

1. Εκτίμηση της τοξικότητας στραγγισμάτων ΧΥΤΑ

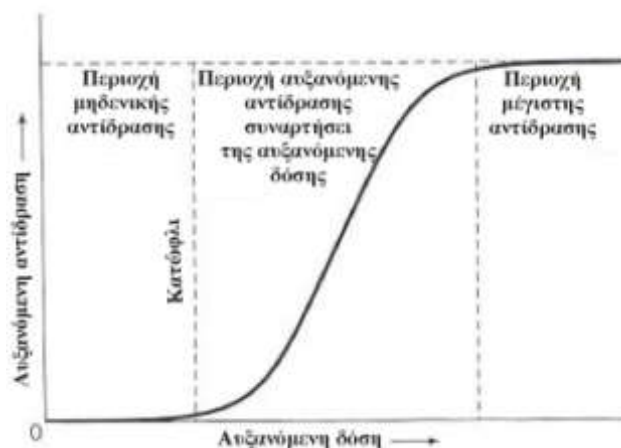
Σκοπός: Σκοπός της παρούσας εργαστηριακής άσκησης είναι ο προσδιορισμός της τοξικότητας αγνώστου δείγματος στραγγισμάτων ΧΥΤΑ με τη βοήθεια μικροοργανισμών.

Θεωρητικό μέρος

Όπως είναι γνωστό ως τοξική ουσία χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε χημική ουσία μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στο βιολογικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Αντίστοιχα, η τοξικότητα εκφράζει το βαθμό πρόκλησης αρνητικών επιπτώσεων στο βιολογικό σύστημα ενός οργανισμού, εξαιτίας μιας χημικής ουσίας.

Η εκτίμηση της τοξικότητας υγρών δειγμάτων (διαλυμάτων) μπορεί να γίνει με τον προσδιορισμό του δείκτη τοξικότητας **LC₅₀** (**Lethal Concentration**: θανατηφόρα συγκέντρωση), ο οποίος εκφράζει τη συγκέντρωση της υπό εξέταση τοξικής ή επικίνδυνης ουσίας που προκαλεί θάνατο στο 50% των πειραματόζωων. Επίσης χρησιμοποιείται ευρέως και ο δείκτης **LD₅₀** (**Lethal Dose**: θανατηφόρα δόση), που εκφράζει τη δόση (ποσότητα) της υπό εξέταση τοξικής ή επικίνδυνης ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% των πειραματόζωων.

Για τον χαρακτηρισμό μιας ουσίας ως προς την τοξικότητά της πολλές φορές είναι αναγκαία και η γνώση της μέγιστης ποσότητας έκθεσης οργανισμών σε αυτήν για συγκεκριμένο χρόνο έκθεσης. Χαρακτηριστικό όριο έκθεσης οργανισμού σε χημική ουσία αποτελεί η τιμή **TLV** (**Threshold Limit Value**: οριακή τιμή κατωφλιού) η οποία εκφράζει την μέγιστη συγκέντρωση της δεδομένης ουσίας στην οποία θα μπορούσε να εκτίθεται ένας συγκεκριμένος οργανισμός κάθε ημέρα χωρίς σημαντική βλάβη (Σχήμα 1).



Σχήμα 2-1: Γραφική απεικόνιση του TLV.

Τέλος, η τιμή **TLV - TWA** (Time - Weighted Average: μέση τιμή - υπολογισμένη ως προς χρόνο) εκφράζει τη μέση συγκέντρωση μιας ουσίας ως προς το χρόνο για ένα συνηθισμένο οκτάωρο εργάσιμης ημέρας ή 40 ώρες μιας εβδομάδας εργάσιμων ημερών στην οποία ένας εργαζόμενος μπορεί να εκτεθεί στην συγκεκριμένη ουσία χωρίς επιβλαβή επίδραση.

Στην περίπτωση των στραγγισμάτων XYTA προφανώς αναφερόμαστε σε μίγμα πιθανών τοξικών και επικινδύνων ουσιών. Επομένως, η τοξικότητά τους εκτιμάται από την ακόλουθη σχέση :

$$R_m = \sum_{i=1}^n C_i / TLV_i$$

όπου: R_m : η σχετική αναλογία της τοξικότητας του μίγματος

C_i : η συγκέντρωση της συγκεκριμένης τοξικής ουσίας (ppm)

TLV_i : το όριο έκθεσης για τη συγκεκριμένη τοξική ουσία (ppm)

Εάν $R_m > 1$, τότε η συγκέντρωση του μίγματος υπερβαίνει το όριο TLV και θεωρείται επικίνδυνη τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση στην οδηγία 60/2000 για την ποιότητα των επιφανειακών νερών, αναφέρεται πέρα από τις χημικές αναλύσεις και στον προσδιορισμό της οικολογικής ποιότητας των επιφανειακών νερών με την εφαρμογή των τεστ τοξικότητας. Η συγκεκριμένη οδηγία προτείνει τον προσδιορισμό της τοξικότητας με τη χρήση υδρόβιων οργανισμών όπως τα οστρακόδερμα *Artemia*, τα βακτήρια, τα άλγη κλπ.

Πειραματικό μέρος

Όργανα και υλικά:

1. Εφίππια *Artemia Salina*
2. Δισκίο επώασης
3. Φύλλα parafilm
4. Μικροσιφόνια
5. Σιφόνια
6. Θάλαμος επώασης

7. Θαλασσινό νερό (σε 1 l απιονισμένο νερό διαλύονται 27.50 g NaCl, 0.21 g NaHCO₃, 7.0 g MgSO₄ 7H₂O, 5.20 g MgSO₄, 5.20 g MgCl₂ 6H₂O, 0.70 g KCl, 1.30 CaCl₂ και η τιμή του pH του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη HCl μεταξύ 8-8.5.
8. Πιάτο με κυψελίδες
9. Τραπέζι φωτισμού
10. Δείγματα στραγγισμάτων XYTA

Χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού:

Ο προσδιορισμός της τοξικότητας γίνεται γενικά με τη χρήση υδρόβιων οργανισμών όπως τα οστρακόδερμα *Artemia*, τα βακτήρια, τα άλγη κλπ. Στη παρούσα εργαστηριακή άσκηση χρησιμοποιούνται αυγά *Artemia Salina* προκειμένου να εκτελεστεί το τεστ τοξικότητας σύμφωνα με τις διεθνείς αποδεκτές τυποποιημένες μεθόδους. Οι δοκιμές χρησιμοποιούν τα "νεογνά" *Artemia Salina* που εκκολάπτονται σε περίπου 24 ώρες (25-28° C) από τα αυγά - εφίπια.



Εικόνα 2-1: Σετ Artemia salina.

Οι βέλτιστες συνθήκες για την εκκόλαψη της *Artemia Salina* είναι:

- Θερμοκρασία μεγαλύτερη από 25° C με βέλτιστη θερμοκρασία τους 28° C
- Αλατότητα της τάξης των 5 ppt
- Έντονο και συνεχή αερισμό
- Συνεχή φωτισμό με λάμπα φθορισμού
- pH: 8-8.5
- Η ποσότητα κυστών της *Artemia* να μην ξεπερνά τα 5 g/l νερού.
- Συνεχής ανάδευση

Πειραματική διαδικασία:

1.Εκκόλαψη των εφίππων *Artemia Salina* (η εκκόλαψη των εφίππων πρέπει να αρχίσει 1 ημέρα πριν από την έναρξη της δοκιμής τοξικότητας):

Αρχικά φέρεται μια ποσότητα κυστών *Artemia* σε κατάλληλο μπουκάλι και προστίθενται ~50ml απεσταγμένου νερού. Οι κύστες αφήνονται να ενυδατωθούν για 60-90 λεπτά σε θερμοκρασία 25° C. Στη συνέχεια προστίθεται 1l τεχνητό θαλασσινό νερό και οι κύστες αφήνονται να εκκολαπτούν για 18 h στους 28° C (ή για 24 h στους 25° C) σε θάλαμο επώασης, υπό συνεχή ανάδευση, αερισμό και φωτισμό. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκκόλαψης των *Artemia*, διαχωρίζονται τα κελύφη από τους ζωντανούς οργανισμούς.

** Δεδομένου ότι οι τυποποιημένες διαδικασίες δείχνουν ότι τα νεογνά δεν πρέπει να είναι ηλικίας μεγαλύτερα από 24h στην έναρξη της δοκιμής τοξικότητας, τα νεογνά πρέπει να συλλεχθούν το αργότερο 30h μετά από την έναρξη της επώασης.*

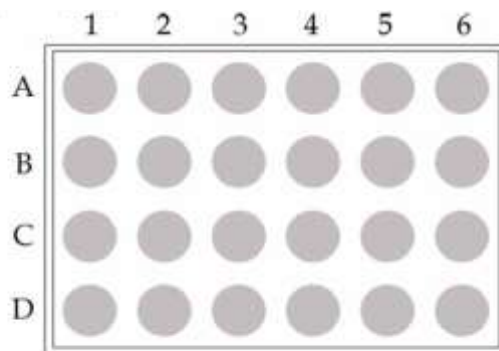
2.Δημιουργία διαλυμάτων αραιώσης τοξικού αποβλήτου:

Κατασκευάστε 5 διαλύματα (Α, Β, Γ, Δ, Ε) των 10ml το καθένα. Το διάλυμα Α αποτελείται από στραγγίσματα ΧΥΤΑ (100%). Τα άλλα τρία διαλύματα (Β, Γ, Δ) έχουν συγκέντρωση 50, 25, 12.5, 0% κ.ο. του διαλύματος Α (σε θαλασσινό νερό), αντίστοιχα.

3.Πλήρωση των κυψελίδων:

Οι αναλύσεις διεξάγονται σε ειδικές κυψελίδες δοκιμής (Εικόνα 2). Οι κυψελίδες είναι στο σύνολο τους 24. Η πρώτη στήλη (rinsing wells) αποτελεί χώρο αποθήκευσης των νεογνών (δεν γίνεται δοκιμή σε αυτές), ενώ οι υπόλοιπες στήλες χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή. Στις 5 κυψελίδες (2-6) της πρώτης γραμμής (Α) διοχετεύεται καθαρό θαλασσινό νερό (συγκέντρωση τοξικής ουσίας 0%). Στις κυψελίδες των υπόλοιπων γραμμών διοχετεύεται διάλυμα της τοξικής ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις (12.5, 25, 50, 100%). Τοποθετείστε με τη βοήθεια σιφωνίου 2ml κάθε διαλύματος σε κάθε κυψελίδα μιας συγκεκριμένης γραμμής (και στις κυψελίδες αποθήκευσης). Ο σκοπός των κυψελίδων της πρώτης στήλης είναι να γίνει η μεταφορά των νεογνών αρχικά σε αυτές και μετά στις κυψελίδες δοκιμής ώστε να αποτραπεί η αραιώση της τοξικής ουσίας κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των νεογνών από το δισκίο εκκόλαψης στις κυψελίδες

δοκιμής εξαιτίας του νερού που θα συμμεταφερθεί αναγκαστικά μαζί με τα νεογνά.



Εικόνα 2-2: Πιάτο κυψελίδων.

4. Μεταφορά των νεογνών στις κυψελίδες δοκιμής:

Τοποθετείστε το δισκίο επώασης στη φωτιζόμενη πλάκα και μεταφέρετε 20 (κολυμπώντας ενεργά) νεογνά με μικροσιφόνια στις κυψελίδες αποθήκευσης. Στη συνέχεια τοποθετείστε το πιάτο με τις κυψελίδες πάνω στην φωτιζόμενη πλάκα και μεταφέρετε από την κάθε κυψελίδα αποθήκευσης 5 νεογνά σε καθεμία από τις 4 κυψελίδες της ίδιας γραμμής

ΠΡΟΣΟΧΗ!!!

Τα νεογνά Artemia μπορούν εύκολα να παγιδευτούν στην επιφάνεια του υγρού μέσου στις κυψελίδες εξαιτίας της επιφανειακής τάσης. Όσοι οργανισμοί παγιδευτούν στην επιφάνεια είναι πολύ πιθανόν να πεθάνουν και έτσι τα αποτελέσματα θνησιμότητας που θα πάρουμε να είναι ανακριβή εξαιτίας του θανάτου των νεογνών από άλλη αιτία και όχι λόγω τοξικότητας του υγρού. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο είναι σημαντικό, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των νεογνών, να τοποθετηθούν τα νεογνά εντός του υγρού των κυψελίδων με βοήθεια του μικροσιφωνίου που θα πρέπει να εισχωρήσει μέσα στο υγρό και να μην τοποθετηθούν απλά επάνω στην επιφάνεια του υγρού.

5. Επώαση των νεογνών εντός των κυψελίδων και σημείωση των αποτελεσμάτων:

Τοποθετείστε ένα φύλλο Parafilm και την κάλυψη πάνω από το πιάτο των κυψελίδων και αφήστε τα νεογνά να επωαστούν στον θάλαμο επώασης στους

25°C, στο σκοτάδι. Μετά από 24h επώασης, τοποθετήστε το πιάτο με τις κυψελίδες πάνω στη φωτιζόμενη πλάκα και μετρήστε τον αριθμό των νεκρών και ακινητοποιημένων* οργανισμών στις κυψελίδες δοκιμής και στις κυψελίδες των διαλυμάτων Α έως Δ.



** Τα νεογνά που δεν κολυμπούν μετά από ελαφριά αναταραχή του υγρού για 15 δευτερόλεπτα θεωρούνται ακινητοποιημένα (Εικόνα 3).*

Εικόνα 2-3: Οργανισμοί Artemia salina.

Ζητούμενα

- 1) Υπολογίστε για κάθε διάλυμα (0, 12.5, 25, 50, 100%) το ποσοστό θανάτωσης % των οργανισμών Artemia salina λόγω της τοξικότητας του εξεταζόμενου διαλύματος. Αν έχετε θνησιμότητα στο 0% (σε ποσοστό <10%, που οφείλεται σε άλλα αίτια, αφαιρέστε την από όλα τα δεδομένα σας, έτσι ώστε να έχετε την θνησιμότητα που οφείλεται μόνο στην τοξική ουσία).

Εργαστείτε ως εξής:

- Υπολογίστε αρχικά τον μέσο όρο των νεκρών οργανισμών Artemia salina στις κυψελίδες αναφοράς ($MO_{\text{αναφοράς}}$). (Οι κυψελίδες αναφοράς είναι η πρώτη γραμμή με σκέτο καθαρό θαλασσινό νερό).
 - Υπολογίστε τον μέσο όρο των νεκρών οργανισμών Artemia salina στις κυψελίδες για κάθε διάλυμα ξεχωριστά και αφαιρέστε την τιμή $MO_{\text{αναφοράς}}$.
- 2) Υπολογίστε το δείκτη LC_{50} (Lethal Concentration 50%) χρησιμοποιώντας τα δεδομένα % θνησιμότητα (άξονας y) ως προς συγκέντρωση (άξονας x). Για το διάγραμμα να γίνει μετασχηματισμός των δεδομένων: ο άξονας y σε μονάδες probit και ο άξονας x σε logC. Το LC_{50} μπορεί να γενικευτεί για όλους τους μικροοργανισμούς;
 - 3) Προσδιορίστε περίπου ή εκτιμήστε την τιμή κατώφλι από το διάγραμμα % θνησιμότητα ως προς logC (λογάριθμος συγκέντρωσης).

- 4) Οι τρεις επαναλήψεις σε κάθε συγκέντρωση γιατί πιστεύετε ότι γίνονται? Εάν δοκιμάζαμε ως διάλυμα καθαρό νερό βρύσης πιστεύετε ότι τα Artemia Salina θα επιβίωναν στο τεστ οξείας τοξικότητας 24 ωρών? Γιατί?
- 5) Τα νεογνά Artemia Salina είναι μια πρωταρχική πηγή πρωτεΐνης για πολλούς υδρόβιους οργανισμούς. Εάν κάνετε τεστ τοξικότητας για να ελέγξετε τα νερά σε μια περιοχή και βρείτε υψηλή (>90%) θνησιμότητα για τα Artemia, τι συμπεράσματα μπορείτε να βγάλετε για το οικοσύστημα της περιοχής; (πχ. αντίκτυπος στην τροφική αλυσίδα)
- 6) Με το τεστ οξείας τοξικότητας με Artemia μπορούμε να αποδώσουμε την τοξικότητα του αγνώστου διαλύματος σε συγκεκριμένη ουσία? Αν όχι, πώς θα μπορούσαμε να ταχτοποιήσουμε πιθανές τοξικές ουσίες πχ βαρέα μέταλλα;