

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Διπλωματική Εργασία

«Μελέτη Τοξικότητας Υγρών Αποβλήτων»

Γεωργιάδης Ιωάννης
Α.Μ. : 2000.05.0011

ΧΑΝΙΑ 2007

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία που ακολουθεί ασχολήθηκε με την μελέτη της οξείας τοξικότητας διάφορων δειγμάτων υγρών αποβλήτων με βιοδοκιμές τοξικότητας.

Τα δείγματα ήταν αστικά λύματα, από διάφορα στάδια της προεπεξεργασίας και επεξεργασίας τους στον βιολογικό καθαρισμό, παραπροϊόντα της χλωρίωσης του νερού (THM και DBPs) και βιομηχανικά απόβλητα, από βαφείο, από εργοστάσιο χυμών πορτοκαλιού, ελαιουργείου και κατσίγαρος.

Στις βιοδοκιμές τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν ο οργανισμός *Daphnia Magna*, που είναι είδος ζωοπλανκτού και ζει σε γλυκά νερά και το φωτοβακτήριο *Vibrio Fischeri*. Και τα δύο είδη χρησιμοποιούνται σε προτυποποιημένες βιοδοκιμές τοξικότητας δίδοντας ικανοποιητικά και συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν πως τα αστικά λύματα μετά την δευτεροβάθμια επεξεργασία δεν έχουν καμία τοξικότητα και ότι τα παραπροϊόντα της χλωρίωσης, στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, παρουσίασαν πολύ μικρή τοξικότητα. Όσον αφορά τα βιομηχανικά υγρά απόβλητα βρέθηκε ότι το πιο ακραία τοξικό δείγμα ήταν της βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού. Ακολουθούν ο κατσίγαρος και τα απόβλητα ελαιουργείου, που επίσης παρουσίασαν ακραία τοξικότητα και τέλος τα απόβλητα βαφείου που δεν εμφάνισαν μεγάλη τοξικότητα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα στην διπλωματική μου εργασία, καθηγητή κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και τις συμβουλές.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος, Κουκουράκη Ελισάβετ και την Αντωνίου Χρύσα, για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές και την υποστήριξη τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για την υπομονή τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Καρατζά Γεώργιο και τον επίκουρο καθηγητή κ. Καραφύλλη Ιάσων για την επικουρική τους συμμετοχή στην εξεταστική επιτροπή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	3
Ευχαριστίες.....	5
Περιεχόμενα.....	7
1.Εισαγωγή.....	10
2.Θεωρητικό Μέρος.....	12
2.1.Τοξικολογία.....	12
2.1.1.Οικοτοξικολογία και Υδατική Τοξικολογία.....	12
2.2.Τοξικότητα και Τοξικές Ουσίες.....	12
2.3.Κατηγορίες Τοξικών Ουσιών.....	15
2.3.1.Βιομηχανικές Χημικές Ουσίες.....	15
2.3.2.Υπολείματα στην Χημεία Χλωρίου.....	16
2.3.3.Άλλες Κατηγορίες Τοξικών Ουσιών.....	17
2.4.Πηγές Τοξικών Ουσιών.....	18
2.5.Τρόποι Έκφρασης της Τοξικότητας.....	19
2.6.Ασθένειες που Οφείλονται σε Τοξικές Ουσίες.....	21
2.7.Προσδιορισμός Τοξικότητας.....	22
2.7.1.Μέθοδοι Προσδιορισμού Τοξικότητας.....	23
2.7.2.Τεστ Τοξικότητας.....	23
2.8.Βιοδοκιμές.....	25
2.8.1.Βιοδοκιμές με <i>Daphnia Magna</i>	26
2.8.2. Βιοδοκιμές Με Βάση Την Αναστολή Της Βιοφωταύγειας Βακτηρίων.....	28
2.8.3.Δοκιμές Toxkits.....	30
2.8.4.Πειράματα Μεταλλάξεων με Βακτήρια.....	31
2.8.5.Τα Μειονεκτήματα Των Βιοδοκιμών.....	31
2.9.Βιβλιογραφική Αναδρομή.....	32
2.10.Νομοθετικό Πλαίσιο για τις Οικοτοξικολογικές Αναλύσεις.....	33
3.Πειραματικό Μέρος.....	34
3.1.Δείγματα.....	34
3.1.1.Αστικά Λύματα.....	34
3.1.2.Βιομηχανικά Υγρά Απόβλητα.....	34
3.1.3.Παραπροϊόντα Χλωρίωσης.....	35
3.2.Πειραματική Διαδικασία.....	36
3.2.1.Αναλυτικές Μέθοδοι.....	36

3.2.1.1.pH.....	36
3.2.1.2.Ολικά Αιωρούμενα Στερεά (TSS).....	37
3.2.1.3. Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD).....	37
3.2.1.4.Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD).....	38
3.2.2.Βιοδοκιμές.....	39
3.2.2.1.Daphnia Magna.....	39
3.2.2.2.Microtox Test.....	44
4.Αποτελέσματα.....	49
4.1.Χαρακτηρισμός Δειγμάτων.....	49
4.2.Αποτελέσματα Βιοδοκιμών.....	50
4.2.1.Daphnia Magna.....	50
4.2.2.Microtox Test.....	55
5.Συμπεράσματα και Προτάσεις.....	59
5.1.Συμπεράσματα.....	59
5.2.Προτάσεις.....	60
6.Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	61
Παραρτήματα.....	63
Παράρτημα I : Αναλυτικά Αποτελέσματα Microtox Test.....	64
Παράρτημα II : Καμπύλες Βαθμονόμησης.....	80

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη Ελλάδα, όπως και στις περισσότερες περιοχές του πλανήτη, οι συνηθισμένες εργαστηριακές αναλύσεις που γίνονται στα υγρά απόβλητα, περιλαμβάνουν φυσικές αναλύσεις, για να προσδιοριστούν οι φυσικές ιδιότητες του δείγματος (χρώμα, θολότητα, ολικά στερεά κ.α.), χημικές αναλύσεις, με τις οποίες προσδιορίζονται οι χημικές ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα και σε ποιες συγκεντρώσεις και μικροβιολογικές αναλύσεις, με τις οποίες προσδιορίζονται οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο δείγμα και σε ποιες συγκεντρώσεις .

Αυτές οι αναλύσεις, πολλές φορές, δεν είναι αρκετές, καθώς ενδέχεται να υπάρχουν σε κάποια υγρά απόβλητα τοξικές ουσίες, σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις, οι οποίες δύναται να μην ανιχνευθούν. Οι χημικές αναλύσεις δεν αρκούν για να ανακαλυφθούν όλες τις τοξικές ουσίες που περιλαμβάνονται στο δείγμα, καθώς κάθε χημική ανάλυση για κάθε χημική ουσία είναι ξεχωριστή και συνήθως ανιχνεύονται τα μέταλλα (μαγνήσιο, κάδμιο κ.α.), τα ιόντα (νιτρικά, φωσφορικά κ.α.) και οι οργανικές ουσίες (φαινόλες κ.α.).

Γίνεται κατανοητή λοιπόν η αναγκαιότητα να πραγματοποιούνται, συμπληρωματικά στις χημικές αναλύσεις, οικοτοξικολογικές αναλύσεις, οι οποίες στην βιβλιογραφία αναφέρονται και σαν βιοδοκιμές, για να προσδιορίζεται το κατά πόσο είναι τοξικό το δείγμα των υγρών αποβλήτων που αναλύεται, χρησιμοποιώντας κάποιους ευαίσθητους οργανισμούς ως δείκτες τοξικότητας.

Κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν οικοτοξικολογικές αναλύσεις, για την μελέτη της τοξικότητας διάφορων δειγμάτων, που περιλάμβαναν αστικά λύματα, από διάφορα στάδια της προεπεξεργασίας και επεξεργασίας τους στον βιολογικό καθαρισμό, παραπροϊόντα της χλωρίωσης του νερού (THM και DBPS) και βιομηχανικά απόβλητα, από βαφείο, από εργοστάσιο χυμών πορτοκαλιού και ελαιουργείου .

Οι βιοδοκιμές έγιναν με την χρήση του οργανισμού *Daphnia Magna*, που ζει σε γλυκά νερά, και με το *Microtox Test*, που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Vibrio Fischeri*, το οποίο απαντάται να ζει κυρίως σε θαλάσσιο περιβάλλον. Οι συγκεκριμένες οικοτοξικολογικές αναλύσεις είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες, εδώ και αρκετά χρόνια σε παγκόσμιο επίπεδο.

Το κεφάλαιο 2, που ακολουθεί, αποτελεί το θεωρητικό μέρος της εργασίας, στο οποίο αναφέρονται γενικά για την τοξικολογία, την τοξικότητα και τις τοξικές ουσίες, καθώς και πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο προσδιορίζεται η τοξικότητα, μέσω των τεστ τοξικότητας και των βιοδοκιμών που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Στο τρίτο κεφάλαιο, το οποίο αποτελεί το πειραματικό μέρος, περιγράφονται τα δείγματα που αναλύθηκαν, οι αρχές των πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι διαδικασίες των πειραματικών μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της εργασίας.

Τέλος, στα κεφάλαια 4 και 5 γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων και διατύπωση συμπερασμάτων και προτάσεων.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η τοξικολογία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς και χρήσιμους κλάδους της επιστήμης για την καθημερινή μας ζωή. Μελετά τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει μια χημική ουσία σε έναν άνθρωπο, καθώς και σε ένα οικοσύστημα και καθορίζει τα επιτρεπτά όρια. Εξασφαλίζεται έτσι, η αποφυγή σημαντικών προβλημάτων στην ανθρώπινη υγεία και στην λειτουργία των οικοσυστημάτων. Οι όροι και ο τρόπος που λειτουργεί ο κλάδος της τοξικολογίας παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

2.1. Τοξικολογία

Η τοξικολογία (toxicology) είναι η μελέτη των συμπτωμάτων που επιφέρει σε έναν οργανισμό μια χημική ουσία. Σαν πρακτική μπορούμε να ισχυριστούμε ότι υπάρχει από την αρχαιότητα, καθώς ακόμα και από εκείνη την εποχή ήταν γνωστές πολλές ουσίες που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν τοξικές. Σαν επιστημονικός κλάδος περιλαμβάνει πολλά στοιχεία από άλλα επιστημονικά πεδία, όπως η χημεία, η βιολογία, η οικολογία, η ιατρική κ.α.. Επίσης μπορούμε να πούμε ότι διασπάται σε πολλούς επιμέρους κλάδους. Από αυτούς μας ενδιαφέρει να επικεντρωθούμε στην οικοτοξικολογία και στην υδατική τοξικολογία.

2.1.1. Οικοτοξικολογία και Υδατική Τοξικολογία

Η οικοτοξικολογία (ecotoxicology) είναι ο επιστημονικός κλάδος που εξετάζει τις τοξικές επιδράσεις που μπορεί να έχει ένας ρύπος στους οργανισμούς ενός οικοσυστήματος, αλλά και το πώς μεταφέρονται και αλληλεπιδρούν μέσα στο περιβάλλον. Η οικοτοξικολογία ως ανεξάρτητη επιστήμη αναπτύχθηκε κατά τις τελευταίες δεκαετίες του εικοστού αιώνα και η διαφορά της από την κλασική τοξικολογία φανερώνεται από το πρόθεμα οικο- που είναι σύντμηση της λέξης οικοσύστημα.

Η υδατική τοξικολογία (aquatic toxicology) είναι ένα πιο εξειδικευμένο κομμάτι της οικοτοξικολογίας και ασχολείται με την τοξικότητα ουσιών που βρίσκονται διαλυμένες ή αιωρούμενες στα νερά (υγρά απόβλητα, υδάτινα οικοσυστήματα κ.τ.λ.).

Η εξέλιξη αυτών των κλάδων της τοξικολογίας προέκυψε από την ανάγκη της κοινωνίας να προστατευτεί και να προλάβει προβλήματα και επιπτώσεις που θα μπορούσαν να έχουν στην υγεία των ανθρώπων και άλλων έμβιων όντων, χημικές ουσίες, οι οποίες μέχρι τότε διοχετεύονταν χωρίς μέτρο στην ατμόσφαιρα και σε υδάτινους αποδέκτες (π.χ. παρασιτοκτόνα).

2.2. Τοξικότητα και Τοξικές Ουσίες

Η τοξικότητα (toxicity) είναι μια ιδιότητα ή ένα σύνολο ιδιοτήτων μιας ουσίας (ή ενός υλικού), η οποία προκαλεί βλαβερή επίδραση σε έναν οργανισμό ή σε ένα βιολογικό σύστημα. Τοξικές, σύμφωνα με την Οδηγία του Συμβουλίου της 12^{ης} Δεκεμβρίου 1991 για τα επικίνδυνα απόβλητα (96/689/ΕΟΚ), χαρακτηρίζονται οι ουσίες των οποίων η εισπνοή, κατάποση ή εισχώρηση στο δέρμα είναι δυνατόν να συνεπάγεται σοβαρούς κινδύνους, παροδικού ή χρόνιου χαρακτήρα, ή ακόμη και το θάνατο (συμπεριλαμβανομένων των πολύ τοξικών ουσιών). Στα πλαίσια της ίδιας Οδηγίας ορίζονται ως οικοτοξικές οι «ουσίες που παρουσιάζουν ή είναι δυνατόν να παρουσιάσουν άμεσο ή μελλοντικό κίνδυνο για έναν ή περισσότερους τομείς του περιβάλλοντος. Επίσης να αναφέρουμε και ότι μια ουσία, η οποία εισάγεται σε ένα οικοσύστημα ή οργανισμό και έχει τοξικές επιδράσεις ονομάζεται και **ξеноβιοτική** (xenobiotic).

Η τοξικότητα μιας ουσίας δεν μπορεί να θεωρηθεί μετρήσιμη χημική παράμετρος, καθώς κρίνεται πάντα από την αρνητική επίδραση που έχει σε μια βιολογική λειτουργία ενός οργανισμού ή ενός οικοσυστήματος (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 : Αρνητικές επιδράσεις τοξικών ουσιών

Βιολογική Λειτουργία	Αρνητική Επίδραση
DNA	-Μετάλλαξη
Κύτταρο	-Θάνατος του κυττάρου -Διαταραχές στην αναπαραγωγή -Νεοπλαστικές μεταμορφώσεις
Ιστοί / Όργανα	-Λειτουργικές ατέλειες -Δυσμορφίες -Καρκίνος
Οργανισμός	-Μείωση χρόνου ζωής -Μείωση αναπαραγωγικής ικανότητας
Πληθυσμός	-Ελαχιστοποίηση του μεγέθους του πληθυσμού -Εξαφάνιση
Οικοσύστημα	-Μείωση της βιοποικιλιοτητας

Σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί, μπορούμε να ισχυριστούμε πως είναι παραπλανητικό να θεωρούμε ότι κάποιες ουσίες είναι τοξικές και κάποιες άλλες όχι. Δεν θα ήταν υπερβολή να πούμε πως όλες οι ουσίες μπορούν να θεωρηθούν τοξικές, καθώς ακόμα και η πιο ακίνδυνη και αθώα ουσία, εάν ληφθεί από έναν οργανισμό σε πολύ μεγάλες ποσότητες και για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να αποβεί βλαβερή. Επίσης κάποιες ουσίες δεν είναι βλαβερές από μόνες τους αλλά γίνονται όταν βρεθούν μέσα στο σώμα ενός οργανισμού και μεταβολιστούν, αλλάζουν δηλαδή την χημική τους σύσταση. Ο πρώτος που παρατήρησε και έθεσε αυτό το ζήτημα, ήταν ο Ελβετός γιατρός και φιλόσοφος Παράκελσος (1493 – 1541), του οποίου έχει μείνει μνημειώδης, για τον κλάδο της τοξικολογίας, η φράση : « Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια . Η σωστή δόση ξεχωρίζει το φάρμακο από το δηλητήριο.». Το νόημα της συγκεκριμένης δήλωσης γίνεται πολύ εύκολα κατανοητό. Στην καθημερινή ζωή όμως, έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζεται μια ουσία τοξική, όταν είναι άμεσα και σε πολύ μικρές ποσότητες βλαβερή, ακόμα και θανατηφόρα (π.χ. διοξίνες, υδράργυρος, κυανιούχο κάλιο). Έτσι, όταν αναφερόμαστε σε τοξικές ουσίες, μιλάμε πάντα για δόση ή για συγκέντρωση τοξικής ουσίας.

Επίσης όταν εξετάζουμε την τοξικότητα μια ουσίας, λαμβάνουμε υπόψη και τον τρόπο με τον οποίο ήρθε σε επαφή ο οργανισμός με την ουσία (π.χ. μέσω αναπνοής, εισχώρηση από το δέρμα, κατάποση), αν είναι στιγμιαία ή χρόνια η επαφή, την χρονική διάρκεια της έκθεσης στην ουσία, τον τύπο και την σοβαρότητα της βλάβης που προκάλεσε, καθώς και κάποιες άλλες παραμέτρους.

2.3. Κατηγορίες Τοξικών Ουσιών

Υπάρχουν πάρα πολλές κατηγορίες τοξικών ουσιών. Η κυριότερη κατηγορία είναι οι βιομηχανικές χημικές ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ανομοιογένεια, παράγονται σε τεράστιες ποσότητες και μεταφέρονται και χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Επίσης πολύ σημαντική κατηγορία αποτελούν οι ουσίες οι οποίες προκύπτουν σαν υπολείμματα από την χημεία του χλωρίου.

2.3.1. Βιομηχανικές Χημικές Ουσίες

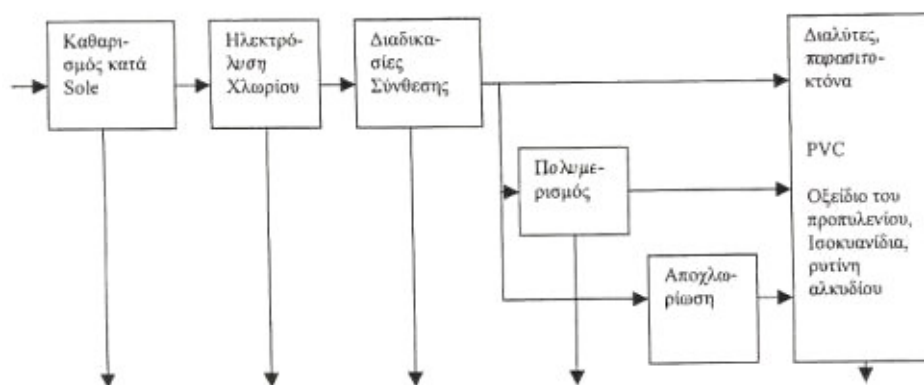
Τα υγρά βιομηχανικά απόβλητα μεταφέρουν κατά κανόνα πολύ μεγάλο ρυπαντικό φορτίο, το οποίο παρουσιάζει ατελείωτη ποικιλία, τόσο από κλάδο σε κλάδο βιομηχανίας, όσο και μεταξύ παρόμοιων ακόμη βιομηχανιών, ανάλογα με τις πρώτες ύλες. Μέσα σε αυτό το ρυπαντικό φορτίο περιλαμβάνονται πολλές χημικές ουσίες, οργανικές είτε ανόργανες, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη τοξικότητα. Όταν η διάθεση των υγρών αποβλήτων των βιομηχανιών γίνεται χωρίς να υποστούν κάποια ειδική προεπεξεργασία και χωρίς να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα ασφαλείας, πολλές από τις τοξικές ουσίες που περιέχονται στα σε αυτά καταλήγουν σε οικοσυστήματα και προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην υδρόβια ζωή, μάλιστα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και συνήθως δεν είναι δυνατόν να απομακρυνθούν με τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας των αστικών λυμάτων. Επίσης πολλές σύνθετες οργανικές ενώσεις που παράγονται από την χημική βιομηχανία για την παραγωγική διαδικασία άλλων κλάδων της βιομηχανίας, έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξικές (π.χ. το ακρυλονιτρίλιο, που χρησιμοποιείται στην παραγωγή συνθετικών ινών). Μερικές από τις τοξικές ουσίες που παράγονται από βιομηχανίες και καταλήγουν στο περιβάλλον φαίνονται στον πίνακα 1.2 :

Πίνακας 1.2 : Τοξικές ουσίες που παράγονται από βιομηχανίες (Πηγή: Γιδαράκος 2004)

Βιομηχανικός τομέας	As	Cd	CKW	Cr	Cu	CN	Pb	Hg	Se	Zn
Μεταλλεία/ Επεξεργασία μετάλλων	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Παραγωγή χρωμάτων		X		X	X	X	X	X	X	
Παραγωγή Παρασιτοκτόνων	X		X			X	X	X		X
Ηλεκτρονικά όργανα			X		X	X	X	X	X	
Μονάδες καθαρισμού	X			X	X			X		X
Επεξεργασία επιφανειών				X	X	X				X
Χημική βιομηχανία			X	X	X			X		
Παραγωγή εκρηκτικών	X					X		X	X	
Παραγωγή ελαστικών και πλαστικών			X		X			X		X
Παραγωγή συσσωρευτών		X					X	X		
Παραγωγή φαρμάκων	X							X		
Υφάσματα			X	X						
Επεξεργασία πετρελαίου και άνθρακα	X		X							
Παραγωγή χαρτιού								X		
Εταιρίες δέρματος				X						

2.3.2. Υπολείμματα Στην Χημεία Χλωρίου

Άλλη μια σημαντική κατηγορία τοξικών ουσιών, είναι οι ουσίες που μένουν σαν υπολείμματα στην χημεία του χλωρίου. Τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν από την διαχείριση των υπολειμμάτων κατά την παρασκευή ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων που περιέχουν χλώριο επεξεργάζονται δύσκολα, εξαιτίας της πολυπλοκότητας τους (Σχήμα 1.3).



Ιλύς Καθίζησης Σουλφίδιο του Βαρίου περιέχων Υδράργυρο Χλωρικά άλατα	Ιλύς Ανόδου Αμάλγαμα Διάφραγμα Αμιάντου Ξηρό Υδροχλωρικό Οξύ	CHC-χαμηλού σημείου βρασμού CHC-υψηλού σημείου βρασμού Καταλύτες Απόβλητο Υδροχλωρικό Οξύ	Ιλύς PVC Σκόνη PVC	Απόβλητο Υδροχλωρικό Οξύ Χλωρικά άλατα	Απορρίμματα τελικών προϊόντων (π.χ. PVC, PUR, διαλύτες)
--	---	--	---------------------------	---	---

Σχήμα 1.3 : Υπολείμματα στην χημεία του χλωρίου (Πηγή : Γιδαράκος 2004)

Μάλιστα αυτή η κατηγορία μπορεί να επηρεάσει και την υγεία του ανθρώπου καθώς περιλαμβάνει και χημικές ουσίες που αποτελούν παραπροϊόντα της χλωρίωσης του πόσιμου νερού, που γίνεται για την εξόντωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Από τα παραπροϊόντα της χλωρίωσης του πόσιμου νερού, αυτά που συναντώνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα, είναι τα τριαλογονομεθάνια ή αλογονωμένα παράγωγα του μεθανίου (trihalomethanes – THM's).

2.3.3. Άλλες Κατηγορίες Τοξικών ουσιών

Υπόλοιπες κατηγορίες τοξικών ουσιών, που δημιουργούν εκτεταμένα και σοβαρά προβλήματα, τόσο σε οργανισμούς όσο και σε οικοσυστήματα, αναφέρονται παρακάτω :

- **Παρασιτοκτόνα και φυτοφάρμακα :** η τοξική τους δράση έχει να κάνει κυρίως με το γεγονός ότι μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες

παρενέργειες σε έναν οργανισμό τον οποίον δεν έχουν σχεδιαστεί να επηρεάζουν.

- **Το αργό πετρέλαιο και τα παράγωγά του :** πολύ σημαντική αιτία πρόκλησης περιβαλλοντικής τοξικότητας, καθώς παραμένουν στο περιβάλλον για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα και η χρήση τους είναι πάρα πολύ μεγάλη σε παγκόσμιο επίπεδο.
- **Μέταλλα και μεταλλοειδή :** τα μέταλλα προκύπτουν στο περιβάλλον μέσα από τις μεταλλευτικές εργασίες, την κατασκευαστική βιομηχανία αλλά και την χρήση τους ως πρόσθετα καυσίμων και λιπαντικών. Επικίνδυνα μέταλλα και μεταλλοειδή, ως προς την τοξική τους δράση, θεωρούνται βασικά ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το κάδμιο, το αρσενικό, μορφές του χρωμίου, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος κ.α..

Υπάρχουν βέβαια και ισχυρότατες τοξικές ουσίες που δεν παράγονται από ανθρώπινες δραστηριότητες, αλλά από βιολογικά συστήματα, όπως δηλητήρια, ενδοτοξίνες που παράγονται από βακτήρια κ.α.. Όμως, η ποσότητα των ενώσεων που παράγονται από φυσικές πηγές είναι αμελητέα σε σύγκριση με την ποσότητα των ουσιών που παράγονται από ανθρώπινες δραστηριότητες. Επίσης ορισμένες από τις ουσίες που περιγράφηκαν παραπάνω μπορούν να βρεθούν και σε οικοσυστήματα που δεν είναι ρυπασμένα, για παράδειγμα άλατα χαλκού και ψευδαργύρου τα οποία αποτελούν θρεπτικά συστατικά. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι η παρουσία και μόνο μιας ουσίας σε συνδυασμό και με χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να μην προκαλεί πρόβλημα, όμως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της δόσης της σε ένα οργανισμό και οι βιολογικές δράσεις θα κρίνουν τελικά, αν η ουσία αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον.

2.4. Πηγές Τοξικών Ουσιών

Οι πηγές από τις οποίες εισάγονται στο περιβάλλον οι τοξικές ουσίες είναι κυρίως δύο ειδών :

- **Σημειακές εκφορτίσεις**, οι οποίες προκύπτουν από εκροές αγωγών αποβλήτων, ρεύματα αποβλήτων βιομηχανικών εγκαταστάσεων, χώρους απόθεσης επικίνδυνων στερεών αποβλήτων, πετρελαιοκηλίδες από ατυχήματα κ.α.. Τέτοιου τύπου εκροές μπορούν εύκολα να χαρακτηριστούν σε σχέση με το είδος των ουσιών που διαρρέουν, το ρυθμό της εκροής και την ποσότητα των ουσιών που διέφυγαν.
- **Μη σημειακές εκφορτίσεις**, οι οποίες αφορούν εκείνες τις ουσίες που εισάγονται σε ένα οικοσύστημα μέσω αποστράγγισης και εκροών καλλιεργημένων αγροτικών εκτάσεων, μολυσμένων εδαφών και ιζημάτων, την ατμοσφαιρική απόθεση και τα αστικά εκπλύματα από χώρους στάθμευσης και κατοικημένες περιοχές.

Οι μη σημειακές πηγές είναι πιο δύσκολες στο να χαρακτηριστούν καθώς οι εκροές τους είναι πολύπλοκα μίγματα, οι ποσότητες των τοξικών είναι δύσκολο να προσδιοριστούν, οι ταχύτητες και ο χρόνος των εκπομπών είναι δύσκολο να υπολογιστούν. Μια από τις πιο δύσκολες πλευρές των μη σημειακών εκφορτίσεων είναι ότι τα συστατικά τους μπορούν να μεταβάλουν συνέχεια τα τοξικολογικά χαρακτηριστικά τους.

2.5. Τρόποι Έκφρασης της Τοξικότητας

Για τον προσδιορισμό του κατά πόσο και σε ποιον βαθμό μια ουσία είναι τοξική, συνήθως χρησιμοποιείται ως κριτήριο η θνησιμότητα ή κάποια αρνητική επίδραση που προκαλεί η ουσία σε έναν οργανισμό δείκτη. Αναφέραμε επίσης ότι στην τοξικολογία μιλάμε πάντα για δόση ή για συγκέντρωση τοξικής ουσίας. Έτσι στην τοξικολογία οι κυριότεροι τρόποι έκφρασης της τοξικότητας που έχουν επικρατήσει είναι οι παρακάτω :

- **LD₅₀ (Lethal Dose)** : Η δόση που προκαλεί το θάνατο στο 50% των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

- **LC₅₀ (Lethal Concentration)** : Η συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο στο 50% των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.
- **EC₅₀ (Effective Concentration)** : Η συγκέντρωση που έχει κάποια επίδραση στο 50% των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Η έκφραση αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για επιδράσεις που δεν είναι θανατηφόρες.
- **IC₅₀ (Inhibitory Concentration)** : Η συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή μιας φυσικής απόκρισης στο 50% των οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Όσο μικρότερη είναι η τιμή των παραπάνω όρων, τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η τοξικότητα της ουσίας (πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4 : Σχέση μεταξύ LD₅₀, LC₅₀ και κατάταξης της τοξικότητας (P.R.Parish, 1989)

LD ₅₀ (mg/kg)	LC ₅₀ (mg/l)	Κατάταξη
>5000	>100	σχετικά μη τοξικό
500-5000	10-100	ήπια τοξικό
50-500	1-10	πολύ τοξικό
<50	<1	Ακραία τοξικό

Άλλοι τρόποι έκφρασης της τοξικότητας είναι οι : **TLV (Threshold Limit Value)** που εκφράζει το χαρακτηριστικό όριο έκθεσης του οργανισμού στην τοξική ουσία, **NOEC (No Observed Effects Concentration)** που εκφράζει την μηδενική επίδραση μιας συγκέντρωσης της ουσίας στους οργανισμούς του πειράματος κ.α.

2.6. Ασθένειες που Οφείλονται σε Τοξικές Ουσίες

Τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιασθεί , σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, καινούργιες ασθένειες οι οποίες οφείλονται στην έκθεση σε τοξικές ουσίες. Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα εξής :

- Η αρρώστια itai – itai, η οποία οφείλεται στη βιοσυσσωρευση του καδμίου στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρατηρήθηκε στην Ιαπωνία σε μια περιοχή όπου η θάλασσα ήταν μολυσμένη με κάδμιο. Κυρίως μέσω της τροφής (ψάρια, φύκη, μαλάκια) το κάδμιο συσσωρεύτηκε στον ανθρώπινο οργανισμό. Συμπτώματα της αρρώστιας είναι οι ισχυροί πόνοι στα κόκαλα, καθώς η τοξικότητα του καδμίου σε σημαντικό βαθμό οφείλεται στο γεγονός ότι το κάδμιο χημικά προσομοιάζει το ασβέστιο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο οργανισμός να προσλαμβάνει κάδμιο και αυτό να υποκαθιστά το ασβέστιο.
- Η αρρώστια της Minamata, η οποία επίσης παρατηρήθηκε στην Ιαπωνία, την δεκαετία του 1950. Είναι αντίστοιχη με την itai – itai και οφείλεται στην βιοσυσσωρευση του υδραργύρου, ο οποίος σαν ουσία προσβάλλει κυρίως το νευρικό σύστημα. Πήρε το όνομά της από την περιοχή της Minamata όπου παρουσιάστηκε για πρώτη φορά.

2.7. Προσδιορισμός Τοξικότητας

Πειράματα για τον προσδιορισμό της τοξικότητας χημικών ουσιών, γίνονται συστηματικά από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Είναι γνωστά σε όλους τα πειράματα, που διεξάγονται στα εργαστήρια και χρησιμοποιούν σαν πειραματόζωα ποντίκια και άλλα μικρά ζώα, έτσι ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για το κατά πόσο μια ουσία είναι τοξική και τι προβλήματα μπορεί να δημιουργήσει σε έναν οργανισμό. Τα πειράματα αυτά είναι απαραίτητα, καθώς οι απλές χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές αναλύσεις, που γίνονται συνήθως, δεν αρκούν για να εξακριβωθεί επακριβώς η επικινδυνότητα ενός δείγματος, που έρχεται στο εργαστήριο.

Η προσέγγιση του θέματος της ρύπανσης των υδάτων μέσω συγκεντρώσεων συγκεκριμένων τιμών χημικών ουσιών, δεν μπορεί να προστατεύσει αποτελεσματικά όλα τα επιφανειακά νερά, καθώς πολλές τοξικές ουσίες δεν μπορούν να μετρηθούν με τις υφιστάμενες αναλυτικές τεχνικές. Πρόσθετα, δεν υπάρχουν στοιχεία για την τοξικότητα χιλιάδων χημικών ενώσεων, οι οποίες διοχετεύονται στους αποδέκτες καθημερινά. Τέλος, τα αποτελέσματα των επιδράσεων μεμονωμένων ουσιών δεν λαμβάνουν υπόψη τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ρύπων, οι οποίες μπορεί να

λαμβάνουν χώρα σε ένα πολύπλοκο μίγμα ρυπαντών, όπως στα βιομηχανικά και τα αστικά υγρά απόβλητα. Έτσι, κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1980 η αμερικάνικη EPA εισηγήθηκε την αναγκαιότητα των βιολογικών εργαστηριακών δοκιμών (Wall & Hammer, 1987).

Ο εργαστηριακός προσδιορισμός της τοξικότητας, έχει εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό και πλέον υπάρχουν χιλιάδες τύποι πειραμάτων, με τους οποίους μπορούμε να ανιχνεύσουμε και να μελετήσουμε την επίδραση πολύ μεγάλου αριθμού τοξικών ουσιών. Επίσης, στα πλαίσια της οικοτοξικολογίας και της υδατικής τοξικολογίας, έχουν εξελιχθεί πειράματα, όπου έμβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την μέτρηση της τοξικότητας χημικών ουσιών ή μιγμάτων στα οικοσυστήματα. Τα πειράματα αυτά λέγονται βιοδοκιμές (bioassays) .

2.7.1. Μέθοδοι Προσδιορισμού της Τοξικότητας

Ο προσδιορισμός της τοξικότητας μιας ουσίας μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους : α) με απευθείας μέτρηση της τοξικότητας με πειράματα, που λαμβάνουν χώρα σε εργαστήρια και καλούνται τεστ ή δοκιμές τοξικότητας (toxicity tests, toxicity assays) και β) με οικολογική παρακολούθηση, δηλαδή με μελέτη και εκτίμηση των επιδράσεων στα οικοσυστήματα, με μετρήσεις πεδίου (field studies). Η αναφορά μας θα επικεντρωθεί στο πρώτο τρόπο μέτρησης. Κατά την διάρκεια της εργασίας δεν πραγματοποιηθήκαν μετρήσεις οικολογικής παρακολούθησης στο πεδίο, καθώς δεν υπήρχε η δυνατότητα.

2.7.2. Τεστ Τοξικότητας

Τα τεστ τοξικότητας είναι εργαστηριακές διαδικασίες, που διεξάγονται με την χρήση ζωντανών οργανισμών, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με μεμονωμένες χημικές ουσίες, είτε μίγματα χημικών ουσιών, είτε απόβλητα ή τμήματα οικοσυστημάτων (π.χ. ιζήματα) που μπορούν από μόνα τους να θεωρηθούν αυτόνομα οικοσυστήματα.

Ο αριθμός των τεστ τοξικότητας είναι πολύ μεγάλος. Η ποικιλία των ειδών, που χρησιμοποιούνται, είναι πολύ μεγάλη και καταλαμβάνει όλα τα επίπεδα

οργάνωσης της φύσης, από μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι θηλαστικά, ενώ δεν αποκλείονται και οι φυτικοί οργανισμοί.

Πέρα από το είδος του οργανισμού τα τεστ τοξικότητας μπορούν να διακριθούν ανάλογα και με τα παρακάτω :

- Την διάρκεια του τεστ και αν αυτό μετρά χρόνια (chronic) ή οξεία / άμεση (acute) τοξικότητα. Αυτός ο χρονικός προσδιορισμός είναι συνάρτηση του χρόνου ζωής του οργανισμού που χρησιμοποιείται στο τεστ.
- Τον αριθμό των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών. Υπάρχουν τεστ τοξικότητας ενός οργανισμού (single species) ή πολλών οργανισμών (multispecies).
- Την πολυπλοκότητα (επίπεδο στην τροφική αλυσίδα και αριθμός) της βιολογικής κοινότητας.
- Την αρνητική επίδραση που έχει η τοξική ουσία στον οργανισμό, που χρησιμοποιείται στο τεστ. Δηλαδή αν η τοξική ουσία προκαλεί θάνατο ή αναστολή κάποιας φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού (π.χ. ανάπτυξη, αναπνοή, αναπαραγωγή).

Όπως αναφέραμε παραπάνω, υπάρχει μεγάλη ποικιλία οργανισμών που χρησιμοποιούνται στα τεστ τοξικότητας. Αυτό δεν σημαίνει όμως, ότι δεν υπάρχουν κριτήρια για το ποιοι οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα τεστ. Για την ακρίβεια, θα πρέπει να εξασφαλίσουμε τα εξής :

- Ο οργανισμός να είναι ευρέως διαθέσιμος (ή προσβάσιμος) μέσω εργαστηριακών καλλιεργειών, προμηθειών από εκκολαπτήρια ή με συλλογή από τη φύση.

- Ο οργανισμός πρέπει να μπορεί να συντηρηθεί στο εργαστήριο και σε ικανές ποσότητες.
- Η γενετική σύνθεση και το ιστορικό της καλλιέργειας πρέπει να είναι γνωστά.
- Οι ευαισθησίες του οργανισμού σε διάφορες κατηγορίες τοξικών ουσιών πρέπει να είναι γνωστές, σχετικά μάλιστα και με τα τελικά σημεία (endpoints) που πρέπει να μετρηθούν.
- Η ευαισθησία του οργανισμού του τεστ, πρέπει να είναι και σε κάποιο βαθμό αντιπροσωπευτική της τάξης ή της συνομοταξίας του είδους που πρεσβεύει.

2.8. Βιοδοκιμές

Οι βιοδοκιμές (bioassays) είναι τεστ τοξικότητας που γίνονται στα πλαίσια της οικοτοξικολογίας και υδατικής τοξικολογίας, κατά τα οποία χρησιμοποιούνται έμβιοι οργανισμοί ως δείκτες για την μέτρηση τοξικότητας χημικών ουσιών ή μειγμάτων στα οικοσυστήματα.

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες βιοδοκιμών, οι άμεσες και οι χρόνιες. Οι άμεσες μπορούν να διαρκέσουν το μέγιστο 96 ώρες και η θνησιμότητα είναι το μετρήσιμο μέγεθος. Οι χρόνιες είναι μακροπρόθεσμα πειράματα όπου εκτός από την θνησιμότητα, μετρώνται και άλλες μη θανάσιμες επιδράσεις στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών.

Τα κριτήρια επιλογής μιας βιοδοκιμής είναι να μην έχουν πολύ μεγάλη διάρκεια, να έχουν μικρό κόστος, ο οργανισμός που χρησιμοποιείται να είναι όσο το δυνατόν πιο ευαίσθητος, τα πειράματα να μπορούν να επαναλαμβάνονται και να υπάρχει η δυνατότητα να γίνονται πολλά πειράματα, ώστε να ελέγχονται οι πολλές διαφορετικές ουσίες.

Με τις βιοδοκιμές γίνεται έλεγχος, για να διαπιστώσουμε ποιες είναι οι συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών που σκοτώνουν τους έμβιους οργανισμούς ή

προκαλούν βλάβη σε κάποια ζωτική τους λειτουργία (π.χ. ικανότητα αναπαραγωγής) ή προκαλούν κάποια μετάλλαξη. Επίσης στόχος μίας βιοδοκιμής μπορεί να είναι και ο προσδιορισμός της ασφαλούς συγκέντρωσης, η οποία προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση που επιτρέπει την φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών στους αποδέκτες.

Είναι σημαντικό να γίνονται πειράματα με περισσότερους από έναν οργανισμούς, οι οποίοι να είναι αντιπροσωπευτικοί των κρίκων της τροφικής αλυσίδας. Μερικά από τα πιο γνωστά πειράματα που χρησιμοποιούνται στην οικοτοξικολογία και την υδατική τοξικολογία είναι τα εξής :

- Το πείραμα της ακινητοποίησης της *Daphnia Magna*, που είναι καρκινοειδές είδος ζωοπλανκτού, πολυκύτταρος οργανισμός.
- Το πείραμα με την χρήση της *Artemia Salina*, που είναι είδος γαρίδας και ζει σε εκβολές ποταμών και δελταϊκά συστήματα γενικότερα. Στο πείραμα μετρείται η θνησιμότητα.
- Τα πειράματα που μετράνε την αναστολή της ικανότητας που έχουν κάποια βακτήρια να εκπέμπουν βιοφωταύγεια. Το πιο γνωστό είναι το Microtox Test, που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Vibrio Fischeri* και είναι πολύ σύντομο.
- Το πείραμα της ανάπτυξης αλγών. Τα άλγη (ή μικροφύκη) είναι μικροοργανισμοί, έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός οργανισμών ανά πείραμα. Διαρκούν 3 μέρες.
- Τα πειράματα με μύκητες. Διαρκούν λιγότερο από τα πειράματα με άλγη (έως μια μέρα). Τα πειράματα με μύκητες δεν είναι πολύ διαδεδομένα.
- Τα πειράματα με ψάρια, που σαν οργανισμοί είναι πιο κοντά στον άνθρωπο (σπονδυλωτά). Έχουν το μειονέκτημα ότι είναι μικρός ο αριθμός των οργανισμών ανά πείραμα και διαρκούν μεγάλο χρονικό διάστημα.

- Τα πειράματα με καλλιεργημένα κύτταρα ψαριών. Αυτά είναι πιο ευαίσθητα από τα πειράματα με ολόκληρα ψάρια και διαρκούν λιγότερο.

2.8.1. Βιοδοκιμές με *Daphnia Magna*

Το πείραμα ακινητοποίησης της *Daphnia* (24 or 48 hour acute immobilization test), μαζί με το πείραμα οξείας τοξικότητας σε ψάρια, είναι ένα από τα σημαντικότερα στην υδατική τοξικολογία. Οι οργανισμοί *Daphnia Magna* και *Daphnia Pulex* είναι οι πιο κοινοί οργανισμοί δείκτες. Τα άτομα της *Daphnia Magna* είναι τα πιο διαδεδομένα, όσον αφορά την χρήση τους σε πειράματα τοξικότητας, καθώς είναι μεγαλύτερα, είναι εύκολα διαθέσιμα και καλλιεργήσιμα και επιπροσθέτως απαιτούν σχετικά πιο σκληρό νερό για την καλλιέργειά τους σε σύγκριση με τα αντίστοιχα άτομα της *Daphnia Pulex*.

Η *Daphnia Magna* (εικόνα 1.5) είναι καρκινοειδές, είδος ζωοπλανκτού, πολυκύτταρος οργανισμός και απαντάται κυρίως σε γλυκά νερά (λίμνες, ποτάμια). Κατά την γέννησή του έχει μήκος περίπου 0.5 mm και κατά την ενηλικίωσή του αποκτά μήκος περίπου 5 mm. Χαρακτηριστικό του είδους είναι η εξαιρετική ευαισθησία στα μεταλλικά ιόντα και στις οργανικές τοξικές ουσίες.



Εικόνα 1.5 : *Daphnia Magna*

Η *Daphnia Magna* είναι ένας ευαίσθητος οργανισμός και έτσι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την διεξαγωγή ενός πειράματος που τις χρησιμοποιεί, είναι η ποιότητα του νερού καλλιέργειας και διατήρησης των οργανισμών. Ιδιαίτερη φροντίδα απαιτείται προκειμένου να ελαχιστοποιούνται εξωτερικές πηγές θνησιμότητας, όπως χλωριούχα ή χλωριωμένα χημικά, βαριά μέταλλα ή κάποια οργανικά στο μέσο διατήρησης. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόζονται, ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε εργαστηρίου, μέθοδοι ήπιου ή αυστηρότερου καθαρισμού του μέσου καλλιέργειας και διατήρησης. Για τα πειράματα με την *Daphnia Magna* συνήθως χρησιμοποιείται νερό μέτριας σκληρότητας. Το νερό διάλυσης γίνεται αποδεκτό, όταν οι οργανισμοί επιδεικνύουν ικανοποιητική επιβίωση και αναπαραγωγή κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και της διατήρησης στο παραπάνω μέσο.

Γενικά για την διεξαγωγή του πειράματος, με την χρήση της *Daphnia Magna*, χρησιμοποιούνται δέκα νεογνά, ηλικίας μικρότερης από 24 ώρες και η εκτίμηση της οξείας τοξικότητας πραγματοποιείται μέσα από τις επιπτώσεις διαφόρων συγκεντρώσεων (αραιώσεις) του κάθε απόβλητου στην κινητικότητα των *Daphnia* (συνήθως ακινησία σημαίνει και θάνατο). Μετρώντας τις ακινητοποιημένες μονάδες μετά από 24 και 48 ώρες (από την στιγμή που ήρθαν σε επαφή με το απόβλητο) υπολογίζουμε το LC_{50} (Lethal Concentration), δηλαδή τη συγκέντρωση του αποβλήτου που μειώνει τον πληθυσμό των *Daphnia magna* κατά 50%.

Το πείραμα οξείας τοξικότητας της *Daphnia Magna* είναι χρήσιμο για τον προσδιορισμό της τοξικότητας καθαρών συστατικών, μιγμάτων ή εκροών. Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγονται ο σύντομος χρόνος πραγματοποίησης, η απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος και το χαμηλό κόστος. Στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται η απαίτηση συνεχούς καλλιέργειας των οργανισμών δεικτών και η ευαισθησία τους στην ποιότητα του μέσου της καλλιέργειας. Επιπλέον είναι δύσκολο σε ένα πείραμα να χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός ζώων και έτσι μερικές φορές η επαναληψιμότητα δεν είναι καλή.

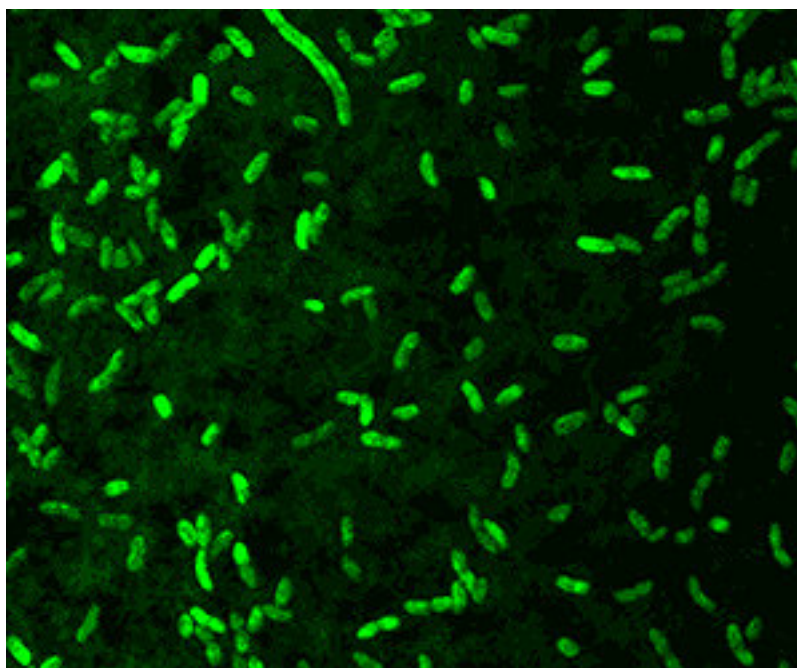
2.8.2. Βιοδοκιμές Με Βάση Την Αναστολή Της Βιοφωταύγειας Βακτηρίων

Ως βιοφωταύγεια ορίζεται το ορατό φως που παράγεται από μια χημική αντίδραση μέσα σε έναν οργανισμό. Αποτελεί υποπερίπτωση της χημειοφωταύγειας, κατά την οποία παράγεται ορατό φως γενικά από μια εξώθερμη χημική αντίδραση, αλλά είναι κάτι εντελώς διαφορετικό από τον φθορισμό ή τον φωσφορισμό.

Οι βιοδοκιμές αυτές είναι πολύ απλές. Χρησιμοποιούν σαν κριτήριο την μείωση της βιοφωταύγειας που εκπέμπουν κάποια βακτήρια, η οποία προκαλείται από την τοξική επίδραση που προκαλεί μία χημική ουσία ή ένα απόβλητο. Είναι εύχρηστες σε εμπορική βάση, γρήγορες, συγκριτικά φθηνές, αξιόπιστες και μπορούν να μετρήσουν την τοξικότητα σε ένα ευρύ φάσμα υδατικών και στερεών, αλλά και αέριων δειγμάτων.

Τα πειράματα αυτά έγιναν εφικτά χάρη και στην εξέλιξη της μικροβιοτεχνολογίας, επειδή με μια τεχνική κρυοζήρανσης μπορεί πια να παρέχει στάσιμους οργανισμούς για το τεστ, οι οποίοι μπορούν ανά πάσα στιγμή να ενεργοποιηθούν.

Το βακτήριο που χρησιμοποιείται πιο συχνά, σε αυτού του είδους τα πειράματα, είναι το *Vibrio Fischeri* (παλαιότερη ονομασία *Photobacterium phosphoreum*)(εικόνα 1.6), το οποίο εμφανίζεται να συμβιώνει με θαλάσσιους οργανισμούς.



Εικόνα 1.6 : Καλλιέργεια *Vibrio Fischeri* , από μικροσκόπιο , στο σκοτάδι

Οι λόγοι που κάνουν το *Vibrio Fischeri*, αλλά και τα υπόλοιπα βακτήρια που εκπέμπουν βιοφωταύγεια, κατάλληλα για την χρήση τους σε βιοδοκιμές είναι οι εξής:

- Είναι εύκολα προσβάσιμα, καθώς ο τρόπος απομόνωσής τους από ψάρια και θαλασσινά είναι απλός.
- Έχουν χαμηλές διατροφικές απαιτήσεις και τα μέσα ανάπτυξής τους είναι εύκολα παρασκευάσιμα διαλύματα.
- Έχουν χαμηλές απαιτήσεις σε συνθήκες επώασης, καθώς δεν χρειάζονται ειδικοί επωαστήρες και αρκεί ακόμα και η θερμοκρασία δωματίου (20 – 22°C) για την επώασή τους.
- Έχουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης. Η φωταύγεια τους μπορεί να παρατηρηθεί μέσα στις πρώτες ώρες επώασης και να κορυφωθεί σε 24 με 48 ώρες.
- Δεν είναι επικίνδυνα, καθώς δεν είναι παθογόνα και όπως οι περισσότεροι θαλάσσιοι οργανισμοί δεν μπορούν να εξαπλωθούν εύκολα σε εργαστηριακούς χώρους.

Το πιο γνωστό πείραμα που χρησιμοποιεί το βακτήριο *Vibrio fischeri* είναι το Microtox Test. Η συσκευή του Microtox μετράει ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος που προσπίπτει πάνω στους μικροοργανισμούς του δείγματος πριν και μετά την εισαγωγή του στα φιαλίδια όπου είναι εγκλιματιζόμενοι οι μικροοργανισμοί.

2.8.3. Δοκιμές Toxkits

Βιοδοκιμές πραγματοποιούνταν, μέχρι πριν από λίγα χρόνια, μόνο σε ελάχιστα εξειδικευμένα εργαστήρια, τα οποία καλλιεργούσαν ευαίσθητους μικροοργανισμούς, για να είναι σε θέση όταν χρειασθεί να πραγματοποιήσουν τις αναλύσεις. Η καλλιέργεια αυτή κόστιζε πολύ σε χρόνο και σε χρήμα και απαιτούσε προσωπικό με σχετική κατάρτιση. Για τους λόγους αυτούς τα εργαστήρια που έκαναν αυτές τις τοξικολογικές αναλύσεις ήταν πολύ λίγα.

Πριν από μερικά χρόνια, κάποιοι επιστήμονες από εργαστήρια του Βελγίου ανέπτυξαν τα τεστ τοξικότητας Toxkits, τα οποία περιέχουν όλα τα απαραίτητα υλικά για την πραγματοποίηση οικοτοξικολογικών αναλύσεων, οι οποίες γίνονται εύκολα και με ελάχιστο κόστος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους .

Μερικά από τα πλεονεκτήματα που έχουν τα Toxkits είναι τα εξής :

- Είναι εύχρηστα και με πολύ αναλυτικές οδηγίες ώστε να μπορούν να γίνουν οι μετρήσεις και από άτομα χωρίς εξειδίκευση στη μελέτη τοξικότητας.
- Έχουν μικρό κόστος.
- Ακολουθούν τις οδηγίες διεθνών οργανισμών, όπως ο OECD και ISO.
- Έχουν υψηλή ευαισθησία.
- Απαιτούν ελάχιστο έως καθόλου εργαστηριακό εξοπλισμό.

Τα μειονεκτήματα των Toxkits είναι ότι τα περισσότερα δεδομένα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία αναφέρονται σε κλασικές βιοδοκιμές, οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι εργαστηριακοί και συνεπώς απομακρυσμένοι από το φυσικό περιβάλλον και τέλος, σε κάποιες χώρες, όπως είναι η Γερμανία, η πλειοψηφία των επιστημόνων δεν θεωρεί τα αποτελέσματά τους αξιόπιστα.

2.8.4. Πειράματα Μεταλλάξεων με Βακτήρια

Τα πειράματα μεταλλάξεων χρησιμοποιούνται όταν είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός ουσιών που προκαλούν βλάβες στο DNA των οργανισμών. Το πιο γνωστό και διαδεδομένο είναι το Ames test, το οποίο προτάθηκε από τον καθηγητή Ames και τους συνεργάτες του το 1975. Το τεστ αυτό χρησιμοποιεί ως οργανισμό δείκτη το βακτηρίδιο *Salmonella Typhimurium*. Ο λόγος που γίνονται τα πειράματα αυτά είναι η δυσκολία του να γίνονται πειράματα με ποντίκια σε όλες τις νέες ουσίες που βγαίνουν στο εμπόριο κάθε χρόνο. Έχει βρεθεί ότι το 90% των ουσιών που προκαλούν μεταλλάξεις στη *Salmonella Typhimurium* είναι και καρκινογόνες. Άλλο ένα πείραμα, το οποίο είναι διαδεδομένο για τον έλεγχο βλαβών στο DNA, είναι το Rec – assay test, το οποίο χρησιμοποιεί ως οργανισμό δείκτη το βακτήριο *Bacillus Subtilis*.

Το μειονέκτημα αυτών το δυο πειραμάτων είναι ότι χρησιμοποιούν βακτήρια, δηλαδή προκαρυωτικούς οργανισμούς. Για να ξεπερασθεί αυτό το πρόβλημα, έχει προταθεί να χρησιμοποιούνται σε τέτοια πειράματα μύκητες, οι οποίοι είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.

2.8.5. Τα Μειονεκτήματα Των Βιοδοκιμών

Όπως αναφέραμε παραπάνω οι βιοδοκιμές αποτελούν το πιο εύκολο, αποτελεσματικό και φθινό τρόπο για να αναλύσουμε τις επιδράσεις μια χημικής ουσίας ή ενός υγρού αποβλήτου που εισβάλλει σε ένα οικοσύστημα. Το πρόβλημα που προκύπτει είναι ότι, οι βιοδοκιμές είναι καθαρά εργαστηριακά πειράματα και έτσι, παρόλο που έχουν κάποια δεδομένη εγκυρότητα, δεν μπορεί να υπάρξει ασφαλής προέκτασή των αποτελεσμάτων αυτών των δοκιμών τοξικότητας σε φυσικές

συνθήκες στο οικοσύστημα. Άλλωστε, για αυτόν τον λόγο, δεν υπάρχουν θεσπισμένοι νόμοι που να αναφέρονται συγκεκριμένα στις βιοδοκιμές, σαν υποχρεωτικά κριτήρια για επιφανειακά νερά, υγρά απόβλητα κ.α.. Τα δεδομένα των βιοδοκιμών θεωρούνται ανεπαρκή καθώς δεν υπάρχει επαρκής κατανόηση των οικολογικών δράσεων σε ένα οικοσύστημα και υπάρχει η ανάγκη της προέκτασης των συμπερασμάτων, έτσι ώστε να υπάρξει ασφαλής και έγκυρη μεταφορά των αποτελεσμάτων από τις ειδικές συνθήκες του εργαστηρίου, στο οικοσύστημα. Σε ένα οικοσύστημα υπάρχουν πολυάριθμες πιθανές έμμεσες ή παράλληλες επιδράσεις, που μπορούν να οδηγήσουν σε απρόβλεπτες συνέπειες. Επίσης, οργανισμοί με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (ηλικία και είδος) μπορεί να αντιδράσουν διαφορετικά όταν εκτίθενται στην ίδια συγκέντρωση της ίδιας τοξικής ουσίας υπό διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος. Τέλος οι ενυπάρχουσες τυχαίες περιβαλλοντικές και εξελικτικές παράμετροι, του ίδιου του οικοσυστήματος, είναι ένα μεγάλο και απρόβλεπτο πεδίο διακυμάνσεων.

2.9. Βιβλιογραφική Αναδρομή

Τεστ που έχουν γίνει με την χρήση *Daphnia magna*, για διάφορες εξαιρετικά τοξικές ουσίες, έχουν καταγραφεί τα εξής αποτελέσματα LC_{50} στις 48hr : για το χλωροφόρμιο ή τριχλωρομεθάνιο ($CHCl_3$) 28,9mg/l (U.S. EPA, 1978) , για τις χλωριωμένες φαινόλες μεταξύ 0,29 και 6,04mg/l (U.S. EPA, 1978) και για τον μόλυβδο μεταξύ 0,61 και 1,91mg/l, ανάλογα με την σκληρότητα του νερού (Chapman, et al. Manuscript).

Επίσης έχουν καταγραφεί EC_{50} στα 15 λεπτά με το Microtox Test, για Cu 0,2%, για Zn 1,5% και για Pb 0,5% (V.Tsiridis, M.Petala, P.Samaras, S.Hadjispyrou, G.Sakellaropoulos, A.Kungolos).

Για απόβλητα ελαιουργείου έχουν καταγραφεί : με Microtox Test EC_{50} στα 15 λεπτά 0,37 με 0,6% και με *Daphnia magna* LC_{50} στις 24 ώρες 2,5 με 7,5% (M.Gotsi, N.Kalogerakis, E.Psilaki, P.Samaras, D.Mantzavinos, 2005) και με *Daphnia Magna* LC_{50} στις 24 ώρες 4,7% και στις 48 ώρες 0,9% (Καλαϊτζάκης Μ., 2005).

Για νοσοκομειακά υγρά απόβλητα έχουν καταγραφεί, για τρία διαφορετικά νοσοκομεία στο Μεξικό, τα εξής αποτελέσματα με την χρήση *Daphnia magna*: LC₅₀ 24 ωρών 50,3%, 0,7% και ND, δηλαδή καθόλου τοξικά και LC₅₀ στις 48 ώρες 33,2%, 0,4% και ND. Η διαφορά στις τιμές της τοξικότητας των αποβλήτων εξαρτάται βεβαίως από τον τύπο του νοσοκομείου.

2.10. Νομοθετικό Πλαίσιο Για Τις Οικοτοξικολογικές Αναλύσεις

Ο στόχος της νομοθεσίας των εθνικών και διεθνών οργανισμών, σχετικά με την διαχείριση και την διάθεση των υγρών και στερεών αποβλήτων στο περιβάλλον, είναι να προστατέψουν την ανθρώπινη υγεία και τους οργανισμούς του οικοσυστήματος. Οι περισσότερες από αυτές τις νομοθεσίες επικεντρώνονται σε σε αναλύσεις για τον προσδιορισμό φυσικών και χημικών παραμέτρων των υγρών αποβλήτων που πρόκειται να διατεθούν σε κάποιον φυσικό αποδέκτη ή των στερεών αποβλήτων που πρόκειται να αποτεθούν σε κάποιον χώρο διάθεσης ή επεξεργασίας. Συνεπώς, ο προσδιορισμός της ποιότητας των υγρών και στερεών αποβλήτων βασίζεται συνήθως στις φυσικοχημικές αναλύσεις και στη συμμόρφωση των μετρούμενων παραμέτρων με τα όρια που επιβάλλονται από την νομοθεσία.

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 χρήση των οικοτοξικολογικών αναλύσεων. Η συγκεκριμένη οδηγία προτείνει τον προσδιορισμό της τοξικότητας με την χρήση υδρόβιων οργανισμών, όπως τα *Daphnia*, τα βακτήρια, τα άλγη κ.α..

Σε εθνικό επίπεδο, ορισμένα ευρωπαϊκά κράτη όπως η Ιταλία και η Ισπανία, περιλαμβάνουν στη νομοθεσία τους και τις οικοτοξικολογικές αναλύσεις. Συγκεκριμένα σε αυτά τα κράτη, με την εθνική τους νομοθεσία, οι βιοδοκιμές είναι προαιρετικές για ποτάμια και λίμνες, ενώ για τον έλεγχο των βιομηχανικών εκροών είναι υποχρεωτικές. Οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται πιο συχνά και προτείνονται από την νομοθεσία είναι τα *Daphnia Magna* και τα φωτοβακτήρια *Vibrio Fischeri*.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Δείγματα

Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν αστικά λύματα (από διάφορα στάδια της επεξεργασίας τους στον βιολογικό καθαρισμό), βιομηχανικά υγρά απόβλητα (απόβλητα βαφείου, απόβλητα βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού, κατσίγαρος και απόβλητα ελαιουργείου) και παραπροϊόντα της χλωρίωσης (THMs και DBPS).

3.1.1. Αστικά Λύματα

Τα αστικά λύματα που εξετάστηκαν, προήλθαν από δειγματοληψίες που έγιναν στον βιολογικό καθαρισμών Χανίων. Εξετάστηκαν δείγματα βοθρολύματος και ανεπεξέργαστων λυμάτων (Raw), δείγματα που είχαν υποστεί την πρωτοβάθμια επεξεργασία και δείγματα που είχαν υποστεί την δευτεροβάθμια επεξεργασία, χλωριωμένα, μη χλωριωμένα και αποχλωριωμένα. Τα αστικά λύματα, γενικά δεν είναι πολύ τοξικά και οι τοξικές ουσίες που περιέχουν, προέρχονται κυρίως από τις διάφορες βιομηχανίες, που αποχετεύονται στο δίκτυο υπονόμων.

3.1.2. Βιομηχανικά Υγρά Απόβλητα

Τα βιομηχανικά απόβλητα που εξετάστηκαν, ήταν απόβλητα βαφείου, από το βαφείο Επίλεκτος Κλωστοϋφαντουργική Ε.Π.Ε στην Λειβαδια., απόβλητα βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού, από τους χυμούς Λακωνίας στην Σπάρτη, κατσίγαρος και απόβλητα ελαιουργείου, από το Ελαιουργείο Καλαμαρίδη στο Καμπάνι Ακρωτηρίου, που είναι ένα κλασικό τριφασικό ελαιουργείο.

Τα βαφεία χρησιμοποιούν σαν πρώτες ύλες κυρίως βαμβάκι, μαλλί και συνθετικές ίνες, καθώς και μεγάλη ποικιλία από είδη χρωμάτων. Τα απόβλητα που παράγονται κατά την διάρκεια του πλυσίματος του ακατέργαστου μαλλιού και το στάδιο αποκολλαρίσματος της βαφής είναι αυτά που δημιουργούν το μεγαλύτερο

πρόβλημα. Ανάμεσα στις τοξικές ουσίες που περιέχουν, βρίσκουμε τις Cr , Cu και φαινόλες σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Τα απόβλητα βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού, παράγονται κυρίως κατά το πλύσιμο, το καθάρισμα, την πολτοποίηση και τη στράγγιση των πορτοκαλιών, καθώς επίσης και από το καθάρισμα των συσκευών και των δαπέδων του εργοστασίου. Τα απόβλητα περιέχουν πολλά αιωρούμενα στερεά, κολλοειδής και διαλυμένες οργανικές ουσίες.

Ο κασίγαρος και τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου, παράγονται κατά κύριο λόγο σε μονάδες παραγωγής ελαιόλαδου από σύνθλιψη του ελαιοκάρπου. Τα εν λόγω απόβλητα περιέχουν μεγάλο ρυπαντικό φορτίο. Περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων, οι οποίες είναι ιδιαίτερα τοξικές.

3.1.3. Παραπροϊόντα Χλωρίωσης

Τα παραπροϊόντα της χλωρίωσης που εξετάστηκαν ήταν διαλύματα THMs, σε συγκεντρώσεις 100ppb και 10ppb, και DBPs, τα οποία παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.

Τα τριαλογονομεθάνια ή αλογονωμένα παράγωγα του μεθανίου (trihalomethanes – THM's) είναι οργανικά μόρια που έχουν προκύψει από το μεθάνιο με αντικατάσταση τριών ατόμων υδρογόνου με άτομα αλογόνων, κυρίως χλωρίου και βρωμίου, σε διάφορους συνδυασμούς. Τα τριαλογονομεθάνια είναι τέσσερα : το χλωροφόρμιο ή τριχλωρομεθάνιο (CHCl_3), το βρωμοδιχλωρομεθάνιο (CHCl_2Br), διβρωμοχλωρομεθάνιο (CHClBr_2) και το βρωμοφόρμιο ή τριβρωμομεθάνιο (CHBr_3). Τα όρια για τις συγκεντρώσεις των τριαλογονομεθανίων στο πόσιμο νερό σύμφωνα με την αναθεωρημένη οδηγία [COM(94)612] της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι : 40ppb για το χλωροφόρμιο, 15ppb για το βρωμοδιχλωρομεθάνιο και 25ppb για διβρωμοχλωρομεθάνιο, ενώ η αμερικάνικη EPA (Environmental Protection Agency) έχει θεσπίσει ανώτατο όριο για τα τέσσερα τριαλογονομεθάνια τα 100ppb(EPA , 2001) συνολικά .

Το μίγμα DBPs (Disinfection Byproducts) περιέχει τις εξής ουσίες : THM 100ppb, τριχλωροακετονιτρίλιο, διχλωροακετονιτρίλιο, βρωμοχλωροακετονιτρίλιο, χλωροπικρίνη, 1,1-διχλωρο-ακετόνη, 1,1,1-τριχλωρο-2-προπανόνη σε συγκέντρωση 80ppb το καθένα και τριχλωροαιθυλένιο, τετραχλωροαιθυλένιο και 1,2-διχλωροαιθάνιο σε συγκέντρωση 5ppb το καθένα.

3.2. Πειραματική Διαδικασία

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας, έλαβαν χώρο στο Διατμηματικό Εργαστήριο Τεχνολογίας και Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και περιελάμβαναν αναλυτικές μεθόδους για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων και βιοδοκιμές για την μέτρηση της τοξικότητας.

3.2.1. Αναλυτικές Μέθοδοι

Στα δείγματα των αποβλήτων που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκαν μια σειρά μετρήσεων με διάφορες αναλυτικές μεθόδους για τον χαρακτηρισμό τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

3.2.1.1. pH

Το pH είναι μια μέτρηση της οξύτητας ή της αλκαλικότητας ενός δείγματος. Μπορεί να πάρει τιμές από 0 έως 14. Τιμές από 0 έως 7 χαρακτηρίζουν το δείγμα όξινο, η τιμή 7 το χαρακτηρίζει ουδέτερο και τέλος τιμές μεγαλύτερες του 7 το χαρακτηρίζουν αλκαλικό.

Οι μετρήσεις του pH στο εργαστήριο έγιναν με τον μετρητή pH της εταιρίας Crison, μοντέλο micropH 2002, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η βαθμονόμηση του μηχανήματος, γίνεται με ρυθμιστικά διαλύματα με pH 4 και 7.

3.2.1.2. Ολικά Αιωρούμενα Στερεά (TSS)

Μέσα στα δείγματα των αποβλήτων βρίσκονται στερεά, αιωρούμενα ή διαλυμένα στην μάζα τους και αποτελούνται από οργανικά και ανόργανα συστατικά.

Τα ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids – TSS) είναι τα στερεά τα οποία συγκρατεί το ειδικό φίλτρο, από το οποίο περνάει το δείγμα και υπολογίζονται με την ζύγιση του φίλτρου, το οποίο έχει πρώτα ξηραθεί σε φούρνο στους 105 °C και εκφράζονται σε mg/l δείγματος.

Στο εργαστήριο τα ολικά αιωρούμενα στερεά μετρήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο 2540D. “Total Suspended Solids” από το Standard Methods (APHA, AWWA, WEF, 1922), με φίλτρα για αιωρούμενα στερεά, με μέγεθος πόρων 1μm (Type A/E).

3.2.1.3. Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand – COD) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη χημική οξείδωση των οργανικών συστατικών ενός αποβλήτου σε CO₂ και H₂O από ισχυρό οξειδωτικό μέσο (διχρωμικό κάλιο ή σπανιότερα υπερμαγγανικό κάλιο) και σε όξινες συνθήκες.

Η μέτρηση του COD στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε με τα ετοιμα αντιδραστήρια της εταιρίας Merck, σύμφωνα με την μέθοδο 5220 D. “Closed Reflux Titrimetric Method” από το Standard Methods (APHA, AWWA, WEF, 1922). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χημική οξείδωση του υδατικού διαλύματος σε ειδικά φιαλίδια που περιέχουν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και διχρωμικό κάλιο (K₂Cr₂O₇) ως οξειδωτικό, τα οποία τοποθετούνται σε κατάλληλο θερμοαντιδραστήρα για χώνευση στους 150 °C για δύο ώρες. Η μέτρηση της απορρόφησης μετά την χώνευση είναι φωτομετρική, σε φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους στα 593nm και 447nm, ανάλογα με το kit που χρησιμοποιήθηκε (10 – 15 ppm, 25 – 1500 ppm, 500 – 3000 ppm και 3000-10000 ppm ανάλογα με το δείγμα). Ο υπολογισμός του COD έγινε μέσω των ευθειών βαθμονόμησης που προέκυψαν μετρώντας πρότυπα διαλύματα. Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων καθώς και οι ευθείες

βαθμονόμησης που προέκυψαν για κάθε εύρος συγκεντρώσεων παρουσιάζονται στο Παράρτημα II. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της απορρόφησης ήταν το UV – 1202 Spectrophotometer της εταιρίας SHIMADZU.

3.2.1.4. Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (BOD)

Το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand – BOD) είναι η πιο διαδεδομένη παράμετρος για την μέτρηση οργανικής ρύπανσης και φορτίου σε επιφανειακά νερά και αποβλήτα αντίστοιχα. Το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο ορίζεται ως η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για την οξείδωση των οργανικών συστατικών ενός αποβλήτου, από μικροοργανισμούς σε αερόβιες συνθήκες.

Η οξείδωση αυτή είναι σχετικά αργή και ολοκληρώνεται πρακτικά σε είκοσι ημέρες, οπότε το απαιτούμενο οξυγόνο που υπολογίζεται ονομάζεται τελικό BOD (BOD_L). Στην συνηθισμένη πρακτική έχει επικρατήσει ο προσδιορισμός του BOD στις πέντε ημέρες (BOD_5), μέσα στην διάρκεια των οποίων οξειδώνονται απλές οργανικές ουσίες, που αντιπροσωπεύουν ένα ποσοστό 60 – 70 % των συνολικών οργανικών ουσιών.

Η μέτρηση του BOD στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε με τα ειδικά πώματα της εταιρίας Oxitor, τα οποία εφαρμόζουν σε ειδικές υάλινες φιάλες, σκούρου χρώματος. Μέσα σε αυτές τις φιάλες τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα ml δείγματος, ανάλογα με τη φύση του αποβλήτου (πίνακας 3.1) και στην συνέχεια φυλάσσονται σε επωαστικό κλίβανο υπό ανάδευση, στους 20 °C για πέντε ημέρες. Σε ειδική θέση κάτω από το πώμα τοποθετείται KOH, για την προσρόφηση του CO₂ που παράγεται κατά την εκπνοή των μικροοργανισμών. Τα πώματα Oxitor καταγράφουν τις τιμές του BOD καθ' όλη την διάρκεια των πέντε ημερών, μέσω μανομετρικής μεθόδου.

Πίνακας 3.1: ποσότητα ml δείγματος, ανάλογα με τη φύση του αποβλήτου

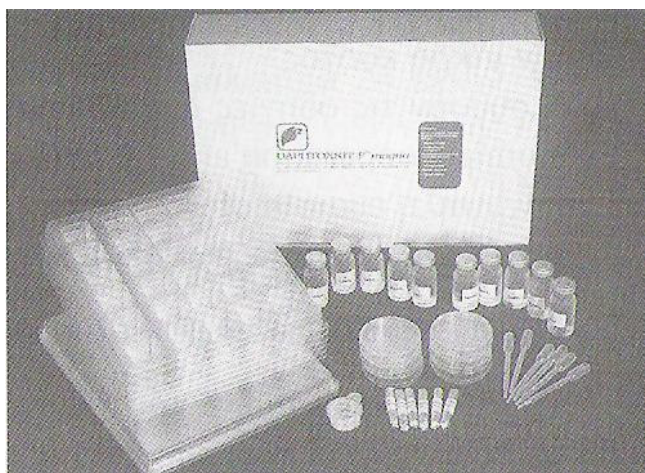
Sample Volume (ml)	Measuring Range (mg/L)	Factor
432	0 – 40	1
365	0 – 80	2
250	0 – 200	5
164	0 – 400	10
97	0 – 800	20
43,5	0 – 2000	50
22,7	0 - 4000	100

3.2.2. Βιοδοκιμές

Στο εργαστήριο έγιναν βιοδοκιμές με *Daphnia Magna* και το Microtox Test, που ανήκουν στην κατηγορία των άμεσων (οξείων) βιοδοκιμών.

3.2.2.1. *Daphnia Magna*

Στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε το πείραμα Daphtoxkit (Εικόνα 3.2), το οποίο περιέχει κύστες με αυγά (σε απενεργοποιημένη μορφή) του καρκινοειδούς *Daphnia magna* και τα απαραίτητα υλικά για το τεστ. Τα Daphtoxkit χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα σαν πειράματα τοξικότητας και ακολουθούν τους κανονισμούς εθνικών και διεθνών οργανισμών (OESD, ISO, EEC, USEPA, ASTM).



Εικόνα 3.2 : Σετ προσδιορισμού τοξικότητας Daphtoxkit

Η αναλυτική διαδικασία του πειράματος είναι η εξής :

- Προετοιμασία πρότυπου διαλύματος γλυκού νερού (fresh water) :

Για την εκκόλαψη των αυγών, είναι αναγκαίο να παρασκευαστεί ένα πρότυπο διάλυμα γλυκού νερού, για να επιτύχουμε το κατάλληλο περιβάλλον (θρεπτικά συστατικά και σκληρότητα του νερού), μέσα στο οποίο θα αναπτυχθούν τα άτομα της *Daphnia*. Το διάλυμα παρασκευάζεται σε μία φιάλη 1000ml, με την προσθήκη των παρακάτω σε υπερκάθαρο νερό :

64,75 mg NaHCO_3

294 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

123,25 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5,75 mg KCl

- Εκκόλαψη των αυγών :

Η εκκόλαψη των αυγών που περιέχονται σε μια κύστη γίνεται σε ένα μικρό τριβλείο Petri. Αδειάζουμε τα αυγά σε μια ειδική μικρή απόχρη και τα καθαρίζουμε με απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια ρίχνουμε προσεκτικά τα αυγά στο τριβλείο και προσθέτουμε 50 ml fresh water, το οποίο πρώτα το έχουμε αερίσει για 15 λεπτά, έτσι ώστε να υπάρχει αρκετό οξυγόνο για τα νεογνά. Από κάθε φιάλη προκύπτουν 100 –

120 Daphnia, τα οποία αρκούν για τον έλεγχο της τοξικότητας δύο δειγμάτων (50 για κάθε δείγμα, συν 10 Daphnia για το τυφλό).

- Επώαση και τροφοδοσία των αυγών :

Η επώαση των αυγών γίνεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, στους 20-22 °C, κάτω από φως 6000 lux για 72 ώρες. Αμέσως μετά το πέρας των 72 ωρών τα νεογνά daphnia τροφοδοτούνται με την ειδική τροφή spirulina (μικροφύκη), που περιέχεται στο Daphtoxkit σε κύστες. Σε λιγότερο από 24 ώρες μεταφέρουμε τα νεογνά στα αραιωμένα διαλύματα.

- Προετοιμασία των δειγμάτων :

Για την εύρεση του LC₅₀, είναι απαραίτητο να ετοιμαστούν πέντε συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος, οι οποίες προκύπτουν από 1:1 αραιώσεις της αρχικής συγκέντρωσης του αποβλήτου. Αναλυτικά : έχουμε πέντε φιάλες των 50ml, μέσα στις οποίες θα γίνουν οι αραιώσεις. Μεταφέρουμε 50ml δείγματος στην πρώτη φιάλη, για να έχουμε την 100% συγκέντρωση C1. Στην συνέχεια μεταφέρουμε 25ml από την πρώτη φιάλη, στην επόμενη και προσθέτουμε 25ml fresh water, κάνοντας έτσι 1:1 αραιώση. Συνεχίζουμε μεταφέροντας 25ml από το αραιωμένο δείγμα στην επόμενη φιάλη, και προσθέτουμε 25ml fresh water κ.τ.λ.. Στο τέλος έχουμε πέντε συγκεντρώσεις των **100%, 50%, 25%, 12,5% και 6,25% (C1, C2, C3, C4 και C5 αντίστοιχα)**. Όταν το υγρό απόβλητο θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό γίνεται αρχική αραιώση, την οποία επιλέγουμε έτσι ώστε να μην πεθάνουν αμέσως όλα τα Daphnia που θα έρθουν σε επαφή με το δείγμα. Επίσης, σε κάποια δείγματα, χρειάζεται να γίνουν δοκιμές σε περισσότερες από πέντε συγκεντρώσεις για να βγάλουμε το αποτέλεσμα.

- Μεταφορά των δειγμάτων και των Daphnia στο πλατώ βιοδοκιμής :

Τα δείγματα μεταφέρονται στο ειδικό πλατώ βιοδοκιμής που περιέχει το Daphtoxkit (εικόνα 3.3), ξεκινώντας από το τυφλό και στην συνέχεια με την αραιότερη συγκέντρωση. Υπάρχουν πηγάδια περιεκτικότητας 10 ml, χωρισμένα έτσι

ώστε κάθε σειρά να αντιστοιχεί σε μία συγκέντρωση και σε κάθε δύο στήλες να αντιστοιχεί ένα δείγμα. Γεμίζουμε το κάθε πηγάδι με 10ml της κατάλληλης συγκέντρωσης. Έτσι για την κάθε συγκέντρωση αντιστοιχούν δύο πηγάδια, δηλαδή στο πλατώ μπορούμε να εξετάσουμε δυο δείγματα. Στην συνέχεια μέσα από το τριβλείο όπου έχουν επωαστεί τα *Daphnia* πρέπει να μεταφέρουμε με μια μικροπιπέτα 5 *Daphnia* σε κάθε πηγάδι, οπότε συνολικά σε κάθε συγκέντρωση αντιστοιχούν 10 *Daphnia*. Τα άτομα της *Daphnia magna* είναι πολύ ευαίσθητα και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, για να μην πεθάνουν κατά την μεταφορά τους στο δείγμα. Όταν ολοκληρώσουμε την μεταφορά, καταγράφουμε την ώρα και σκεπάζουμε το πλατώ, το οποίο μεταφέρουμε στον επωαστήρα, όπου φυλλάσσεται σε σκοτάδι στους 20-22 °C.

		A	B	C	D
Freshwater (τυφλό)	X				
C5	1				
C4	2				
C3	3				
C2	4				
C1	5				

Εικόνα 3.3 : Μεταφορά των συγκεντρώσεων του δείγματος στο πλατώ του τεστ

- Καταμέτρηση και καταγραφή των ζωντανών *Daphnia* :

Μετά από 24 ώρες πραγματοποιείται, με την βοήθεια μεγεθυντικού φακού, η μέτρηση και η καταγραφή των νεκρών *Daphnia* σε κάθε πηγάδι. Μετά από 48 ώρες

γίνεται η τελική καταμέτρηση και καταγραφή των νεκρών Daphnia. Εδώ τελειώνει το τεστ και όσα Daphnia έχουν απομείνει στο τριβλείο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλο τεστ. Για να έχουμε την εξαγωγή των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων πρέπει, αν είναι δυνατόν, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση να έχουν πεθάνει όλα τα Daphnia, ενώ στην πιο αραιή να ζουν όλα. Έτσι για κάποια δείγματα δύναται να κάνουμε συμπληρωματικά τεστ. Για αυτόν τον λόγο πρέπει να βρούμε τις κατάλληλες αραιώσεις που θα κάνουμε στο δείγμα, για να πετύχουμε τον σκοπό αυτό.

- Επεξεργασία αποτελεσμάτων και εξαγωγή του LC_{50} :

Εισάγουμε τον αριθμό των νεκρών Daphnia που έχουμε καταγράψει για κάθε συγκέντρωση, ξεκινώντας από την μεγαλύτερη, σε ειδικό λογισμικό στον υπολογιστή, το οποίο μας δίνει την δυνατότητα να υπολογίσουμε με σύντομο τρόπο το LC_{50} για τις 24 ή τις 48 ώρες από τα στοιχεία της θνησιμότητας προς την συγκέντρωση του αποβλήτου και δίνει εκτυπωμένα συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των καταγραφών. Το ίδιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να προκύψει και γραφικά. Χρησιμοποιώντας λογαριθμικό χαρτί, τοποθετούμε στον άξονα Y τις συγκεντρώσεις του προς εξέταση αποβλήτου και στον άξονα X το ποσοστό θνησιμότητας για κάθε συγκέντρωση στο ύψος της συγκέντρωσης για κάθε αραιώση και τα σημεία αυτά τα ενώνουμε με ευθεία γραμμή. Τέλος προσδιορίζονται τα δύο σημεία πάνω στο γράφημα, τα οποία διαχωρίζονται από την κάθετη γραμμή των 50% και διαβάζεται η τιμή του LC_{50} στο σημείο τομής των δύο γραμμών.

- Εγκυρότητα του τεστ :

Παράλληλα με το απόβλητο, πραγματοποιείται και βιοδοκιμή σε τυφλό δείγμα καθώς και σε δείγμα ελέγχου διχρωμικού καλίου ($K_2Cr_2O_7$) (σε συγκεντρώσεις 0,32 - 0,56 - 1 - 1,8 - 3,2 mg/l), προκειμένου να γίνει έλεγχος της εγκυρότητας απόκρισης της βιοδοκιμής υπό ακραίες συνθήκες.

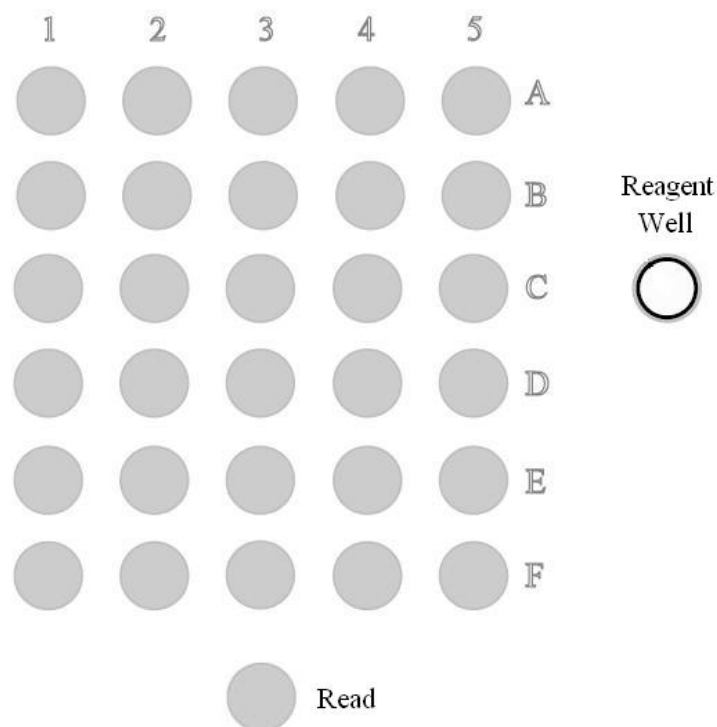
3.2.2.2. Microtox Test

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν τα Basic , Basic 81,9% και Comparison test του Microtox, στην συσκευή Model 500 Analyzer (1998) της εταιρίας AZUR Enviromental (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 : Συσκευή Model 500 Analyzer (1998) της εταιρίας AZUR Enviromental

Η επιφάνεια εργασίας της συσκευής περιέχει πηγάδια υποδοχής των φιαλιδίων, μέσα στα οποία μεταφέρονται οι μικροοργανισμοί και τα δείγματα, ένα πηγάδι στο οποίο λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση των μικροοργανισμών, με την προσθήκη 1ml υγρού ενεργοποίησης, καθώς και ένα πηγάδι το οποίο μετράει την απορρόφηση της ακτινοβολίας. Η συσκευή έχει την δυνατότητα να διατηρεί τα φιαλίδια και το περιεχόμενό τους στην επιθυμητή θερμοκρασία. Η επιφάνεια εργασίας παρουσιάζεται στο σχήμα 3.4 που ακολουθεί :



Σχήμα 3.4 : Επιφάνεια εργασίας συσκευής

Αρχικά ενεργοποιούμε τα βακτηρίδια, που διατηρούνται σε απενεργοποιημένη μορφή μέσα σε φιαλίδια στον καταψύκτη. Τοποθετούμε σε ένα άδειο φιαλίδιο 1ml υγρού ενεργοποίησης και στην συνέχεια αδειάζουμε προσεκτικά μέσα τα ανενεργά βακτηρίδια, που είναι σε μορφή σκόνης, και ανακινούμε το διάλυμα. Τα βακτήρια πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός τριών ωρών, από την στιγμή της ενεργοποίησής τους. Πριν από την διεξαγωγή οποιουδήποτε πειράματος με κάποιο απόβλητο, πρέπει να ελέγξουμε αν τα βακτήρια είναι κατάλληλα για χρησιμοποίηση και πραγματοποιούμε ένα Basic Test 5min με standard διάλυμα φαινόλης 50ppm, το οποίο με την προσθήκη του διαλύματος ρύθμισης οσμωτικής πίεσης γίνεται 45ppm, από το οποίο πρέπει να πάρουμε αποτέλεσμα μεταξύ 13 και 26ppm.

Η αναλυτική διαδικασία των Basic, Basic 81,9% και Comparison test του Microtox είναι η εξής:

- Basic Test :

Το Basic Test είναι το πιο απλό τεστ που περιέχει το Microtox και το επιλέγουμε όταν το δείγμα που θέλουμε να εξετάσουμε δεν είναι πολύ τοξικό. Το δείγμα εξετάζεται σε συγκεντρώσεις 0%, 5,626%, 11,25%, 22,50% και 45,00%. Ξεκινάμε το τεστ τοποθετώντας φιαλίδια στα πηγάδια A1 έως A5 και B1 έως B5. Στα B1-B5 τοποθετούμε 0,5 ml διαλυτικού (diluent) και 1ml στα A1-A4. Στο A5 τοποθετούμε 2,5ml δείγματος, 0,250ml διαλύματος ρύθμισης οσμωτικής πίεσης αναμιγνύουμε και αφαιρούμε 0,750ml για να έχουμε 2ml δείγματος. Από αυτό το φιαλίδιο παίρνουμε 1ml του μίγματος και το μεταφέρουμε στο A4. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται και στα φιαλίδια A3 και A2 όπου τελικά πετάμε 1ml από το τελευταίο. Το φιαλίδιο A1 λειτουργεί σαν τυφλό (μηδενική συγκέντρωση). Έτσι έχουμε 1ml μίγματος στα A1-A5 με τις συγκεντρώσεις που αναφέραμε παραπάνω. Μετά από 5 λεπτά μεταφέρουμε 0,010ml διαλύματος βακτηριδίων από το πηγάδι ενεργοποίησης (reagent well) στα φιαλίδια B1-B5 και μετράμε την αρχική τους απορρόφηση I_0 . Στην συνέχεια μεταφέρουμε 0,5ml από τα φιαλίδια με το δείγμα A1-A5 στα B1-B5 και μετράμε την απορρόφηση I_t για τα χρονικά διαστήματα 5 και 15 λεπτών.

- Basic 81,9% Test :

Το Basic 81,9% Test είναι παρόμοιο με το Basic Test. Σε αυτό το τεστ κάνουμε περισσότερες αραιώσεις και το χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε το EC_{50} αποβλήτων που είναι ιδιαίτερα τοξικά. Το δείγμα εξετάζεται σε συγκεντρώσεις 0%, 0,3199%, 0,6398%, 1,280%, 2,559%, 5,119%, 10,24%, 20,48%, 40,95% και 81,90%. Ξεκινάμε το τεστ τοποθετώντας φιαλίδια στα πηγάδια A1 έως A5 , B1 έως B5, C1 έως C5, D1 έως D5 και F3. Στο F3 τοποθετούμε 1,5ml διαλυτικού (diluent) και 1ml στα A1-A5 και C1-C4. Στο C5 τοποθετούμε 2,5ml δείγματος, 0,250ml διαλύματος ρύθμισης οσμωτικής πίεσης αναμιγνύουμε και αφαιρούμε 0,750ml για να έχουμε 2ml δείγματος. Από αυτό το φιαλίδιο παίρνουμε 1ml του μίγματος και το μεταφέρουμε στο C4. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται διαδοχικά στα φιαλίδια C3 έως C1 και A5 έως A2, όπου τελικά πετάμε 1ml από το τελευταίο. Το φιαλίδιο A1 λειτουργεί σαν τυφλό (μηδενική συγκέντρωση). Έτσι έχουμε 1ml μίγματος στα A1-A5 και C1-C5. Μετά από 5 λεπτά μεταφέρουμε 0,150ml διαλύματος βακτηριδίων από το πηγάδι

ενεργοποίησης (reagent well) φιαλίδιο F3 και αναμιγνύουμε. Στην συνέχεια μεταφέρουμε 0,100ml μίγματος βακτηριδίων από το F3 στα φιαλίδια B1 έως B5 και D1 έως D5 και μετράμε την αρχική τους απορρόφηση I_0 . Στην συνέχεια μεταφέρουμε 0,9ml από τα φιαλίδια με το δείγμα A1-A5 στα B1-B5 και από τα C1-C5 στα D1-D5 και μετράμε την απορρόφηση I_t για τα χρονικά διαστήματα 5 και 15 λεπτών.

- Comparison Test :

Το Comparison Test το χρησιμοποιούμε όταν το δείγμα μας είναι ελάχιστα έως καθόλου τοξικό και αυτό που κάνει είναι να συγκρίνει το δείγμα του αποβλήτου με το τυφλό δείγμα, χωρίς να βγάζει το EC_{50} . Ξεκινάμε το τεστ τοποθετώντας φιαλίδια στα πηγάδια A1 έως A5, B1 έως B5, C1 έως C5, D1 έως D5, E1 έως E5 και F3. Τοποθετούμε σε μια φιάλη 10ml διαλύματος ενεργοποίησης, προσθέτουμε 1ml διαλύματος ρύθμισης οσμωτικής πίεσης και αναμιγνύουμε. Μεταφέρουμε από 1,5ml του μείγματος της φιάλης στα φιαλίδια B1, B3, B5, D2, D4 και F3. Σε μια άλλη φιάλη τοποθετούμε 10ml δείγματος, προσθέτουμε 1ml διαλύματος ρύθμισης οσμωτικής πίεσης και αναμιγνύουμε. Μεταφέρουμε από 1,5ml του μείγματος της φιάλης στα φιαλίδια B2, B4, D1, D3 και D5. Μετά από 5 λεπτά μεταφέρουμε 0,150ml διαλύματος βακτηριδίων από το πηγάδι ενεργοποίησης (reagent well) φιαλίδιο F3 και αναμιγνύουμε. Στην συνέχεια μεταφέρουμε 0,100ml μίγματος βακτηριδίων από το F3 στα φιαλίδια C1 έως C5 και E1 έως E5 και μετράμε την αρχική τους απορρόφηση I_0 . Στην συνέχεια μεταφέρουμε 0,9 ml από τα φιαλίδια με το δείγμα B1-B5 στα C1-C5 και από τα D1-D5 στα E1-E5 και μετράμε την απορρόφηση I_t για τα χρονικά διαστήματα 5 και 15 λεπτών.

Το EC_{50} (Effective Concentration), όπου η βιοφωταύγεια από τους μικροοργανισμούς έχει μειωθεί στο 50%, υπολογίζεται απευθείας από λογισμικό του μηχανήματος του Microtox ως εξής :

- Αρχικά υπολογίζεται η συνάρτηση Γ για χρόνο t min σε κάθε συγκέντρωση C του δείγματος που εξετάζεται :

$$\Gamma_t = F_K \frac{I[C]_0 - I[C]_t}{I[C]_t}$$

Όπου :

Γ = ο λόγος της βιοφωταύγειας που χάθηκε λόγω τοξικής επίδρασης προς τη βιοφωταύγεια που παραμένει

$I[C]_t$ = η ένταση της βιοφωταύγειας που μετράται σε δείγμα τοξικής συγκέντρωσης C , μετά από χρόνο έκθεσης t σε min

$I[C]_0$ = η ένταση της βιοφωταύγειας που μετράται σε δείγμα τοξικής συγκέντρωσης C , σε χρόνο έκθεσης $t = 0$

F_K = συντελεστής διόρθωσης ($F_K = I[0]_t / I[0]_0$)

$I[0]_t$, $I[0]_0$ = η ένταση της βιοφωταύγειας που μετράται σε τυφλό δείγμα σε χρόνο 0 και t min.

- Στην συνέχεια υπολογίζεται η % αρνητική επίδραση (effect) που προκαλεί στην βιοφωταύγεια, που εκπέμπουν τα βακτήρια, η κάθε συγκέντρωση C του δείγματος σε χρόνο t :

$$\%Effect = \left(\frac{\Gamma_t}{1 + \Gamma_t} \right) \times 100$$

- Τέλος έχοντας υπολογίσει την % αρνητική επίδραση (effect) για κάθε συγκέντρωση γίνεται γραμμική παρεμβολή και υπολογίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί την 50% αρνητική επίδραση, δηλαδή το EC_{50} .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρουσιάζονται, αρχικά, τα αποτελέσματα των αναλυτικών μεθόδων, που έγιναν για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων και στην συνέχεια τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών.

4.1. Χαρακτηρισμός Δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, για τον χαρακτηρισμό των αποβλήτων, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά μετρήσεων με διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που δίδονται παρακάτω :

- Αστικά λύματα, 1^η δειγματοληψία :

Πίνακας 4.1 : Αποτελέσματα αναλυτικών μεθόδων των αστικών λυμάτων 1^{ης} δειγματοληψίας

Δείγμα	pH	TSS(mg/l)	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)
Πρωτοβάθμιο	7,3	150	411,2	320
Δευτεροβάθμιο	7,1	9	>10	30
Χλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	7,2	32	2,6	15
Αποχλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	7,4	32	26,2	-
Βοθρόλυμα	7,5	1950	5104	1450
Ανεπεξέργαστο	7,7	150	378,1	500

- Αστικά λύματα, 2^η δειγματοληψία :

Πίνακας 4.2 : Αποτελέσματα αναλυτικών μεθόδων των αστικών λυμάτων 2^{ης} δειγματοληψίας

Δείγμα	pH	TSS(mg/l)	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)
Πρωτοβάθμιο	7,0	106	338,6	240
Χλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	7,1	25	60,2	14
Αποχλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	7,1	27	>10	-
Βοθρόλυμα	7,5	1560	5205	1300
Ανεπεξέργαστο	7,9	312	583,2	320

Παρατηρούμε ότι στην πρώτη δειγματοληψία το δείγμα ανεπεξέργαστων λυμάτων έχει μικρότερο COD από το δείγμα που πήραμε από την πρωτοβάθμια επεξεργασία (πίνακας 4.1). Το αποτέλεσμα αυτό, αν δεν πρόκειται για πειραματικό σφάλμα ή για σφάλμα κατά την συλλογή των δειγμάτων, πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί αν την ημέρα που έγινε η δειγματοληψία στον βιολογικό καθαρισμό είχε καθαριστεί το ανεπεξέργαστο λύμα και είχαν ρίξει το βοθρόλυμα στην πρωτοβάθμια επεξεργασία.

- Βιομηχανικά υγρά απόβλητα :

Πίνακας 4.3 : Αποτελέσματα αναλυτικών μεθόδων των βιομηχανικών υγρών αποβλήτων

Δείγμα	pH	TSS (mg/l)	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)
Βαφείου	8,9	21	248,7	-
Ελαιουργείου	4,5	3574	11283	-
Κατσίγαρος	4,3	7600	6920	42
Βιομ. Χυμών πορτοκαλιού	4,3	46440	9680	130

Στα δείγματα βαφείου και ελαιουργείου, παρόλο που έγινε μέτρηση για BOD, δεν είχαμε αποτελέσματα. Αυτό συνέβη γιατί πιθανότατα το δείγμα αποβλήτων βαφείου δεν περιέχει μικροοργανισμούς και το δείγμα αποβλήτων ελαιουργείου έχει πολύ υψηλό COD και έτσι πέθαναν οι μικροοργανισμοί που περιείχε το δείγμα.

Επίσης αξίζει να προσέξουμε ότι το δείγμα αποβλήτων βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού περιέχει 46440mg/l TSS, που είναι πολύ μεγάλη ποσότητα αιωρούμενων στερεών.

4.2 Αποτελέσματα Βιοδοκιμών

4.2.1. Daphnia Magna

Τα αναλυτικά αποτελέσματα των LC₅₀, που προέκυψαν από τις βιοδοκιμές με Daphnia Magna, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, για να εξαχθούν τα πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα, για κάποια από τα δείγματα, χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν παραπάνω από ένα τεστ :

- Αστικά λύματα :

Πίνακας 4.4 : LC₅₀ χλωριωμένου δευτεροβάθμιου λύματος

Χλωριωμένο Δευτεροβάθμιο					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	0	0	ND*	ND*
50	10	0	0		
25	10	0	0		
12,5	10	0	0		
6,25	10	0	0		

Πίνακας 4.5 : LC₅₀ αποχλωριωμένου δευτεροβάθμιου λύματος

Αποχλωριωμένο Δευτεροβάθμιο					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	0	1	ND*	ND*
50	10	0	0		
25	10	0	0		
12,5	10	0	0		
6,25	10	0	0		

Τα λύματα που έχουν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία (χλωριωμένα και αποχλωριωμένα), δεν προκαλούν καμία βλάβη στα Daphnia και δεν έχουν καμία τοξικότητα.

Σημείωση : Τεστ πραγματοποιήθηκαν, για εξοικονόμηση υλικού, μόνο στο χλωριωμένο και στο αποχλωριωμένο δευτεροβάθμιο λύμα της πρώτης δειγματοληψίας, καθώς αυτά είναι που διοχετεύονται στους υδάτινους αποδέκτες .

- Παραπροϊόντα χλωρίωσης :

Πίνακας 4.6 : LC₅₀ THM 100ppb

THM 100ppb					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	7	9	80,5	70,7
50	10	1	1		
25	10	0	2		
12,5	10	0	0		
6,25	10	0	0		

Πίνακας 4.7 : LC₅₀ DBPs

DBPs					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	6	8	88,1	75,1
50	10	1	1		
25	10	0	0		
12,5	10	0	0		
6,25	10	0	0		

Τα παραπροϊόντα τις χλωρίωσης, που εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις σύμφωνα με τα υπαρκτά ανώτατα όρια, παρουσιάζουν πολύ μικρή τοξικότητα.

- Βιομηχανικά υγρά απόβλητα :

Πίνακας 4.8 : LC₅₀ αποβλήτων βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού

Απόβλητα Βιομηχανίας Χυμών Πορτοκαλιού					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
4	10	10	10	0,6	0,4
2	10	9	10		
1	10	8	10		
0,5	10	4	10		
0,25	10	3	9		

Πίνακας 4.9 : LC₅₀ κατσίγαρου 1^{ου} τεστ

Κατσίγαρος 1^ο Τεστ					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
0,666	10	4	9	ND*	0,5
0,333	10	0	0		
0,166	10	0	0		
0,833	10	0	0		
0,041	10	0	0		

Πίνακας 4.10 : LC₅₀ κατσίγαρου 2^{ου} τεστ

Κατσίγαρος 2^ο Τεστ					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
5	10	10	10	0,9	0,5
2,5	10	10	10		
1,25	10	8	8		
0,625	10	2	6		
0,315	10	0	2		

Πίνακας 4.11 : LC₅₀ αποβλήτων ελαιουργείου 1^{ου} τεστ

Απόβλητα Ελαιουργείου 1^ο Τεστ					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
1	10	0	3	ND*	ND*
0,5	10	0	0		
0,25	10	0	0		
0,125	10	0	0		
0,062	10	0	0		

Πίνακας 4.12 : LC₅₀ αποβλήτων ελαιουργείου 2^{ου} τεστ

Απόβλητα Ελαιουργείου 2^ο Τεστ					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	10	10	-	-
50	10	10	10		
25	10	10	10		
12,5	10	10	10		
6,25	10	10	10		

Πίνακας 4.13 : LC₅₀ αποβλήτων ελαιουργείου 6,25-1%

Απόβλητα Ελαιουργείου 6,25-1%					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
6,25	10	10	10	2,5	1,5
1	10	0	3		

Πίνακας 4.14 : LC₅₀ αποβλήτων βαφείου

Απόβλητα Βαφείου					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
100	10	4	8	ND*	81,4
50	10	10	10		
25	10	10	10		
12,5	10	10	10		
6,25	10	10	10		

Τα απόβλητα χυμών πορτοκαλιού προκάλεσαν την μεγαλύτερη θνησιμότητα στα Daphnia, κυρίως λόγω της φύσης τους, καθώς αιωρούμενα σωματίδια κολλούσαν πάνω στο σώμα των Daphnia και εμποδίζαν την κίνησή τους και όπως είδαμε παραπάνω το δείγμα περιείχε πολύ μεγάλη ποσότητα TSS (πίνακας 4.3). Έτσι εμφανίζουν το μεγαλύτερο LC₅₀, 0,6% για τις 24 ώρες και 0,4% για τις 48 (πίνακας 4.8).

Το δείγμα του κατσίγαρου είναι επίσης εξαιρετικά τοξικό, όπως και το δείγμα των αποβλήτων ελαιουργείου. Για τα συγκεκριμένα δείγματα χρειάστηκε να γίνουν δύο τεστ για το καθένα, γιατί έπρεπε να πραγματοποιηθούν διαφορετικές αραιώσεις στα δείγματα. Στον κατσίγαρο η αρχική αραιώση στο πρώτο τεστ ήταν 1:150 (πίνακας 4.9), ή οποία ήταν πολύ μεγάλη και δεν προκάλεσε καμία θνησιμότητα, εκτός από την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Έτσι στο τεστ 2 έγινε 1:20 αραιώση (πίνακας 4.10) και έχουμε LC₅₀ 0,9% για τις 24 ώρες και 0,5% για τις 48. Στα απόβλητα ελαιουργείου η αρχική αραιώση στο τεστ 1 ήταν 1:100 (πίνακας 4.11), η οποία επίσης ήταν πολύ μεγάλη και έτσι είχαμε μηδαμινή θνησιμότητα, με εξαίρεση τον θάνατο τριών Daphnia στην συγκέντρωση 1% στις 48 ώρες. Στο τεστ 2 δεν πραγματοποιήθηκε αραιώση (πίνακας 4.12), γεγονός που προκάλεσε ακαριαία θνησιμότητα στα Daphnia, έτσι δεν πήραμε αποτέλεσμα. Για να βγάλουμε αποτέλεσμα για αυτό το δείγμα εισήγαμε στο λογισμικό την θνησιμότητα στην

συγκέντρωση 6,25% του δεύτερου τεστ και στην συγκέντρωση 1% του πρώτου. Έτσι πήραμε αποτέλεσμα LC₅₀ 2,5% για τις 24 ώρες κι 1,5% για τις 48 (πίνακας 4.13).

Τέλος, τα απόβλητα βαφείου παρουσιάζουν πολύ μικρή τοξικότητα, σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα βιομηχανικών αποβλήτων (πίνακας 4.14).

- Δείγμα ελέγχου :

Πίνακας 4.15 : LC₅₀ δείγματος ελέγχου διχρωμικού καλίου

Διχρωμικό Κάλιο					
Συγκέντρωση	Αριθμός Daphnia	Αριθμός Νεκρών		LC ₅₀	
%		24h	48h	24h	48h
3,2	10	9	9	1,8	1,3
1,8	10	5	8		
1	10	2	3		
0,56	10	1	2		
0,32	10	0	0		

Το τεστ με το δείγμα ελέγχου (διχρωμικό κάλιο) πραγματοποιήθηκε, όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος, για να γίνει έλεγχος της εγκυρότητας απόκρισης της βιοδοκιμής υπό ακραίες συνθήκες και όπως βλέπουμε η κατανομή της θνησιμότητας σε σχέση με την συγκέντρωση είναι η επιθυμητή (πίνακας 4.15).

4.2.2 Microtox Test

Με το Microtox test εξετάστηκαν όλα τα δείγματα και τα EC₅₀, που υπολογίστηκαν, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, σε όσα δείγματα έγινε το comparison test, όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος, παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ του δείγματος του αποβλήτου και του τυφλού δείγματος :

- Αστικά λύματα, 1^η δειγματοληψία :

Πίνακας 4.16 : Αποτελέσματα αστικών λυμάτων 1^{ης} δειγματοληψίας

Δείγμα	EC ₅₀		Τύπος Τεστ
	5 min	15min	
Πρωτοβάθμιο	13,4	9,5	5-15min Basic 81.9% Test
Βοθρόλυμα	10,5	5,8	5-15min Basic 81.9% Test
Ανεπεξέργαστο	60,2	56,1	5-15min Basic 81.9% Test

Δείγμα	Διαφορά %		Τύπος Τεστ
	5min	15min	
Δευτεροβάθμιο	ND*	ND*	5-15min Comparison Test
Χλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	ND*	ND*	5-15min Comparison Test
Αποχλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	ND*	ND*	5-15min Comparison Test
Βοθρόλυμα	82,2	91,6	5-15min Comparison Test

- Αστικά λύματα, 2^η δειγματοληψία :

Πίνακας 4.17 : Αποτελέσματα αστικών λυμάτων 2^{ης} δειγματοληψίας

Δείγμα	EC ₅₀		Τύπος Τεστ
	5 min	15min	
Πρωτοβάθμιο	29,6	22,1	5-15min Basic 81.9% Test
Βοθρόλυμα	1,2	1,4	5-15min Basic 81.9% Test
Ανεπεξέργαστο	10,2	8,1	5-15min Basic 81.9% Test

Δείγμα	Διαφορά %		Τύπος Τεστ
	5min	15min	
Χλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	0,7	ND*	5-15min Comparison Test
Αποχλωριωμένο Δευτεροβάθμιο	4,2	3,2	5-15min Comparison Test

Παρατηρούμε στους πίνακες 4.16 και 4.17 ότι από τα αστικά λύματα, την μεγαλύτερη τοξικότητα την παρουσιάζει το βοθρόλυμα, όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία. Όσον αφορά τα δείγματα από την δευτεροβάθμια επεξεργασία, τα οποία καταλήγουν στην θάλασσα, παρουσιάζουν ελάχιστη έως καθόλου τοξικότητα. Βλέπουμε την πολύ μεγάλη διαφορά στην τοξικότητα μεταξύ του βοθρολύματος και των δευτεροβάθμιων λυμάτων, όπως προέκυψε από τα 5-15min Comparison Test που πραγματοποιήθηκαν για τα συγκεκριμένα δείγματα (πίνακας 4.16).

Στην πρώτη δειγματοληψία βλέπουμε ότι το ανεπεξέργαστο λύμα είναι ελάχιστα τοξικό, σε αντίθεση με το πρωτοβάθμιο το οποίο παρουσιάζεται πιο τοξικό (πίνακας 4.16). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την διαφορά που έχουν στο COD (πίνακας 4.1), όπως παρατηρήσαμε και επεξηγήσαμε παραπάνω. Μπορούμε να θεωρήσουμε πιο αντιπροσωπευτικά τα αποτελέσματα της τοξικότητας των δειγμάτων του ανεπεξέργαστου και του πρωτοβάθμιου λύματος που πήραμε από την δεύτερη δειγματοληψία.

Επίσης παρατηρούμε διαφορά στο μέγεθος της τοξικότητας του βοθρολύματος της πρώτης και της δεύτερης δειγματοληψίας. Αυτό προέκυψε γιατί στο βιολογικό καθαρισμό Χανίων αποχετεύονται διάφορες βιομηχανίες και καταλήγουν λύματα με διαφορετικό επίπεδο ρύπανσης κάθε μέρα, έτσι έγινε και τις ημέρες που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες.

- Παραπροϊόντα χλωρίωσης :

Πίνακας 4.18 : Αποτελέσματα παραπροϊόντων χλωρίωσης

Δείγμα	Διαφορά %		Τύπος Τεστ
	5min	15min	
THM 10ppb	ND*	ND*	5-15min Comparison Test
THM 100ppb	36,9	29,9	5-15min Comparison Test
DBPs	30,3	55,4	5-15min Comparison Test

Στον πίνακα 4.18 βλέπουμε ότι το δείγμα THM 10ppb δεν ήταν τοξικό, ενώ των 100ppb παρουσιάζει μικρή διαφορά από το τυφλό, η οποία όμως ελαττώνεται στα 15 λεπτά, πράγμα που συμβαίνει γιατί το 5-15min Comparison Test είναι ποιοτικό και όχι ποσοτικό τεστ και το θεωρούμε πειραματικό σφάλμα.

Το μίγμα DBPs επίσης δεν είναι τοξικό, αν και βλέπουμε μια μεγάλη αύξηση στα 15 λεπτά, το οποίο θεωρείται επίσης πειραματικό σφάλμα για τους λόγους που αναφέρθηκαν λίγο παραπάνω.

- Βιομηχανικά υγρά απόβλητα :

Πίνακας 4.19 : EC₅₀ βιομηχανικών υγρών αποβλήτων

Δείγμα	EC ₅₀		Τύπος Τεστ
	5min	15min	
Βαφείου	79,0	52,5	5-15min Basic 81.9% Test
Ελαιουργείου	0,2	0,3	5-15min Basic 81.9% Test
Κατσίγαρος	0,2	0,2	5-15min Basic 81.9% Test
Βιομ. Χυμών πορτοκαλιού 1 : 10	1,2	1,3	5-15min Basic 81.9% Test

Στο πίνακα 4.19 παρατηρούμε ότι και στα τεστ που έγιναν με το Microtox έδειξαν πως τα απόβλητα βαφείου είναι τα λιγότερο τοξικά, αν και το EC₅₀ μειώνεται αρκετά στις 48 ώρες. Τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν ακραία τοξικότητα, με πιο τοξικό το δείγμα της βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού, για το οποίο χρειάστηκε να γίνει μια αρχική 1:10 αραίωση, καθώς το μηχάνημα δεν έχει την δυνατότητα να μετρήσει τόσο μεγάλη τοξικότητα.

Σημείωση: Σε κάποια δείγματα η τοξικότητα είναι πολύ άμεση και το μηχάνημα δεν μπορεί να μετρήσει με ακρίβεια την διαφορά στο EC₅₀, μεταξύ 5 και 15 λεπτών και έτσι εμφανίζεται το φαινόμενο να μεγαλώνει το EC₅₀, δηλαδή να ελαττώνεται η τοξική επίδραση, όσο περνάει η ώρα.

***ND :** Δεν είναι δυνατή η εκτίμηση της τοξικότητας γιατί το 100% του δείγματος προκαλεί λιγότερο από 50% θνησιμότητα στους οργανισμούς.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

5.1 Συμπεράσματα

- Τα αστικά λύματα, στα αρχικά στάδια της επεξεργασίας, παρουσιάζουν κάποια τοξικότητα, αλλά μετά την δευτεροβάθμια επεξεργασία παύουν να είναι τοξικά και έτσι δεν δημιουργούν πρόβλημα στους υδάτινους αποδέκτες, όπου διοχετεύονται.
- Τα δείγματα των παραπροϊόντων της χλωρίωσης του πόσιμου νερού, THM και DBPs, που εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις σύμφωνα με τα υπάρχοντα όρια που προβλέπει η νομοθεσία, δεν έδειξαν να είναι ιδιαίτερα τοξικά.
- Από τα βιομηχανικά υγρά απόβλητα που εξετάστηκαν, τα πιο τοξικά ήταν τα απόβλητα της βιομηχανίας χυμών πορτοκαλιού και ακολουθούν ο κατσίγαρος και τα απόβλητα ελαιουργείου. Είναι σίγουρο πως αν διοχετεύονταν σε κάποιον υδάτινο αποδέκτη, θα είχαν ιδιαίτερα τοξική επίδραση στους οργανισμούς του οικοσυστήματός του. Τα απόβλητα βαφείου δεν παρουσίασαν μεγάλη τοξικότητα.
- Το Microtox Test είναι πολύ εύχρηστο και γρήγορο στη εξαγωγή αποτελεσμάτων, διαρκεί περίπου 20 λεπτά. Είναι όμως σχετικά ακριβό, καθώς απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και ειδικά διαλύματα τα οποία πρέπει να προμηθεύονται από την εταιρία παραγωγής τους.
- Το τεστ ακινητοποίησης των *Daphnia magna* είναι επίσης εύχρηστο, αλλά διαρκεί πολύ περισσότερο χρόνο (5 ημέρες) και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την μεταφορά των ατόμων της *Daphnia* στο δείγμα και κατά την καταμέτρηση των ακινητοποιημένων ατόμων, ειδικά σε περιπτώσεις που το δείγμα είναι πολύ θολό. Επίσης η επαναληψιμότητα ήταν δύσκολη. Το πλεονέκτημα του τεστ ήταν ότι το μόνο διάλυμα (freshwater) που απαιτούσε

για την καλλιέργεια των *Daphnia* και την αραίωση των δειγμάτων, ήταν δυνατό να παρασκευαστεί ανά πάσα στιγμή με υλικά που υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο.

- Τα αποτελέσματα που έδωσαν οι δύο τύποι βιοδοκιμών που χρησιμοποιήθηκαν, είναι συγκρίσιμα σε ικανοποιητικό βαθμό και ταυτίζονται όσον αφορά το μέγεθος της τοξικότητας των δειγμάτων των αποβλήτων.

5.2 Προτάσεις

- Επιπλέον βιοδοκιμές, με χρήση άλλων οργανισμών και μεθόδων(π.χ. *Artemia Salina*, πείραμα της ανάπτυξης αλγών κ.α.), για την εκτίμηση της τοξικότητας των δειγμάτων.
- Μελέτη της τοξικότητας και άλλων δειγμάτων, όπως νοσοκομειακών αποβλήτων, αποβλήτων μεταλλείων και μονάδων επεξεργασίας μετάλλων, αποβλήτων βυρσοδεψείων κ.α.
- Μελέτη της τοξικότητας των φθοριούχων ενώσεων που περιέχονται στο πόσιμο νερό και προέρχονται από την τεχνική φθορίωση του για την καταπολέμηση της τερηδόνας.
- Ευρύτερη χρήση των βιοδοκιμών από βιομηχανίες που παράγουν επικίνδυνα υγρά απόβλητα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

A. ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Κούγκολος Α.Γ., *Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική*, Εκδόσεις Τζιόλα 2005.
- Σκώττη Ε., *Εκτίμηση της τοξικότητας υγρών αποβλήτων ελαιουργείων μετά από συν-επεξεργασία τους με υγρά αστικά απόβλητα*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2005.
- Καλαϊτζάκης Μ., *Ηλεκτρολυτική επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2005.
- Μαρκαντωνάτος Γ., *Επεξεργασία και διάθεση υγρών αποβλήτων*, Αθήνα 1990.
- Γιδαράκος Ε., *Επεξεργασία και Διαχείριση Τοξικών και Επικίνδυνων Αποβλήτων*, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2004.
- Γκέκας Β, Κατσιβέλα Ε.Σ., Φρατζεσκάκη Ν.Ε., *Τεχνολογίες Επεξεργασίας Τοξικών Αποβλήτων*, Εκδόσεις Τζιόλα 2002.
- Σκορδύλης Α., Ισαακάκης Α., *Τοξικά και επικίνδυνα απόβλητα στον Ν.Αττικής*, Συνέδριο Χημικά (Τοξικά) Στο Περιβάλλον, σελ 19, 1990.
- Βελέντζα Π.Ι., *Τοξικές χημικές ουσίες στο περιβάλλον (νερό και απόβλητα): ιδιότητες και επιπτώσεις στην υγεία*, Συνέδριο Χημικά (Τοξικά) Στο Περιβάλλον, σελ 544, 1990.

B. ΔΙΕΘΝΕΙΣ (ΑΓΓΛΙΚΕΣ) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Parish P.R., *Acute Toxicity Test, Fundamentals of Aquatic Toxicology*, New York: Hemisphere, p. 31, 1989
- Bae J.S., Freeman H.S., *Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the Daphnia magna*, Dyes and Pigments, Volume 73, Issue 1, p. 81-85, 2007.
- Gotsi M., Kalogerakis N., Psilaki E., Samaras P. Mantzavinos D., *Electrochemical oxidation of olive oil mill wastewaters*, Water Research, Volume 39, Issue 17, p. 4177-4187, October 2005.
- Tsiridis V., Petala M., Samaras P., Hadjispyrou S., Sakellaropoulos G, Kungolos A., *Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on Vibrio fischeri*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 63, Issue 1, p. 158-167, January 2006.

- Villegas-Navarro A., Rodríguez Santiago M., Ruiz Pérez F., Rodríguez Torres R., Dieck Abularach T., Reyes J.L., *Determination of LC50 from Daphnia magna in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents*, Environment International, Volume 23, Issue 4, p. 535-540, 1997.
- Task Force on Biomonitoring in the Water Environment, *Biomonitoring in the Water Environmen*, Water Environment Federation, 1997.
- U.S. Environmental Protection Agency, *Ambient Water Quality Criteria*, October 1980.
- Bulich A., Baily G., *Environmental toxicity assessment using luminescent bacteria*, Environmental Toxicology Assessment, p. 29-40, 1997.
- Stuhlfauth T., *Ecotoxicological monitoring of industrial effluents*, Environmental Toxicology Assessment, p. 187-198, 1997.
- American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environmental Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington DC, USA, 18th ed., 1992.

Γ. ΑΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <http://www.epa.gov>
- <http://www.pesticideinfo.org>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MICROTOX TEST**

STANDARD TEST PHENOL 50ppm

Phenol (5min Basic Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	91.11	80.80	0.8868 #	
1	5.625	86.75	64.99	0.1838 #	15.52%
2	11.25	82.12	50.89	0.4311 #	30.12%
3	22.50	94.21	45.29	0.8448 #	45.79%
4	45.00	106.68	33.68	1.809 #	64.40%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 25.83ppm (95% confidence range: 22.81 to 29.25)

Phenol (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.15	108.82	1.181 #	
1	0.3199	92.91	103.69	0.0581 #	5494%
2	0.6398	82.95	94.72	0.0341 *	3303%
3	1.280	91.27	97.99	0.0999 #	9084%
4	2.559	88.46	87.27	0.1970 #	16.46%
5	5.119	95.08	87.59	0.2819 #	21.99%
6	10.24	98.11	66.24	0.7491 #	42.83%
7	20.48	86.27	43.16	1.360 #	57.63%
8	40.95	82.67	23.83	3.097 #	75.59%
9	81.90	95.94	14.20	6.979 #	87.47%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.15	102.48	1.112 #	
1	0.3199	92.91	99.10	0.0426 *	4089%
2	0.6398	82.95	90.57	0.0185 *	1820%
3	1.280	91.27	92.93	0.0922 #	8445%
4	2.559	88.46	84.85	0.1594 #	13.75%
5	5.119	95.08	86.54	0.2218 #	18.16%
6	10.24	98.11	66.38	0.6437 #	39.16%
7	20.48	86.27	43.44	1.209 #	54.72%
8	40.95	82.67	23.17	2.968 #	74.80%
9	81.90	95.94	13.60	6.845 #	87.25%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 12.97% (95% confidence range: 9.385 to 17.92)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 15.21% (95% confidence range: 12.45 to 18.58)

ΑΣΤΙΚΑ ΛΥΜΑΤΑ 1^H ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

1ο βήμα (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.15	99.87	1.084 #	
1	0.3199	92.39	98.01	0.0216 *	2.117%
2	0.6398	83.71	84.19	0.0776 #	7.201%
3	1.280	85.52	89.74	0.0328 *	3.177%
4	2.559	100.15	100.63	0.0786 #	7.288%
5	5.119	118.25	106.40	0.2045 #	16.98%
6	10.24	69.92	41.54	0.8242 #	45.18%
7	20.48	83.55	34.47	1.627 #	61.93%
8	40.95	86.74	19.68	3.777 #	79.07%
9	81.90	98.99	11.69	8.177 #	89.10%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.15	114.06	1.238 #	
1	0.3199	92.39	111.97	0.0213 *	2.087%
2	0.6398	83.71	94.58	0.0955 #	8.718%
3	1.280	85.52	100.58	0.0524 #	4.982%
4	2.559	100.15	110.49	0.1219 #	10.87%
5	5.119	118.25	120.27	0.2170 #	17.83%
6	10.24	69.92	42.41	1.041 #	51.00%
7	20.48	83.55	30.48	2.393 #	70.53%
8	40.95	86.74	12.46	7.617 #	88.39%
9	81.90	98.99	5.64	20.72 #	95.40%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 13.38% (95% confidence range: 8.254 to 21.70)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 9.534% (95% confidence range: 6.332 to 14.36)

Βοθρόλυμα (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.71	102.40	1.105 #	
1	0.3199	87.83	89.16	0.0880 #	8.092%
2	0.6398	88.91	85.78	0.1448 #	12.65%
3	1.280	82.67	74.80	0.2207 #	18.08%
4	2.559	84.16	68.17	0.3636 #	26.66%
5	5.119	84.61	60.26	0.5508 #	35.52%
6	10.24	79.77	46.27	0.9042 #	47.48%
7	20.48	76.86	32.99	1.573 #	61.14%
8	40.95	80.49	23.81	2.734 #	73.22%
9	81.90	84.21	16.81	4.533 #	81.93%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.71	108.67	1.172 #	
1	0.3199	87.83	89.30	0.1529 #	13.26%
2	0.6398	88.91	86.42	0.2059 #	17.08%
3	1.280	82.67	73.39	0.3204 #	24.26%
4	2.559	84.16	67.01	0.4721 #	32.07%
5	5.119	84.61	54.10	0.8332 #	45.45%
6	10.24	79.77	39.57	1.363 #	57.68%
7	20.48	76.86	24.79	2.634 #	72.48%
8	40.95	80.49	17.12	4.511 #	81.85%
9	81.90	84.21	12.36	6.986 #	87.48%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 10.55% (95% confidence range: 9.825 to 11.33)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 5.790% (95% confidence range: 5.062 to 6.624)

2ο βήμα (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	94.13	52.73	36.35
Control	91.53	51.03	36.60
Control	91.17	50.53	36.48
Control	89.83	48.80	36.03
Control	90.08	47.60	36.58
Mean	91.35	50.14	36.41
Sample	81.18	108.70	134.08
Sample	86.56	113.66	140.33
Sample	93.33	124.36	155.17
Sample	85.81	119.63	148.78
Sample	86.36	122.09	151.20
Mean	86.65	123.74	153.42

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = -146.8 (-171.0 to -122.6) - Hormesis

15: Difference = -321.4 (-356.6 to -286.2) - Hormesis

Αποχλωρομένο (5-15min Comparison Test 1)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	92.54	89.33	97.54
Control	94.79	93.31	104.06
Control	92.46	92.00	102.06
Control	91.87	91.86	103.48
Control	114.87	116.19	121.81
Mean	97.31	96.54	105.79
Sample	94.65	100.72	115.97
Sample	94.33	100.22	114.13
Sample	93.13	100.05	113.31
Sample	93.66	101.35	116.46
Sample	89.94	99.52	112.99
Mean	93.14	104.67	119.47

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = -8.421 (-25.39 to 8.551) - Hormesis

15: Difference = -12.94 (-27.30 to 1.426) - Hormesis

Απογλωρισμένο (5-15min Comparison Test 2)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	92.75	88.18	84.97
Control	73.47	70.16	68.43
Control	74.95	71.02	69.22
Control	91.20	89.66	88.42
Control	90.90	85.55	84.59
Mean	84.65	80.91	79.13
Sample	81.97	95.00	94.33
Sample	85.56	100.37	100.54
Sample	88.96	105.73	105.58
Sample	90.62	101.93	103.25
Sample	88.47	102.95	103.37
Mean	87.12	98.25	98.46

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = -21.43 (-40.53 to -2.328) - Hormesis

15: Difference = -24.44 (-44.47 to -4.414) - Hormesis

Βοθρόλυμα (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	93.40	94.78	99.39
Control	91.59	95.42	99.06
Control	92.69	96.61	100.67
Control	102.46	102.96	108.99
Control	96.59	98.96	104.48
Mean	95.35	97.75	102.52
Sample	94.78	21.65	9.23
Sample	93.87	19.05	9.09
Sample	86.14	14.65	7.25
Sample	98.24	16.08	9.03
Sample	96.19	14.18	7.81
Mean	93.84	17.39	8.62

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = 82.21 (74.50 to 89.92)

15: Difference = 91.60 (84.67 to 98.53)

Χλωριομένο (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	92.84	82.70	64.13
Control	83.35	75.67	59.21
Control	78.91	79.50	64.73
Control	104.72	73.19	64.62
Control	87.66	78.23	58.00
Mean	89.50	77.86	62.14
Sample	86.99	110.85	130.80
Sample	77.72	100.86	118.88
Sample	104.40	133.52	156.88
Sample	87.95	115.74	136.23
Sample	87.24	118.02	60.66
Mean	88.86	116.62	121.55

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = -49.79 (-77.64 to -21.94) - Hormesis

15: Difference = -95.61 (-184.5 to -6.745) - Hormesis

Raw (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.31	98.99	1.061 #	
1	0.3199	90.41	95.37	0.0056 *	0.5666%
2	0.6398	79.93	85.70	-0.0105 *	-1067%
3	1.280	69.55	75.17	-0.0184 *	-1879%
4	2.559	75.27	82.60	-0.0332 *	-3442%
5	5.119	79.63	81.34	0.0385 *	3714%
6	10.24	79.81	72.80	0.1630 #	14.02%
7	20.48	72.89	57.44	0.3462 #	25.72%
8	40.95	82.45	54.53	0.6041 #	37.66%
9	81.90	81.55	35.44	1.441 #	59.04%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.31	102.87	1.102 #	
1	0.3199	90.41	96.59	0.0319 *	3093%
2	0.6398	79.93	90.07	-0.0216 *	-2214%
3	1.280	69.55	83.36	-0.0801 *	-8718%
4	2.559	75.27	86.84	-0.0444 *	-4650%
5	5.119	79.63	84.35	0.0407 *	3917%
6	10.24	79.81	74.90	0.1747 #	14.87%
7	20.48	72.89	58.07	0.3838 #	27.74%
8	40.95	82.45	54.70	0.6617 #	39.82%
9	81.90	81.55	35.74	1.516 #	60.25%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 60.16% (95% confidence range: 46.34 to 78.10)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 56.13% (95% confidence range: 44.36 to 71.03)

ΑΣΤΙΚΑ ΔΥΜΑΤΑ 2^H ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

1οβάθμιο (5-15min Basic Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.99	100.24	1.066 #	
1	5.625	108.50	92.26	0.2542 #	20.27%
2	11.25	89.72	63.71	0.5019 #	33.42%
3	22.50	99.56	58.91	0.8024 #	44.52%
4	45.00	102.19	46.30	1.354 #	57.52%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.99	93.67	0.9966 #	
1	5.625	108.50	80.42	0.3446 #	25.63%
2	11.25	89.72	54.63	0.6367 #	38.90%
3	22.50	99.56	50.68	0.9578 #	48.92%
4	45.00	102.19	37.18	1.739 #	63.49%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 29.58% (95% confidence range: 23.23 to 37.66)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 22.12% (95% confidence range: 18.25 to 26.81)

2οβάθμιο Απογλωρισμένο (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	93.33	95.82	98.38
Control	86.13	88.37	91.37
Control	94.29	95.91	97.71
Control	94.29	95.07	96.50
Control	84.89	90.57	91.29
Mean	90.59	93.15	95.05
Sample	91.78	88.77	93.54
Sample	88.37	85.41	87.59
Sample	95.16	93.19	96.74
Sample	92.08	93.98	94.07
Sample	86.73	85.83	89.27
Mean	90.82	89.20	92.00

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = 4.237 (-5.001 to 13.48)

15: Difference = 3.209 (-5.507 to 11.93)

2οβάθμιο Χλωριομένο (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	92.93	100.93	101.77
Control	101.18	122.67	118.39
Control	106.16	113.57	116.97
Control	99.46	114.00	111.86
Control	108.95	125.28	125.06
Mean	101.74	115.29	114.81
Sample	89.48	99.50	96.92
Sample	96.22	107.35	112.68
Sample	102.95	117.15	118.35
Sample	99.74	111.91	112.26
Sample	89.45	104.00	102.00
Mean	95.57	114.53	115.02

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = 0.6604 (-16.16 to 17.48)

15: Difference = -0.1799 (-18.20 to 17.84) - Hormesis

Raw (5-15min Basic Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.71	107.27	1.145 #	
1	5.625	71.68	52.09	0.5752 #	36.52%
2	11.25	73.76	41.59	1.030 #	50.74%
3	22.50	77.53	27.56	2.220 #	68.95%
4	45.00	109.47	21.31	4.880 #	82.99%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.71	107.65	1.149 #	
1	5.625	71.68	48.06	0.7133 #	41.63%
2	11.25	73.76	36.05	1.350 #	57.45%
3	22.50	77.53	21.11	3.219 #	76.30%
4	45.00	109.47	12.52	9.044 #	90.04%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 10.18% (95% confidence range: 8.467 to 12.24)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 8.115% (95% confidence range: 5.864 to 11.23)

Βοθρόλυμα (5-15min Basic Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	97.15	99.83	1.028 #	
1	5.625	107.32	30.93	2.565 #	71.95%
2	11.25	116.70	29.26	3.098 #	75.60%
3	22.50	119.71	22.25	4.529 #	81.91%
4	45.00	179.22	21.21	7.683 #	88.48%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	97.15	102.50	1.055 #	
1	5.625	107.32	32.55	2.479 #	71.25%
2	11.25	116.70	30.95	2.978 #	74.86%
3	22.50	119.71	23.38	4.402 #	81.49%
4	45.00	179.22	21.95	7.615 #	88.39%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 1.248% (95% confidence range: 0.2336 to 6.669)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 1.405% (95% confidence range: 0.2618 to 7.540)

ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΧΛΩΡΙΩΣΗΣ

THM 10ppb (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	95.49	94.98	108.10
Control	96.86	95.49	105.96
Control	94.20	95.58	101.47
Control	94.19	101.45	106.00
Control	93.96	102.82	107.94
Mean	94.94	98.06	105.89
Sample	87.85	102.64	101.69
Sample	84.29	96.87	100.00
Sample	90.41	102.42	98.60
Sample	88.82	102.47	102.63
Sample	92.09	103.06	103.02
Mean	88.69	108.17	107.85

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = -10.31 (-17.97 to 2.639) - Hormesis

15: Difference = -1.844 (-6.913 to 3.224) - Hormesis

THM 100ppb (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	94.26	88.54	86.46
Control	91.68	89.29	86.33
Control	93.39	86.93	89.67
Control	92.43	87.89	87.38
Control	88.86	88.16	86.49
Mean	92.12	88.16	87.27
Sample	92.10	57.48	61.06
Sample	92.17	57.17	62.19
Sample	88.98	55.35	60.48
Sample	88.43	50.34	55.83
Sample	89.12	51.96	59.87
Mean	90.16	55.62	61.16

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = 36.91 (30.43 to 43.39)

15: Difference = 29.91 (24.78 to 35.04)

DBPS (5-15min Comparison Test)

Sample	lo	lt (5)	lt (15)
Control	92.35	91.10	91.42
Control	92.29	86.32	95.87
Control	93.36	91.47	97.12
Control	88.27	89.37	96.03
Control	90.16	91.82	94.51
Mean	91.29	90.02	94.99
Sample	81.45	58.08	37.70
Sample	75.47	54.80	35.48
Sample	81.47	56.16	38.03
Sample	84.80	59.06	41.78
Sample	85.86	56.24	39.04
Mean	81.81	62.77	42.39

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

5: Difference = 30.27 (24.97 to 35.57)

15: Difference = 55.37 (49.63 to 61.11)

ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Απόβλητα Βαφείου (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.34	110.13	1.180 #	
1	0.3199	92.78	106.84	0.0246 *	2.402%
2	0.6398	89.69	106.91	-0.0101 *	-1.027%
3	1.280	90.57	107.86	-0.0092 *	-0.9342%
4	2.559	85.71	102.09	-0.0094 *	-0.9517%
5	5.119	93.00	109.05	0.0062 *	0.6187%
6	10.24	93.58	98.22	0.1241 #	11.04%
7	20.48	90.14	82.26	0.2929 #	22.65%
8	40.95	93.27	70.18	0.5681 #	36.23%
9	81.90	103.29	63.02	0.9338 #	48.29%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.34	105.18	1.127 #	
1	0.3199	92.78	104.57	-0.0002 *	-0.0201%
2	0.6398	89.69	102.25	-0.0115 *	-1.171%
3	1.280	90.57	102.64	-0.0056 *	-0.5696%
4	2.559	85.71	95.39	0.0125 *	1.234%
5	5.119	93.00	100.69	0.0407 *	3.919%
6	10.24	93.58	85.34	0.2357 #	19.07%
7	20.48	90.14	68.00	0.4937 #	33.05%
8	40.95	93.27	55.66	0.8883 #	47.04%
9	81.90	103.29	50.51	1.304 #	56.60%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 79.04% (95% confidence range: 49.72 to 125.6)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 52.52% (95% confidence range: 34.80 to 79.27)

Απόβλητα Βαφείου (5-15min Basic 81.9% Test 2)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.28	106.82	1.145 #	
1	0.3199	91.09	109.30	-0.0456 *	-4.782%
2	0.6398	91.17	107.26	-0.0266 *	-2.736%
3	1.280	88.73	105.40	-0.0359 *	-3.730%
4	2.559	90.78	105.64	-0.0159 *	-1.619%
5	5.119	93.23	105.28	0.0140 *	1.389%
6	10.24	92.10	97.39	0.0829 #	7.660%
7	20.48	90.66	82.06	0.2652 #	20.96%
8	40.95	90.63	71.13	0.4591 #	31.46%
9	81.90	90.23	55.95	0.8468 #	45.85%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	93.28	98.88	1.060 #	
1	0.3199	91.09	102.10	-0.0542 *	-5.739%
2	0.6398	91.17	98.89	-0.0227 *	-2.325%
3	1.280	88.73	97.33	-0.0336 *	-3.480%
4	2.559	90.78	94.58	0.0174 *	1.715%
5	5.119	93.23	93.35	0.0586 #	5.542%
6	10.24	92.10	84.22	0.1592 #	13.73%
7	20.48	90.66	65.89	0.4585 #	31.44%
8	40.95	90.63	54.71	0.7560 #	43.05%
9	81.90	90.23	42.03	1.276 #	56.06%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 83.62% (95% confidence range: 39.83 to 175.6)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 53.30% (95% confidence range: 34.40 to 82.59)

Απόβλητα Ελαιουργείου (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.19	106.41	1.154 #	
1	0.3199	79.33	31.86	1.874 #	65.21%
2	0.6398	77.82	14.32	5.273 #	84.06%
3	1.280	79.13	4.39	19.81 #	95.19%
4	2.559	75.13	1.43	59.64 #	98.35%
5	5.119	80.82	0.31	299.9 *	99.67%
6	10.24	78.65	0.05	1815 *	99.94%
7	20.48	76.80	0.01	8864 *	99.99%
8	40.95	75.40	0.01	8702 *	99.99%
9	81.90	83.00	0.01	9579 *	99.99%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.19	110.17	1.195 #	
1	0.3199	79.33	37.24	1.546 #	60.72%
2	0.6398	77.82	12.41	6.494 #	86.66%
3	1.280	79.13	1.68	55.29 #	98.22%
4	2.559	75.13	0.21	426.5 *	99.77%
5	5.119	80.82	0.02	4828 *	99.98%
6	10.24	78.65	0.01	9398 *	99.99%
7	20.48	76.80	0.01	9177 *	99.99%
8	40.95	75.40	0.01	9010 *	99.99%
9	81.90	83.00	0.01	9918 *	99.99%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 0.2268% (95% confidence range: 0.1821 to 0.2824)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 0.2858% (95% confidence range: 0.0688 to 1.187)

Κατσίγαρος (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.56	104.57	1.130 #	
1	0.3199	85.82	23.33	3.156 #	75.94%
2	0.6398	76.82	10.43	7.321 #	87.98%
3	1.280	79.39	2.34	37.33 #	97.39%
4	2.559	77.49	0.11	794.9 *	99.87%
5	5.119	85.52	0.02	4830 *	99.98%
6	10.24	82.10	0.02	4637 *	99.98%
7	20.48	80.69	0.03	3038 *	99.97%
8	40.95	79.51	0.02	4490 *	99.98%
9	81.90	83.42	0.03	3140 *	99.97%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.56	110.40	1.193 #	
1	0.3199	85.82	27.37	2.740 #	73.26%
2	0.6398	76.82	8.99	9.192 #	90.19%
3	1.280	79.39	0.68	138.3 *	99.28%
4	2.559	77.49	0.02	4620 *	99.98%
5	5.119	85.52	0.02	5099 *	99.98%
6	10.24	82.10	0.02	4895 *	99.98%
7	20.48	80.69	0.02	4811 *	99.98%
8	40.95	79.51	0.02	4741 *	99.98%
9	81.90	83.42	0.02	4974 *	99.98%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 0.1883% (95% confidence range: 0.0081 to 4.361)

Calculations on 15 Mins. Data:

EC50 : 0.1796%

Calculated from two data points, therefore no confidence range given

Απόβλητα Χυμών Πορτ. (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.93	113.94	1.226 #	
1	0.3199	86.33	8.12	12.04 #	92.33%
2	0.6398	83.73	2.59	38.64 #	97.48%
3	1.280	83.50	0.99	102.4 *	99.03%
4	2.559	79.80	0.10	977.4 *	99.90%
5	5.119	85.84	0.02	5261 *	99.98%
6	10.24	81.35	0.02	4986 *	99.98%
7	20.48	81.85	0.03	3344 *	99.97%
8	40.95	87.37	0.02	5355 *	99.98%
9	81.90	85.85	0.02	5262 *	99.98%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.93	119.56	1.287 #	
1	0.3199	86.33	4.95	21.44	95.54%
2	0.6398	83.73	0.95	112.4 *	99.12%
3	1.280	83.50	0.13	825.4 *	99.88%
4	2.559	79.80	0.03	3421 *	99.97%
5	5.119	85.84	0.03	3680 *	99.97%
6	10.24	81.35	0.02	5232 *	99.98%
7	20.48	81.85	0.02	5264 *	99.98%
8	40.95	87.37	0.02	5619 *	99.98%
9	81.90	85.85	0.02	5522 *	99.98%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 0.0729%

Calculated from two data points, therefore no confidence range given

Statistical calculations could not be performed on the 15 Mins data

Απόβλητα Χυμών Πορτ. 1:10 (5-15min Basic 81.9% Test)

5 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.70	119.49	1.289 #	
1	0.3199	84.52	103.08	0.0569 #	5.384%
2	0.6398	88.06	91.90	0.2351 #	19.04%
3	1.280	83.43	52.46	1.050 #	51.22%
4	2.559	88.89	18.50	5.193 #	83.85%
5	5.119	94.84	4.85	24.21 #	96.03%
6	10.24	91.92	1.45	80.71 #	98.78%
7	20.48	90.07	0.43	269.0 *	99.63%
8	40.95	86.68	0.00	- *	-
9	81.90	94.34	0.01	- *	99.99%

15 min.

Sample	Conc	lo	lt	Gamma	% effect
Control	0.000	92.70	119.21	1.286 #	
1	0.3199	84.52	104.63	0.0388 *	3.736%
2	0.6398	88.06	97.65	0.1597 #	13.77%
3	1.280	83.43	61.56	0.7428 #	42.62%
4	2.559	88.89	17.90	5.386 #	84.34%
5	5.119	94.84	2.27	52.73 #	98.14%
6	10.24	91.92	0.44	267.7 *	99.63%
7	20.48	90.07	0.02	5790 *	99.98%
8	40.95	86.68	0.00	- *	-
9	81.90	94.34	0.01	- *	99.99%

- used in calculation; * - invalid data; D – deleted from calcs.

Calculations on 5 Mins. Data:

EC50 : 1.229% (95% confidence range: 1.156 to 1.308)

Calculations on 15 Mins. Data:

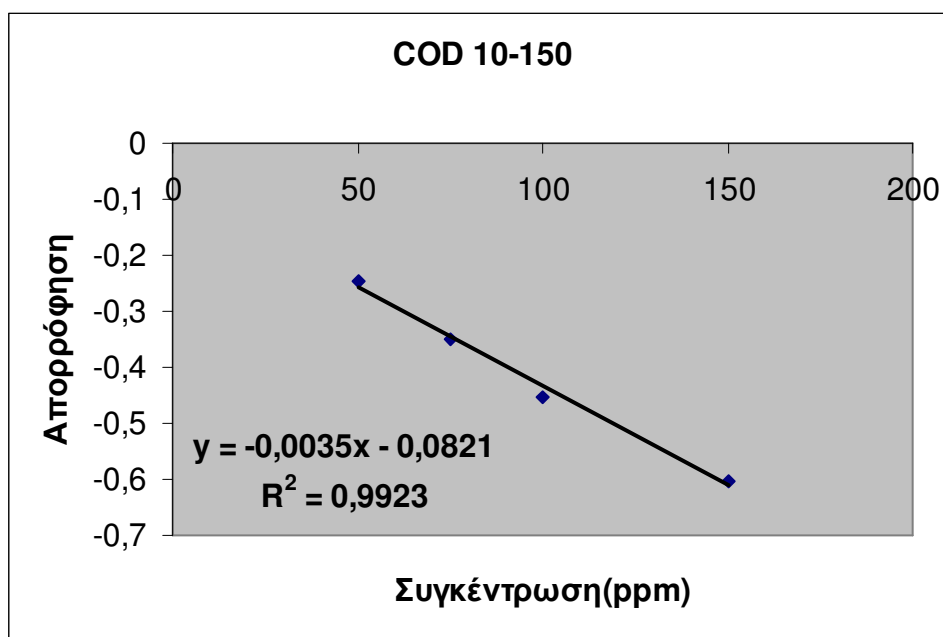
EC50 : 1.324% (95% confidence range: 1.065 to 1.648)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II : ΚΑΜΠΥΛΕΣ **ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ**

Συγκέντρωση COD 10 – 150

Πίνακας II.1 : Μέτρηση απορρόφησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 10-150ppm

Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση (nm)
50	-0,248
75	-0,349
100	-0,453
150	-0,602
10	-0,227
25	-0,299
125	-0,57

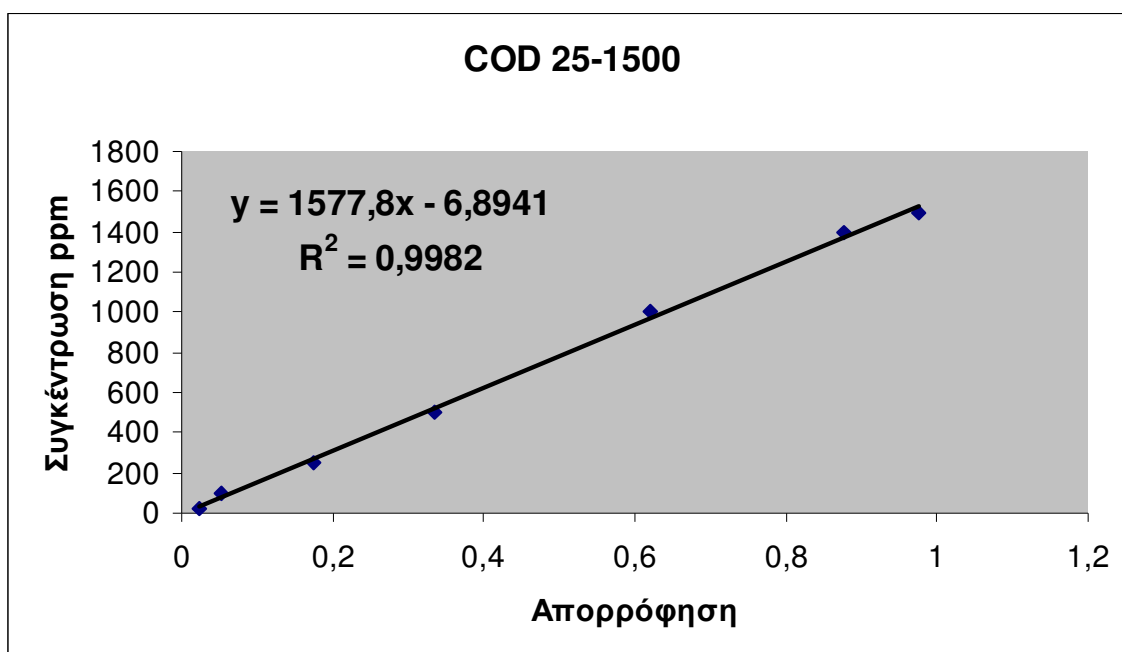


Σχήμα II.2 : Καμπύλη βαθμονόμησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 10-150ppm

Συγκέντρωση COD 25 – 1500

Πίνακας Π.3 : Μέτρηση απορρόφησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 25-1500ppm

Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση (nm)
25	0,024
100	0,052
250	0,176
500	0,335
1000	0,619
1400	0,876
1500	0,975

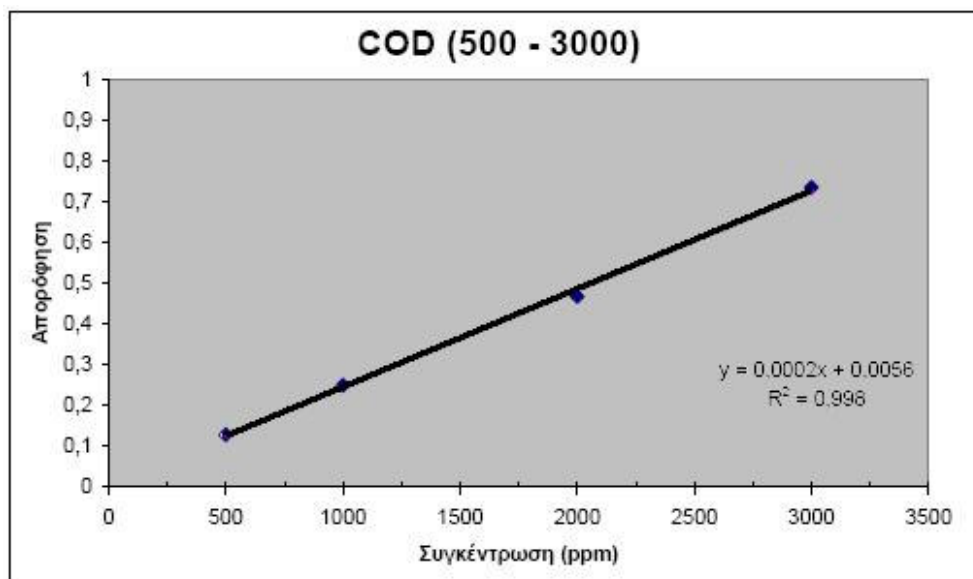


Σχήμα Π.4 : Καμπύλη βαθμονόμησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 25-1500ppm

Συγκέντρωση COD 500 – 3000

Πίνακας Π.5 : Μέτρηση απορρόφησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 500-3000ppm

Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση (nm)
500	0,129
1000	0,250
2000	0,468
3000	0,735

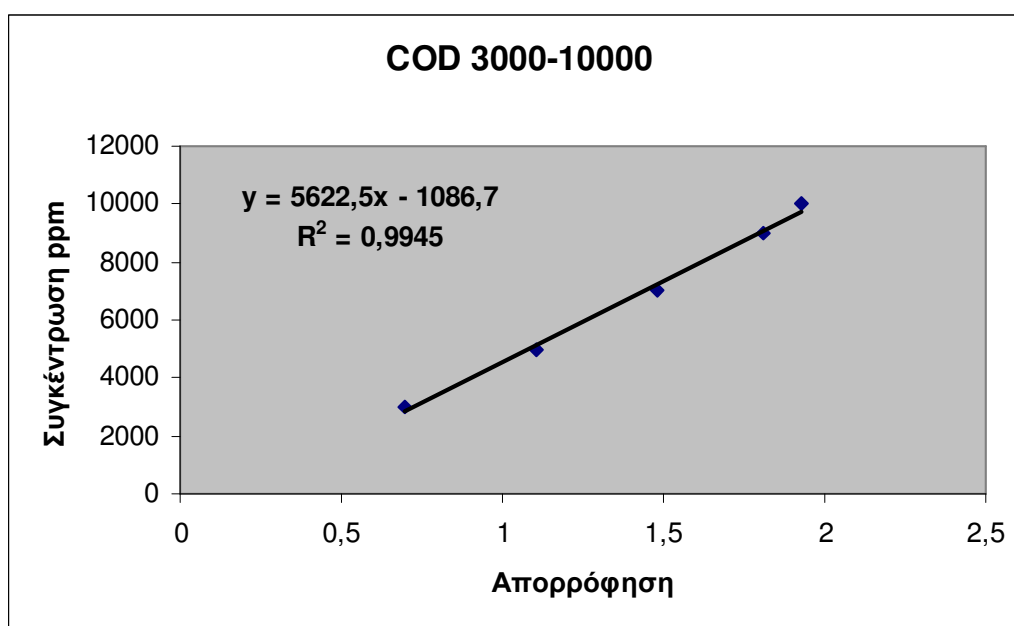


Σχήμα Π.6 : Καμπύλη βαθμονόμησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 500-3000ppm

Συγκέντρωση COD 3000 – 10000

Πίνακας Π.7 : Μέτρηση απορρόφησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 3000-10000ppm

Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση (nm)
3000	0,695
5000	1,107
7000	1,479
9000	1,808
10000	1,925



Σχήμα Π.8 : Καμπύλη βαθμονόμησης συγκέντρωσης του οργανικού φορτίου 3000-10000ppm