



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ- ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΝΕΩΝ ΜΟΥΔΑΝΙΩΝ**

ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΡΑΣΑΚΚΟΥ

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΛΑΔΟΚΕΡΩΤΟΥ
Daphnia magna (Straus, 1820) ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΜΑΖΙΚΗ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΙΧΘΥΔΙΩΝ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΝΕΑ ΜΟΥΔΑΝΙΑ
2009**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΝΕΩΝ ΜΟΥΔΑΝΙΩΝ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΚΛΑΔΟΚΕΡΩΤΟΥ *Daphnia magna* (Straus, 1820) ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗ ΜΑΖΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΙΧΘΥΔΙΩΝ

Πτυχιακή εργασία: Μιχάλης Κρασάκκου

Επίβλεψη: Δρ. Λάμπρος Κοκοκύρης

Νέα Μουδανιά

2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1. Εισαγωγή στο είδος *Daphnia magna* 1

1.1.1. Γενική μορφολογία και φυσιολογία 1

1.1.2. Περιβάλλον διαβίωσης 3

1.1.3. Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή 4

1.1.4. Διατροφή 6

1.2. Υγρά απόβλητα 7

1.2.1. Είδος υγρών απόβλητων 7

1.2.2. Επεξεργασία υγρών αποβλήτων 7

1.2.2.1. Πρωτοβάθμια επεξεργασία 7

1.2.2.2. Δευτεροβάθμια επεξεργασία 8

1.2.2.3. Τριτοβάθμια επεξεργασία (Κροκίδωση και οζονισμός) 10

1.2.2.3.1. Κροκίδωση 10

1.2.2.3.2. Οζονισμός 12

1.2.3. Ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση των υγρών αποβλήτων 13

1.3. Η χρήση των κλαδοκερωτών στη διατροφή των ιχθυονυμφών του γλυκού νερού 16

1.4. Καλλιέργεια της *D. magna* σε αστικά απόβλητα 17

1.5. Σκοπός της εργασίας 17

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 19

2.1. Χρονολογία και διάρκεια πειραμάτων 19

2.2. Προέλευση πληθυσμού 19

2.3. Πείραμα 1 19

2.3.1. Μέσο καλλιέργειας 19

2.3.2. Εγκατάσταση πληθυσμών, μέσο καλλιέργειας και τύπος διατροφής 20

2.3.3. Διατροφή του πληθυσμού 21

2.3.3.1. Διατροφή με *Chlorella sp.* 21

2.3.3.2. Διατροφή με πίτουρο σιταριού (*Wheat bran*) 22

2.3.4. Φυσικοχημικές παράμετροι του μέσου καλλιέργειας 22

2.3.4.1. Θερμοκρασία 22

2.3.4.2. Αλατότητα 22

2.3.4.3. Διαλυμένο οξυγόνο (DO) 22

2.3.4.4. pH 22

2.3.4.5. Σκληρότητα 23

2.3.5. Περιγραφή του αριθμού γενεών και του αριθμού των απογόνων ανά γενεά 23

2.3.6. Μέτρηση του μεγέθους των ατόμων (*σωματικές διαστάσεις*) 23

2.4. Πείραμα 2 24

2.4.1. Υπολογισμός της αφθονίας του πληθυσμού 25

2.4.2. Προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας του πληθυσμού 25

2.4.3. Υπολογισμός ρυθμού πληθυσμιακής αύξησης 25

2.5. Στατιστική ανάλυση 25

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1. Πείραμα 1	26
3.1.1. Φυσικοχημικές παράμετροι των μέσων καλλιέργειας	26
3.1.1.1. Θερμοκρασία	26
3.1.1.2. Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)	26
3.1.1.3. Αλατότητα	26
3.1.1.4. pH	26
3.1.1.5. Σκληρότητα	27
3.1.2. Θνησιμότητα	29
3.1.3. Αναπαραγωγή (Γονιμότητα)	29
3.1.4. Μέγεθος των ατόμων	31
3.2. Πείραμα 2	34
3.2.1. Φυσικοχημικές παράμετροι του μέσου καλλιέργειας	34
3.2.1.1. Θερμοκρασία	34
3.2.1.2. Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)	34
3.2.1.3. Αλατότητα	34
3.2.1.4. pH	34
3.2.1.5. Σκληρότητα	34
3.2.2. Μεταβολή της αφθονίας και τελική βιομάζα	36
3.2.3. Ρυθμός πληθυσμιακής αύξησης	36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
4.1. Φυσικοχημικές παράμετροι	39
4.2. Θνησιμότητα και ηλικία αναπαραγωγής	39
4.3. Γονιμότητα και αύξηση του μεγέθους	40
4.4. Αφθονία και Βιομάζα της καλλιέργειας στο κροκιδωμένο απόβλητο	41
4.5. Καλλιέργεια των ατόμων της <i>D. magna</i> και διατροφή με πίτουρο σιταριού	42
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	44
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	46
7. ABSTRACT	48
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	54
9.1. Παρασκευή συνθετικού αποβλήτου	54
9.2. Επεξεργασία του συνθετικού αποβλήτου	54
9.2.1 Επεξεργασία με κροκιδωτικά (κροκίδωση)	54
9.2.2. Επεξεργασία του συνθετικού απόβλητου με όζον (οζονισμός)	56

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας μου στο Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Α.Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης.

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Λάμπρο Κοκοκύρη, Καθηγητή Εφαρμογών του Τμήματος, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Η βοήθεια του ήταν πολύτιμη σε κάθε στάδιο της εργασίας. Με τη συνεργασία μας, αποκόμισα αρκετά πράγματα που πιστεύω ότι θα με βοηθήσουν στο μέλλον.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Δρ. Πεταλά Μαρία, Χημικό Μηχανικό, Επιστημονικό Συνεργάτη του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τη σημαντικότερη βοήθεια της στην παρασκευή των αποβλήτων, τα οποία υπήρξαν η αφετηρία της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Μονοκρούσο Νίκο, Επιστημονικό Συνεργάτη του Τμήματος Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών, για τη βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω το Προσωπικό του Ιχθυογεννητικού Σταθμού Πέλλας (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων) για τη βοήθεια που μου παρείχε στις εργασίες μου στο Σταθμό και ειδικότερα τη Βιολόγο κ. Αλεξία Γαζέα,

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου Γεωργιάδου Π., Λιάσο Σ., Κιάκη Κ. και Καφαλή Μ. που με βοήθησαν στη μεταφορά των δειγμάτων από τον Ιχθυογεννητικό Σταθμό Πέλλας και από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου που με στήριξε στις σπουδές μου και με στηρίζουν με κάθε τρόπο στη ζωή μου γενικότερα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή στο είδος *Daphnia magna*

Η συστηματική κατάταξη της *Daphnia magna* είναι η ακόλουθη:

- Φύλο: ARTHROPODA (Αρθρόποδα)
- Υποφύλο: CRUSTACEA (Καρκινοειδή)
- Κλάση: BRANCHIOPODA (Βραγχιόποδα)
- Τάξη: CLADOCERA (Κλαδοκερωτά)
- Οικογένεια: DAPHNIIDAE
- Γένος: *Daphnia*

1.1.1. Γενική μορφολογία και φυσιολογία

Τα άτομα του γένους *Daphnia* λέγονται και φυλλόποδα επειδή τα πόδια τους είναι επίπεδα και χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μικρών ρευμάτων. Η *D. magna* κολυμπά με τη βοήθεια των κεραιών της, κάνοντας μέσα στο υγρό μέσο «εκτινάξεις». Το σώμα της περιβάλλεται από κέλυφος χιτινώδους κατασκευής, γνωστό ως «*carapace*» (Εικόνα 1.1). Το κέλυφος αποτελείται από διπλό τοίχωμα που διατρέχεται από την αιμολέμφο. Κάθε άτομο έχει πολλά ζεύγη εξαρτημάτων, όπως οι μεγάλες (βοηθούν στην κολύμβηση) και οι μικρές κεραιές (κεραιΐδια), η άνω και η κάτω γνάθος και τα ζεύγη θωρακικών ποδιών (πέντε ζεύγη).

Τα αρσενικά διακρίνονται από τα θηλυκά από το μέγεθος τους (τα αρσενικά είναι μικρότερα), τις μεγαλύτερες κεραιές, την διαφορετική κοιλιακή περιοχή αλλά και από τα πρώτα πόδια τα οποία έχουν μυτερή προεξοχή (Ebert, 2005).

Το κυκλοφορικό σύστημα είναι ανοικτού τύπου. Η καρδιά είναι τοποθετημένη στην ραχιαία περιοχή του σώματος μπροστά από το θάλαμο επώασης. Το αίμα διακρίνεται εύκολα λόγω του διαφανούς περιβλήματος των ατόμων. Στους 20°C η καρδιά χτυπάει με ρυθμό 200 κτύπων ανά λεπτό (min) ενώ ο ρυθμός αυτός μειώνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η μεταφορά του οξυγόνου γίνεται με τη βοήθεια της αιμογλοβίνης, η οποία είναι κόκκινη και δίνει στα άτομα μια ιδιαίτερη κοκκινωπή όψη (Ebert, 2005).

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από ένα εγκεφαλικό γάγγλιο, το οποίο είναι τοποθετημένο κοντά στο έντερο, δίπλα στον οφθαλμό. Τα νεαρά και τα ενήλικα

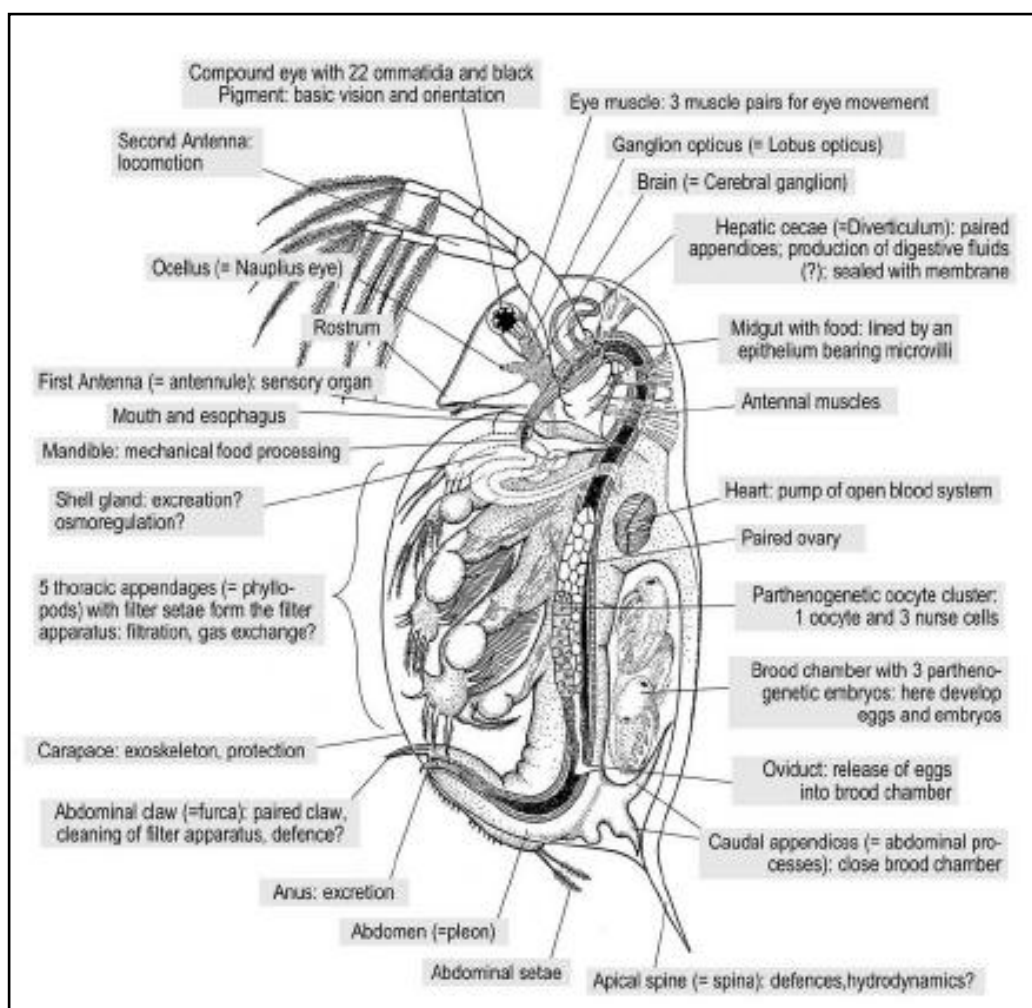
άτομα έχουν ένα μεγάλο σύνθετο οφθαλμό ενώ τα έμβρυα παρουσιάζουν δυο καφετιές κηλίδες οι οποίες κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου ανάπτυξης μέσα στον επωαστικό θάλαμο συγχωνεύονται σε μία. Ο οφθαλμός βοηθά στον προσανατολισμό των ατόμων κατά την κολύμβηση (Ebert, 2005).

Το έντερο είναι σωληνοειδές με τρία μέρη: τον οισοφάγο, το μεσεντέριο και το τελικό μέρος. Υπάρχουν δυο μικρά πυλωρικά τυφλά (εκκολπώματα) που διακρίνονται εύκολα στο επάνω μέρος του μεσεντέριου. Το pH στο πρόσθιο μέρος του μεσεντέριου είναι 6-6,8 ενώ στο τελικό 6,6-7,2. Τα υπολείμματα της τροφής απομακρύνονται από το οπίσθιο μέρος του εντέρου με περισταλτικές κινήσεις αλλά απαιτείται και η πίεση από πρόσφατα καταναλωμένα μόρια τροφής.

Με τη βοήθεια των οφθαλμών, αντιδρούν στην κατεύθυνση και την ποιότητα του φωτός (διεύθυνση, χρώμα, σκεδασμός, ένταση του φωτός, «φωτοτακτικό είδος», Young and Dowling, 1976, Ebert, 2005). Τη νύχτα μετακινούνται προς την ανώτερη επιφάνεια του νερού για να τραφούν ενώ την ημέρα επιστρέφουν σε βαθύτερα και πιο σκοτεινά σημεία για προστασία από τους θηρευτές των επιφανειακών στρωμάτων.

Μπορούν να αντιληφθούν την παρουσία θηρευτών τους (*Chaoborus spp.*, *Notonecta spp.*, ζωοπλαγκτονοφάγα ψάρια) μέσω των χημικών ουσιών που απελευθερώνονται από αυτούς¹.

¹ Μια τέτοια ουσία είναι η καϊρομόνη. Η ουσία αυτή προκαλεί μεταβολές σε φυσικά γνωρίσματα (ηλικία και μέγεθος ωρίμανσης, αριθμό και μέγεθος αυγών, Macháček, 1991, Stibor, 1992, Weider and Rijanowska, 1993), επαγωγή της φυλετικής αναπαραγωγής (Slsarczyck, 1995) αλλά και μεταβολές στη συμπεριφορά (οριζόντια και κάθετη μετακίνηση και φωτοτακτισμό, Ringellberg, 1991, de Meester, 1993, Loose, 1993).



Εικόνα 1.1. Ανατομικά γνωρίσματα της *Daphnia magna*. Ενήλικο θηλυκό μήκους 2mm (από το άκρο της κεφαλής μέχρι τη βάση της ουράς) με παρθενογενετικά έμβρυα στον επωαστικό θάλαμο. Για λόγους καλύτερης απεικόνισης, το «carapace» εμφανίζεται ως διαφανές. Σχεδιάστηκε από τον Matthes στον Ebert, 2005.

1.1.2. Περιβάλλον διαβίωσης

Τα περισσότερα είδη κλαδοκερωτών αφθονούν στα γλυκά νερά (μικρές υδατοσυλλογές, λίμνες, π.χ. *D. magna*, *D. pulex*, *Polyphemus pediculus*, *Leptocora kinditii*, *Bosmina sp*) ή και στα μεγάλα βάθη των λιμνοθαλασσών. Όμως μερικά είδη αφθονούν στη θάλασσα (*Evadne sp*, *Penilia sp*, *Podon sp*) ή και στα υφάλμυρα νερά. Τα είδη του γένους *Daphnia* είναι οι πιο άφθονοι ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί σε υδατοσυλλογές γλυκών νερών και αναπτύσσονται αρκετά καλά μέσα σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (Macháček and Seda, 2007). Βρίσκονται σε πολλά σημεία του υδάτινου κόσμου από τροπικά κλίματα μέχρι την Αρκτική, σε βιοτόπους που ποικίλουν σε μέγεθος (FAO, 1996) και αποτελούν ένα σημαντικό

μέρος του τροφικού πλέγματος στα υδάτινα οικοσυστήματα των εσωτερικών νερών (Ebert, 2005), αφού μεταφέρουν αποτελεσματικά την ενέργεια από τα κατώτερα (βακτήρια, φυτοπλαγκτό) στα ανώτερα τροφικά επίπεδα (ψάρια, Donson and Frey, 2000, Dumont and Negrea, 2002).

Η ποιότητα του νερού στους βιοτόπους των κλαδοκερωτών μπορεί να ποικίλλει πολύ. Στα περισσότερα είδη του γένους *Daphnia* οι αποδεκτές τιμές pH κυμαίνονται μεταξύ 6,5 και 9,5 ενώ οι βέλτιστες από 7,2 έως 8,5. Η αλατότητα πρέπει να είναι μικρότερη από 5 psu (γύρω στο 1,5 psu) αλλά μερικά είδη μπορούν να αντέξουν υψηλότερες τιμές, όπως η *D. magna* η οποία αντέχει σε τιμές 20 psu (Ebert, 2005).

1.1.3. Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή

Ο κύκλος ζωής των ειδών του γένους *Daphnia* είναι σχετικά σύντομος και έχει διάρκεια περίπου οκτώ εβδομάδων. Ωριμάζουν πολύ γρήγορα σε σχέση με τη διάρκεια ζωής τους και μπορούν να παράγουν πολλούς απογόνους (Deken, 2005, Σίνης, 2005). Τα περισσότερα είδη αναπαράγονται με παρθενογένεση (αμειωτικά) δημιουργώντας όλο θηλυκούς πληθυσμούς αν και μερικές φορές παράγονται και αρσενικά άτομα (Εικόνα 1.2). Τα παρθενογεννητικά αυγά αναπτύσσονται στον επωαστικό θάλαμο και περιβάλλονται από λεπτή μεμβράνη. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη αρχίζει μέσα στον επωαστικό θάλαμο, με την απομάκρυνση της μεμβράνης. Η διάρκεια της εμβρυογένεσης είναι ανάλογη της θερμοκρασίας και κυμαίνεται από 11 μέρες στους 10°C μέχρι τις 2 μέρες στους 25°C. Τα νεογέννητα άτομα είναι μικροσκοπικά αντίγραφα των ενηλίκων (FAO, 1996) αλλά χωρίς επωαστικό θάλαμο (Ebert, 2005).

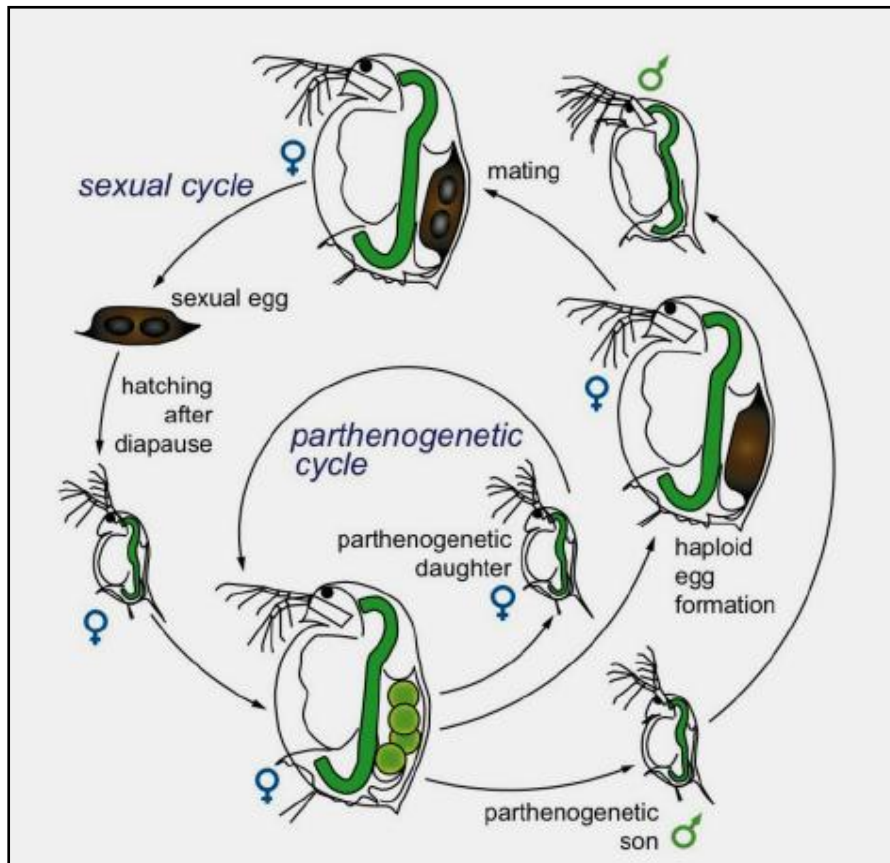
Όμως, όταν η διαθεσιμότητα της τροφής είναι περιορισμένη και οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυσμενείς, τότε αναπαράγονται αμφιγονικά (γαμετογενετικά) και παράγουν αυγά (φυλετικά αυγά ή αυγά του χειμώνα², Rassoulzadegan and Akcuyrtlakli, 2002). Η γονιμότητα των θηλυκών επηρεάζεται κατά πολύ από το μέγεθος των μητρικών ατόμων και τη διαθεσιμότητα της τροφής (FAO, 1996).

Τα φυλετικά αυγά είναι ογκώδη και λίγα σε αριθμό (από 0 έως 3, αλλά συνήθως 2, Fitzimmons and Innes, 2006). Απελευθερώνονται μέσα στο εφίππιο (προστατευτικός σάκος με φυσαλίδες που βοηθούν στην επίπλευση), που δημιουργείται από το ραχιαίο επιδερμικό τοίχωμα του θηλυκού. Τα εφίππια βρίσκονται συνήθως στον πυθμένα και μπορούν να ενεργοποιηθούν για την εκκόλαψη ακόμα και μετά από

² γιατί αναπτύσσονται κατά τη μεγάλη περίοδο της χειμερινής διάπαυσης.

πολλές δεκαετίες (Carvallo and Wolf, 1989, Caceres, 1998). Η εκκόλαψη επηρεάζεται από τη μεταβολή της φωτοπεριόδου, την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας ή και την παρουσία νερού (Ebert, 2005). Τα άτομα που ζουν σε υδατοσυλλογές που υφίστανται περιοδικά ξήρανση, τείνουν να παράγουν περισσότερα φυλετικά αυγά από τους μόνιμους πληθυσμούς των μεγάλων λιμνών.

Οι χημικές ουσίες που απελευθερώνονται από το ζωπλαγκτό σε συνθήκες υπερπληθυσμού καταστέλλουν τη σίτιση και την αναπαραγωγή των ιδίων ή άλλων ειδών (Seitz, 1984, Helgen, 1987, Matveev, 1993, Gosser and Ratte, 1994, Burns, 1995).



Εικόνα 1.2. Φυλετικός και αφυλετικός (παρθενογένεση) κύκλος ζωής της *Daphnia magna*. Κατά τη διάρκεια του παρθενογεννητικού κύκλου τα θηλυκά παράγουν διπλοειδή αυγά από τα οποία εκκολάπτονται θηλυκά άτομα. Ωστόσο το συγκεκριμένο παρθενογεννητικό θηλυκό μπορεί υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες να παράγει και διπλοειδή αυγά από τα οποία εκκολάπτονται αρσενικά άτομα. Επιπλέον, το ίδιο παρθενογεννητικό θηλυκό, μπορεί να μεταπέσει σε αμφιγονική αναπαραγωγή και να παράγει απλοειδή αυγά που γονιμοποιούνται από αρσενικά άτομα. Αυτά τα αυγά περικλείονται στο εφίππιο και διανύουν μια περίοδο διάπαυσης μέχρι την εκκόλαψη των νέων ατόμων στο υδάτινο περιβάλλον (από Dita B. Vizoso στον Ebert 2005).

1.1.4. Διατροφή

Η *D. magna* είναι διθηματοφάγος οργανισμός. Τρέφεται κυρίως με μικροφύκη και βακτήρια, μεγέθους 1-50μm (αν και σωματίδια μέχρι τα 70 μm έχουν βρεθεί στο εντερικό περιεχόμενο μεγάλων ατόμων), Η τροφοληψία γίνεται με τη βοήθεια των ποδιών, τα οποία με τα τριχίδια και τις άκανθες συλλέγουν τα σωματίδια της τροφής στην κοιλιακή αύλακα και τα ωθούν προς το στόμα (Σίνης, 2005).

Η ποσότητα και το είδος της τροφής που καταναλώνεται επηρεάζει το χρωματισμό των ατόμων. Σε γενικές γραμμές, τα καλοθρεμμένα άτομα έχουν πιο έντονο χρωματισμό από αυτά που υποσιτίζονται (Ebert, 2005). Όταν τρέφονται με μικροφύκη το χρώμα τους πράσινο ή κίτρινο ενώ όταν τρέφονται με βακτήρια έχουν λευκό ή ροζ χρώμα.

1.2. Υγρά απόβλητα

1.2.1. Είδος υγρών απόβλητων

Τα απόβλητα που υφίστανται επεξεργασία από τους σταθμούς επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι τα:

- 1 *Αστικά απόβλητα*: Τα οικιακά απόβλητα ή το μείγμα οικιακών με βιομηχανικά απόβλητα ή/και όμβρια νερά,
- 2 *Οικιακά απόβλητα*: Τα απόβλητα από περιοχές κατοικίας και υπηρεσιών που προέρχονται κυρίως από τον ανθρώπινο μεταβολισμό και τις εμπορικές δραστηριότητες,
- 3 *Βιομηχανικά απόβλητα*: Τα απόβλητα που απορρίπτονται από κτίρια και χώρους που χρησιμοποιούνται για οποιαδήποτε εμπορική ή βιομηχανική δραστηριότητα και τα οποία δεν είναι οικιακά απόβλητα ή όμβρια νερά (οδηγία 91/271/ της Ε.Ε)

1.2.2. Επεξεργασία υγρών αποβλήτων

1.2.2.1. Πρωτοβάθμια επεξεργασία

Οι γενικοί όροι που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του βαθμού επεξεργασίας, κατά αύξοντα τρόπο είναι: η προκαταρτική, η πρωτοβάθμια, η δευτεροβάθμια, η τριτοβάθμια και η προχωρημένη επεξεργασία. Η προκαταρτική επεξεργασία περιλαμβάνει το διαχωρισμό των στερεών από τα υγρά (Πεταλά, 2006). Η πρωτοβάθμια επεξεργασία είναι η επεξεργασία με φυσική ή/και χημική μέθοδο για την καθίζηση των αιωρούμενων στερεών ή η επεξεργασία με άλλες μεθόδους, με τις

οποίες το BOD₅ των εισερχόμενων αποβλήτων μειώνεται τουλάχιστον κατά 20% ενώ το συνολικό φορτίο των αιωρούμενων στερεών μειώνεται κατά 50% τουλάχιστον.

1.2.2.2. Δευτεροβάθμια επεξεργασία

Η δευτεροβάθμια επεξεργασία είναι η επεξεργασία με μέθοδο που κατά κανόνα περιλαμβάνει βιολογική επεξεργασία με δευτεροβάθμια καθίζηση ή με άλλες μεθόδους δια των οποίων τηρούνται οι απαιτήσεις που καθορίζονται στον Πίνακα 1.1 (Οδηγία 91/271 της Ε.Ε).

Η επιλογή της μεθόδου πρέπει να γίνεται προσεκτικά και ύστερα από ανάλυση των προβλημάτων της κάθε περίπτωσης ξεχωριστά. Η μέθοδος ή ο συνδυασμός μεθόδων εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις και το είδος του ρυπαντικού φορτίου που θα απομακρυνθεί. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποβλήτων (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2 (Λοϊζίδου, 2006).

Πίνακας 1.1. Απαιτήσεις για απορρίψεις από σταθμούς επεξεργασίας αστικών αποβλήτων που διέπονται από τα άρθρα 4 και 5 της οδηγίας 91/271 Ε.Ε. Εφαρμόζεται η τιμή συγκέντρωσης ή το ποσοστό μείωσης.

	Συγκέντρωση	Ελάχιστη εκατοστιαία μείωση ⁽¹⁾	Μέθοδοι μέτρησης αναφοράς
Βιομηχανικές ανάγκες σε οξυγόνο (BOD ₅ στους 20 °C) χωρίς νιτροποίηση ⁽²⁾	25 mg/L O ₂	70-90 40 δυνάμει του άρθρου 4 παράγραφος 2	Ομογενοποιημένο, αδιήθητο, ακατακάθιστο δείγμα, προσδιορισμός του διαλυμένου οξυγόνου πριν και μετά, πενθήμερη επώαση στους 20°C, σε απόλυτο σκότος. Προσθήκη παρεμποδιστή της νιτροποίησης.
Χημικές ανάγκες σε οξυγόνο (COD)	125 mg/L O ₂	75	Ομογενοποιημένο, αδιήθητο, ακατακάθιστο δείγμα Διχρωμικού καλίου.
Ολικά αιωρούμενα στερεά	35 mg/L ⁽³⁾ 35 δυνάμει του άρθρου 4 παράγραφος 2 (άνω των 10000 ι.π) 60 δυνάμει του άρθρου 4 παράγραφος 2 (2000-10000 ι.π)	90 ⁽³⁾ 90 δυνάμει του άρθρου 4 παράγραφος 2 (άνω των 10000 ι.π) 70 δυνάμει του άρθρου 4 παράγραφος 2 (2000-10000 ι.π)	- Διήθηση αντιπροσωπευτικού δείγματος μέσω φίλτρου μεμβράνης των 0,45 μμ. Ξήρανση σε θερμοκρασία 105oC και ζύγιση. - Φυγοκέντρηση αντιπροσωπευτικού δείγματος (επί 5 τουλάχιστον λεπτά, με μέση επιτάχυνση 2800-3200 g). Ξήρανση σε θερμοκρασία 105oC και ζύγιση.
<p>⁽¹⁾ Μείωση ανάλογα με το φορτίο των εισρεόντων αποβλήτων</p> <p>⁽²⁾ Η παράμετρος αυτή μπορεί να αντικατασταθεί από άλλη:ολικός οργανικός άνθρακας (TOC) ή ολικές ανάγκες σε οξυγόνο (TOD) αν μπορεί να ευρεθεί σχέση μεταξύ του BOD₅ και της υποκατάστατης παραμέτρου.</p> <p>⁽³⁾ Η απαίτηση αυτή είναι προαιρετική</p>			
<p>Οι απορρίψεις που αφορούν απορρίψεις από τελμάτωση διεξάγονται σε διηθημένα δείγματα. Ωστόσο, η συγκέντρωση του συνόλου των αιωρούμενων στερεών σε αδιήθητα δείγματα νερών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 150 mg/L.</p>			

Πίνακας 1.2. Κύριες μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων (από Λοιζίδου, 2006).

Μέθοδος επεξεργασίας		
Βιολογική επεξεργασία		Χημική/Φυσικοχημική επεξεργασία
A. Αερόβια	B) Αναερόβια	
<ul style="list-style-type: none"> - ενεργός ιλύς (activated sludge) - αεριζόμενες λίμνες (aerated lagoons) - βιολογικά φίλτρα (trickling filters) - περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι (rotating biological discs) 	<ul style="list-style-type: none"> - αναερόβια φίλτρα (anaerobic filters) - αναερόβιος χωνευτήρας (conventional anaerobic digester) - αναερόβια μονάδα ενεργούς ιλύος (anaerobic activated sludge plant) 	<ul style="list-style-type: none"> - χημική κατακρήμνιση - χημική οξειδωση - απορρόφηση σε ενεργό άνθρακα - αντίστροφη ώσμωση - απαέρωση αμμωνίας

1.2.2.3. Τριτοβάθμια επεξεργασία (Κροκίδωση και οζονισμός)

Τα συστήματα τριτοβάθμιας και προχωρημένης επεξεργασίας αναφέρονται στις διεργασίες για την περαιτέρω απομάκρυνση των κολλοειδών και των αιωρούμενων σωματιδίων με χημική κροκίδωση και διήθηση μέσω πορώδους μέσου. Τα συστήματα προχωρημένης επεξεργασίας μπορούν να επιτύχουν πλήρη απομάκρυνση ορισμένων συστατικών, με ιον-ανταλλαγή (αμμωνία ή νιτρικά) και με αντίστροφη όσμωση (ολικά διαλυμένα στερεά), (Metcalf and Eddy, 1991).

1.2.2.3.1. Κροκίδωση

Η κροκίδωση είναι σχετικά απλή στην εφαρμογή, χωρίς υψηλό κόστος λειτουργίας και είναι συνήθως το πρώτο στάδιο της τριτοβάθμιας επεξεργασίας. Η διεργασία της κροκίδωσης αναφέρεται στην προσθήκη χημικών στις δευτεροβάθμιες εκροές για την ενίσχυση της συσσωμάτωσης των σωματιδίων και τον ακόλουθο διαχωρισμό των στερεών από τα υγρά με καθίζηση ή διήθηση. Ευρέως χρησιμοποιούμενα ανόργανα κροκιδωτικά είναι το θειικό αργίλιο, το χλωριούχο αργίλιο, ο χλωριούχος και ο θειικός σίδηρος. Τα άλατα αυτά υδρολύονται στο νερό, αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια των σωματιδίων, προκαλώντας αποσταθεροποίηση των κολλοειδών. Συχνά για την αύξηση της αποδοτικότητας της διεργασίας, τα ανόργανα κροκιδωτικά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με οργανικούς πολυηλεκτρολύτες. Οι συγκεντρώσεις των κροκιδωτικών εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των αποβλήτων και κυμαίνονται από 1 έως 50 mg/L (Metcalf and Eddy, 1991).

Η κροκίδωση, η θρόμβωση και η καθίζηση χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών μικρού μεγέθους (<10 μm). Με την κροκίδωση επιτυγχάνεται

σημαντική μείωση της θολότητας των αποβλήτων, ελάττωση του οργανικού φορτίου και απομάκρυνση συστατικών όπως ο φώσφορος και τα μεταλλικά στοιχεία (Πεταλά, 2006).

Η χημεία της κροκίδωσης σε αστικά απόβλητα μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία τους είναι περίπλοκη και όχι πλήρως κατανοητή μέχρι σήμερα (Πεταλά, 2006). Μολονότι δεν υφίσταται ένας γενικά αποδεκτός ορισμός της κροκίδωσης σε θέματα που σχετίζονται με την κατεργασία των αποβλήτων, ισχύει ο ακόλουθος ορισμός κατά τον οποίο η διεργασία της κροκίδωσης περιλαμβάνει τρία στάδια (Μήτρακας, 2001):

- i. Την προσθήκη χημικών μέσων, γνωστών ως κροκιδωτικών. Το στάδιο αυτό είναι το βασικό στάδιο της κροκίδωσης (coagulation)
- ii. Τη συνένωση των κολλοειδών σωματιδίων που προσεγγίζουν το ένα το άλλο με αποτέλεσμα τη δημιουργία ορατών θρόμβων. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται θρόμβωση (flocculation)
- iii. Την απομάκρυνση των σχηματισμένων μεγάλων συσσωμάτων με καθίζηση (sedimentation).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της κροκίδωσης είναι, η δόση του κροκιδωτικού, το pH στο οποίο λαμβάνει χώρα η κροκίδωση, η συγκέντρωση των κολλοειδών σωματιδίων (ή η θολότητα του νερού), η ύπαρξη άλλων ιόντων και κυρίως φυσικών οργανικών ουσιών και τέλος φυσικές παράμετροι, όπως για παράδειγμα ο ρυθμός ανάδευσης (Gregory and Duan, 2001, Metcalf and Eddy, 2003)³.

1.2.2.3.2. Οζονισμός

³ Σχετικά με την επίδραση των κροκιδωτικών στους υδρόβιους οργανισμούς, έχει βρεθεί ότι ο σίδηρος σε συγκέντρωση 16 mg Fe³⁺/L προκαλεί 50% ακινητοποίηση στη *D. magna* (Sorvari and Sillanpaa, 1996). Το αργίλιο θεωρούταν επίσης μη τοξικό πριν από περίπου 10 χρόνια (Poleo, 1995, Sauvant et al., 2000). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι προκαλεί άμεση τοξικότητα στα ψάρια του γλυκού νερού και ότι η συσσώρευσή του σε ένα υδάτινο οικοσύστημα μπορεί να είναι επικίνδυνη για τους υδρόβιους οργανισμούς (Poleo, 1995).

Ο οζονισμός χρησιμοποιείται όχι μόνο ως μέθοδος απολύμανσης και ανάκτησης αποβλήτων αλλά ταυτόχρονα και ως μέθοδος επεξεργασίας, επειδή το όζον, ως οξειδωτικό μέσο, οδηγεί όχι μόνο στην καταστροφή μικροοργανισμών αλλά στην διάσπαση και απομάκρυνση οργανικού φορτίου και χρώματος (Gottschalk et al., 2000). Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα της χημικής οξειδωσης με όζον είναι ότι δεν σχηματίζονται δευτερογενή απόβλητα, όπως π.χ. κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με τις διεργασίες της κροκιδωσης και της ενεργούς ιλύος από τις οποίες παράγονται οι αντίστοιχες λάσπες.

Το όζον παράγεται με πολλούς τρόπους, όπως από τον αέρα με υπεριώδη ακτινοβολία, με έντονη θέρμανση αερίου οξυγόνου ή σαν παραπροϊόν σε ηλεκτρολυτικές και χημικές διεργασίες. Το όζον είναι ιδιαίτερα ασταθές συστατικό, επομένως θα πρέπει να παράγεται στο σημείο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί (Gottschalk et al., 2000). Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται διάφορες μέθοδοι παραγωγής όζοντος .

Πίνακας 1.3. Μέθοδοι παραγωγής όζοντος (Gottschalk et al., 2000).

Μέθοδος	Αρχή λειτουργίας	Πηγή όζοντος	Παρατηρήσεις
Ηλεκτρική	Ηλεκτρ. εκκένωση	Αέρας ή O ₂	Εργαστηριακής και βιομηχανικής κλίμακας χρήση
Ηλεκτροχημική	Ηλεκτρόλυση	Νερό	Εργαστηριακής και ημι-βιομηχανικής κλίμακας
Ραδιενέργεια	Ακτίνες Χ	Νερό (υπερ-καθαρό)	Εργαστηριακή χρήση
Θερμική	Ιονισμός	Νερό	Εργαστηριακή χρήση
Φωτοχημική (λ<185nm)	Ακτινοβολία	O ₂ ή πόσιμο νερό	Νέα τεχνολογία

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης του όζοντος σε διαλύματα που περιέχουν οργανικά συστατικά είναι οι εξής (Λοϊζίδου, 2006):

- Αντίδραση με οργανικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να οξειδωθούν,
- Αντίδραση με αρωματικές οργανικές ενώσεις (διάσπαση αρωματικού δακτυλίου),
- Αντίδραση με ακόρεστες οργανικές ενώσεις (σχάση διπλού δεσμού).

Οι κύριοι στόχοι κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων με οζονισμό είναι (Πεταλά, 2006):

- Μετατροπή τοξικών ενώσεων προς λιγότερο τοξικές (οι οποίες συνήθως βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις)
- Μερική οξειδωση του μη-βιοδιασπώμενου τμήματος του DOC, όπου εφαρμόζεται οζονισμός, με στόχο τη βελτίωση της απόδοσης της βιολογικής διεργασίας που ακολουθεί
- Απομάκρυνση του χρώματος,
- Μείωση των επιπέδων DOC και TOC.

Η παρουσία υπολειμματικής συγκέντρωσης όζοντος στα υδατικά δείγματα μπορεί να έχει τοξική επίδραση στις ζωτικές λειτουργίες ενός οργανισμού, αν και ο χρόνος ημιζωής του όζοντος είναι πολύ μικρός (Gottschalk et al., 2000). Πάντως έχει βρεθεί ότι ακόμη και πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις όζοντος μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα σε μερικούς οργανισμούς (π.χ. στα βραγχιόποδα). Μόλις 35 $\mu\text{g O}_3/\text{L}$ προκαλούν 50% ακινητοποίηση στη *D. magna*, έπειτα από 48 h έκθεσης ενώ συγκέντρωση 11 $\text{mg O}_3/\text{L}$, δεν προκαλεί τοξική επίδραση στους ίδιους οργανισμούς (Leynen et al., 1998). Τέλος, οι δευτεροβάθμιες εκροές έπειτα από οζονισμό με 1-3 $\text{mg O}_3/\text{L}$ για 15 min προκαλούν αύξηση ή μείωση στην κινητικότητα και την αναπαραγωγή του *Ceriodaphnia dubia*, ανάλογα με την περιοχή και την εποχή της δειγματοληψίας (Blatchey et al., 1997).

1.2.3. Ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση των υγρών αποβλήτων

Η επαναχρησιμοποίηση υγρών αποβλήτων, ιδιαίτερα για άρδευση καλλιεργειών, εφαρμόζεται επί αιώνες και φαίνεται ότι έχει τις ρίζες της στους αρχαίους Ελληνικούς πολιτισμούς (Angelakis and Spyridakis, 1995, Angelakis et al., 2005). Η ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση των υγρών αποβλήτων αποτελεί μία ταχύτατα αυξανόμενη πρακτική κυρίως σε ξερικές και ημιξηρικές περιοχές. Με τις διαθέσιμες σήμερα τεχνολογίες είναι δυνατή η παραγωγή ακόμη και πόσιμου νερού από περιθωριακά νερά, όπως είναι οι εκροές υγρών αποβλήτων. Όμως, σε τέτοιες περιπτώσεις, θα πρέπει να εξετάζονται θέματα όπως είναι η προστασία της δημόσιας υγείας, το υψηλό κόστος επεξεργασίας και η κοινωνική αποδοχή (Αγγελάκης και Παρανυχιανάκης, 2005). Η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων αποβλήτων, εφαρμόζεται για άρδευση αγροτικών καλλιεργειών, ή αστικού πρασίνου, για παροχή βιομηχανικού νερού, για ενίσχυση υδροβιότοπων και ακόμη, για άμεση ή έμμεση χρήση στο δίκτυο ύδρευσης. Σε κάθε περίπτωση, γνώμονας για την επιλογή της μεθόδου επαναχρησιμοποίησης θα πρέπει πρωτίστως να είναι η διασφάλιση της δημόσιας υγείας και στόχος η εξυπηρέτηση των αναγκών (Πεταλά, 2006). Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται οι κατηγορίες επαναχρησιμοποίησης των ανακτημένων

υγρών αποβλήτων καθώς και πιθανοί περιορισμοί των εφαρμογών. Όπως αναφέρεται και στην οδηγία 91/271 της Ε.Ε, τα επεξεργασμένα απόβλητα πρέπει να επαναχρησιμοποιούνται, όποτε είναι σκόπιμο. Επιπλέον, ο τρόπος διάθεσης των αποβλήτων πρέπει να μειώνει στο ελάχιστο τις αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον.

Πίνακας 1.4. Κατηγορίες χρήσης επεξεργασμένων αποβλήτων και ενδεχόμενοι περιορισμοί/κίνδυνοι (από Asano, 1998).

Κατηγορίες χρήσης	Ενδεχόμενοι περιορισμοί/κίνδυνοι
1. Άρδευση καλλιεργειών αγροτικών <ul style="list-style-type: none"> ▪ Άρδευση σοδειάς ▪ Εμπορικά φυτώρια 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Επίδραση της ποιότητας νερού, των αλάτων στο έδαφος και στη σοδειά ▪ Ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων νερών αν δεν γίνει καλή διαχείριση ▪ Εμπορικότητα της σοδειάς και δημόσια αποδοχή
2. Άρδευση κοινόχρηστων χώρων <ul style="list-style-type: none"> ▪ Πάρκα ▪ Αυλές σχολείων ▪ Γήπεδα γκολφ ▪ Νεκροταφεία ▪ Ζώνες πρασίνου 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Επίδραση της ποιότητας νερού, των αλάτων στο έδαφος και τα φυτά ▪ Θέματα δημόσιας υγείας σε σχέση με τους παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ιούς, παράσιτα) ▪ Ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων νερών αν δεν γίνει καλή διαχείριση
3. Επαναχρησιμοποίηση στη βιομηχανία <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ψύξη ▪ Τροφοδοσία λέβητα ▪ Νερό επεξεργασίας 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Τα συστατικά των επεξεργασμένων αποβλήτων σχετίζονται με το σχηματισμό επικαθήσεων, τη διάβρωση, την ανάπτυξη μικροοργανισμών και τη δυσσομία ▪ Θέματα δημόσιας υγείας, ιδιαίτερα μεταφοράς μικροσταγονιδίων με οργανικά και παθογόνους οργανισμούς στο νερό ψύξης και παθογόνους μικροοργανισμούς στα νερά διαφόρων επεξεργασιών
4. Ενίσχυση και εμπλουτισμός υπόγειων υδροφορέων <ul style="list-style-type: none"> ▪ Συμπλήρωση υπόγειου νερού ▪ Αντιμετώπιση της διείσδυσης θαλασσινού νερού ▪ Αντιμετώπιση καθιζήσεων 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Πιθανή ρύπανση του υπόγειου υδροφορέα που χρησιμοποιείται ως πηγή πόσιμου νερού ▪ Ίχνη οργανικών στα επεξεργασμένα απόβλητα και η τοξική επίδρασή τους ▪ Ολικά διαλυμένα στερεά, μέταλλα, νιτρικά ιόντα και παθογόνοι μικροοργανισμοί στα επεξεργασμένα απόβλητα
5. Αστική χρήση-μη πόσιμο νερό <ul style="list-style-type: none"> ▪ Πυροπροστασία ▪ Κλιματισμός ▪ Καθαρισμός W.C 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Προστασία της δημόσιας υγείας από τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών με μικρά σταγονίδια νερού ▪ Πιθανή διάβρωση, εναπόθεση αλάτων, ανάπτυξη μικροοργανισμών και γενικά ρύπανση ▪ Προβλήματα σε πιθανές διασταυρώσεις με το σύστημα υδροδότησης
6. Αναψυχή/περιβαλλοντικές χρήσεις <ul style="list-style-type: none"> ▪ Λίμνες ▪ Εμπλουτισμός υγροβιότοπων ▪ Εμπλουτισμός επιφανειακών υδάτινων ρευμάτων ▪ Αλιεία ▪ Τεχνητό χιόνι 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Θέματα υγείας που σχετίζονται με την παρουσία βακτηρίων και ιών (π.χ. εντερικές μολύνσεις και μολύνσεις αυτιών, ματιών, μύτης) ▪ Φαινόμενα ευτροφισμού, λόγω της ύπαρξης αζώτου και φωσφόρου στο ανακτημένο νερό ▪ Τοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς
7. Πόσιμο νερό <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ανάμιξη με ανεπεξέργαστο νερό υδροδότησης ▪ Απευθείας χρήση 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ίχνη οργανικών και άλλων χημικών στο ανακτημένο νερό υγρών αποβλήτων με υψηλό δυναμικό τοξικότητας ▪ Δημόσια και αισθητική αποδοχή ▪ Προστασία δημόσιας υγείας κυρίως σε σχέση με τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών και κυρίως ιών

1.3. Η χρήση των κλαδοκερωτών στη διατροφή των ιχθυονυμφών του γλυκού νερού

Το ζωοπλαγκτό είναι μια πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών, αμινοξέων, λιπαρών οξέων και ενζύμων (Kibria et al., 1999) και συνιστά τροφή για πολλούς οργανισμούς του θαλασσινού και του γλυκού νερού (διατροφή ιχθυονυμφών και ιχθυδίων De Pauw et al., 1981, Tay et al., 1991, Kibria et al., 1999). Γενικά οι ιχθυονύμφες που τρέφονται με ζωοπλαγκτό παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιωσιμότητα και καλύτερες αποδόσεις από αυτές που τρέφονται με τεχνητή (Green and Merrick, 1980, Proulx and de la Noüe, 1985). Σε αντίθεση με το ζωοπλαγκτό, οι βιομηχανικές τροφές χαρακτηρίζονται από μειωμένη πεπτικότητα (Dabrowski, 1984, Lauff and Hofer, 1984, Govoni et al, 1986), ανεπάρκεια σε παράγοντες αύξησης (Higgs et al., 1985, Baragi and Lovell, 1986), μεγαλύτερη επιβάρυνση του νερού της καλλιέργειας (Dave, 1989).

Τα κλαδοκερωτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη διατροφή των ιχθυονυμφών του γλυκού νερού (Treece and Davis, 2000). Περιέχουν καρτενοειδή, που εκτός από την θετική επίδρασή τους στο χρωματισμό των ψαριών (π.χ. σολομοειδή, Torrison, 1985) λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά στα αυγά και στις νύμφες (Tacon, 1981) και βελτιώνουν την αντίσταση των οργανισμών σε συνθήκες υποξίας (Craik, 1985). Επιπλέον, περιέχουν αρκετά πεπτικά ένζυμα (πεπτιδάση, αμυλάση, λιπάση κ.α) ακόμα και κυτταρυλάση, η οποία λειτουργεί ως εξωένζυμο στο έντερο των ιχθυονυμφών (FAO, 1996).

Το είδος *Daphnia magna* χαρακτηρίζεται από υψηλή προσαρμοστικότητα και υψηλές επιδόσεις σε συνθήκες καλλιέργειας (Huet, 1970, Ivleva, 1973, Dinges, 1974, De Pauw et al., 1981)) λόγω της παρθενογεννητικής αναπαραγωγής (Proulx and de la Noüe, 1985). Το είδος της τροφής (σύσταση και θρεπτική αξία) και η ποιότητα του μέσου (φυσικοχημικές μεταβολές), επηρεάζουν σημαντικά την αναπαραγωγή και την αύξηση του σε συνθήκες καλλιέργειας (Ivleva, 1973, D' Agostino and Provasoli, 1970; Hebert, 1978, FAO, 1996). Η θρεπτική αξία του μπορεί να αξιολογηθεί καθορίζοντας τη σύνθεσή του σε αμινοξέα, το δείκτη απόδοσης των πρωτεϊνών και την καθαρή χρησιμοποίηση πρωτεΐνης (Watanabe et al., 1978).

Εδώ και δύο δεκαετίες γίνεται μια συστηματική προσπάθεια να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή του ζωοπλαγκτού στις εντατικές καλλιέργειες. Τουλάχιστον όσον αφορά το είδος *D. magna*, η τροφή, η μέθοδος καλλιέργειας, το μέσο καλλιέργειας και οι φυσικοχημικές παράμετροι του μέσου, επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση των καλλιεργειών (Proulx και De La Noue, 1985, De Pauw et al., 1981). Μεταξύ αυτών, η τροφή επηρεάζει σημαντικά την εκτρεφόμενη βιομάζα, επηρεάζοντας (1) την

αύξηση των ατόμων και (2) την διατροφική αξία τους, η οποία με τη σειρά της πρέπει να καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες των ιχθυονυμφών που θα σιτιστούν (Savas et al., 2008).

1.4. Καλλιέργεια της *D. magna* σε αστικά απόβλητα

Σε υδατοσυλλογές όπου εκρέουν αστικά απόβλητα, οργανισμοί όπως τα βλεφαριδοφόρα (ciliates), τα τροχόζωα (rotifers), τα κλαδοκερωτά (cladocerans) και τα κωπήποδα (copepods) επικρατούν στη ζωοπλαγκτική κοινότητα (Barica and Mur, 1980, Rivera et al., 1987). Τα κλαδοκερωτά συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος της βιομάζας, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους και της παρθενογενετικής αναπαραγωγής τους. Ειδικότερα τα γένη *Alona*, *Ceriodaphnia*, *Daphnia* και *Moina* είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούν σε ικανοποιητικό βαθμό τα οργανικά σωματίδια των αποβλήτων (Nandini et al., 2005).

Τα δευτερογενώς επεξεργασμένα αστικά απόβλητα, με την κατάλληλη λίπανση (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}) αποτελούν ένα επαρκές και χαμηλό σε κόστος μέσο, για την παραγωγή σημαντικής βιομάζας μικροφυκών που συνιστούν την τροφή της *Daphnia* (Proulx and De La Noue, 1985). Επιπλέον, τα απόβλητα είναι πηγή μικρών τροφικών σωματιδίων (οργανικής ύλης) που συνιστούν τροφή για τη *D. magna* προκαλώντας σημαντική αύξηση της αφθονίας και της βιομάζας της (van der Geest, 2005, Cauchie et al., 2000). Η διατροφή ιχθυονυμφών με άτομα *D. magna* από απόβλητα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη των ιχθυονυμφών (καλύτερα από τις τεχνητές ξηρές τροφές, Tarifeno-Silva et al., 1982, Dave, 1989, Van der Geest, 2005). Τέλος η μέθοδος επεξεργασίας διαφοροποιεί τα απόβλητα ως προς την ποιότητα (Cauchie et al., 2000).

1.5. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν: (1) να αξιολογήσει υγρά απόβλητα δευτερογενούς και τριτογενούς επεξεργασίας με βάση την επίδραση τους στην αναπαραγωγή και στην αύξηση καλλιεργούμενων ατόμων της *Daphnia magna* (παρακολούθηση παραμέτρων όπως βιωσιμότητα, ηλικία αναπαραγωγής, γονιμότητα, μέγεθος ατόμων), και (2) να αναπτύξει τη δοκιμαστική καλλιέργεια της *D. magna*, στο καταλληλότερο από τα αξιολογούμενα απόβλητα.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν δύο πειράματα, διάρκειας 21 ημερών το καθένα. Στο πρώτο πείραμα, αξιολογήθηκαν τα υγρά απόβλητα σύμφωνα με τον διεθνή δοκιμαστικό έλεγχο OECD TG 211 (Paris 1998), σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα σίτισης των ατόμων της *D. magna* (διατροφή με πίτουρο σιταριού, και διατροφή με χλωροφύκος) ενώ στο δεύτερο πείραμα, αναπτύχθηκε η καλλιέργεια του είδους σε όγκο 4L του καταλληλότερου απόβλητου, με το αποτελεσματικότερο πρωτόκολλο σίτισης. Και στα δύο πειράματα, η αξιολόγηση των αποβλήτων έγινε, με μάρτυρα το νερό του φυσικού πληθυσμού, το οποίο ήταν ανεπεξέργαστο ή τριτογενώς επεξεργασμένο (κροκίδωση, οζονισμός).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Χρονολογία και διάρκεια πειραμάτων

Τα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο 2008.

2.2. Προέλευση πληθυσμού

Τα άτομα της *D. magna* προέρχονταν από φυσικό πληθυσμό που διατηρούταν (ανανέωση όγκου νερού σε ποσοστό 30%, μία φορά την εβδομάδα, προσθήκη χλωροφυκών) σε δεξαμενή με στάσιμο νερό από τον ποταμό Έδεσσαίο.

2.3. Πείραμα 1

Στο πρώτο πείραμα αξιολογήθηκαν υγρά απόβλητα δευτερογενούς και τριτογενούς επεξεργασίας, στην αναπαραγωγή και την αύξηση της *Daphnia magna*. Το πρώτο πείραμα σχεδιάστηκε σύμφωνα με εγχειρίδιο καλλιέργειας του F.A.O (FAO Fisheries Technical Paper 361, Rome 1996) και το πρωτόκολλο αναπαραγωγής της *Daphnia magna* (OECD TG 211, Paris 1998).

Δοκιμάστηκαν έξι (6) διαφορετικά μέσα καλλιέργειας (Πίνακας 2.1) και δύο διαφορετικοί τύποι τροφής: (1) διατροφή με το χλωροφύκος *Chlorella sp.* και (2) διατροφή με πίτουρο σταριού. Έτσι προέκυψε μία διάταξη δύο πληθυσμών (Δ_{cl} : διατροφή με το χλωροφύκος, *Chlorella sp.*) και Δ_{wb} (διατροφή με πίτουρο σταριού) που καλλιεργήθηκαν σε 6 μέσα καλλιέργειας, σε τέσσερα αντίγραφα για κάθε μέσο και για κάθε ομάδα (δες πειραματική διάταξη, Εικόνα 2.1). Κατ' αυτό τον τρόπο είχαμε 48 άτομα *Daphnia sp.*, συνολικά, δηλαδή 24 για κάθε τύπο τροφής ή διαφορετικά 4 άτομα σε κάθε μέσο καλλιέργειας και σε κάθε τύπο τροφής.

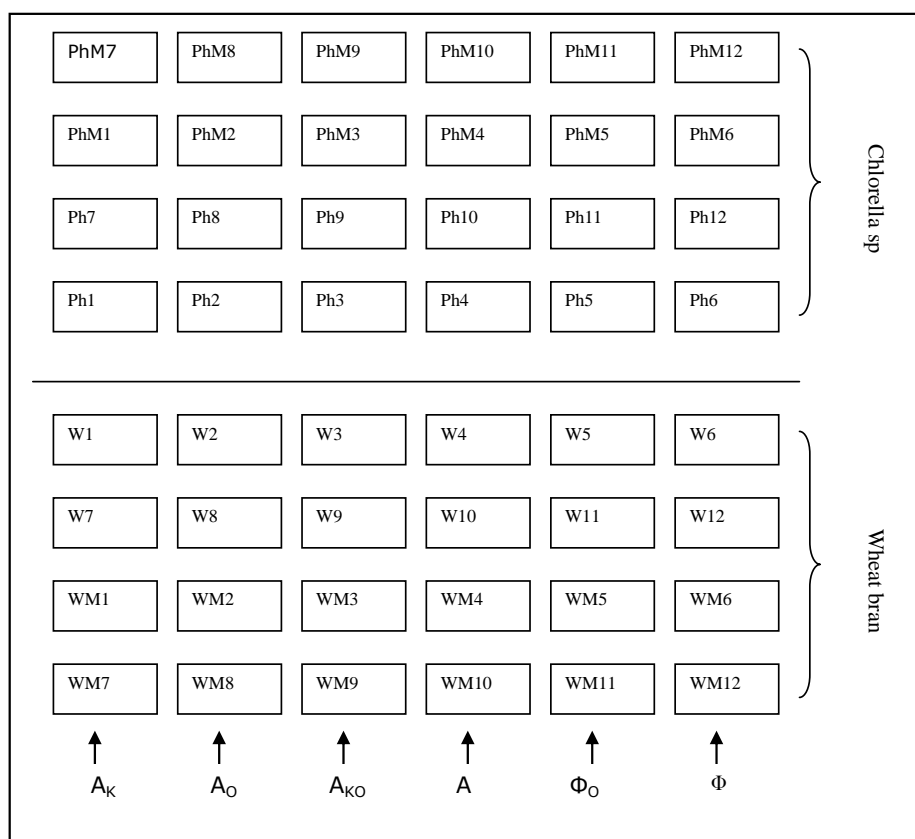
2.3.1. Μέσο καλλιέργειας

Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν παρήχθησαν στο Τμήμα Χημείας του Α.Π.Θ. και παραχωρήθηκαν από την Δρ. Μαρία Πεταλά, Χημικό Μηχανικό, Επιστημονικό Συνεργάτη του Τμήματος. Για τις λεπτομέρειες της παραγωγής του συνθετικού απόβλητου και της επακόλουθης επεξεργασίας του (κροκίδωση, οζονισμός, κροκίδωση και οζονισμός) δίνονται οι σχετικές πληροφορίες στο Παράρτημα Ι.

Σχόλιο [U1]: Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 6 μέσα καλλιέργειας και δυο τύποι τροφής, που με τη παρατήρηση των οποίων, θέλαμε να προσδιορίσουμε το μέσο εκείνο με τον αντίστοιχο τύπο τροφής, στο οποίο η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή των *Daphnia* θα έφτανε όσο το δυνατό το μέγιστο σημείο. Παρατηρώντας τα πιο πάνω σε συνδυασμό με την παρακολούθηση κάποιων άλλων βιολογικών παραμέτρων (π.χ. ρυθμό αναπαραγωγής, μέγεθος ατόμων) προχωρήσαμε στο δεύτερο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτεροι όγκοι νερού από τα μέσα στα οποία σημειώθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Η μόνη παραλλαγή που υπήρξε σε σχέση με τους τύπους νερών του πρώτου πειράματος αφορούσε στην επιλογή μιας επιπλέον επεξεργασίας του νερού του φυσικού πληθυσμού (κροκίδωση του νερού του φυσικού πληθυσμού). Ξεκινώντας με έναν συγκεκριμένο αριθμό ατόμων *Daphnia* με την ίδια αρχική βιομάζα σε κάθε τύπο νερού, παρακολουθήσαμε την αφθονία των ατόμων όπως επίσης και την τελική βιομάζα σε κάθε μέσο. Αξιολογώντας τα αποτελέσματά μας κύριος στόχος ήταν να προσδιορίσουμε σε ποιο τύπο νερού και τροφής, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες φυσικοχημικές παραμέτρους, επιτυγχάνεται η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα *Daphnia*. Θα μπορούσαμε έτσι να καταρτίσουμε ένα κατάλληλο πρωτόκολλο καλλιέργειας των *Daphnia* που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις υδατοκαλλιέργειες με σκοπό την μέγιστη, ποσοτική και ποιοτική, παραγωγή ατόμων *Daphnia* που θα χρησιμοποιηθεί εκ νέου για την σίτιση ιχθυδίων.

2.3.2. Εγκατάσταση πληθυσμών, μέσο καλλιέργειας και τύπος διατροφής

Η πειραματική καλλιέργεια έγινε σε δοχεία ζέσεως των 100ml, με ένα άτομο *Daphnia* ανά δοχείο σύμφωνα με το διεθνές πρωτόκολλο (OECD TG 211, Paris 1998). Σε όλα τα δοχεία τοποθετήθηκαν άτομα ηλικίας έως και 48 ωρών (παρήχθησαν στο εργαστήριο, σε δοκιμαστικούς σωλήνες).



Εικόνα 2.1. Διάταξη των δοχείων ζέσεως και κωδικός ανάλογα με το πρωτόκολλο διατροφής (*Chlorella* sp: χλωροφύκος *Chlorella* sp., Wheat bran: πίτουρο σιταριού) και το μέσο καλλιέργειας (**A_κ**: κροκιδωμένο απόβλητο, **A_ο**: οξονισμένο απόβλητο, **A_{κο}**: κροκιδωμένο και οξονισμένο απόβλητο, **A**: απόβλητο δευτερογενούς επεξεργασίας, **Φ_ο**: οξονισμένο φυσικό νερό, **Φ**: φυσικό νερό).

Πίνακας 2.1. Κωδικοποίηση των μέσων καλλιέργειας.

Μέσο καλλιέργειας	Κωδικός
1. νερό φυσικού πληθυσμού	Φ
2. οζονισμένο νερό φυσικού πληθυσμού	Φ_ο
3. απόβλητο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	A
4. απόβλητο κροκιδωμένο (τριτοβάθμια επεξεργασία)	A_κ
5. απόβλητο οζονισμένο (τριτοβάθμια επεξεργασία)	A_ο
6. απόβλητο κροκιδωμένο και οζονισμένο (τριτοβάθμια επεξεργασία)	A_{κο}

Το νερό της καλλιέργειας, ανανεώνονταν ανά 3 ημέρες ενώ αμέσως μετά γίνονταν η σίτιση των ατόμων σύμφωνα με το πρωτόκολλο διατροφής.

Ο πληθυσμός διατηρήθηκε υπό συνθήκες τεχνητής φωτοπεριόδου (14L:10D, χρονοδιακόπτης ΤΓ-14^A, Cixy city Yidong Electronics), από πηγή λευκού φωτός ισχύος 25W σε απόσταση 80cm, μέσα σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 21°C.

2.3.3. Διατροφή του πληθυσμού

2.3.3.1. Διατροφή με *Chlorella sp.*

Η καλλιέργεια της *Chlorella sp.* έγινε σε κωνικές φιάλες των 2L, σε φωτιζόμενο θάλαμο, θερμοκρασίας 21°C. Η θερμοκρασία του νερού της καλλιέργειας ήταν 22°C, η αλατότητα 35psu και το pH 7,6-8,5. Ο φωτισμός ήταν συνεχής, με λάμπες λευκού φωτός 40W, φωτοπεριόδου 24L:0D. Πριν την εισαγωγή του φυτοπλαγκτού, γίνονταν αποστείρωση των υλικών σε κλίβανο. Τα θρεπτικά και οι βιταμίνες προσθέτονταν στο μέσο καλλιέργειας σύμφωνα με τη συνταγή Walne τροποποιημένη κατά Laing 1996 (F.A.O, 1996). Στη καλλιέργεια παρέχονταν ατμοσφαιρικός αέρας με ελαφριά ένταση ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογενής έκθεση των κυττάρων στα θρεπτικά και στο φως, να αποφεύγεται η θερμική στρωμάτωση, και να ανταλλάσσονται αέρια μεταξύ καλλιέργειας και ατμοσφαιρικού αέρα. ¹ Η μέτρηση της συγκέντρωσης του φυτοπλαγκτού γίνονταν σε αιμοκυτόμετρο Newbauer. Οι πειραματικοί πληθυσμοί ταίζονταν με 10⁵ κύτταρα ανά δοχείο ζέσεως, δηλαδή με 2500 κύτταρα ανά ml καλλιέργειας.

¹ Γίνεται προσθήκη CO₂ (1% του ατμοσφαιρικού αέρα), το οποίο ισορροπεί το νερό ως προς τις αλλαγές του pH λόγω της αυξομείωσης των συγκεντρώσεων CO₂/HCO₃ (F.A.O, 1996).

2.3.3.2. Διατροφή με πίτουρο σιταριού (*Wheat bran*)

Το πίτουρο σιταριού ήταν προϊόν βιολογικής καλλιέργειας, τύπου Il flor di lotto (www.fiordiloto.it, Ιταλία). Ποσότητα 1g διαλύονταν σε 12ml αποχλωρωμένου νερού βρύσης, αναδεύονταν και ακολούθως διηθούνταν με δίκτυ ανοίγματος 60μm, για τη συγκράτηση των μεγάλων τεμαχιδίων του πίτουρου. Σε κάθε πειραματικό πληθυσμό χορηγούνταν καθημερινά ποσότητα 0,5ml αραιωμένου πίτουρου ανά δοχείο ζέσεως.

2.3.4. Φυσικοχημικές παράμετροι του μέσου καλλιέργειας

2.3.4.1. Θερμοκρασία

Οι μετρήσεις της θερμοκρασίας έγιναν με θερμομέτρο τύπου Check Temp 1 (Hanna Instruments), σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, καθημερινά, δύο φορές την ημέρα (9:00 και 19:00). Στο πρώτο πείραμα, έγιναν 284 μετρήσεις για κάθε τύπο τροφής (21 ημέρες x 2 δοχεία ανά ημέρα x 2 μετρήσεις ανά δοχείο x 6 μέσα καλλιέργειας).

2.3.4.2. Αλατότητα

Η αλατότητα μετρήθηκε με συσκευή μέτρησης ολικών αιωρούμενων σωματιδίων (Tetracon Microprocessor Conductivity Meter) τύπου LF 320 (WTW, Γερμανία). Η μέτρηση γίνονταν σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, κάθε 3^η ημέρα, μία φορά την ημέρα (17:00). Στο πρώτο πείραμα, έγιναν λοιπόν, 28 μετρήσεις για κάθε τύπο τροφής (7 ημέρες x 4 δοχεία ανά ημέρα).

2.3.4.3. Διαλυμένο οξυγόνο (DO)

Οι μετρήσεις του διαλυμένου οξυγόνου (DO), έγιναν με τη βοήθεια οξυγονομέτρου τύπου OXI 197 (WTW, Γερμανία). Η μέτρηση γίνονταν σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, κάθε 3^η ημέρα, μία φορά την ημέρα (17:00). Στο πρώτο πείραμα, έγιναν 28 μετρήσεις για κάθε τύπο τροφής (7 ημέρες x 4 δοχεία ανά ημέρα).

2.3.4.4. pH

Οι μετρήσεις του pH έγιναν με τη βοήθεια επιτραπέζιου οργάνου μέτρησης τύπου Sentix 61 Inolab (WTW, Γερμανία). Η μέτρηση γίνονταν σε κάθε δοχείο

Σχόλιο [U2]: Πριν τη χρήση του οργάνου γίνονταν ρύθμιση ενώ μετά τις μετρήσεις ακολουθούσε καθαρισμός του οργάνου με διαλύματα τα οποία παρέχονται με το όργανο και απομακρύνουν τα άλατα, όπως επίσης βοηθούν στην ρύθμιση του οργάνου.

Σχόλιο [U3]: Πριν τη χρήση προηγούνταν ρύθμιση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες, χρησιμοποιώντας τα διαλύματα καθαρισμού και ρύθμισης.

καλλιέργειας, κάθε 3^η ημέρα, μία φορά την ημέρα (17:00). Στο πρώτο πείραμα, έγιναν 7 μετρήσεις για κάθε τύπο τροφής (7 ημέρες x 1 δοχείο ανά ημέρα).

2.3.4.5. Σκληρότητα

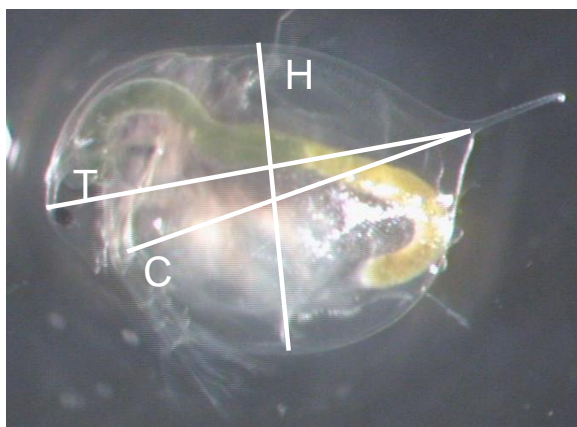
Η σκληρότητα μετρήθηκε με δοκιμή σκληρότητας (Total Hardness Test) τύπου Aqua Merck (Merck). Η μέτρηση γίνονταν σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, κάθε 3^η ημέρα, μία φορά την ημέρα (17:00). Στο πρώτο πείραμα, έγιναν λοιπόν, 28 μετρήσεις για κάθε τύπο τροφής (7 ημέρες x 4 δοχεία ανά ημέρα).

2.3.5. Περιγραφή του αριθμού γενεών και του αριθμού των απογόνων ανά γενεά

Σε κάθε δοχείο καταγράφονταν καθημερινά (9:00 και 19:00), ο αριθμός γενιάς και ο αριθμός των απογόνων κάθε γενιάς. Μετά την καταμέτρηση, οι απόγονοι απομακρύνονταν και στη καλλιέργεια παρέμενε μόνο το μητρικό άτομο.

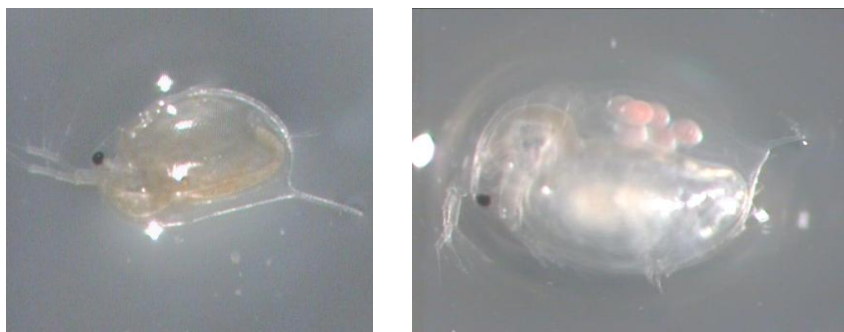
2.3.6. Μέτρηση του μεγέθους των ατόμων (σωματικές διαστάσεις)

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.2 μετρήθηκαν 3 διαστάσεις: το ολικό μήκος σώματος (TL), το μήκος C (carapace length) και το ύψος σώματος (H). Οι μετρήσεις έγιναν την 1^η (αρχή) και την 21^η ημέρα (τέλος) σε δύο άτομα από κάθε μέσο καλλιέργειας και τύπο τροφής (24 άτομα ανά ημέρα).



Εικόνα 3.2. Οι 3 διαστάσεις σώματος που μετρήθηκαν.
T: ολικό μήκος σώματος, C: μήκος κελύφους (carapace),
H: ύψος σώματος.

Αρχικά, τα άτομα φωτογραφίζονταν σε στερεοσκόπιο τύπου SZX12 (OLYMPUS), στις μεγεθύνσεις 0,5×40 (για τα νεαρά άτομα) και 0,5×25 (για τα ενήλικα) με κάμερα τύπου CCD IRIS (Sony) και ακολούθως μετρούνταν οι διαστάσεις σε σύστημα ανάλυσης εικόνας (Image Analysis, Image Pro plus 4.5.1.29).



Εικόνα 1. Άτομο *D. magna* την 1^η και την 21^η μέρα του πειράματος στην ίδια μεγέθυνση.

2.4. Πείραμα 2

Στο δεύτερο πείραμα αναπτύχθηκε η καλλιέργεια της *D. magna*, στο καταλληλότερο από τα απόβλητα που αξιολογήθηκαν στο 1^ο πείραμα, και σε τρία μέσα με βάση το φυσικό νερό (Φ , Φ_k , Φ_o).

Οι καλλιέργειες έγιναν σε ενυδρεία 15L, σε όγκο νερού 4 L, με δύο αντίγραφα για κάθε μέσο καλλιέργειας. Πάνω από τα ενυδρεία και σε απόσταση 70 cm τοποθετήθηκαν λάμπες λευκού φωτός 25W, φωτοπεριόδου 14L:10D, με χρονοδιακόπτη τύπου ΤΓ-14Α της εταιρείας Cixy City Yidong Electronics. Οι φυσικοχημικές παράμετροι μετρήθηκαν όπως περιγράφεται για το πρώτο πείραμα.

Η καλλιέργεια ξεκίνησε στην πυκνότητα των 120 ατόμων (30 άτομα/L), συνολικής ξηρής βιομάζας 30mg και διήρκεσε 21 ημέρες. Η ανανέωση του μέσου γινόταν κάθε τέσσερις ημέρες στο 50% του νερού της καλλιέργειας. Τα άτομα της *Daphnia*, σιτίζονταν καθημερινά, με πίτουρο σιταριού, μία φορά την ημέρα (στις 13:30), στη δόση των 0,3g (300mg) ανά 4L καλλιέργειας.

2.4.1. Υπολογισμός της αφθονίας του πληθυσμού

Την 1^η ημέρα ο αριθμός των ατόμων ήταν ο ίδιος σε κάθε μέσο (120 άτομα/δοχείο). Ακολούθησαν δειγματοληψίες την 10^η, 15^η και 21^η ημέρα από την έναρξη του πειράματος (D_{10} , D_{15} , D_{21}). Οι δειγματοληψίες γίνονταν ως εξής:

- Αφού αναδεύαμε την καλλιέργεια για να την ομογενοποιήσουμε, τοποθετούσαμε ένα κυλινδρικό σωλήνα διαμέτρου 10 cm, στο κέντρο του ενυδρείου για να παγιδεύουμε ένα μικρό όγκο νερού.
- Μεταφέραμε τα άτομα με σιφώνιο, σε ένα άλλο δοχείο γνωστού όγκου.
- Διαχωρίζαμε το νερό σε μικρότερους όγκους και καταμετρούσαμε τον αριθμό των ατόμων,
- Ο συνολικός αριθμός ατόμων στη δεξαμενή υπολογίζονταν με αναγωγή στον τελικό όγκο νερού της κάθε καλλιέργειας.
- Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνονταν δυο φορές για μεγαλύτερη ακρίβεια.

2.4.2. Προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας του πληθυσμού

Την τελευταία ημέρα, μετρήθηκε η ξηρή βιομάζα σε κάθε πληθυσμό. Η ξήρανση έγινε σε ξηραντήρα τύπου FN 500 της εταιρείας Nüve (70°C, 20 min) και η ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό Explorer Pro (OHAUS).

2.4.3. Υπολογισμός ρυθμού πληθυσμιακής αύξησης (r)

Ο ρυθμός πληθυσμιακής αύξησης (r), υπολογίστηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο: $r = [\ln(N_t) - \ln(N_0)]/t$, όπου N_0 και N_t είναι η αρχική και η τελική αφθονία αντίστοιχα και t είναι ο χρόνος σε ημέρες (Krebs, 1985).

2.5. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα καταχωρήθηκαν και αρχειοθετήθηκαν σε φύλλα εργασίας του υπολογιστικού προγράμματος EXCEL 2003. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα, Statistica 7,0 (Stat Soft). Οι μέσες τιμές συγκρίθηκαν με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA, one way, παραμετρική ανάλυση), σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,001$. Ο έλεγχος των στατιστικά σημαντικών διαφορών έγινε με τη δοκιμή Bonferoni (Zar, 1999).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πείραμα 1

3.1.1. Φυσικοχημικές παράμετροι των μέσων καλλιέργειας

3.1.1.1. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία των μέσων διαμορφώθηκε ανεξάρτητα από το είδος της τροφής που προσφέρθηκε (Εικόνα 3.1.A). Η μέση θερμοκρασία διαφοροποιήθηκε μεταξύ 19,7 (*Chlorella* Φ₀) και 21,2°C (WB Α_κ) στις δύο ομάδες διατροφής και διέφερε σημαντικά μεταξύ των μέσων καλλιέργειας (ANOVA, $p < 0.001$). Και στις δύο ομάδες, η μέση θερμοκρασία της δευτερογενούς (A) ή τριτογενούς επεξεργασμένου (A₀, A_{0κ}, A_κ) αποβλήτου ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του φυσικού νερού (Φ, Φ₀, ANOVA, $p < 0.001$).

3.1.1.2. Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)

Με μόνη εξαίρεση τη δευτεροβάθμια εκροή (A), στο οποίο η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου ήταν σημαντικά μικρότερη αυτής στα άλλα μέσα (3 mg/L, ANOVA, $p < 0,001$), η μέση συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη από 3 mg/L σε όλα τα μέσα και στις δύο ομάδες διατροφής (Εικόνα 3.1.B). Στα τριτογενώς επεξεργασμένα απόβλητα, οι τιμές ήταν ενδιάμεσες (A_κ, A_{κ0}, A₀, $p < 0,001$) ενώ το νερό του φυσικού πληθυσμού (Φ και Φ₀) είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές (4,8-5,1ppm, $p < 0,001$).

3.1.1.3. Αλατότητα

Η αλατότητα διαφοροποιήθηκε μεταξύ των μέσων κατά παρόμοιο τρόπο και στις δύο ομάδες διατροφής (*Chlorella sp.*, WB), με μέση τιμή, μεγαλύτερη από 4psu σε όλα τα μέσα (Εικόνα 3.1.Γ). Η μέση αλατότητα των απόβλητων (A, A_κ, A_{κ0}, A₀), ήταν σημαντικά χαμηλότερη (3,9-4,53, $p < 0,05$) ενώ η αλατότητα στο φυσικό νερό είχε τις υψηλότερες τιμές (Φ: 5,15 psu Φ₀:5,33 psu).

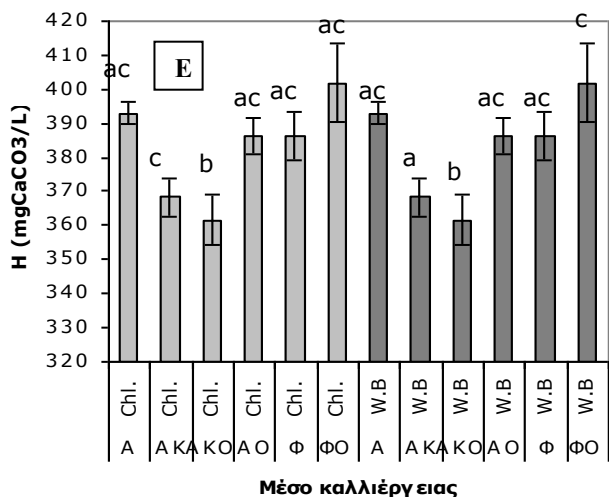
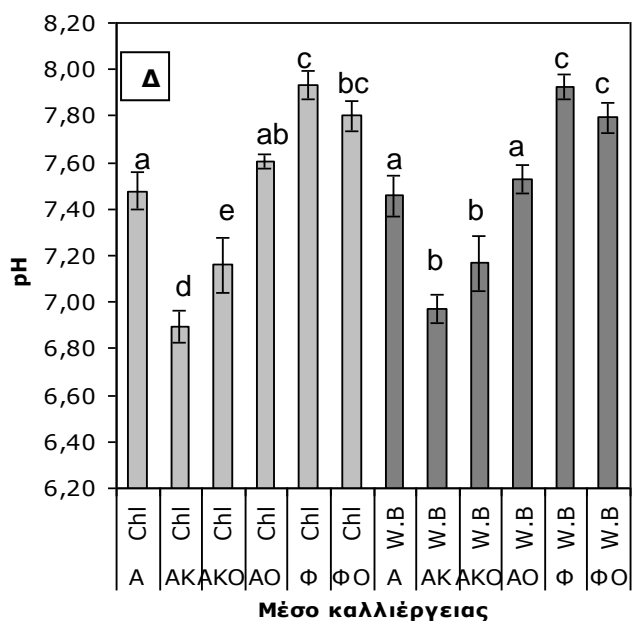
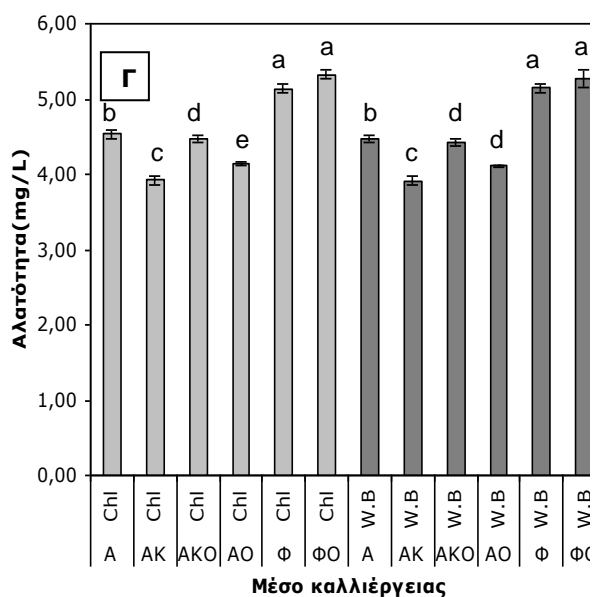
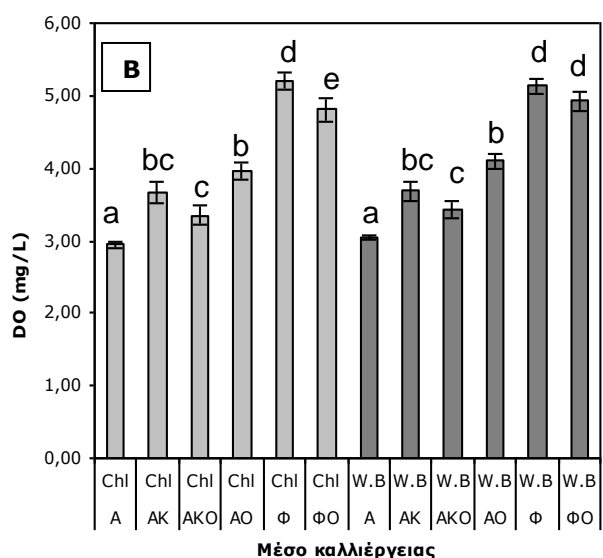
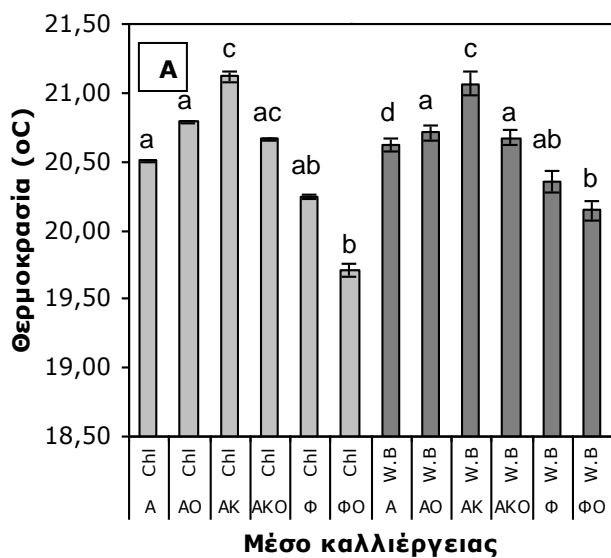
3.1.1.4. pH

Όπως και οι άλλες παράμετροι, έτσι και η μέση τιμή του pH διαμορφώθηκε ανεξάρτητα από τον τύπο διατροφής, αφού οι τιμές pH κάθε μέσου ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες (Εικόνα 3.1.Δ). Επιπλέον, σε όλα τα μέσα, το pH ήταν αλκαλικό (τιμές μεγαλύτερες από 7). Το φυσικό νερό στην ανεπεξεργαστη ή στην

επεξεργασμένη μορφή του, ήταν το πιο αλκαλικό μέσο (pH: 7,8-7,93), η δευτεροβάθμια εκροή (A) και το οξονισμένο απόβλητο (A_ο) είχαν ενδιάμεσες τιμές (7,1-7,5) ενώ το κροκιδωμένο (A_κ) και το διπλά επεξεργασμένο απόβλητο (A_{κο}) είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές (6,8-7, $p < 0,001$).

3.1.1.5. Σκληρότητα

Η σκληρότητα διαφοροποιήθηκε στα μέσα ανεξάρτητα από τον τύπο τροφής. Τα περισσότερα μέσα είχαν παρόμοια σκληρότητα (μεγαλύτερη από 371,54 mg CaCO₃/L, πολύ σκληρό νερό) με εξαίρεση το διπλά επεξεργασμένο απόβλητο (A_{κο}) το οποίο είχε σημαντικά χαμηλότερη τιμή και στις δύο ομάδες διατροφής (367,25 και 361,53 mg CaCO₃/L αντίστοιχα, σκληρό νερό, $p < 0,05$) (Εικόνα 3.1.Ε).



Εικόνα 3.1. Μέσες τιμές (\pm SE) των φυσικοχημικών παραμέτρων στα μέσα καλλιέργειας. (A: θερμοκρασία, B: DO, Γ: αλατότητα, Δ: pH, E: σκληρότητα) (A: δευτεροβάθμια εκροή, AK: κροκιδωμένο απόβλητο, AKO: κροκιδωμένο-οξονισμένο απόβλητο, AO: οξονισμένο απόβλητο, Φ: φυσικό νερό, ΦO: οξονισμένο φυσικό νερό) και τύπο τροφής (Chl: *Chlorella sp*, W.B: πίτουρο σιταριού). Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικά διάφορες τιμές ($p < 0.001$).

3.1.2. Θνησιμότητα

Τα νεκρά άτομα (n=7) παρατηρήθηκαν στη δευτεροβάθμια εκροή (A) και στα οξονισμένα μέσα (απόβλητο και φυσικό νερό, A_ο, Φ_ο) ενώ δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι στα υπόλοιπα μέσα (Πίνακας 3.1). Επίσης, οι περισσότεροι θάνατοι (5 στους 7, 71 %), παρατηρήθηκαν στον πληθυσμό που τρέφονταν με πίτουρο.

Πίνακας 3.1. Αριθμός νεκρών ατόμων (θνησιμότητα) ανά μέσο καλλιέργειας και τύπο τροφής.

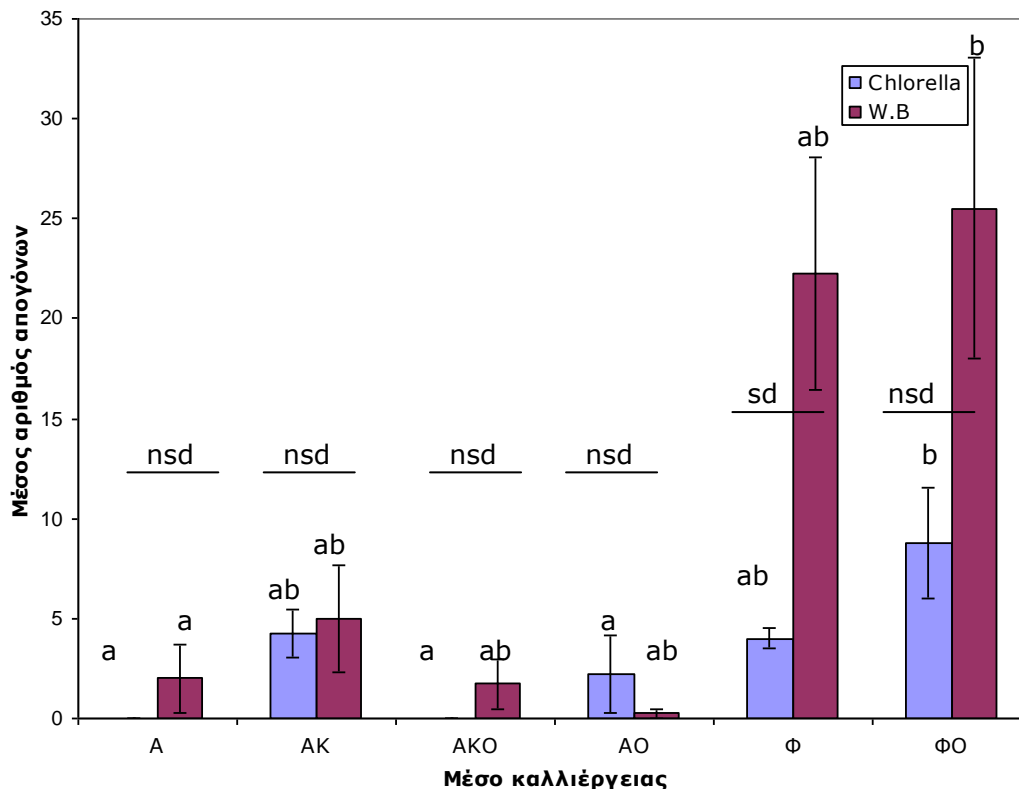
Μέσο καλλιέργειας	<i>Chlorella sp.</i>	Πίτουρο σιταριού (W.B)	Σύνολο
A	1	3	4
A _κ			
A _ο	1	1	2
A _{κο}			
Φ			
Φ _ο		1	1
Σύνολο	2	5	7

3.1.3. Αναπαραγωγή (Γονιμότητα)

Στην ομάδα σίτισης με *Chlorella sp.*, η γονιμότητα (μέσος αριθμός απογόνων) ήταν παρόμοια στα απόβλητα και στο φυσικό νερό αλλά σημαντικά χαμηλότερη από αυτή στο οξονισμένο φυσικό νερό (Φ_ο, Εικόνα 3.2., p<0,05).

Ομοίως, στην ομάδα σίτισης με πίτουρο (WB), ο αριθμός απογόνων ήταν παρόμοιος στα απόβλητα και στο φυσικό νερό (Φ), αλλά στα απόβλητα A, A_{κο}, και A_ο ήταν σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν στο Φ_ο (p<0,01). Δηλαδή και στις δύο ομάδες σίτισης, τα άτομα που καλλιεργήθηκαν στο Φ_ο είχαν τη μεγαλύτερη γονιμότητα. Με άλλα λόγια, η επεξεργασία του φυσικού νερού με οξονισμό (Φ_ο), συνέβαλλε σε καλύτερη γονιμότητα σε σχέση με το ανεπεξεργαστο φυσικό νερό (Φ).

Μεταξύ των απόβλητων και μάλιστα και στις δύο ομάδες διατροφής, οι καλύτερες αποδόσεις παρουσιάστηκαν στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_κ, αλλά όχι και στατιστικά σημαντικά διάφορες).

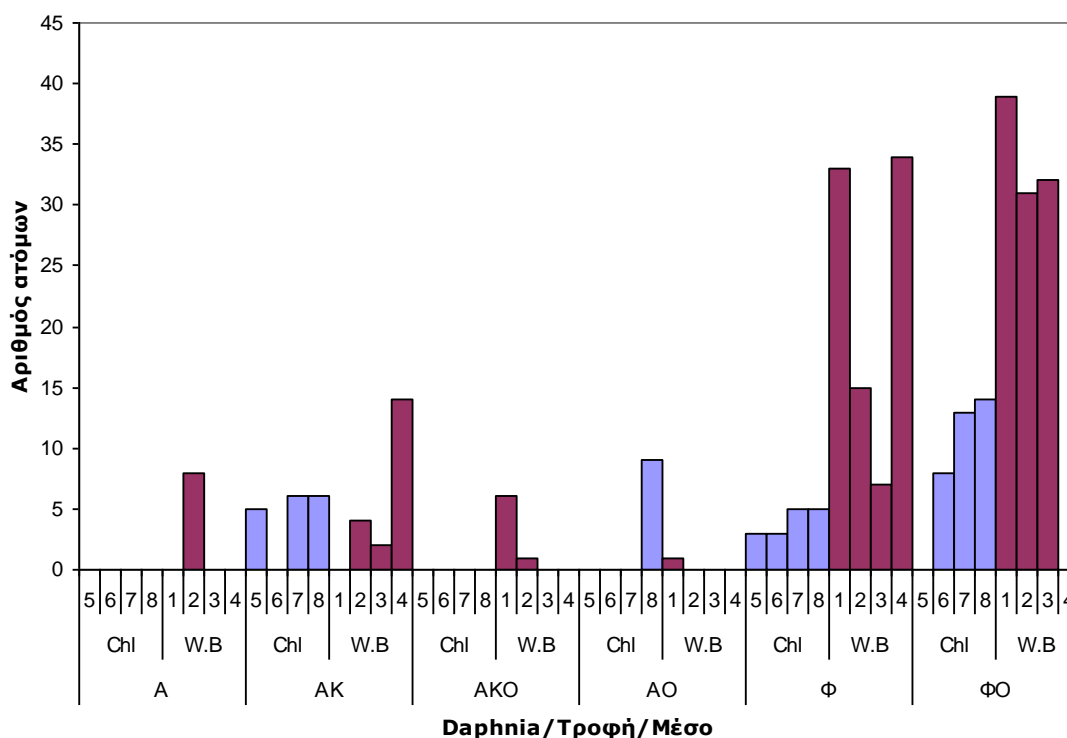


Εικόνα 3.2. Μέσος αριθμός απογόνων (\pm SE) για κάθε μέσο καλλιέργειας (A: δευτεροβάθμια εκροή, A_κ: κροκιδωμένο απόβλητο, A_{κo}: κροκιδωμένο-οζονισμένο απόβλητο, A_o: οζονισμένο απόβλητο, Φ: φυσικό νερό, Φ_o: οζονισμένο φυσικό νερό) και τύπο τροφής (*Chlorella sp.*, W.B: πίτουρο σιταριού). Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικά διάφορες τιμές (μεταξύ των μέσων καλλιέργειας με *Chlorella sp.*: $p < 0.05$, μεταξύ των μέσων με WB: $p < 0.01$). SD: στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). nSD: μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η στατιστική ανάλυση της μέσης γονιμότητας ανά μέσο καλλιέργειας και τύπο τροφής, έδειξε ότι η διατροφή με πίτουρο σιταριού, συνέβαλε σε αύξηση της γονιμότητας μόνο στο φυσικό νερό (Φ και πιθανόν και στο Φ_o, $p < 0,05$) ενώ δεν είχε ευεργετική επίδραση σε άλλο μέσο.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3, στην οποία απεικονίζεται η συγκεντρωτική γονιμότητα του κάθε ατόμου στο σύνολο της πειραματικής περιόδου (21 ημέρες) και ανάλογα με τον τύπο τροφής που προσφέρθηκε, η συντριπτική πλειοψηφία των ατόμων στα απόβλητα A, A_{κo}, A_o, δεν αναπαράχθηκαν ενώ μόνο στο κροκιδωμένο απόβλητο A_κ, 6 στα 8 άτομα *Daphnia* έδωσαν απογόνους (75%, 5-14 απογόνους ανά άτομο, Εικόνα 3.3). Όμως, στο φυσικό (Φ, Φ_o) η συνολική γονιμότητα ήταν μεγαλύτερη από πέντε απογόνους ανά άτομο. Μάλιστα δε, σε αρκετές περιπτώσεις

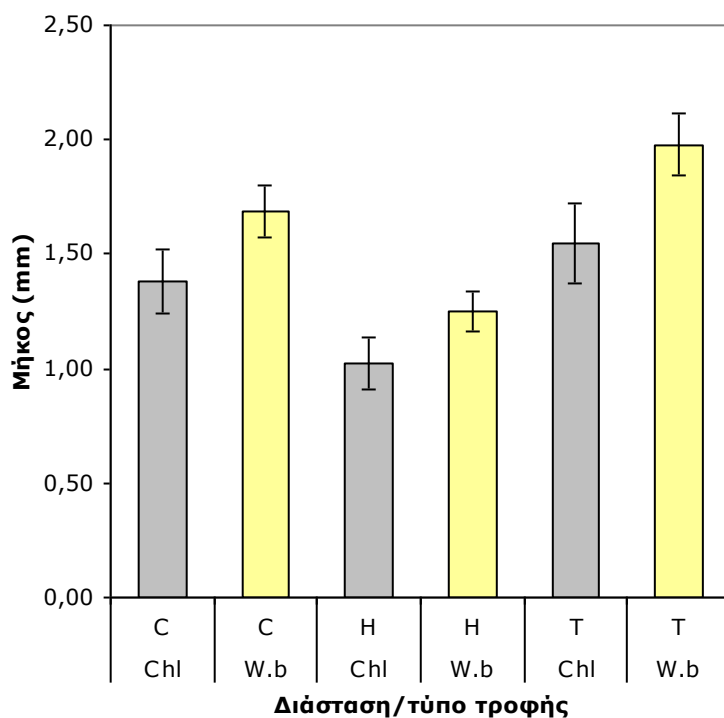
ήταν μεγαλύτερη από δέκα άτομα ενώ μερικά άτομα και συγκεκριμένα τρία στο Φ₀ και δυο στο Φ παρήγαγαν περισσότερα από 30 απογόνους, το καθένα.



Εικόνα 3.3. Συνολικός αριθμός απογόνων για κάθε άτομο *D. magna* σε κάθε μέσο καλλιέργειας (A: δευτεροβάθμια εκροή, A_κ: κροκιδωμένο απόβλητο, A_{κ0}: κροκιδωμένο-οξοιτισμένο απόβλητο, A_ο: οξοιτισμένο απόβλητο, Φ: φυσικό νερό, Φ₀: οξοιτισμένο φυσικό νερό) και ανάλογα του τύπου τροφής (*Chlorella sp*, W.B πίτουρο σιταριού).

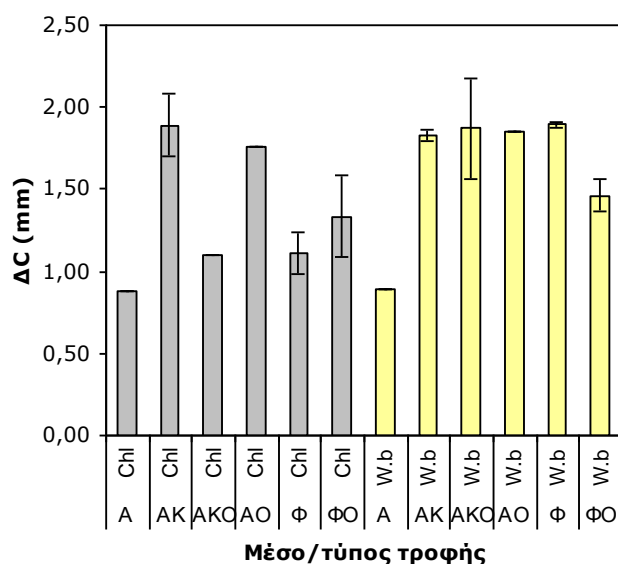
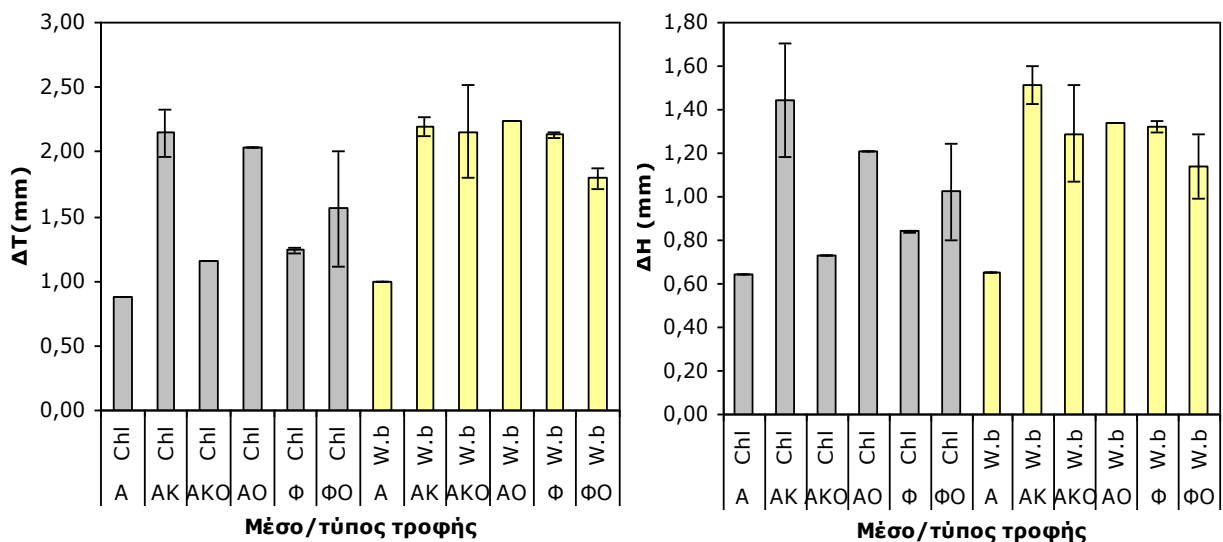
3.1.4. Μέγεθος των ατόμων

Οι τρεις σωματικές διαστάσεις (ολικό μήκος, σωματικό ύψος και μήκος κελύφους) αυξήθηκαν περισσότερο, στα άτομα που τρέφονταν με πίτουρο (WB) συγκριτικά μ' αυτά που τρέφονταν με φυτοπλαγκτό (Chl, Εικόνα 3.4). Μάλιστα δε, η μέση μεταβολή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα του πίτουρου για όλες τις μετρούμενες διαστάσεις ($p < 0,05$). Για παράδειγμα, το μέσο ολικό μήκος (T) των ατόμων της ομάδας WB αυξήθηκε κατά 1,98 mm ενώ αυτό της ομάδας Chl, αυξήθηκε κατά 1,55 mm. Όπως για το ολικό μήκος, αντίστοιχες ήταν οι διαφορές για το ύψος σώματος (H, 1,25 αντί 1,02mm της ομάδας φυτοπλαγκτού) και το μήκος κελύφους (C, 1,69 αντί 1,38mm της ομάδας φυτοπλαγκτού).



Εικόνα 3.4. Μέση μεταβολή (\pm SE) του μήκος κελύφους (C), του σωματικού ύψους (H) και του ολικού μήκους σώματος (T) στις δύο ομάδες σίτισης (Chl: *Chlorella sp.*, W.b: πίτουρο σιταριού).

Η ανάλυση της μεταβολής κάθε σωματικής διάστασης (ολικό μήκος, ύψος σώματος, μήκος κελύφους) σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας, έδειξε ότι τα άτομα της *Daphnia* ήταν σημαντικά πιο μεγαλόσωμα στο κροκιδωμένο και στο οζονισμένο απόβλητο (A_K και A_{KO}), είχαν ενδιαμέσο μέγεθος στο φυσικό νερό (Φ και Φ_0) και ήταν σημαντικά πιο μικρόσωμα στο ανεπεξέργαστο απόβλητο (A) (Εικόνα 3.5). Για παράδειγμα, ενώ η μέση μεταβολή του ολικού μήκους ήταν περίπου 2,1mm στο A_K και A_0 , ήταν 1,6mm στο φυσικό νερό (Φ και Φ_0) και μόνο 0,93mm στη δευτεροβάθμια εκροή (A). Παρόμοιας τάσης αλλά και κλίμακας, ήταν οι μεταβολές στις άλλες δύο σωματικές διαστάσεις (ύψος και μήκος κελύφους, Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5. Μέση μεταβολή (\pm SE) στο μήκος κελύφους (C), του σωματικού ύψους (H) και του ολικού μήκους (T) των ατόμων της *D. magna*, ανάλογα με τον τύπο τροφής (Chl: *Chlorella sp.*, W.b: πίτουρο σιταριού) και το μέσο καλλιέργειας (A: δευτεροβάθμια εκροή, AK: κροκιδωμένο απόβλητο, AKO: κροκιδωμένο-οξονισμένο απόβλητο, AO: οξονισμένο απόβλητο, Φ: φυσικό νερό, ΦO: οξονισμένο φυσικό νερό).

3.2. Πείραμα 2

3.2.1. Φυσικοχημικές παράμετροι του μέσου καλλιέργειας

3.2.1.1. Θερμοκρασία

Η μέση θερμοκρασία δεν διέφερε σημαντικά στα τέσσερα μέσα καλλιέργειας και κυμάνθηκε από 19,5 έως 20,5°C (Εικόνα 3.6.A, $p>0,05$).

3.2.1.2. Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)

Η μέση συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_k , $3\pm 0,2$ mg/L, $p<0.001$) συγκριτικά με το φυσικό νερό (Φ , Φ_k , Φ_o , 4,5mg/L) (Εικόνα 3.6B).

3.2.1.3. Αλατότητα

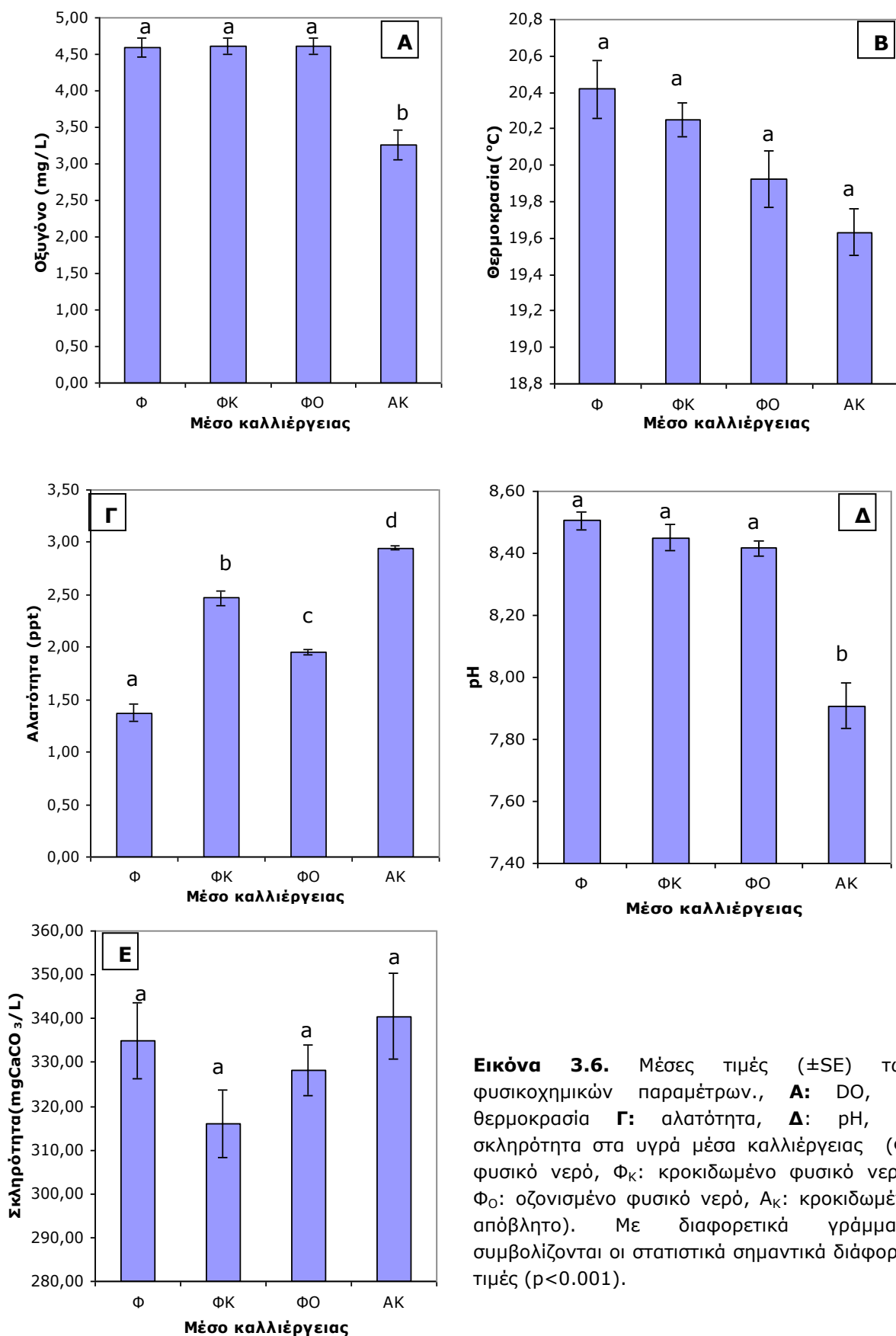
Η μέση αλατότητα διέφερε σημαντικά στα τέσσερα μέσα ($p<0.001$, Εικόνα 3.6.Γ). Το A_k είχε τη μεγαλύτερη αλατότητα, το επεξεργασμένο φυσικό νερό είχε ενδιάμεσες τιμές (Φ_k , Φ_o) ενώ το ανεπεξέργαστο φυσικό νερό είχε σημαντικά χαμηλότερη τιμή.

3.2.1.4. pH

Το pH ήταν αλκαλικό σε όλα τα μέσα αλλά ενώ δεν διέφερε σημαντικά στα μέσα με βάση το φυσικό νερό (Φ , Φ_k , Φ_o , περίπου 8,4, Εικόνα 3.6.Δ) και είχε σημαντικά χαμηλότερη τιμή στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_k : 7,9, $p<0,001$).

3.2.1.5. Σκληρότητα

Η μέση σκληρότητα, διαφοροποιήθηκε μεταξύ 316 και 340 mg $CaCO_3/L$ και δεν διέφερε σημαντικά στα μέσα καλλιέργειας ($p>0,05$, Εικόνα 3.6.E).



Εικόνα 3.6. Μέσες τιμές (\pm SE) των φυσικοχημικών παραμέτρων., **A:** DO, **B:** θερμοκρασία **Γ:** αλατότητα, **Δ:** pH, **Ε:** σκληρότητα στα υγρά μέσα καλλιέργειας (Φ: φυσικό νερό, Φκ: κροκιδωμένο φυσικό νερό, Φο: οξονισμένο φυσικό νερό, Ακ: κροκιδωμένο απόβλητο). Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές τιμές ($p < 0.001$).

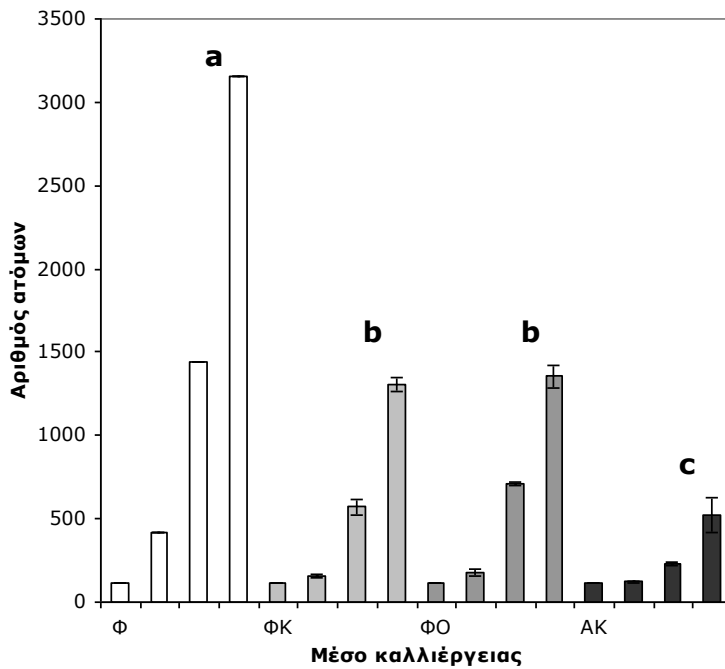
3.2.2. Μεταβολή της αφθονίας και τελική βιομάζα

Η αφθονία των ατόμων αυξήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος σε όλα τα μέσα. Όμως, την 21^η ημέρα, η μεγαλύτερη αφθονία παρατηρήθηκε στο ανεπεξέργαστο φυσικό νερό (Φ : 3152 άτομα, συγκέντρωση: 315,2 άτομα ανά L), ήταν ενδιάμεση στο κροκιδωμένο και στο οζονισμένο φυσικό νερό (Φ_K : 1307 ± 147 , Φ_O : 1356 ± 98 , συγκέντρωση: 130-135 άτομα/L) ενώ ήταν σημαντικά μικρότερη στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_K : 519 άτομα, συγκέντρωση: 52 άτομα/L, $p < 0.001$) (Εικόνα 3.7).

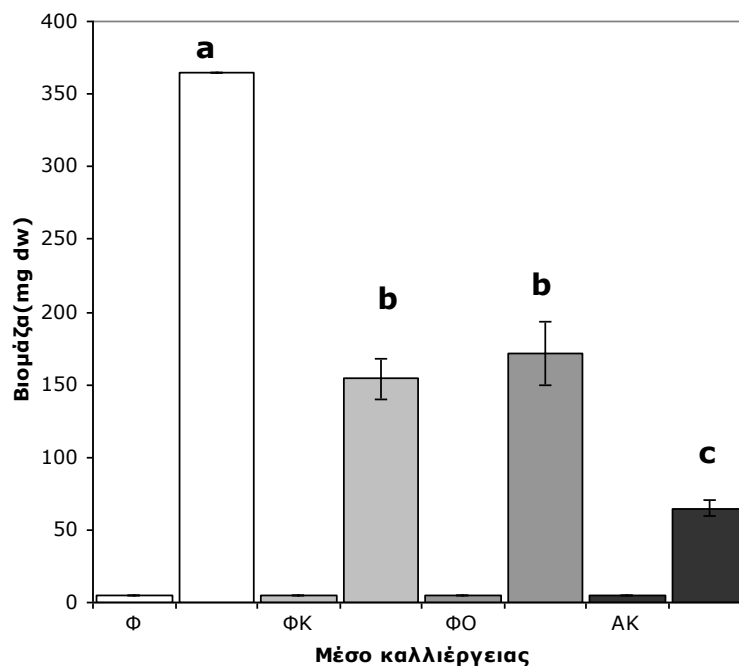
Κατ' αντίστοιχο τρόπο, η ξηρή βιομάζα την 21^η ημέρα ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_K : 65 mg) είχε παρόμοιες και ενδιάμεσες τιμές στο κροκιδωμένο και στο οζονισμένο φυσικό νερό (Φ_K : 154 mg, Φ_O : 171 mg) ενώ είχε τη μέγιστη τιμή στο φυσικό νερό (Φ : 365 mg, $p < 0.001$) (Εικόνα 3.8).

3.2.3. Ρυθμός πληθυσμιακής αύξησης

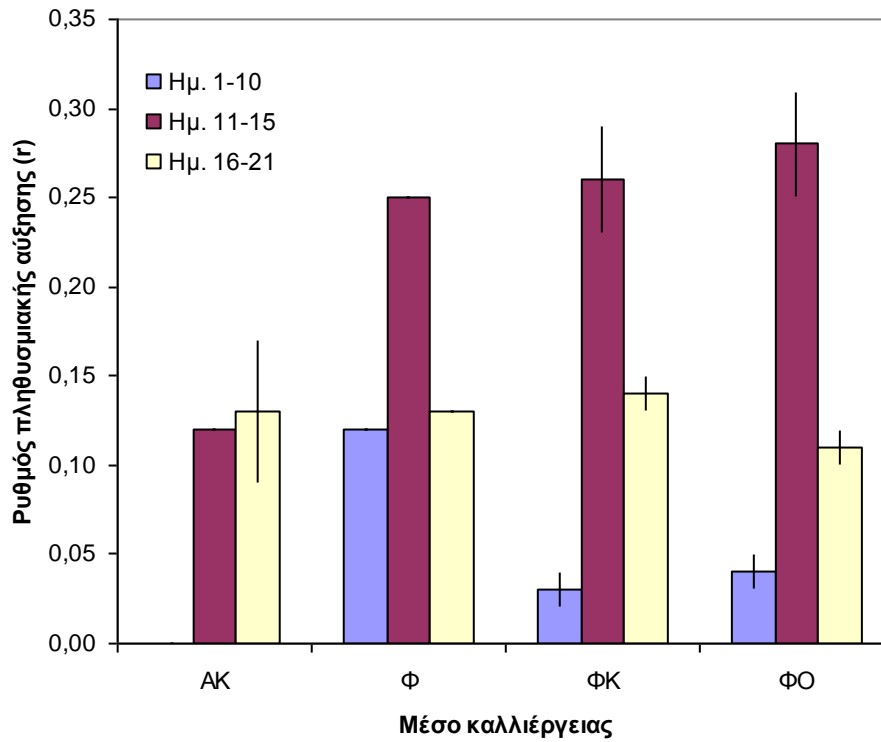
Στο φυσικό νερό και μάλιστα ανεξάρτητα από το τύπο της επεξεργασίας του (Φ , Φ_K , Φ_O), ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού την δεύτερη χρονική περίοδο (δηλαδή μεταξύ 11^{ης} και 15^{ης} ημέρας) ήταν διπλάσιος (0,25) από αυτόν στο απόβλητο (A_K , 0,12, Εικόνα 3.9). Επιπλέον, ο ρυθμός αύξησης την δεύτερη χρονική περίοδο ήταν μεγαλύτερος αυτού κατά την πρώτη και την τρίτη περίοδο, σε όλους τους πληθυσμούς που καλλιεργήθηκαν σε φυσικό νερό. Τέλος, την πρώτη χρονική περίοδο, ο ρυθμός αύξησης στα μέσα Φ_K και Φ_O (0,03-0,04), ήταν σημαντικά μικρότερος αυτού στο φυσικό νερό (Φ , 0,12).



Εικόνα 3.7. Μέσος συνολικός αριθμός ατόμων (\pm SE) την 1^η, 10^η, 15^η και 21^η ημέρα του πειράματος σε κάθε μέσο καλλιέργειας (Φ: φυσικό νερό, Φ_κ: κροκιδωμένο φυσικό νερό, Φ_ο: οζονισμένο φυσικό νερό, Α_κ: κροκιδωμένο απόβλητο). Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές τιμές ($p < 0.001$).



Εικόνα 3.8. Μέση ξηρή βιομάζα (\pm SE) την 1^η και την 21^η ημέρα του πειράματος σε κάθε μέσο καλλιέργειας (Φ: φυσικό νερό, Φ_κ: κροκιδωμένο φυσικό νερό, Φ_ο: οζονισμένο φυσικό νερό, Α_κ: κροκιδωμένο απόβλητο). Με διαφορετικά γράμματα συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές τιμές ($p < 0.001$).



Εικόνα 3.9. Μέσος ρυθμός πληθυσμιακής αύξησης (r , $\pm SE$) σε κάθε μέσο καλλιέργειας (AK: κροκιδωμένο απόβλητο, Φ: φυσικό νερό, Φκ: κροκιδωμένο φυσικό νερό, Φο: οζονισμένο φυσικό νερό) στις τρεις χρονικές περιόδους (**Ημ. 1-10:** χρονική περίοδος μεταξύ 1^{ης} και 10^{ης} ημέρας, **Ημ. 11-15:** χρονική περίοδος μεταξύ 11^{ης} και 15^{ης} ημέρας, **Ημ. 16-21:** χρονική περίοδος μεταξύ 16^{ης} και 21^{ης} ημέρας).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Φυσικοχημικές παράμετροι

Τα μέσα καλλιέργειας διέφεραν μεταξύ τους ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και στις δύο ομάδες σίτισης. Ωστόσο, παρά τις αποκλίσεις οι τιμές όλων των παραμέτρων κυμάνθηκαν μέσα στο επιθυμητό εύρος για μια επιτυχημένη και ευνοϊκή (από άποψη συνθηκών) καλλιέργεια του είδους (OECD TG 211, Paris 1998). Η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (DO), η αλατότητα αλλά και η αλκαλικότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερες στα απόβλητα συγκριτικά με το φυσικό νερό. Μόνο η σκληρότητα των μέσων ήταν παρόμοια, με εξαίρεση το διπλά επεξεργασμένο απόβλητο (A_{KO}) το οποίο είχε σημαντικά χαμηλότερες τιμές και στις δύο ομάδες διατροφής.

4.2. Θνησιμότητα και ηλικία αναπαραγωγής

Η θνησιμότητα ήταν μεγαλύτερη στο δευτερογενώς επεξεργασμένο απόβλητο (A) και στα οζονισμένα μέσα (απόβλητο και φυσικό νερό, A_O, Φ_O) ενώ δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι στα υπόλοιπα μέσα. Αυτό αποτελεί ένδειξη της ανεπάρκειας του ανεπεξέργαστου απόβλητου αλλά και των πιθανών αρνητικών επιδράσεων του οζονισμού, στη βιωσιμότητα των ατόμων της *D. magna*. Σύμφωνα με την Πεταλά (2006), το δευτερογενώς επεξεργασμένο απόβλητο, ασκεί τοξική επίδραση στα άτομα της *D. magna* (εμποδίζει την εκτέλεση βασικών λειτουργιών) και τα ακινητοποιεί επιφέροντας το θάνατο. Σε παρόμοια μελέτη, ο van der Geest (2005), αναφέρει ότι η θνησιμότητα της *D. magna*, σε απόβλητα δευτερογενούς επεξεργασίας κυμάνθηκε από 15 έως και 90%. Οι Nandini et al., (2004), αναφέρουν ότι η αύξηση του μεγέθους της *D. pulex*, σε ανεπεξέργαστα ή σε μερικώς επεξεργασμένα αστικά απόβλητα (προσθήκη αερισμού, δημιουργία κυκλοφορίας του νερού) ήταν μηδενική ενώ η καλλιέργεια του είδους σε δευτερογενώς επεξεργασμένα απόβλητα εξελίχθηκε αρνητικά.

Προσδιορίζοντας την ηλικία της πρώτης αναπαραγωγής, μπορούμε αποφανθούμε για το επίπεδο της προσαρμοστικότητας των ατόμων, στο μέσο καλλιέργειας. Το είδος *D. magna*, αναπαράγεται για πρώτη φορά στην ηλικία των 5 έως 10 ημερών, ανάλογα με τη θερμοκρασία του νερού και την επάρκεια των συνθηκών του περιβάλλοντος με σημαντικότερη την επάρκεια των συνθηκών σίτισης¹ (De Pauw et al., 1981, Roche, 1998, Ebert, 2005, van der Geest, 2005). Ένα ενήλικο θηλυκό άτομο, μπορεί να

¹ Όσο πιο επαρκείς είναι οι συνθήκες σίτισης, τόσο πιο πρόωμη ηλικιακά είναι η αναπαραγωγή.

παράγει αυγά κάθε 3-4 μέρες μέχρι το θάνατό του ενώ μπορεί να ζήσει για περισσότερους από 2 μήνες (στο εργαστήριο, van der Geest, 2005). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, τα άτομα που τρέφονταν με πίτουρο ωρίμασαν την 9^η ημέρα ζωής (στους 20-21°C), νωρίτερα σε σχέση με αυτά που τρέφονταν με το χλωροφύκος. Η ηλικία αυτή είναι μέσα στο εύρος ημερών που αναφέρουν άλλοι ερευνητές (Roche, 1998, Ebert, 2005, van der Geest, 2005) ενώ σχεδόν συμπίπτει με αυτή που αναφέρουν οι De Pauw et al. (1981), δηλαδή την 8^η ημέρα, σε πληθυσμό *D. magna* που σιτίζονταν με το ίδιο πρωτόκολλο σίτισης (πίτουρο ρυζιού). Επιπλέον, η μικρότερη ηλικία που βρήκαμε, δηλαδή αυτή των 6,4 (± 1.6) ημερών συμπίπτει με αυτή που αναφέρουν οι Lewis and Maki (1981).

4.3. Γονιμότητα και αύξηση του μεγέθους

Η γονιμότητα της *D. magna* έτεινε να είναι μικρότερη στα απόβλητα συγκριτικά με το φυσικό νερό. Μεταξύ των απόβλητων η γονιμότητα ήταν χαμηλή στο δευτερογενώς επεξεργασμένο απόβλητο (A) αλλά υψηλότερη στο κροκιδωμένο (A_K) και ακολούθως στο οζονισμένο απόβλητο (A_O). Μάλιστα δε, η πλειονότητα των ατόμων στα μέσα A, A_O, A_{KO}, δεν αναπαράχθηκαν. Τα δευτερογενώς επεξεργασμένα απόβλητα δεν φαίνεται να ευνοούν τη γονιμότητα της *D. magna*, ενώ παρόλο που στα τριτογενώς επεξεργασμένα απόβλητα η γονιμότητα βελτιώνεται σημαντικά φαίνεται ότι επηρεάζεται αρνητικά και τείνει να είναι μικρότερη από αυτή στο φυσικό νερό (Φ_o και Φ).

Η ανάλυση της μεταβολής των σωματικών διαστάσεων σε σχέση με το μέσο καλλιέργειας, έδειξε ότι τα άτομα της *D. magna* ήταν σημαντικά πιο μεγαλόσωμα στο κροκιδωμένο και στο οζονισμένο απόβλητο (A_K και A_O) σε σχέση με το δευτερογενώς επεξεργασμένο απόβλητο (A). Μάλιστα τα μεγέθη των ατόμων ήταν παρόμοια με αυτά στο φυσικό νερό (Φ και Φ_o). Παρόμοιας τάσης και κλίμακας ήταν οι μεταβολές στις άλλες δύο σωματικές διαστάσεις (ύψος και μήκος κελύφους). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ποιότητα του μέσου και ειδικότερα το είδος της επεξεργασίας (δευτερογενής, κροκιδωση, οζονισμός) επηρεάζει την αύξηση των ατόμων. Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά το τελικό ολικό μήκος, είναι πολύ κοντά με αυτά του van der Geest (2005), ο οποίος αναφέρει μέσο μήκος από 2,3 έως 2,8 mm αλλά και με αυτά του Roche (1998), (3,9-5,2mm, σε απόβλητα δεξαμενών εξισορρόπησης μετά από 2 μήνες). Είναι πολύ πιθανό η κροκιδωση και ο οζονισμός να ευνοούν την αύξηση, παρέχοντας υλικά πάνω στα οποία τρέφονται τα άτομα της *D. magna*. Τέτοια στοιχεία θα μπορούσαν να είναι διάφορα οργανικά σωματίδια ή και βακτήρια που αναπτύσσονται δευτερογενώς.

Η αρνητική επίδραση των δευτερογενώς επεξεργασμένων αποβλήτων στη γονιμότητα και στην αύξηση, μπορεί να σχετίζεται με τη χαμηλή συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (DO), σ' αυτά τα νερά. Η επίδραση του DO στην εκτέλεση των βασικών λειτουργιών και ειδικότερα στην αναπαραγωγή και την αύξηση των ζωικών οργανισμών είναι γνωστή. Στο συγκεκριμένο πείραμα, το ανεπεξέργαστο απόβλητο (A), είχε σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO: 3 mg/L) και μάλιστα κοντά στα όρια αντοχής του είδους. Τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης DO συνοδεύονταν από τη δημιουργία ενός επιφανειακού στρώματος, το οποίο εμποδίζει ενδεχομένως την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του νερού και του αέρα. Η επιπλέον επεξεργασία (τριτογενής επεξεργασία) του μέσου A με κροκιδωση (A_K) ή οζονισμό (A_O) ή και το συνδυασμό των δύο μεθόδων (A_{KO}), συντέλεσε στην αύξηση του DO και βελτίωσε τη βιωσιμότητα, τη γονιμότητα και την αύξηση των ατόμων σ' αυτά τα μέσα, καθιστώντας τα ευεργετικότερα για την ανάπτυξη των ατόμων συγκριτικά με το δευτερογενώς επεξεργασμένο απόβλητο (A). Η κροκιδωση είναι πιο ευεργετική μέθοδος από την δευτεροβάθμια επεξεργασία γιατί (1) αυξάνει τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και (2) γιατί τα κροκιδωτικά που χρησιμοποιούνται επιδρούν ευεργετικά (π.χ. ο $FeCl_3$). Η διπλή επεξεργασία (A_{KO} , κροκιδωση και οζονισμός, τριτογενής επεξεργασία) αλλά και ο οζονισμός από μόνος του (A_O) είναι λιγότερο ευεργετικά γιατί ο οζονισμός μπορεί να είναι τοξικός για τα καλλιεργούμενα είδη κλαδοκερωτών και μάλιστα πιθανόν όσο και η δευτεροβάθμια επεξεργασία (A, Πεταλά, 2006).

4.4. Αφθονία και Βιομάζα της καλλιέργειας στο κροκιδωμένο απόβλητο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η αύξηση της αφθονίας και της βιομάζας του καλλιεργούμενου πληθυσμού της *D. magna* στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_K) ήταν μικρότερη από αυτή στο φυσικό (Φ) και στο επεξεργασμένο φυσικό νερό (Φ_K και Φ_O). Με δεδομένο ότι η τελική βιομάζα της καλλιέργειας στο A_K ανήλθε μόνο στο 17% αυτής στο φυσικό νερό (Φ), δεν φαίνεται ότι το A_K συνιστά ένα πλεονεκτικό μέσο για την καλλιέργεια των κλαδοκερωτών σε εμπορική κλίμακα. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η τριτογενής επεξεργασία του φυσικού νερού, δεν βελτιώνει την αποδοτικότητα του φυσικού νερού για την καλλιέργεια των κλαδοκερωτών αφού η βιομάζα των ατόμων στο επεξεργασμένο φυσικό νερό (Φ_K και Φ_O) ήταν σημαντικά χαμηλότερη αυτής στο ανεπεξέργαστο φυσικό νερό (Φ). Ως εκ τούτου ούτε η κροκιδωση ούτε ο οζονισμός του φυσικού νερού, συνιστούν αποτελεσματικές μεθόδους για την αύξηση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών της *D. magna* σε φυσικό νερό.

4.5. Καλλιέργεια των ατόμων της *D. magna* και διατροφή με πίτουρο σιταριού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, (1) η γονιμότητα των ατόμων *D. magna* που καλλιεργήθηκαν στο φυσικό νερό ήταν μεγαλύτερη όταν τρέφονταν με πίτουρο από ότι όταν τρέφονταν με το χλωροφύκος και (2) τα άτομα που τρέφονταν με το πίτουρο ήταν σημαντικά πιο μεγαλόσωμα από αυτά που τρέφονταν με το φυτοπλαγκτό ανεξάρτητα από το μέσο καλλιέργειας. Το μήκος των ατόμων που τρέφονταν με πίτουρο περίπου τριπλασιάστηκε μέσα σε 21 ημέρες (αρχική τιμή: 1mm, τελική τιμή: 3,5mm) και είναι παρόμοιο αυτού που αναφέρουν οι De Pauw et al. (1981), (αρχική τιμή: 1mm, τελική τιμή: 3mm, σίτιση με πίτουρο). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το πίτουρο σιταριού είναι καλύτερο είδος τροφής για την ανάπτυξη και των ατόμων της *D. magna* συγκριτικά με το φυτοπλαγκτό ενώ ο συνδυασμός φυσικό νερό και διατροφή με πίτουρο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός για την αύξηση των ατόμων της *D. magna*, σε συνθήκες καλλιέργειας.

Τα πίτουρα έχουν προταθεί ως εναλλακτική τροφή και στην εκτροφή των ναυπλίων της γαρίδας της άλμης (Sorgeloos et al. 1980) και πρωτοχρησιμοποιήθηκαν ως τροφή στη μαζική καλλιέργεια των κλαδοκερωτών από τους De Pauw et al., (1981). Τα άτομα της *D. magna* διατηρούνται για περισσότερες από 20 γενεές χωρίς αξιοσημείωτα προβλήματα, όπως είναι η μείωση της αναπαραγωγικής απόδοσης (De Pauw et al., 1981). Ωστόσο, σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της καλλιέργειας είναι η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας μετά από τον υπολογισμό της πραγματικής αφθονίας των ατόμων. Η υπερβολική σίτιση αυξάνει τη θνησιμότητα, πιθανόν λόγω υπερβολικής ανάπτυξης βακτηρίων, που προκαλούν αναταράξεις στην ισορροπία της καλλιέργειας.

Μέχρι σήμερα για τη διατροφή των καλλιεργούμενων κλαδοκερωτών χρησιμοποιούνται κατ' αποκλειστικότητα, διάφορα είδη μικροφυκών είτε σε νωπή είτε σε αποξηραμένη μορφή. Όμως, παρά τη σπουδαιότητα του, το φυτοπλαγκτό παραμένει πηγή τροφής ακριβή, σε περιπτώσεις καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας (Soeder, 1978, De Pauw et al., 1981). Η μαζική καλλιέργεια των κλαδοκερωτών απαιτεί μεγάλες ποσότητες για την παραγωγή των οποίων θα πρέπει να καταβληθεί σημαντικό κόστος αλλά και ιδιαίτερη φροντίδα για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες καταστάσεις (π.χ. καταστροφή καλλιέργειας, τοξικότητα από υπερβολική αύξηση κ.α.). Τα πίτουρα είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και

περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις υδατανθράκων (άμυλο), πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων. Είναι διαθέσιμα σε μεγάλες ποσότητες, σε χαμηλές τιμές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα μετά από μια απλή προετοιμασία. Επίσης μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλες χρονικές περιόδους. Εκτός από τη χρήση τους για τον εμπλουτισμό των τροφίμων (ψωμί, δημητριακά cornflakes), υπάρχουν και στις τροφές κατοικίδιων και αγροτικών ζώων (κουνέλι, γουρούνι, άλογο, σκύλος κ.α.) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Bran>). Μερικοί ερευνητές προτείνουν την ανάπτυξη προγραμμάτων σίτισης τα οποία συνδυάζουν τα πίτουρα με τα μικροφύκη αυξάνοντας τελικά την παραγωγικότητα της καλλιέργειας (Tarifeno-Silva et al., 1982, De Pauw et al., 1981, Proulx and de la Noue, 1985, FAO, 1996).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τα απόβλητα δευτερογενούς επεξεργασίας (A) ευνοούν σημαντικά λιγότερο την καλλιέργεια της *D. magna* συγκριτικά με την κροκίδωση (A_K), τον οζονισμό (A_O) και τον συνδυασμό τους (A_{KO}). Μεταξύ των τελευταίων επεξεργασιών, η κροκίδωση ασκεί την περισσότερο ευνοϊκή επίδραση στην καλλιέργεια των ατόμων της *D. magna*.
2. Το είδος του απόβλητου (δευτερογενής, κροκίδωση, οζονισμός) επηρεάζει την γονιμότητα των ατόμων της *D. magna*. Η κροκίδωση βελτιώνει σημαντικά τη γονιμότητα των ατόμων, σε σημείο που να την εξισώνει με αυτή του φυσικού νερού.
3. Το είδος του μέσου και ειδικότερα το είδος της επεξεργασίας (δευτερογενής, κροκίδωση, οζονισμός) επηρεάζει την αύξηση των ατόμων. Όπως και στη περίπτωση της γονιμότητας, η κροκίδωση βελτιώνει σημαντικά το μέγεθος των ατόμων που παράγονται.
4. Η διατροφή των ατόμων με πίτουρο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο μεγάλωσμων ατόμων συγκριτικά με την αποκλειστική διατροφή με φυτοπλαγκτό και συμβάλει σε μεγαλύτερη τελική βιομάζα. Επιπλέον φαίνεται ότι το πίτουρο αυξάνει τη γονιμότητα των ατόμων της *D. magna* στο φυσικό νερό.
5. Το φυσικό νερό ασκεί ευεργετική επίδραση στη βιωσιμότητα, στη γονιμότητα, στην αύξηση και στη βιομάζα των ατόμων της *D. magna*. Η καλλιέργεια σε φυσικό νερό, υπερέχει απ' όλες τις απόψεις από την καλλιέργεια σε απόβλητα. Ωστόσο, η κροκίδωση και ο οζονισμός του φυσικού νερού μειώνουν την ευεργετικότητά του στην καλλιέργεια των ατόμων.
6. Τα κροκιδωμένα απόβλητα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά στην καλλιέργεια των ατόμων της *D. magna* αλλά στην περίπτωση αυτή η απόδοση της καλλιέργειας σε αφθονία και βιομάζα ανέρχεται περίπου στο 20% αυτής του φυσικού νερού.

Προοπτικές έρευνας

Η παρούσα πειραματική εργασία θα μπορούσε να συνεχιστεί με διάφορους τρόπους. Θα μπορούσε να αξιολογηθεί η απόδοση της *D. magna* ως τροφή προνυμφών κάποιων ψαριών (π.χ. ιριδίζουσας πέστροφας) με παράλληλη σύγκριση με προνύμφες που θα τρέφονταν με τεχνητή τροφή. Επίσης θα μπορούσε να αξιολογηθεί η θρεπτική σύσταση των ατόμων της *D. magna* και να συγκριθούν τα άτομα μεταξύ των μέσων και σε σχέση με την κάλυψη των θρεπτικών συστατικών έναντι των τεχνητών τροφών.

Μελλοντικά θα μπορούσαν να αξιολογηθούν και άλλα είδη μέσων καθώς και οι μέθοδοι επεξεργασίας τους. Για παράδειγμα για τη μελέτη της κροκιδώσης, υπάρχουν και άλλα κροκιδωτικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πιθανώς να επηρεάζουν διαφορετικά τους οργανισμούς. Επίσης υπάρχουν και άλλα είδη ζωοπλαγκτού που δύναται να καλλιεργούνται σε υγρά απόβλητα.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να αξιολογήσει υγρά απόβλητα δευτερογενούς και τριτογενούς επεξεργασίας, παρακολουθώντας την επίδραση τους στην αύξηση και την αναπαραγωγή των καλλιεργούμενων ατόμων του κλαδοκερωτού, *Daphnia magna* και να αναπτύξει τη δοκιμαστική καλλιέργεια του είδους στο καταλληλότερο από τα αξιολογούμενα απόβλητα.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν δύο πειράματα, διάρκειας 21 ημερών το καθένα. Στο πρώτο πείραμα, αξιολογήθηκαν τέσσερα υγρά απόβλητα (Α: δευτερογενής επεξεργασία, Α_κ: κροκιδωμένο απόβλητο, Α_ο: οζονισμένο απόβλητο και Α_{κο}: κροκιδωμένο και οζονισμένο απόβλητο) σύμφωνα με τον διεθνή δοκιμαστικό έλεγχο OECD TG 211 (Paris 1998) σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα σίτισης (διατροφή με πίτουρο ρυζιού ή με το χλωροφύκος, *Chlorella sp.*). Στο δεύτερο πείραμα, αναπτύχθηκε η καλλιέργεια της *D. magna* σε όγκο 4L του καταλληλότερου απόβλητου (Α_κ: κροκιδωμένο απόβλητο), στο αποτελεσματικότερο πρωτόκολλο σίτισης (διατροφή με πίτουρο σιταριού). Και στα δύο πειράματα, η αξιολόγηση των αποβλήτων έγινε, με μάρτυρα το νερό του φυσικού πληθυσμού, το οποίο ήταν ανεπεξέργαστο (Φ) ή τριτογενώς επεξεργασμένο (Φ_κ: κροκιδωμένο, Φ_ο: οζονισμένο φυσικό νερό).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα απόβλητα δευτερογενούς επεξεργασίας (Α), ευνοούν σημαντικά λιγότερο την καλλιέργεια της *D. magna* συγκριτικά με την κροκιδωση (Α_κ), τον οζονισμό (Α_ο) και τον συνδυασμό τους (Α_{κο}). Μεταξύ των τελευταίων, η κροκιδωση ασκεί την περισσότερη ευνοϊκή επίδραση στην καλλιέργεια των ατόμων της *D. magna*, βελτιώνοντας σημαντικά τη γονιμότητα των ατόμων αλλά και το μέγεθος των ατόμων που παράγονται.

Η διατροφή των ατόμων με πίτουρο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο μεγάλωσμων ατόμων συγκριτικά με την αποκλειστική διατροφή με φυτοπλαγκτό και συμβάλει σε μεγαλύτερη τελική βιομάζα.

Το φυσικό νερό ασκεί ευεργετική επίδραση στη βιωσιμότητα, στη γονιμότητα, στην αύξηση και στη βιομάζα των ατόμων και ως εκ τούτου η καλλιέργεια σε φυσικό νερό και ειδικά μετά από διατροφή με πίτουρο σιταριού, υπερέχει απ' όλες τις απόψεις από την καλλιέργεια σε απόβλητα. Η τελική βιομάζα στην πειραματική καλλιέργεια με το φυσικό νερό (Φ) ήταν 91 mg/L (788 άτομα/L)

μετά από 21 ημέρες καλλιέργειας ενώ στο κροκιδωμένο απόβλητο (A_κ) ήταν μόλις 16 mg ξηρή βιομάζα/ L (129 άτομα/L).

Συμπερασματικά αν και οι αποδόσεις της καλλιέργειας στο κροκιδωμένο απόβλητο αντιστοιχούν στο 20% περίπου αυτών στο φυσικό νερό, τα κροκιδωμένα απόβλητα ίσως θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, στα πλαίσια της ανάκτησης των υγρών αποβλήτων για την εναλλακτική καλλιέργεια της *D. magna*.

7. Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of secondarily and tertiary wastewaters to growth and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, and to develop the test culture of species into the optimal effluent medium.

For this cause two experiments, 21 days long each, have been performed. During the first experiment, were analyzed four types of effluents (A: secondary effluent, A_K: tertiary effluent treated by coagulation, A_O: tertiary effluent treated by ozonation and A_{KO}: tertiary treated effluent by coagulation and ozonation) according to OECD reproduction test (Paris 1998) with two standard food regimes (wheat bran, *Wb* or algae, *Chlorella sp.*). During the second experiment, *D. magna* cultured in 4L of the optimal effluent medium (A_K: tertiary effluent treated by coagulation), with the more effective food regime (feeding with *Wb*). And in the two experiments, the evaluation of effluents became with water of natural population as control, that was untreated (Φ) or tertiary treated (Φ_K : coagulated, Φ_O : natural water treated by ozonation).

Our results, showed that the secondary effluents (A), encourage considerably least the culture of *D. magna* comparatively with the coagulation (A_K), the ozonation (A_O) and their combination (A_{KO}). Between the last ones, the coagulation practises the most favourable effect in the culture of *D. magna*, improving considerably the fertility and the size of individuals that are produced. The diet of individuals with bran has as resulting from the production of bigger individuals comparatively with algae fed individuals and contributes in the production of higher biomass.

The natural water has beneficial effect to the viability, fertility, growth of individuals and in the production of biomass. Thus the culture of *D. magna* in natural water surpasses that of effluents, especially after the feeding with bran.

After 21 days, the final biomass in the experimental culture with natural water (Φ) was 91 mg dw/L (788 ind/L), while in the tertiary treated effluent (A_K) was only 16 mg dw/L (129 ind/L).

In conclusion even if the yields of culture in the coagulated effluent corresponding roughly in 20% those of natural water, these waters could be used in the frames of reclamation of wastewaters for the alternative culture of *D. magna*.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A) Ξενόγλωσση

- Angelakis AN, Koutsoyiannis D, Tchobanoglous G (2005). Wastewater Technologies in the Ancient Greece. *Water Research* 39: 210-220.
- Angelakis AN, Spyridakis S (1995). The status of water resources in Minoan times: a preliminary study. Angelakis AN, and Issar A, Editors, Diachronic Climatic Impacts on Water Resources in Mediterranean Region. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- APHA-AWWA-WEF, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Ed. Washington D.C.
- Asano, T., 1998. Wastewater reclamation, recycling and reuse: an introduction in wastewater reclamation and reuse, Water Quality Management Library, Vol. 10. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, 1-55.
- Baragi V, Lovell RT (1986). Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 478-484.
- Barica J, Mur LR (1980) (Eds.): Hypertrophic Ecosystems. Developments in Hydrobiology 2. Junk Publishers, Netherlands.
- Blatchley ER, Hunt BA, Duggirala R, Thompson JE, Zhao J, Halaby T, Cowger RL, Straub M, Alleman JE (1997). Effects of disinfectants on wastewater effluent toxicity. *Water Research* 31(7): 1581-1588.
- Burns CW (1995). Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia* 101: 234-244.
- Cauchie HM, Salvia M, Weicherding J, Thome JP, Hoffmann L (2000). Performance of a single-cell aerated waste stabilisation pond treating domestic wastewater: a three-year study. *International Review of Hydrobiology* 85: 231-251.
- Caceres CE (1998). Interspecific variation in the abundance, production, and emergence of diapausing eggs. *Ecology* 79: 1699-1710
- Carvalho GR, Wolf HG (1989). Resting eggs of lake- *Daphnia* I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshwater Biology* 22: 459-470
- Craik JCA (1985). Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture* 47: 61-88.
- Dabrowski K (1984). The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reproduction Nutrition Development* 24: 807-833.
- Dave G (1989). Experiences with Wastewater-Cultured *Daphnia* in the Start-feeding of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 79: 337-343.
- D'Agostino AS, Provasoli L (1970). Dixenic culture of *D. magna*. *Straus. Biological Bulletin* 139: 485-94.
- De Meester L (1993). Genotype, fish-mediated chemicals and phototaxis in *Daphnia*. *Ecology* 74: 1467-1474.
- De Pauw N, Laureys P, Morales J (1981). Mass cultivation of *Daphnia magna* (*Straus*) on ricebran. *Aquaculture* 25 :141-152.
- Deken A (2005). SEEING RED:Daphnia and Hemoglobin. Summer Research Fellowship for Science Teachers.
- Dinges R (1974). The availability of *Daphnia* for water quality improvement and

- as an animal food source. In: Proceedings Wastewater Use in the Production of Food and Fiber (EPA-660/2-74-041, 4-5), Environmental Protection Agency, Washington DC, pp. 142-161.
- Dodson SI, Frey DG (2000). Cladocera and other Branchiopoda. In: Thorp, JH, Covich AP (Eds.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, Academic Press, San Diego, p 850-914.
- Dumont HJ, Negrea SV (2002). Introduction to the Class Branchiopoda. Leiden, Backhuys Publishers, p 398.
- Ebert D (2005). Ecology, epidemiology and evolution of parasitism in *Daphnia*. Basel, p 98
- FAO (1996) Manual on the production and use of live food organisms. Fisheries technical paper. Rome, p 295
- Fitzsimmons JM, Innes D.J (2006). Inter-genotype variation in reproductive response to crowding among *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 568:187-205
- Green LC, Merrick JR (1980). Tropical freshwater fish culture: A covered pond improves plankton and fry production. *Aquaculture* 19 (4): 389-94.
- Gregory J, Duan J (2001). Hydrolyzing metal salts as coagulants, *Pure Applied Chemistry*, 73(12): 2017-2026.
- Goser B, Rate HT (1994). Experiments evidence of negative interference in *Daphnia magna*. *Oecologia* 98: 354-361.
- Gottschalk C, Libra JA, Saupe A (2000). Ozonation of water and wastewater: a practical guide to understanding ozone and its application. London: Wiley-VCH.
- Govoni JJ, Boehlert GW, Watanabe Y (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fish* 16: 59-77.
- Hebert PDN (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews* 53: 387-426.
- Helgen JC (1987). Feeding rate inhibition in crowded *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 154: 113-119.
- Higgs DA, Markert JR, Plotnikoff MD, McBride JR, Dosanjh BS (1985). Development of nutritional and environmental strategies for maximizing the growth and survival of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Aquaculture* 47: 113-130.
- Huet M (1970). *Traite de pisciculture*, Editions Ch. de Wijngaert, Brussels.
- Ivleva V (1973). Mass Cultivation of Invertebrates: Biology and Methods. *Israel Program for Scientific Translations*, Jerusalem.
- Kibria G, Nugegoda D, Fairlough R, Lam P, Bradley A (1999). Utilization of wastewater-grown zooplankton: Nutritional quality of zooplankton and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell 1838) (Teraponidae) fed on wastewater-grown zooplankton. *Aquaculture Nutrition* 5: 221-227.
- Krebs CJ (1985). Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row, New York, p 789.
- Lauff M, Hofer R (1984). Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335-346.
- Lewis MA, Maki AW (1981). Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. in laboratory culture. *Hydrobiologia* 85: 175-179
- Leynen M, Duvivier L, Girboux P, Ollevier F (1998). Toxicity of ozone to fish larvae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 176-179.

- Loose CJ (1993). *Daphnia* diel vertical migration behaviour: response to vertebrate predator abundance. *Archives of Hydrobiology* 39: 29-36
- Machacek J (1991). Indirect effect of planktivorous fish on the growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Hydrobiologia* 225: 193-197.
- Machacek J, Seda J (2007). Life history response of *Daphnia galeata* to heterogeneous conditions within a reservoir as determined in a cross-designed laboratory experiment. *Aquatic Ecology* 41:55-66
- Matveev V (1993). An investigation of allelopathic effects of *Daphnia*. *Freshwater biology* 29: 99-105.
- Metcalf, Eddy (1991). *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*, 3rd ed., McGraw-Hill, New York
- Metcalf, Eddy (2003). *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*, 4th ed., McGraw-Hill, New York.
- Nandini S, Lara DA, Sarma SSS, Garcia PR (2004). The ability of selected cladoceran species to utilize domestic wastewaters in Mexico City. *Journal of Environmental Management* 71: 59-65.
- Nandini S, Valdez MH, Sarma SSS (2005). Life History Characteristics of Cladocerans (Cladocera) Fed on Wastewaters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 33 (2): 133-141.
- OECD (1998). OECD guidelines for testing chemicals 211. *Daphnia magna* reproduction test. *Organization of economic Co-operation and Development*, Paris.
- OECD 1999. Guidelines for testing of chemicals, Simulation test-Aerobic sewage treatment. 303A.
- Proulx D, de la Noüe J (1985). Growth of *Daphnia magna* on Urban Wastewaters Tertiarily Treated with *Scenedesmus sp.* *Aquacultural Engineering* 4: 93-111
- Poleo ABS (1995). Aluminium polymerization-a mechanisms of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology* 31: 347-356.
- Rassoulzadegan M, Akyurtlakli N (2002). An Investigation on the Toxic Effects of Malathion (Organophosphate Insecticide) on the *Daphnia magna* (Straus), 1820 (Crustacea, Cladocera). *Turkish Journal of Zoology* 26: 349-355
- Ringelberg J (1991). Enhancement of the phototactic reaction in *Daphnia hyalina* by a chemical mediated by juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Plankton Research* 13: 17-25.
- Rivera F, Sanchez MR, Lugo A, Ramirez P, Ortiz P, Calderon A (1987) Ciliates in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution* 34: 245-262
- Roche FK (1998). Growth potential of *Daphnia magna* status in the water of dairy waste stabilization ponds. *Water Research* 32 (4): 1325-1328.
- Sauvant MP, Pepin D, Bohatier J, Groliere CA (2000). Effects of chelators on the acute toxicity and bioavailability of aluminium to *Tetrahymena pyriformis*. *Aquatic Toxicology* 47: 259-275.
- Savas S, Ölmez M, Erdoğan O, Lerzan Çiçek N, Güçlü Z, Serkan Güçlü S (2008). Effect of L-carnitine enrichment on the population growth of the cladoceran *Moina micrura*. 4th international congress on Aquaculture, Fisheries. Technology and Environmental Management. 21-22 November 2008, Athens, Greece.
- Seitz A (1984). Are there allelopathic interactions in zooplankton? Laboratory experiments with *Daphnia*. *Oecologia* 62: 94-96.

- Soeder CJ, (1978). Economic considerations concerning the autotrophic production of microalgae at the technical scale. *Archives of Hydrobiology* 11: 259-273.
- Sorgeloos P, Baeza-Mesa M, Bossuyt E, Bruggeman E, Dobbeleir J, Versichele D, Lavina E, Bernardino A 1980. Culture of *Artemia* on rice bran: the conversion of a waste-product into highly nutritive animal protein. *Aquaculture* 21: 393-396.
- Sorvari J, Sillanpaa M (1996). Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere* 33(6): 119-127.
- Stibor H (1992). Predator induced life-history shifts in a freshwater cladoceran. *Oecologia* 92: 162-165.
- Susarzyk M (1995). Predator-induced diapause in *Daphnia*. *Ecology* 76:1008-1013.
- Tacon A (1981). Speculative review of possible carotenoid function in fish. *The Progressive Fish- Culturist* 43: 205-208.
- Tarifeno-Silva E, Kawasaki LY, Yu DP, Gordon MS, Chapman DJ (1982). Aquacultural approaches to recycling of dissolved nutrients in secondarily treated domestic wastewaters – II- Biological productivity of artificial food chains. *Water Research* 16: 51-57.
- Tay SH, Rajbanshi VK, Ho WH, Chew J, Yap EA (1991) Culture of cladoceran *Moina micrura* kurz using agroindustrial wastes. *In: Proceedings of the Fourth Asian Fish Nutrition Workshop (de Silva, S.S. ed.), Fish Nutrition Research in Asia, Vijayawada, India. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.*
- Torrissen OJ (1985). Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in *rainbow trout (Salmo gairdneri)*. *Aquaculture* 46: 133-142.
- Treece GD, Davis DA (2000). Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish. *SRAC Publication No. 701*.
- Van der Geest H (2005). Growth of *Daphnia magna* on the effluent of wastewater treatment plants. Texel.
- Watanabe, T., Arakawa, C., Kitajima, C. & Fujita, S. (1978) Nutritional quality of living feed from the view point of essential fatty acids for fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 44: 1223-1227.
- Weider LJ, Pijanowska J (1993). Plasticity of *Daphnia* life histories in response to chemical cues from predators. *Oikos* 67: 385-392.
- Young S, Downing AC (1976). The receptive fields of *Daphnia* ommatidia. *Journal of Experimental Biology* 64 : 185-202.
- Zar JH (1999). Biostatistical analysis. 4th edition. Publ: Prentice hall, New Jersey. p. 663

B) Ελληνική

- Αγγελάκης ΑΝ, Παρανυχιανάκης ΝΒ (2005). Επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων αστικών υγρών αποβλήτων-Ανάγκη θέσπισης κριτηρίων. Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Ηρακλείου, 71307 Ηράκλειο Κρήτης Καρδίτσα. σελ 15
- Λοιζίδου Μ (2006). Υγρά απόβλητα, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, σελ 75.
- Μήτρακας Μ (2001). Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού. 2η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
- Πεταλά ΔΜ (2006) Επίδραση της τριτοβάθμιας επεξεργασίας στην τοξικότητα υγρών αποβλήτων αστικής προέλευσης. Διδακτορική διατριβή. Θεσσαλονίκη, σελ 247.
- Σίνης ΙΑ (2005).Λιμνολογία, θεωρία και ασκήσεις. University studio press. Θεσσαλονίκη.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

9.1. Παρασκευή συνθετικού αποβλήτου

Η επιλογή της χρήσης του συνθετικού αποβλήτου, έγινε ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερή ποιοτική σύσταση των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιούσαμε στα πειράματά μας.

Η σύσταση του αποβλήτου (OECD, 1999) περιλάμβανε τα συστατικά του Πίνακα 9.1. Τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck.

Πίνακας 9.1. Σύσταση του συνθετικού υγρού αποβλήτου.

Συστατικό	Συγκέντρωση (mg/L)
Πεπτόνη	160
Εκχύλισμα ζωικού υλικού	110
Ουρία	30
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	7
Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	3
Θειικό μαγνήσιο (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	2
Όξινο φωσφορικό κάλιο (K ₂ PO ₄)	28
Καολίνης	40
Χλωριούχο αμμώνιο (NH ₄ Cl)	40

Το δείγμα παρασκευαζόταν με χρήση νερού βρύσης, σύμφωνα με τη μέθοδο παρασκευής του συνθετικού αποβλήτου (OECD, 1999), σε πλαστική φιάλη όγκου 10L που προηγουμένως είχε εκτεθεί στην ηλιακή ακτινοβολία για περίπου 1 ώρα για την απομάκρυνση του υπολειμματικού χλωρίου. Ο έλεγχος παρουσίας υπολειμματικής συγκέντρωσης χλωρίου γινόταν με τη μέθοδο τιτλοδότησης DPD, σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο για τα νερά και τα απόβλητα (APHA-AWWA-WEF, 1995). Στην συνέχεια, προσθέτονταν οι κατάλληλες ποσότητες των αντιδραστηρίων και ακολουθούσε ανάδευση. Έπειτα από την προετοιμασία του δείγματος ακολουθούσε άμεσα η διεξαγωγή του πειράματος.

9.2. Επεξεργασία του συνθετικού αποβλήτου

9.2.1 Επεξεργασία με κροκιδωτικά (κροκίδωση)

Το διάλυμα κροκιδωτικού που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας ήταν το FeCl₃*6H₂O. Κατά τη διεξαγωγή της τριτογενούς επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων χρησιμοποιούνται και άλλα είδη ανόργανων αλάτων. Τα χαρακτηριστικά

των κροκιδωτικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.2. Τα διαλύματα των κροκιδωτικών, εκτός από το PAC-18, χρησιμοποιούνται μετά από 24 h από την παρασκευή τους, ώστε να ολοκληρώνονται οι πιθανές αντιδράσεις υδρόλυσης του αργιλίου και του σιδήρου και τα διαλύματα να αποκτούν σταθερότητα ως προς τα χαρακτηριστικά τους. (Πεταλά, 2006)

Πίνακας 9.2. Ιδιότητες των κροκιδωτικών (Πεταλά, 2006).

Κροκιδωτικό	Μοριακό Βάρος	Πυκνότητα (g/ml)
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	666,7	1,91
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	241,5	1,11
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,3	1,82
PAC-18	-	1,36

Για την αξιολόγηση των κροκιδωτικών, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή δοκιμών κροκιδώσης (Jar Test) (Εικόνα 9.1.). Η συσκευή περιλαμβάνει τέσσερις διατάξεις ανάμιξης με ταχύτητα από 0 έως 250 rpm. Η έναρξη και η λήξη της διεργασίας γινόταν με τη χρήση ενός χειροκίνητου μειωτήρα που ρύθμιζε την ταχύτητα περιστροφής των αναδευτήρων, με έλεγχο της ηλεκτρονικής ένδειξης της ταχύτητας περιστροφής των αναδευτήρων που περιέχει η συσκευή. Η μέτρηση του προκαθορισμένου χρόνου της διεργασίας έγινε με χρήση ενός ηλεκτρονικού χρονομέτρου.



Εικόνα 9.1. Συσκευή δοκιμών κροκιδώσης (από Πεταλά, 2006).

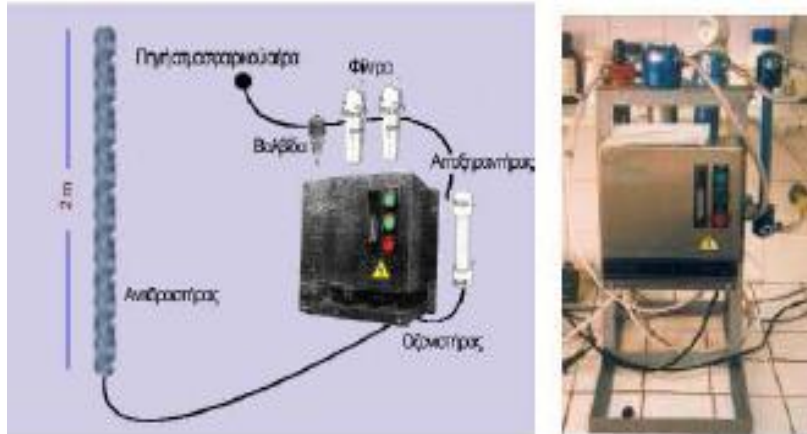
Η πειραματική διαδικασία της κροκίδωσης στη συσκευή δοκιμών περιλάμβανε:

1. Στο πρώτο στάδιο, λειτουργία του αναδευτήρα σε υψηλή ταχύτητα (200rpm) για την καλή αιώρηση των στερεών του δείγματος (0,8 L, 5 min).
2. Στο δεύτερο στάδιο, (ταχεία ανάδευση), περιστροφή του αναδευτήρα (100rpm) και ανάδευση για 2,5 min. Η προσθήκη του κροκιδωτικού γινόταν ταυτόχρονα στα τέσσερα δοχεία και μετά ακολουθούσε η ρύθμιση του pH. Η ταχεία ανάδευση στοχεύει στην πλήρη διασπορά του κροκιδωτικού και στην ομοιομορφία του διαλύματος, εξασφαλίζοντας την μέγιστη αποτελεσματικότητα του κροκιδωτικού στην αποσταθεροποίηση των σωματιδίων.
3. Στο τρίτο στάδιο (αργή ανάδευση), περιστροφή του αναδευτήρα (20rpm) και ανάδευση για 17,5 min, ώστε να υποβοηθηθεί η συσσωμάτωση των σωματιδίων.
4. Στο τελευταίο στάδιο, λάμβανε χώρα ο διαχωρισμός των στερεών, με καθίζηση. Η διάρκεια της καθίζησης ήταν 30 min. Μετά το πέρας των 30min, λαμβάνονταν το υπερκείμενο και αναλύονταν για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών παραμέτρων.

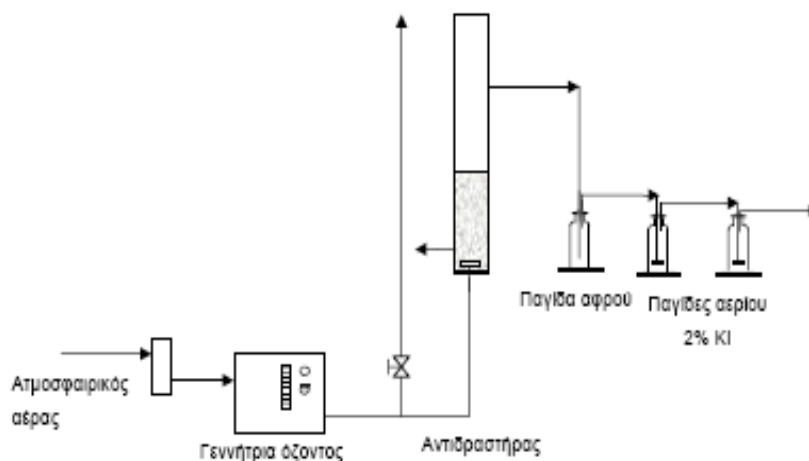
9.2.2. Επεξεργασία του συνθετικού απόβλητου με όζον (οζονισμός)

Η επεξεργασία του συνθετικού αποβλήτου με οζονισμό πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό αντιδραστήρα στήλης-φουσαλίδας ημι-διαλείπουσας λειτουργίας (bubble-column semi-batch reactor) του Εργαστηρίου Γενικής και Ανόργανης Χημικής Τεχνολογίας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ). Η τροφοδοσία του όζοντος ήταν συνεχής ενώ του δείγματος ήταν ασυνεχής (Εικόνα 9.2.). Οι διαστάσεις του κυλινδρικού αντιδραστήρα ήταν: ύψος 200 cm, ID= 4 cm και το υλικό κατασκευής διαφανές πλέξι-γκλας. Για την παροχή του αερίου χρησιμοποιήθηκε κεραμικός διαχυτήρας με μέγεθος πόρων 10-16 μm τοποθετημένος στη βάση του αντιδραστήρα. Για την παραγωγή του όζοντος χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια της εταιρείας Ozonia μοντέλο TOGC2A, η οποία παράγει όζον με ηλεκτρική εκκένωση του ατμοσφαιρικού αέρα (electrical discharge

ozone generator). Ο αέρας διαβιβάζεται υπό πίεση (5bar) σε δυο διαδοχικά συστήματα ξήρανσης και στη συνέχεια οδηγείται στη γεννήτρια παραγωγής όζοντος. Από τη γεννήτρια εξέρχεται μίγμα ατμοσφαιρικού αέρα-όζοντος το οποίο οδηγείται στη βάση του αντιδραστήρα. Η παροχή του αέρα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν 3 LPM (Liters Per Minute) και η ρύθμιση της γεννήτριας στις ενδείξεις από 5 έως 10 (μέγιστο της απόδοσης). Το διάγραμμα ροής της διεργασίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.3.



Εικόνα 9.2. Εργαστηριακός αντιδραστήρας στήλης-φυσαλίδας ημι-διαλείπουσας λειτουργίας (bubble-column semi-bath reactor, από Πεταλά, 2006).



Εικόνα 9.3. Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας των αποβλήτων με όζον.

Συνολικά, στη διάρκεια του πρώτου πειράματος περίπου 6 L συνθετικού αποβλήτου επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο αυτή. Για την οζόνωση 1 L δείγματος, ο συνολικός χρόνος οζόνωσης κυμάνθηκε από 2 έως 30 min. Το ύψος που καταλάμβανε το δείγμα στον αντιδραστήρα ήταν περίπου 40 cm, δηλαδή αναλογία ύψους/διαμέτρου 10:1, η οποία είναι τυπική για αντιδραστήρες στήλης φυσαλίδας. Για θερμοκρασία 20 °C, η μέγιστη συγκέντρωση (διαλυτότητα) όζοντος στην υγρή φάση ισούται με το 0,24 της συγκέντρωσης στην αέρια φάση, δηλαδή 2 και 1,6 mg/L αντίστοιχα. Σε σημείο λίγο πριν την εισαγωγή του αέριου μίγματος στον αντιδραστήρα τοποθετήθηκε βάνα, ώστε το αέριο μείγμα να κατευθύνεται είτε στον απαγωγό απευθείας, είτε στον αντιδραστήρα.

Κατά την εκκίνηση της επεξεργασίας ρυθμιζόταν η επιθυμητή παροχή αέρα (3L/min), που οδηγούνταν στον απαγωγό. Στη συνέχεια, ρυθμιζόταν η επιθυμητή ένδειξη παραγωγής του όζοντος με τη βοήθεια κατάλληλου κουμπιού στη βάση της γεννήτριας. Έπειτα, με τη πίεση του κουμπιού χειρισμού, ξεκινούσε η παραγωγή όζοντος από τη γεννήτρια. Το αέριο μίγμα οδηγούνταν για 5 min στον απαγωγό, ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερή λειτουργία της γεννήτριας. Έπειτα από 5 min η βάνα περιστρεφόταν κατά 180° και το αέριο μίγμα τροφοδοτούταν στον αντιδραστήρα, ο οποίος στην κορυφή του ήταν αεροστεγώς κλειστός. Το αέριο μίγμα εξερχόταν πλευρικά από κατάλληλη έξοδο (σε ύψος περίπου 1m από τη βάση του αντιδραστήρα) και οδηγούνταν σε τρεις παγίδες αερίων τοποθετημένες σε σειρά. Η πρώτη παγίδα ήταν κενή και χρησιμοποιούταν για τη δέσμευση του αφρού, ενώ οι άλλες δυο περιείχαν 200 ml KI για τη δέσμευση του όζοντος που δεν αντέδρασε. Μετά το τέλος του χρόνου αντίδρασης, η βάνα περιστρεφόταν και πάλι κατά 180°, ώστε το αέριο ρεύμα να οδηγηθεί στον απαγωγό. Στη συνέχεια, σταματούσε η λειτουργία της γεννήτριας, προσδιοριζόταν το όζον που ήταν διαλυμένο στην υγρή φάση και έπειτα από χρονικό διάστημα 5 min (οπότε το αέριο μίγμα δεν περιείχε πλέον όζον), ο αέρας διοχετεύεται και πάλι στον αντιδραστήρα για χρονικό διάστημα 5 min, ώστε να απομακρυνθεί το όζον που είχε διαλυθεί στην υγρή φάση. Τέλος, το δείγμα έπειτα από την επεξεργασία λαμβανόταν από την έξοδο, στη βάση του αντιδραστήρα.