenex, Israel), הקולונה יובשה למשך כ-10 דקות תחת אוויר הואקום, ותרכובת היעד שוחררה מהקולונה תוך שימוש ב-10 מ"ל מתנול. הדגימות נשמרו בכלי זכוכית בהקפאה עד לניטור ההורמונים.

### 3.5.3 מיצוי ובדיקת הורמונים במי ההשקיה

נפח של 1 ליטר מים שפירים (ממנהל המחקר החקלאי) ונפח של 1 ליטר מי קולחים (מקיבוץ רבדים) אוחסנו בכלי כהה. הדגימות הועברו דרך SPE Strata X 200 mg/3mL- (Phenomenex, Israel), הקולונה יובשה למשך כ-10 דקות תחת אוויר הואקום, ותרבות היעד שוחררה מהקולונה תוך שימוש ב-10 מ"ל מתנול. הדגימות נשמרו בכלי זכוכית בהקפאה עד לניטור ההורמונים.

### 3.5.4 ניטור הורמונלי בשיטת ELISA

אנליזה הורמונאלית נעשתה על נפח של 1 מ"ל מדגימת המיצוי ההורמונאלי. המתנול הונדף ע"י הזרמת אוויר בצורה עדינה לתוך הכלי. לאחר יבוש סופי הורחף המשקע עם בופר שאינו מכיל סטראיידים (סופק בתוך הקיט ELISA), ולדגימה נעשה ניטור הורמונאלי בשיטת ELISA לפי פרוטוקול הקיט (EIA-4079, EIA-1559, EIA-4164; DRG, Eldan, Israel).

הפלטה נקראה במכשיר ELISA Reader (Bio Rad) באורך גל 450 nm, והנתונים הגולמיים (כלומר עוצמת הקרינה) נותחו ע"י 6 (Bio Rad) Microplate Manager software.

### 3.6 אימות ניטור ההורמונים ע"י שיטת LCMS

על מנת לאמת את תוצאות הבדיקה של ריכוזי ההורמונים ולשלול Cross reaction בוצעה בדיקה בשיטת LCMS. 5 דגימות של מיצוי צמחים מהעונה הרביעית נשלחו למעבדת שרות (מיגל, קריית שמונה). האנליזה בוצעה באמצעות מכשיר Agilent 1290 U-HPLC.

### 3.7 ניתוח סטטיסטי

נבדק מתאם בין ריכוזי הורמון, סוג הבוצה, עונת הצמיחה ומשקל הצמחים. ההשפעות של הבוצות ועונות הצימוח על קליטת ההורמונים ע"י הצמח נותחו באמצעות t-test להשוואת הממוצעים בין הטיפולים השונים.

במהלך שלוש שנות המחקר, נאספה כמות גדולה של נתונים. נתונים אלה נותחו ויוצגו במספר

חתכים:

1. ריכוזי ההורמונים הסטרואידלים בבוצה.
2. ריכוזי ההורמונים הסטרואידלים במי ההשקיה (קולחים ושפירים)
3. ריכוזי ההורמונים הסטרואידלים בצמחי החסות ביחס לפרמטרים הבאים:
  - א. עונת צמיחת החסות
  - ב. סוג הבוצה שיושמה בליזימטרים
  - ג. משקל החסות בקציר
4. הקשר בין ריכוזי ההורמונים בצמחים
5. אימות ריכוזי ההורמונים בחסות בבדיקת LCMS

#### 4.1 ניטור ההורמונים הסטרואידלים בבוצות ממקורות שונים

בדיקת ריכוזי ההורמונים אסטרון וסטטוסטרון בבוצות: Nviro, בוצות ממתקן השפכים חיפה ושפד"ן וקומפוסט בוצה שמקורה במתקן השפכים דלילה מסוכמים בטבלה 4. מדגמים של הבוצות נאספו ממתקני השפכים השונים ונשמרו בהקפאה לצורך ניטור הורמונלי. נלקחו שלוש דגימות שונות מאותו מדגם מכל בוצה, ולכל אחת מהדגימות נעשה מיצוי וניטור הורמונלי. שני ההורמונים נמצאו בבוצות אסטרון בריכוז של 69-277ng/g וסטטוסטרון בריכוז של 0.7-31 ng/g (משקל יבש). ריכוז ההורמונים הגבוה ביותר נמצא בבוצה שמקורה במתקן לטיפול בשפכים בחיפה, והריכוזים הנמוכים ביותר נמצאו בבוצה שטופלה בשיטת Nviro (NVS).

טבלה מס 4: ממוצע ריכוזי ההורמונים ב- 3 בוצות ותוצר בוצת שפדן –NVS ( ng/g dry weight).

Sludge type/source	Estrone	Testosterone
Shafdan	100±12	4.1±0.3
Haifa	277±125	31.9±10
NVS	69±13	0.7±0.2
Compost	111±2	17.1±11

#### 4.2 ניטור ההורמונים סטרואידלים במי קולחים ובמים שפירים

מי הקולחים והמים השפירים בהם הושקו צמחי הניסוי נדגמו שלוש פעמים בכל עונה.

שני ההורמונים נמצאו בדגימות. טווח הריכוזים במים השפירים בוולקני: עבור אסטרו

0.6-1.1 ng/L ועבור טסטוסטרון 0.7-1.2ng/L (גרף 1).

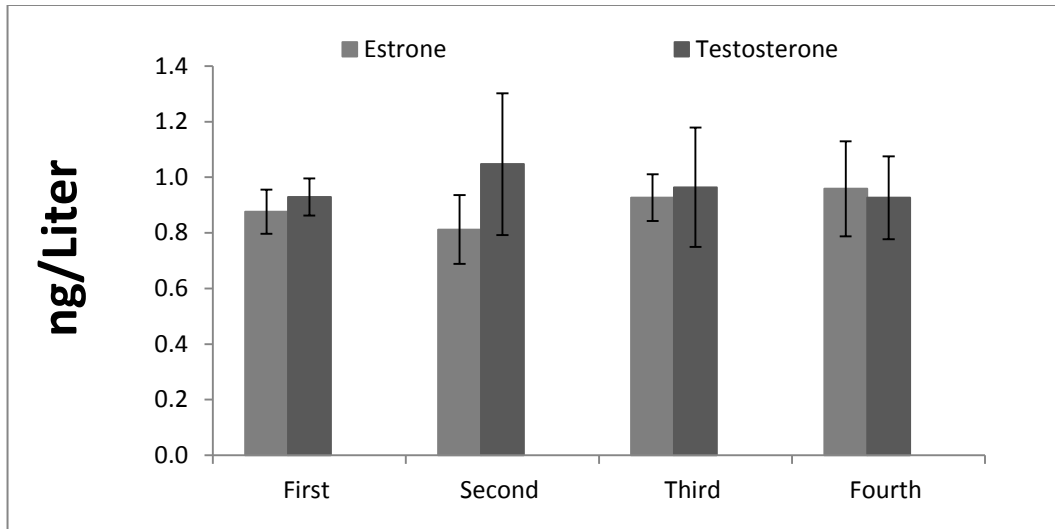
טווח הריכוזים במים השפירים ברבדים (עונה ראשונה ושלישית): עבור אסטרו 1.2-1.5 ng/L

ועבור טסטוסטרון 1.3-1.9 ng/L.

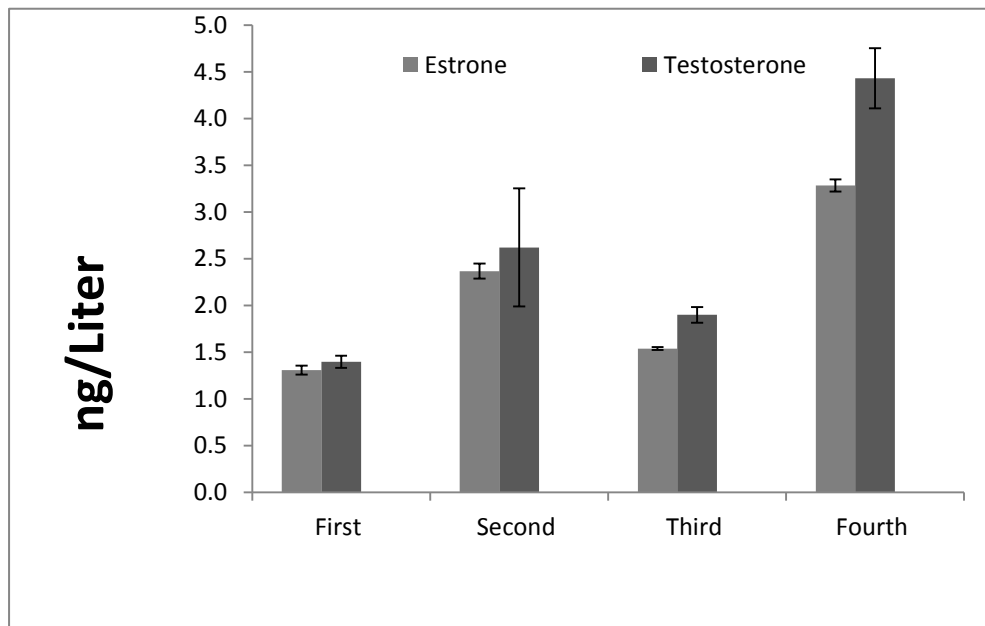
טווח הריכוזים במי הקולחים ברבדים (עונה שנייה ורביעית): עבור אסטרו 2.3-3.3 ng/L

ועבור טסטוסטרון 2-4.7 ng/L (גרף 2).





איור 1. ריכוזי ההורמונים במים שפירים (השקיה) במרכז וולקני בארבע עונות הגידול



איור 2. ריכוז ההורמונים במי ההשקיה בקיבוץ רבדים. עונה ראשונה ושלישית (חורף) השקיית עזר בשפירים, עונה שנייה ורביעית (קיץ) קולחים.

#### 4.3 ניטור ההורמונים הסטרואידלים בצמחי החסה

ניטור ההורמונים הסטרואידלים בוצע בכל דגימות צמחי החסה בכל ארבע העונות (2 בקיץ ו-2 בחורף). שאריות ההורמונים נמצאו בכל הצמחים בכל העונות (גם באלה שמצע הצימוח שלהם לא הכיל בוצה).

הריכוזים הממוצעים בצמחים הם:

אסטרון: 0.7-6.7 ng/g dry weight

סטוטסטרון: 31-73 ng/g dry weight

#### 4.4 השפעה של ריכוזי ההורמונים בצמח ביחס לעונות השנה.

ריכוזי ההורמונים בצמחי החסה הושוו בין עונות הקיץ לעונות החורף בכל אחד מטיפולי הבוצה.

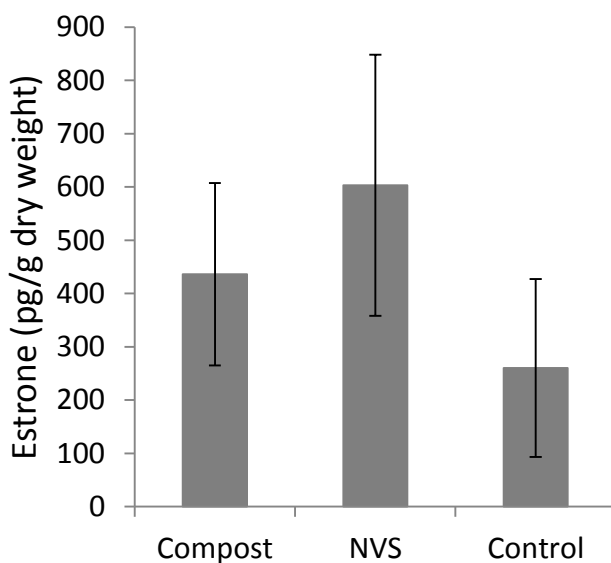
ריכוז האסטרון בקיץ בצמחי החסות היה גבוה באופן משמעותי מאשר בצמחים שגדלו בחורף, (6.7±5 ng/g dry weight לעומת 0.9±0.7 ng/g dry weight; N=112 בהתאמה), מגמה זה הייתה נכונה עבור כל סוגי הבוצות (טבלה 5). בטסטוסטרון כמעט לא ניכר הבדל בין שתי העונות.

#### 4.5 השוואה בין ריכוזי ההורמון בצמחים לסוגי הבוצות המיושמות

נמצא הבדל משמעותי בריכוז האסטרון בין הצמחים שגדלו בקרקע שיושמה בבוצות (NVS- 50 compost) לבין הריכוז שנמצא בצמחים שהיוו ביקורת (מצע ללא בוצה). ההבדלים המשמעותיים היו רק בצמחים שגודלו בוולקני (מים שפירים) ורק בעונת החורף (גרף 3). לא נמצא הבדל משמעותי בין ריכוזי הסטוטסטרון בצמחים בהקשר למצעי הבוצות.

טבלה מס 5. השוואת ריכוזי ההורמונים בצמחי החסה ע"פ עונת הגידול (ng/g dry weight) שתי עונות חורף ושתי עונות קיץ (\*\*\* ההבדל מובהק ברמה  $P < 0.001$ , \*\* מובהק ברמה  $P < 0.01$  וללא כוכביות – לא מובהק).

	Estrone		Testosterone	
	Winter	Summer	Winter	Summer
<b>Compost</b> (n=32)	0.89±1.17 ***	6.26±4.91	55±93	34 ±51
<b>NVS50</b> (n=32)	0.76±0.77 ***	8.35±5.9	115±15 0 **	28 ±44
<b>Class B</b> (n=8)	1.19±1.44 **	4.11±2.29	44±51	22 ±21
<b>NVS150</b> (n=8)	0.65±0.71 ***	6.65±6.59	42±44	14 ±5
<b>Not amended</b> (n=32)	0.41±0.9 ***	6.78±3.78	57±84	38 ±52



איור 3. המקרה היחיד בו טיפולי הבוצה התבטאו בריכוזים גבוהים של הורמונים בצמחי החסה באופן מובהק יותר מטיפול הביקורת הוא עבור האסטרון, בגידול חורף בקמפוס וולקני. רמת המובהקות בהבדל בין הממוצע של הטיפולים לממוצע הביקורת היא  $P < 0.05$  בקומפוסט ו  $P < 0.01$  עבור ה-NVS.

#### 4.6 הקשר בין ריכוזי ההורמון בצמחים למשקל

לא נמצא הבדל משמעותי בין משקלי הצמחים לסוגי מצע הבוצות, סוג הקרקע ומיקום בכל

עונה (טבלה 6).

Soil / Treatment	Winter 2011/12	Summer 2012	Winter* 2012/13	Summer* 2013
Sand (Volcani)				
Not amended	0.42 ± 0.03	0.88 ± 0.04	0.12±0.01	0.3±0.09
NVS-50	0.47 ± 0.07	0.49 ± 0.24	0.45±0.09	0.59±0.15
Sludge compost	0.48 ± 0.07	1.07 ± 0.07	0.34±0.07	0.8±0.13
Sand (Revadim)				
Not amended	1.21 ± 0.26	0.51 ± 0.13	0.75±0	0.6±0.08
NVS-50	1.17 ± 0.23	0.32 ± 0.05	0.77±0.14	0.68±0.03
Class B	1.18 ± 0.28	0.58 ± 0.02	0.73±0.32	0.82±0.06
Sludge compost	1.25 ± 0.38	0.60 ± 0.05	0.89±0.16	0.84±0.03
Loess (Revadim)				
Not amended	1.40 ± 0.16	0.57 ± 0.06	0.93±0.12	0.67±0.1
NVS-50	1.17 ± 0.31	0.65 ± 0.03	1.13±0.13	0.87±0.14
Clay (Revadim)				
Not amended	1.43 ± 0.21	0.57 ± 0.06	0.89±0.14	0.75±0.03
NVS-50	1.02 ± 0.11	0.56 ± 0.08	1.02±0.19	0.71±0.08
NVS-150	1.31 ± 0.23	0.65 ± 0.09	0.95±0.21	0.88±0.07
Sludge compost	1.25 ± 0.03	0.60 ± 0.16	0.87±0.26	0.83±0.17

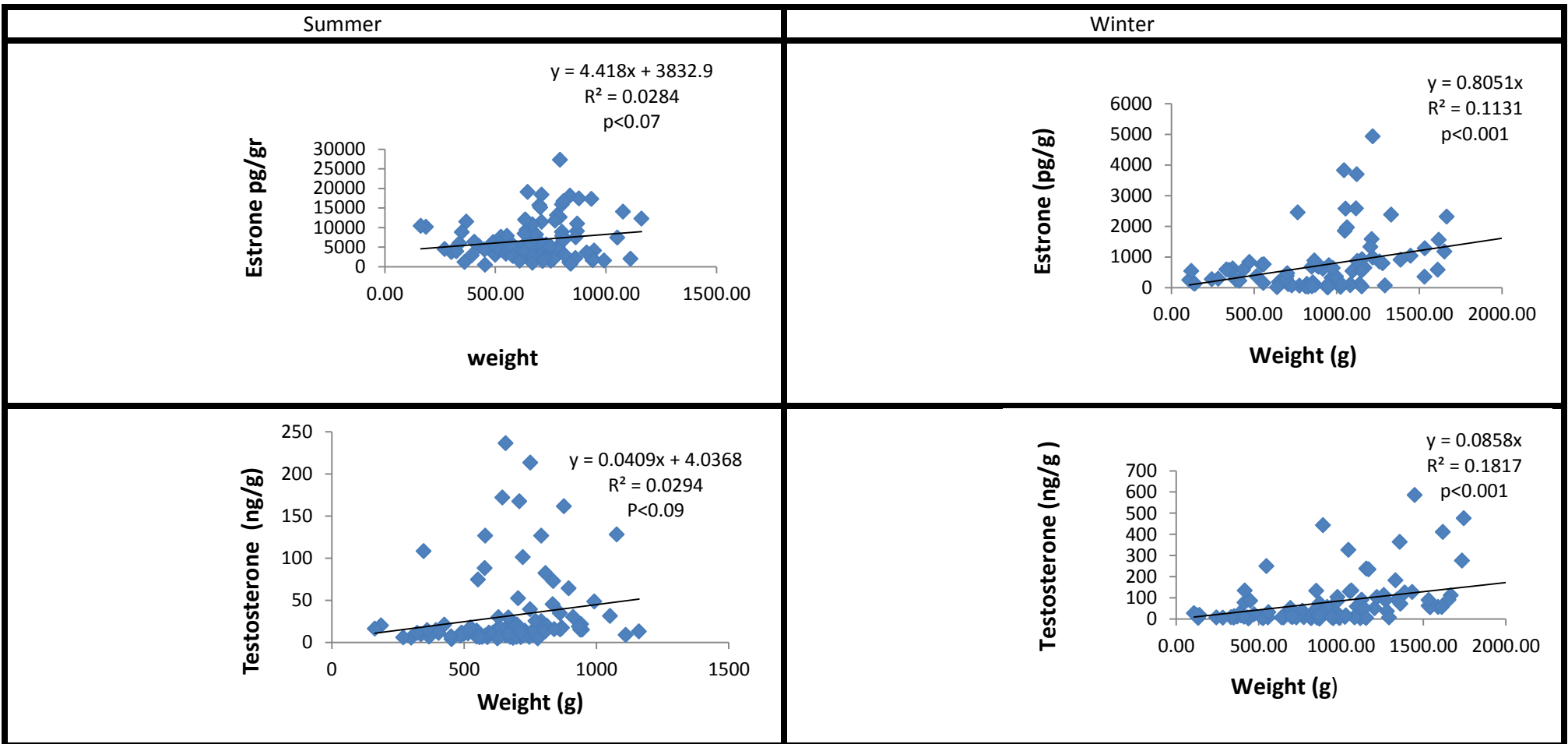
טבלה מס 6. מסת החסה הממוצעת וסטיית התקן בטיפולים ובקרקעות השונות (ק"ג לצמח).

מתאם חיובי ומשמעותי נמצא בין ריכוז האסטרוגן למשקל החסות. המתאם היה חזק יותר בחורף

לעומת בקיץ ( $r^2=0.11$ ,  $p=0.0007$ ;  $r^2=0.028$ ,  $p=0.06$ ; בהתאמה). מגמה דומה נמצאה גם

עבור טסטוסטרון, כאשר בחורף המתאם חיובי ומשמעותי יותר לעומת הקיץ;  $r^2=0.02$ ,  $p=0.08$ ;

( $r^2=0.18$ ,  $p<0.001$ ) בהתאמה) (גרף 4).



איור 4. רגרסיה ליניארית, ריכוזי ההורמונים כנגד משקל החסה, בחלוקה לעונות (2 חורף ו-2 קיץ).

#### 4.6.1 הקשר הסטטיסטי בין ריכוזי ההורמונים בצמחים

בניתוח סטטיסטי של ריכוזי ההורמונים בצמחים נמצא מתאם חיובי חזק בין שני סוגי ההורמונים (אסטרון וסטוסטרון). המתאם היה מובהק יותר בקיץ לעומת החורף (טבלה 7).

טבלה מס 7. מקדם הקורלציה (R), ורמת המובהקות (P) בין ריכוזי האסטרון והסטוסטרון לפי עונות.

		Test-Est
Summer	R	0.400477
	P-value	9.19E-05
Winter	R	0.2099
	P-value	0.055321

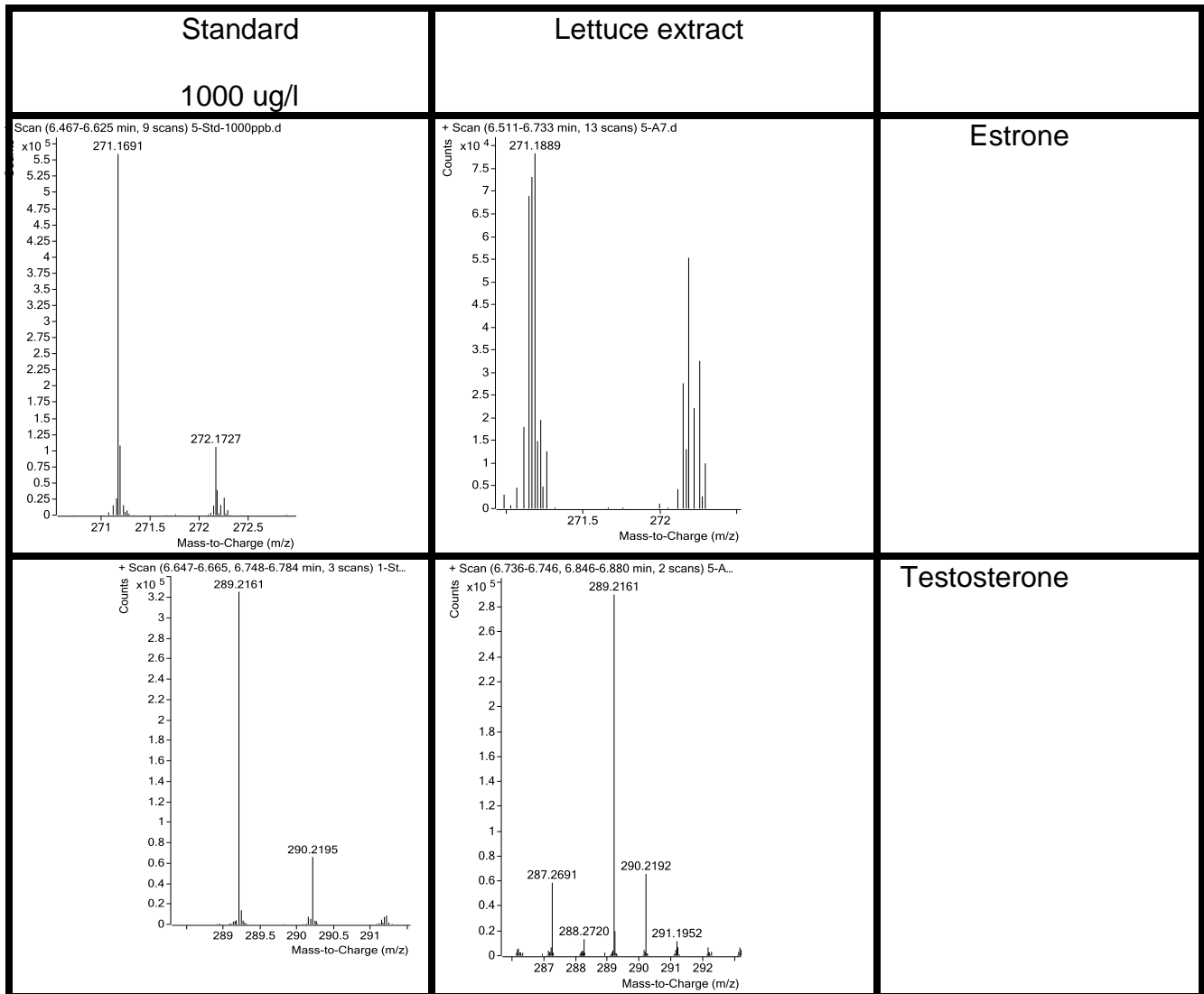
#### 4.7 אימות ניטור ההורמונים ע"י שיטת

10 דגימות של מיצויי הצמח מהעונה הרביעית נבדקו בשיטת LCMS (5 – אסטרון, ו-5 טסטוסטרון). בכל המקרים נמצאה התאמה בין תוצאות בדיקה זו לתוצאות בדיקת ה-ELISA. ראוי לציין שבמחצית מהבדיקות רמת ריכוז ההורמון הייתה מתחת לרמת הסף הניתנת לגילוי בבדיקת LCMS, אולם גם רמה זו תאמה את שנמצא בבדיקת ה-ELISA.

#### 5 דיון ומסקנות

שאלת המחקר המרכזית בעבודה זו היא האם חשיפה ארוכת טווח לקולחים ולאובוצות המכילים ריכוזים גבוהים של סטרואידים הורמונאליים, יכולה לגרום לספיגה של הסטרואידים בצמחים (החסה נבחרה כמודל).

נמצא ריכוז של ההורמונים אסטרון וסטוסטרון בבוצה ובמי ההשקיה של צמחי החסות (קולחים ומים שפירים). כמו כן נמצאו הורמונים בצמחי החסה שטופלו בתוצרי בוצה וגם בצמחי החסה בוצה בקבוצת הביקורת ברוב המקרים ללא הבדל בין הטיפולים.



איור 5 . ספקטרוגרפיה מסות של אסטרון וטסטוסטרון של מכשיר ה-LCMS (1000 ug).

ערכי ההורמונים (אסטרון וטסטוסטרון) שהתגלו בניסוי זה הן בבוצות והן במי ההשקיה דומים לערכים שמדווחים בספרות (Sabourin et al., 2012; Kuch and Ballsmitter 2001; Ternes et al, 1999)

מחקרים רבים דיווחו על נוכחות הורמונים סטרואידלים בבוצות ובקולחים, אך יש מעט מידע ספורתי על נוכחות הורמונים סטרואידלים בצמחים שנחשפו לסטרואידים חיצוניים. אסטרוני נמצא בזרעי תפוחים בריכוז של 130 ng/g (Gawienowski and Gibbs, 1969). Sabourin וחבריו (2012) מצאו סטטוסטרון בעגבניות (4.2 ng/g) ובתפוח אדמה (5 ng/g).

### 5.1 השפעת עונת הגידול על ריכוזי ההורמונים בצמח

ריכוזי האסטרוני בצמחים שגדלו בקיץ (השקיה במי קולחים ובמים שפירים) היו באופן משמעותי גבוהים (עד  $\times 16$ ) מהריכוזים שנמצאו בצמחים שגדלו בחורף. לא נמצא הבדל משמעותי בריכוזי הסטטוסטרון בצמחים בהקשר לעונות השנה.

יישום תוצרי הבוצה היה לפני שתילות הקיץ, לכאורה האסטרוני בחסה הגיב לזמן שעבר מאז היישום, ולעומת זאת הסטטוסטרון אדיש. מכיוון שגם חזרות הביקורת (ללא זבלים) התנהגו כך, אין לייחס את הריכוזים הגבוהים בקיץ למועד יישום הבוצות ואלה כנראה קשורים בהמרה של אסטרדיול לאסטרוני.

קצב ההמרה של אסטרדיול לאסטרוני תלוי ישירות בטמפרטורה (Scherr et al., 2008) ולכן בקיץ הפירוק מהיר יותר ומולק' האסטרוני זמינה לצמח, כך שזהו גורם משמעותי להבדלים בין עונות השנה. בעוד שהסטטוסטרון אינו תוצר פירוק של חומר אחר, וריכוזו נשאר יחסית קבוע, כך שלא ניכר הבדל משמעותי בין עונות השנה.

### 5.2 השפעת של יישום הבוצות על ריכוזי ההורמונים בצמח

קשר בין יישום הבוצות לריכוזי ההורמונים נמצא רק עבור אסטרוני - בצמחים שגדלו על מצע בוצות מסוג NVS-compost היה ריכוזו גבוה באופן משמעותי לעומת צמחים שגדלו ללא בוצה. תופעה זו נחזתה רק בצמחים שגדלו באתר וולקני (חול ורק בחורף עם השקיית עזר בלבד). לא ניתן לזהות השפעה של יישום בוצה על ריכוזי ההורמונים בצמחי החסות בעונת הקיץ (השקיה מלאה).



יתכן שממצאים אלה קשורים ב: 1. בחול יש פחות פעילות מיקרוביאלית (שגורמת לפירוק האסטרדיל לאסטרון) לעומת סוגי קרקע אחרים. 2. הקרקעות ברבדים נחשפו לכמויות גדולות יותר של הורמונים מאחר שהושקו במי קולחים במשך שנים ובניסוי, בעת שבמנהל המחקר החקלאי בוצעה ההשקיה רק במים שפירים (Stumpe & Marschner, 2010).

בכל מקרה, ראוי לציין כי בחורף ריכוז האסטרון בכל אחד מסוגי המצע (בוצה או נטול בוצה) הוא נמוך משמעותית מאשר בקיץ.

#### 5.2.1 מתאם בין ריכוזי ההורמונים בצמחי החסה למשקל הצמחים

נמצא מתאם חיובי ומשמעותי בין ריכוזי שני סוגי ההורמונים בצמחי החסות (לגרם חומר יבש) למשקלם - המתאם היה חזק יותר בחורף מאשר בקיץ. להערכתנו הגורם לכך הוא ספיגה של חומרים (בין היתר גם מזהמים) דרך מערכת השורשים. ככול שיש מערכת שורשים מסועפת וגדולה (במתאם חיובי למשקל), הצמח מדיית יותר מים וסופג יותר חומרים, ובהם ההורמונים (Dettenmaier et al., 2009).

#### 5.2.2 מתאם בין ריכוזי ההורמונים בצמחי החסה

מתאם חיובי קיים בין ריכוזי ההורמונים בצמח (אסטרון וסטטוסטרון). המתאם היה חזק יותר בקיץ מאשר בחורף. משמעות הדבר היא שאם הורמון מסוים נמצא בצמחי החסה יש הסתברות גבוהה שההורמון השני יהיה נוכח. אף על פי כן, המתאם הוא לא חזק, ולכן מודל הרגרסיה לא יכול שלשמש ככלי ניבוי (כלומר ברגע שהורמון אחד נמצא, עדיין לא ניתן לחזות ברמת דיוק סבירה את רמות הריכוז של ההורמון השני). המתאם יכול להעיד על כך שמנגנון ההטמעה של ההורמונים הסטרואידלים דומה.

### 5.3 אימות ההורמונים ע"י שיטת LCMS

כפי שמצוין בפרק השיטות, נוגדני שיטת ה-ELISA יכולים להגיב עם חומרים נוספים, ובמקרה שקיימת כמות גדולה מחומרים אלה, עלולה השיטה להניב תוצאות שגויות. כדי לאמת שאכן הריכוזים שנמצאו בצמחים הם אכן ריכוזי ההורמונים אסטרון וטסטוסטרון, בוצעה בדיקה השוואתית בשיטת LCMS. התוצאות שהתקבלו ב-LCMS תואמות לאלו שהתקבלו בשיטת ה-ELISA, ולפיכך אמינותה של זו האחרונה אומתה.

### 5.4 האם לריכוזי ההורמונים הסטרואידלים שנמצאו בצמחי החסה יש השפעה פיזיולוגית?

ידוע שלקליטת כמויות גדולות של הורמונים סטרואידים יש השלכות פיזיולוגיות שליליות. כך למשל (Parsch and Sippel, 2001; Andersson and Skakkebaek, 1999) נטען כי ספיגת אסטרון ממקור חיצוני בריכוז גבוה גורמת להקדמת גיל ההתבגרות אצל ילדים, ועלולה להעלות את הסיכון לתחלואה במספר סוגי סרטן.

מנהל התרופות והמזון האמריקאי (US Food and Drug Administration, 1999), ממליץ על הגבלת כמות ההורמונים הסטרואידים הנצרכים ממזון על לא יותר מ-1% מכמות ההורמון המיוצרת באופן טבעי בגוף האדם. לפיכך הכמות היומית המקסימלית היא: לגבר – אסטרון 1 מיקרוגרם, טסטוסטרון 46 מיקרוגרם. לאישה – אסטרון 50 מיקרוגרם, טסטוסטרון 2.3 מיקרוגרם.

כדי להמחיש את הנתונים נחשב את הצריכה המקסימאלית המותרת של חסה, בהנחה (הלא נכונה כמובן) שאין מקור אחר לצריכת ההורמונים הללו. עבור גבר, הכמות המומלצת לצריכה יומית היא 4 ק"ג (נובע ממגבלת האסטרון), ועבור אישה הכמות המומלצת היא 920 גרם (נובע ממגבלת הטסטוסטרון). עבור ילדים הכמויות המומלצות הן כמובן אף נמוכות יותר, אולם לא נמצאו נתונים מהימנים בספרות לגבי הערכים המדויקים.

לפיכך ברור שיש להמעיט ככל הניתן את החשיפה להורמונים אלו. הגורם המשמעותי ביותר לעלייה בריכוז ההורמונים הוא איכות מי ההשקיה, כאשר כל שיטת השקיה – מי קולחים ומים שפירים גרמו לעלייה כזו. רק בתקופת החורף, כאשר מרבית ההשקיה הייתה ממי גשמים, נמדדו ריכוזי הורמונים נמוכים יחסית. לשימוש בבוצה, או סוג הבוצה, הייתה השפעה קטנה יחסית על רמת ההורמונים בצמח. מסקנה זו הוכחה באופן חד משמעי עבור האסטרון, כאשר עבור הטסטוסטרון - מאחר והיה נוכח בקרקע כתוצאה מההשקיה בתקופות הקיץ והמוביליות הנמוכה שלו, אנו מסיקים ששמירה על משטר קפדני של השקיה במים מטוהרים לאורך כל עונות השנה הייתה מביאה גם עבורו לרמות נמוכות.

לאור התוצאות המדאיגות הללו, בדקנו את כמות ההורמונים במים שעברו סינון בפחם פעיל. התוצאה הייתה ירידה של ריכוז ההורמונים אסטרון וטסטוסטרון בכ-90%. לפיכך ראוי לשקול השקיה של ירקות במים שעברו טיהור מתאים.

## קיצורים

מכון טיהור שפכי גוש דן - (השפד"ן)

PPCP- pharmaceuticals and personal care products

EDCs - Endocrine Disrupting Compounds

NO- No bio-solids

C- Sludge compost

B - Sludge class B

N-V/ N-150: N-Viro (50/150 Nitrogen kg/ dunams respectively)

PAPB- Potassium Acid Phthalate Buffer

STBB - Sodium Tetraborate Buffer

SPE- Solid Phase Extraction

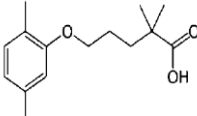
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

## פרק ב': קשירת PPCPs ע"י קרקעות ותוספים אורגניים

### 1. מבוא

העבודה הניסיונית התרכזה על התנהגות ג'מפיברוזיל אשר נמצא בריכוזים משמעותיים בבוצה (ראה חלק סקר בוצות). ג'מפיברוזיל הינו חומצה אורגנית הידרופובית אשר עוברת דיסוציאציה חזקה בערכי pH המצויים בקרקעות הארץ. תכונות כימיות חשובות נמצאים בטבלה 1. לכן האינטראקציות של ג'מפיברוזיל עם הקרקע, החומר האורגני בקרקע וחומר אורגני מומס יכול לשמש כחומר מודל עבור מולקולות אורגניות יוניות, הידרופוביות אחרים עם סופחים שונים בסביבה.

טבלה 1. תכונות כימיות חשובות של ג'מפיברוזיל.

	<b>Gemfibrozil</b>
The PPCP class	Lipid-regulating agent
The chemical classification and structure	5-[2,5-dimethylphenoxy] 2,2-dimethyl-pentanoic acid 
pK <sub>a</sub>	4.7
K <sub>oc</sub> , (L/kg) <sup>b</sup>	430 (estimated) <sup>a</sup>
log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup>	4.77 <sup>a</sup>
Aqueous solubility (mg/L)	11 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Toxnet (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>). <sup>b</sup>K<sub>oc</sub> – Sorption coefficient describing a distribution between a soil and an aqueous phase (normalized to the soil organic carbon content).

<sup>c</sup>log K<sub>ow</sub> – log Octanol-water partitioning coefficient.

לכן בדיווח הנוכחי כלול

- א. בדיקת ספיחה של ג'מפיברוזיל עם קרקעות, בוצות וקרקעות שעברו אינקובציה עם בוצות;
- ב. הערכת של היכולת של ג'מפיברוזיל ליצור קומפלקסים מימיים עם חומר האורגני המומס מבוצות שונות.

## 2. חומרים ושיטות

כללי

ספיחה של ג'מפיברוזיל נבחן ב-: שלוש קרקעות, קרקע חרסיתית מרבדים, קרקע לס מנחל עוז וחול דונה; על שלושה תוספים אורגניים, בוצת שפכים ממפעל הטיהור בהרצליה, בוצת שפכים ממפעל הטיהור בשפ"דן וקומפוסט מבוצות שפכים; ועל 9 תערובות של הקרקעות עם התוספים האורגניים. קשירת ה ג'מפיברוזיל למומר אורגני מומס נבחן עם DOM שהפקנו מסידרת בוצות.

### קרקעות

קרקעות: הקרקעות נדגמו מאזורים שבהם מסלקים (או שמתוכנן לעתיד הקרוב להתחיל בה) בוצות וקומפוסט בקרקע חקלאית. הקרקעות נדגמו מ- 20 ס"מ העליונים של הקרקע, יובשו בעביר ונופו לפחות מ- 2.0 מ"מ. תוכנות הקרקע מובאות בטבלה 2.

### תוספים אורגניים

שלושת התוספים האורגניים הוקפאו ב-  $18^{\circ}\text{C}$  מיד לאחר הדיגום. לפני הוספתם לקרקעות הם עברו יבוש בהקפאה (ליופילציה). תוכנות מובחרות של החומרים מובאים בטבלה 3.

### שיטות

#### הדגרת הקרקע עם התוספים האורגניים

הקרקע (50 ג') והתוסף האורגני (בין 0.5 – 0.7 ג') עורבבו יחד להגיע ל-  $1.5 \text{ Mg of N ha}^{-1}$ . קרקעות ביקורת (ללא תוסף אורגני) ותערובות הקרקע-תוסף אורגני הוכנסו לכוסות פלסטיק של 250 מ"ל עם מכסים מחוררים לקראת הדגרה אירובית. הכוסות הודגרו למשך 6 חודשים בטמפרטורה של  $30^{\circ}\text{C}$

ברטיבות קבוע של 80% מקיבול שדה (26.0, 17.0, ו- 4.0 % בקרקעות רבדים, נחל עוז וחול דונה בהתאמה). הרטיבות נשמרה קבוע ע"י שקילה תקופתית והוספת מים לפי הצורך. סך הכול היו 12 טיפולים – 3 קרקעות ביקורת ו-9 תערובות קרקע-תוסף אורגני. כול טיפול הוכן ב-3 חזרות.

תכולת הפחמן כללי וחנקן כללי נבדקו בקרקעות והתערבות, וכן נבדק ריכוז חנקן מסיס ופחמן מסיס במיצי מים של הקרקעות והתערובות. בנוסף נבדקו ספקטרה האולטרה סגול והנראה לעין במיצויים אלו וגם ספקטרה הפלורסנטית.

### ניסוי ספיחה

ספיחת הג'מפיברוזיל בקרקעות ובבוצות המקוריות וב-12 הדוגמאות שעברו הדגרה נבחן בניסויים מנייתים (batch experiments) בהתאם לשיטות שפותחו במעבדתינו בעבר (Borisover and Graber, 2003). לשם כך נשקל דוגמה הסופח לתוך מבחנה זכוכית עם פקק מצופה בטפולן (למנוע ספיחה הג'מפיברוזיל ע"י הפלסטיק) ואז הוספנו תמיסה מימית של הג'מפיברוזיל למבחנה. טווח הריכוזים של הג'מפיברוזיל נע בין 0.5 ל-9.0 מג'ל. חוזק היוני של התמיסות נשמרה קבוע ע"י תמיסת  $\text{CaCl}_2$  בריכוז של 0.01M אשר כלל גם ביוסיד (sodium azide) בריכוז של 200 מג'ל. דוגמאות הסופחים ותמיסת ג'מפיברוזיל בריכוזים שונים הוכנו בשלוש חזרות וכן שתי סוגי ביקורות: סופחים ללא ג'מפיברוזיל וכן תמיסות ג'מפיברוזיל ללא סופחים. כולם טולטלו ב-  $25^{\circ}\text{C}$  בקצב של 125 סל"ד. הדוגמאות כוסו בזמן הטלטול נגד קרינה (אור). קינטיקה של ספיחה נבדקה ונמצא ששיווי משקל הושג לאחר 24 שעות ולכן במבחני הספיחה הוחלט על טלטול ל-72 שעות להבטיח שיווי משקל. לאחר השגת שיווי משקל הדוגמאות עברו זרכוז ונלקח מל" אחד דוגמה לקביעת ריכוז הג'מפיברוזיל בתמיסה. קביעת ריכוז הג'מפיברוזיל נעשתה ב-HPLC (Shimadzu) עם גלאי diode array ודוגם אוטומטי. עקום כיול הוכן של תמיסות ג'מפיברוזיל במים הוכנה. הפאזה הנוזלים הכילה 30% מים ו- 70% אציטוניטריל המכיל 0.01% (v/v) של TFA וזרימה של 1 מל"דקה. עורך הגל לקביעת הג'מפיברוזיל היה 282 נ"מ. נבדק ה-pH בכל הדוגמאות ונמצא די אחיד בין דוגמאות של כל סופח וסופח.

טבלה 2. תוכנות מובחרות של הקרקעות.

	<b>Revadim</b> רבדים	<b>Oz stream</b> נחל עוז	<b>Dune sand</b> חול דונה
<b>Sampling depth</b>	Topsoil	mixed depths	unspecified
<b>clay % w/w<sup>a</sup></b>	42	29	5
<b>silt % w/w<sup>a</sup></b>	21	20	1
<b>sand % w/w<sup>a</sup></b>	37	51	94
<b>Texture</b>	Clay	Sandy clay loam	Sand
<b>Organic carbon (OC), %, w/w</b>	0.60±0.01	0.39±0.02	0.03±0.01
<b>Humidity, % w/w</b>	5±0.14	3.42±0.06	1.19±0.42
<b>CEC (meq 100g<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	36.3±0.74	16.1±0.37	NA <sup>c</sup>
<b>ESP<sup>b</sup></b>	1.25±0.04	4.26±0.3	NA
<b>EPP<sup>b</sup></b>	4.66±0.1	7.83±0.0	NA
<b>CaCO<sub>3</sub> %<sup>b</sup></b>	13.4±0.1	12.9±0.3	0.27

<sup>a</sup> הנתונים סופקו ע"י דר' דניאל קורצמן ממרכז וולקני, <sup>b</sup> הנתונים סופקו ע"י מגי סלע ממרכז וולקני, <sup>c</sup> לא נבדק - NA.

טבלה 3. תכונות מוחרות של שלושת התוספים האורגניים.

סוג התוסף	מקור	תאריך דיגום	w/w [TOC%] <sup>b</sup>	w/w [TN%] <sup>c</sup>
Anaerobically digested sludge (Class B)	WWTP <sup>a</sup> Herzlia	18.3.2011	32±1.9	5.00±0.33
Secondary aerated sludge (Class A)	WWTP Shafdan	23.2.2012	37±0.22	6.20±0.01
mixed organic sources	Sludge compost (Dlila site, kibbutz Nahshon)	16.3.2012	19±0.10	1.92±0.14

<sup>a</sup>WWTP-wastewater treatment plant, <sup>b</sup>TOC-Total Organic Carbon content, <sup>c</sup>TN- Total Nitrogen content.

#### קשירת הג'מפיברוזיל לחומר האורגני המומס (DOM) מבוצות וקומפוסט

קשירת הג'מפיברוזיל לחומר האורגני המומס מבוצות וקומפוסט נבדקה בשיטת הגברת המסיסות עם ריכוזים שונים של

DOM בנוכחות עודף ג'מפיברוזיל מוצקה. ה-DOM לבדיקות אלו הושגה ע"י מיצוי מימי של הבוצות. ה-pH נמדד בכל ההרצות. קינטיקה של המסה נבדק ומסיס הג'מפיברוזיל נקבע בשיווי משקל.

#### ניתוח תוצאות

תוצאות הספיחה הותאמו למודל פרומדליך:

$$C_s = K_F \cdot (C_w)^n$$

כאשר  $C_s$  הינו ריכוז הג'מפיברוזיל הספוח (מ"ג/ק"ג);



$K_f$  הוא מקדם הספיחה של פרוינדליר;

$C_w$  הוא ריכוז הג'מפיברוזיל בתמיסת השיווי משקל (מ"ג/ל);

ו-  $n$  הוא קבוע המתארת מידת האי-ליניאריות של האיזותרמה וקשורה להתפלגות אתרי הספיחה על פי אנרגיית האינטראקציה של סופח-נספח. מקדם הספיחה מנורמל לתכולת הפחמן האורגני, ( $K_{F-oc}$ ; L/kg) חושב בעזרת הנוסחה:

$$K_{F-oc} = K_F / f_{oc}$$

כאשר  $f_{oc}$  היא תכולת הפחמן האורגני בסופח.

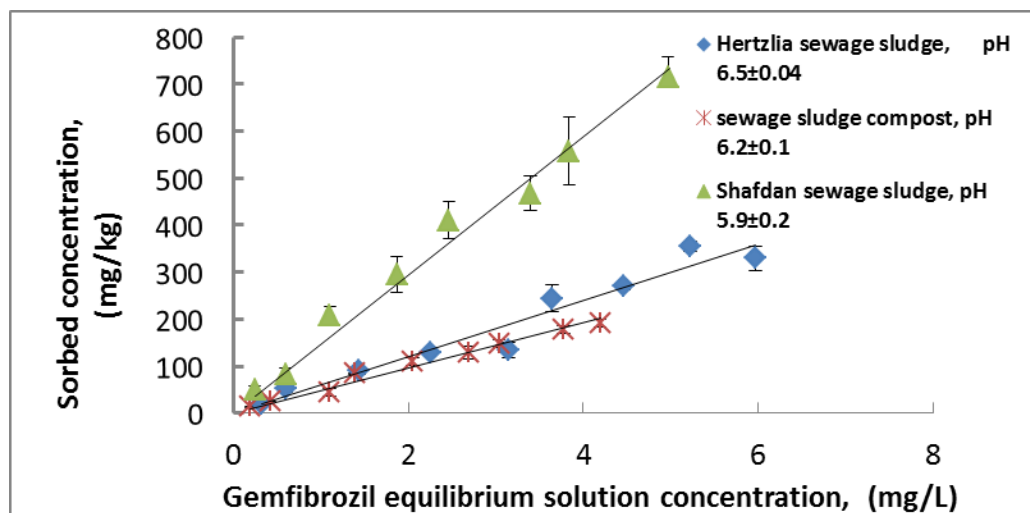
## תוצאות

### קשירת ג'מפיברוזיל וה- DOM

קשירת הג'מפיברוזיל לחומר הורגני המסיס (DOM) תוארה ע"י מקדם ה-  $K_{OC}$  (טבלה 4).

ספיחת ג'מפיברוזיל על התוספים האורגניים

איזותרמות הספיחה של ג'מפיברוזיל על הבוצות השונות שעברו אינקובציה עם הקרקעות היו ליניאריות (איור 1) ומקדמי הספיחה שלהם ( $K_d$ ) וערכי הספיחה על בסיס פחמן אורגני ( $K_{OC}$ ) מובאים בטבלה 5.



איור 1. איזותרמות ספיחה של ג'מפיברוזיל על בוצות עם סימון לסטית התקן.

טבלה 4. ערכי מקדם הקשירה בין ה-DOM וג'מפיברוזיל.

מקור ה-DOM	pH <sup>a</sup>	K <sub>OC</sub> , (L/kg)
Nahariya SS <sup>b</sup> נהריה	5.0	אין קשירה
	6.0	3100±500 <sup>c</sup>
	" 6.1natural"	38000 ±7000
Herzlia SS הרצליה	4.5	אין קשירה
	5.4	אין קשירה
	" 6.0natural"	9800 ±1000
Shafdan SS שפד"ן	5.0	1200 ±900
	5.9	אין קשירה
	" 5.8natural"	2400 ±600
SS Compost קומפוסט	5.3	אין קשירה
	5.8	5300 ±800
	" 5.9natural"	אין קשירה
Haifa SS חיפה	"6.0natural"	11100 ± 2000
Netanya SS נתניה	"6.0natural"	9800 ±2000

<sup>a</sup> ה-pH נשמר קבוע ע"י בופר או היה טבעי (natural); <sup>b</sup> SS - בוצה; <sup>c</sup> ± סטית תקן

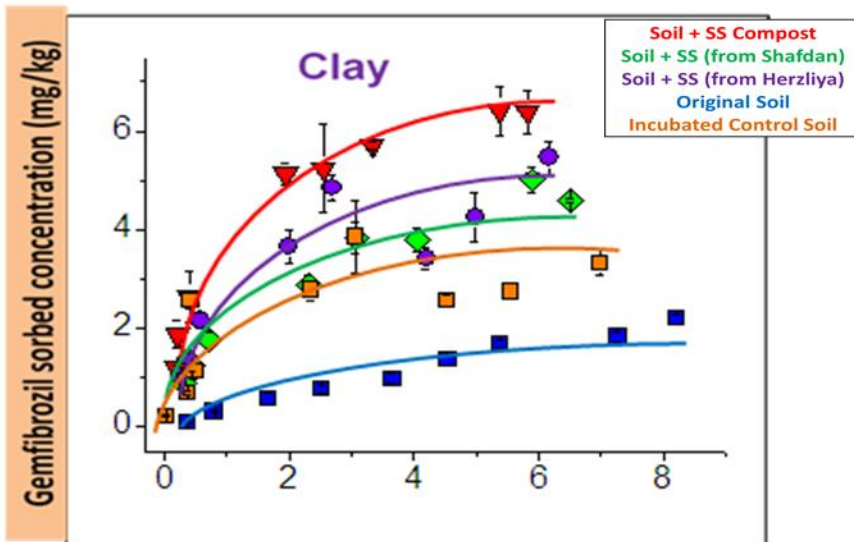
טבלה 5. מקדמי ספיחה של ג'מפיברוזיל על סופחים אורגניים.

Sewage sludge סופח אורגני	OC, %	$K_d$ , ( L/kg)	$K_{oc}$ , ( L/kg)
Herzlia SS <sup>a</sup> בוצה הרצליה	32	$63 \pm 7^b$	$190 \pm 20$
SS compost קומפוסט בוצות	19	$52 \pm 6$	$270 \pm 30$
Shafdan SS בוצה שפד"ן	37	$154 \pm 26$	$390 \pm 60$

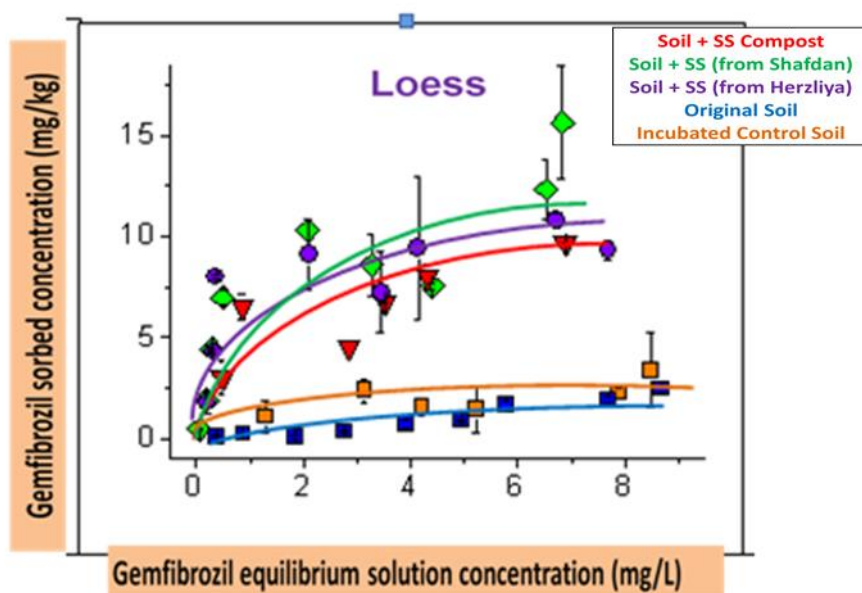
קים קשר בין תכולת הפחמן האורגני בבוצות השונות לבין הספיחה של ג'מפיברוזיל עליהם (ראה טבלה 5 ואיור 1). מקדמי הספיחה על בסיס פחמן אורגני ( $K_{oc}$ ) דומים מאוד לכל הסופחים.

#### ספיחת ג'מפיברוזיל ממים על הקרקעות והקרקעות עם תוספים אורגניים

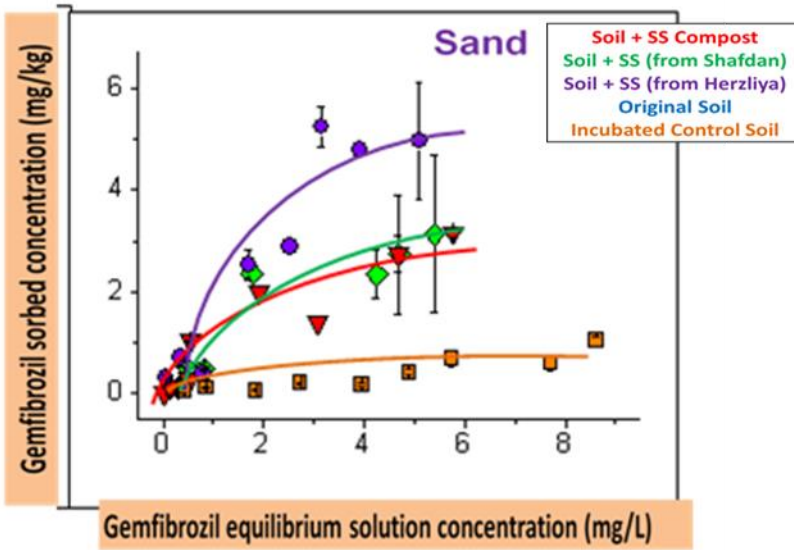
איזוטרמות הספיחה של ג'מפיברוזיל על הסופחים השונים (קרקעות ביקורת וקרקעות שעברו אינקובציה עם תוסף אורגני) מוצגים באיורים 2-4. לשם השוואה בכל ציור יש איזוטרמת ספיחה של ג'מפיברוזיל על קרקע ללא תוסף אורגני ואשר עבר אינקובציה של חצי שנה כמו לקרקעות שקיבלו את התוסף. מקדמי הספיחה של ג'מפיברוזיל בכל הטיפולים מובאות בטבלה 6.



איור 2. איזטרמות ספיחה של ג'מפיברוזיל בקרקע כבדה (רבדים).



איור 3. איזטרמות ספיחה של ג'מפיברוזיל בקרקע בינונית (לס – נחל עוז).

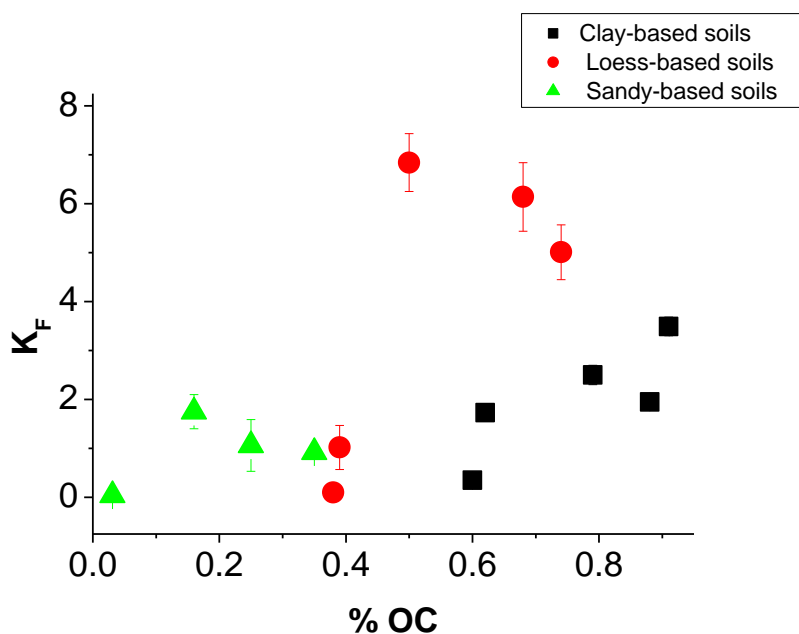


איור 4. איזותרמות ספיחה של ג'מפיברוזיל בחול דונה.

טבלה 6. סיכום נתוני ספיחת ג'מפיברוזיל על הקרקעות המקוריות ועל הקרקעות עם תוספים אורגניים.

קרקע	תוסף אורגני	קומפוסט	בוצה הרצליה	בוצה שפד"ן	קרקע ביקורת לאחר הדגרה	קרקע מקורית
Clay חרסית - רבדים	$K_F$	$3.49 \pm 0.19^b$	$1.95 \pm 0.09$	$2.50 \pm 0.20$	$1.73 \pm 0.15$	$0.35 \pm 0.03$
	n	$0.37 \pm 0.04$	$0.50 \pm 0.03$	$0.40 \pm 0.05$	$0.32 \pm 0.06$	$0.86 \pm 0.04$
	OC, %	0.91	0.88	0.79	0.62	0.60
	pH	$7.71 \pm 0.05$	$7.74 \pm 0.09$	$7.62 \pm 0.04$	$7.69 \pm 0.01$	$7.37 \pm 0.06$
Loess לס - נחל עוז	$K_F$	$5.01 \pm 0.56$	$6.14 \pm 0.70$	$6.84 \pm 0.59$	$1.02 \pm 0.45$	$0.1 \pm 0.02$
	n	$0.3 \pm 0.08$	$0.38 \pm 0.07$	$0.20 \pm 0.06$	$0.45 \pm 0.25$	$1.50 \pm 0.12$
	OC, %	0.74	0.68	0.5	0.39	0.38
	pH	$8.07 \pm 0.16$	$7.96 \pm 0.13$	$8.07 \pm 0.13$	$8.34 \pm 0.14$	$7.31 \pm 0.04$
Sand חול דונה	$K_F$	$0.92 \pm 0.14$	$1.06 \pm 0.53$	$1.75 \pm 0.35$	-	$0.03 \pm 0.15$
	n	$0.70 \pm 0.10$	$0.73 \pm 0.32$	$0.69 \pm 0.15$	-	$1.49 \pm 0.20$
	OC, %	0.35	0.25	0.16	0.03	0.031
	pH	$7.99 \pm 0.20$	$7.95 \pm 0.09$	$7.80 \pm 0.03$	-	$7.51 \pm 0.03$

בערכי ה- pH שעבדנו, הג'מפיברוזיל קיימת כמולקולה מיוננת (ראה  $pK_a$  בטבלה 1) כך שספיחת החומר לאתרים שליליים בחרסיות תהיה מינימלית. האינטראקציה של הג'מפיברוזיל עם החומר האורגני בבוצות (ובקרקע), עם קצוות החרסיות או עם אוקסידים מתכתיים עשוי להיות בעל חשיבות. אכן, הספיחה של ג'מפיברוזיל בקרקעות לאחר הוספת התוספים האורגניים התחזקה בצורה משמעותית. באיור 5 צירנו מקדם הספיחה של פרוינדליך ( $K_F$ ) לעומת תכולת הפחמן האורגני בסופחים (קרקעות וקרקעות עם תוספים). הוספת תוסף אורגני ואינקובציה ל 6 חדשים אמנם הביא לעליה בספיחה אבל אין מגמה אחידה בקרקעות השונות.



איור 5. ספיחת ג'מפיברוזיל: מקדם הספיחה כפונקציה של תכולת הפחמן האורגני בקרקעות.

## סיכום ומסקנות

תוספים אורגניים שמקורם בבוצות הם מקור אחד להמצאות ג'מפיברוזיל בקרקע. על סמך התוצאות ניתן להסיק שהוספת תוסף אורגני לקרקע יגביר במידה ניכרת את הספיחה של ג'מפיברוזיל בקרקע כולה מאידך תוספת בוצה/קומפוסט המכיל ג'מפיברוזיל יגדיל את ריכוז החומר בתמיסת הקרקע כתוצאה מהספיחה היחסית חלשה שלה וכן בגלל הקשירה שלה לחומר אורגני מומס כך שלאחר השקיה ריכוז הג'מפיברוזיל בתמיסת הקרקע עלולה להיות גבוה. תופעה זאת יהיה חשובה בעיקר בקרקעות קלות.

נוכחות DOM בתמיסת הקרקע יגביר שחרור הג'מפיברוזיל לתמיסת הקרקע מהקרקע עצמה. מקדם הקשירה על בסיס פחמן אורגני ( $K_{oc}$ ) של הג'מפיברוזיל עם DOM גבוה בסדר גודל ממקדם הספיחה שלה עם הקרקע או עם הקרקע שקיבל תוסף אורגני כך שהוספת בוצות/קומפוסט לקרקע עלולה להגביר תנועת ג'מפיברוזיל לעומק הקרקע ולמי-התהום.



## פרק ג': קליטת PPCPs ע"י צמחים

**מבוא:** בפרק א' דיווחנו על ניסוי הליזמטרים וקליטת הורמונים ע"י צמחים במשטר של תוספים אורגניים והשקייה בקולחין. המטרה המרכזית של חלק זה של פרויקט זה היו לבחון קליטה של חומרים רפואיים וטיפוח אישי ע"י צמחים במספר קרקעות עם ובלי תוספות אורגניות.

ניסוי הליזמטרים נועד לבחון את גורל PPCPs במערכת מבוקרת מחד, אך קרובה לתנאי השדה (וניסוי השדה) מאידך. לשם ביצוע העבודה הוקם מערכת ניסיונית של 52 ליזמטרים גדולים (40 בשדה הניסויים בשדות קיבוץ רבדים ו-12 במנהל המחקר החקלאי-וולקני). כמו כן, נבדק מספר PPCPs במי ההשקיה, בבוצות ובקומפוסטים ובתוצרת הצמחית, שגודלה בליזמטרים בהם יושמו תוצרי בוצה שונים. תיאור הליזמטרים והטיפולים השונים נמצאים בפרק א' ולא יתוארו שוב. במגביל לניסוי הליזמטרים נערך ניסוי שדה רבדים עם אותם הטיפולים (ראה איור בנספח 2).

**שיטות אנליטיות:** דוגמאות התוספים האורגניים והצמחים יובשו בליופילייזר (freeze-dryer) לפני תחינה וניפוי. דוגמאות למיצוי של התוספים האורגניים היו כ-0.5 ג' ושל החומר הצמחי כ-2 ג'. המיצוי של החומרים נעשתה לפי שיטת ה-USEPA 1694 ומתוארת הטבלה 1 ואיור 1 למטה. פרטים על האנליזה ב-LCMS מובאים בנספח 1.

### תוצאות: סקר בוצות

הקומפוסטים המסחריים שמשמשים בהם בחקלאות מורכבות מבוצות שפכים המגיעות ממפעלי טיהור שפכים שונים ומעורבים במקום במפעל ליצור קומפוסט לפי הגעתם למקום. אם ברצוננו להעריך את הרכב של קומפוסט כלשהוא חייבים לדעת איזו בוצות עורבבו ובאיזו יחס. לשם כך בוצע סקר בוצות כאשר נאספו דוגמאות של בוצות שהגיעו למתקן טובלן, בבקעת הירדן. התוצאות מובאות בטבלאות 2 ו-3. לשם השוואה היצגנו הנתונים שלנו על גרף של ה-USEPA באיור 3.

## **Method for Soil Extraction (based on EPA 1694)**

### **1. Preparation of solid samples**

- 1.1** Transfer the soil from its original container to a sandwich bags.
- 1.2** Homogenize the sample by shaking samples that are pourable liquids, or by stirring solids, or breaking the clusters by hand.
- 1.3** Sieve the sand soil.
- 1.4** Weight 10 g of solids. Place the two sample aliquots in separate clean 50-mL disposable centrifuge tubes. Designate one of the samples as the acid fraction, the other the base fraction.
- 1.5** Add water to the tubes with soil, vortex each for 2 min. Spike the samples with labeled compounds, vortex the samples and leave them for 24 hours in the shaker.

### **2. Determination of solids content.**

- 5.1** Weigh 5 to 10 g of the bulk sample to three significant figures in a tared beaker, weighing pan, or other suitable container. Dry for a minimum of 12 hours at  $110 \pm 5^\circ\text{C}$ , and cool in a desiccator.
- 5.2** Weigh the dried aliquot and calculate percent solids as follows:
- $$\% \text{ Solids} = (\text{Weight after drying (g)} / \text{Weight before drying}) * 100$$

### **3a. Acid extraction of solid samples**

- 3.a.1** Add 15 mL of pH 2 phosphate buffer to the sample, and blank. Vortex each for 2 min. Check and adjust the pH to  $2.0 \pm 0.5$  with buffer, vortexing the mixture after each addition. Maintain the pH above 1.95 to preclude deuterium-hydrogen exchange on the deuterium-labeled compounds.
- 3.a.2** Add 20 mL acetonitrile to the solid sample, sonicate for 30 min, and centrifuge for approximately 5 min at approximately 3000 rpm.
- 3.a.3** Decant the extracts (supernatants) of the sample into separate, clean 250-mL round-bottom flasks.
- 3.a.4** Add 15 mL of phosphate buffer to the sample. Adjust to pH  $2.0 \pm 0.5$  with HCl. Vortex to resuspend the solids. Check and adjust the pH to  $2.0 \pm 0.5$  with buffer, vortexing the mixture after the addition.
- 3.a.4** Perform a second extraction by repeating Sections 3.a.2 and 3.a.3, adding the extracts to

their respective flasks.

**3.a.5** For the third extraction, add 15 mL of acetonitrile only to each of the tubes. Sonicate and centrifuge the tubes, and decant the supernatants into their respective round-bottom flasks.

**3.a.6.** If particles are visible in the extract, centrifuge for approximately 5 min at approximately 3000 rpm.

### **3. Concentration of the solid sample extracts.**

Extracts from the acid fraction of solid samples are concentrated prior to cleanup and the extracts are reconstituted into aqueous solutions that are processed through the aqueous sample SPE HLB extraction procedures as a cleanup step.

**4.1** Concentrate the extracts from the solid samples to a final volume of 20 - 30 mL by rotary evaporation at 50°C. Do not allow the extracts to go dry.

**4.a.2** Immediately after concentration, add 200 mL of reagent water and 500 mg of Na<sub>4</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O to the acid fraction extract. Swirl to mix. Check that the pH is  $2 \pm 1$ . If necessary, adjust dropwise with HCl solution. Swirl to mix.

### **4. SPE HLB extraction procedures**

Assemble the SPE extraction apparatus and attach the SPE HLB cartridges.

**5.a.1** Condition an SPE HLB cartridge by eluting it with 20 mL of methanol, and 6 mL reagent water at pH  $2.0 \pm 0.5$ . Discard this eluant. Do not let the cartridge go dry at any point during the conditioning process.

**5.2** Using the SPE cartridge load the sample onto the cartridge at a flow rate of 5-10 mL/min. Extraction of a 1-L aqueous sample will take 100-200 minutes, thus use of a multi-position extraction manifold is desirable.

**5.a.3** Once the entire sample has passed through the cartridge, wash the acid fraction cartridge with 10 mL of reagent water to remove the EDTA.

**5.4** Dry the cartridges for either fraction under vacuum for approximately 5 min.

### **6.a Cartridge elution.**

**6.a.1** Elute the analytes with 12 mL methanol. Initiate the elution by vacuum and complete the elution by gravity. Collect the eluant in a clean 20 ml bottle.

איור 1. תהליך מיצוי וריכוז PPCPs לקראת אנליזה ב-LCMS.

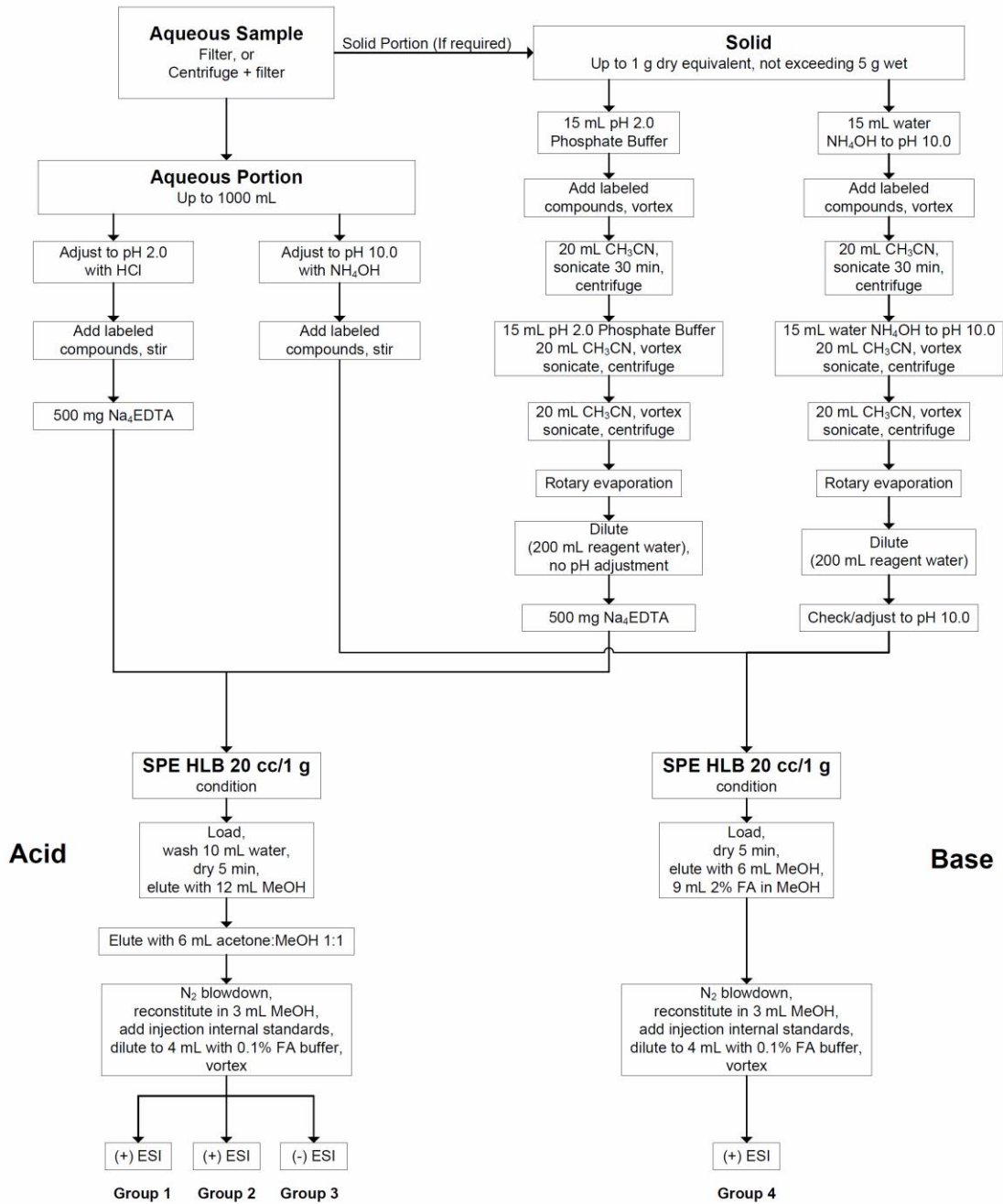


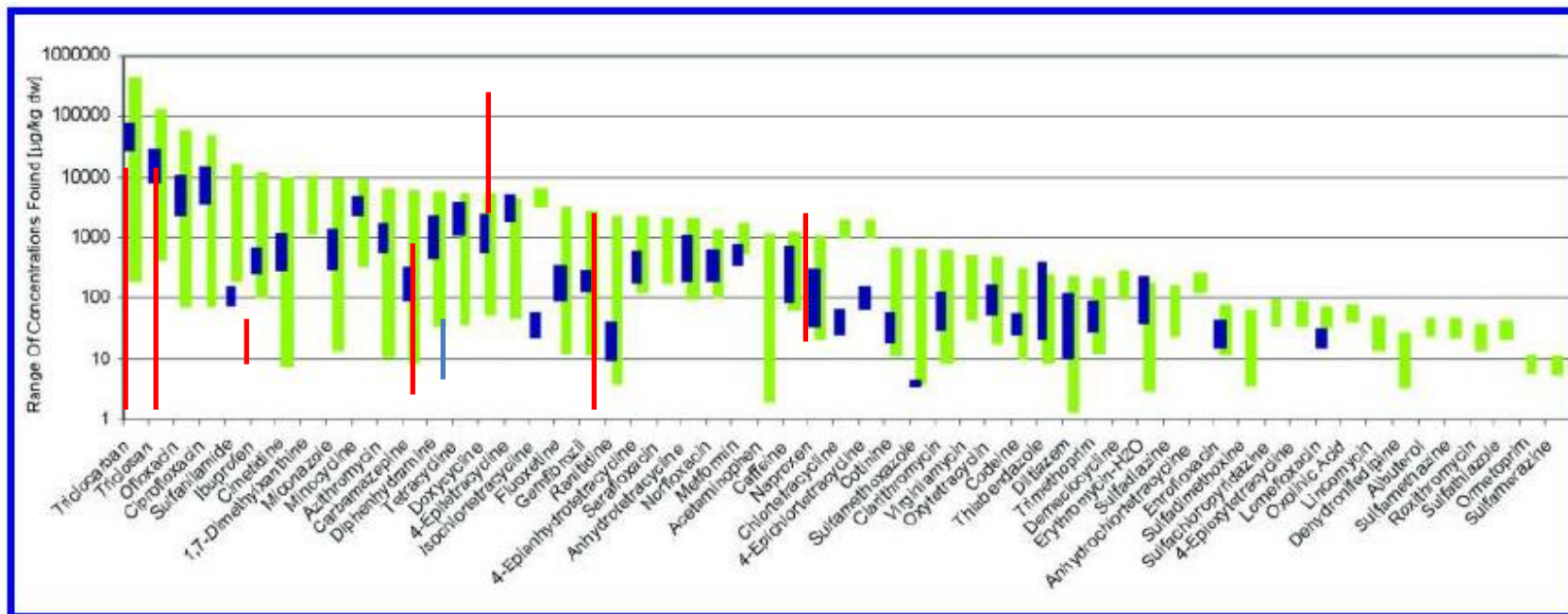
Figure 1 Flow chart for determination of pharmaceuticals and personal-care products by LC/MS/MS

Fexofenadine	Ciprofloxacin	Diclofenac	Diphenyl-hydramine	Carbamazabine	Caffeine	Triclorcarban	Gemfibrosil	Triclosan	Acesulfame	מקור הבוצה/קומפוסט
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	61.6	151.7	20.3	4.7	3.5	963	2.2	מט"ש אשקלון
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	11.2	99.7	93.4	8.4	59.3	255	1.8	ברנר
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	26.5	539.1	9.7	5.6	74.1	1321	4.9	מט"ש כפר-סבא
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	45.6	101.1	6.2	24.7	2.7	323	5.1	מט"ש גוש עציון
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	16.8	734.1	6.6	3.4	272.7	594	4.1	מט"ש חיפה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	43.9	119.9	6.1	6.8	3.9	370	5.5	מט"ש חדרה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	13.1	127.4	7.1	3.4	8.0	485	3.0	מט"ש באר שבע
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	26.3	193.8	1.7	9.9	1.7	780	7.2	מט"ש הרצליה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	27.0	159.5	22.6	3.5	4.0	668	2.2	מט"ש כרמיאל
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	24.4	329.6	7.8	2.5	3.4	751	4.8	מט"ש נהריה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	2.1	83.2	6.4	0.8	2.6	12	0.7	מט"ש חדרה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	15.8	811.3	3.2	4.1	152.6	568	3.7	מט"ש חיפה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	5.1	86.3	0	3.5	3.8	87	1.3	בית שאן
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	4.2	114	0	10.4	4.6	67	7.6	רעננה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	13.8	119.2	60.9	3.4	2.9	88	0.3	צפת
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	7.9	130.9	16.8	2.6	3.0	406	6.0	עפולה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	13.6	116.5	1.2	7.0	15.3	308	1.5	תנובות
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	18.1	153.7	1.8	3.8	48.2	49	5.4	נתניה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	30.8	195.7	24.5	3.8	5.1	700	2.1	עכו
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	5.8	120	14.8	8.9	4.4	150	0.3	ניר עציון
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	10.8	143.7	56.7	5.7	3.7	204	3.7	קולחי השרון
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	8.7	237	5.0	1.0	17.1	3	0.4	טבריה
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	57.3	113.2	14.9	7.8	2.3	274	8.0	מעין צבי
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	0.9	78.5	0	0.4	3.4	5	0.0	גדות
לא נבדק	לא נבדק	לא נבדק	19.4	92.5	9.4	8.3	9.0	107	19.7	רמת השרון
55.5	12.6	269	5.8	527	150	37.7	2665	10595	4.9	חדש (קומפוסט)
49.3	4.4	88.4	3.3	303	56.4	50.2	741	982	2.1	בינוני (קומפוסט)
7.8	2.7	85.6	2.5	1.75	65.9	7.8	523	1039	0.2	ישן (קומפוסט)

טבלה 2. ריכוז (ug/kg) של PPCPs בבוצות וקומפוסט-בוצות שונות שנה ראשונה.

Triclosan	Triclorcarban	Ibuprofen	Gemfibrozil	Galaxolide	Fenofibrate	Femotidine	Doxycyclic hyclate	Diphenyl hydramine	Carbamazapine	Caffiene	Benzfibrate	Acesulfame	מקור הבוצה/קומפוסט
1703	30			26	15	23		12	23	60		15	בית שאן 16/7/12
										65			גדות 7/12
								2	28	32			חדרה 7/12
5423	83	53	263	74	89	32	42408	35	647	98	15	60	חיפה 17/7/12
4793	75	23	188		50		52573	32	899	89	15	23	חיפה 30/7/12
1770	38	83		52	17	8		42	191	237	53	30	כרמיאל 16/7/12
2235	30	53		48	23	20		38	192	266	45	15	כרמיל
		75			8		120053	0	0	116			מגדלים אעבלין
2513	38				29			45	58	83	15	15	נהריה 7/12
2513	98	30	53	17	34	11		38	136	2216	15	15	נתניה 7/12
1673	38	23				26		20	178	144	15	15	עכו 7/12
1103	45			44	18	36	1575	27	53	93		38	תנובות קולחי השרון
1620	30		15		10			24	21	112			היפוך 1 23/7/12
1538	30	15	23		29			15	43	98			היפוך 2 28/7/12
2085	30	53	300		37			25	246	498	15		היפוך 3
2348	45	75	428		23			17	290	233			היפוך 4
2400	45	30	405		26			14	321	205			היפוך 5
1988	30	23	203		23			20	176	218			היפוך 6

טבלה 3. ריכוז (ug/kg) של PPCPs בבוצות וקומפוסט-בוצות שונות שנה שניה.



איור 2. השוואת ריכוזי ה-PPCPs בבוצות בעבודה זו (קווים אדומים) לאומת אלו שדווחו ע"י ה-USEPA ב-2001 (McClellan & Halden, 2010).

מטבלה 2 אנו רואים שתהליך הקומפוסטציה מביאה לירידה בריכוזי החומרים כאשר דוגמאות נלקחות מהרימה שלא עוברת היפוך שאז ניתן לדגום מאותו מקום כמעט. מאידך, הנתונים בטבלה 3 מראים שאין השפעה של זמן (היפוכים) בריכוז ה- PPCPs בקומפוסט. הסיבה, ככל הנראה, היא אי-האחידות בהרימה לאחר ההיפוך כך שלא ניתן לדגום דוגמה בהרכב הדומה לדיגום הקודם. בכל אופן, מעיון באיור 3 אנו רואים שטווח הריכוזים שמדדנו דומה לאלו שנמצא בספרות. הריכוזים הנמוכים יחסית של חלק מה- PPCPs בעבודה הנוכחית נובעת מה- recovery הנמוך של חלק מהחומרים.

ניסוי לזימטרים: כפי שכתבנו למעלה, ניסוי הליזימטרים נועד לבחון את גורל PPCPs במערכת מבוקרת מחד, אך קרובה לתנאי השדה (וניסוי השדה) מאידך. לשם ביצוע העבודה הוקם מערכת ניסיונית של 52 ליזימטרים גדולים (40 בשדה הניסויים בשדות קיבוץ רבדים ו-12 במנהל המחקר החקלאי-וולקני). להזכירכם, הקרקעות בניסוי זה היו: קרקע חולית (94% חול, 1% סילט ו-5% חרסית); קרקע לס מאזור נחל עוז (51% חול 20% סילט ו-29% חרסית); וקרקע חרסיתית מרבדים (37% חול, 21% סילט ו-42% חרסית). נתונים על ניסוי החסה בליזימטרים מובאת בטבלה מס. 4.

טבלה 4. נתונים על ניסוי החסה בליזימטרים

עונה	תאריך זריעה וקטיף	ימי גידול	משקל ממוצע	השקייה הליזימטר (L)	גשם הליזימטר (L)
1	18/12/11-25/03/12	98	1109	24	125
2	13/05/12-17/06/12	35	621	59	0
3	18/11/12-11/02/13	86	766	15	135
4	05/06/13-14/07/13	39	715	48	0



התוספים האורגניים הוספו לליזימטרים ב-3 תאריכים: 20/6/2011, 23/4/2012 וב- 19/5/2013 כפי שתואר בפרק א' מהדווח. הרכב ה- PPCPs בתוספים ובקולחין שהשתמש להשקוה בתאריכים שונים מוצגות בטבלאות 5 ו- 6.

טבלה 5. הרכב ה- PPCPs בתוספים האורגניים בניסוי הליזימטרים (ng/g).

Ibuprofen	Gemfibrozil	Triclosan	Diphenyl hydramine	Carbamazepine	Caffeine	
16	414	1328	15	130	117	COMPOST 6/11
	430	1350	15	133	89	
	2	9		2	353	COMPOST 4/12
32	30	92		6	92	
	24	868	9	23	41	COMPOST 5/13
	21	593	3	28	87	
	4	150	3	6	6	NVIRO 6/11
	2	192	4	9	15	
	3	170	3	8	7	NVIRO 4/12
8	2	156	3	7	24	
	4	212	4	5	12	NVIRO 5/13
	4	243	4	5	9	
	263	5423	35	647	98	Class B Sludge 6/11
	188	4793	32	899	89	
	405	2400	14	321	205	Class B Sludge 4/12
	203	1988	20	176	218	
	300	2085	25	246	498	Class B Sludge 5/13
	428	2348	17	290	233	

מטבלה 6 רואים שהבוצה מכילה כמות גבוה יותר של מזהמים אורגניים מאשר התוספים האחרים. זה צפוי היות שבזמן הקומפוסטציה חלק מהחומרים מתפרקים וב- NVIRO יש רק כ- 20% בוצה וגם היא עוברת תהליך חימום בטמפרטורות גבוהות. בנוסף רואים שונות לא קטנה בריכוזם של המזהמים

האורגניים בכל תוסף בתאריכים השונים. למשל, ריכוז ה-carbamazepine בקומפוסט ביוני 2011 היא כ- 130 ug/kg ובאפריל 2012 רק כ- 2-6 ug/kg.

טבלה 6. הרכב ה- PPCPs בקולחין בניסוי הליזימטרים (ug/L).

	תאריך דיגום קולחין רבדים				
	4/7/2011	21/12/2011	5/6/2012	16/12/2012	24/6/2013
Acesulfame	11.4	410	60.6		65.5
Acetylsalicyl acid					
Benzfibrate			441		
Caffiene	18.6	49.0	23.2	33.1	21.7
Carbamazepine	22.5	11.1	24.6	2.4	53.6
Ciprofloxacin					
Clorfibrate					
Codiene					
Diclofenac					
Diphenylhydramine hydrochloride (DPHA)					
Doxycyclic hyclate					
Enalaprilat					
Femotidine					
Fenofibrate					
Fexofenadine					
Galaxolide					
Gemfibrozil	21.9	20.1	22.3	15.7	20.3
Ibuprofren					
Nadalol					
Naproxen					
Sulfamethoxazole					
Triclorcarban	19.1	12.5	21.6	11.2	27.2
Triclosan	48.3	62.0	33.8	55.0	34.6

גם ריכוזם בקולחים אינו יציב עם הזמן – ה-carbamazepine נא בין 2.4 ל- 54 ug/L. שוב השינויים לא כל כך גדולים וצפויים.

נבדק ריכוזם של ה- PPCPs בנקז של הליזימטרים בדצמבר 2013 לאחר קטיף החסה בעונה האחרונה (טבלה 7). רק 4 חומרים נמצאו בתשטיפים – diclofenac, gemfibrozil, carbamazepine, caffeine. הריכוזים שנמצאו נמוכים בכשתי סדרי גודל מריכוזם בקולחין שאיתם השקינו את הליזימטרים. הירידה בריכוז נובע כנראה מפירוקם בקרקע. חפץ ושות' (2009) וגם Grossberger et al. (2014) דווחו ש- diclofenac, gemfibrozil, carbamazepine עוברים פירוק די מהיר בקרקע. (Laws et al. (2011) ו- Estevez et al. (2012) דווחו ש- caffeine די עמיד בקרקע ואינו עובר פירוק. מאידך, Williams & McLain (2012) הראו שה- caffeine אינו נייד בקרקע ולא מגיע מעבר כ- 50 סמ' עומק. Diclofenac נמצא בתשטיפים של הליזימטרים אבל לא בקולחין ולא בתוספים האורגניים. (Estevez et al. (2012) דווחו על מקרים דומים בו מצאו מספר חומרים במי תהום באתר שהושקתה בקולחין נקיים מחומרים אלו. מקור ה- diclofenac בתשטיפים של הליזימטרים אינו ברור.

טבלה 7. ריכוזם של ה- PPCPs בנקז של הליזימטרים בדצמבר 2013 (ug/L).

קומפוסט	קומפוסט	בוצה	NVS-50	NVS-150		
0	0	0	0	0	DCF	חרסית רבדים
0	0.2±0.02	0	0	0	CBZ	
0.06±0.01	0.04±0.06	0	0.05±0.01	0	CAF	
0	0.65±0.09	0	0	0	GEM	
0.51	0.47	0	0.17	0.12±0.08	DCF	לס רבדים
0	0.09±0.02	0	0.04±0.04	0.04±0.01	CBZ	
0	0.11±0.01	0	0.08±0.002	0.07±0.02	CAF	
0.17±0.16	0.31±0.2	0	0	0	GEM	
0.35±0.13	0	0	0.23±0.11	0	DCF	חול רבדים
0.03±0.001	0	0	0.02	0	CBZ	
0	0	0	0.05	0	CAF	
0	0	0	0	0	GEM	
0	0	0	0.15	0	DCF	חול וולקני
0.13±0.05	0.41±0.07	0.51±0.19	0.16±0.04	0	CBZ	
0	0	0.04	0.05	0	CAF	
0.5	0.87±0.08	0.89±0.11	0.19±0.16	0	GEM	

בהתחשב שדיגום התשטיף בא לאחר 3 עונות של השקיה בקולחין יש להניח שהתפתחה אוכלוסיה מיקרוביאלית שיכולה לפרק חומרים אלו ולכן ריכוזם הנמוך אינו מפתיע במיוחד. לא נמצא מגמתיות בנקז בין הקרקעות.

המטרה העיקרית של העבודה הינו לבחון אם המזהמים האורגניים השונים הנמצאים בתוספות האורגניות נקלטים ע"י הצמח ובאיזו ריכוזים. בבדיקות של החסה בליזימטרים נמצאו 2 חומרים בלבד, ה- caffeine וה- carbamazepine (טבלה 8). לא נמצאו חומרים אחרים ולא נמצאו אף PPCP בדוגמאות של חיטה מניסוי השדה – לא בגרעינים ולא בגבעולים. תוצאות דומות דווחו ע"י (Gottschall et al. 2012). עבור חיטה שגדל בקרקע שקיבל תוספת בוצה שעבר עיקול אנארובי. אין הרבה נתונים בספרות על קליטת PPCPs ע"י צמחים. (Wu et al. 2012) מצא ריכוז של כ- 600 ng/g של carbamazepine בחסה שקיבל תוספת של בוצה class B. בעבודה של (Holling et al. 2012) מצאו ריכוזים בין 318-660 ng/g של carbamazepine בחסה לאחר גידול בקרקע שקיבל תוספת של בוצת שפכים ממט"ש מקומי ללא טיפול נוסף. הריכוזים שמצאנו (טבלה 8) עבור carbamazepine בחסה נמוכים ורק בטיפול חול וולקני נמצא ריכוזים גבוהים (גם ל- caffeine). ראוי לציין שריכוזם של ה- PPCPs בקרקעות שלא קיבלו תוספת אורגנית כלשהו – אבל הושקו בקולחין - משמעותיים ביותר ומאששים את התוצאות על קליטת ההורמונים בפרק א'. (Wu et al. 2010) דווחו על זמינות גבוה יותר של PPCPs מקולחין מאשר מבוצות – דבר המאשש הממצאים שלנו. בכל אופן רואים בבירור שיש השפעה של הוספת קומפוסט לקרקע על קליטת 2 חומרים אלו. לכן רכשנו בשוק חסות רגילות, חסות אורגניות שמקבלים זיבול בתוספים אורגניים במקום דישון כימי, וחסה "גוש קטיף". התוצאות מובאות בטבלה 9 ומראות הבדל די משמעותי בין החסות. לחסות האורגניות ריכוזים גבוהים בהרבה מאלו שגודלו ללא תוספים אורגניים המעידים על תרומתם לקליטת ה- PPCPs ע"י החסה.

טבלה 8. ריכוז (ng/g) ה- PPCPs בחסה לאחר 3 שנים של תוספים אורגניים.

חול וולקני		חול רבדים		לס רבדים		חרסית רבדים		טיפול
CAF	CBZ	CAF	CBZ	CAF	CBZ	CAF	CBZ	
17±8	105±46	20	14	-	22±48	20	63±7	קומפוסט ללא
63±36	223±65	50±14	90±17	89	26±96	-	-	קומפוסט
25±10	171±31	-	-	-	-	-	-	בוצה
-	38±33	59±40	6±2	56±7	39±6	2±9	63±13	NVS-50
-	-	-	-	-	34±12	-	-	NVS-150

טבלה 9. ריכוז (ng/g) של PPCPs בחסות שונות מהשוק.

Carbamazepine	Caffeine	
4.5±2.1	64±35	חסה רגילה
21±8.5	230±21	חסה אורגנית
2.3±1.1	41±49	גוש קטיף

## סיכום כללי:

הבוצות ומי ההשקיה (שפירים ומי קולחים) הכילו ריכוזים ניכרים של הורמונים. נמצא שלמי ההשקיה, אשר מכילים כמויות לא מבוטלות של הורמונים, יש השפעה חזקה יותר על רמת ההורמונים שנקלטו ע"י החסה מאשר לתוספים האורגניים. ריכוז ההורמונים בחסה עבור סף המותר לפי המלצת ה-USFDA.

יש קורולציה בין תכולת הפחמן האורגני בבוצות וקומפוסטים וספיחת ה-gemfibrozile. קבועי הספיחה על בסיס פחמן אורגני (Koc) דומים לשלושת הבוצות. ספיחת ה-gemfibrozile בקרקעות שטופלו בבוצות הייתה חזקה מאשר בקרקעות שלא קיבלו תוספת ח"א.

בניסוי ליזימטרים נבדק קליטת PPCPs ע"י חסה. נמצא שלאחר 3 שנים של הוספת התוספים האורגנים נמצאו רק 2 חומרים שנקלטו ע"י הצמח – קרבמזפין וקפאין. הריכוזים היו נמוכים לאומת נתונים מהספרות. נמצא גם כאן השפעה חזקה של מי ההשקיה שהכילה חומרים אלו.

### **LC-MS/MS methodology**

Chromatographic separation was achieved on Shimadzu Prominence high performance liquid chromatograph system (Shimadzu Corp. Japan) equipped with: a degasser (DGU-20A<sub>3</sub>), two solvent delivery units (LC-20 AD), an auto-sampler (SIL 20 ACHT) and a column oven thermostat operated at 30 °C (CTO – 20 ASVP). Separation was performed using a Comosil column (5C<sub>18</sub>-MS-II), 150 mm 4.6 mm i. d., 5 µm particle size (Nacalai USA, Inc.).

The HPLC system was coupled to a 3200 LC/MS/MS mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex) with an electrospray Turbo V ionization source. Acquisition was performed in the multiple reaction monitoring mode (MRM).

#### **Positive mode**

LC conditions: The initial mobile phase composition was 90% water with 0.3% acetic acid and 0.1% ammonium acetate (A) and 10% methanol-acetonitrile mix at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>; then solvent B was increased gradually to 100% over 22 min. The sample volume injected was 20 µl. Table 1 represents the MS/MS parameters for the positive MRM acquisition mode

#### **Negative mode**

LC conditions: The initial mobile phase composition was 60% water with 0.1% acetic acid and 0.1% ammonium acetate (A) and 40% methanol-acetonitrile mix at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>; then solvent B was increased gradually to 100% over 15 min. The sample volume injected was 20 µl. Table 2 represents the MS/MS parameters for the negative MRM acquisition mode.

Table 1. The PPCPs dependent MS/MS parameters optimized for the positive MRM acquisition mode

<b>Compound</b>	<b>MRM</b>	<b>DP (V)</b>	<b>CE (V)</b>	<b>CXP (V)</b>
Naproxen	231.2/185.2 231.2/115.1	31	17	4
Diclofenac	296.0/250.0 231.2/115.1	31	25	4
Caffiene	195.1/138.1 195.1/110.0	46	17	4
Ciprofloxacin	332.1/231.0 332.1/314.2	41	47	2
Carbamazapine	237.1/194.1 237.1/179.0	31	25	38
Diphenylhydramine	257.1/168.3	31	19	4
Galaxolide	259.2/189.2 259.2/145.2	31	19	4
Codiene	300.2/152.2	51	87	0
Doxycyclic hyclate	445.2/98.1 445.2/127.1	41	59	2
Fexofenadine	502.3/171.1 502.3/466.4	61	49	2
Enalaprilat	349.2/206.1 349.2/91.2	41	23	4
Femotidine	338.1/189.2 338.1/155.2	36	25	8
Fenofibrate	361.1/139.1 361.1/233.2	41	37	4
Nadalol	310.2/201.1	41	21	4
Sulfamethoxazole	254.1/156.0 254.1/92.1	81	45	4



Table 2. The PPCPs dependent MS/MS parameters optimized for the negative MRM acquisition mode

<b>Compound</b>	<b>MRM</b>	<b>DP (V)</b>	<b>CE (V)</b>	<b>CXP (V)</b>
Triclosan	231.2/185.2 231.2/115.1	-25	-24	-4
Benzfibrate	296.0/250.0 231.2/115.1	-25	-22	-2
Clorfibrate	195.1/138.1 195.1/110.0	-45	-20	0
Gemfibrozil	332.1/231.0 332.1/314.2	-20	-20	-2
Ibuprofen	237.1/194.1 237.1/179.0	-20	-6	-2
Triclorcarban	257.1/168.3	-55	-20	0
Acesulfame	259.2/189.2 259.2/145.2	-30	-18	0
Acetylsalicyl acid	300.2/152.2	-15	-16	0



## References

- Andersson AM; Skakkebæk NE (1999). Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology* 140 477–485
- Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil*; 272:201-209.
- Arnon,S, Dahan,O, Elhanany,S, Cohen,K, Pankratov,I, Gross,A, Ronen,Z, Baram,S, Shore,LS (2008). Transport of testosterone and estrogen from dairy-farm waste lagoons to groundwater, *Environmental Science & Technology* 42: 5521-5526.
- Avisar,D, Lester,Y, Ronen,D (2009). Sulfamethoxazole contamination of a deep phreatic aquifer, *Science of the Total Environment* 407: 4278-4282.
- Bassil N, Alkaade S, Morley JE (2009). The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Ther Clin Risk Manag* 5 (3): 427–448.
- Ben-Gal A, Shani U (2002). A highly conductive drainage extension to control the lower boundary condition of lysimeters. *Plant and Soil* 239, 9-17.
- Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS. (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agric Food Chem* 54: 2288-2297.
- Bruce GM, Pleus RC, Snyder SA. (2010) Toxicological Relevance of Pharmaceuticals in Drinking Water. *Environmental Science & Technology* 44: 5619-5626.
- Dettenmaier EM, Doucette WJ, Bugbee B. (2009) Chemical Hydrophobicity and Uptake by Plant Roots. *Environmental Science & Technology* 2009; 43: 324-329.
- Estevez E, Cabrera MdC, Molina-Diaz A, Robles-Molina J, Palacios-Diaz MdP. (2012) Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Sci Total Environ* 433: 538-546.
- Fine P, Hass, A, Prost, R, Atzmon, N (2002). Organic carbon leaching from effluent irrigated lysimeters as affected by residence time. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66:1531-1539.
- Fine, P, Hass, A (2007). Role of Organic Matter in Microbial Transport during Irrigation with Sewage Effluent. *J. Environ. Qual.* 36:1050-1060.
- Gawienowski AM, Gibbs CC (1969). The isolation of estrone from apple seeds. *Phytochemistry* 8: 685–686.

Gottschall N, Topp E, Metcalfe C, Edwards M, Payne M, Kleywegt S, Russell P, Lapen DR. (2012) Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 87: 194-203.

Grossberger A, Hadar Y, Borch T, Chefetz B. (2014) Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environ Pollut* 185: 168-177.

Holling CS, Bailey JL, Heuvel BV, Kinney CA. (2012) Uptake of human pharmaceuticals and personal care products by cabbage (*Brassica campestris*) from fortified and biosolids-amended soils. *J Environ Monitor* 14: 3029-3036.

Huggins CB, Stevens RB, Hodges CV (1941). The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg.* 43:209.

Kuch HM, Ballschmitter K (2001). Determination of endocrine- disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC- (NCI)- MS in the picogram per liter range. *Envir Sci Technol* 35: 3201–3206.

Laws BV, Dickenson ERV, Johnson TA, Snyder SA, Drewes, JE (2011), Attenuation of contaminants of emerging concern during surface-spreading aquifer recharge. *Sci Total Environ* 409:1087–1094.

Malchi T, Maor Y, Tadmor G, Shenker M, Chefetz B. (2014), Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environmental Science & Technology* 48: 9325-9333.

McClellan, K; Halden, RU (2010) Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA National Sewage Sludge Survey. *Water Res.*, 44:658-668

Partsch CJ, Sippell WG (2001). Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Hum Reprod Update.* 7(3):292-302.

Sabourin L, Duenk P, Bonte-Gelok S, Payne M, Lapen DR (2012). Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Science of the Total Environment* 431; pp 233–236.

Scherr FF, Sarmah AK, Di HJ, Cameron KC (2008). Modeling degradation and metabolite formation kinetics of estrone-3-sulfate in agricultural soils. *Environ Sci Technol*. 2008 Nov 15;42(22):8388-94.

Stumpe B, Marschner B. (2010). Organic waste effects on the behavior of 17 $\beta$ -estradiol, Estrone, and 17 $\alpha$ - ethinylestradiol in agricultural soils in long- and short-term setups. *Journal of Environmental Quality*. 39 (3) 907-916

Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD Servos M. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. Investigations in Germany, Canada, and Brazil. *Sci Total Envir* 225: 81–90.

US Food and Drug Administration (1999). Guideline 3, part 2: Guideline for toxicological testing. [www.fda.gov](http://www.fda.gov) 1–5.

Vysotskaya LB, Timergalina LN, Simonyan MV, Veselov SY, Kudoyarova G.R (2001). Growth rate, IAA and cytokinin content of wheat seedling after root pruning. *Plant Growth Regulation* 33, 51–57.

Williams CF, McLain JET. (2012) Soil Persistence and Fate of Carbamazepine, Lincomycin, Caffeine, and Ibuprofen from Wastewater Reuse. *J Environ Qual* 41: 1473-1480.

Wu CX, Spongberg AL, Witter JD, Fang M, Czajkowski KP. (2010) Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Soybean Plants from Soils Applied with Biosolids and Irrigated with Contaminated Water. *Environ Sci Technol* 44: 6157-6161.

Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Sridhar BBM. (2012) Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotox Environ Safety* 85: 104-109.

Zumoff B (1998). Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical, and clinical investigative studies to a resolution of the controversy. *Proc Soc Exp Biol Med*. 217(1): 30-37.

חפץ, ב., שנקר, מ., הדר, י. (2009) חומרים רפואיים ממי קולחים: קליטה על ידי צמחים וגורל בקרקע. דו"ח לתוכנית מחקר מספר 821-0101-09, המדען הראשי למשרד החקלאות.

## סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

**הערה:** נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. לבחון: שכיחותם וריכוזם בבוצות שפכים בארץ; השפעת החומר האורגני המוצק והמסיס המוספים עם הבוצה על מסיסותם, תנועתם וזמינותם לצמח ויחסי הגומלין שלהם עם השקיה בקולחים; פוטנציאל קליטתם בגידולים חקלאיים המשמשים למאכל ישיר כתוצאה משמוש בבוצות לחקלאות;</p>
<p><b>עיקרי התוצאות.</b> הבוצות ומי ההשקיה (שפירים ומי קולחים) הכילו ריכוזים ניכרים של הורמונים. נמצא שלמי ההשקיה, אשר מכילים כמויות לא מבטלות של הורמונים, יש השפעה חזקה יותר על רמת ההורמונים שנקלטו ע"י החסה מאשר לתוספים האורגניים. ריכוז ההורמונים בחסה עבור סף המותר לפי המלצת ה-USFDA.</p> <p>יש קורולציה בין תכולת הפחמן האורגני בבוצות וקומפוסטים וספיחת ה-gemfibrozile. קבועי הספיחה על בסיס פחמן אורגני (Koc) דומים לשלושת הבוצות. ספיחת ה-gemfibrozile בקרקעות שטופלו בבוצות הייתה חזקה מאשר בקרקעות שלא קיבלו תוספת ח"א.</p> <p>בניסוי לייזימטרים נבדק קליטת PPCPs ע"י חסה. נמצא שלאחר 3 שנים של הוספת התוספים האורגנים נמצאו רק 2 חומרים שנקלטו ע"י הצמח – קרבמזפין וקפאין. הריכוזים היו נמוכים לאומת נתונים מהספרות. נמצא גם כאן השפעה חזקה של מי ההשקיה שהכילה חומרים אלו.</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח? נמצא ש-PPCPs והורמונים נקלטו ע"י חסה כאשר יש השפעה חזקה של השקיה בקולחין על הקליטה.</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון /או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר? יש להכניס טוקסוקולוג לתמונה לקבוע מהם הריכוזים בצמח המהווים סיכון לבני אדם.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; Dorit Shargil, Zev Gerstl, Pinchas Fine, Ido Nitsan and Daniel Kurtzman <b>Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants Sci Total Environ (2014)</b></p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p>&lt; ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא</p>

\*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים