



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΩΝ
ΑΠΟΒΑΗΤΩΝ**

Εργαστήριο 1^ο – Εκτίμηση τοξικότητας στραγγισμάτων ΧΥΤΑ

Ομάδα 17

Άγγελος Παντής 2018050055

Δημήτριος Φωτίου 2018050040

Κυριακή Θεοχάρη 2018050043

Νίκος Σουλάκος 2016050076

Φλώρα Λούκαϊ 2016050021



Σκοπός και Πειραματική Διαδικασία

Γίνεται προσδιορισμός της τοξικότητας αγνώστου δείγματος στραγγισμάτων ΧΥΤΑ πραγματοποιώντας τεστ οξείας τοξικότητας σε νεογνά *Artemia Salina*. Παρασκευάζονται διαλύματα από το δείγμα όγκου 10ml και συγκέντρωσης 0 , 12,5 , 20 , 25 , 50 και 100%. Τοποθετούνται 2 ml της αντίστοιχης συγκέντρωσης σε κάθε κυψελίδα. Οι κυψελίδες για κάθε συγκέντρωση είναι τρεις, μια κυψελίδα στη στήλη αποθήκευσης και άλλες δυο στις στήλες επανάληψης. Στη συνέχεια μεταφέρεται επαρκές πλήθος *Artemia* σε κάθε κυψελίδα της στήλης αποθήκευσης, από την οποία γίνεται μεταφορά πέντε ζώντων μικροοργανισμών σε κάθε κυψελίδα επανάληψης. Έπειτα από 24h στους 25°C (στο σκοτάδι) λαμβάνονται οι μετρήσεις.

Τα δεδομένα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Λεδομένα

Πίνακας 1

Συγκέντρωση %	Αριθμός ζώντων οργανισμών: 5 ανά κυψελίδα	
	Στήλη Επανάληψης 1	Στήλη Επανάληψης 2
0	5	4
12,5	4	4
25	2	3
50	1	1
100	0	0

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις αναφέρονται στο δείγμα στραγγισμάτων και δημιουργούνται έπειτα από ανάμιξη θαλασσινού νερού (φυσικό περιβάλλον *Artemia Salina*) με το διάλυμα του αγνώστου δείγματος. Η συγκέντρωση 0% αντιστοιχεί στο διάλυμα που δεν έχει γίνει προσθήκη ποσότητας τοξικού δείγματος (100% θαλασσινό νερό), ενώ η συγκέντρωση 100% υποδεικνύει καθαρή ποσότητα δείγματος. Για τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις έγιναν οι κατάλληλες αναμίξεις σε δείγμα τελικού όγκου 10ml.

Ενδεικτικά:

$C = 12,5\% \rightarrow C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \frac{12,5 \cdot 10 \text{ml}}{100} = 1,25 \text{ml}$, δηλαδή προσθήκη 1,25ml αγνώστου σε 8,75ml θαλασσινού νερού.

Ομοίως:

$C = 25\% \rightarrow 2,5 \text{ ml}$ αγνώστου σε 7,5ml θαλασσινού νερού

$C = 50\% \rightarrow 5 \text{ ml}$ αγνώστου σε 5ml θαλασσινού νερού

1. Υπολογισμός ποσοστού θανάτωσης Artemia Salina λόγω τοξικότητας.

Πίνακας 2

C%	logC	1 ^η	2 ^η	Ζωντανά%	Θνησιμότητα%	Διορθωμένη Θνησιμότητα%
0	-	5	4	90	10	0
12,5	1,09	4	4	80	20	10
25	1,40	2	3	50	50	40
50	1,70	1	1	20	80	70
100	2,00	0	0	0	100	90

Το ποσοστό των ζώντων μικροοργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε δόση για 24 ώρες υπολογίζεται προσθέτοντας το πλήθος των ζώντων (για τις 2 δοκιμές) και διαιρώντας το στη συνέχεια με τον αρχικό πληθυσμό (5+5 ζώντα σε κάθε κυψελίδα).

Το ποσοστό της θνησιμότητας υπολογίζεται αφαιρώντας από το αρχικό ποσοστό (100%) το ποσοστό των ζώντων μετά το τεστ τοξικότητας.

Παρατηρείται ότι η θνησιμότητα στη δοκιμή με μηδενική συγκέντρωση τοξικού διαλύματος βρέθηκε 10%. Το τεστ μπορεί να θεωρηθεί οριακά αποδεκτό, καθώς τα αποδεκτά ποσοστά ορίζονται μικρότερα του 10%.

Το ποσοστό της θνησιμότητας σε διάλυμα θαλασσινού νερού (0%) είναι ενδεικτικό της θνησιμότητας των οργανισμών από φυσικά αίτια. Για να μελετηθεί η θνησιμότητα που οφείλεται αποκλειστικά στη τοξικότητα και όχι σε άλλα αίτια, το παραπάνω ποσοστό αφαιρείται από τα επόμενα ποσοστά. Τα τελικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στη στήλη της διορθωμένης θνησιμότητας.

Ενδεικτικά για τη συγκέντρωση 12,5% :

Αριθμός ζώντων: 4 στη 1^η / 4 στη 2^η επανάληψη

Αρχικός αριθμός ζώντων: 5 στη 1^η / 5 στη 2^η

$$\text{Ποσοστό ζωντανών} = \frac{4+4}{10} \times 100\% = 80\%$$

$$\text{Θνησιμότητα} = 100 - 80 = 20\%$$

$$\text{Διορθωμένη θνησιμότητα} = 20 - 10 = 10\%$$

Ομοίως συμπληρώνονται οι υπόλοιπες γραμμές του Πίνακα 2.

2. Υπολογισμός δείκτη LC₅₀ (Lethal Concentration 50%).

Ο δείκτης LC₅₀ είναι η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας (στο νερό) που προκαλεί θάνατο στο 50% του εκτιθέμενου πληθυσμού. Υπολογίζεται από το διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού θανάτου με τη μεταβολή στη συγκέντρωση της τοξικής ουσίας. Ο άξονας x αντιστοιχεί στον λογάριθμο της συγκέντρωσης της ουσίας που προκαλεί θάνατο των μικροοργανισμών και ο άξονας y στη θνησιμότητα σε μονάδες probit.

Μετατροπή διορθωμένου ποσοστού θνησιμότητας σε μονάδες probit

Η μετατροπή σε μονάδες probit γίνεται σύμφωνα με τον Πίνακα 3:

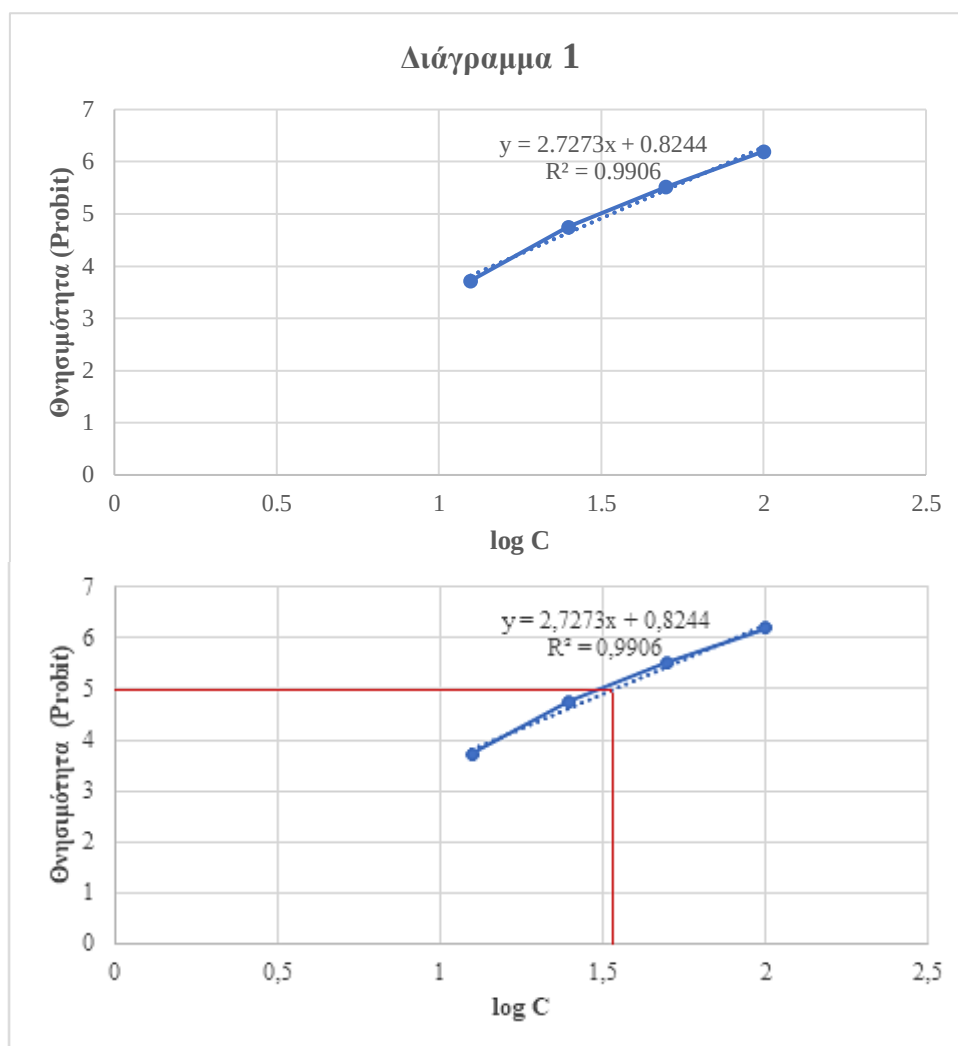
Πίνακας 3

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.60	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.30	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Πίνακας 4

C%	logC	Διορθωμένη Θνησιμότητα%	Θνησιμότητα σε Probit
0	-	0	–
12,5	1,09	10	3,72
25	1,40	40	4,75
50	1,70	70	5,52
100	2,00	90	6,28

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η μετατροπή της θνησιμότητας σε μονάδες probit. Το Διάγραμμα 1 προκύπτει από τις τιμές των στηλών logC και θνησιμότητα σε probit.



Η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης προέκυψε: $y = 2,7273x + 0,8244$, με $R^2 = 0,9906$ (καλή γραμμική συσχέτιση). Ο δείκτης LC_{50} υπολογίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που αντιστοιχεί σε θνησιμότητα 5 probit (50%). Δηλαδή:

$$\log C = \frac{5 - 0,8244}{2,7273} = 1,53 \Rightarrow LC_{50} = 10^{1,53} = 33,88 \cong 34\%$$

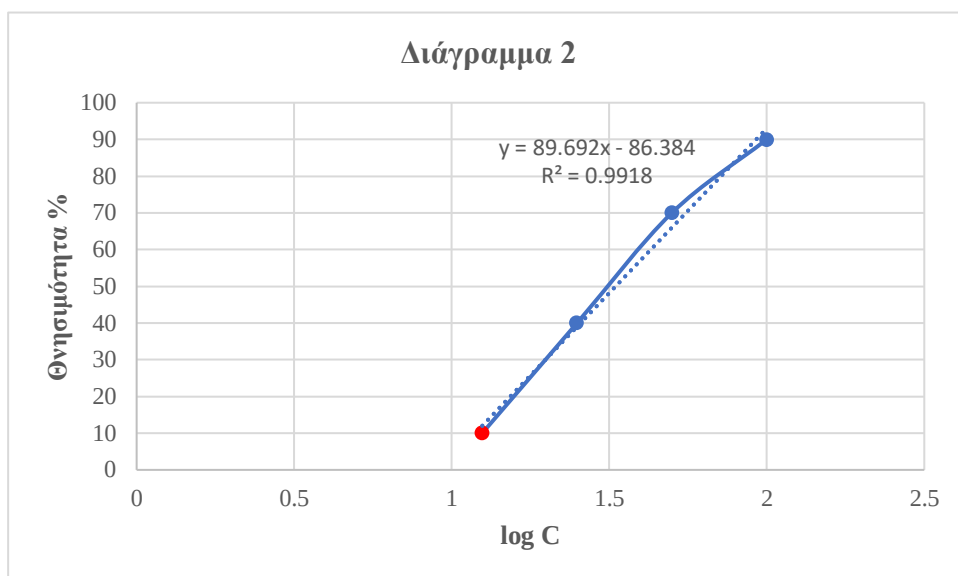
Συνεπώς, η έκθεση μικροοργανισμών σε διάλυμα συγκέντρωσης 34% του δείγματος στραγγισμάτων θα προκαλέσει θάνατο στο 50% του πληθυσμού.

3. Εκτίμηση τιμής κατώφλι (threshold).

Η τιμή κατώφλι αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της τοξικής ουσίας κάτω από την οποία δεν παρατηρείται ανησυχητική επίδραση στον οργανισμό. Επομένως, το κατώφλι αποτελεί τη τιμή της συγκέντρωσης στην οποία εμφανίζονται δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς. Στο τεστ οξείας τοξικότητας το κατώφλι αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του δείγματος που αρχίζει να προκαλεί θάνατο.

Για τον προσδιορισμό του σημείου γίνεται γραφική αναπαράσταση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης και της θνησιμότητας (%). Ο υπολογισμός γίνεται είτε προσεγγιστικά μέσω του Διαγράμματος 2 είτε απευθείας από τα δεδομένα.

log (Συγκέντρωσης)	Διορθωμένη Θνησιμότητα%
-	0
1,09	10
1,40	40
1,70	70
2,00	90



Σύμφωνα με τα δεδομένα, για $\log C = 1,09$ έχει προέλθει θάνατος ήδη στο 10% του πληθυσμού. Βάσει αυτού, το κατώφλι θα βρίσκεται λίγο κάτω από το $10^{1,09}$. Με μικρή ακρίβεια, η τιμή $\log C$ που αντιστοιχεί στο κατώφλι εκτιμάται λίγο μικρότερη του 1,09, περίπου 0,95.

Για μεγαλύτερη ακρίβεια μπορεί να υπολογιστεί η τιμή του x στην ευθεία παλινδρόμησης ($R^2 = 0,99$) του Διαγράμματος 2, αν το y (ποσοστό θνησιμότητας) οριστεί μηδενικό. Συγκεκριμένα:

$$x = \log C = \frac{86,384}{89,692} = 0,963 \Rightarrow C = 10^{0,963} = 9,20\%$$

Επομένως, συγκέντρωση μεγαλύτερη από 9,2% του δείγματος στραγγισμάτων αρχίζει να προκαλεί θάνατο στον εκτιθέμενο πληθυσμό μικροοργανισμών.

Παρόλο που το κατώφλι και το LC_{50} προσδιορίστηκαν για τα *Artemia Salina*, το δεύτερο μπορεί να γενικευτεί για όλους τους μικροοργανισμούς.

4. Σκοπός επαναλήψεων και δοκιμή σε διάλυμα καθαρού νερού βρύσης.

Οι δυο επαναλήψεις γίνονται για λόγους ακριβείας. Όσο περισσότερες είναι οι επαναλήψεις, τόσο μεγαλύτερη αξιοπιστία παρουσιάζουν τα τελικά αποτελέσματα, καθώς μειώνεται η επίδραση σφαλμάτων που ενδέχεται να επενεργούν σε κάθε δοκιμή. Για μεγαλύτερη ακρίβεια στο τεστ οξείας τοξικότητας θα μπορούσαν να γίνουν τρεις επαναλήψεις.

Το θαλασσινό νερό αποτελεί το φυσικό περιβάλλον των *Artemia Salina* και αυτός είναι ο λόγος που επιλέχθηκε για αραίωση. Η τοποθέτηση των νεογνών *Artemia Salina* σε καθαρό νερό βρύσης (χωρίς αλατότητα) θα είχε ως αποτέλεσμα τη θανάτωση μεγάλου ποσοστού τους, πριν ακόμα εκτεθούν στη τοξική ουσία. Το ποσοστό θανάτου που δεν οφείλεται στη τοξικότητα του εξεταζόμενου δείγματος θα ξεπερνούσε το 10%, επομένως το τεστ οξείας τοξικότητας – όπως ορίζεται από τον κανονισμό – θα θεωρούνταν μη αποδεκτό.

Οι υπό εξέταση μικροοργανισμοί είναι σκόπιμο να βρίσκονται αρχικά σε διάλυμα που προσομοιώνει τις βέλτιστες συνθήκες διαβίωσής τους, ώστε να μη δυσχεραίνεται η μέτρηση του ποσοστού θανάτου αποκλειστικά λόγω τοξικότητας.

5. Αντίκτυπος μεγάλης τοξικότητας για τα *Artemia Salina* στη τροφική αλυσίδα του οικοσυστήματος.

Τα *Artemia Salina*, ιδιαίτερα τα νεογνά, βρίσκονται πολύ χαμηλά στο τροφική αλυσίδα υδάτινων οικοσυστημάτων και αποτελούν πρωταρχική πηγή πρωτεϊνών για πολλούς υδρόβιους οργανισμούς. Συνεπώς, αν ο πληθυσμός τους αρχίσει να μειώνεται θα αποτελέσουν ενδεχόμενο περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης των οργανισμών ενός υδατικού ενδιαιτήματος.

Εκτός από την έλλειψη κύριας πηγής τροφής και κατά συνέπεια τον περιορισμό της ανάπτυξης (ή ακόμα και μείωση) του υπάρχοντος πληθυσμού των υδρόβιων οργανισμών, το φαινόμενο της βιομεγέθυνσης αποτελεί επίσης σημαντικό κίνδυνο για το οικοσύστημα.

Η τοξικότητα που συσσωρεύεται στα νεογνά *Artemia Salina* τα οποία καταφέρνουν να μεγαλώσουν, διοχετεύεται στους θηρευτές τους. Η βιομεγέθυνση έχει ως αποτέλεσμα τη διαδοχική αύξηση της συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας στους οργανισμούς, όσο αυτοί καταναλώνονται από θηρευτές μεγαλύτερου τροφικού επιπέδου.

Η βιομεγέθυνση αφορά τη χρόνια τοξικότητα και έχει υπολογιστεί ότι η συγκέντρωση του ρύπου αυξάνεται κατά μια τάξη μεγέθους για κάθε στάδιο της τροφικής αλυσίδας. Εκτός από οικολογικό κίνδυνο αποτελεί κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία, στη περίπτωση που εκτεθειμένοι οργανισμοί (όπως ψάρια) καταναλώνονται από ανθρώπους.

6. Ταυτοποίηση τοξικών ουσιών (πχ βαρέα μέταλλα) με τεστ οξείας τοξικότητας.

Το τεστ οξείας τοξικότητας παρέχει πληροφορία μόνο για την θνησιμότητα που προκαλείται στο εξεταζόμενο είδος, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αγνώστου διαλύματος στην οποία εκτίθεται. Δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ύπαρξη συγκεκριμένων τοξικών ουσιών μέσα στο δείγμα, παρά μόνο η επίδραση αυτών σε μικροοργανισμούς εντός 24 ωρών.

Από το ποσοστό θνησιμότητας των μικροοργανισμών δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο αξιόπιστο συμπέρασμα για τη σύσταση του τοξικού δείγματος, καθώς οι ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν θάνατο σε τόσο ευαίσθητους οργανισμούς είναι άπειρες. Για τη ταυτοποίηση των ουσιών που έχουν τοξική δράση στους μικροοργανισμούς απαιτείται να γίνουν χημικές αναλύσεις στο δείγμα.

Οι αναλύσεις στο δείγμα δεν γίνονται τυχαία, ακολουθούν κάποια λογικά στάδια που ορίζονται κυρίως από τη περιοχή δειγματοληψίας (προ επεξεργασία και ανάλυση). Η ευρύτερη περιοχή από την οποία προήλθε το δείγμα μπορεί ενδεχομένως να κατευθύνει την έρευνα, αποκλείοντας άσκοπες αναλύσεις.

Σε περίπτωση που το δείγμα προήλθε από περιοχή με έντονη βιομηχανική δραστηριότητα, είναι σκόπιμο να γίνουν αναλύσεις για την ανίχνευση βαρέων μετάλλων. Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να ταυτοποιηθούν ανάλογα με την ατομική τους απορρόφηση στο φασματόμετρο.

Ακόμα και να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές ουσίες που προκαλούν όμοια αποτελέσματα στο ποσοστό θανάτωσης των *Artemia Salina*, θα βρεθούν λογικά τουλάχιστον πάνω από ένα διάλυμα με παρόμοια χαρακτηριστικά στο ποσοστό θανάτωσης των μικροοργανισμών, με το άγνωστο διάλυμα. Φυσικά πρέπει να συμπεριληφθεί και η πιθανότητα σφαλμάτων που θα γίνουν.

Εν κατακλείδι, είναι χρονοβόρο, κοστοβόρο και αρκετά ανακριβές να ταυτοποιηθεί το άγνωστο διάλυμα μας μέσω το ποσοστό της θνησιμότητας με το τεστ οξείας τοξικότητας, που είναι πρακτικά παράλογο να το κάνει κανείς.

Βιβλιογραφία

1. Γιδαράκος Ε., Αϊβαλιώτη Μ., Επικίνδυνα Απόβλητα – Διαχείριση – Επεξεργασία – Διάθεση. Εκδόσεις Πολυτεχνείου Κρήτης, Χανιά, 2022.
2. Επεξεργασία & Διαχείριση Τοξικών και Επικίνδυνων Αποβλήτων, Εργαστηριακές σημειώσεις μαθήματος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2022.