

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΣΤΗ
ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΦΑΙΝΑΝΘΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΓΡΟΤΙΚΑ
ΕΔΑΦΗ ΚΑΙ Η ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ.**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΕΩΡΓΑΝΤΑ ΕΙΡΗΝΗ-ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2004



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 3970/1

Ημερ. Εισ.: 26-10-2004

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

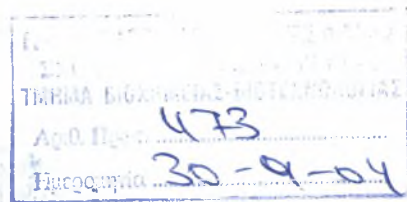
2004

ΓΕΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075133



Λάρισα, Σεπτέμβριος 2004

Γεωργαντά Ειρήνη-Μαρία

Αναφορά του επιστημονικού έργου που διεξήχθη κατά την τρίμηνη εργασία (01.03.04 – 01.06.04) στο Università Cattolica del Sacro Cuore στην Piacenza της Ιταλίας.

Το ινστιτούτο Chimica Agraria του Università Cattolica del Sacro Cuore στην Piacenza της Ιταλίας είναι ένα από τα πιο δραστήρια κέντρα περιβαλλοντικών σπουδών στην Ευρώπη. Ιδιαίτερα ο τομέας εδαφικής έρευνας είναι σημαντικά δραστηριοποιημένος σε θέματα υπολογισμού της επίδρασης οργανικών και ανόργανων ενώσεων στα εδαφικά οικοσυστήματα και στην εύρεση εφικτών στρατηγικών για την εξυγίανση των μολυσμένων εδαφών.

Κατά την τρίμηνη παραμονή στην Piacenza εργάστηκα υπό την επίβλεψη του Dr. Edoardo Puglisi σε μια επιστημονική μελέτη με θέμα την επίδραση της προσθήκης οργανικών προσθετικών στη βιοδιαθεσιμότητα της φαινανθρίνης σε δείγμα ρυπασμένου εδάφους και την εύρεση της περισσότερο αποτελεσματικής τεχνικής για την εκχύλισή της.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΦΑΙΝΑΝΘΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΓΡΟΤΙΚΑ ΕΔΑΦΗ ΚΑΙ Η ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ.

Γεωργαντά Ειρήνη-Μαρία

Περίληψη

Η συμπεριφορά των υδρόφοβων οργανικών ρύπων στο εδαφικό περιβάλλον ελέγχεται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις τους με τα ποικίλα συστατικά του εδάφους. Έτσι, διαφορετικά ποσά πρόσθετης οργανικής ύλης ενσωματώθηκαν σε δείγματα εδάφους ρυπασμένα με φαινανθρίνη και έπειτα συγκρίθηκε η βιοδιαθεσιμότητά της φαινανθρίνης στα δείγματα αυτά σε σχέση με δείγματα χωρίς οργανικά προσθετικά. Η προσθήκη οργανικών προσθετικών στο έδαφος μείωσε τη βιοδιαθεσιμότητα της φαινανθρίνης. Επιπλέον, εφαρμόστηκαν εξαντλητικές (MeOH shaking, soxhlet, sonication) και μη εξαντλητικές (H₂O shaking, CD) τεχνικές εκχύλισης, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως η μέθοδος ανάδευσης με μεθανόλη αποτελεί την πιο αποτελεσματική τεχνική για την ανάκτηση της φαινανθρίνης από το ρυπασμένο έδαφος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες-ΠΑΥ (polycyclic aromatic hydrocarbons- PAHs) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων με δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους στο μόριό τους. Ανήκουν στους ευρύτερα

διαδεδομένους οργανικούς ρύπους του εδάφους, των φυσικών υδροφόρων συστημάτων και των υγρών λυμάτων. Παρουσιάζουν ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα, ανθεκτικότητα στην αποδόμηση, και λόγω της συγγένειάς τους με τους λιπώδεις ιστούς τείνουν να βιοσυσσωρεύονται μέσα στις τροφικές αλυσίδες. Οι περισσότεροι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, με χαμηλή τάση ατμού στον αέρα προσροφώνται σε σωματίδια. Όταν διαλύονται στο νερό ή προσροφώνται σε σωματιδιακό υλικό, οι ΠΑΥ υφίστανται φωτοδιάσπαση καθώς εκτίθενται στο υπεριώδες φως της ηλιακής ακτινοβολίας. Στην ατμόσφαιρα, οι ΠΑΥ μπορούν να αντιδρούν με ρύπους όπως οξειδία αζώτου και διοξειδία θείου, σχηματίζοντας νίτρο- ή δίνιτρο-ΠΑΥ, και σουλφονικά οξέα, αντίστοιχα. Οι ΠΑΥ υφίστανται επίσης αποδόμηση από μικροοργανισμούς του εδάφους (World Health Organization Regional Office for Europe, 1987 and ATSDR, 1994).

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες σχηματίζονται κυρίως ως αποτέλεσμα πυρολυτικών διαδικασιών, ιδιαίτερα μέσω της ατελούς καύσης οργανικών υλικών κατά τη διάρκεια βιομηχανικών ή άλλου είδους ανθρώπινων δραστηριοτήτων όπως διαρροές πετρελαίου, εξατμίσεις αυτοκινήτων, καύση φυσικού αερίου και διαδικασίες επεξεργασίας του άνθρακα (Means et al., 1980).

Σε μια εργαστηριακή έρευνα, επιστήμονες από την ιατρική σχολή του πανεπιστημίου του Χάρβαρντ στη Βοστώνη, μεταμόσχευσαν ιστό από ωοθήκες γυναικών που περιείχε ωάρια σε ποντικούς, τους οποίους στη συνέχεια υπέβαλαν στις τοξικές ουσίες που περιέχει ο καπνός του τσιγάρου (Matikainen et al., 2001). Εκείνο που διαπίστωσαν είναι ότι οι ουσίες αυτές δραστηριοποιούν ένα συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο οδηγεί τα γυναικεία ωάρια σε θάνατο. Αυτό σημαίνει ότι οι γυναίκες που καπνίζουν χάνουν σταδιακά τα αποθέματα ωαρίων που έχουν με αποτέλεσμα να οδηγούνται στη στειρότητα. Επίσης το φαινόμενο αυτό πιθανόν να εξηγεί και την πρόωρη εμμηνόπαυση που έχει συσχετισθεί με το κάπνισμα στις γυναίκες. Οι ουσίες στις οποίες οφείλεται το φαινόμενο αυτό είναι πιθανότατα οι **πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ)**. Έχει αποδειχθεί ότι οι καπνιστές εισπνέουν σημαντικές ποσότητες των ΠΑΥ (Matikainen et al., 2001). Ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι ΠΑΥ είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου **Bax** το οποίο βρίσκεται μέσα στα ωάρια. Η ενεργοποίηση του Bax επιφέρει το θάνατο του ωαρίου.

Παρόλο που υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε έναν περιορισμένο αριθμό τους, τους επονομαζόμενους 16 πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες προτεραιότητας της Εταιρίας Περιβαλλοντικής Προστασίας των Ηνωμένων Εθνών (EPA priority PAHs). Η παρουσία τους προκαλεί σοβαρή ανησυχία για το περιβάλλον και τον άνθρωπο, καθώς μερικοί από αυτούς, όπως το βενζο(a)πυρένιο και το βενζ(a)ανθρακένιο, αποδείχτηκε ότι έχουν καρκινογόνες και μεταλλαξιγόνες ιδιότητες (Santodonato, 1997). Αυτοί καταγράφονται από την Εταιρία Περιβαλλοντικής Προστασίας των Ηνωμένων Εθνών και την Ευρωπαϊκή Κοινότητα ως «ρύποι προτεραιότητας». Επιπλέον, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες επανεξετάζονται τώρα ως πιθανά συνθετικά οιστρογόνα, καθώς κύρια συστατικά τους εμφανίζουν παρόμοια δομή με φυσικά οιστρογόνα όπως την οιστραδιόλη (Santodonato, 1997). Έτσι, μεγάλη προσοχή έχει επικεντρωθεί πλέον στις πιθανές βιολογικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία.

1.2 Τοξικοκινητική των ΠΑΥ

Οι ΠΑΥ είναι ιδιαίτερα λιποδιαλυτοί και απορροφώνται σχετικά εύκολα από τους πνεύμονες (Wolff et al., 1989), το έντερο (Withey et al., 1991) και το δέρμα των θηλαστικών (Kao et al., 1985). Ανεξαρτήτως από τον τρόπο χορήγησης, οι ΠΑΥ κατανέμονται ταχέως και ευρέως στον οργανισμό. Ανιχνεύσιμα επίπεδα παρατηρούνται στα περισσότερα εσωτερικά όργανα από λεπτά έως ώρες μετά τη χορήγησή τους. Τα υψηλότερα επίπεδα συνήθως παρατηρούνται στο ήπαρ (IARC, 1983, and Foth et al., 1988). Οι μαστικοί και άλλοι λιπώδεις ιστοί αποτελούν κύριες πηγές αποθήκευσης των ΠΑΥ (Modica et al., 1983), αλλά λόγω του ταχέως μεταβολισμού τους δε φαίνεται να λαμβάνει χώρα σημαντική συσσώρευση. Το γαστρεντερικό σύστημα περιέχει σχετικά υψηλά επίπεδα μεταβολιτών ως αποτέλεσμα της ηπατοχολικής απέκκρισης (Schlede et al., 1970, and Wiersma and Roth, 1983). Μετά το μεταβολισμό, η ηπατοχολική απέκκριση μέσω των περιττωμάτων αποτελεί τον κύριο τρόπο με τον οποίο οι ΠΑΥ απομακρύνονται από το σώμα, ανεξαρτήτως από τον τρόπο με τον οποίο χορηγήθηκαν (Foth et al., 1988, and Van de Wiel et al., 1993).

Το ενζυμικό σύστημα που είναι κυρίως υπεύθυνο για τον μεταβολισμό των ΠΑΥ είναι αυτό της οξειδάσης μικτής λειτουργίας των μικροσωματίων, το οποίο μετατρέπει τους μη πολικούς ΠΑΥ σε πολικά υδρόξυ- και επόξυ- παράγωγα (Hall et al., 1989). Τα εποξειδία είναι τα κυριότερα ενδιάμεσα του οξειδωτικού μεταβολισμού των αρωματικών διπλών δεσμών. Είναι πολύ δραστικά και μεταβολίζονται ενζυμικά σε άλλες ενώσεις όπως οι διυδροδιόλες και οι φαινόλες (Glatt and Oesch, 1987). Τα ενζυμικά συστήματα που μεταβολίζουν τους ΠΑΥ είναι ευρέως καταμεμημένα στα κύτταρα και τους ιστούς των ανθρώπων και των ζώων. Η υψηλότερη μεταβολική λειτουργία παρατηρείται στο ήπαρ, ακολουθούμενη από τους πνεύμονες, τον εντερικό βλεννογόνο, το δέρμα και τους νεφρούς (Anderson et al., 1989). Οι ΠΑΥ διεγείρουν τον ίδιο τους το μεταβολισμό επάγοντας τις μονοοξυγενάσες και τις υδρολάσες του συστήματος κυτοχρώματος P-450. Η επαγωγή των ισοενζύμων που ανήκουν στην P-450IA υποοικογένεια του κυτοχρώματος (CYP1A1 and CYP1A2) διαμεσολαβείται από τη δέσμευση σε μια κυτοσολική πρωτεΐνη-υποδοχέα, τον Ah υποδοχέα (Nebert et al., 1993).

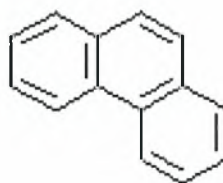
Οι ΠΑΥ ασκούν την μεταλλαξιγόνο και καρκινογόνο δράση τους μέσω της βιομετατροπής τους σε χημικά ενεργά ενδιάμεσα που δεσμεύονται ομοιοπολικά στα κυτταρικά μακρομόρια. Εκτενείς και συστηματικές μελέτες πάνω στην ογκογένεση που προκαλούν οι μεταβολίτες των ΠΑΥ σε ζώα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα «γειτονικά» (bay-region) εποξειδία διόλης είναι οι βασικότεροι μεταλλαξιγόνοι και καρκινογόνοι μεταβολίτες των ΠΑΥ, αν και όχι απαραίτητα οι μόνοι (Graslund and Jernstrom, 1989). Αυτά τα εποξειδία διόλης μετατρέπονται εύκολα, με άνοιγμα του δακτυλίου του εποξειδίου, σε ηλεκτρονιόφιλα καρβοκατιόντα, τα οποία αποτελούν αλκυλιωτικούς παράγοντες που δεσμεύονται ομοιοπολικά σε πυρηνόφιλες περιοχές στις βάσεις του DNA και στις πρωτεΐνες.

1.3 Οι ΠΑΥ στο έδαφος

Καρκινογόνοι ΠΑΥ έχουν βρεθεί στα επιφανειακά στρώματα πλήθους εδαφών. Οι τυπικές συγκεντρώσεις σε ένα δασικό έδαφος κυμαίνονται από 5 μg σε 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Σημαντικές ποσότητες των ΠΑΥ μεταφέρονται στο δασικό έδαφος από φυτικά υπολείμματα, καθώς πολλοί ΠΑΥ από τον αέρα προσροφώνται σε οργανικά υλικά, όπως τα φύλλα και οι βελόνες των δέντρων. Τα αγροτικά εδάφη έχουν βρεθεί να περιέχουν κατά μέσο όρο καρκινογόνους ΠΑΥ σε επίπεδα των 10–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ προερχόμενοι κυρίως από ατμοσφαιρικές διαρροές. Και στα δύο προαναφερθέντα είδη εδάφους, είναι πιθανό να βρεθούν περιστασιακά τιμές καρκινογόνων ΠΑΥ που να φτάνουν τα 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Οι αστικές περιοχές έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ΠΑΥ (600–3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) από ότι οι δασικές ή αγροτικές περιοχές, εξαιτίας των πολλαπλών πηγών καύσης οργανικών υλικών. Είναι προφανές ότι σε περιοχές με πληθώρα μεταφορικών μέσων και βιομηχανιών οι συγκεντρώσεις των καρκινογόνων ΠΑΥ θα είναι κατά πολύ υψηλότερες (Menzie et al., 1992).

1.4 Φαινανθρίνη

Η φαινανθρίνη είναι ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας με τρεις βενζοϊκούς δακτυλίους, που βρίσκεται σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις σε περιοχές μολυσμένες με πίσσα και σε ρυπασμένα υδάτινα περιβάλλοντα. Ο



χημικός της τύπος είναι $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$, έχει Μοριακό Βάρος 178,22, και απαντάται ως άχρωμο κρυσταλλικό στερεό (Budavari et al., 1989, U.S. EPA, 1987). Έχει σημείο τήξεως 100°C , σημείο βρασμού 340°C , πυκνότητα 1.179 στους 25°C (Budavari et al., 1989) και πίεση ατμού 9.6×10^{-4} torr (25) (Mabey et al., 1982). Η φαινανθρίνη είναι σχετικά αδιάλυτη στο νερό (1–1.6 mg/L), αλλά ευδιάλυτη στο παγωμένο οξικό οξύ και σε μια πληθώρα άλλων οργανικών διαλυτών όπως η αιθανόλη, η βενζίνη, τα ανθρακικά δισουλφίδια, το ανθρακικό τετραχλωρίδιο, ο διαιθυλαιθέρας και το τολουόλιο (Budavari et al., 1989). Η φαινανθρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία βαφικών υλών, εκρηκτικών, φαρμάκων, στη

σύνθεση φαινανθρινοκουινόνης, και στη βιοχημική έρευνα (Sax and Lewis, 1987). Ένα παράγωγό της, η κυκλοπεντενοφαινανθρίνη, έχει χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό για τη σύνθεση στεροειδών χολικών οξέων, χοληστερόλης και άλλων στεροειδών (IARC, 1983). Η φαινανθρίνη αποτελεί μέλος της λίστας των «ρύπων προτεραιότητας» (ATSDR, 1990). Καθώς είναι ο μικρότερος αρωματικός υδρογονάνθρακας που έχει μια «bay-περιοχή» και μια «K-περιοχή», η φαινανθρίνη χρησιμοποιείται συχνά ως πρότυπο σε μελέτες για τον μεταβολισμό των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Παρόλα αυτά, η ίδια η φαινανθρίνη και οι μεταβολίτες της δεν είναι άμεσα τοξικοί, καρκινογόνοι ή μεταλλαξιγόνοι (Cerniglia, 1984).

1.5 Βιοδιαθεσιμότητα

Το μείζων θέμα που απασχολεί τους επιστήμονες, όσον αφορά στην αποδόμηση των υδρόφοβων οργανικών ρύπων και στην οικοτοξικότητα που προκαλούν στο εδαφικό περιβάλλον, είναι η βιοδιαθεσιμότητα του ρύπου (Heitzer et al., 1992). Η πορεία και η συμπεριφορά του οργανικού ρύπου, όπως η φαινανθρίνη, στο έδαφος εξαρτώνται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των εδαφικών χαρακτηριστικών, των ιδιοτήτων του ρύπου, της διαδικασίας απορρόφησής του και περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία. Η πιθανή τύχη των ρύπων αφού εισέλθουν στο εδαφικό περιβάλλον εξαρτάται από τις παρακάτω διεργασίες: διάχυση στα υπόγεια νερά, βιοαποδόμηση, εξάτμιση στον αέρα, δέσμευση στη στερεή φάση του εδάφους και μεταφορά στους εδαφικούς οργανισμούς (Jones et al., 1996).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, η ποσότητα μιας ουσίας όταν βρίσκεται στο έδαφος διαχωρίζεται στα εξής τμήματα:

- Αυτό που χάνεται λόγω διεργασιών, όπως η εξάτμιση, η υδρόλυση, η φωτόλυση και η βιοαποικοδόμηση,
- Αυτό που προσροφάται, αλλά είναι εύκολα διαθέσιμο με φυσικές και χημικές μεθόδους
- Το διαλυμένο στο εδαφικό διάλυμα και
- Το δεσμευμένο στη στερεή φάση του εδάφους (Bound residues), το οποίο είναι μη εκχυλίσιμο.

Φαίνεται να είναι πλέον ευρέως αποδεκτό το γεγονός ότι καθώς οι οργανικοί ρύποι δεσμεύονται στα φυσικά εδαφικά κολλοειδή καθίστανται λιγότερο βιοδιαθέσιμοι για τους μικροοργανισμούς. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στη δέσμευση των οργανικών ρύπων στην εδαφική οργανική ύλη περιλαμβάνουν δεσμούς π, δεσμούς υδρογόνου, ανταλλαγή προσδετών, και σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών με αλληλεπίδραση των διαφορετικών λειτουργικών ομάδων. Έτσι, λοιπόν, η οργανική ύλη του εδάφους έχει αποδειχθεί ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σχηματισμού δεσμευμένων κατάλοιπων (Northcott and Jones, 2000).

Τα ισχυρώς δεσμευμένα τμήματα των οργανικών ρύπων στο έδαφος είναι αρκετά σταθερά στο περιβάλλον και αποτελούν μια από τις δυσκολότερες προκλήσεις στην προσπάθεια για εξυγίανση των ρυπασμένων περιοχών (Alexander, 1991, Scow, 1993). Η παραμονή και υπολειμματικότητα σημαντικών ποσοτήτων οργανικών ρύπων στο έδαφος έχει προταθεί ότι σχετίζεται με την υψηλή λιποφιλικότητά τους (Cerniglia, 1992).

Παρόλα αυτά, ακόμη και τα μη βιοδιαθέσιμα τμήματα των ρύπων μπορούν να ανακτηθούν εφαρμόζοντας εξαντλητική εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (Kelsey and Alexander, 1997). Η εκτίμηση του κινδύνου των περιβαλλοντικών ρύπων βασίζεται πλέον στη συγκέντρωση των χημικών που εξάγονται από το έδαφος με εξαντλητικές μεθόδους (US Environmental Protection Agency, 1992).

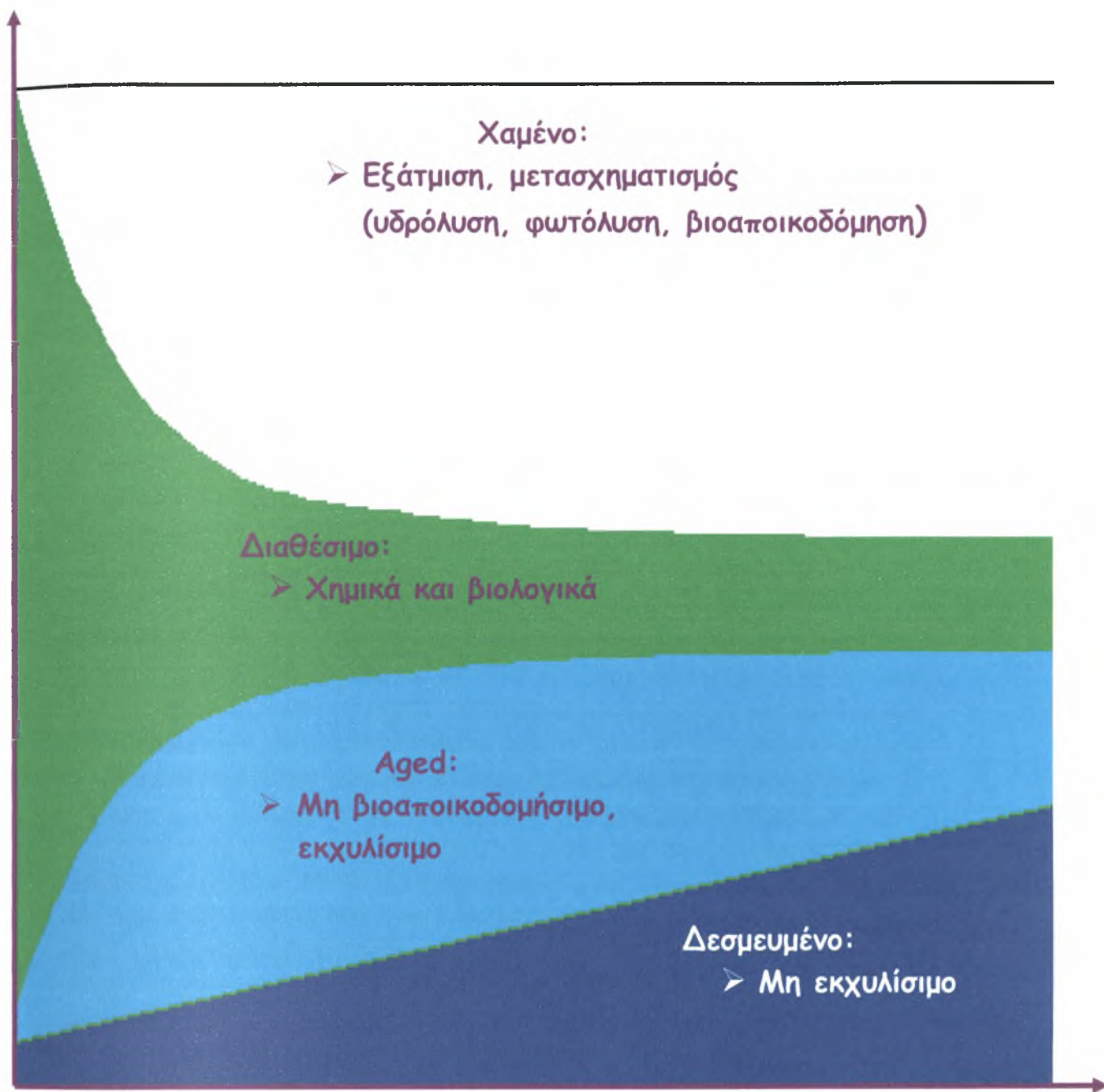
Η έννοια της βιοδιαθεσιμότητας δεσμευμένων ρύπων μπορεί να υφίσταται στα πλαίσια αργών ρυθμών αποδέσμευσής τους ή περιορισμού στη μαζική μεταφορά τους. Πράγματι, οι υδρόφοβοι ρύποι επιδεικνύουν πολύ αργούς ρυθμούς αποδέσμευσης από το έδαφος, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το αποτέλεσμα της εξυγίανσης (Luthy *et al.*, 1997). Η Αμερικανική Κοινότητα Ελέγχου και Υλικών [American Society for Testing and Materials (ASTM) 1998] όρισε τη βιοδιαθεσιμότητα ως ένα μέτρο που δείχνει το ποσοστό του χημικού, που μας ενδιαφέρει στο περιβάλλον, το οποίο είναι διαθέσιμο και άμεσα προσβάσιμο από έναν οργανισμό για απορρόφηση.

1.6 Το φαινόμενο της «Γήρανσης» (Aging) στο έδαφος

Οι τοξικές οργανικές ενώσεις, όσο παραμένουν στο έδαφος, καθίστανται ολοένα και λιγότερο βιοδιαθέσιμες και συνεπώς λιγότερο τοξικές (Alexander, 2000). Αντιθέτως, ενώσεις που έχουν πρόσφατα προστεθεί στο έδαφος είναι πλήρως διαθέσιμες στους μικροοργανισμούς του εδαφικού περιβάλλοντος (εικ. 1) (Weissenfels et al., 1992, Erickson et al., 1993). Η χρόνο-εξαρτώμενη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας, που συχνά αναφέρεται με τον όρο «Γήρανση» (Aging), οφείλεται στη σταδιακή προσρόφηση των χημικών σε θέσεις του εδάφους ή σε εδαφικά κολλοειδή που δεν είναι προσβάσιμα στους μικροοργανισμούς.

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, ότι το φαινόμενο της γήρανσης πολλών υδρόφοβων ρύπων συμβαίνει στο έδαφος (Alexander, 1995, Luthy et al., 1997). Χαρακτηριστικό δε είναι ότι οι «γηρασμένες» ενώσεις εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στις διαδικασίες εκχύλισης με διαλύτες (Kelsey et al., 1997) και εκρόφησης (Kan et al., 1994). Αυτή η ανθεκτικότητα οδηγεί σε μειωμένη διαθεσιμότητα τους στα βακτήρια (Nam et al., 1998) καθώς επίσης και στους ανώτερους οργανισμούς.

Παρότι έχει γίνει αποδεκτή η διαδικασία της γήρανσης των υδρόφοβων ρύπων στο φυσικό περιβάλλον, δεν είναι ακόμη σαφές ποιοι μηχανισμοί εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό. Δύο από τους πιθανότερους μηχανισμούς είναι η συνένωση των οργανικών ενώσεων με τη φυσική οργανική ύλη (Carroll et al., 1994) και η διείσδυση των ρύπων σε μικρούς πόρους του εδάφους (Wu and Gschwend, 1986). Ένα επιπρόσθετο μοντέλο έχει προταθεί, προερχόμενο από παρατηρήσεις διαφορετικών συναγωνιστικών επιρροών στη δέσμευση των οργανικών ρύπων (Xing et al., 1996). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η φυσική οργανική ουσία έχει δύο διαφορετικές περιοχές δέσμευσης που αλληλεπιδρούν με τους οργανικούς ρύπους: μια περιοχή διαμερισμού και μια υδρόφοβη περιοχή με πόρους. Η τελευταία εμφανίζει συναγωνιστική συμπεριφορά δέσμευσης και πιθανώς ευθύνεται για τα ανθεκτικά στην εκχύλιση τμήματα των «γηρασμένων» ρύπων. Αυτή η αντίληψη ενισχύεται από τα ευρήματα που δείχνουν ότι οι μικροί πόροι με υδρόφοβες επιφάνειες είναι υπεύθυνοι για την αντίσταση στην εκρόφηση (Werth and Reinhard, 1997) και τη φθίνουσα βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων στα βακτήρια (Nam and Alexander, 1998).



Εικ. 1 Η τύχη των οργανικών ρύπων που εισέρχονται στο έδαφος με την πάροδο του χρόνου.

1.7 Οργανικά πρόσθετα και βιοδιαθεσιμότητα

Παρόλο που οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες μπορούν να υφίστανται προσρόφηση, εξάτμιση, φωτόλυση και χημική οξειδωση, η μικροβιακή αποδόμηση είναι η κύρια διαδικασία αποσύνθεσής τους ([Bumpus, 1989], [Bogan and Lamar, 1995], [Kilbane, 1998], [Yuan et al.]). Οι μικροοργανισμοί που αποδομούν τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες μπορεί να είναι άλγη, βακτήρια και μύκητες ([Juhasz et al., 1996], [Marquez-Rocha et al., 2000]. Τα πρόσθετα οργανικά υλικά και λιπάσματα αποτελούν πλούσιες πηγές ξενοβιοτικών αποδομητικών μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν βακτήρια, ακτινομύκητες και λιγνολυτικούς ατελείς μύκητες, οι οποίοι μπορούν να αποδομούν ρύπους σαν τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Παρόλο που πολλά επιφανειακά εδάφη περιέχουν ενδογενή βακτήρια και μύκητες ικανούς να αποδομούν τους υδρογονάνθρακες (Berry 1999, Prince and Drake 1998 and van Agteren et al. 1998), υλικά όπως τα λιπάσματα συγχωνεύονται με μολυσμένα εδάφη για να συνεισφέρουν στην αποδόμηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων ως μια *in-situ* διαδικασία εξυγίανσης του εδάφους (Crawford et al., 1993). Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν επιπλέον να μετατρέπουν τους ρύπους σε λιγότερο τοξικές ουσίες. Η επιτυχία ή αποτυχία μιας στρατηγικής εξυγίανσης με πρόσθετα οργανικά υλικά (λιπάσματα) εξαρτάται, παρόλα αυτά, από μια πληθώρα παραγόντων, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η βιοδιαθεσιμότητα και η βιοαποδομησιμότητα του ρύπου (Semple et al., 2001).

Η χρήση οργανικών προσθετικών σε εδάφη έχει δοκιμασθεί με επιτυχία για αύξηση της γονιμότητας του εδάφους και αύξηση της περιεκτικότητας των εδαφών σε οργανική ουσία (Houot et al., 2002). Μεγάλα ποσά λιπασμάτων εφαρμόζονται κάθε χρόνο σε καλλιεργούμενα εδάφη. Ένα τμήμα του άνθρακα που προστίθεται περνά στο εδαφικό διάλυμα μέσω καθίζησης ή έκπλυσης, φθάνοντας έτσι σε βαθύτερα στρώματα του εδαφικού ορίζοντα (Gigliotti et al., 2002). Το ποσό της διαλυτής οργανικής ύλης είναι μικρό, φυσιολογικά λιγότερο από το 1% του συνολικού οργανικού περιεχομένου. Αλλά αυτό το ποσό παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των υδρόφοβων ρύπων κάθετα στον εδαφικό ορίζοντα αλλά και στη μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος (Kaiser et al., 1997).

Εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας των οργανικών ενώσεων

Η βιοδιαθεσιμότητα των οργανικών ρύπων μπορεί να μελετηθεί από δύο διαφορετικές όψεις: (1) βιολογικά και (2) χημικά.

1.8 Βιολογική εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας

Η εκτίμηση του πραγματικού κινδύνου που σχετίζεται με τα μολυσμένα εδάφη, πρέπει να συμπεριλαμβάνει τις οικοτοξικολογικές επιδράσεις στη βιομάζα του εδάφους. Για το σκοπό αυτό, μια από τις πιο αξιόπιστες τεχνικές αντιπροσωπεύεται από τους βιοαισθητήρες, οι οποίοι είναι βιολογικά υλικά, που όταν εκτίθενται σε μια χημική ουσία μέσα σε ένα περιβαλλοντικό εκμαγείο, παράγουν σήμα, μετρήσιμο με κατάλληλο μεταγωγέα (van Der Leslie, 1994). Σε μελέτες εδαφικής ρύπανσης η χρήση των βιοαισθητήρων αποτελεί μια *ex situ* τεχνική: το περιβαλλοντικό πλαίσιο στο οποίο μετράται η απόκριση δεν είναι συνήθως το καθεαυτό έδαφος αλλά το υδατικό διάλυμα που εκχυλίζεται από αυτό. Αυτό σημαίνει πως η σωστή χρήση των βιοαισθητήρων απαιτεί την ανάπτυξη κατάλληλων τεχνικών για την εκχύλιση του βιοδιαθέσιμου τμήματος. Τα γενετικά τροποποιημένα *lux*-marked βακτήρια, είναι ανάμεσα στους βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται περισσότερο σήμερα: η ποσότητα του εκπεμπόμενου φωτός, εύκολα μετρήσιμη με λουμινόμετρο, αποτελεί μέτρηση των μεταβολικών κυτταρικών αλλαγών που επάγονται από τους ρύπους (Paton et al., 1997).

Μια επίσης αξιόπιστη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι το προφίλ των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFA- Phospholipid Fatty Acid Profile): τα λιπαρά οξέα που προέρχονται από τα φωσφολιπίδια, αποτελούν τα κύρια συστατικά της μεμβράνης των ζωντανών κυττάρων. Ουσιαστικά, η δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και οι αλλαγές που υφίσταται, παρέχουν πληροφορίες για την κατάσταση του εδάφους. Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα PLFA προφίλ: οι αλλαγές στη μικροβιακή σύνθεση του εδάφους αντικατοπτρίζονται ως αποκλίσεις από τα PLFA πρότυπα (Turpeinen, 2004).

Άλλες τεχνικές περιλαμβάνουν ανοσοπροσδιορισμούς (Van Emon, 2001), χρήση μοριακών δεικτών και τις παραδοσιακές, αλλά λιγότερο χρησιμοποιούμενες τεχνικές μέτρησης της μικροβιακής

βιομάζας και της ενζυμικής και αναπνευστικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Palmer, 1998).

1.9 Χημική εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας

Παραδοσιακά, οι τεχνικές εκχύλισης του εδάφους αφορούσαν στον καθορισμό της «ολικής» συγκέντρωσης των οργανικών ρύπων στο έδαφος. Γι' αυτό τα εδάφη εκχυλίζονταν συνήθως «εξαντλητικά» (Brilis and Marsden, 1990). Παρόλα αυτά, στο φως της ολοένα αναπτυσσόμενης γνώσης γύρω από το θέμα της διαθεσιμότητας και γήρανσης των ενώσεων, τέτοιου είδους μέθοδοι φαίνεται να έχουν ελάχιστη σχέση με τη μέτρηση του ποσοστού του ρύπου που μπορεί να αφομοιωθεί και να προκαλέσει οικολογικό κίνδυνο (= «βιοδιαθέσιμο» όριο) (Bosma and Harms, 1996, Bosma et al., 1997, Kelsey et al., 1997).

Ενώ η χρήση λιγότερο εξαντλητικών τεχνικών φαίνεται καταλληλότερη από ότι η εξαντλητική εκχύλιση για την εκτίμηση του κινδύνου στα μολυσμένα εδάφη, κι αυτές ακόμη αδυνατούν να προσομοιώσουν τους πραγματικούς μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος. Πρέπει, βέβαια, να υπογραμμιστεί ότι τέτοιες χημικές μέθοδοι εκτίμησης της βιοδιαθεσιμότητας δεν μπορούν ποτέ να είναι τόσο περιεκτικές, εφόσον η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται από τους οργανισμούς του εδάφους (Kelsey et al., 1997; White et al., 1997) και δη από το είδος τους (Guerin and Boyd, 1992; Leppanen and Kokkonen, 1998).

1.9.1 Μη εξαντλητικές τεχνικές εκχύλισης

Εκχύλιση ανάδευσης με νερό (water Shaking)

Αυτή η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για ενώσεις πολύ χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, καθώς η απλή ανάδευση με νερό προφανώς δεν επιτρέπει τη μεταφορά όλων των ανταλλάξιμων συστατικών. Με άλλα λόγια, η διάλυση της ένωσης μπορεί να περιοριστεί από τη χαμηλή διαλυτότητά της, και έτσι να υποτιμηθεί η διαθεσιμότητα υδρόφοβων ουσιών.

Τεχνική εκχύλισης βασιζόμενη σε κυκλοδεξτρίνες (CD)

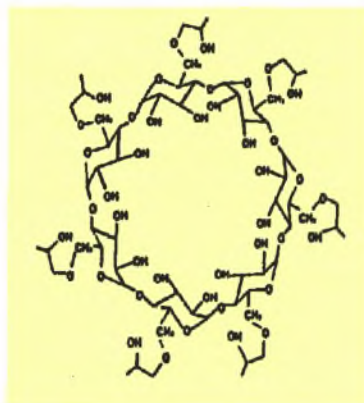
Το βιοδιαθέσιμο όριο των χημικών ενώσεων έχει πολλές φορές ταυτιστεί με την ποσότητα που προσδιορίζεται από την εκχύλιση της υγρής φάσης. Με τις υδρόφοβες οργανικές ενώσεις όπως είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, που είναι ελάχιστα διαλυτοί και εμφανίζουν ισχυρή έλξη προς την οργανική ύλη, αυτή η μέθοδος παρουσιάζει τεράστιους περιορισμούς. Γιατί πολύ μικρές ποσότητες αυτών των ενώσεων θα βρίσκονται στο διάλυμα του εδάφους, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό θα παραμένει στην στερεή φάση. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος πολλοί συγγραφείς προτείνουν τη χρήση διαλυμάτων κυκλοδεξτρινών για να ενισχύουν τη διαλυτότητα αυτών των ρύπων.

Οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούν μια ομάδα μακροκυκλικών οργανικών μορίων που περιλαμβάνουν μια σπείρα 1,4-δεσμευμένων μορίων γλυκόζης (Shieh and Hedges, 1996). Οι κυκλοδεξτρίνες εμφανίζουν υψηλή διαλυτότητα στο νερό λόγω της παράταξης ενεργών υδροξυλομάδων στο εξωτερικό της σπείρας.

Έχουν

επίσης μια υδρόφοβη οργανική κοιλότητα στο εσωτερικό,

η οποία στη β-κυκλοδεξτρίνη είναι περίπου 6.5 Å σε διάμετρο (Shieh and Hedges, 1996). Είναι, επομένως, πιθανό να σχηματίζεται ένα 1:1 έγκλειστο σύμπλοκο μεταξύ του μακρομορίου της



κυκλοδεξτρίνης και ενός

οργανικού τμήματος (Shieh and Hedges, 1996, Wang and Brusseau, 1995, Shixiang et al., 1998). Υδατικά διαλύματα κυκλοδεξτρίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να επιτευχθεί επαναδιάλυση ρύπων με υδατοδιαλυτότητα πολύ χαμηλή αλλά και υψηλότερη της ίδιας της κυκλοδεξτρίνης (π.χ., φαινανθρίνη, 2-μέθυλο-φαινανθρίνη, 1,2-φθοροβενζόλιο, και β-βρωμοαφθαλένιο) ([Shieh and Hedges, 1996, Wang and Brusseau, 1995, Shixiang et al., 1998]). Έχει αποδειχθεί ότι μόρια που είναι πολύ μεγάλα για να σχηματίσουν 1:1 έγκλειστα σύμπλοκα με τη β-κυκλοδεξτρίνη μπορούν να σχηματίσουν 1:2 έγκλειστα σύμπλοκα, αποτελούμενα

από δύο μακρομόρια και ένα «φιλοξενούμενο» (Cescutti et al., 1996, Wang and Brusseau, 1995). Εναλλακτικά, ένα μεγαλύτερο μόριο κυκλοδεξτρίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να στεγάσει μεγαλύτερους «φιλοξενούμενους» (Blyshak et al., 1988).

Η εκχύλιση με κυκλοδεξτρίνες φαίνεται να ακολουθεί κινητική ισορροπίας και, σύμφωνα με πειράματα μεταλλοποίησης που διεξήχθησαν με ^{14}C επισημασμένες ενώσεις, η ποσότητα που εξάγεται σχετίζεται στενά με το βιοδιαθέσιμο όριο (Reid et al., 2000).

1.9.2 Εξαντλητικές τεχνικές εκχύλισης

Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet (SOX)

Η εκχύλιση με τη μέθοδο soxhlet είναι μια παραδοσιακή μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια, και έχει προταθεί από πολλές εταιρίες ως μέθοδος επιλογής για την εκχύλιση μη πολικών οργανικών ρύπων (ISO/DIS 13877, 1995).

Η εκχύλιση soxhlet απαιτεί μεγάλες ποσότητες (> 150 ml), συνήθως χλωριωμένου, διαλύτη και διαρκεί από 6 έως 24 ώρες. Παρόλο που η τεχνική είναι αργή, έχει τη δυνατότητα να εκχυλίσει αρκετά δείγματα χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα πολλαπλές κατασκευές soxhlet. Το κόστος των κατασκευών αυτών είναι σχετικά χαμηλό από την άποψη αρχικής δαπάνης εγκατάστασης της μεθόδου, αλλά υψηλό από την άποψη κατανάλωσης διαλύτη (Dean and Xiong, 2000).

Σήμερα έχουν αναπτυχθεί αυτόματες συσκευές που επιταχύνουν το χρόνο της εκχύλισης. Η επιλογή του διαλύτη ή του μίγματος διαλυτών αποτελεί βασικό παράγοντα. Για εδάφη με χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΠΑΥ (\cong mg/kg ξηρό βάρος), στα οποία οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες βρίσκονται προσροφημένοι στην επιφάνεια των σωματιδίων ή σε συσσωματώματα λάσπης, προτιμούνται σχετικά πολικοί διαλύτες, όπως η ακετόνη, που διαλύουν τα συσσωματώματα και επιτρέπουν την άμεση επαφή μεταξύ των σωματιδίων (Hartmann, 1996). Για περισσότερο ρυπασμένα εδάφη (\cong mg/kg ξ.β.) μπορούν να χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες όπως το τολουόλιο ή το κυκλοεξάνιο (Berset et al., 1999).

Η μέθοδος soxhlet παρουσιάζει μέτριες τιμές αποτελεσματικότητας στην εκχύλιση των ρύπων, ενώ τα αποτελέσματά της εμφανίζουν πολύ μικρές διακυμάνσεις σε αντίθεση με τις περισσότερες τεχνικές εκχύλισης (Berset et al., 1999).

Τεχνική εκχύλισης με υπερήχους (sonication)

Η μέθοδος με υπερήχους είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης. Υπάρχουν όμως ελάχιστα διαθέσιμα δεδομένα από τη βιβλιογραφία που να συγκρίνουν τη μέθοδο αυτή με άλλες τεχνικές εκχύλισης (Blankenhorn et al., 1992, Brilis and Mardsen, 1990, Hechler et al., 1995). Σε αυτές τις μελέτες πολύ διαφορετικοί διαλύτες, όπως κυκλοεξάνιο, τετραϋδροφουράνιο και μίγματα διχλωρομεθανίου και ακετόνης χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση οργανικών ρύπων με την τεχνική sonication.

Η τεχνική αυτή είναι ταχύτερη από τη soxhlet, αλλά παρόλα αυτά θεωρείται αργή για αναλύσεις ρουτίνας (Chen et al. 1996). Επιπλέον απαιτεί επιδέξιο και έμπειρο χειριστή ώστε να δίνει υψηλή αποτελεσματικότητα και επαναληψιμότητα (Dean and Xiong, 2000). Τέλος, όπως έχει παρατηρηθεί, η ανάκτηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη μέθοδο των υπερήχων είναι χαμηλότερη από άλλες μεθόδους συμπεριλαμβανομένης της τεχνικής soxhlet (Berset et al., 1999).

Τεχνική εκχύλισης με ανάδευση με μεθανόλη (methanol Shaking)

Πρόκειται για μια ακόμη καθιερωμένη μέθοδο εκχύλισης. Λόγω του εύκολου χειρισμού της έχει ενσωματωθεί στις επίσημες μεθόδους της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (ISO/DIS 13877, 1995). Η αποδοτικότητά της μπορεί να συγκριθεί με αυτή της τεχνικής soxhlet, αλλά, με μεγαλύτερες διακυμάνσεις (Berset et al., 1999).

Η τεχνική αυτή απαιτεί ελάχιστα υλικά, χαμηλότερες ποσότητες διαλύτη (μεθανόλη) και είναι σχετικά γρήγορη (Dean and Xiong, 2000).

1.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της εκχύλισης.

Η αποδοτικότητα της εκχύλισης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων από το έδαφος μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως η υγρασία του εδάφους, οι πολικές ιδιότητες των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και η σύσταση του εδάφους (Fisher et al., 1994, Noordkamp et al., 1997, Letellier et al., 1999). Για παράδειγμα, οι Song et al, 2002, παρατήρησαν πως σε υγρά εδάφη που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών ρύπων η μέθοδος με υπερήχους ήταν λιγότερο αποδοτική από ότι σε ξηρά εδάφη. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν πως τα μίγματα διαλυτών είναι περισσότερο αποδοτικά στην εκχύλιση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων από υγρά εδάφη, από ότι οι μεμονωμένοι διαλύτες.

1.11 Ανάλυση των ρυπαντών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αναπτύχθηκε την δεκαετία του 1960. Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής είναι ότι μια ένωση πτητικών ή μη πτητικών ουσιών (π.χ. πολυμερών, βιολογικών δειγμάτων, θερμικά ευαίσθητων ουσιών) παρασύρεται από υγρή κινητή φάση κατά μήκος μιας στήλης (στατική φάση) και διαχωρίζεται. Κάθε ουσία προσδιορίζεται από ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο της στήλης. Ο χρόνος κατακράτησης (retention time) αποτελεί τη βάση για την ποιοτική ανάλυση, το δε εμβαδόν των κορυφών στο χρωματογράφημα τη βάση για την ποσοτική. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε αναλύσεις περιβάλλοντος, αμινοξέων, πρωτεϊνών, φαρμάκων, φυτοπροστατευτικών ουσιών και πολυμερών. Τα δείγματα είναι είτε υγρά ή στερεά, τα οποία διαλύονται σε διαλύτη συμβατό με την κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιούνται 5-10 μL δείγματος και ο χρόνος ανάλυσης κυμαίνεται μεταξύ 10 και 25 min. Η ακρίβεια, η

ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης της τεχνικής εξαρτάται από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Οι χρωματογραφικές της στήλες έχουν συνήθως μήκος 3-25 cm και εσωτερική διάμετρο 0,5-5 mm. Για την πλήρωση της στήλης, χρησιμοποιούνται συνήθως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), διαμέτρου 2-10 μm. Το υλικό αυτό έχει μεγάλη πολικότητα και αποτελεί τη βάση για την υγρή χρωματογραφία προσρόφησης. Μείωση της πολικότητας της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου επιτυγχάνεται με τη χημική της σύνδεση με αλκύλια, που φέρουν άμινο-, κύανο- ή φαίνυλο- ομάδες στο άκρο τους. Έτσι, προκύπτουν οι χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (bonded phase), που αποτελούν τη βάση της υγρής χρωματογραφίας κατανομής.

Αν η στατική φάση είναι περισσότερο πολική, σε σχέση με την κινητή φάση, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως *κανονικής φάσης* (normal phase). Αν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική σε σχέση με την κινητή φάση, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως *αντίστροφης φάσης* (reversed phase).

Η υγρή φάση διέρχεται τη χρωματογραφική στήλη μέσω αντλίας. Η σύσταση της κινητής φάσης είτε διατηρείται σταθερή (*ισοκρατική έκκλουση*), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα, με τη χρήση δύο ή περισσότερων διαλυτών (*βαθμιδωτή έκκλουση*).

Οι σημαντικότεροι ανιχνευτές HPLC είναι:

- **Ανιχνευτής υπεριώδους- ορατού (UV- VIS Detector):**
Υπάρχουν δύο τύποι ανιχνευτών: Οι ανιχνευτές σταθερού μήκους κύματος (συνήθως στα 254 nm) που είναι και οι πιο οικονομικοί και οι μεταβαλλόμενου μήκους κύματος, που είναι πλήρη φασματοφωτόμετρα απορρόφησης στην υπεριώδη-ορατή περιοχή. Οι ανιχνευτές αυτού του τύπου έχουν σχετικά μεγάλη ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βαθμιδωτή έκκλουση. Δεν μπορούν όμως να αξιοποιηθούν, όταν ο διαλύτης έκκλουσης (κινητή φάση) απορροφά ισχυρά στην περιοχή του υπεριώδους- ορατού ή όταν οι ουσίες που προσδιορίζουμε δεν απορροφούν στην περιοχή αυτή.
- **Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων υπεριώδους-ορατού (Photodiode Array Detector, PDA):** Ο ανιχνευτής PDA μετρά με τη βοήθεια μιας συστοιχίας φωτοδιοδων, ταυτόχρονα σε διαφορετικά μήκη κύματος. Έτσι, λαμβάνεται ένα πλήρες φάσμα σε κάθε χρονική στιγμή και τα χρωματογραφήματα μπορούν να απεικονιστούν τρισδιάστατα. Η ταυτοποίηση μιας εκκλουόμενης ουσίας

μπορεί να γίνει ασφαλέστερα σε σχέση με το απλό φασματοφωτόμετρο UV- VIS, με βάση τόσο το χρόνο ανάλυσης όσο και το φάσμα απορρόφησης της κάθε ουσίας. Όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό, αυτός γίνεται με σχετικά μεγάλη ευαισθησία, αν οι μετρήσεις γίνουν στο μέγιστο της απορρόφησης του κάθε συστατικού του μίγματος.

Όπως κάθε τεχνική έτσι και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς: οι δυνατότητες ταυτοποίησης των ουσιών που διαχωρίζονται είναι περιορισμένες, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται συνήθως συμπληρωματικές τεχνικές, όπως οι MS, NMR και IR. Σε πολλές περιπτώσεις η διαχωριστικότητα επιτυγχάνεται με μεγάλη δυσκολία, ενώ απαιτείται σχετικά μεγάλη εμπειρία για την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού.

1.12 Στόχοι της παρούσης εργασίας

1. Ο υπολογισμός της επίδρασης των οργανικών προσθετικών στη βιοδιαθεσιμότητα της φαινανθρίνης.
2. Ο όσο το δυνατόν ακριβέστερος υπολογισμός της βιοδιαθεσιμότητας της φαινανθρίνης στο εξεταζόμενο έδαφος.
3. Σύγκριση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων εκχύλισης και εύρεση της αποτελεσματικότερης τεχνικής από αυτές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία και προετοιμασία

Δείγμα επιφανειακού (25 cm) εδάφους συλλέχθηκε από την περιοχή Μπάρι της Νότιας Ιταλίας. Το χώμα στην περιοχή αυτή είναι αργιλώδες, με ένα κόκκινο χρώμα λόγω της υψηλής συγκέντρωσης οξειδίων σιδήρου. Το δείγμα (3,9 Kg) κοσκινίστηκε με κόσκινο διαμέτρου 2 mm προκειμένου να απομακρυνθούν ρίζες

και άλλα παρόμοια υλικά του εδάφους. Το δείγμα αυτό χωρίστηκε σε δύο τμήματα (2,4 Kg + 1,5 Kg). Το τμήμα του 1,5 Kg εστάλη σε ειδική εταιρία προς αποστείρωση (Gammarad Italia s.p.a Bologna, Italy). Στη συνέχεια κάθε τμήμα χωρίστηκε σε τρία ισομερή δείγματα. Τα δύο από τα τρία δείγματα κάθε τμήματος εμπλουτίστηκαν με οργανικά προσθετικά: το ένα σε ποσοστό 0.38 % και το άλλο σε ποσοστό 1,15% της ποσότητάς τους. Τα ποσοστά αυτά αναλογούν σε 10 t/ha (τόνους /εκτάριο) και 30 t/ha, αντίστοιχα, ποσά που χρησιμοποιούνται ως λίπασμα σε αγροτικές καλλιέργειες. Τα ποσοστά αυτά μετατρέπονται σε 0,27% και 0,83% αντίστοιχα στο μη αποστειρωμένο δείγμα λόγω της ύπαρξης μιας ποσότητας υγρασίας (2,5%). Το έδαφος αυτό αναδεύτηκε σε ειδικό αναδευτήρα (shaker) ολονυκτίως (12 ώρες) ώστε να ομογενοποιηθεί με το λίπασμα.

Την επόμενη ημέρα έγινε η εφαρμογή φαινανθρίνης στα δείγματα (spiking). Σε κάθε μέρος του δείγματος προστέθηκε φαινανθρίνη 150 ppm ίση με το 1/100 της ποσότητάς του. Η εφαρμογή φαινανθρίνης έγινε με μια μέθοδο αραίωσης-ανάμειξης, χρησιμοποιώντας ακετόνη ως διαλύτη-φορέα. Ακολούθησε ομογενοποίηση με σπάτουλα και ανακίνηση για ολόκληρη τη νύχτα.

Στη συνέχεια, κάθε μέρος του δείγματος διαιρέθηκε σε 5 υπο-δείγματα προς στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η συνολική διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος περιγράφεται συνοπτικά στον ακόλουθο πίνακα:

Δείγμα: έδαφος από το Μπάρι (Νότια Ιταλία)	
Μόλυνση του δείγματος με 150 ppm φαινανθρίνης	
Μη αποστειρωμένο (NST)	Αποστειρωμένο (ST)
➤ Χωρίς λίπασμα (5 υπο-δείγματα)	Χωρίς λίπασμα (5 υπο-δείγματα)
➤ 0.27% λίπασμα (5 υπο-δείγματα)	0.38% λίπασμα (5 υπο-δείγματα)
➤ 0,83% λίπασμα (5 υπο-δείγματα)	1,15% λίπασμα (5 υπο-δείγματα)

Τέλος, ακολούθησε εφαρμογή διαφόρων τεχνικών εκχύλισης (Τμήμα 2.2) στις 0, 20 και 60 ημέρες από τη μόλυνση του δείγματος. Με λήψη από κάθε υπο-δείγμα της ανάλογης

ποσότητας που απαιτεί κάθε τεχνική, έτσι ώστε η κάθε μία μέθοδος να δίνει 5 επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

2.2 Διαδικασίες εκχύλισης των δεινμάτων

2.2.1 Μη εξαντλητικές

Εκχύλιση ανάδευσης με νερό (water Shaking)

Προτού εφαρμοστεί η τεχνική αυτή, δοκιμάστηκε ένα προκαταρκτικό τεστ σε μη μολυσμένο δείγμα εδάφους για να βρεθεί η ακριβής ποσότητα νερού που ήταν απαραίτητη για την πραγματοποίηση της μεθόδου.

Έτσι, λοιπόν, δείγμα 2gr από κάθε υπο-δείγμα και 1ml απεσταγμένο (di) νερό διατηρήθηκαν σε επαφή μέσα σε σωλήνες φυγοκέντρησης για τουλάχιστον 2 ώρες. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 στροφές (rpm), για 60 λεπτά (min), στους 14⁰ C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο (upper phase), το οποίο επαναφυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 5000 στροφές προκειμένου να απομακρυνθούν και τα πιο μικρά αιωρούμενα σωματίδια. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση τα καθαρά διαλύματα συγκεντρώθηκαν σε φιαλίδια (vials) του 1ml και χρησιμοποιήθηκαν για την HPLC ανάλυση (Τμήμα 2.3).

Τεχνική εκχύλισης βασιζόμενη σε κυκλοδεξτρίνες

Αρχικά προετοιμάστηκε το διάλυμα της β-κυκλοδεξτρίνης (CD σε σκόνη + di νερό) σε τελική συγκέντρωση 50mM. Χρησιμοποιήθηκε 1gr εδάφους από κάθε υπο-δείγμα και 20 ml του διαλύματος β-κυκλοδεξτρίνης. Έγινε ανάδευση για 12 περίπου ώρες και έπειτα φυγοκέντρηση για 1 ώρα (h), στις 4000 στροφές (rpm) και στους 14⁰ C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε από το υπερκείμενο μια ποσότητα (\approx 1 ml) και διατηρήθηκε στο ψυγείο για να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση HPLC (Τμήμα 2.3).

Εάν το διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση δεν ήταν αρκετά καθαρό ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση του υπερκείμενου για 5 λεπτά στις 5000 στροφές, όπως ακριβώς στη μέθοδο με το νερό.

2.2.2 Εξαντλητικές

Μέθοδος εκχύλισης Soxhlet (SOX)

Περίπου 2,5 gr εδάφους και 10 gr θειικού νατρίου (Na_2SO_4) αλέστηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωλήνα εκχύλισης με τοιχώματα κυτταρίνης. Το δείγμα εκχυλίστηκε για 20 κύκλους, στους 65°C περίπου, σε 100 ml διχλωρομεθανίου (DCM) σε σύστημα εκχύλισης Buchi B-811. Τα στερεά υπολείμματα αφαιρέθηκαν χρησιμοποιώντας βαμβάκι πάχους 10cm πάνω από το μίγμα δείγματος- Na_2SO_4 . Το εκχύλισμα ξηράθηκε με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό και επανακτήθηκε σε μεθανόλη τελικού όγκου 10 ml. Το καθαρό εκχύλισμα υπέστη αραιώση 1:10, επειδή η συγκέντρωσή του ήταν πολύ υψηλή, και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια 1 ml, στους 4°C για επακόλουθη ανάλυση (Τμήμα 2.3).

Τεχνική εκχύλισης με υπερήχους (sonication)

2 gr εδάφους εκχυλίστηκαν με 20 ml μίγματος διαλυτών - 10 ml ακετόνη + 10 ml διχλωρομεθάνιο – στην ειδική συσκευή υπερήχων NEI ultrasonic bath επί πέντε περίπου ώρες. Μετά το πέρας των 5 ωρών ακολούθησε φιλτράρισμα και έπειτα καθαρισμός του εκχυλίσματος σε στήλη με υαλοβάμβακα και 3 gr άνυδρου θειικού νατρίου, για να απομακρυνθεί το νερό, το οποίο δεσμεύεται και παγιδεύεται στο θειικό νάτριο. Το εκχύλισμα ξηράθηκε με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό και επανακτήθηκε σε μεθανόλη τελικού όγκου 10 ml. Η ξήρανση διαρκεί συνήθως τόσο, όσο χρειάζεται για να εξατμιστεί όλο το διχλωρομεθάνιο αλλά να παραμείνει η μεγαλύτερη ποσότητα της ακετόνης. Το καθαρό εκχύλισμα υπέστη αραιώση 1:10 και 1 ml περίπου του διαλύματος αυτού τοποθετήθηκε σε ειδικό φιαλίδιο (vial) και διατηρήθηκε στους 4°C για την HPLC ανάλυση (Τμήμα 2.3).

Τεχνική εκχύλισης με ανάδευση με μεθανόλη (methanol Shaking)

Δείγμα 1 gr εδάφους και 20 ml μεθανόλης τοποθετήθηκαν σε ειδικό σωλήνα φυγοκέντρωσης και αναδεύτηκαν ολονυκτίως στη συσκευή shaker. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 στροφές (rpm), για 60 λεπτά (min), στους 14°C . Στη συνέχεια

αφαιρέθηκε 1 ml περίπου από το φυγοκεντρημένο διάλυμα και κρατήθηκε στους 4⁰ C για ανάλυση (Τμήμα 2.3) .

2.3 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε είναι αντίστροφης φάσης (reversed phase) με χρωματογραφική στήλη C18. Ο ανιχνευτής της είναι ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων υπεριώδους-ορατού (Photodiode Array Detector, PDA). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 10 μ L με χρόνο έγχυσης 30 min και χρόνο κατακράτησης 27 min. Ο διαχωρισμός επιτελέσθηκε με σταθερή ροή κινητής φάσης 1ml/min, χρησιμοποιώντας ισοκρατική έκλουση (ακετονιτρίλιο /νερό σε αναλογία 60/40). Η φαινανθρίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά σε μήκος κύματος 254 nm από το εμβαδόν των κορυφών σε γραμμική συσχέτιση με τα πρότυπα διαλύματα (standards).

Για τη βαθμονόμηση της HPLC χρησιμοποιήθηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα (standards) φαινανθρίνης των 0,2 , 0,5 , 1 , 2 , και 5 ppm. Τα διαλύματα αυτά προετοιμάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις, από το αρχικό διάλυμα των 150 ppm, σε μεθανόλη.

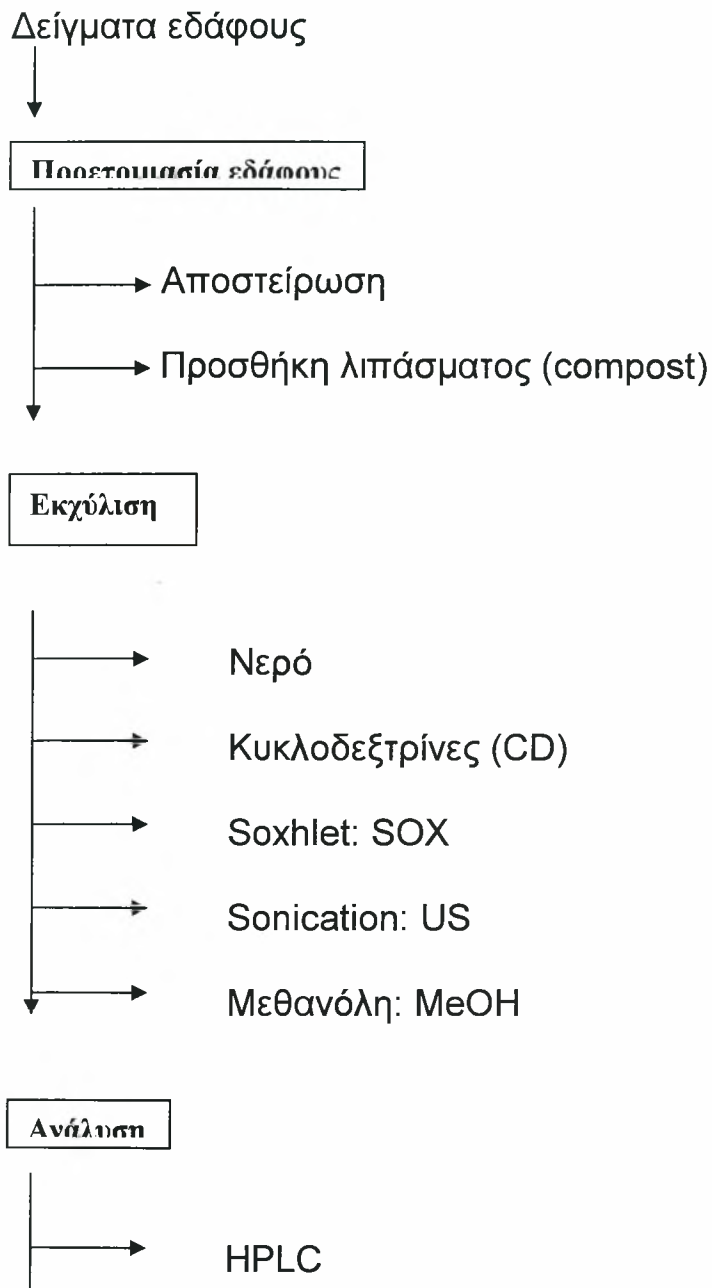
2.4 Στατιστική εκτίμηση των δεδομένων-αποτελεσμάτων

Τα πειραματικά αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με τη χρήση του πακέτου SAS, 1995.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

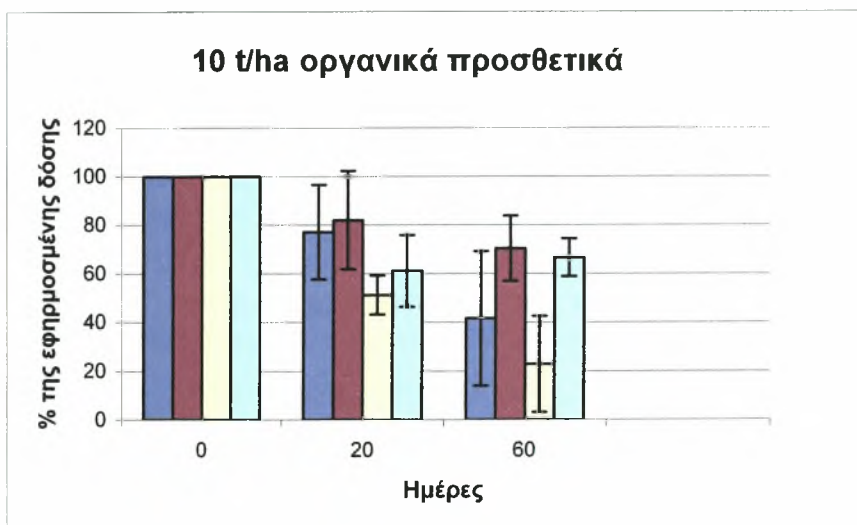
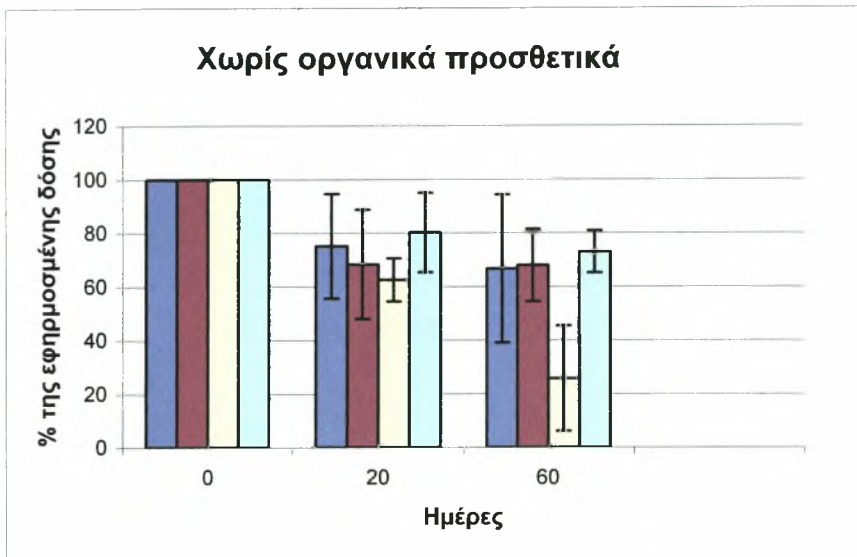
Λόγω τεχνικών προβλημάτων και εμποδίων, τα αποτελέσματα των τεχνικών Soxhlet και Sonication στις 0 και 60 ημέρες απουσιάζουν από την παρούσα μελέτη, αλλά αναμένεται να έχουν ληφθεί μέσα στους επόμενους μήνες.

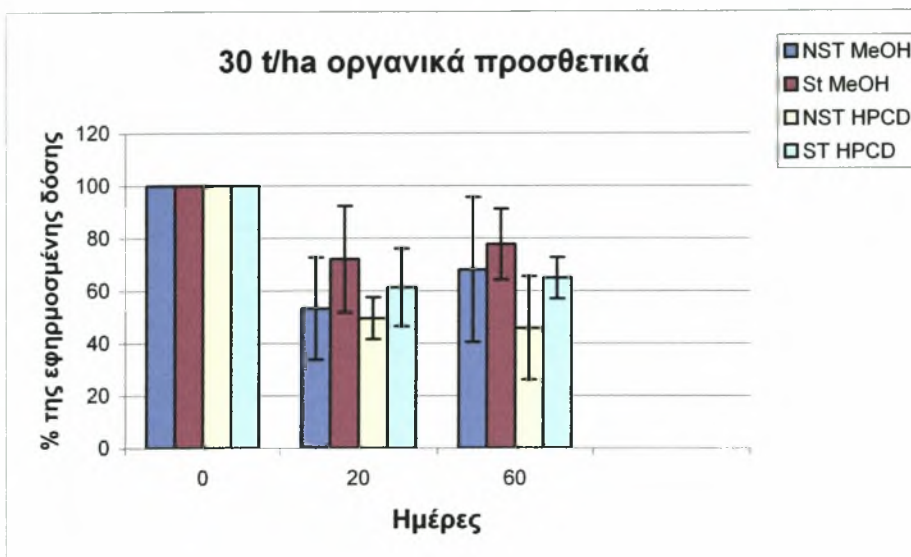
Οι κύριες παράμετροι μελέτης, δηλαδή η προετοιμασία του δείγματος, οι τεχνικές εκχύλισης και η ανάλυση των εκχυλισμάτων παρουσιάζονται σαν ένα γενικό σχήμα στην εικ. 2. Κάθε παράμετρος θα συζητηθεί τώρα ξεχωριστά.



Εικ. 2. Επισκόπηση των παραμέτρων που μελετούνται για τον προσδιορισμό της φαινανθρίνης.

3.1 Επίδραση της αποστείρωσης και της προσθήκης οργανικών λιπασμάτων (compost) στη βιοδιαθεσιμότητα της φαινανθρίνης.





Εικ. 3 Το ποσό της φαινανθρίνης που εκχυλίζεται με τις μεθόδους των κυκλοδεξτρινών (HPCD) και της ανάδευσης με μεθανόλη (MeOH shaking) στις 20 και 60 ημέρες από την εφαρμογή της φαινανθρίνης.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών μπορεί να οριοθετηθεί η κατανομή της φαινανθρίνης στα εξής κλάσματα: ισχυρά δεσμευμένη, γηρασμένη, βιοδιαθέσιμη και βιοαποδομούμενη (Πιν. 1). Συγκεκριμένα, η διαφορά ανάμεσα στην ποσότητα που εκχυλίζεται με μεθανόλη στο χρόνο μηδέν και σε αυτή που εκχυλίζεται από τα διαδοχικά δείγματα του αποστειρωμένου εδάφους αντιπροσωπεύει το δεσμευμένο όριο της φαινανθρίνης. Η διαφορά ανάμεσα στο ποσό που εκχυλίζεται με μεθανόλη και σε αυτό που εκχυλίζεται με κυκλοδεξτρίνες αντιστοιχεί στο «γηρασμένο» τμήμα της φαινανθρίνης και τέλος η διαφορά ανάμεσα στην ποσότητα του αποστειρωμένου και μη αποστειρωμένου δείγματος που εκχυλίζεται με μεθανόλη αντικατοπτρίζει το κλάσμα της βιοαποδομούμενης φαινανθρίνης.

Η εκχύλιση με κυκλοδεξτρίνες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, φαίνεται να ακολουθεί κινητική ισορροπίας και, σύμφωνα με πειράματα που διεξήχθησαν, η ποσότητα των ΠΑΥ που εξάγεται από το έδαφος με την τεχνική αυτή σχετίζεται στενά με το βιοδιαθέσιμο όριο (Reid et al., 2000).

	% Δεσμευμένο (100-ST MeOH)		% Βιοδιαθέσιμο (ST CD)	
	20 ημέρες	60 ημέρες	20 ημέρες	60 ημέρες
Χωρίς οργ. Προσθετικά	31.6 ± 21.3	32.1 ± 13.5	80.2 ± 14.8	72.9 ± 7.8
10 t/ha οργ. Προσθετικά	17.9 ± 26.8	29.6 ± 9.0	61.1 ± 20.1	66.6 ± 7.6
30 t/ha οργ. Προσθετικά	27.9 ± 17.3	22.2 ± 14.7	61.2 ± 22.3	64.8 ± 13.9
	% Γηρασμένο (ST MeOH-ST CD)		% Βιοαποδομούμενο (ST MeOH-NST MeOH)	
	20 ημέρες	60 ημέρες	20 ημέρες	60 ημέρες
Χωρίς οργ. Προσθετικά	0	0	0	1,2
10 t/ha οργ. Προσθετικά	20,9	3,7	4,9	28,8
30 t/ha οργ. Προσθετικά	10,8	12,9	18,9	9,7

Πίνακας 1. % Ποσοστό της δεσμευμένης, γηρασμένης, βιοδιαθέσιμης και βιοαποδομούμενης φαινανθρίνης του δείγματος.

Τα αποτελέσματα (Εικ. 3) δείχνουν ότι από το μη αποστειρωμένο τμήμα του δείγματος εκχυλίζονται μικρότερα ποσά φαινανθρίνης σε σχέση με το αποστειρωμένο τμήμα. Μια παρατήρηση που ισχύει και για τις εξαντλητικές (MeOH) και για τις μη εξαντλητικές (CD) τεχνικές εκχύλισης. Αυτό οφείλεται στο ότι το μη αποστειρωμένο έδαφος περιέχει σημαντικούς πληθυσμούς ενδογενών βακτηρίων και μυκήτων, ικανών να αποδομούν τους υδρογονάνθρακες.

Έτσι, ένα ποσοστό του βιοδιαθέσιμου κλάσματος της φαινανθρίνης στο αποστειρωμένο δείγμα, αποτελεί «χαμένο» τμήμα (Εικ. 1) για το μη αποστειρωμένο έδαφος.

Όσον αφορά στην επίδραση της προσθήκης των οργανικών προσθετικών στο έδαφος (organic amendments), παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μείωση του βιοδιαθέσιμου κλάσματος της φαινανθρίνης, ενίσχυση του φαινομένου της «γήρανσης» και εμφανής αύξηση στη διαδικασία βιοαποδόμησης, στα εδάφη στα οποία είχε προστεθεί οργανική ύλη.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα προσθετικά παρέχουν θρεπτικό υλικό για τους ενδογενείς μικροοργανισμούς αλλά και επιφάνειες για την προσρόφηση των ΠΑΥ.

Άλλωστε, ένας από τους πιθανότερους μηχανισμούς που εμπλέκονται στο φαινόμενο της «γήρανσης» είναι η προσρόφηση των οργανικών ενώσεων επί της φυσικής (ή προστιθέμενης) οργανικής ύλης (Carroll et al., 1994).

Ιδιαίτερα όσον αφορά στο βιοαποδομούμενο κλάσμα της φαινανθρίνης, και στις 20 αλλά και στις 60 ημέρες μετά την προσθήκη της φαινανθρίνης, παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση στα τμήματα του δείγματος με πρόσθετο οργανικό υλικό σε σχέση με αυτό που στερείται πρόσθετης οργανικής ύλης.

Βέβαια φαίνεται, πως η επίδραση της προσθήκης οργανικού προσθετικού είναι σχετική και ανεξάρτητη από την δόση που εφαρμόζεται. Παρατηρήσεις που το αποδεικνύουν αυτό είναι η μείωση του γηρασμένου κλάσματος από το δείγμα των 10 t/ha σε αυτό των 30 t/ha στις 20 ημέρες και η αντίστοιχη μείωση του βιοαποδομούμενου τμήματος στις 60 ημέρες.

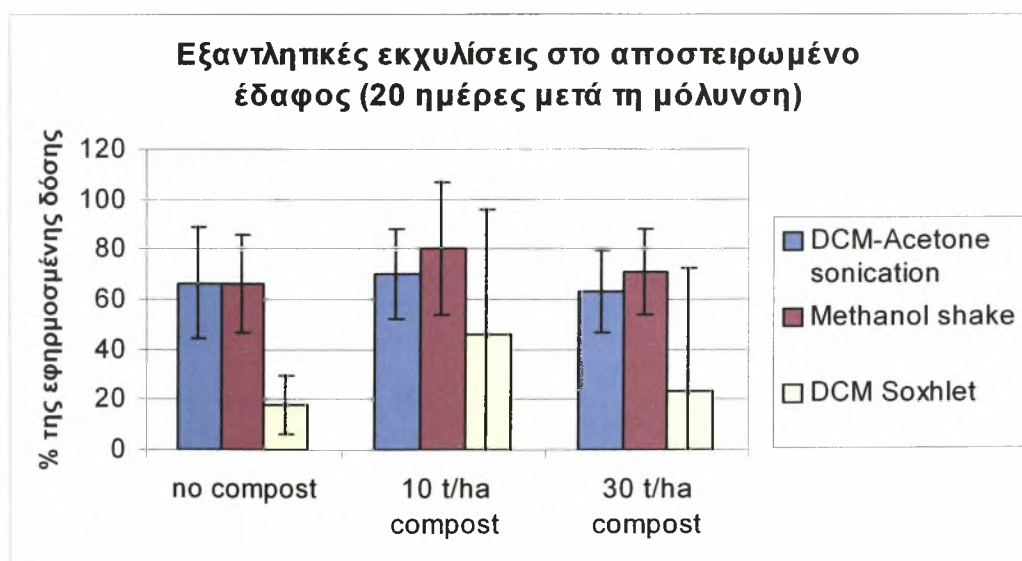
Τέλος, το γεγονός ότι το γηρασμένο κλάσμα της φαινανθρίνης παραμένει μηδέν ακόμη και έπειτα από τις 60 ημέρες από την προσθήκη φαινανθρίνης στο δείγμα χωρίς οργανικά προσθετικά (πιν. 1), προφανώς υποδεικνύει πως το χρονικό αυτό διάστημα δεν επαρκεί για να ξεκινήσει η διαδικασία της «γήρανσης».

3.2 Αποτελεσματικότητα των δοκιμασμένων τεχνικών εκχύλισης

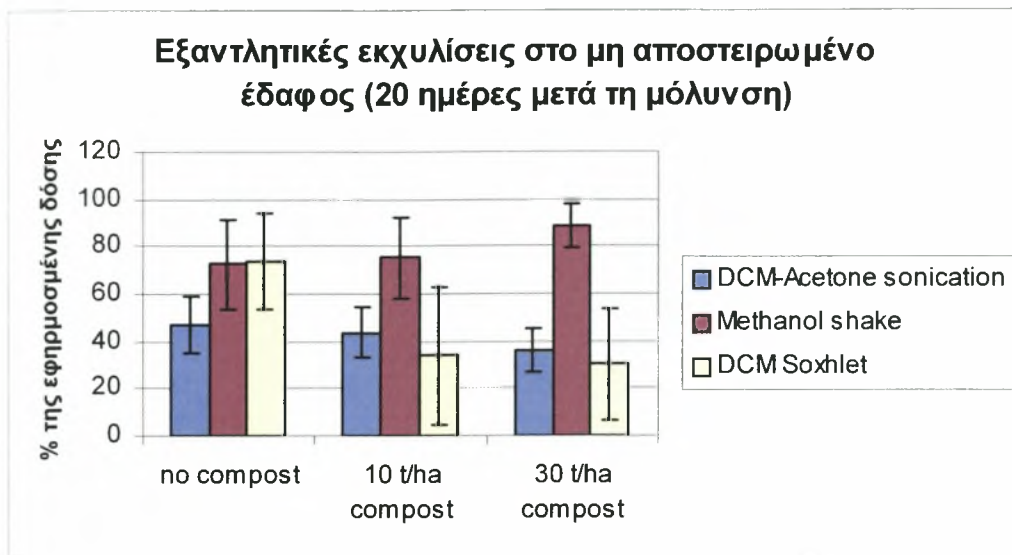
Με τη μέθοδο της ανάδευσης με νερό (water shaking) δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάκτηση της φαινανθρίνης από το δείγμα. Αυτό προφανώς οφείλεται στην πολύ χαμηλή (<1mg/L) υδατική διαλυτότητα του συγκεκριμένου ΠΑΥ, που περιορίζει τη διάλυσή του στο νερό και δεν επιτρέπει τη μεταφορά όλων των ανταλλάξιμων συστατικών.

Επιπλέον, όπως είναι αναμενόμενο, με την εξαντλητική μέθοδο της μεθανόλης εκχυλίζεται μεγαλύτερο ποσό της φαινανθρίνης σε σχέση με την μη εξαντλητική τεχνική των κυκλοδεξτρινών (εικ.3). Όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 το τμήμα που ανακτάται με την εκχύλιση CD αντιπροσωπεύει μόνο τη βιοδιαθέσιμη φαινανθρίνη, ενώ αυτό που ανακτάται με τη μεθανόλη περιλαμβάνει επιπλέον και το ποσό της γηρασμένης φαινανθρίνης.

Στις εικόνες 4 και 5 παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινανθρίνης που ανακτήθηκαν με τις 3 εξαντλητικές τεχνικές εκχύλισης 20 ημέρες μετά την προσθήκη του ΠΑΥ.



Εικ. 4 Ανακτήσεις φαινανθρίνης ύστερα από εξαντλητικές μεθόδους εκχύλισης από αποστειρωμένο έδαφος, 20 ημέρες μετά την προσθήκη της.



Εικ. 5 Ανακτήσεις φαινανθρίνης ύστερα από εξαντλητικές μεθόδους εκχύλισης από μη αποστειρωμένο έδαφος, 20 ημέρες μετά την προσθήκη της.

Μια καλή τεχνική εκχύλισης θα μπορούσε να οριστεί ως η διαδικασία που παραλαμβάνει το υψηλότερο ποσό των ΠΑΥ από ένα έδαφος για το οποίο δεν υπάρχουν διαθέσιμες πιστοποιημένες οριακές τιμές (Berset et al., 1999). Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Οι μέθοδος ανάδευσης με μεθανόλη αποδείχτηκε, χωρίς μεγάλη διαφορά από τις άλλες δύο μεθόδους, αποτελεσματικότερη στην ικανότητά της να εκχυλίσει την φαινανθρίνη από το μολυσμένο έδαφος.
2. Η εκχύλιση soxhlet, σε αντίθεση με το αναμενόμενο αποτέλεσμα βάσει των βιβλιογραφικών αναφορών (Berset et al., 1999), παρουσίασε αρκετά υψηλές αποκλίσεις στα αποτελέσματα σε σχέση με τις άλλες δύο μεθόδους που εμφανίζουν χαμηλότερες.

Κάθε φορά που επιλέγεται μια μέθοδος εκχύλισης, καλό είναι να λαμβάνονται υπ' όψιν ορισμένα βασικά κριτήρια: (i) ο απαιτούμενος εξοπλισμός, (ii) το εργατικό δυναμικό που χρειάζεται, (iii) ο χρόνος που απαιτείται, (iv) η απαραίτητη εξειδίκευση και (v) το συνολικό κόστος.

Οι μέθοδοι εκχύλισης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συγκριτική περίληψη των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης.

Παράμετρος	Νερό	Κυκλοδεξτρίνες	Soxhlet	Υπέρηχοι	Μεθανόλη
Βάρος δείγματος	2 gr	1 gr	2,5 gr	2 gr	1 gr
Διαλύτης	νερό	β-κυκλοδεξτρίνη	διχλωρομεθάνιο	Ακετόνη/DCM	μεθανόλη
Όγκος διαλύτη	1 ml	20 ml	100 ml	20 ml	20 ml
Διαχωρισμός	φυγοκέντρηση	φυγοκέντρηση	-	-	φυγοκέντρηση
Καθαρισμός	2 ^η φυγοκέντρηση	2 ^η φυγοκέντρηση	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	-
Ανάλυση	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC

Η κατανάλωση διαλύτη αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους στην επιλογή τεχνικής εκχύλισης για οικονομικούς λόγους. Η τεχνική της ανάδευσης με νερό εμφανίστηκε εξαρχής ιδιαίτερα ελκυστική, καθώς απαιτούσε ελάχιστη κατανάλωση διαλύτη για τη πραγματοποίησή της. Παρόλα αυτά, αποδείχτηκε πλήρως αναποτελεσματική για την εκχύλιση της φαινανθρίνης από το μολυσμένο έδαφος.

Ορισμένα από τα αποτελέσματα που χρήζουν λεπτομερέστερης μελέτης, πιθανώς να οφείλονται σε σφάλματα κατά τη διεξαγωγή της HPLC ανάλυσης. Τέτοιου είδους αποτελέσματα είναι αυτά που δείχνουν πως η επιρροή από την προσθήκη των οργανικών προσθετικών είναι ανεξάρτητη από τη δόση που εφαρμόζεται, καθώς επίσης και οι μεγάλες αποκλίσεις των αποτελεσμάτων της εκχύλισης soxhlet.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επίδραση της προσθήκης οργανικών προσθετικών στην τύχη της φαινανθρίνης στο έδαφος, καθώς και η αξιολόγηση της πιο αποτελεσματικής μεθόδου εκχύλισης φαινανθρίνης από δείγματα εδάφους, μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία με σειρά πειραμάτων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η παρουσία πρόσθετων οργανικών υλικών φαίνεται να ενισχύει τις διαδικασίες της γήρανσης και της βιοαποδόμησης, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα της φαινανθρίνης.
- Τα δείγματα στα οποία προστέθηκαν οργανικά προσθετικά, εμφάνισαν παρόμοιες τιμές βιοδιαθεσιμότητας, γήρανσης και βιοαποδόμησης: η επίδραση του πρόσθετου οργανικού υλικού στην τύχη της φαινανθρίνης φαίνεται να είναι σχετική και ανεξάρτητη από τη δόση που εφαρμόζεται.
- Η εξαντλητική τεχνική εκχύλισης με μεθανόλη παρουσιάζεται ως η περισσότερο αποτελεσματική για την ανάκτηση φαινανθρίνης από δείγματα εδάφους.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη για λεπτομερέστερες και εκτενέστερες μελέτες στο θέμα της επίδρασης των οργανικών προσθετικών στη βιοδιαθεσιμότητα των ΠΑΥ και στην εύρεση οικονομικότερων, γρηγορότερων και συγχρόνως αποδοτικότερων τεχνικών εκχύλισης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υποστηρίχθηκε από το Ινστιτούτο chimica agraria του Università Cattolica del Sacro Cuore στην Piacenza της Ιταλίας και ιδιαίτερα από τους υπεύθυνους καθηγητές E. Capri, M. Trevisan και A.A.M. Del Re τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Τεράστια ήταν επίσης η συμβολή του Dr. E. Puglisi με τη συνεχή επίβλεψη και βοήθειά του επί του έργου αυτού. Ευχαριστώ τον ίδιο και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να εργαστώ στο συγκεκριμένο Ινστιτούτο και τον καθηγητή μου κ. Καρπούζα Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθειά του στη συγγραφή αυτής της εργασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Στυλιανός Λοδάκης. Αναλυτική Χημεία, σελ. 306-309, 332, 368-369. Εκδόσεις Παπασωτηρίου. Αθήνα, 2001.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexander M. (1991) Research needs. *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1972-1974.
2. Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals? *Environmental Science and Technology* **29**, 2713-2717.
3. Alexander, M., 2000. Aging bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4259-4265.
4. American Society for Testing and Materials (ASTM). 1998. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation test with the lumbricid earthworm *Eisenia foetida*. E 1676-97. Philadelphia, PA: ASTM.4.
5. Anderson, L.M. et al. Metabolism of transplacental carcinogens. In: Napalkov, N.P. et al., eds. *Perinatal and multigeneration Carcinogenesis*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1989, pp. 155–188 (IARC Scientific Publications, No. 96).
6. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Acenaphthene, Acenaphthylene, Anthracene, Benzo(a)anthracene, Benzo(a)pyrene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(g,i,h)perylene, Benzo(k)fluoranthene, Chrysene, Dibenzo(a,h)anthracene, Fluoranthene, Fluorene, Indeno(1,2,3-c,d)pyrene, Phenanthrene, Pyrene. Prepared by Clement International Corporation, under Contract No. 205-88-0608. ATSDR/TP-90-20.
7. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): update*. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Services, 1994.
8. Berry D.F., 1999. Composting of organic chemical contaminants: bioremediation application of solid state fermentation. In: Adriano, D.C., Bollag, J.-M., Frankenberger Jr, W.T. and Sims, R.C., Editors, 1999. *Bioremediation of Contaminated Soils*, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 397–416.
9. Berset J.D., Ejem M., Ruth Holzer, Peter Lischer, 1999. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta* **383**, 263-275.
10. Blankenhorn I., Meijer D., von Delft R.J., *Fresenius' J. Anal. Chem.* **343** (1992): 497.
11. Blyshak, L. A.; Roosi, T. M.; Patonay, G.; Warner, I. M.(1988). *Analytical Chemistry* **60**, 2127-2131.
12. Bogan B.W. and Lamar R.T., One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **61** (1995), pp. 2631–2635.

13. Bosma, T., Harms, H., 1996. Bioavailability of organic pollutants. *EAWAG News* **40E**, 28-31.
14. Bosma T. N. P., Middeldorp P. J. M., Schraa G. and Zehnder A. J. B. (1997) Mass transfer limitation: quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 248-252.
15. Brilis, G. M., Marsden, P. J., 1990. Comparative-evaluation of soxhlet and sonication extraction in the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **21**, 91-98.
16. Budavari, S., M.J. O'Neil and A. Smith (Eds.). 1989. The Merck Index. Merck & Co., Inc. Rahway, NJ, pp. 1143-1144.
17. Bumpus J.A., Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (1989), pp. 154-158.
18. Carroll, K.M., Harkness, M.R., Bracco, A.A., Balcarcel, R.R., 1994. Application of a permeant/polymer diffusional model to the desorption of polychlorinated biphenyls from Hudson river sediments. *Environmental Science and Technology* **28**, 253-258.
19. Cerniglia C.E. (1984) Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In *Petroleum Microbiology*, ed. R. M. Atlas, pp. 99-128. Macmillan, New York.
20. Cerniglia C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.
21. Cescutti, P.; Garozzo, D.; Rizzo, R.(1996) Study of the inclusion complexes of Aromatic molecules with cyclodextrins using ionspray mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **290**, 105-115.
22. Chen I, Cohn S., P. Suresh C. Rae, and Linda S. Lee³, 1996. Evaluation of extraction and detection methods for determining PAHs from coal tar contaminated soils. *Chemosphere*, Vol. **32**, pp. 1123-1132.
23. Crawford S.L., Johnson, G.E. and Goetz, F.E., 1993. The potential for bioremediation of soils containing PAHs by composting. *Compost Science and Utilization* **1**, pp. 41-47.
24. Dean, J., Xiong, G., 2000. Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**, 553-564.
25. Draft International Standard ISO/DIS 13877, 1995.
26. Erickson, D.C., Loehr, R.C., Neuhauser, E.F., 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Res.* **27**, 911-919.
27. Fisher R., Kreuzig R. and Bahadir M., Extraction behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on waste incinerator fly ash. *Chemosphere* **29** (1994), pp. 311-317.
28. Foth, H. et al. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food chemistry and toxicology*, **26**: 45-51 (1988).
29. Gigliotti, G., Kaiser, K., 2002. "Differences in the chemical composition of dissolved organic matter from waste material of different sources". *Biol. Fertil. Soils*, **36**: 321-329.
30. Glatt, H.R. & Oesch, F. Species differences in enzymes controlling reactive epoxides. *Archives of toxicology supplement*, **10**: 111-124 (1987).
31. Graslund, A. & Jernstrom, B. DNA-carcinogen interaction: covalent DNA-adducts of benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides studied by biochemical and biophysical techniques. *Quarterly review of biophysics*, **22**: 1-37 (1989).

32. Guerin, W. F., Boyd, S. A., 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Applied Environmental Microbiology* **58**, 1142-1152.
33. Hall, M. et al. Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis*, **10**: 1815–1821 (1989).
34. R. Hartmann, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **62** (1996) 161.
U. Hechler, J. Fischer, S. Plagemann, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **351** (1995) 591.
35. Heitzer, A., Webb, O.F., Thonnard, J.E., Sayler, G.S., 1992. Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1839-1846.
36. Houot, S., Clergeot, D., Michelin, J., Francou, C., Bourgeois, S., Caria, G., Ciesielski, H., 2002. "Agronomic value and environmental impacts of urban compost used in agriculture. *Microbiology of composting*". H. Insam, N. Riddech, S. Klammer (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heildeberg.
37. IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1. Chemical, Environmental and Experimental Data, Vol. **32**. World Health Organization, Lyon, France, pp. 419-430.
38. Institute. 1995. SAS User's Guide: Statistics, Version 5 Ed. SAS Inst., Cary, NC, USA.
39. Jones, K.C., Alcock, R.E., Johnson, D.L., Nothcott, G.L., Semple, K.T., Woolgar, P.J., 1996. Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation* **3**, 189-197.
40. Juhasz A.L., ML Britz and G.A. Stanley, Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology Letters* **18** (1996), pp. 577–582.
41. Kaiser, K.; Guggenberger, L.; Haumaier, L. Zech, W. 1997. "Dissolved organic matter sorption on subsoils and minerals studied by C-NMR and DRIFT spectroscopy", *Soil Science Society American Journal* **48**: 301-310.
42. Kan, A.T., Fu, G., Tomson, M.B., 1994. Adsorption/desorption hysteresis in organic pollutants and soil/sediment interaction. . *Environmental Science and Technology* **28**, 859-867.
43. Kao, J. et al. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicology and applied pharmacology*, **81**: 502–516 (1985).
44. Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. 1997. Selective chemicals extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science and Technology* **31**, 214-217.
45. Kilbane J.J., II, Extractability and subsequent biodegradation of PAHs from contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution* **104** (1998), pp. 285–304.
46. Leppanen, K. T., Kokkonen, J. V. K., 1998. Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Muller). *Environmental Science and Technology* **32**, 1503-1508.

47. Letellier M., Budzinski H., Charrier L., Capes S. and Dorthe A.M., Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **364** (1999), pp. 228–237.
48. Luthy M. L., R. G., Alikin G. R., Brussaeu Cunningham S. D., Gschwend P. M., Pignatello J. J., Reinhard M., Traina S. J., Weber W. J., Jr. and Westall J. C. (1997) Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3341-3347.
49. Mabey, W.R., J.H. Smith, R.T. Podoll, et al. 1982. Aquatic fate process data for organic priority pollutants. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Washington, D.C. EPA 440/4-81-014.
50. Marquez-Rocha F.J., Hernandez-Rodriquez V.Z. and Vazquez-Duhalt R., Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* **22** (2000), pp. 469–472.
51. Matikainen T. et al., Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nature Genetics* 2001, **28**:355-360.
52. Means J.C., Wood S.G., Hasset J.J. and Banwart W.L. (1980) Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* **14**, 1524-1528.
53. Menzie, C.A. et al. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental science and technology*, **26**: 1278–1284 (1992).
54. Modica, R. et al. Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicology letters*, **18**: 103–109 (1983).
55. Nam, K., Alexander, M. 1998. Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability. *Environmental Science and Technology* **32**, 71-74.
56. Nam, K., Chung, N., Alexander, M. 1998. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science and Technology* **32**, 3785-3788.
57. Nebert, D.W. et al. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Annals of the New York Academy of Science*, **685**: 624–640 (1993).
58. Noordkamp E.R., Grotenhuis J.T.C. and Rulkens W.H., Selection of an efficient extraction method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil and sediment. *Chemosphere* **35** (1997), pp. 1907–1917.
59. Northcott. G.L., Jones K.C. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environmental Pollution* **108** (2000) 19-43.
60. Palmer G. et al., Use of lux-based biosensors for rapid diagnosis of pollutants in arable soils. *Chemosphere* **36** (1998), pp. 2683–2697.
61. Paton, G.I., Rattray, E.A.S., Campbell, C.D., Cresser, M.S., Glover, L.A., Meeussen, J.C.L., Killham, K. Use of genetically modified microbial biosensors for soil ecotoxicity testing. In Biological Indicators of soil health and sustainable productivity. Pankhurst et al (Eds.). CAB International. (1997).

62. Prince R.C. and Drake, E.N., 1998. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: Adriano, D.C., Bollag, J.-M., Frankenberger Jr., W.T. and Sims, R.C., Editors, 1998. *Bioremediation of contaminated soils*, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 89–110.
63. Reid, B. J., Stokes, J. D., Jones, K. C., Semple, K.T. Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, 3174-3179.
64. Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* (1997), **34**, 835-848.
65. Sax, N.I. and R.L. Lewis (Eds.). 1987. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 11th ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York, p. 895.
66. Schlede, E. et al. Stimulatory effect of benzo(alpha)pyrene and phenobarbital pre-treatment on the biliary excretion of benzo(alpha)pyrene metabolites in the rat. *Cancer. research*, **30**: 2898–2904 (1970).
67. Scow K. M. and Alexander M. (1992) Effect of diffusion on the kinetics of biodegradation: experimental results with synthetic aggregates. *Soil Science Society American Journal*. **56**, 128-134.
68. Semple K. T., Reid B. J. and Fermor T. R., Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* **112** (2001), pp. 269-283.
69. Shieh, W. J.; Hedges, A. R. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* (1996), **A33**, 673-683.
70. Shixiang, G.; Liansheng W.; Qingguo, H.; Sukui, H. *Chemosphere* (1998), **37**, 1299-1305.
71. Song Y. F., Jing X., Fleischmann S. and Wilke B. -M.. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere* **48** (2002), pp. 993-1001.
72. Turpeneinen R., Kairesalo T. and Haggblom M.M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper- contaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology* **47** (2004), pp. 39-50.
73. US Environmental Protection Agency, 1992. Framework for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R92/001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
74. US EPA, 1999. Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in ambient Air. Environmental Protection Agency, US Federal Register, Compendium Method TO-13A 1-42.
75. Van Agteren M.H., Keuning, S. and Janssen, D.B., 1998. Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds. , Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
76. Van der Leslie, D., Corbisier, P., Baeyers, W., Wuertz, S., Diesl, L., Mergeay, M. The use of biosensors in environmental monitoring. In *Bioremediation: scientific and technological issues*. 10th Forum in Microbiology. (1994)
77. Van de Wiel, J.A. et al. Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and faeces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology*, **80**: 103–115 (1993).
78. Van Emon JM. 2001. Immunochemical applications in environmental science. *Journal of AOAC International* **84**:125-133.
79. Wang, X.; Brusseau, M. L. *Environmental Science and Technology*, (1995), **27**, 2821-2825.

80. Wang, X.; Brusseau, M. L. *Environmental Science and Technology*, (1995), **29**, 2346-2351.
81. Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., Langhoff, J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradation and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 689-696.
82. Werth, C.J., Reinhard, M., 1997. Effect of temperature on trichloroethylene desorption from silica gel and natural sediments. 2. Kinetics. *Environmental Science and Technology* **31**, 697-703.
83. White, J.C., Kelsey, J.W., Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1997. Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2040-2045.
84. Wiersma, D.A. & Roth, R.A. Total body clearance of circulating benzo(a)pyrene in conscious rats: effect of pre-treatment with 3-methylcholanthrene and the role of liver and lung. *Journal of pharmacology and experimental therapy*, **226**: 661–667 (1983).
85. Withey, J.R. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *Journal of toxicology and environmental health* **32**: 42–447 (1991).
86. Wolff R.K. et al. Effects of repeated inhalation exposures to 1-nitropyrene, benzo[a]pyrene, Ga₂O₃ particles, and SO₂ alone and in combinations on particle clearance, bronchoalveolar lavage fluid composition, and histopathology. *Journal of toxicology and environmental health*, **27**: 123–138 (1989).
87. World Health Organization Regional Office for Europe, 1987. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). *In: Air quality guidelines for Europe*. Copenhagen, pp. 105– 117.
88. Wu, S., Gschwend, P.M., 1986. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environmental Science and Technology* **20**, 717-725.
89. Xing, B., Pignatello, J.J., Gigliotti, B., 1996. Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils. *Environmental Science and Technology* **30**, 2432-2440.
90. Yuan S.Y., Chang J.S., Yen J.H. and Chang B.V., Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere* **43** (2001), pp. 273–278.
91. Yuan S.Y., Wei S.H. and Chang B.V., Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* **41** (2000), pp. 1463–1468.