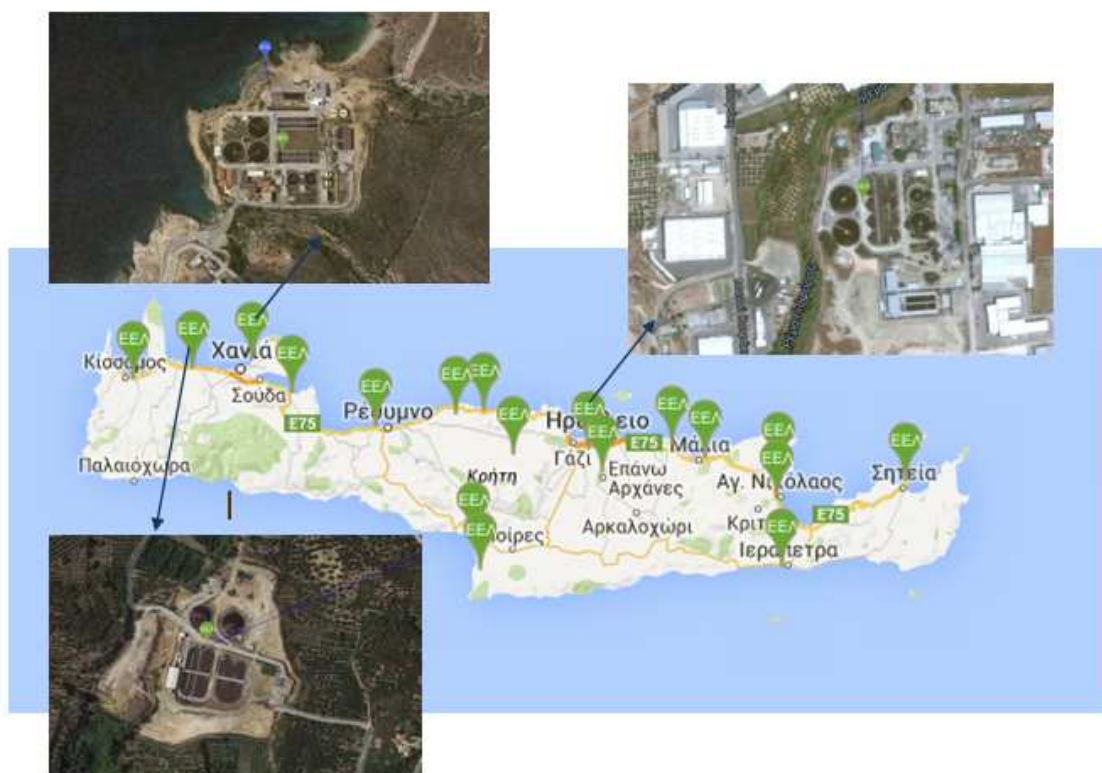




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική»

**«Απενεργοποίηση μικροοργανισμών κατά την
επεξεργασία υγρών αποβλήτων»**



Αφροδίτη Κολομβάκη
Χημικός Μηχανικός

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Βενιέρη Δανάη

ΧΑΝΙΑ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής έγινε στο εργαστήριο «Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας» του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ασχοληθώ με το μαγικό κόσμο της έρευνας και του πειράματος. Η συμβολή ανθρώπων έμπειρων και πρόθυμων να βοηθήσουν ήταν καθοριστική και σίγουρα πολύτιμη, γι' αυτό και τους ευχαριστώ θερμά.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη εργαστηρίου και επιβλέπουσα καθηγήτρια **Δανάη Βενιέρη**, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το ελκυστικό και ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο της έρευνας και της μικροβιολογίας. Με τις γνώσεις και την εμπειρία της έδωσε τις απαραίτητες κατευθυντήριες γραμμές για τη διεξαγωγή του πειράματος, και από το σχεδιασμό μέχρι τη διεξαγωγή αποτελεσμάτων είχε το κλειδί για την αντιμετώπιση οποιασδήποτε δυσκολίας.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την ΕΤΕΠ βιολόγο κα. **Ιωσηφίνα Γουνάκη**, για την πολύτιμη συμβολή της και την «τεχνική» καθοδήγηση σε ένα άψογα οργανωμένο και τακτοποιημένο εργαστήριο. Την ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι επιστημονικές της τοποθετήσεις ήταν καθοριστικές και η ανιδιοτελής διάθεσή της να βοηθά, να εξηγεί και να με καθοδηγεί διαρκώς ανεκτίμητη. Επίσης, την ευχαριστώ πολύ για την ευελιξία που έδειξε στο χρόνο που μου αφιέρωνε για να ελαχιστοποιηθούν κατά το δυνατόν τα δρομολόγια μου και να μην είμαι συνέχεια στην εθνική οδό Ηρακλείου- Χανίων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους καθηγητές κ. **Διαμαντόπουλο Ευάγγελο** και κ. **Γκίκα Πέτρο**, για το χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Χριστίνα Κοτσιφάκη, που με ξενάγησε στο Βιολογικό Καθαρισμό Χανίων και μου επέτρεψε την είσοδο στο σταθμό οποιαδήποτε στιγμή για δειγματοληψία. Επίσης, την κα. Κρυσταλλία Σηφακάκη, υπεύθυνη στο Βιολογικό Καθαρισμό Ηρακλείου, που όποτε ζήτησα άδεια για δειγματοληψία μου αφιέρωσε τον απαιτούμενο χρόνο και η συζήτηση μαζί της με βοήθησε να αντιληφθώ τις ιδιαιτερότητες τους σταθμού και τον τρόπο λειτουργίας. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την κα. Αργυρώ Παρασκάκη, υπεύθυνη στο βιολογικό Νέας Κυδωνίας για το χρόνο της, τις συμβουλές της, την καθοδήγησή της στις δειγματοληψίες του σταθμού και που μοιράστηκε μαζί μου την εμπειρία της από την

πρακτική πλέον εφαρμογή αυτών που πραγματεύεται η έρευνα και το πείραμα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Χρύσα Μπούκη, υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος, που με απάλλαξε από δυο- τρία δρομολόγια πολλών χιλιομέτρων για διαδικασία λίγων λεπτών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν από μικροβιολογική σκοπιά τα ρεύματα εισόδου, εξόδου, η χλωρίωση και η εκροή τριών σημαντικών σταθμών Βιολογικού Καθαρισμού αστικών λυμάτων της Βόρειας Κρήτης, των Χανίων, της Νέας Κυδωνίας που βρίσκεται στο Γεράνι του δήμου Πλατανιά, και του Ηρακλείου. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε διάρκεια ενός έτους, από το Φεβρουάριο του 2012 έως το Φεβρουάριο του 2013 και σε συχνότητα που επέτρεψε τη μελέτη για κάθε εποχή του χρόνου. Συγκεκριμένα, έγιναν μετρήσεις για τους δείκτες Total Coliforms (TC), *Escherichia coli*, κοπρανωδών στρεπτόκοκκων και *Clostridium perfringens*, ενώ ταυτόχρονα τα δείγματα ελέγχθηκαν και για βακτηριοφάγους. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων εισόδου, εξόδου και χλωρίωσης ως προς την παρουσία ιών εντερικής προέλευσης (αδενοϊών και εντεροϊών) με τη μέθοδο της nested PCR. Γενικά, αυξημένες τιμές μικροβιολογικών δεικτών σημειώθηκαν κατά τους θερινούς μήνες, αλλά και το Δεκέμβριο λόγω των χαμηλών βροχοπτώσεων στις αναφερόμενες περιοχές. Στο σταθμό Χανίων οι υψηλότεροι μικροβιολογικοί δείκτες μετρήθηκαν το μήνα Σεπτέμβριο, ενώ ο συγκεκριμένος σταθμός παρουσιάζει αποτελεσματικότερη χλωρίωση. Ο σταθμός Νέας Κυδωνίας εμφάνισε μεγαλύτερη φόρτιση κατά τους μήνες Μάιο και Οκτώβριο, όπως συνέβη και για το σταθμό του Ηρακλείου, ενώ η εκροή του εμφάνισε χαμηλές μετρήσεις. Τα TC είχαν σε όλες τις περιπτώσεις σταθερά μεγαλύτερες τιμές από τους υπόλοιπους δείκτες, ενώ ο δείκτης του *Clostridium perfringens* ήταν 10 φορές μικρότερος από τους υπόλοιπους, και παρουσίασε υψηλότερη πυκνότητα στο σταθμό Ηρακλείου. Οι θαλάσσιοι αποδέκτες των επεξεργασμένων λυμάτων Χανίων και Νέας Κυδωνίας εμφανίζεται να μην επηρεάζονται και οι μικροβιολογικές μετρήσεις ήταν εντός του αποδεκτού ορίου για κολύμβηση. Οι μετρήσεις που έγιναν για βακτηριοφάγους, στην είσοδο των σταθμών αντιστοιχούν σε τάξη μεγέθους 10^4 - 10^6 PFU/100mL. Απομάκρυνση από 75 έως 98% παρατηρήθηκε στους σταθμούς Χανίων και Νέας Κυδωνίας στις δεξαμενές καθίζησης, ενώ για τους συγκεκριμένους σταθμούς η μέγιστη φόρτιση παρατηρήθηκε το Σεπτέμβριο. Αντιθέτως, στην εγκατάσταση του Ηρακλείου η μέγιστη συγκέντρωση των βακτηριοφάγων παρατηρήθηκε το μήνα Νοέμβριο. Στην εκροή του βιολογικού Χανίων δεν εντοπίστηκαν βακτηριοφάγοι σε καμία μέτρηση, ενώ στη Νέα Κυδωνία το Σεπτέμβριο η συγκέντρωση των βακτηριοφάγων ήταν 4×10^3 PFU/100mL, η οποία

φαίνεται να προκύπτει από τον αυξημένο αριθμό λουομένων την περίοδο αυτή στην τουριστική περιοχή του Γερανίου. Όσον αφορά στους ιούς εντερικής προέλευσης οι αδενοϊοί εντοπίστηκαν κυρίως κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ οι εντεροϊοί ανιχνεύθηκαν κυρίως κατά τη διάρκεια του θέρους. Γενικά, οι αδενοϊοί είχαν πιο σταθερή παρουσία καθώς εντοπίστηκαν στην είσοδο και σε ορισμένες περιπτώσεις μετά και από την απολύμανση (χλωρίωση). Τα αποτελέσματα της μελέτης αναδεικνύουν την ανθεκτικότητα των ιών έναντι των υπόλοιπων βακτηριακών δεικτών κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων, γεγονός που επιβάλλει τον συχνότερο έλεγχό τους και την εφαρμογή αποτελεσματικών μεθόδων απολύμανσης, καθώς η χλωρίωση σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται να μην επαρκεί.

ABSTRACT

The main objective of the present study was the microbiological monitoring and the evaluation of microbial removal during wastewater treatment in three sewage treatment plants located in Northern Crete. Specifically, sampling took place within a period of a year (February 2012 – February 2013) in treatment plants of Chania, Nea kydonia and Heraklion. Microbiological evaluation included the detection and enumeration of fecal bacterial indicators namely, total coliforms (TC), *Escherichia coli*, fecal streptococci and *Clostridium perfringens*. Furthermore, analysis of viral indicators was performed with the detection of bacteriophages (MS2) and enteric viruses (adenoviruses & enteroviruses). Samples were taken from the input, after secondary treatment and chlorination, from of the output and finally from the seawater of the surrounding area of each plant. Generally, high bacterial numbers were recorded within the summer period in all sampling sites. During wastewater treatment there was a considerable microbial removal in all plants, but with significant variations. While fecal indicators were reduced in a satisfactory level, the trend was not exactly the same regarding the isolated viruses. Among them, adenoviruses proved to be highly resistant as they were detected even after chlorination in certain cases. On the contrary, Enteroviruses and phages were more sensitive, as they were detected in lower levels throughout treatment in the selected plants. Moreover, microbiological quality of seawater, where plants discharge their effluents, was almost “excellent” in all cases, according to current legislation and safe for public health, suggesting that there is no contamination related to the sewage effluent. However, results of the present study highlight the importance of selection of appropriate microbial indicators for the monitoring of wastewater treatment. In some cases fecal bacterial indicators seem to be unreliable, considering that they are quite sensitive under environmental stress through sewage treatment. Therefore, they are not sufficient for the overall risk assessment for public health. Taking into account that viruses, which are present in wastewater, are far more resistant and virulent for human, they should be included in routine tests for the effectiveness evaluation of sewage treatment plants.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο	Σελ.
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
Κατάλογος περιεχόμενων πινάκων	7
Κατάλογος περιεχόμενων εικόνων	9
Κατάλογος σχημάτων	11
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1 Βιολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά αστικών λυμάτων	17
1.1 Εισαγωγικά	17
1.2 Μικροβιολογικοί δείκτες	17
1.2.1 Ολικά κολοβακτηριοειδή – Total coliforms	17
1.2.2 Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή – Fecal coliforms	18
1.2.3 Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι- εντερόκοκκοι	19
1.2.4 <i>Clostridium perfringens</i>	19
2 Παρουσία ιών στους βιολογικούς καθαρισμούς	20
2.1 Εντεροϊοί	20
2.2 Αδενοϊοί	21
2.3 Βακτηριοφάγοι	23
3 Βιολογικοί Καθαρισμοί	24
3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ	24
3.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ	26
3.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΒΟΡΕΙΟΥ ΑΞΟΝΑ (ΝΕΑΣ ΚΥΔΩΝΙΑΣ)	27
4 Νομικό πλαίσιο λειτουργίας βιολογικών καθαρισμών	29
5 Χλωρίωση	34
5.1. Απολύμανση υγρών αποβλήτων	34
5.2. Χλωρίωση αστικών λυμάτων	35
6 Σκοπός της εργασίας	40
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
1 Δειγματοληψία και επεξεργασία δειγμάτων	41
2. Πρωτόκολλα ανάλυσης νερού για την ανίχνευση μικροοργανισμών	43
2.1 <u>Ολικά κολοβακτηριοειδή</u>	43
2.2 <i>Escherichia coli</i>	43
2.3 <u>Κοπρανώδεις Στρεπτόκοκκοι</u>	43
2.3 <u><i>Clostridium perfringens</i></u>	44
3. Πρωτόκολλο για βακτηριοφάγους	44
4. Πρωτόκολλα ανίχνευσης ιών εντερικής προέλευσης από λύματα	46
4.1. Διαλύματα για απομόνωση γενετικού υλικού	46
4.2. Συμπύκνωση δείγματος για την απομόνωση των ιών	47
4.3. Απομόνωση γενετικού υλικού των ιών	47

4.3.1 Χημικά διαλύματα	48
4.3.2 Διαδικασία (πρωτόκολλο SC)	48
4.3.3 Τεχνικές παρατηρήσεις	49
4.4. Απομόνωση γενετικού υλικού των ιών με τη χρήση του QIAgen viral RNA extraction kit	49
4.5. Φωτομέτρηση απομονωμένου γενετικού υλικού	50
4.6. Επιλογή εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	50
4.7. Πρωτόκολλο PCR για αδενοϊούς (Pina et al. 1998, Puig et al., 1993)	51
4.8. Πρωτόκολλο PCR για εντεροϊούς	52
4.9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	54
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
1. Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων	55
2. Ανίχνευση βακτηριοφάγων	72
3. Ανίχνευση ιών σε αστικά λύματα	79
3.1 Αδενοϊοί	79
3.2 Εντεροϊοί	83
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98
Διαδικτυακή Βιβλιογραφία	99

Κατάλογος περιεχομένων πινάκων	Σελ.
Πίνακας	
<i>A.1: Ταξινόμηση κυριότερων ποιοτικών χαρακτηριστικών αστικών λυμάτων</i>	14
<i>A.2: Περιορισμοί επαναχρησιμοποίησης υγρών αποβλήτων</i>	15
<i>B.3.1.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Ηρακλείου</i>	25
<i>B.3.1.2: Επεξεργασία Λυμάτων Ηρακλείου</i>	25
<i>B.3.2.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Χανίων</i>	26
<i>B.3.2.2: Επεξεργασία Λυμάτων Χανίων</i>	27
<i>B.3.3.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Νέας Κυδωνίας</i>	29
<i>B.3.3.2: Επεξεργασία Λυμάτων Νέας Κυδωνίας</i>	29
<i>B.4.1: Μέσος όρος των περιεχομένων κολοβακτηριοειδών ανά 100mL κατά την περίοδο κολυμβήσεως κατά Κ.Υ.Α. Ε1β/221</i>	30
<i>B.4.2: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ'ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για περιορισμένη άρδευση, βιομηχανική χρήση νερού ψύξης μιας χρήσης και εμπλουτισμό υπόγειου υδροφορέα, που δεν χρησιμοποιείται για πόση</i>	31

και με διήθηση διαμέσου κατάλληλου εδαφικού στρώματος

<i>B.4.3: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για απεριόριστη άρδευση και βιομηχανική χρήση πλην νερού ψύξης μιας χρήσης (ΚΥΑ, Ειβ 145116/2011)</i>	32
<i>B.4.4: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για αστική και περιαστική χρήση και εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων με γεωτρήσεις [(ΚΥΑ, Ειβ 145116/2011)</i>	33
<i>B.5.1. Ταξινόμηση των απολυμαντικών μέσων</i>	35
<i>Πίνακας B.5.2.: Μορφές του χλωρίου και χημικές ουσίες που συνδέονται με τη χλωρίωση</i>	36
<i>Πίνακας B.5.3: Τυπικές δόσεις χλωρίου για χρόνο επαφής 30 λεπτών</i>	38
<i>Πίνακας Γ.1.1: Συνοπτικός πίνακας δειγματοληψιών</i>	42
<i>Πίνακας Γ.4.1: Εκκινήτες (Pina et al., 1998)</i>	51
<i>Πίνακας Δ.1.1: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Χανίων (ΔΕΥΑΧ) όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση, S4= έξοδος</i>	56
<i>Πίνακας Δ.1.2: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Νέας Κυδωνίας όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση, S4= έξοδος</i>	57
<i>Πίνακας Δ.1.3: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου (ΔΕΥΑΗ), όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση</i>	58
<i>Πίνακας Δ.2.1: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Χανίων, όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3= χλωρίωση, S4= έξοδος</i>	72
<i>Πίνακας Δ.2.2: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Νέας Κυδωνίας, όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3= χλωρίωση, S4= έξοδος</i>	72
<i>Πίνακας Δ.2.3: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου, όπου S1=είσοδος, S2=μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3=χλωρίωση, S4= έξοδος</i>	73
<i>Πίνακας Δ.3.1: Συνοπτικός πίνακας ανίχνευσης ιών</i>	87
<i>Πίνακας E.1: Τυπικά χαρακτηριστικά μη επεξεργασμένων λυμάτων</i>	91

Κατάλογος περιεχομένων εικόνων	Σελ.
<i>Εικόνα 1: Απεικόνιση εντεροϊού</i>	21
<i>Εικόνα 2: Δομή αδενοϊού</i>	22
<i>Εικόνα 3: Απεικόνιση δομής βακτηριοφάγου</i>	23
<i>Εικόνα 4: Βιολογικός καθαρισμός Ηρακλείου</i>	24
<i>Εικόνα 5: Βιολογικός Καθαρισμός</i>	26
<i>Εικόνα 6: Βιολογικός Καθαρισμός Νέας Κυδωνίας</i>	28
<i>Εικόνα 7: Μονάδες επεξεργασίας λυμάτων στην Κρήτη που υπάρχουν στην Οδηγία 91/271/ΕΟΚ</i>	30
<i>Εικόνα 8: Καμπύλη ιονισμού του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) σε σχέση με το pH σε θερμοκρασία 25 °C</i>	37
<i>Εικόνα 9: Μαιανδρική δεξαμενή χλωρίωσης</i>	39
<i>Εικόνα 10: Θαλάσσια περιοχή δειγματοληψίας απόρριψης βιολογικού καθαρισμού Χανίων</i>	41
<i>Εικόνα 11: Θαλάσσια περιοχή δειγματοληψίας απόρριψης βιολογικού καθαρισμού Νέας Κυδωνίας</i>	42
<i>Εικόνα Δ.3.1.α: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Χανιά 8/5 S1, 2: Χανιά 8/5 S2, 3: Χανιά 8/5 S3, 4: Ν. Κυδωνία 15/5 S1, 5: Ν. Κυδωνία 15/5 S2, 6: Ν. Κυδωνία 15/5 S3, 7: Ηράκλειο 21/5 S1, 8: Ηράκλειο 21/5 S2, +: θετικό δείγμα</i>	79
<i>Εικόνα Δ.3.1.β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 21/5 S3, 2: Χανιά 13/6 S1, 3: Χανιά 13/6 S2, 4: Χανιά 13/6 S3, 5: Ηράκλειο 19/6 S1, 6: Ηράκλειο 19/6 S2, 7: Ηράκλειο 19/6 S3, +: θετικό δείγμα</i>	80
<i>Εικόνα Δ.3.1.γ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Χανιά 6/3 S1, 2: Χανιά 6/3 S2, 3: Χανιά 6/3 S3, 4: Ν. Κυδωνία 19/3 S1, 5: Ν. Κυδωνία 19/3 S2, 6: Ν. Κυδωνία 19/3 S3, +: θετικό δείγμα</i>	80
<i>Εικόνα Δ.3.1.δ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 27/4 S1, 2: Ηράκλειο 27/4 S2, 3: Ηράκλειο 27/1 S3, 4: Ν. Κυδωνία 22/6 S1, 5: Ν. Κυδωνία 22/6 S2, 6: Ν. Κυδωνία 22/6 S3, +: θετικό δείγμα</i>	81
<i>Εικόνα Δ.3.1.ε: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα,</i>	81

1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 24/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3, 4: Χανιά 27/9 S1, 5: Χανιά 27/9 S2, 6: Χανιά 27/9 S3, 7: Ν. Κυδωνία 4/10 S1, 8: Ν. Κυδωνία 4/10 S2, +:θετικό δείγμα	
Εικόνα Δ.3.1.στ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ν. Κυδωνία 4/10 S3, 2: Ν. Κυδωνία 26/11 S1, 3: Ν. Κυδωνία 26/11 S2, 4: Ν. Κυδωνία 26/11 S3, 5: Χανιά 28/11 S1, 6: Χανιά 28/11 S2, 7: Χανιά 28/11 S3, 8: Ηράκλειο 30/11 S1, 9: Ηράκλειο 30/11 S2, 10: Ηράκλειο 30/11 S3, +:θετικό δείγμα	82
Εικόνα Δ.3.2.α: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 4/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3	83
Εικόνα Δ.3.2.β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Χανιά 6/3 S1, 2: Χανιά 6/3 S2, 3: Χανιά 6/3 S3, 4: Ν. Κυδωνία 19/3 S1, 5: Ν. Κυδωνία 19/3 S2, 6: Ν. Κυδωνία 19/3 S3, 7: Ηράκλειο 27/4 S1, 8: Ηράκλειο 27/4 S2, 9: Ηράκλειο 7/4 S3	84
Εικόνα Δ.3.2.γ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Χανιά 8/5 S1, 2: Χανιά 8/5 S2, 3: Χανιά 8/5, 4: Ν. Κυδωνία 15/5 S1, 5: Ν. Κυδωνία 15/5 S2, 6: Ν. Κυδωνία 15/5 S3, 7: Ηράκλειο 21/5 S1, 8: Ηράκλειο 21/5 S2, 9: Ηράκλειο 21/5 S3	84
Εικόνα Δ.3.2.δ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Χανιά 13/6 S1, 2: Χανιά 13/6 S2, 3: Χανιά 13/6 S3, 4: Ηράκλειο 19/6 S1, 5: Ηράκλειο 19/6 S2, 6: Ηράκλειο 19/6 S3, 7: Ν. Κυδωνία 22/6 S1, 8: Ν. Κυδωνία 22/6 S2, 9: Ν. Κυδωνία 22/6 S3	85
Εικόνα Δ.3.2.ε: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 24/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3, 4: Χανιά 27/9 S1, 5: Χανιά 27/9 S2, 6: Χανιά 27/9 S3, 7: Ν. Κυδωνία 4/10 S1, 8: Ν. Κυδωνία 4/10 S2, 9: Ν. Κυδωνία 4/10 S3, 10: Ν. Κυδωνία 26/11 S1, 11: Ν. Κυδωνία 26/11 S2, 12: Ν. Κυδωνία 26/11 S3	85
Εικόνα Δ.3.2.στ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +:θετικό δείγμα, 1: Χανιά 28/11 S1, 2: Χανιά 28/11 S2, 3: Χανιά 28/11 S3, 4: Ηράκλειο 30/11 S1, 5: Ηράκλειο 30/11 S2, 6: Ηράκλειο 30/11 S3	86

Κατάλογος περιεχομένων σχημάτων

Σχήμα	Σελ.
<i>Σχήμα Δ.1.α: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Χανίων</i>	60
<i>Σχήμα Δ.1.β: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη χλωρίωση του σταθμού Χανίων</i>	60
<i>Σχήμα Δ.1.γ: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Χανίων</i>	61
<i>Σχήμα Δ.1.δ: Μικροβιολογικοί δείκτες στην έξοδο του σταθμού Χανίων</i>	61
<i>Σχήμα Δ.1.ε: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Νέας Κυδωνίας</i>	63
<i>Σχήμα Δ.1.στ: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση του σταθμού Νέας Κυδωνίας</i>	63
<i>Σχήμα Δ.1.ζ: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Νέας Κυδωνίας</i>	64
<i>Σχήμα Δ.1.θ: Μικροβιολογικοί δείκτες στην έξοδο του σταθμού Νέας Κυδωνίας</i>	64
<i>Σχήμα Δ.1.ι: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Ηρακλείου</i>	66
<i>Σχήμα Δ.1.ια: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία του σταθμού Ηρακλείου</i>	66
<i>Σχήμα Δ.1.ιβ: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Ηρακλείου</i>	67
<i>Σχήμα Δ.1.ιγ: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Χανίων</i>	68
<i>Σχήμα Δ.1.ιδ: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Νέας Κυδωνίας</i>	69
<i>Σχήμα Δ.1.ιε: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Ηρακλείου</i>	69
<i>Σχήμα Δ.2.α: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Χανίων</i>	73
<i>Σχήμα Δ.2.β: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Νέας Κυδωνίας</i>	74
<i>Σχήμα Δ.2.γ: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου</i>	75
<i>Σχήμα Δ.2.δ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων εισόδου</i>	75
<i>Σχήμα Δ.2.ε: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων δευτεροβάθμιας καθίζησης</i>	76
<i>Σχήμα Δ.2.στ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων χλωρίωσης</i>	77
<i>Σχήμα Δ.2.ζ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων εξόδου</i>	78
<i>Σχήμα Ε.1: Εποχιακή εμφάνιση ιών</i>	93
<i>Σχήμα Ε.2: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Χανίων στην είσοδο</i>	94
<i>Σχήμα Ε.3: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας στην είσοδο</i>	94

<i>Σχήμα E.4: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία</i>	95
<i>Σχήμα E.5: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας μετά τη χλωρίωση</i>	95
<i>Σχήμα E.6: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Ηρακλείου στην είσοδο</i>	96
<i>Σχήμα E.7: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Ηρακλείου μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση</i>	96
<i>Σχήμα E.8.: Ανίχνευση αδενοϊών στα δείγματα</i>	97
<i>Σχήμα E.9.: Ανίχνευση εντεροϊών στα δείγματα</i>	97

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις ημέρες μας θεωρείται απαραίτητη ανάγκη για οποιονδήποτε οικισμό η ύπαρξη διαχείρισης των παραγόμενων αποβλήτων. Τα υγρά απόβλητα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία πριν την τελική διάθεσή τους, ώστε να αμβλύνονται οι επιπτώσεις στους αποδέκτες. Ο καθαρισμός των υγρών αποβλήτων έχει κυρίως ως στόχο την προστασία των υδατικών πόρων. Για την επιτυχή διαχείριση των αποβλήτων, είναι αναγκαία η γνώση της προέλευσης και των χαρακτηριστικών τους. Το τελικό προϊόν πρέπει να εναρμονίζεται με το ρυθμό αυτοκαθαρισμού του τελικού αποδέκτη. Οι υδάτινοι αποδέκτες επιτυγχάνουν αποδόμηση των οργανικών συστατικών με τα οποία φορτίζονται, εφ' όσον η φόρτιση που δέχονται διατηρείται κάτω από το επίπεδο που αντιστοιχεί στην ικανότητα αυτοκαθαρισμού τους.

Η αποχέτευση των οικιακών λυμάτων είναι μία πρακτική γνωστή από την αρχαιότητα. Αυτό που αποτελεί την πρόσφατη εξέλιξη είναι η επεξεργασία τους. Διάφορες ασθένειες που ταλαιπώρησαν την ανθρωπότητα κατά το παρελθόν αφού εκδηλώθηκαν υπό τη μορφή επιδημιών είναι δυνατόν να μεταφερθούν μέσω του πόσιμου νερού. Το πόσιμο νερό, όμως, δε λαμβάνεται κατά αποκλειστικότητα από καλά προστατευμένους υπόγειους υδατικούς πόρους, αλλά και από επιφανειακά ύδατα που σε πολλές περιπτώσεις είναι οι πιο πρόσφοροι αποδέκτες για υγρά απόβλητα. Το πρόβλημα των υγρών αποβλήτων εντάθηκε μετά το Β' παγκόσμιο πόλεμο, καθώς υπήρξε σημαντική αστικοποίηση και ραγδαία βιομηχανική ανάπτυξη. Από τους σημαντικότερους σχεδιαστικούς παράγοντες για μία εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων είναι η παροχή τροφοδοσίας. Γενικά, η παροχή λυμάτων κυμαίνεται από 60-130% της παροχής του νερού που τροφοδοτεί την πόλη. Σε εκτεταμένες πόλεις απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα (6-12 h) μέχρι να φτάσουν στην εγκατάσταση επεξεργασίας. Σε περιόδους βροχοπτώσεων παρατηρείται αύξηση της παροχής λόγω της εισροής επιφανειακών επιρροών στην εγκατάσταση, όταν δεν υπάρχει ξεχωριστό σύστημα διοχέτευσης των όμβριων.

Για τον επιτυχή σχεδιασμό μίας εγκατάστασης λυμάτων, πρέπει να είναι γνωστή και η σύσταση του ρεύματος εισόδου. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αστικών λυμάτων κατηγοριοποιούνται σε φυσικά, χημικά, βιοχημικά και μικροβιολογικά [πίνακα 1]. Για το σωστό προσδιορισμό κάποιου χαρακτηριστικού, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ορθή δειγματοληψία και μεταφορά και συντήρηση του δείγματος μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για την

παρακολούθηση λειτουργίας της εγκατάστασης του βιολογικού καθαρισμού και την αξιολόγηση των επιπτώσεων από τη διάθεσή τους σε διάφορους αποδέκτες.

*Πίνακας Α.1: Ταξινόμηση κυριότερων ποιοτικών χαρακτηριστικών αστικών λυμάτων
(Τσώνης, 2004)*

Κατηγορία	Παράμετρος
Φυσικά	Ολικά στερεά
	Αιωρούμενα στερεά
	Θολότητα
	Χρώμα
	Οσμή
	Θερμοκρασία
Χημικά	Υδατάνθρακες
	Πρωτεΐνες
	Λίπη και έλαια
	Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
	Ολικός Οργανικός άνθρακας
	Θρεπτικά συστατικά
	Διάφορα κατιόντα
	Διάφορα ανιόντα
	Υδροθείο
	Βαρέα μέταλλα
	Ιχνοστοιχεία
Βιοχημικά	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο
	5 ημερών
Μικροβιολογικά	Βακτήρια
	Ιοί
	Πρωτόζωα
	Ελμίνθες
	Κολοβακτηρίδια

Για να αποφευχθεί η μικροβιολογική μόλυνση των αποδεκτών όπου διατίθενται τα επεξεργασμένα λύματα, πριν την τελική διάθεση λαμβάνει χώρα το στάδιο της απολύμανσης. Ο όρος απολύμανση αναφέρεται στην αδρανοποίηση (θανάτωση ή παρεμπόδιση ανάπτυξης ή αναπαραγωγής) των παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να μην είναι ικανοί για τη μετάδοση ασθενειών. Μέχρι τη δεκαετία του 1970, η πιο ενδεδειγμένη μέθοδος απολύμανσης ήταν η χλωρίωση. Σήμερα κερδίζουν έδαφος η απολύμανση με UV και η οζόνωση ως πιο οικολογικές, αλλά και πιο ακριβές μέθοδοι.

Οι κυριότεροι τρόποι επαναχρησιμοποίησης των επεξεργασμένων λυμάτων είναι οι εξής:

- Άρδευση
- Διάθεση σε υπόγειους και θαλάσσιους υδροφορείς
- Βιομηχανική χρήση
- Αστική χρήση μη πόσιμου νερού

Από τους κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων λυμάτων είναι η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών, στους οποίους συγκαταλέγονται και οι ιοί εντερικής προέλευσης. Για το λόγο αυτό, πολλές σύγχρονες έρευνες εστιάζουν στην κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών σε υδάτινο περιβάλλον ώστε να προωθηθούν οι κατάλληλοι μηχανισμοί εξουδετέρωσης και να αποφευχθούν οι εκδηλώσεις επιδημιών.

Πίνακας Α.2: Περιορισμοί επαναχρησιμοποίησης υγρών αποβλήτων (Toze, 2004, ΦΕΚ 354/Β/8-3-11)

Επαναχρησιμοποίηση Αποβλήτων	Περιορισμοί
Άρδευση ● φυτικές καλλιέργειες ● Εμπορικά φυτώρια	<input type="checkbox"/> ποιότητα νερού (επίδραση αλάτων σε φυτά)
Άρδευση κοινόχρηστων χώρων αναψυχής ● πάρκα σχολεία ● εθνικοί δρόμοι ιπποδρόμια ● νεκροταφεία ζώνες πρασίνου	<input type="checkbox"/> προστασία δημόσιας υγείας (σε σχέση με παθογόνα) μόλυνση επιφανειακών και υπόγειων νερών όταν δεν υφίσταται κατάλληλο σύστημα διαχείρισης εμπορικότητα και δημόσια αποδοχή προϊόντων
Βιομηχανική χρήση ● νερό ψύξης ● μεταποίηση ● βαριά βιομηχανία	<input type="checkbox"/> πιθανότητα διάβρωσης από τα συστατικά του νερού δημόσια υγεία (σχετικά με μεταφορά παθογόνων με υδατοσταγονίδια)
Εμπλουτισμός υπόγειων υδροφορέων ● αναπλήρωση προστασία	<input type="checkbox"/> ίχνη οργανικών, χημικών ή παθογόνων με υψηλή τοξικότητα συνολικά στερεά, μέταλλα και

<ul style="list-style-type: none"> ● ιζηματολογικός έλεγχος 	παθογόνα στο ανακτώμενο νερό
Ανανυχή/περιβαλλοντικές χρήσεις <ul style="list-style-type: none"> ● λίμνες και δεξαμενές ● αποκατάσταση ελωδών χώρων ● ανάπτυξη αλιευτικών χώρων δημιουργία πάγου 	προστασία δημόσιας υγείας από βακτήρια και ιούς <input type="checkbox"/> ευτροφισμός λόγω αζώτου και φωσφόρου λυμάτων ακαλαισθησία
Μη πόσιμες χρήσεις <ul style="list-style-type: none"> ● πυροπροστασία ● κλιματισμός ● καθαρισμός τουαλετών 	<input type="checkbox"/> δημόσια υγεία (σχετικά με μεταφορά παθογόνων με υδατοσταγονίδια) <input type="checkbox"/> ποιοτικές επιδράσεις σε εναπόθεση διάβρωση, βιολογική ανάπτυξη (ρύπανση) προβλήματα από πιθανή διασταύρωση με σύστημα υδροδότησης
Πόσιμες χρήσεις <ul style="list-style-type: none"> ● απευθείας χρήση επεξερασμένων λυμάτων ανάμειξη με νερό υδροδότησης	<input type="checkbox"/> ίχνη οργανικών, χημικών και παθογόνων με υψηλή τοξικότητα <input type="checkbox"/> καλαισθησία <input type="checkbox"/> προστασία δημόσιας υγείας κυρίως από τη μεταφορά ιών

B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιολογικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά αστικών λυμάτων

1.1 Εισαγωγικά

Η σωστή διαχείριση του προβλήματος των αστικών λυμάτων προϋποθέτει επαρκή γνώση των βιολογικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών τους. Σημαντικό είναι να είναι γνωστή η τάξη μεγέθους της συγκέντρωσής τους και η διακύμανσή της κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας.

Οι κύριες κατηγορίες παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν στα λύματα είναι βακτήρια, ιοί, μύκητες, πρωτόζωα και έλμινθες (σκουλήκια που ζουν παρασιτικά στο έντερο). Μερικές από τις ασθένειες που μπορεί να εκδηλωθούν στον άνθρωπο κυρίως από την πόση νερού μολυσμένου από λύματα είναι τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός, δυσεντερία, διάρροια και χολέρα (Τσώνης, 2004)

Το μεγαλύτερο ποσοστό μικροοργανισμών στα λύματα είναι τα κολοβακτηρίδια (μικροοργανισμοί εντερικής κυρίως προέλευσης). Η συνεισφορά ανά κάτοικο στον αριθμό κολοβακτηριδίων κυμαίνεται από 200×10^9 έως 400×10^9 ημερησίως. Επειδή ο προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών είναι αρκετά δύσκολος, συνήθως γίνεται προσδιορισμός μόνο των κολοβακτηριοειδών.

Για τον έλεγχο προέλευσης της μόλυνσης, γίνεται προσδιορισμός των ολικών κολοβακτηριοειδών (Total Coliforms – TC), των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών (με κύριο αντιπρόσωπο το βακτήριο *Escherichia coli*) και των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων.

1.2 Μικροβιολογικοί δείκτες

Οι πιο ευρέως διαδεδομένοι μικροβιολογικοί δείκτες ελέγχου ποιότητας νερού και λυμάτων είναι οι ακόλουθοι:

1.2.1 Ολικά κολοβακτηριοειδή – Total coliforms

Περιλαμβάνουν όλα τα αερόβια και προαιρετικώς αναερόβια Gram αρνητικά μη σπορογόνα βακτήρια, τα οποία ζυμώνουν την λακτόζη και παράγουν αέριο όταν επωασθούν στους 37 °C για 48 ώρες. Περιλαμβάνουν τα γένη *Escherichia*,

Citrobacter, *Klebsiella* και *Enterobacter*. Όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν αποικίζουν απαραίτητως τον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων γι' αυτό ο δείκτης αυτός έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση (Βενιέρη, 2011).

1.2.2 Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή – Fecal coliforms

Αποτελούν υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών και βρίσκονται κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων. διαφέρουν από τα ολικά κολοβακτηριοειδή από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Το συχνότερο μέλος αυτής της ομάδας είναι το *Escherichia coli* αλλά δυνατόν να περιλαμβάνει και διάφορα είδη *Klebsiella* ή *Enterobacter*.

Η *E. coli* είναι ένα ευρέως διαδεδομένος μικροοργανισμός αφού είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας. Ο ανθρώπινος εντερικός σωλήνας αποτελεί το φυσικό περιβάλλον του μικροοργανισμού όπου αναπτύσσεται ήδη από την εμβρυική ηλικία του ατόμου, αναπτύσσοντας μία σχέση αμοιβαίας αλληλεξάρτησης. Η *E. coli* διαβιώνοντας στις εντερικές λάχνες συνήθως δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, εκτός και αν πρόκειται για εξασθενημένα και ανοσοκατεσταλμένα άτομα ή όταν ο πληθυσμός του βακτηρίου υπερβεί κάποια ανώτατα όρια. Όσον αφορά στα παθογόνα στελέχη του είδους, αυτά δύνανται να προκαλέσουν μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων. Είναι Gram αρνητικός μικροοργανισμός και αποτελεί μέλος της ομάδας των κολοβακτηριοειδών.

Παράλληλα, ανευρίσκεται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα πολλών θερμόαιμων ζώων, όπως είναι τα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι κ.α. Η παρουσία της στο νερό ή στα τρόφιμα θεωρείται ότι δείχνει την άμεση ή έμμεση κοπρανώδη μόλυνση από λύματα και την πιθανή παρουσία άλλων παθογόνων. Επειδή η μολυσματική δόση του κολοβακτηριδίου είναι μεγάλη, η μετάδοση από άτομο σε άτομο δεν είναι συχνή, ενώ θεωρείται σημαντική η μετάδοση μέσω τροφών. Η *E. coli* είναι από τους οργανισμούς που έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση υδατογενών λοιμώξεων. Γενικά, η συσχέτιση της παρουσίας στο νερό παθογόνων βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος με τους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού είναι πολύ καλή. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία υδατογενείς λοιμώξεις έχουν προκληθεί από διάφορους ορότυπους της *E. coli* όπως είναι

τα εντεροτοξινογόνα ETEC, τα εντεροπαθογόνα EPEC, τα εντεροδιεισδυτικά EIEC και πιο σπάνια τα αιμορραγικά στελέχη O157:H (Βενιέρη, 2011).

1.2.3 Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι- εντερόκοκκοι

Η ύπαρξή τους στο νερό σημαίνει τη μόλυνσή του από κόπρανα των θερμόαιμων ζώων. Οι *S. faecalis* και *S. faecium* φαίνεται να προέρχονται κυρίως από τα ανθρώπινα κόπρανα. Οι *S. bovis*, *S. equinus* και *S. avium* υπάρχουν σε μεγάλες πυκνότητες στα κόπρανα ζώων.

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν σημαντικό βακτηριακό δείκτη για τον έλεγχο της κοπρανώδους μόλυνσης των επιφανειακών νερών.

Εκτός των παραπάνω δεικτών, ο συστηματικός προσδιορισμός των ολικών αερόβιων και προαιρετικώς αναερόβιων ετερότροφων βακτηρίων στο νερό δίνει σημαντικές πληροφορίες ως προς την σταθερότητα της ποιότητάς του. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως των 1-2 λογαρίθμων μπορεί να σημαίνουν προβλήματα στην μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου (βιοφίλμ) στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας κλπ (Βενιέρη, 2011).

1.2.4 *Clostridium perfringens*

Το *C. perfringens* είναι ένα υποχρεωτικά αναερόβιο σπορογόνο βακτήριο του εντέρου και αποτελεί έναν καλό δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης.

Οι σπόροι του είναι γενικά περισσότερο ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές πιέσεις σε σχέση με τους αερόβιους εντερικούς δείκτες με αποτέλεσμα να επιβιώνουν στο περιβάλλον περισσότερο από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ανεύρεσή του δεν αποδεικνύει πρόσφατη περιττωματική μόλυνση. Έχει βρεθεί ότι η καμπύλη επιβίωσης του *C. perfringens* είναι η ίδια με αυτή του κρυπτοσποριδίου με αποτέλεσμα το βακτηρίδιο αυτό να θεωρείται ένας δείκτης που προλέγει την πιθανή ύπαρξη ζωντανών ωοκύστεων κρυπτοσποριδίου στο νερό (Βενιέρη, 2011).

2. Παρουσία ιών στους βιολογικούς καθαρισμούς

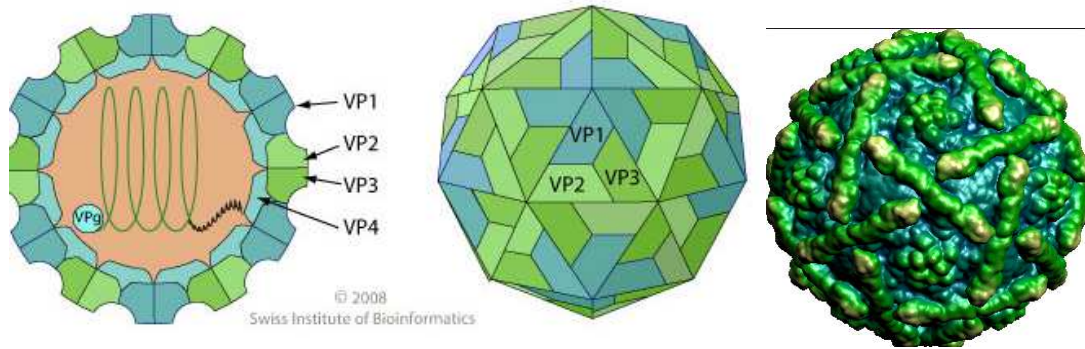
Πάνω από 140 διαφορετικά είδη ιών εντερικής προέλευσης έχουν ανιχνευτεί στα κόπρανα. Σε γενικές γραμμές, σε ένα γραμμάρια κοπράνων ασθενούς μπορούν να ανιχνευτούν 10^6 ιικά σωματίδια, ενώ στα λύματα έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις της τάξης των 500.000 μολυσματικών μονάδων/λίτρο (Parker et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, σε κόπρανα ασθενών μπορεί να περιέχονται πάνω από 10^{10} ιικά σωματίδια ηπατίτιδας A, τα οποία αποβάλλονται από τον οργανισμό του ασθενούς για διάστημα 30 ημερών έως τριών μηνών από την εμφάνιση της νόσου. Οι ρότα ιοί εκκρίνονται σε ποσότητες ακόμη μεγαλύτερες (10^{10} - 10^{12} ιικά σωματίδια/γραμμάριο κοπράνων) για περίπου ένα μήνα από την εμφάνιση της νόσου. Οι Noro ιοί εμφανίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στα κόπρανα των ασθενών (10^4 - 10^6 ιικά σωματίδια/γραμμάριο κοπράνων) και αποβάλλονται από τον οργανισμό για διάστημα δύο εβδομάδων από την εκδήλωση της ασθένειας. Τέλος, οι εντεροϊοί περιέχονται στα κόπρανα σε συγκέντρωση 10^8 - 10^{10} ιικά σωματίδια/γραμμάριο κοπράνων και αποβάλλονται από τον ασθενή για περίπου 7 εβδομάδες. Επιπλέον, στα κόπρανα φορέων αποβάλλονται ιοί ο αριθμός των οποίων στα μη επεξεργασμένα λύματα κυμαίνεται στα 10^3 - 10^6 ιικά σωματίδια/γραμμάριο (Βενιέρη, 2011).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση και τη συχνότητα εμφάνισης ιών στα λύματα είναι η συχνότητα των λοιμώξεων, ο αριθμός των φορέων. Η συχνότητα χρήσης του εμβολίου της πολιομυελίτιδας και η ευαισθησία της μεθόδου απομόνωσης και ανίχνευσης.

2.1 Εντεροϊοί

Οι εντεροϊοί περιλαμβάνουν τους Polio-ιούς, τους ιούς Coxsackie, τους A και B echo-ιούς και τους εντεροϊούς 68-71. Η μορφολογία τους είναι σφαιρική με διάμετρο περίπου 30 nm. Το γενετικό τους υλικό είναι μονόκλωνο γραμμικό RNA και περικλείεται στο πυρηνοκαψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το καψίδιο αποτελείται από τέσσερα πολυπεπτίδια (VP1, VP2, VP3, VP4).

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται ευρέως και σε παγκόσμια κλίμακα. Το ανθρώπινο σώμα αποτελεί το φυσικό ξενιστή των εντεροϊών (viralzone.expasy.com).

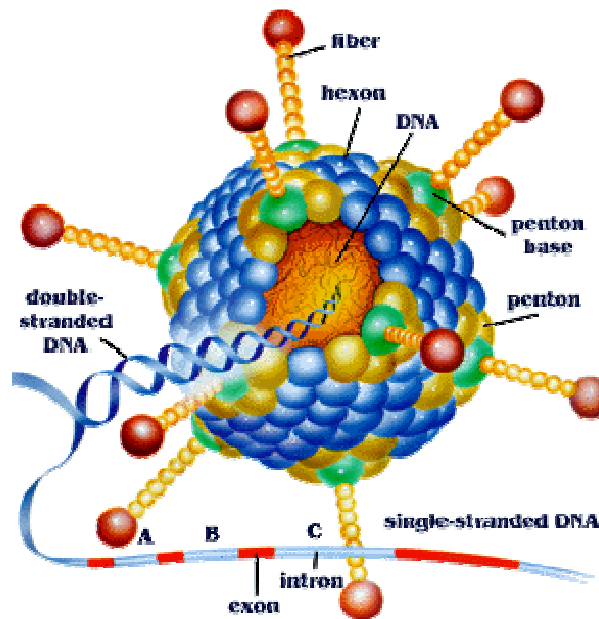


Εικόνα 1: Απεικόνιση εντεροϊού (viralzone.expasy.org, geneticliteracyproject.org)

2.2 Αδενοϊοί

Οι Αδενοϊοί (*Adenoviridae*) είναι μεσαίου μεγέθους, χωρίς φάκελο, εικοσαεδρικοί ιοί, οι οποίοι αποτελούνται από ένα πυρηνοκαψίδιο και το γονιδίωμά τους είναι γραμμικό δίκλωνο DNA. Έχουν περιγραφεί 57 ορότυποι στον άνθρωπο και είναι υπεύθυνοι για το 5-10% των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος στο παιδιά, ενώ προσβάλλουν και ενήλικες. Ταξινομούνται στα επτά υπογένη, A-G.

Οι αδενοϊοί αποτελούν τους μεγαλύτερους άνευ φακέλου ιούς, με διάμετρο 90-100 nm. Λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, είναι σε θέση να μεταφερθούν μέσω του ενδοσώματος (δηλ., σύντηξη περιβλήματος δεν είναι απαραίτητη). Το ιοσωμάτιο έχει επίσης μια μοναδική «ακίδα» ή ίνα που συνδέεται σε ακμή του καψιδίου που βοηθά στην προσκόλληση στο κύτταρο ξενιστή μέσω του υποδοχέα αδενοϊού-coxsackie στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή.



Εικόνα 2: Δομή αδενοϊού (microbewiki.kenyon.edu)

Ο αδενοϊός είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός, ευρέως διαδεδομένος σε ανθρώπινους ζωικούς πληθυσμού καθώς επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα εκτός ξενιστή (Virology: www.microbiologybytes.com). Οι αδενοϊοί είναι ασυνήθιστα σταθεροί σε χημικούς ή φυσικούς παράγοντες και αντίξοες συνθήκες pH, επιτρέποντας την παρατεταμένη επιβίωση έξω από το σώμα και το νερό.

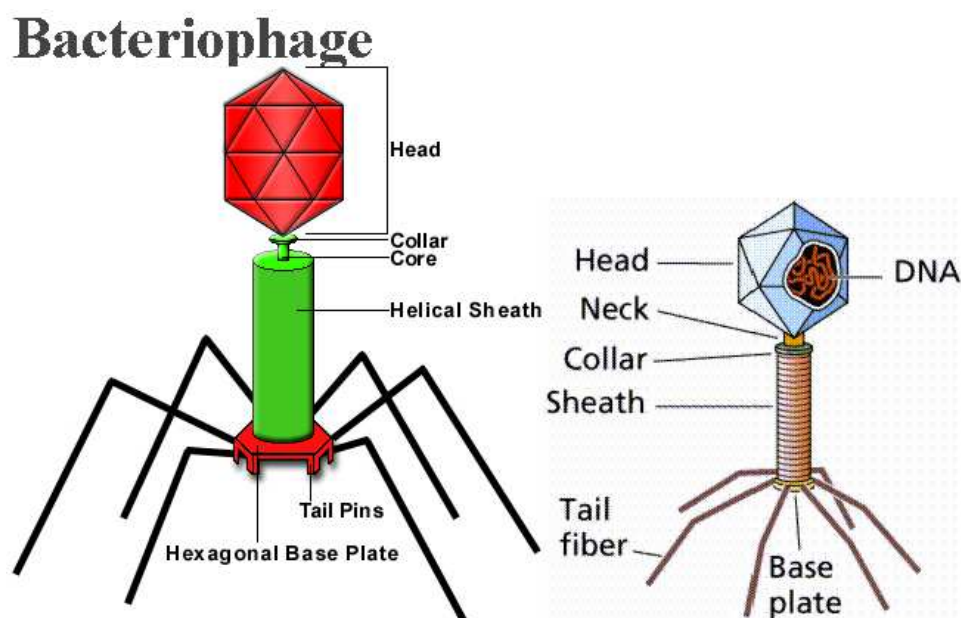
Το καψίδιο του ιού αποτελείται από 253 πρωτεΐνες, και συμπεριλαμβάνει τρεις ευδιάκριτες κατηγορίες: πρωτεΐνες ίνας, πεντονίου και εξονίου (Martin et al., 2007). Υπάρχουν 240 εξονικές πρωτεΐνες και 12 πεντονικές. Οι νηματοειδείς και πεντονικές πρωτεΐνες παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη δέσμευση του υποδοχέα, ενώ οι εξονικές συνθέτουν κυρίως το καψίδιο του ιού. Οι «ίνες» συνδέονται με κάθε πεντονική πρωτεΐνη του καψιδίου διευκολύνει την προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή.

Το γονιδίωμα των αδενοϊών περιλαμβάνει μία πρωτεΐνη που συνδέεται με κάθε ένα από τα 5' άκρα του γραμμικού dsDNA. Αυτή χρησιμοποιείται ως εκκινήτης στην αντιγραφή του ιού και διασφαλίζει ότι τα άκρα του γραμμικού γονιδιώματος του ιού έχουν αντιγραφεί επαρκώς (emedicine.medscape.com). Οι αδενοϊοί αντιγράφονται στον πυρήνα των κυττάρων του ξενιστή, χρησιμοποιώντας τους μηχανισμούς αντιγραφής των κυττάρων του ξενιστή.

2.3 Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι αποτελούνται συνήθως από μια πολυεδρική πρωτεϊνική κεφαλή που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ και μία πρωτεϊνική ουρά που καταλήγει σε νημάτια. Ο βακτηριοφάγος προσκολλάται με τα νημάτια στο βακτηριακό κύτταρο, τρυπάει το κυτταρικό τοίχωμα και προωθεί το νουκλεϊκό οξύ στο κυτταρόπλασμα. Εκεί στη συνέχεια ξεκινάει και η παραγωγή των πρωτεϊνών και του γενετικού του υλικού (Βενιέρη, 2011).

Δύο βασικοί τύποι βακτηριοφάγων έχουν προταθεί σαν ειδικοί δείκτες ιικής μόλυνσης: α) οι σωματικοί κολιφάγοι (Somatic coliphage) και β) οι F ειδικοί RNA φάγοι (F-specific RNA coliphage). Γενικά, θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης εξαιτίας της συνεχούς παρουσίας τους σε υγρά απόβλητα και μολυσμένα ύδατα. Παράλληλα, η δομή, η μορφολογία, το μέγεθος καθώς και η συμπεριφορά τους στο υδάτινο περιβάλλον προσομοιάζουν τα αντίστοιχα των ιών εντερικής προέλευσης τους, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλους δείκτες παρουσίας ιών. Επίσης, χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ανθεκτικότητας των ιών σε διάφορα απολυμαντικά και κατά την επεξεργασία αποβλήτων.



Εικόνα 3: Απεικόνιση δομής βακτηριοφάγου (daviddarling.info)

3. Βιολογικοί Καθαρισμοί

3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ

Ο Βιολογικός Καθαρισμός Ηρακλείου είναι σήμερα μια από τις μεγαλύτερες εγκαταστάσεις καθαρισμού λυμάτων στην Ελλάδα και ίσως η πιο σύγχρονη στο Μεσογειακό χώρο.

Εντάσσεται μέσα στο σχέδιο ολοκληρωμένης διαχείρισης λυμάτων της ευρύτερης περιοχής Ηρακλείου που περιλαμβάνει:

- χωριστικούς κεντρικούς και δευτερεύοντες αποχετευτικούς αγωγούς και αντλιοστάσια
- το Βιολογικό Καθαρισμό (ΒΚ) Ηρακλείου και
- τον αγωγό διάθεσης της εκροής (χερσαίο και υποθαλάσσιο)



Εικόνα 4: Βιολογικός Καθαρισμός Ηρακλείου (ypeka.plexscape.com)

Ο Βιολογικός Καθαρισμός Ηρακλείου λειτουργεί από το 2005 και εξυπηρετεί τους οικισμούς Ηρακλείου και Γαζίου και τα βοθρολύματα του οικισμού Ηρακλείου. Ο συνολικός πληθυσμός που εξυπηρετείται από τη συγκεκριμένη εγκατάσταση σε περιόδους αιχμής είναι 190.200 άτομα, ενώ τα βοθρολύματα που μεταφέρονται στη μονάδα αντιστοιχούν σε πληθυσμό 7000 κατοίκων.

Σύμφωνα, με τον υπεύθυνο της εγκατάστασης, ο βιολογικός καθαρισμός δεν δέχεται και δεν επεξεργάζεται βιομηχανικά λύματα.

Η παροχή που διοχετεύεται ημερησίως στο πρώτο στάδιο επεξεργασίας (ενεργούς ιλύος) φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας Β.3.1.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Ηρακλείου (ypeka.plexscape.com)

	Μέσο (ετήσιος μέσος όρος)
Συνολική εισερχόμενη παροχή στην Ε.Ε.Λ. (m ³ /day):	32.960
Εισερχόμενη παροχή λυμάτων (m ³ /day):	32.500
Εισερχόμενη παροχή βοθρολυμάτων (m ³ /day):	460

Τα στάδια επεξεργασίας στο Βιολογικό Καθαρισμό Ηρακλείου είναι τα εξής:

Πίνακας Β.3.1.2: Επεξεργασία Λυμάτων Ηρακλείου (ypeka.plexscape.com)

Γραμμή επεξεργασίας λυμάτων	Γραμμή επεξεργασίας ιλύος
<ul style="list-style-type: none"> • Προεπεξεργασία • Πρωτοβάθμια • Δευτεροβάθμια • Απομάκρυνση Αζώτου • Απολύμανση <ul style="list-style-type: none"> ο Χλωρίωση 	<ul style="list-style-type: none"> • Πάχυνση • Σταθεροποίηση (Αναερόβια) • Αφυδάτωση

Η εκροή της εγκατάστασης απορρίπτεται σε θαλάσσιο αποδέκτη, ενώ η επεξεργασμένη λυματολάσπη (2.906.000 Kg DS/έτος) διατίθεται σε ΧΥΤΑ.

3.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ

Η εγκατάσταση που βρίσκεται σε λειτουργία από το 1995 προβλέπει την επεξεργασία αστικών λυμάτων που αντιστοιχούν σε 105.500 κατοίκους, βιομηχανικά απόβλητα που αντιστοιχούν σε 5.000 ισοδυνάμους κατοίκους και βοθρολύματα που αντιστοιχούν σε 7.000 ισοδυνάμους κατοίκους, δηλαδή συνολικά θα εξυπηρετεί 117.500 ισοδυνάμους κατοίκους και 26.000 m³/d (www.deyax.org.gr).



Εικόνα 5: Βιολογικός Καθαρισμός Χανίων (ypeka.plexscape.com)

Η παροχή που διοχετεύεται ημερησίως στο πρώτο στάδιο επεξεργασίας (ενεργού ιλύος) φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας Β.3.2.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Χανίων (ypeka.plexscape.com)

	Μέσο (Ετήσιος Μέσος Όρος)
Συνολική εισερχόμενη παροχή στην Ε.Ε.Λ. (m ³ /day):	20.299
Εισερχόμενη παροχή λυμάτων (m ³ /day):	20.152
Εισερχόμενη παροχή βοθρολυμάτων (m ³ /day):	147

Τα στάδια επεξεργασίας στο Βιολογικό Καθαρισμό Χανίων είναι τα εξής:

Πίνακας Β.3.2.2: Επεξεργασία Λυμάτων Χανίων (ypeka.plexscape.com)

Γραμμή επεξεργασίας λυμάτων	Γραμμή επεξεργασίας ιλύος
<ul style="list-style-type: none">• Πρωτοβάθμια• Δευτεροβάθμια• Απομάκρυνση Αζώτου• Απολύμανση<ul style="list-style-type: none">◦ Χλωρίωση	<ul style="list-style-type: none">• Πάχυνση• Σταθεροποίηση• Αφυδάτωση• Πρόσθετη επεξεργασία<ul style="list-style-type: none">◦ Προσθήκη CaO μετά την αφυδάτωση σε ποσοστό ~10%

Η εκροή της εγκατάστασης απορρίπτεται σε θαλάσσιο αποδέκτη (κόλπος Χανίων), ενώ η επεξεργασμένη λυματολάσπη (1.150.000 Kg DS/έτος) διατίθεται σε ΧΥΤΑ.

Λειτουργικά Στοιχεία της Εγκατάστασης

Το 2012 κατά μέσο όρο η Εγκατάσταση επεξεργάστηκε 20.323 m³/ ημέρα.

Η ποιότητα της εκροής της εγκατάστασης τηρεί πλήρως τους περιβαλλοντικούς όρους, με μέσα ποσοστά απομάκρυνσης για το οργανικό φορτίο (BOD5) 98,9%, για τα στερεά 97,8% και για την αμμωνία 99%.

Μετά την απολύμανση η μικροβιολογική ποιότητα της εκροής αντιστοιχεί σε επίπεδα πόσιμων επιφανειακών νερών (<100 CFUs ολικών κολοβακτηριδίων/100mL νερού).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι εξαιρετικά θετικά για την λειτουργία του Βιολογικού Καθαρισμού.

Το 2012 η εγκατάσταση παρήγαγε περίπου 6.500 τόνους αφυδατωμένης λάσπης που μετά από ασβεστοποίηση διατίθενται στον ΧΥΤΑ Κορακιάς.

3.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΤΑΘΜΟΣ ΒΟΡΕΙΟΥ ΑΞΟΝΑ (ΝΕΑΣ ΚΥΔΩΝΙΑΣ)

Η Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων (ΕΕΛ) Βορείου Άξονα, βρίσκεται στο Γεράνι του Δήμου Πλατανιά και εξυπηρετεί τους δήμους της Νέας Κυδωνίας, του Πλατανιά, των Βουκολιών & του Κολυμβαρίου. Το 2007 ολοκληρώθηκε και λειτούργησε η πρώτη φάση του έργου, με δυνατότητα εξυπηρέτησης 30.000

ισοδύναμων κατοίκων, ενώ στην αρχή του 2009 παραδόθηκε και η δεύτερη φάση του έργου, οπότε η εγκατάσταση είναι ικανή να εξυπηρετεί τις ανάγκες 60.000 ισοδύναμων κατοίκων. Με τη συνεχή επέκταση του δικτύου ακαθάρτων, η εγκατάσταση θα καλύπτει ολόκληρο το Βόρειο Άξονα του νομού Χανίων, περιοχή με συνεχή ανάπτυξη και ιδιαίτερου τουριστικού ενδιαφέροντος.

Η μέση δυναμικότητα της πρώτης φάσης της εγκατάστασης είναι 6.000 m³/day, ενώ με την ολοκλήρωση της δεύτερης φάσης η εγκατάσταση μπορεί να επεξεργαστεί μέση παροχή 16.410 m³/day. Η μέση ημερήσια παροχή μεταβάλλεται αισθητά , ανάλογα την περίοδο του έτους. Για τη χειμερινή περίοδο (Νοέμβριος – Απρίλιος) η μέση παροχή είναι 2.500 m³/day, ενώ για τη θερινή περίοδο (Μάιος – Οκτώβριος) η μέση παροχή είναι 6.500 m³/day. Η μέγιστη ημερήσια παροχή εισερχομένων λυμάτων παρατηρήθηκε τον Αύγουστο του 2008 και έφτασε τα 7.850 m³/day. Το αποχετευτικό δίκτυο συνεχώς επεκτείνεται και πραγματοποιούνται νέες συνδέσεις (ypeka.plexscape.com).



Εικόνα 6: Βιολογικός Καθαρισμός Νέας Κυδωνίας (ypeka.plexscape.com)

Η παροχή που διοχετεύεται ημερησίως στο πρώτο στάδιο επεξεργασίας (ενεργούς ιλύος) φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας B.3.3.1: Παροχή Βιολογικού Καθαρισμού Νέας Κυδωνίας (ypeka.plexscape.com)

	Μέσο (Ετήσιος Μέσος Όρος)
Συνολική εισερχόμενη παροχή στην Ε.Ε.Λ. (m ³ /day):	5.421
Εισερχόμενη παροχή λυμάτων (m ³ /day):	5.421
Εισερχόμενη παροχή βοθρολυμάτων (m ³ /day):	-

Τα στάδια επεξεργασίας στο Βιολογικό Καθαρισμό Νέας Κυδωνίας είναι τα εξής:

Πίνακας B.3.3.2: Επεξεργασία Λυμάτων Νέας Κυδωνίας (ypeka.plexscape.com)

Γραμμή επεξεργασίας λυμάτων	Γραμμή επεξεργασίας ιλύος
<ul style="list-style-type: none"> • Δευτεροβάθμια • Απομάκρυνση Αζώτου • Απολύμανση <ul style="list-style-type: none"> ο Χλωρίωση ο Αποχλωρίωση 	<ul style="list-style-type: none"> • Πάχυνση • Αφυδάτωση • Πρόσθετη επεξεργασία <ul style="list-style-type: none"> ο Προσθήκη ασβέστη

Ο τελικός αποδέκτης της εκροής είναι η θαλάσσια περιοχή του Γερανίου, μέσω υποθαλάσσιου αγωγού μήκους 1.120 m.

4. Νομικό πλαίσιο λειτουργίας βιολογικών καθαρισμών

Για τις εγκαταστάσεις βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων, η ποιοτική σύσταση της εκροής των εγκαταστάσεων καθορίζεται από το ΦΕΚ 354B/08-03-2011 και εξαρτάται από την τελική διάθεση του ρεύματος εκροής του Βιολογικού Καθαρισμού (π.χ. βιομηχανική ψύξη, πότισμα καλλιεργειών κοκ.) (ypeka.plexscape.com).

Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες του ΦΕΚ 354B/08-03-2011 που καθορίζουν τα όρια των μικροβιολογικών παραμέτρων.

Τα υπό εξέταση δείγματα από τους βιολογικούς καθαρισμούς Ηρακλείου, Χανίων και Βορείου Άξονα Χανίων (Νέας Κυδωνίας) όλα καταλήγουν σε θαλάσσιο αποδέκτη. Και οι τρεις υπό μελέτη εγκαταστάσεις εμπίπτουν στην Οδηγία 91/271/ΕΟΚ (ypeka.plexscape.com).



Εικόνα 7: Μονάδες επεξεργασίας λυμάτων στην Κρήτη που υπάγονται στην Οδηγία 91/271/ΕΟΚ (ypeka.plexscape.com)

Η μικροβιακή σύσταση εκροής των λυμάτων για υδάτινο αποδέκτη καθορίζονται από την υγειονομική διάταξη ΚΥΑ Ε1β 221/65 «ΠΕΡΙ ΔΙΑΘΕΣΕΩΣ ΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ» και το νόμο 1650/86 για την προστασία του περιβάλλοντος.

Συγκεκριμένα, τα κολυμβητικά ύδατα στα οποία απορρέει ο βιολογικός καθαρισμός πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προδιαγραφές:

Πίνακας Β.4.1: Μέσος όρος των περιεχομένων κολοβακτηριοειδών ανά 100mL κατά την περίοδο κολυμβήσεως κατά Κ.Υ.Α. Ε1β/221 (ΚΥΑ Ε1β 221/65)

Κατηγορία υδάτων κολυμβήσεως	Μέσος όρος των περιεχομένων κολοβακτηριοειδών ανά 100 ml κατά την περίοδο της κολυμβήσεως
Α. Κατάλληλα	0- 50
Β. Παραδεκτά μετ' επιφυλάξεως	51 – 500
Γ. Υποπτα μη συνιστώμενα	501 – 1000
Δ. Ακατάλληλα	Ανω των 1000

Τύπος επαναχρησιμοποίησης	<i>Escherichia coli</i> (EC/100 ml)	BOD5 (mg/l)	SS (mg/l)	Θολότητα (NTU)	Κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία	Ελάχιστη συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων νερού προς επαναχρησιμοποίηση
<p>Περιορισμένη άρδευση Περιοχές όπου δεν αναμένεται πρόσβαση του κοινού, καλλιέργειες ζωοτροφών, βιομηχανικές καλλιέργειες, λιβάδια, δένδρα (μη συμπεριλαμβανομένων των οπωροφόρων), με την προϋπόθεση ότι κατά τη συλλογή οι καρποί δεν βρίσκονται σε επαφή με το έδαφος, καλλιέργειες σπόρων και καλλιέργειες που παράγουν προϊόντα τα οποία υποβάλλονται σε περαιτέρω επεξεργασία πριν την κατανάλωσή τους. Άρδευση με καταιονισμό δεν θα εφαρμόζεται</p> <p>Βιομηχανική χρήση Νερό ψύξης μιας χρήσης</p> <p>Τροφοδότηση υπόγειων υδροφορέων που δεν εμπίπτουν στις διατάξεις του άρθρου 7 του ΠΔ 51/2-3-2007, (με την επιφύλαξη των παραγράφων 4 και 5 του άρθρου 5 της παρούσας), με διήθηση διαμέσου εδαφικού στρώματος με επαρκές πάχος και κατάλληλα χαρακτηριστικά^(δ)</p>	≤ 200 διάμεση τιμή	Σύμφωνα με τις επιταγές της ΚΥΑ 5673/400/1997	Σύμφωνα με τις επιταγές της ΚΥΑ 5673/400/1997	-	Δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία ^{(α), (β)} Απολύμανση ^(γ)	<p>BOD₅, SS, N, P: σύμφωνα με τις επιταγές της ΚΥΑ 5673/400/5.3.97 (ΦΕΚ 192/Β/14.3.97)</p> <p>EC: μια ανά εβδομάδα</p> <p>Υπολειμματικό χλώριο:συνεχώς (εφόσον εφαρμόζεται χλωρίωση)</p>

Πίνακας Β.4.2: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για περιορισμένη άρδευση, βιομηχανική χρήση νερού ψύξης μιας χρήσης και εμπλουτισμό υπόγειου υδροφορέα, που δεν χρησιμοποιείται για πόση και με διήθηση διαμέσου κατάλληλου εδαφικού στρώματος (ΚΥΑ, Ειβ 145116/2011)

Τύπος επαναχρησιμοποίησης	<i>Escherichia coli</i> (EC/100 ml)	BOD ₅ (mg/l)	SS (mg/l)	Θολότητα (NTU)	Κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία	Ελάχιστη συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων νερού προς επαναχρησιμοποίηση
<p>Απεριόριστη άρδευση Όλες οι καλλιέργειες όπως λαχανικά, αμπέλια ή καλλιέργειες των οποίων τα προϊόντα καταναλώνονται ωμά, θερμοκήπια. Η απεριόριστη άρδευση επιτρέπει την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων εφαρμογής της άρδευσης συμπεριλαμβανομένου του καταιονισμού.</p> <p>Βιομηχανική χρήση πλην νερού ψύξης μιας χρήσης επανακυκλοφορούμενο νερό ψύξης, νερό για λέβητες, νερό διεργασιών κλπ⁽ⁿ⁾</p>	<p>≤ 5 για το 80% των δειγμάτων και ≤ 50 για το 95 % των δειγμάτων</p>	<p>≤ 10 για το 80% των δειγμάτων</p>	<p>≤ 10 για το 80% των δειγμάτων</p>	<p>≤ 2 διάμεση τιμή</p> <p>-</p>	<p>Δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία^(ε) ακολουθούμενη από Τριτοβάθμια επεξεργασία^(στ) και Απολύμανση^(ζ)</p>	<p>BOD₅, SS, N, P: σύμφωνα με τις επιταγές της ΚΥΑ 5673/400/5.3.97 (ΦΕΚ 192/Β/14.3.97)</p> <p>Θολότητα και διαπερατότητα: για ανακτημένο νερό από εγκαταστάσεις επεξεργασίας με ισοδύναμο πληθυσμό μεγαλύτερο από 50000 κατοίκους τέσσερις ανά εβδομάδα και δύο ανά εβδομάδα στις υπόλοιπες περιπτώσεις</p> <p>EC: για ανακτημένο νερό από εγκαταστάσεις επεξεργασίας με ισοδύναμο πληθυσμό μεγαλύτερο από 50000 κατοίκους τέσσερις ανά εβδομάδα και δύο ανά εβδομάδα στις υπόλοιπες περιπτώσεις.. Κατ εξαίρεση για νησιωτικές περιοχές με</p>

Πίνακας Β.4.3: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για απεριόριστη άρδευση και βιομηχανική χρήση πλην νερού ψύξης μιας χρήσης (ΚΥΑ, Ειβ 145116/2011)

Τύπος επαναχρησιμοποίησης	Ολικά κολοβακτηρίδ ια (TC/100 ml)	BOD5 (mg/l)	SS (mg/l)	Θολότητ α (NTU)	Κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία	Ελάχιστη συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων νερού προς επαναχρησιμοποίηση
<p>Αστική χρήση Μεγάλες εκτάσεις (νεκροταφεία, πρανή αυτοκινητόδρομων, γήπεδα γκόλφ, δημόσια πάρκα), εγκαταστάσεις αναψυχής, κατάσβεση πυρκαϊών, συμπύκνωση εδαφών, καθαρισμός οδών και πεζοδρόμων, διακοσμητικά σιντριβάνια Πότισμα με καταιονισμό απαγορεύεται;;;</p> <p>Εμπλουτισμός υπόγειων υδροφορέων που δεν εμπίπτουν στις διατάξεις του άρθρου 7 του ΠΔ 51/2-3-2007 (ΦΕΚ54Α/8-3-2007), με γεωτρήσεις</p> <p>Περισστικό πράσινο συμπεριλαμβανομένων των αλσών και δασών ^(λ)</p>	<p>≤ 2 για το 80% των δειγμάτων και ≤ 20 για το 95 % των δειγμάτων</p>	<p>≤ 10 για το 80% των δειγμάτων</p>	<p>≤ 2 για το 80% των δειγμάτων</p>	<p>≤ 2 διάμεση τιμή -</p>	<p>Δευτεροβάθμια βιολογική επεξεργασία ^(θ) ακολουθούμενη από Προχωρημένη επεξεργασία ^(ι) και Απολύμανση ^(κ)</p>	<p>BOD₅, SS, N, P: σύμφωνα με τις επιταγές της ΚΥΑ 5673/400/5.3.97 (ΦΕΚ 192/Β/14.3.97)</p> <p>Θολότητα και διαπερατότητα: για ανακτημένο νερό από εγκαταστάσεις επεξεργασίας με ισοδύναμο πληθυσμό μεγαλύτερο από 50000 κατοίκους τέσσερις ανά εβδομάδα και δύο ανά εβδομάδα στις υπόλοιπες περιπτώσεις</p> <p>TC: για ανακτημένο νερό από εγκαταστάσεις επεξεργασίας με ισοδύναμο πληθυσμό μεγαλύτερο από 50000 κατοίκους επτά ανά εβδομάδα και τρεις ανά εβδομάδα στις υπόλοιπες περιπτώσεις Κατ εξαίρεση για νησιωτικές περιοχές με τεκμηριωμένη έλλειψη κατάλληλης εργαστηριακής υποδομής δύο ανά εβδομάδα</p> <p>Υπολειμματικό Cl₂ συνεχώς (εφόσον εφαρμόζεται χλωρίωση) -</p>

Πίνακας Β.4.4: Όρια για μικροβιολογικές και συμβατικές παραμέτρους καθώς και η κατ ελάχιστον απαιτούμενη επεξεργασία και συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων για αστική και περιστατική χρήση και εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων με γεωτρήσεις [(ΚΥΑ, Ειβ 145116/2011)]

5. Χλωρίωση

Τα αστικά λύματα περιέχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις παθογόνους μικροοργανισμούς, απαγορευτικές για οποιαδήποτε διάθεση του ρεύματος εκροής της βιολογικής επεξεργασίας. Για το λόγο αυτό είναι επιτακτική ανάγκη η απολύμανση των λυμάτων πριν την τελική τους διάθεση. Και στις τρεις υπό εξέταση μονάδες η μέθοδος απολύμανσης που ακολουθείται είναι η χλωρίωση, η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη στην Ελλάδα.

5.3. Απολύμανση υγρών αποβλήτων

Η απολύμανση των υγρών αποβλήτων έχει ως στόχο την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να προστατευτεί η δημόσια υγεία. Όλες οι μέθοδοι απολύμανσης στοχεύουν στην αδρανοποίηση των βακτηρίων, των ιών και των λοιπών μικροοργανισμών, οι οποίοι πιθανώς να είναι παθογόνοι κι εξαιρετικά επικίνδυνοι για τη δημόσια υγεία (Νταράκας, 2014).

Το απολυμαντικό μέσο πρέπει να είναι δραστικό σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών που παρουσιάζονται ή αναμένεται να παρουσιασθούν στο σύστημα, να συμφέρει οικονομικά η εφαρμογή του, να μην δημιουργεί παρενέργειες στο σύστημα και να μην δημιουργεί σοβαρούς κινδύνους για το προσωπικό και το περιβάλλον.

Οι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα στα διάφορα απολυμαντικά μέσα. Οι σπόροι των βακτηρίων και των πρωτόζωων παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Οι κύριες κατηγορίες ανθρώπινων εντερικών μικροοργανισμών οι οποίες υπάρχουν στα υγρά απόβλητα και πρέπει να θανατωθούν πριν τα υγρά απόβλητα διατεθούν στο περιβάλλον είναι τα βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι ωοκύστες, οι κύστες και οι ιοί.

Η περιεκτικότητα των τυπικών αστικών λυμάτων σε κολοβακτηρίδια είναι της τάξης των 10^7 CFU / 100mL και σε αυτά περιλαμβάνονται και παθογόνοι μικροοργανισμοί. Με τις επί μέρους διεργασίες κατά την επεξεργασία των λυμάτων απομακρύνεται ένα μεγάλο ποσοστό αυτών των μικροοργανισμών. Στις σχάρες για παράδειγμα επιτυγχάνεται ποσοστό απομάκρυνσης 10 – 20 % περίπου, στους αμμοσυλλέκτες 10 – 25 % περίπου και κατά την καθίζηση απομακρύνεται ποσοστό της τάξης του 25 – 75 %. Με τη βιολογική επεξεργασία και πιο συγκεκριμένα με τη μέθοδο της ενεργού ιλύος επιτυγχάνεται απομάκρυνση του 90 – 98 % των μικροοργανισμών.

Παρόλα αυτά, η απολύμανση με τη χρήση ισχυρών οξειδωτικών παραγόντων (Cl_2 κλπ) ή με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) είναι απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθεί η μικροβιακή μόλυνση των φυσικών αποδεκτών γιατί αυτοί χρησιμοποιούνται για υδροληψία, κολύμβηση, αλιεία κλπ. Με την απολύμανση λοιπόν επιτυγχάνεται καταστροφή ή αδρανοποίηση των μικροοργανισμών που περιέχονται στα λύματα, σε ποσοστό της τάξης του 98 – 99,9 %, ώστε αυτοί να μην είναι ικανοί να μεταδώσουν ασθένειες στα ζώα και τους ανθρώπους. Με τον όρο αδρανοποίηση» εννοείται όχι απαραίτητα θανάτωση των μικροοργανισμών αλλά παρεμπόδιση της ανάπτυξης ή της δυνατότητας αναπαραγωγής.

Πίνακας Β.5.1. Ταξινόμηση των απολυμαντικών μέσων (Νταράκας, 2014)

Μη χημικά	Χημικά	
	Οξειδωτικά	Μη οξειδωτικά
Υπεριώδης ακτινοβολία (UV)	Cl_2	Μεθυλενοδιθειοκυάνιο (MBT)
	ClO_2	Διβρωμονιτριλοπροπιοαμίδιο (BNPA)
	NaOCl	Χλωριωμένες φαινόλες
Ραδιενεργός ακτινοβολία	O_3	Ισοθειαζόλες
Αποστειρωτική διήθηση	Br_2	Δι-τριβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (TBTO)
Θερμότητα	I_2	
	H_2O_2	

Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα απολυμαντικά μέσα είναι η καταστροφή του κυτταρικού υλικού των μικροοργανισμών, η παρεμβολή στον ενεργειακό τους μεταβολισμό με την αδρανοποίηση της λειτουργίας των ενζύμων τους και η παρεμβολή στην βιοσύνθεση και την ανάπτυξή τους παρεμποδίζοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, κυριότερες από τις οποίες είναι:

- το είδος, η δόση και ο χρόνος επαφής του απολυμαντικού,
- ο τύπος και η φυσιολογική κατάσταση του μικροοργανισμού (πρωτόζωα, βακτήρια, ιοί),
- το pH, η θερμοκρασία, η θολότητα και η διαλυμένη οργανική ύλη.

5.4. Χλωρίωση αστικών λυμάτων

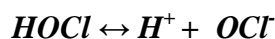
Η πλέον διαδεδομένη απολυμαντική μέθοδος στην Ελλάδα είναι αυτή της χλωρίωσης, κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους εφαρμογής και της υψηλής θνησιμότητας των μικροοργανισμών στην έκθεσή τους στο χλώριο.

Το χλώριο (Cl_2) είναι ουσία τοξική για τον άνθρωπο και τα ζώα, σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις οι οποίες απαιτούνται για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών είναι αβλαβές.

Όταν το αέριο χλώριο αναμιγνύεται με το νερό σχηματίζεται υποχλωριώδες οξύ (HOCl) κατά την εξίσωση:



Το υδροχλωρικό οξύ (HCl) που παράγεται κατά την αντίδραση εξουδετερώνεται από τα όξινα ανθρακικά (HCO_3^-) του νερού. Το υποχλωριώδες οξύ είναι ένα ασθενές οξύ που διασπάται στη συνέχεια σε ιόντα υδρογόνου (H^+) και υποχλωριώδη ιόντα (OCl^-).

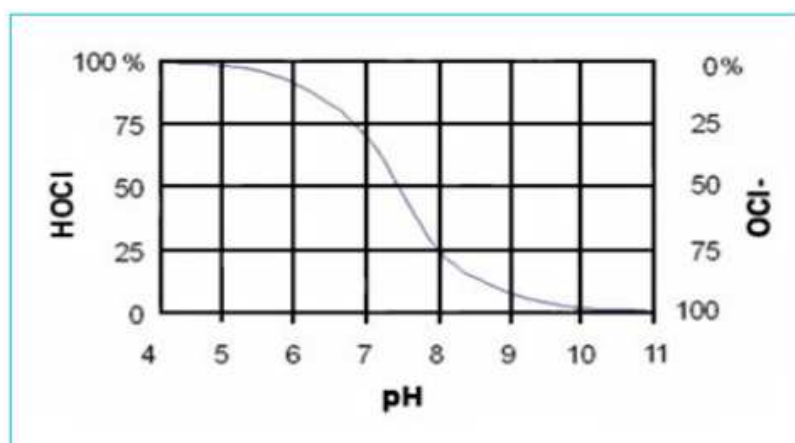


Η βακτηριοκτόνος δράση του υποχλωριώδους οξέως (HOCl) είναι ισχυρότερη από αυτήν του υποχλωριώδους ιόντος. Έχει διαπιστωθεί ότι το υποχλωριώδες οξύ είναι 80-100% πιο αποτελεσματικό απ' ότι τα υποχλωριώδη ιόντα. Η παρουσία όμως του υποχλωριώδους οξέως στο νερό εξαρτάται κυρίως από το pH. Έτσι, σε χαμηλές τιμές pH υπερισχύει το οξύ (HOCl), ενώ σε υψηλές τιμές υπερισχύουν τα υποχλωριώδη ιόντα (OCl^-).

Πίνακας Β.5.2.: Μορφές του χλωρίου και χημικές ουσίες που συνδέονται με τη χλωρίωση

Χημικός τύπος	Ονοματολογία
Cl_2	Χλώριο
Cl^-	Χλωριούχο ιόν
ClO^-	Υποχλωριώδες ιόν
ClO_2^-	Χλωριώδες ιόν
ClO_3^-	Χλωρικό ιόν
ClO_4^-	Υπερχλωρικό ιόν
Cl_2O	Μονοξείδιο χλωρίου
ClO_2	Διοξείδιο του χλωρίου
NH_2Cl	Μονοχλωραμίνη
NHCl_2	Διχλωραμίνη
NCl_3	Τριχλωραμίνη

Στο σχήμα 8 φαίνεται η ποσοστιαία αναλογία των υποχλωριωδών ιόντων (OCl^-) και του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) για διάφορες τιμές του pH. Όταν το pH του νερού είναι 7,5, οι συγκεντρώσεις του HOCl και του OCl^- είναι ισοδύναμες. Σε χαμηλές τιμές ($\text{pH} < 6$) η απολύμανση είναι καλή αλλά η διάβρωση που προκαλείται από τους οξειδωτικούς παράγοντες είναι ισχυρότατη. Τα παραπροϊόντα της απολύμανσης είναι διχλωραμίνες και τριχλωραμίνες. Σε υψηλές τιμές ($\text{pH} > 6$) η απολύμανση είναι κακή, η διάβρωση είναι ανύπαρκτη και το παραπροϊόν της απολύμανσης είναι μονοχλωραμίνες. Για τιμές pH μεταξύ 7,0 και 8,0 η απολύμανση είναι η μέγιστη, η διάβρωση ελάχιστη και τα παραπροϊόντα της απολύμανσης είναι μονοχλωραμίνες και διχλωραμίνες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Με βάση τα παραπάνω μέγιστη απολύμανση επιτυγχάνεται για τιμές pH μεταξύ 5,5 και 7,5. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του pH και όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο περισσότερη ποσότητα χλωρίου απαιτείται για την επιτυχή απολύμανση.

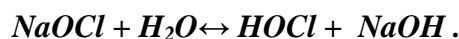


Εικόνα 8: Καμπύλη ιονισμού του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) σε σχέση με το pH σε θερμοκρασία 25 °C

Το τμήμα του συνολικά υπάρχοντος ενεργού χλωρίου, το οποίο βρίσκεται σε μορφή υποχλωριώδους οξέως (HOCl) και υποχλωριωδών ιόντων (OCl^-) είναι γνωστό σαν ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο ή υπολειμματικό χλώριο. Ως ενεργό χλώριο ορίζεται το άθροισμα όλων των ενώσεων χλωρίου που υπάρχουν σε κάποια χρονική στιγμή στο νερό και έχουν απολυμαντική δράση.

Εάν για την απολύμανση χρησιμοποιηθεί χλωριώδες νάτριο (NaOCl_2) και αέριο χλώριο δημιουργείται διοξείδιο του χλωρίου το οποίο είναι το βακτηριοκτόνο μέσο. Το διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2) είναι σταθερό αέριο που παραμένει σαν υπόλειμμα

στο νερό για μικρό χρονικό διάστημα και είναι ιδιαίτερα δραστικό σε υψηλές τιμές του pH. Εάν χρησιμοποιηθεί υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) προκύπτει υποχλωριώδες οξύ και για υψηλές τιμές του pH μετατρέπεται σε υποχλωριώδες ιόν του οποίου η βακτηριοκτόνος δράση δεν είναι αποτελεσματική:



Στην περίπτωση αυτή απαιτείται διόρθωση του pH ώστε η τιμή του να είναι μικρότερη από 7,5. Το φως, η θερμοκρασία και ίχνη βαρέων μετάλλων δημιουργούν απώλειες ενεργού χλωρίου λόγω μετατροπής του σε χλωρικό και χλωριώδες νάτριο.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος απολύμανσης των υγρών αποβλήτων είναι η χλωρίωση (με αέριο χλώριο ή με διοξείδιο του χλωρίου ή με υποχλωριώδες νάτριο) και η πιο σημαντική παράμετρος κατά τη χλωρίωση είναι ο χρόνος επαφής των αποβλήτων με το χλώριο. Το σύστημα της χλωρίωσης σχεδιάζεται ώστε να εξασφαλίζεται ότι το 90 – 95 % περίπου της μάζας των υγρών αποβλήτων παραμένει στη δεξαμενή η οποία είναι μαιανδρικού τύπου για τουλάχιστον 30 – 40 λεπτά. Η δόση του χλωρίου που απαιτείται για επιτυχή απολύμανση είναι συνάρτηση της αρχικής απαίτησης χλωρίου, της εξασθένησής του κατά τον χρόνο επαφής και της απαιτούμενης συγκέντρωσης του υπολειπόμενου χλωρίου το οποίο θα επιτελέσει το έργο της απολύμανσης.

Η συνήθης πρακτική που ακολουθείται για τον προσδιορισμό της απαιτούμενης δόσης χλωρίου, είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης του υπολειμματικού χλωρίου, μετά από χρόνο επαφής 15 - 30 min, η οποία πρέπει να είναι 0,5 mg/L (Νταράκας, 2014).

Πίνακας Β.5.3: Τυπικές δόσεις χλωρίου για χρόνο επαφής 30 λεπτών

Τύπος υγρών αποβλήτων	Αρχική μέτρηση CFU/100ml	Δόση χλωρίου (mg/ltr) για μείωση σε			
		1000 CFU/100ml	200 CFU/100ml	23 CFU/100ml	≤22 CFU/100ml
Ανεπεξέργαστα απόβλητα	10 ⁷ - 10 ⁹	15 – 40	-	-	-
Πρωτοβάθμια εκροή	10 ⁷ - 10 ⁹	10 – 30	20 – 40	-	-
Εκροή ενεργού ιλύος	10 ⁵ - 10 ⁶	2 – 10	5 – 15	10 - 30	-
Διηθημένη εκροή ενεργού ιλύος	10 ⁴ - 10 ⁶	4 – 8	5 – 15	6 – 20	8 - 30
Εκροή αμμόφιλτρου	10 ² - 10 ⁴	1 – 5	2 – 8	5 – 10	8 - 18

CFU: Colony forming units

Για να εξασφαλιστεί η παραμονή των κατεργασμένων αποβλήτων στη δεξαμενή επαφής χλωρίου για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο, η πιο κοινή προσέγγιση είναι η χρήση δεξαμενών επαφής μεγάλου μήκους εμβολικής ροής με στρογγυλεμένα άκρα ή μια σειρά εσωτερικά συνδεδεμένων δεξαμενών ή τμημάτων.



Εικόνα 9: Μαιανδρική δεξαμενή χλωρίωσης

Το μεγάλο μειονέκτημα της χρήσης ισχυρών οξειδωτικών μέσων απολύμανσης όπως το χλώριο και οι διάφορες ενώσεις του είναι η παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων απολύμανσης και κυρίως τα τριαλογονομεθάνια και αλογονοοξικά οξέα. Τα παραπροϊόντα απολύμανσης έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία όπως χρωμοσωμικές διαταραχές, ανωμαλίες και καρκινογενέσεις. Γι' αυτούς τους λόγους γίνονται προσπάθειες αντικατάστασης του χλωρίου με άλλα υλικά απολύμανσης.

Σε πολλές εγκαταστάσεις εφαρμόζεται αποχλωρίωση των χλωριωμένων εκροών η οποία συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση διοξειδίου του θείου (SO_2) ή του όξινου θειώδους νατρίου (NaHSO_3). Σε περιπτώσεις προχωρημένης επεξεργασίας όπου χρησιμοποιείται κοκκώδης ενεργός άνθρακας για την απομάκρυνση της υπολειμματικής οργανικής ύλης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ενεργός άνθρακας και για την αποχλωρίωση των χλωριωμένων εκροών.

6. Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα μελέτη μελετώνται τρεις από τους σημαντικότερους Βιολογικούς Σταθμούς επεξεργασίας αστικών λυμάτων στο Βόρειο Άξονα της Κρήτης, και ειδικότερα οι κυριότεροι των δύο μεγαλύτερων σε πληθυσμό νομών του νησιού. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα ρεύματα εισόδου, εξόδου, η χλωρίωση και η εκροή των σταθμών Βιολογικού Καθαρισμού της Βόρειας Κρήτης, των Χανίων, της Νέας Κυδωνίας που βρίσκεται στο Γεράνι του δήμου Πλατανιά, και του Ηρακλείου, ως προς το περιεχόμενο μικροβιακό φορτίο (βακτήρια & ιοί) με απώτερο στόχο την αξιολόγηση λειτουργίας των αναφερόμενων σταθμών.

Συνοπτικά, τα θέματα που εξετάζονται είναι τα εξής:

- ✓ Μικροβιολογικός έλεγχος και ανίχνευση ιών σε δείγματα από ακατέργαστα λύματα, μετά τη δεξαμενή καθίζησης, στη χλωρίωση και την απόρριψη των βιολογικών του Νομού Χανίων.
- ✓ Έλεγχος απομάκρυνσης του αρχικού μικροβιακού και ιικού φορτίου κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας λυμάτων.
- ✓ Σύγκριση των τριών διαφορετικών υπό μελέτη μονάδων.
- ✓ Έλεγχος για τον εντοπισμό βακτηριοφάγων στα δείγματα.
- ✓ Έλεγχος ανίχνευσης εντεροϊών και αδενοϊών στα λύματα με τη μέθοδο της PCR.
- ✓ Έλεγχος ποιότητας νερού εξόδου και καταλληλότητας για χρήση σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις.
- ✓ Συσχέτιση ανίχνευσης ιών με τις εποχές του έτους.
- ✓ Συσχέτιση ανίχνευσης ιών και μικροβιολογικών δεικτών με τη διακύμανση του πληθυσμού.
- ✓ Έλεγχος ανθεκτικότητας ιών στα διάφορα στάδια επεξεργασίας.
- ✓ Σύγκριση αποτελεσμάτων με τη βιβλιογραφία.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Δειγματοληψία και επεξεργασία δειγμάτων

Η δειγματοληψία από τους τρεις σταθμούς που επιλέχθηκαν έγινε κατά τη διάρκεια ενός έτους και ανά χρονικά διαστήματα τέτοια ώστε να αποτυπωθούν κατά το βέλτιστο δυνατό οι μέγιστες μεταβολές στο μικροβιακό φορτίο, λόγω καιρικών συνθηκών και της μεταβολής του πληθυσμού που αντιστοιχεί στην κάθε μονάδα. Αναμένεται κατά τη χειμερινή περίοδο και ιδιαίτερα κατά την περίοδο έντονων βροχοπτώσεων το μικροβιακό φορτίο να ελαχιστοποιείται. Αντίθετα, κατά τους θερινούς μήνες που ο πληθυσμός αυξάνεται και σε ορισμένες περιπτώσεις έως και διπλασιάζεται (εγκατάσταση Βόρειου Άξονα) σε συνδυασμό με την παρατεταμένη ξηρασία στην Κρήτη το μικροβιακό φορτίο αυξάνεται αισθητά.

Δείγματα λαμβάνονταν από τρία διαφορετικά σημεία των εγκαταστάσεων:

- Την είσοδο του βιολογικού
- Την έξοδο από τη δευτεροβάθμια καθίζηση και πριν τη διαδικασία απολύμανσης
- Την έξοδο από τη χλωρίωση.

Επιπλέον, για τους βιολογικούς Χανίων και Βόρειου Άξονα λήφθηκαν δείγματα και στην απόρριψη του ρεύματος εκροής, στον κόλπο Χανίων και τη θαλάσσια περιοχή Γερανίου πλησίον του ρέματος Κερίτη.



Εικόνα 10: Θαλάσσια περιοχή δειγματοληψίας απόρριψης βιολογικού καθαρισμού Χανίων



*Εικόνα 11: Θαλάσσια περιοχή δειγματοληψίας απόρριψης βιολογικού καθαρισμού
Νέας Κυδωνίας*

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά τις ακόλουθες περιόδους:

Πίνακας Γ.1.1: Συνοπτικός πίνακας δειγματοληψιών.

α/α	Ημερομηνία	Σταθμός
1	22.02.2012	Χανίων
2	06.03.2012	Χανίων
3	19.03.2012	Βορείου Άξονα
4	27.04.2012	Ηρακλείου
5	08.05.2012	Χανίων
6	15.05.2012	Βορείου Άξονα
7	21.05.2012	Ηρακλείου
8	13.06.2012	Χανίων
9	19.06.2012	Ηρακλείου
10	22.06.2012	Βορείου Άξονα
11	24.09.2012	Ηρακλείου
12	27.09.2012	Χανίων
13	04.10.2012	Βορείου Άξονα
14	26.11.2012	Βορείου Άξονα
15	28.11.2012	Χανίων
16	30.11.2012	Ηρακλείου

Σε όλα τα δείγματα έγινε ανίχνευση και καταμέτρηση των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (ολικών κολοβακτηριοειδών - total coliforms, κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών - *E. coli*, εντερόκοκκων - fecal streptococci και *Clostridium perfringens*). Επίσης, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση βακτηριοφάγων και ανίχνευση αδενοϊών κι εντεροϊών.

2. Πρωτόκολλα ανάλυσης νερού για την ανίχνευση μικροοργανισμών

2.1 Ολικά κολοβακτηριοειδή

- α. Διήθηση 100mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,45μm.
- β. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό mEndo Agar LES (HIMEDIA).
- γ. Επώαση στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 21 ώρες ± 3 ώρες.
- δ. Μετά την επώαση γίνεται η καταμέτρηση των τυπικών αποικιών. Στο θρεπτικό υλικό mEndo Agar LES τα κολοβακτηριοειδή εμφανίζουν αποικίες σκούρου κόκκινου χρώματος με χρυσο-πράσινη μεταλλική χροιά.

2.2 Escherichia coli

- α. Διήθηση 100mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,45μm.
- β. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε χρωμογόνο θρεπτικό υλικό HiCrome Coliform Agar (HIMEDIA).
- γ. Επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
- δ. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών. Στο υλικό Hi Crome Coliform οι τυπικές αποικίες *E. coli* είναι σκούρο μπλε-μωβ χρώματος.

2.3 Κοπρανώδεις Στρεπτόκοκκοι

- α. Διήθηση 100mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,45μm.
- β. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley medium (HIMEDIA).
- γ. Επώαση στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 44 ώρες ± 4 ώρες.

δ. Μετά την επώαση εάν έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος) μεταφέρουμε τη μεμβράνη διήθησης σε θρεπτικό υλικό Bile-aesculin-azide agar (HIMEDIA), το οποίο έχει προθερμανθεί στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

ε. Επώαση στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 2 ώρες

στ. Καταμέτρηση των αποικιών που έχουν μαύρο διάχυτο χρώμα στο θρεπτικό υλικό. Οι αποικίες αυτές λαμβάνονται ως κοπρανώδεις εντερόκοκκοι.

2.4 Clostridium perfringens

α. Διήθηση 100mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων $0,45\mu\text{m}$.

β. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC άγαρ) (HIMEDIA).

γ. Επώαση αναερόβια στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 21 ώρες \pm 3 ώρες.

δ. Μετά την επώαση καταμέτρηση όλων των αποικιών που έχουν *μαύρο, γκριζό ή κίτρινο-καφέ χρώμα*.

3 Πρωτόκολλο για βακτηριοφάγους

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Tryptone Yeast Extract Glucose Agar 2% (TYGA2)

Υλικά για 1000 mL:

Tryptone (HIMEDIA): $10\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$

Yeast extract (HIMEDIA): $1\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$

Sodium chloride: $8\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$

Bacto agar (BD): $20\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$

Σε 1000 mL απιονισμένο νερό προστίθενται τα tryptone, yeast extract, sodium chloride και agar. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Τέλος, προστίθενται 5 mL calcium glucose.

- Calcium Glucose Solution

Υλικά για 10 mL:

Calcium chloride 2- hydrate: $0,3\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$

D (+) – glucose: $1\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$

Τοποθετούνται 10 mL αποστειρωμένο νερό σε φιάλη. Προστίθεται το calcium chloride 2- hydrate (υπό ανάδευση) και στη συνέχεια η D (+) – γλυκόζη. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως και έπειτα διηθείται από φίλτρο πόρων 0,22μm κοντά σε φλόγα με σύριγγα. Το διάλυμα φυλάσσεται σε μέρος σκοτεινό και δροσερό.

- Tryptone Yeast Extract Glucose Broth (TYGB)

Υλικά για 1000 mL:

Tryptone: 10 g \pm 0,5 g

Yeast extract: 1 g \pm 0,05 g

Sodium chloride: 8 g \pm 0,1 g

Σε 1000 mL απιονισμένο νερό προστίθενται τα tryptone, yeast extract και sodium chloride. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min.

- Tryptone Yeast Extract Glucose Agar 1% (TYGA1)

Υλικά για 1000 mL:

Tryptone: 10 g \pm 0,5 g

Yeast extract: 1 g \pm 0,05 g

Sodium chloride: 8 g \pm 0,05 g

Bacto agar: 10 g \pm 0,5 g

Μεθοδολογία πειράματος (ISO 10705-1-1996)

a) Προετοιμασία καλλιέργειας

- Σε 100mL TYGB προστίθεται 1 mL calcium glucose. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για μία ώρα. Στη συνέχεια απομακρύνονται και τοποθετούνται σε καθαρό φιαλίδιο ~5 mL από το μίγμα, τα οποία στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν ως blank για τη φωτομέτρηση.
- Λαμβάνεται από τους -80 °C μία working culture ξενιστή και αφήνεται να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- 1 mL από την καλλιέργεια προστίθεται σε 100mL TYGB.

- Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση να γίνει O.D.~0,39 στα 600 nm.

b) Προετοιμασία λύματος

- Σε διάλυμα πεπτόνης 0,1% φτιάχνονται διαδοχικές αραιώσεις του λύματος, λαμβάνοντας κάθε φορά 1 mL από το δείγμα και προσθέτοντας το σε 9 mL διαλύματος πεπτόνης 0,1%.

c) Ανάλυση

- Σε τηγμένο διάλυμα TYGA1 προστίθεται 1 mL calcium glucose/mL TYGA1.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που έχουν τοποθετηθεί στο υδατόλουτρο τοποθετούνται 3 mL από το διάλυμα TYGA1.
- Προστίθεται σε κάθε σωλήνα 1 mL από την καλλιέργεια του ξενιστή.
- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται ένα mL από διαφορετικό κάθε φορά δείγμα που έχει προκύψει από τις αραιώσεις του αρχικού δείγματος.
- Το περιεχόμενο των σωληνάρων προστίθεται σε τρυβλία που έχουν επιστρωθεί με TYGA2.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C για 24 ώρες και ακολουθεί καταμέτρηση των πλακών των φάγων.

4 Πρωτόκολλα ανίχνευσης ιών εντερικής προέλευσης από λύματα

4.1. Διαλύματα για απομόνωση γενετικού υλικού

- Phosphate Buffer Saline –PBS (Sigma)

Διάλυση μίας ταμπλέτας PBS σε 500 mL H₂O και ρύθμιση pH στο 7,1- 7,2. το διάλυμα αποστειρώνεται όπως προηγουμένως.

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ιών

Διάλυση 120 g CuSCN σε 100mL από 0,1 M Tris- HCL.

Προσθήκη 2,6 g Triton X- 100.

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ιών

Διάλυση 24 g σε 20 mL 0,1 M Tris- HCl.

- Silica particles

Διάλυση 60 g Silica Particles (Sigma) σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου σε βαρύτητα για 24 h. Αναρρόφηση 430 mL και απόρριψη του. Προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Παραμονή του ιζήματος για 5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αναρρόφηση 440 mL και απόρριψη. Προσθήκη 600 μ L HCl (32% wt/vol) και ρύθμιση pH = 2. Διατήρηση σε μικρές ποσότητες (4 mL). Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris- EDTA

Παρασκευάζεται διάλυμα 10Mm Tris- HCl, 0,1 mM EDTA, pH = 8. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο για 15 min στους 121°C, 1 atm.

4.2. Συμπύκνωση δείγματος για την απομόνωση των ιών

Μεθοδολογία:

- Προσθήκη 100mL 6% Beef Extract (HIMEDIA) pH= 9,5 σε 100mL δείγματος
- Ανακίνηση για 30 min σε orbital shaker (100 rpm)
- Φυγοκέντρωση στις 7000 xg στους 4°C
- Λήψη υπερκείμενου και ρύθμιση pH στο 3,5
- Φυγοκέντρωση στις 7000 xg στους 4°C
- Λήψη ιζήματος και διάλυση σε 10 mL 1 x PBS.
- Αποθήκευση στους -20°C.

4.3. Απομόνωση γενετικού υλικού των ιών (Boom et al.,1989)

4.3.1 Χημικά διαλύματα

i. Silica particles

Διάλυση 60 g διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) σε απιονισμένο νερό σε συνολικό όγκο 500 mL σε ογκομετρικό κύλινδρο. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h να καθιζάνει το ίζημα. Απομάκρυνση και απόρριψη 430 mL υπερκείμενου και προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Ανάδευση του διαλύματος. Παραμονή για 5 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια απομάκρυνση 440 mL υπερκείμενου και απόρριψη. Προσθήκη 600 μ L HCl 32% wt/vol για ρύθμιση του pH στο 2. Αποθήκευση σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά περίπου 4 mL και αποστείρωση 20 min στους 121°C.

ii. Προετοιμασία των διαλυμάτων

Το διάλυμα λύσης (L6) παρασκευάστηκε διαλύοντας 120 gr GuSCN (θειοκυανούχα γουδινίνη) σε 100mL Tris- Hydrochloride 0,1 M, pH = 6,4 , σε 22 mL EDTA 0,2 M pH =8 και 2,6 g Triton X-100 (CALBIOCHEM). Ακολούθησε ομογενοποίηση. Το διάλυμα έκπλυσης (L2) παρασκευάστηκε διαλύοντας 120 gr GuSCN (θειοκυανούχα γουδινίνη) σε 100mL Tris- Hydrochloride 0,1 M, pH = 6,4. Η διάλυση της GuSCN υποβοηθείται από τη θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 60- 65 °C. Τα διαλύματα αυτά είναι σταθερά για 3 εβδομάδες, αποθηκευμένα υπό σκιά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα έκλουσης (TE) είναι διάλυμα 10 mM Tris- Hydrochloride - 1 mM EDTA (Sigma) pH = 8. Το διάλυμα TE αποστειρώθηκε για 20 min στους 121°C.

4.3.2 Διαδικασία (πρωτόκολλο SC)

1. Σε σωληνάκι erppendorf των 1,5 mL τοποθετούνται 40 μ L διαλύματος silica particles και προστίθενται 900 μ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (L2).
2. Προστίθενται 50 μ L δείγματος. Ανάμιξη με μηχανικό αναδευτήρα vortex για 5s.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
4. Ανάμιξη με μηχανικό αναδευτήρα vortex για 5 s.
5. Σύντομη φυγοκέντρωση για 15 s στα 12.000 x g.
6. Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος δύο φορές με 1 mL διάλυμα έκπλυσης (L2) , δύο φορές με αιθανόλη 70% και μία φορά με ακετόνη.
7. Απόρριψη του υπερκείμενου και τοποθέτηση του ιζήματος στου 56 °C για απομάκρυνση της υγρασίας για 10 min.
8. Προσθήκη 50 μ L διαλύματος έκλουσης TE και μηχανική ανάδευση σε vortex.
9. Επώαση για 10 min στους 56 °C.
10. Σύντομη μηχανική ανάδευση με vortex και φυγοκέντρωση στις 12.000 x g για 2 min
11. Λήψη του υπερκείμενου που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ και αποθήκευση στους -20 °C.
12. Η πλύση πραγματοποιούνται με την προσθήκη κάθε φορά 1 mL από το κατάλληλο διάλυμα. Ακολουθούσε μηχανική ανάδευση μέχρι οπτικά να φαίνεται ότι το ιζημα έχει διαλυθεί πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρωση στις

12.000 \times g για 15 sec. Στη συνέχεια απομακρυνόταν προς απόρριψη το υπερκείμενο.

4.4. Απομόνωση γενετικού υλικού των ιών με τη χρήση του QIAgen viral RNA extraction kit (Baggi et al., 2000)

Τα διαλύματα παρέχονται έτοιμα από το **QIAamp Kit**.

Διαδικασία:

1. Σε σωληνάκι eppendorf των 1,5 mL τοποθετούνται 560μL του διαλύματος AVL και 5,6 μL προετοιμασμένο AVE με RNAase.
2. Προστίθενται 140 μL δείγματος. Ανάμιξη με vortex για 15 s.
3. Επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
4. Σύντομη φυγοκέντρωση για να απομακρυνθούν οι σταγόνες από τα τοιχώματα.
5. Προσθήκη 560 μL αιθανόλης και ανάμιξη με vortex για 15 s. Μετά την ανάμιξη ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρωση για να απομακρυνθούν οι σταγόνες από τα τοιχώματα.
6. Λήψη 630 μL από το διάλυμα του βήματος 5 σε eppendorf του kit, χωρίς να διαβραχεί το χείλος του eppendorf. Εφαρμόζεται το καπάκι και γίνεται φυγοκέντρωση στα 6000 \times g για 1 min. Τοποθέτηση του QIAamp spin column σε καθαρό eppendorf των 2 mL.
7. Ανοίγεται το spin column και επαναλαμβάνεται το βήμα 6.
8. Προσθήκη 500 μL του διαλύματος AW1 στο spin column. Κλείσιμο και φυγοκέντρωση για 1 min στα 6000 \times g. Μεταφορά spin column σε καθαρό eppendorf των 2 mL.
9. Προσθήκη 500 μL του διαλύματος AW2 στο spin column. Κλείσιμο και φυγοκέντρωση για 3 min στα 14000 \times g. Μεταφορά spin column σε καθαρό eppendorf των 2 mL.
10. Προαιρετικό: τοποθέτηση του spin column σε νέο eppendorf των 2 mL.

Τοποθέτηση του spin column σε καθαρό eppendorf των 1,5 mL. Προσθήκη 60 μL από το διάλυμα AVE σε θερμοκρασία δωματίου. Επώση σε θερμοκρασία δωματίου

για 1 min. Φυγοκέντρωση για 1 min στα 6000 x g. Μεταφορά spin column σε καθαρό eppendorf.

4.5. Φωτομέτρηση απομονωμένου γενετικού υλικού

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του απομονωμένου γενετικού υλικού υπολογίζονται φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA ή RNA υπολογίζεται με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα ($O.D._{260}$)=1 αντιστοιχεί σε 50 $\mu\text{g/mL}$ δίκλωνου DNA, 40 $\mu\text{g/mL}$ μονόκλωνου DNA και RNA και περίπου σε 20 $\mu\text{g/mL}$ μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η καθαρότητα του διαλύματος DNA προσδιορίζεται από το λόγο $O.D._{260} / O.D._{280}$ και θεωρείται καθαρό όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη του 1,6.

4.6. Επιλογή εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Γενικά, η επιλογή των εκκινητών ακολουθεί τους εξής κανόνες:

- Το μήκος των εκκινητών περιλαμβάνει 20-30 νουκλεοτίδια
- Αποφυγή επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών
- Προτιμούνται εκκινητές μη συμπληρωματικοί μεταξύ τους
- Αποφεύγονται εκκινητές με αλληλοεπικάλυψη στο 3' άκρο

Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν με βάση την πιο πρόσφατη βιβλιογραφία εφαρμογής της μεθόδου της PCR και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν σε αυτήν. Η επιλογή των εκκινητών συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας Γ.4.1: Εκκινητές (Pina et al., 1998)

Εκκινητής	Αντίδραση	Αλληλουχία εκκινητή	Ιός προς ανίχνευση	Μέγεθος προϊόντος
Ent1	RT-PCR	5'>CGGTACSSTTTGTACCGCCTGT<3'	Εντεροϊοί	540bp
Ent2	RT-PCR	5'>ATTGTCACCATAAGCAGCCA<3'	Εντεροϊοί	540bp
NEnt1	N-RTPCR	5'>TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTA<3'	Εντεροϊοί	123bp
NEnt2	N-RTPCR	5'>GAAACACGGACACCCAAAGTA<3'	Εντεροϊοί	123bp
HexA	PCR	5'>GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC<3'	Αδενοϊοί	301bp
HexB	PCR	5'>CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT<3'	Αδενοϊοί	301bp
NHexA	N-PCR	5'>GCTGCCACCGAGACGTACTTCAGC<3'	Αδενοϊοί	143bp
NHexB	N-PCR	5'>TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC<3'	Αδενοϊοί	143bp

4.7. Πρωτόκολλο PCR για αδενοϊούς (Pina et al. 1998, Puig et al., 1993)

Απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μίγμα αντίδρασης PCR:

Για την απλή PCR των αδενοϊών, η συγκέντρωση των primers είναι 0,08 μ M (Pina et al., 1998).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 40 μ L και η σύσταση του μίγματος έχει ως εξής:

Εκκινητής HexA (0,08 μ M)

Εκκινητής HexB (0,08 μ M)

dNTPs (25 μ M)

Taq πολυμεράση (5U/ μ L)

MgCl₂ (1,5 mM)

Σε κάθε μίγμα περιέχονται 3 mL δείγματος.

Πρόγραμμα PCR:

1. T= 94°C για t = 4 min
 2. T= 92°C για t = 90 sec
 - T= 55°C για t = 90 sec
 - T= 72°C για t = 2 min
- } 35 cycles

3. $T = 72^{\circ}\text{C}$ για $t = 10 \text{ min}$

Nested- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (n-PCR)

Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επαναλαμβάνεται ακριβώς όπως παραπάνω, αλλά σαν δείγμα λαμβάνεται 1 μL από τα προϊόντα της απλής PCR. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν ένα μικρότερο τμήμα του προϊόντος της πρώτης PCR. Η συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0,16 μM (Pina et al., 1998).

4.8. Πρωτόκολλο PCR για εντεροϊούς

Για του εντεροϊούς, πριν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, απαιτείται η σύνθεση cDNA από RNA που έχει ήδη απομονωθεί.

Σύνθεση cDNA εντεροϊών- αντίστροφη μεταγραφή

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιείται ο primer Ent2 σε συγκέντρωση 2,5 μM (Puig et al., 1993) σε διάλυμα συνολικού τελικού όγκου 10 μL . Το μίγμα της αντίδρασης έχει ως εξής:

Εκκινητής Ent2 (2,5 μM)

Master Mix (1x)

dNTPs (200 μM)

MgCl_2 (2,5 mM)

Σε κάθε δείγμα περιέχονται 5 μL δείγματος.

- Το παραπάνω μίγμα επωάζεται για 5 min στους 95°C .
- Τοποθετείται για 5 min στον πάγο
- Προστίθενται 0,5 μL RNAsin inhibitor
- Προστίθενται 0,5 μL DTT (0,2 M)
- Προστίθεται 1 μL reverse transcriptase (50U/ μL)

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή της PCR και επιλέγεται το πρόγραμμα «synthesis» που περιλαμβάνει τα στάδια:

- Επώαση στους 42°C για 30 min

- Επώαση στους 95°C για 5 min
- Διατήρηση σε θερμοκρασία ψυγείου

RT- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για εντεροϊούς

Μίγμα αντίδρασης PCR:

Για την RT-PCR των αδενοϊών, η συγκέντρωση των primers είναι 0,15 μM (Pina et al., 1998).

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μL και η σύσταση του μίγματος έχει ως εξής:

Εκκινητής Ent1 (0,15 μM)

Εκκινητής Ent2 (0,15 μM)

Master Mix (1x)

dNTPs (200 μM)

Taq πολυμεράση (2U/ μL)

MgCl_2 (1,5 μM)

Σε κάθε μίγμα προστίθενται 10 μL δείγματος.

Πρόγραμμα RT-PCR:

1. $T = 94^\circ\text{C}$ για $t = 4 \text{ min}$
 2. $T = 92^\circ\text{C}$ για $t = 90 \text{ sec}$
 $T = 55^\circ\text{C}$ για $t = 90 \text{ sec}$
 $T = 72^\circ\text{C}$ για $t = 2 \text{ min}$
 3. $T = 72^\circ\text{C}$ για $t = 10 \text{ min}$
- } 35 cycles

Nested- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (n-RTPCR)

Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επαναλαμβάνεται ακριβώς όπως παραπάνω, αλλά σαν δείγμα λαμβάνεται 1 μL από τα προϊόντα της απλής RT-PCR. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν ένα μικρότερο τμήμα του προϊόντος της πρώτης RT-PCR. Η συγκέντρωση των εκκινητών είναι 0,16 μM (Pina et al., 1998).

Συγκεκριμένα, η σύσταση του μίγματος της n-RTPCR για τους εντεροϊούς είναι η ακόλουθη:

Εκκινητής NEnt1 (0,16 μ M)

Εκκινητής NEnt2 (0,16 μ M)

Master Mix (1x)

dNTPs (200 μ M)

Taq πολυμεράση (2U/ μ L)

MgCl₂ (1,5 μ M)

Ο τελικός όγκος του μίγματος είναι 50 μ L και περιέχονται 10 μ L δείγματος.

4.9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR γίνεται σε πήκτωμα αгарόζης, συγκέντρωσης 1,5% w/v (Χατζηιωάννου, 2002, www.scribd.com). Τα προϊόντα της PCR έγιναν ορατά κατόπιν έκθεσής τους σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις ακόλουθες παραγράφους γίνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε σε δείγματα λυμάτων από βιολογικούς καθαρισμούς. Τα δείγματα που αναλύθηκαν συμβολίζονται ως εξής:

1. S1= είσοδος βιολογικού καθαρισμού (πριν την εσχάρωση)
2. S2= μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση
3. S3= μετά τη χλωρίωση
4. S4= έξοδος

Η καταμέτρηση των βακτηριακών δεικτών γίνεται σε αποικίες CFU/100mL, ενώ για τους βακτηριοφάγους καταμετρώνται οι σχηματιζόμενες πλάκες PFU/100mL.

1. Μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων

Οι τιμές των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (Total Coliforms: T.C., Fecal Coliforms: F.C., Fecal Streptococci: F.S., *Clostridium perfringens*) προσδιορίστηκαν με την τεχνική της διήθησης μέσω μεμβράνης.

Οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα σε τρεις ιδιαίτερα σημαντικούς σταθμούς την Βόρειας Κρήτης, στο Βιολογικό Καθαρισμό Ηρακλείου, Χανίων και Νέας Κυδωνίας (ή Βορείου Άξονα Χανίων). Και στις τρεις επιλεγμένες εγκαταστάσεις η απολύμανση πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χλωρίωσης. Δείγματα ελήφθησαν στην είσοδο και πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία, μετά τη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, μετά τη χλωρίωση και στο σημείο απόρριψης για τους δύο σταθμούς του νομού Χανίων. Προς ελαχιστοποίηση πιθανότητας σφάλματος και για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο να γίνεται η δειγματοληψία από το ίδιο σημείο κάθε φορά.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών ανά σταθμό και περίοδο δειγματοληψίας.

Πίνακας Δ.1.1: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Χανίων (ΔΕΥΑΧ) όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση, S4= έξοδος

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Δείγμα	T.C. (CFU/ 100mL)	F.C. (CFU/ 100mL)	F.S. (CFU/ 100mL)	<i>C. perfringens</i> (CFU/ 100mL)
22.02.2012	S1	$2,6 \times 10^6$	4×10^6	$4,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$
	S2	$2,05 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$1,95 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$
	S3	2	4	28	10
	S4	152	140	54	17
06.03.2012	S1	$2,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	8×10^4
	S2	$4,5 \times 10^5$	5×10^3	5×10^3	0
	S3	2	1	12	0
	S4	4	1	4	0
08.05.2012	S1	$2,4 \times 10^6$	2×10^6	$1,32 \times 10^6$	4×10^4
	S2	$1,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	3×10^4	0
	S3	10	4	17	1
	S4	0	4	13	6
13.06.2012	S1	$2,8 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	0
	S2	5×10^4	5×10^4	1×10^4	0
	S3	0	1	4	0
	S4	3	2	0	0
27.09.2012	S1	$9,6 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$	8×10^4
	S2	2×10^4	2×10^4	2×10^4	0
	S3	43	26	12	0
	S4	4	1	0	1
28.11.2012	S1	$3,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	0
	S2	5×10^3	1×10^4	5×10^3	0
	S3	30	15	15	0
	S4	9	5	21	2
13.02.2013	S1	$5,44 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	$3,84 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
	S2	$5,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	6×10^4	0
	S3	0	2	6	0
	S4	12	1	1	0

Πίνακας Δ.1.2: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Νέας Κυδωνίας
όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση, S4= έξοδος

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Δείγμα	T.C. (CFU/mL)	F.C. (CFU/mL)	F.S. (CFU/mL)	<i>C. perfringens</i> (CFU/mL)
07.03.2012	S1	$1,8 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	4×10^4
	S2	9×10^4	5×10^4	2×10^4	5×10^3
	S3	10	0	1	1
	S4	0	0	0	2
19.03.2012	S1	$3,2 \times 10^6$	$1,29 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5$	1×10^4
	S2	$1,15 \times 10^5$	0	6×10^4	0
	S3	60	9	6	10
	S4	61	51	14	2
15.05.2012	S1	$7,2 \times 10^6$	$3,52 \times 10^6$	$3,56 \times 10^6$	4×10^4
	S2	$1,45 \times 10^5$	5×10^3	9×10^4	5×10^4
	S3	0	0	1	1
	S4	0	0	0	0
22.06.2012	S1	$1,72 \times 10^6$	$4,44 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
	S2	9×10^4	5×10^4	1×10^4	5×10^3
	S3	0	0	0	0
	S4	0	1	5	0
04.10.2012	S1	$2,72 \times 10^6$	$7,64 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	8×10^4
	S2	7×10^5	2×10^4	1×10^4	0
	S3	0	1	0	0
	S4	5	0	2	1
26.11.2012	S1	$4,48 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$	0
	S2	$1,3 \times 10^5$	3×10^4	$2,5 \times 10^4$	0
	S3	120	66	35	0
	S4	0	0	0	0
13.02.2013	S1	$7,52 \times 10^6$	$1,72 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	8×10^4
	S2	$6,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	1×10^3	0
	S3	>300	>300	173	0
	S4	0	0	0	0

Πίνακας Δ.1.3: Αποτελέσματα δειγματοληψιών βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου (ΔΕΥΑΗ), όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια, S3= μετά τη χλωρίωση

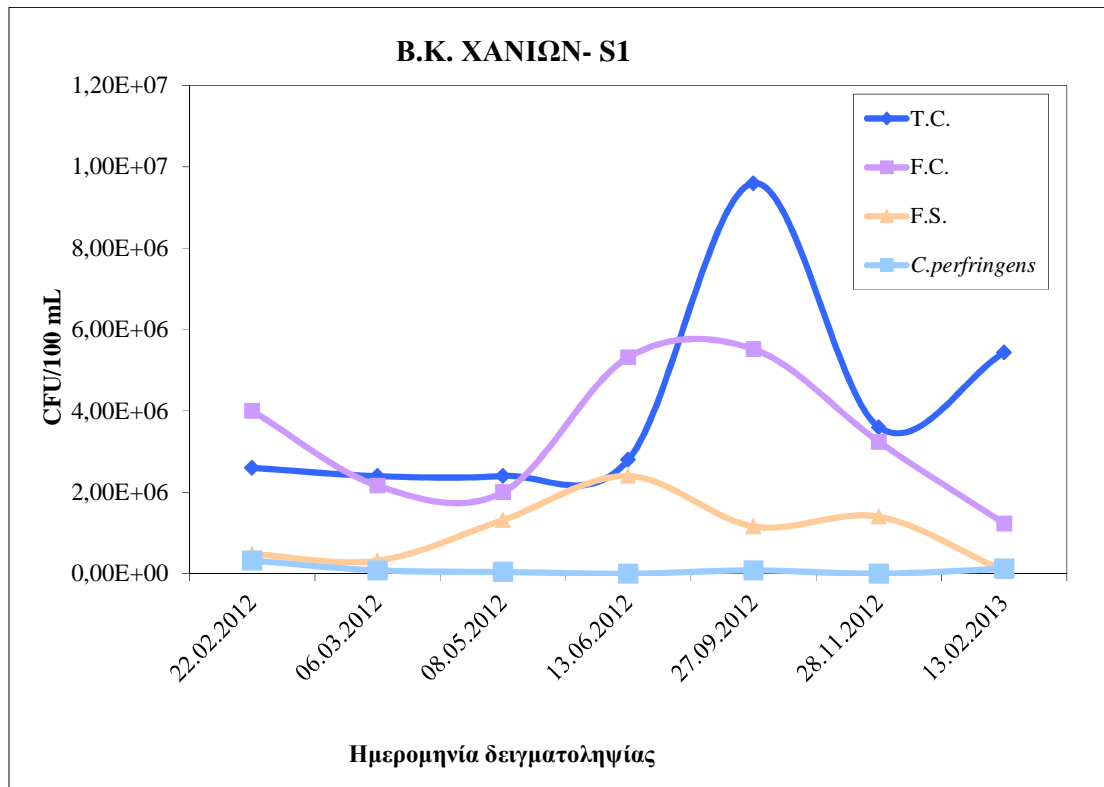
Ημερομηνία δειγματοληψίας	Δείγμα	T.C. (CFU/mL)	F.C. (CFU/mL)	F.S. (CFU/mL)	<i>C. perfringens</i> (CFU/mL)
27.04.2012	S1	2,8 x 10 ⁶	1,99 x 10 ⁶	6,8 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
	S2	1,24 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	5 x 10 ³
	S3	60	10	47	7
21.05.2012	S1	6,4 x 10 ⁶	4,96 x 10 ⁶	2,24 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁵
	S2	4,05 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	2,55 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁴
	S3	3	16	17	0
19.6.2012	S1	2,28 x 10 ⁶	2,88 x 10 ⁶	1,92 x 10 ⁶	4 x 10 ⁴
	S2	1,9 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	8 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴
	S3	0	0	0	9
24.09.2012	S1	2,88 x 10 ⁶	5,96 x 10 ⁶	2,28 x 10 ⁶	4 x 10 ⁴
	S2	6,5 x 10 ⁵	6 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	5 x 10 ³
	S3	100	200	510	5
30.11.2012	S1	5,28 x 10 ⁶	4,16 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	0
	S2	5,5 x 10 ⁴	2 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	0
	S3	0	1	7	0
27.02.2013	S1	8,16 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	4 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵
	S2	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	2 x 10 ³	0
	S3	27	2	0	14

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες, κατά τους χειμερινούς μήνες στις αρχές του 2012 λαμβάνονται οι χαμηλότερες τιμές μικροβιακής φόρτισης για όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας. Αυτό το φαινόμενο είναι αναμενόμενο, καθώς υπήρχαν συνεχόμενες και μεγάλης διάρκειας βροχοπτώσεις σε όλο το βόρειο τμήμα της Κρήτης. Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ για κάθε δειγματοληψία πρέπει να έχουν προηγηθεί τρεις ημέρες χωρίς βροχόπτωση, αυτό δεν ήταν εφικτό λόγω των καιρικών συνθηκών που επικρατούσαν.

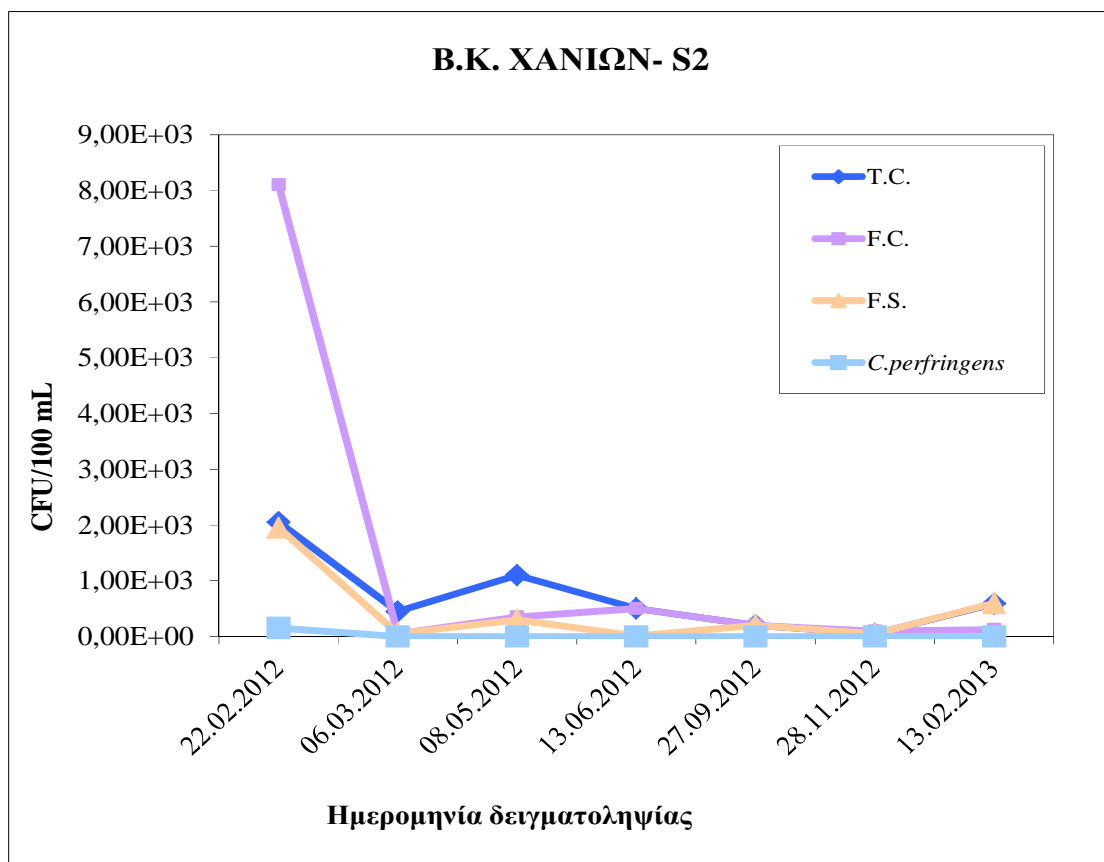
Από τον Απρίλιο και έπειτα οι βροχοπτώσεις εξασθένησαν σημαντικά. Αυτό δικαιολογεί και την απότομη άνοδο των μικροβιολογικών δεικτών στους σταθμούς

της δειγματοληψίας. Το φθινόπωρο του ίδιου έτους παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες και μέχρι και το Δεκέμβριο δεν είχαν αρχίσει οι βροχοπτώσεις. Ο Σεπτέμβριος αναμενόταν να είναι από τους πιο επιβαρυνμένους μήνες καθώς έχει μόλις περάσει το peak της τουριστικής περιόδου, που ειδικά για το σταθμό της ΔΕΥΑΒΑ σημαίνει έως και διπλασιασμό του πληθυσμού που εξυπηρετείται από την εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού του δήμου Νέας Κυδωνίας. Μη αναμενόμενες είναι οι επιβαρυνμένες τιμές κατά το μήνα Νοέμβριο, οι οποίες, όμως, δικαιολογούνται από τα ακραία φαινόμενα καλοκαιρίας για την εποχή και την επιμήκυνση της τουριστικής περιόδου.

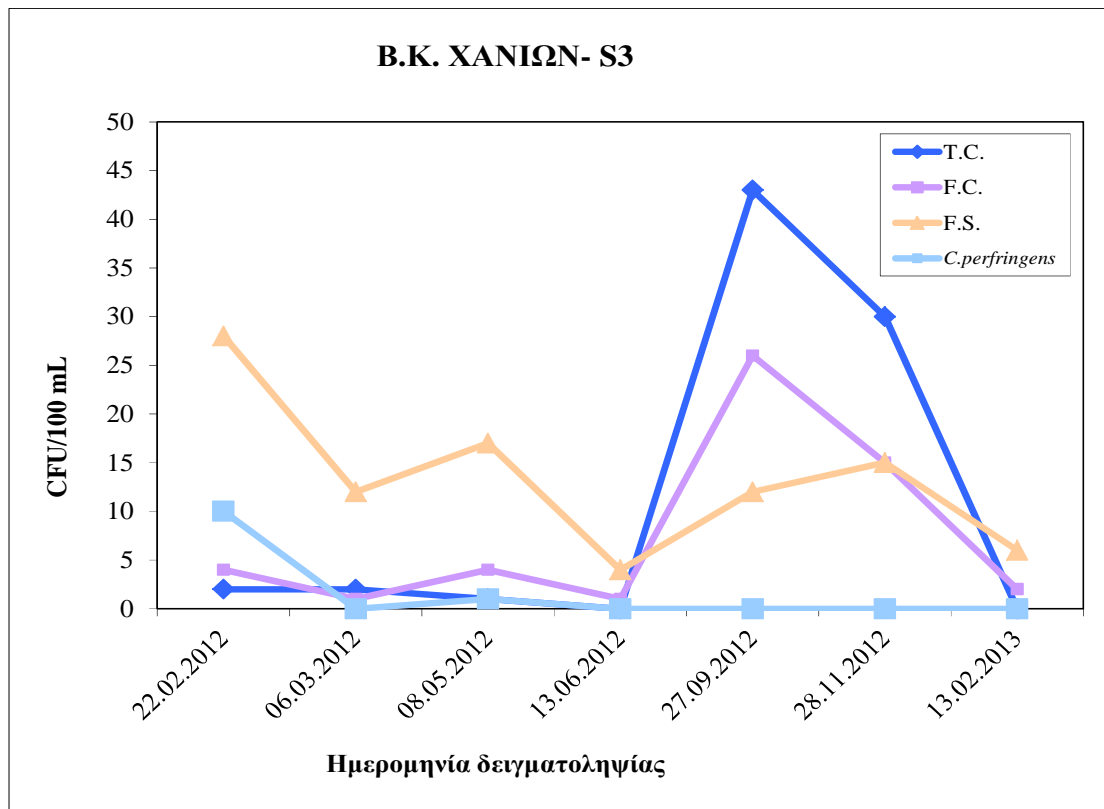
Για τη ΔΕΥΑΧ η μεγαλύτερη φόρτιση παρατηρήθηκε το Σεπτέμβριο του 2012, με το δείκτη ολικών κολοβακτηριοειδών να μετράται στην είσοδο στις $9,6 \times 10^6$ CFU/100mL και το δείκτη κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών στις $5,5 \times 10^6$ CFU/100mL στην είσοδο του βιολογικού καθαρισμού. Την ίδια περίοδο μετά το στάδιο της χλωρίωσης οι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης T.C. και F.C. είχαν συγκεντρώσεις 43CFU/100mL και 26 CFU/100mL, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για την έξοδο του σταθμού Χανίων οι υψηλότερες τιμές παρατηρούνται κατά τους χειμερινούς μήνες. Συγκεκριμένα το Νοέμβριο οι τιμές των δεικτών T.C., F.C., F.S. και *Clostridium perfringens* είναι 9 CFU/100mL, 5 CFU/100mL, 21 CFU/100mL και 2 CFU/100mL αντίστοιχα. Η χλωρίωση της ΔΕΥΑΧ εμφανίζεται ιδιαίτερα αποτελεσματική, καθώς με μόνη εξαίρεση τη μέτρηση που έγινε στις 27/9, υπάρχει μείωση μεγαλύτερη του 98% σε σχέση με το αρχικό φορτίο που εισέρχεται στην εγκατάσταση βιολογικής επεξεργασίας. Σημαντική μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών εμφανίζεται και στη δευτεροβάθμια, η οποία για τη ΔΕΥΑΧ ειδικότερα φτάνει το 99,7% για το μήνα Νοέμβριο για το δείκτη των ολικών κολοβακτηριοειδών. Η ελάχιστη αποφόρτιση παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια του Μαΐου, η οποία όμως και πάλι κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, φτάνοντας το 91% του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού.



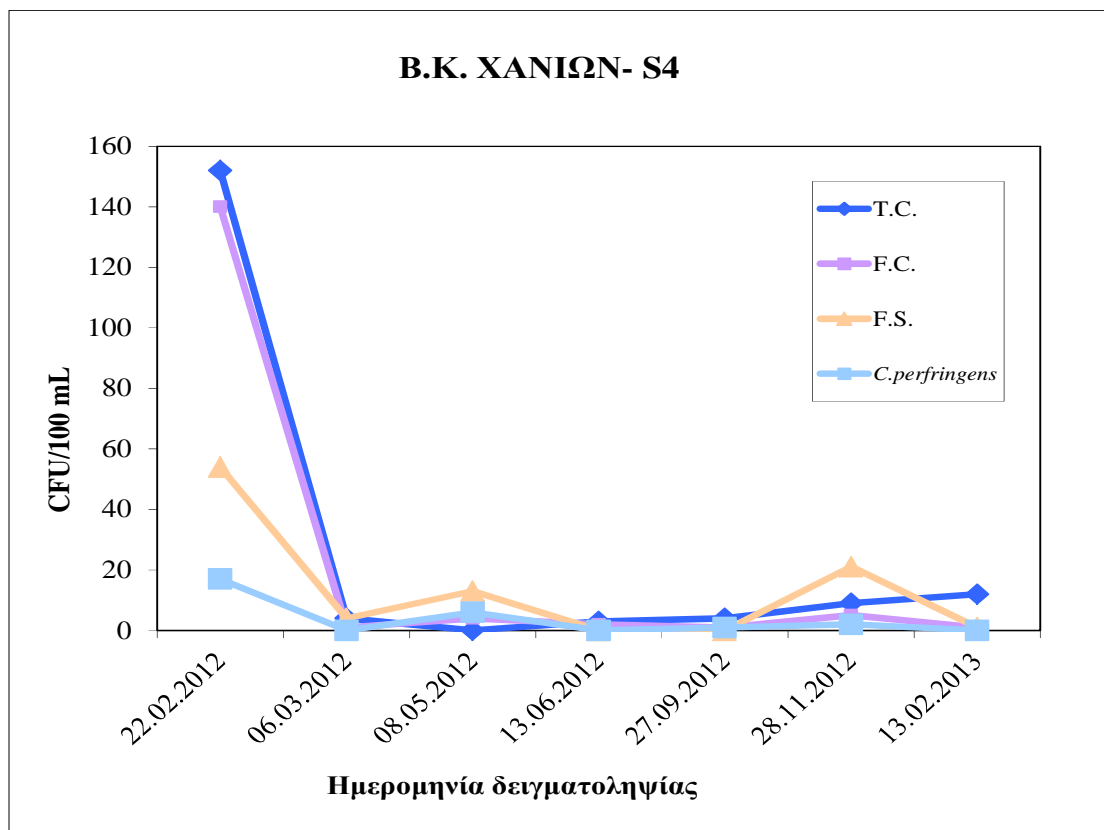
Σχήμα Δ.1.α: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Χανίων



Σχήμα Δ.1.β: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη χλωρίωση του σταθμού Χανίων



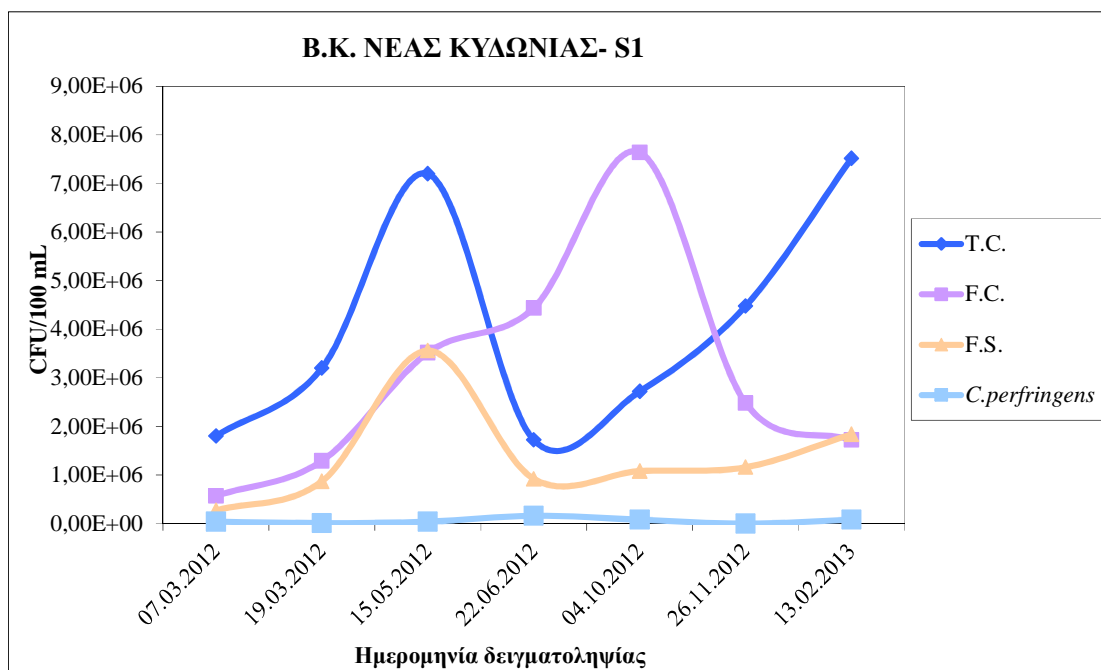
Σχήμα Δ.Ι.γ: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Χανίων



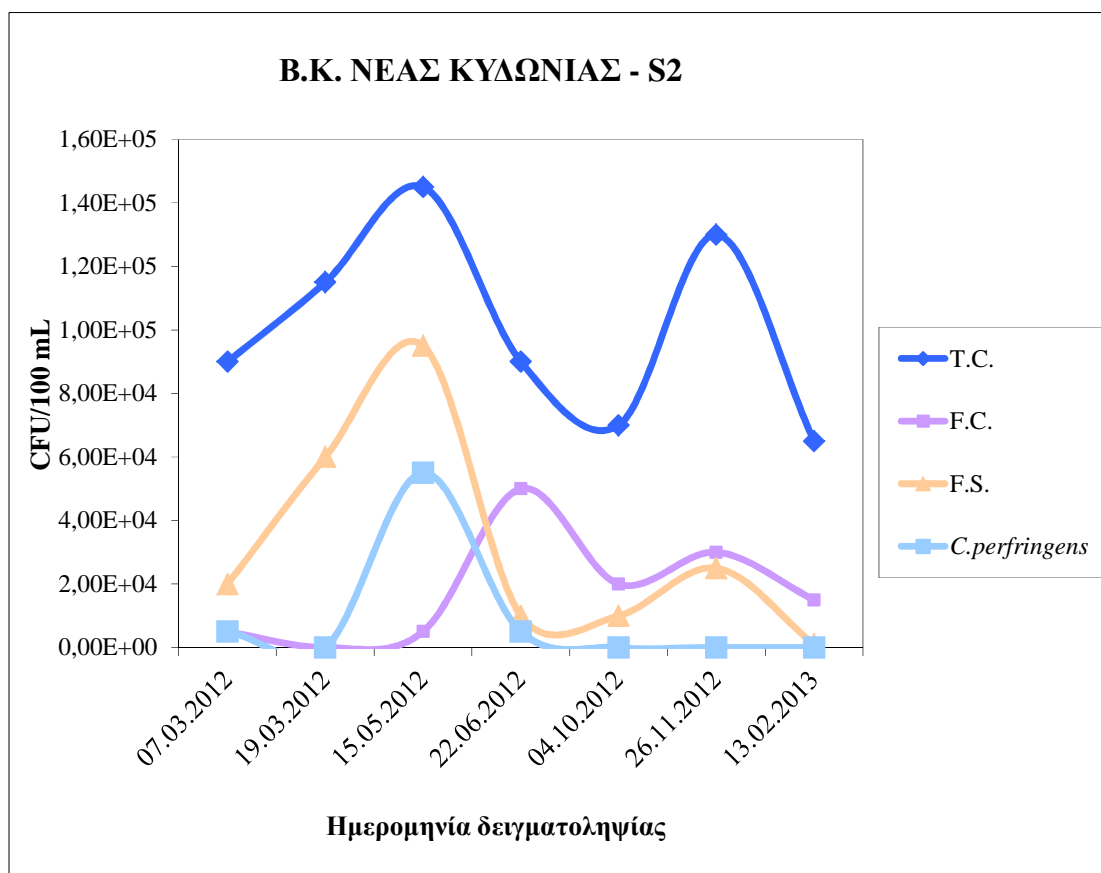
Σχήμα Δ.Ι.δ: Μικροβιολογικοί δείκτες στην έξοδο του σταθμού Χανίων

Στη ΔΕΥΑΒΑ διαπιστώνεται μεγάλη αύξηση ανάμεσα στις μετρήσεις 7/3 και 19/3. Πιθανόν η μέτρηση στις 7/3 να περιέχει σφάλμα λόγω των έντονων βροχοπτώσεων που είχαν προηγηθεί, ενώ στις 19/3 είχαν παρέλθει πάνω από τρεις ημέρες χωρίς βροχές. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο δείκτης των ολικών κολοβακτηριοειδών αυξήθηκε από τις $1,8 \times 10^6$ CFU/100mL στις $3,2 \times 10^6$ CFU/100mL. Αυξημένες τιμές λαμβάνονται στις 4/10 και 26/11. Αρχές Οκτώβρη είναι αναμενόμενη η αυξητική τάση, καθώς δεν είχαν αρχίσει οι βροχοπτώσεις και στις μετρήσεις έχει αντίκτυπο η φόρτιση όλων των θερινών μηνών. Οι αυξημένες τιμές του Νοεμβρίου πιθανώς δικαιολογούνται από την έλλειψη βροχοπτώσεων και την παρατεταμένη τουριστική σαιζόν στην περιοχή του Γερανίου και του Πλατανιά έως τις αρχές του ίδιου μήνα. Ο Μάιος εμφανίζεται ως ο πιο φορτισμένος μήνας για την εγκατάσταση της ΔΕΥΑΒΑ με το δείκτη των ολικών κολοβακτηριοειδών να δίνει $7,2 \times 10^6$ CFU/100 mL, των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών $3,52 \times 10^6$ CFU/100mL και για το δείκτη εντερόκοκκων $3,56 \times 10^6$ CFU/100mL. Παράλληλα, ο δείκτης *Clostridium perfringens* στην είσοδο ήταν 4×10^4 CFU/100mL. Κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών παρατηρείται αυξητική τάση στους δείκτες μετά τη χλωρίωση. Στις 26/11 λαμβάνεται μέτρηση $4,48 \times 10^6$ CFU/100mL στο δείκτη των ολικών κολοβακτηριοειδών, $2,48 \times 10^6$ CFU/100mL για το δείκτη κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών και $1,16 \times 10^6$ CFU/100mL για το δείκτη των εντερόκοκκων. Παρόλα αυτά, ο δείκτης για το *Clostridium perfringens* είναι μηδενικός. Η δευτεροβάθμια καθίζηση στο σταθμό του Βορείου Άξονα Χανίων απομακρύνει από 95 έως 98% του αρχικού φορτίου εισόδου. Η χλωρίωση της ΔΕΥΑΒΑ εμφανίζεται ιδιαίτερα αποτελεσματική, καθώς, με μόνη εξαίρεση τη μέτρηση της 26^{ης} Νοεμβρίου και της 13^{ης} Φεβρουαρίου, εμφανίζεται μείωση του πληθυσμού των παθογόνων κατά 99,99% σε σχέση με την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού. Στις 26/11 ο πληθυσμός μειώνεται κατά 98,66%. Σε γενικές γραμμές, η θαλάσσια περιοχή απόρριψης της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Νέας Κυδωνίας, δίνει χαμηλές μετρήσεις μικροβιολογικών δεικτών. Χαρακτηριστικό είναι ότι κατά το μήνα Οκτώβριο παρουσιάζονται μόλις 5 CFU/100mL ολικών κολοβακτηριοειδών και μία CFU/100mL *Clostridium perfringens*, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες είναι μηδενικοί, ενώ πρόκειται για μία κατεξοχήν τουριστική περιοχή. Στις 19/3 λαμβάνονται αυξημένες τιμές, οι οποίες κατά πάσα πιθανότητα δε συνδέονται άμεσα με το βιολογικό καθαρισμό, καθώς οι τιμές της χλωρίωσης της δε δικαιολογούν την εμφάνιση 61 CFU/100mL, 51 CFU/100mL, 14 CFU/100mL και 2 CFU/100mL αποικιών των

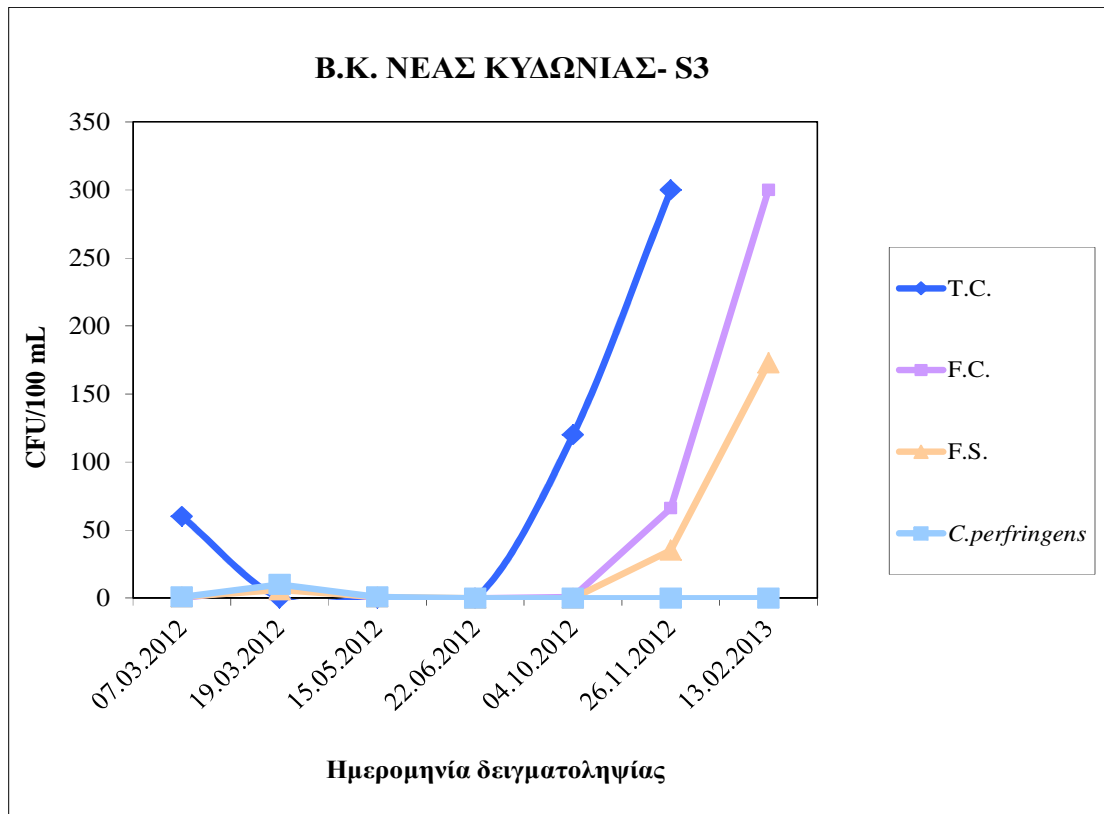
δεικτών ολικών κολοβακτηριοειδών, κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών, εντερόκοκκων και *Clostridium perfringens* αντίστοιχα.



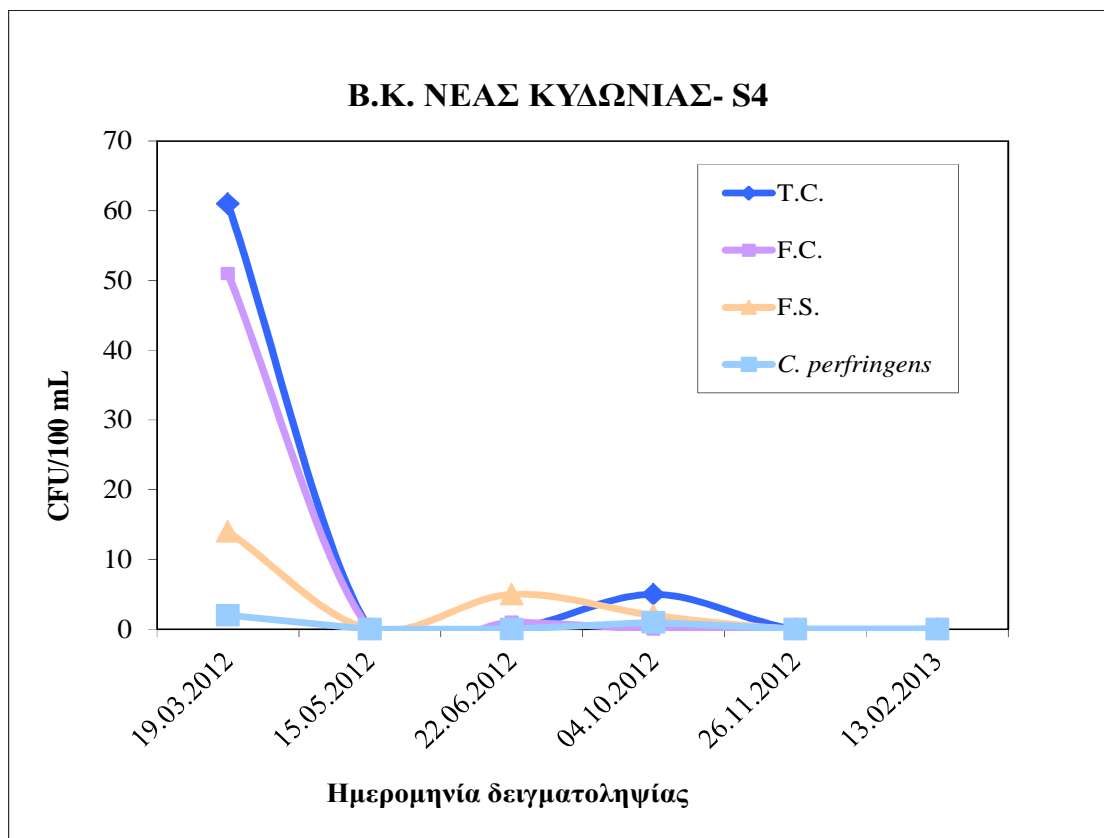
Σχήμα Δ.1.ε: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Νέας Κυδωνίας



Σχήμα Δ.1.στ: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση του σταθμού Νέας Κυδωνίας

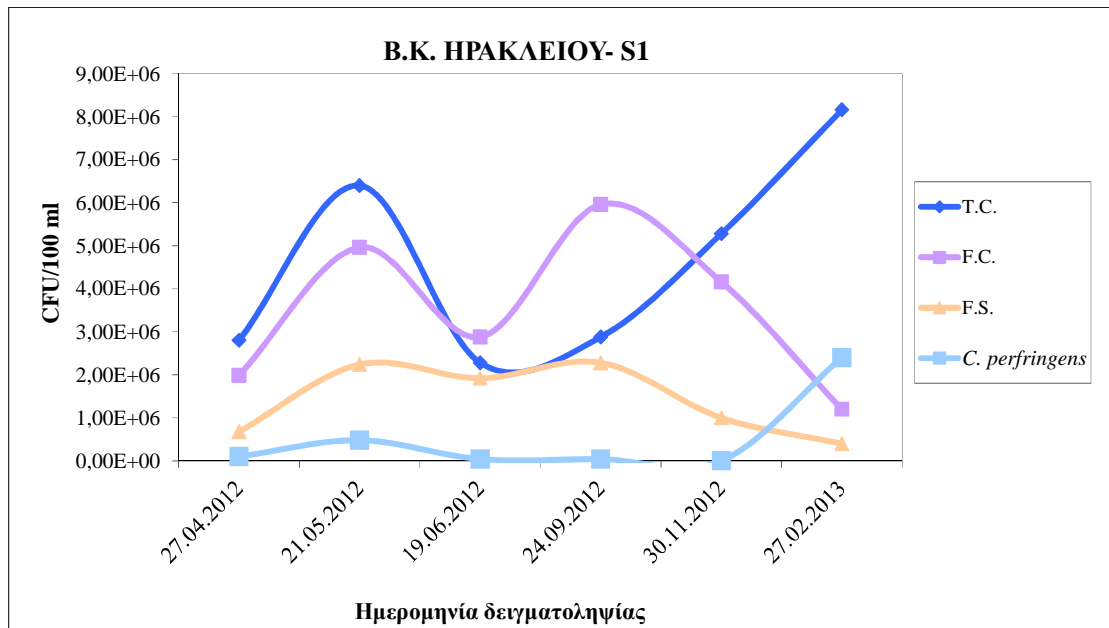


Σχήμα Δ.Ι.ζ: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Νέας Κυδωνίας

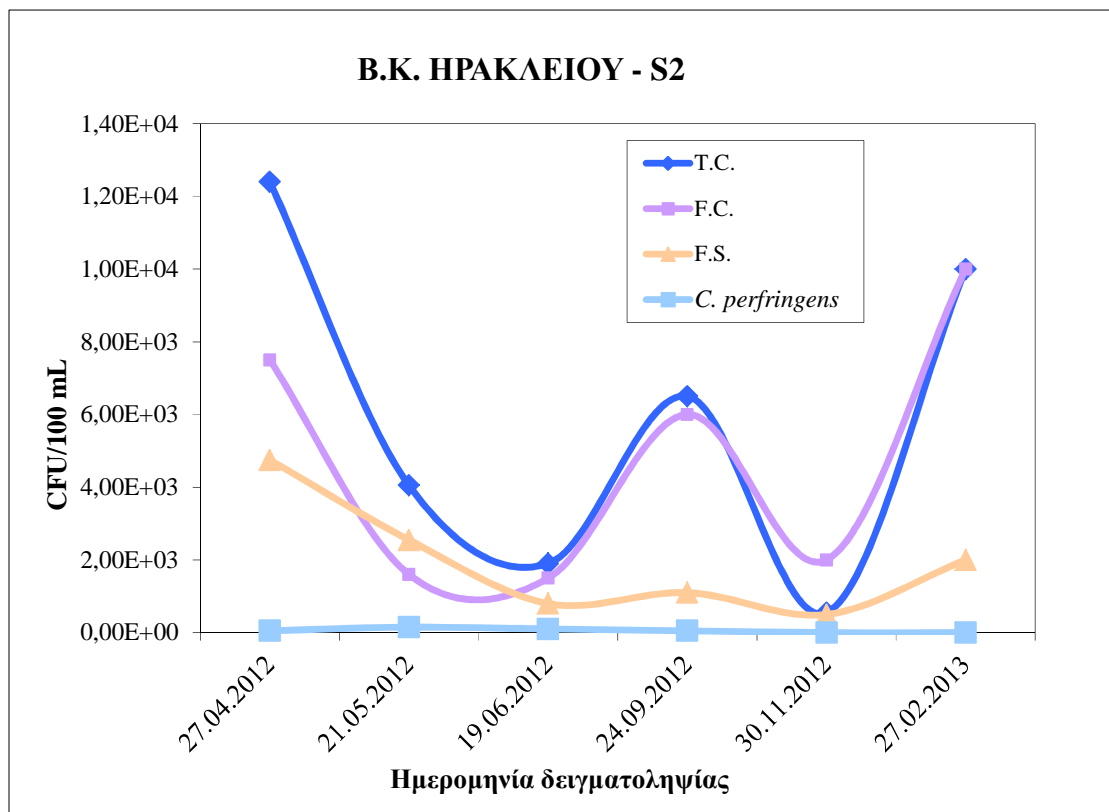


Σχήμα Δ.Ι.θ: Μικροβιολογικοί δείκτες στην έξοδο του σταθμού Νέας Κυδωνίας

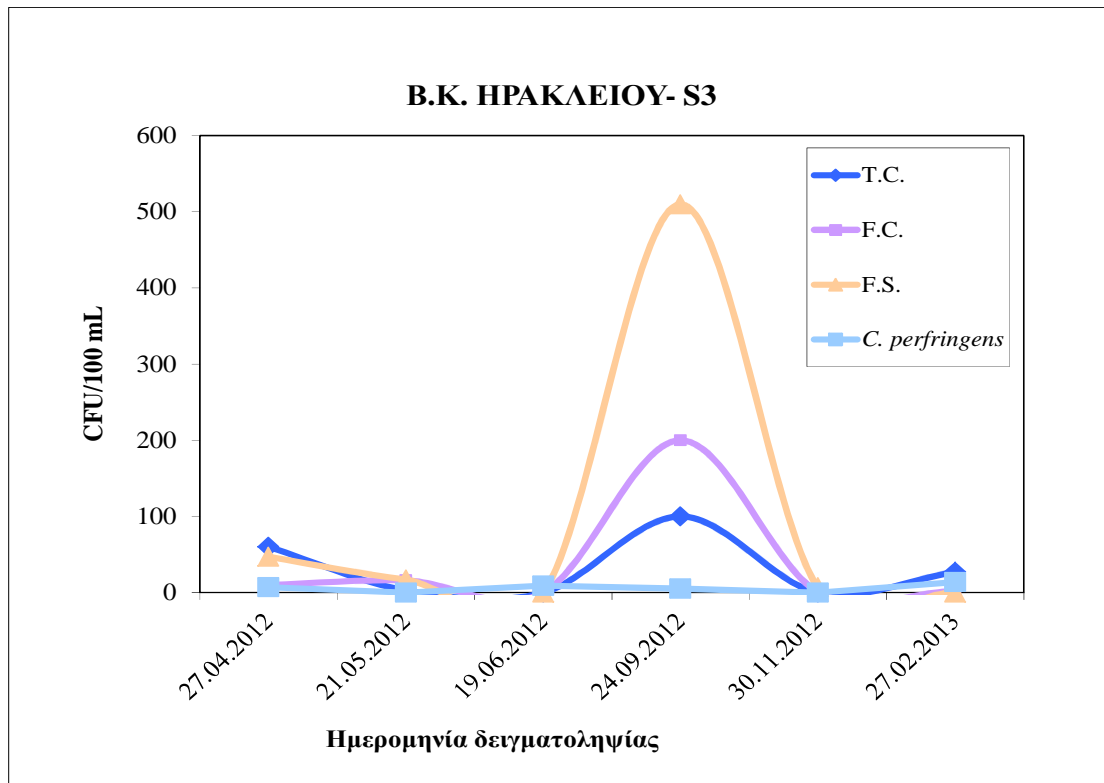
Ο βιολογικός καθαρισμός Ηρακλείου είναι ο υπό εξέταση σταθμός που δέχεται το μεγαλύτερο όγκο αποβλήτων προς επεξεργασία. Γενικά, το προφίλ του ρεύματος εισροής μοιάζει αρκετά με αυτό της ΔΕΥΑΒΑ. Οι τιμές για τους δύο αυτούς σταθμούς αυξάνονται παράλληλα, όπως φαίνεται από τις μετρήσεις της ίδιας περιόδου. Και στην εγκατάσταση του Ηρακλείου εμφανίζεται μία έντονα αυξητική τάση το Μάιο, στην έναρξη, ουσιαστικά της τουριστικής περιόδου. Συγκεκριμένα για το ρεύμα εισόδου, οι τιμές όλων των δεικτών έχουν υπερδιπλασιαστεί σε σχέση με τη μέτρηση του Απριλίου φτάνοντας τις $7,2 \times 10^6$ CFU/100mL, $3,52 \times 10^6$ CFU/100mL, $3,52 \times 10^6$ CFU/100mL και 4×10^6 CFU/100mL για τους δείκτες ολικών κολοβακτηριοειδών, κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών, εντερόκοκκων και *Clostridium perfringens* αντίστοιχα. Στις μετρήσεις Ιουνίου και Οκτωβρίου οι τιμές αυτές μειώνονται, ενώ, όπως συμβαίνει και για τη ΔΕΥΑΒΑ στη Νέα Κυδωνία, οι μέγιστες τιμές λαμβάνονται κατά το μήνα Νοέμβριο. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι και τις ημέρες των δειγματοληψιών, στο Ηράκλειο οι βροχοπτώσεις ήταν ελάχιστες για την εποχή. Το ποσοστό μείωσης των δεικτών των παθογόνων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο σταθμό παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διακύμανση, καθώς στη μέτρηση της 21^{ης} Μαΐου δεν ξεπερνά το 75%, ενώ στη μέτρηση της 30^{ης} Νοεμβρίου, στην οποία μάλιστα παρουσιάζεται το peak της φόρτισης του ρεύματος εισροής το ποσοστό μείωσης των ολικών ξεπερνά το 99%. Η χλωρίωση, ωστόσο, του συγκεκριμένου σταθμού εμφανίζει σταθερή αποτελεσματικότητα με μείωση του πληθυσμού των παθογόνων μικροοργανισμών σταθερά σε υψηλά επίπεδα, με ελάχιστη τιμή του ποσοστού μείωσης 99,6% στη μέτρηση του Σεπτεμβρίου, ενώ σε όλες τις άλλες μετρήσεις η απομάκρυνση είναι πάνω από 99,99%.



Σχήμα Δ.1.1: Μικροβιολογικοί δείκτες στην είσοδο του σταθμού Ηρακλείου



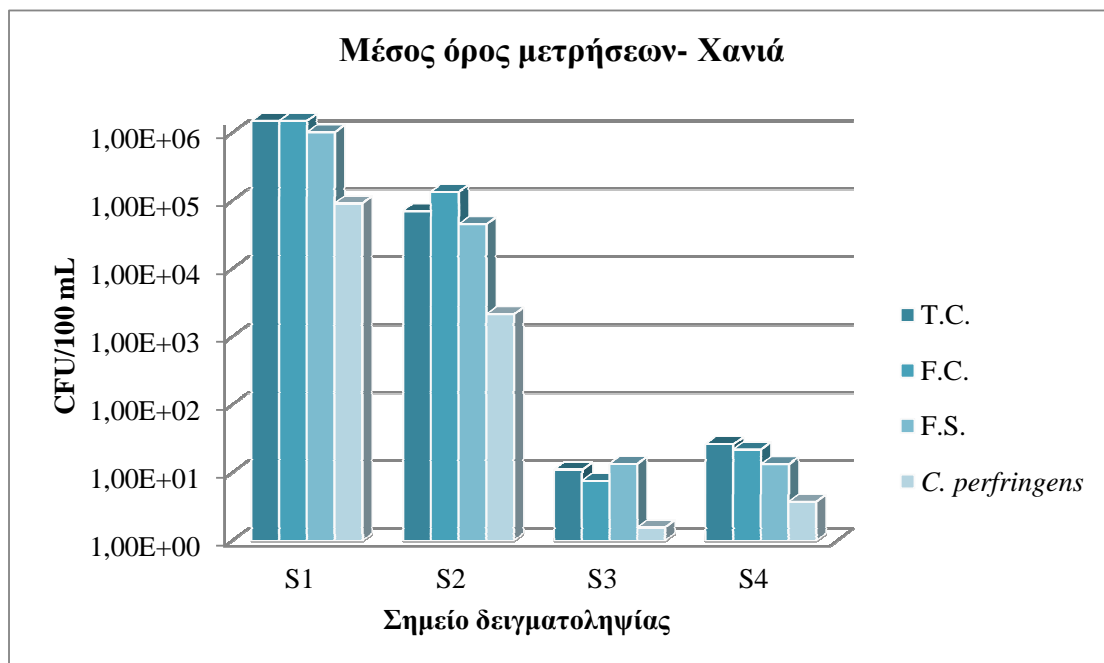
Σχήμα Δ.1.1α: Μικροβιολογικοί δείκτες μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία του σταθμού Ηρακλείου



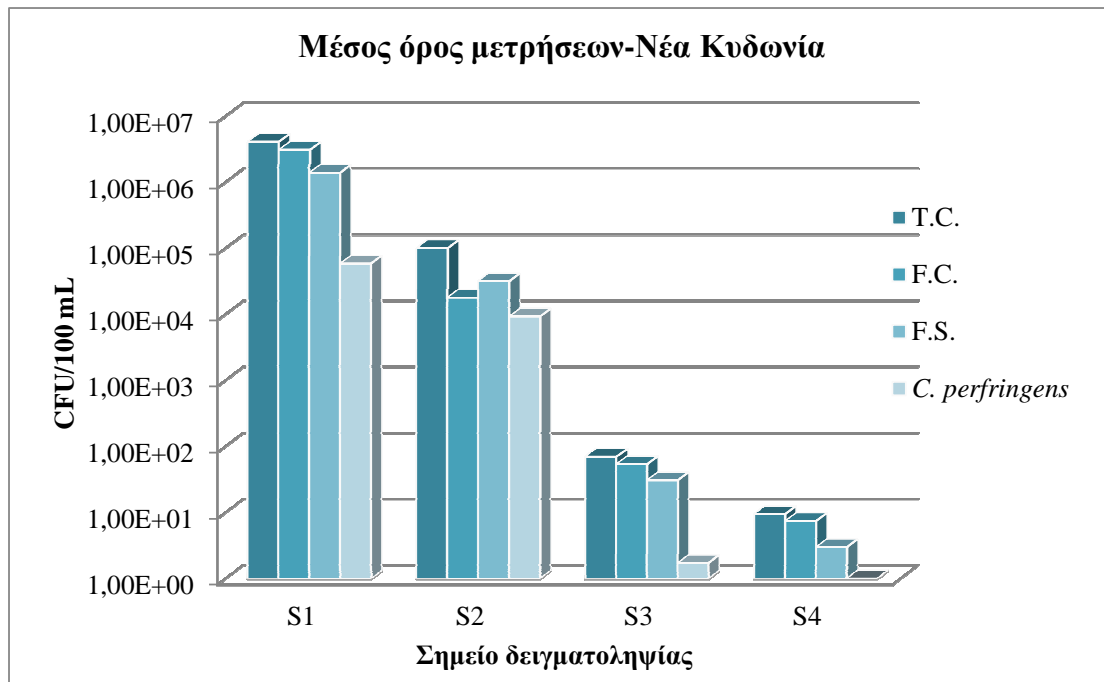
Σχήμα Δ.1.1β: Μικροβιολογικοί δείκτες στη χλωρίωση του σταθμού Ηρακλείου

Από τη σκοπιά των μικροοργανισμών, στο βιολογικό καθαρισμό της ΔΕΥΑΧ, σε μόνιμη βάση στο ρεύμα εισόδου κυριαρχούν οι μικροοργανισμοί των ολικών κολοβακτηριοειδών. Στη μέτρηση του Μαΐου, ωστόσο, ο δείκτης για τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή μειώνεται πολύ στη δευτεροβάθμια καθίζηση και γίνεται ίσος με τον αριθμό που αντιστοιχεί στο δείκτη των ολικών. Ο δείκτης TC εμφανίζεται σταθερά 10% μεγαλύτερος από το δείκτη FC, ενώ στις 27/9 είναι 73% μεγαλύτερος. Ο δείκτης FS παρουσιάζεται αισθητά μικρότερος σε όλες τις δειγματοληψίες, έως και 7 φορές σε σχέση με το δείκτη των ολικών κολοβακτηριοειδών στη δειγματοληψία του Σεπτεμβρίου. Ο μέσος όρος μείωσης του αρχικού φορτίου είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερος από 99,9%. Ο δείκτης FS παρουσιάζεται μεγαλύτερος από το μικροβιολογικό δείκτη των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών FC μόνο για τη ΔΕΥΑΒΑ και συγκεκριμένα στις 15/05, 1,5%. Οι υψηλές μετρήσεις του δείκτη FS δικαιολογούνται και από τη δομή των μικροοργανισμών, καθώς πρόκειται για gram (+) βακτήρια, τα οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε μηχανική καταπόνηση, λόγω του ενισχυμένου στρώματος πεπτιδογλυκάνης που τα περικλείει (Βενιέρη, 2011). Σε όλους τους σταθμούς που ελέγχθηκαν ο δείκτης μόλυνσης ολικών κολοβακτηριοειδών είναι μεγαλύτερος των υπολοίπων. Ο δείκτης του *Clostridium*

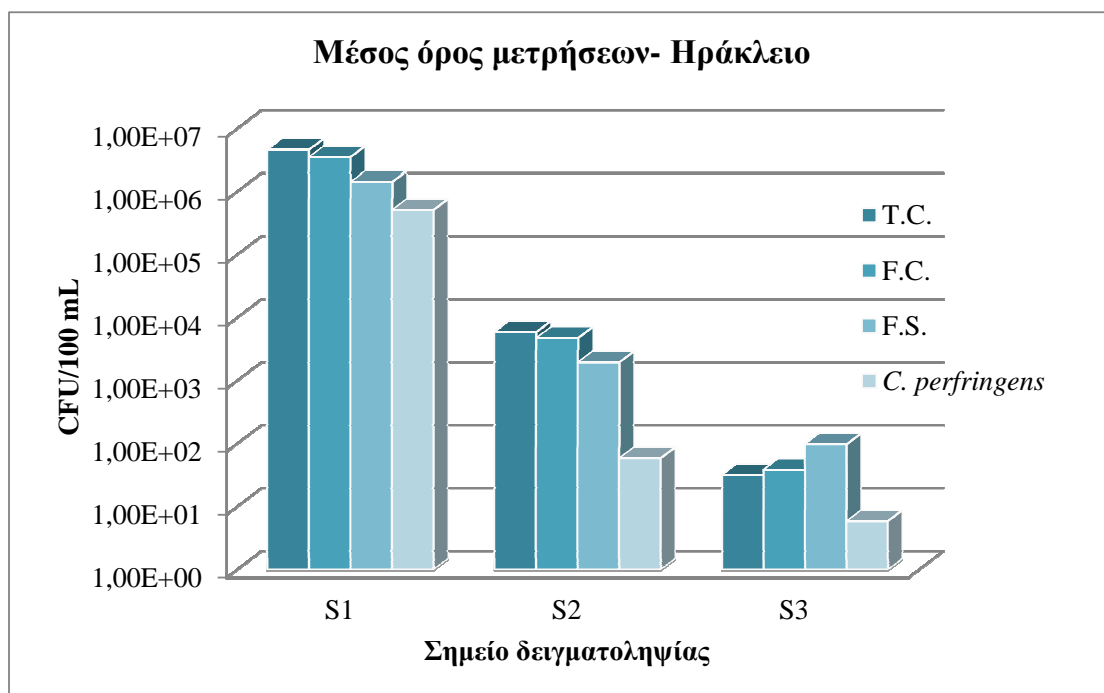
perfringens είναι αυτός που λαμβάνει τις χαμηλότερες τιμές. Το Μάρτιο και το Μάιο ανιχνεύτηκε σε όλες τις δειγματοληψίες που έγιναν, κατά τους θερινούς μήνες η ποσότητα των αποικιών μειώθηκε αισθητά σε όλους τους σταθμούς, ενώ στις δειγματοληψίες του Νοεμβρίου ο δείκτης ήταν μηδενικός σε όλα τα στάδια για όλους τους σταθμούς επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Το *Clostridium perfringens* έχει την πιο έντονη του παρουσία στο σταθμό του Ηρακλείου στη δειγματοληψία Μαΐου. Στις μετρήσεις στις 19/3 για τη ΔΕΥΑΒΑ και 27/4 και 19/6 για τη ΔΕΥΑΗ στη χλωρίωση ο δείκτης μόλυνσης του *Clostridium perfringens* εμφανίζεται πιο υψηλός από το αναμενόμενο, σε σχέση με τις μετρήσεις της εισόδου και της δευτεροβάθμιας καθίζησης του ίδιου δείκτη. Σε όλους τους σταθμούς του Βόρειου Άξονα Κρήτης που εξετάστηκαν ο δείκτης μόλυνσης ολικών κολοβακτηριοειδών κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από τους υπόλοιπους, ακολουθεί ο δείκτης κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών και εντερόκοκκων και τέλος του *Clostridium perfringens* ο οποίος εκφράζεται με χαμηλές μετρήσεις και εμφανίζεται στις περισσότερες μετρήσεις 10 φορές μικρότερος από τους υπόλοιπους δείκτες.



Σχήμα Δ.1.1γ: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Χανίων



Σχήμα Δ.1.1δ: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Νέας Κυδωνίας



Σχήμα Δ.1.1ε: Μέσος όρος μετρήσεων σταθμού Ηρακλείου

Η χλωρίωση σε όλους τους σταθμούς εμφανίζεται ιδιαίτερα αποτελεσματική, με μείωση του αρχικού φορτίου εισόδου στα Χανιά κατά 99,9%, 99,8% στη Νέα Κυδωνία και 99,6% στο Ηράκλειο.

Ο βιολογικός σταθμός των Χανίων φαίνεται να είναι ο πιο αποτελεσματικός και με σταθερή απομάκρυνση των μικροοργανισμών.

Το 2002 εκπονήθηκε μελέτη για την αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης μικροοργανισμών σε μονάδα επεξεργασίας λυμάτων αργής ροής (slow rate, SR) στην περιοχή του Σκαλανίου. Το Σκαλάνι είναι ένας οικισμός δυτικά του Ηρακλείου και είναι δίπλα στην τελευταία περιοχή που εξυπηρετείται από το βιολογικό σταθμό Ηρακλείου. Στη μελέτη των Tzanakakis et. al (2003) αναφέρονται οι μετρήσεις των δεικτών TC και FC πριν και μετά την επεξεργασία. Η μέθοδος περιλαμβάνει ένα στάδιο σε δεξαμενή καθίζησης και στη συνέχεια απόθεση σε έδαφος στο οποίο έχουν φυτευτεί συγκεκριμένα είδη φυτών. Ο δείκτης TC προσδιορίζεται στα 103×10^6 CFU/100mL και $47,5 \times 10^6$ CFU/100mL, αντίστοιχα (Tzanakakis et al., 2003). Οι αντίστοιχες μέσες τιμές σύμφωνα με την παρούσα μελέτη για το βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου είναι $4,63 \times 10^6$ CFU/100mL για τον δείκτη TC και $3,53 \times 10^6$ CFU/100mL για τον δείκτη FC. Η μεγαλύτερη φόρτιση στο Σκαλάνι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για αγροτική περιοχή και στην περιοχή λειτουργούν ελαιοτριβεία, τα λύματα των οποίων οδηγούνται στη μονάδα επεξεργασίας της περιοχής. Η απομάκρυνση του αρχικού φορτίου σε απόσταση μεγαλύτερη από 15 cm από την επιφάνεια του εδάφους μετρήθηκε στο 99,9% (Tzanakakis et al., 2003).

Το 2006 δημοσιεύτηκε από τους Dewedar et. al μία μελέτη, η οποία διαπραγματεύεται την απομάκρυνση οργανικού και μικροβιακού φορτίου από αστικά απόβλητα, περνώντας τα από μία σειρά κλινών με διαφορετικό πληρωτικό υλικό. Η εγκατάσταση ονομάζεται BIOWATYST, λειτουργεί από το 1998 στην Αίγυπτο και εντάσσεται σε πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη σωστή και αποτελεσματική περιβαλλοντική διαχείριση των αποβλήτων της Μεσογείου. Κατά τους Dewedar et. al στην είσοδο της εγκατάστασης ο δείκτης TC είναι $5,78 \times 10^6$ CFU/100mL, ο δείκτης FC $3,78 \times 10^6$ CFU/100mL και ο δείκτης FS $1,5 \times 10^6$ CFU/100mL. Είναι ίδια τάξη μεγέθους και αρκετά κοντά στις τιμές που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας για του βιολογικούς σταθμούς της Βόρειας Κρήτης. Η απομάκρυνση του μικροβιακού φορτίου χωρίς τη χρήση μέσων απολύμανσης (π.χ. χλώριο, UV, όζον) είναι για το δείκτη TC 52%, για το δείκτη FC 48,7% και για το δείκτη FS 65,2% (Dewedar et al., 2006), ενώ παρατηρείται η μέγιστη απομάκρυνση στην κλίνη της άμμου. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι η χλωρίωση είναι πολύ πιο αποτελεσματική με μετρημένη απομάκρυνση του αρχικού φορτίου

πάνω από 99%. Η επεξεργασία σε κλίνες έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη δευτεροβάθμια επεξεργασία βιολογικού καθαρισμού. Αυτό που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ότι στη μελέτη των Dewedar et al. ο δείκτης TC παίρνει τις μέγιστες τιμές του κατά την περίοδο του φθινοπώρου και του καλοκαιριού. Για τους σταθμούς Χανίων και της Νέας Κυδωνίας ο δείκτης TC λαμβάνει τη μέγιστη τιμή του κατά τους φθινοπωρινούς και χειμερινούς μήνες. Στο σταθμό του Ηρακλείου η υψηλότερη μέτρηση TC λαμβάνεται το Φεβρουάριο του 2013 και αντιστοιχεί σε $8,16 \times 10^6$ CFU/100mL, η δεύτερη μεγαλύτερη μέτρηση, όμως λαμβάνεται το Μάιο και αντιστοιχεί σε $6,4 \times 10^6$ CFU/100mL. Το Νοέμβριο λαμβάνεται, επίσης, υψηλή μέτρηση TC και είναι $5,28 \times 10^6$ CFU/100mL. Το ίδιο προφίλ παρουσιάζεται και στις δύο περιπτώσεις και για το δείκτη FC. Η μετρήσεις των δεικτών στην είσοδο των βιολογικών το Φεβρουάριο το 2013 είναι διπλασιασμένοι σε σχέση με τον ίδιο μήνα το 2012. Ο Φεβρουάριος του 2012 ήταν ιδιαίτερα βροχερός, σε αντίθεση με το 2013, που ο χειμώνας είχε ελάχιστες βροχοπτώσεις, και ιδιαίτερα στο νομό Ηρακλείου. Ο δείκτης FS, τόσο στην αιγυπτιακή εγκατάσταση όσο και στις εγκαταστάσεις της Κρήτης λαμβάνει τις υψηλότερες τιμές την άνοιξη.

Σε μελέτη που εκπονήθηκε το 2008 οι Kalogerakis et al. Μέτρησαν τους δείκτες TC και FC από το βιολογικό σταθμό Χανίων μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση. Οι τιμές που δίδονται στην αναφορά τους είναι 10^4 - 5×10^5 CFU/ 100mL για το δείκτη TC και 10^4 - $1,5 \times 10^5$ CFU/ 100mL για το δείκτη FC (Kalogerakis et al. 2008). Η μέση τιμή του δείκτη TC μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκε στις $7,06 \times 10^4$ CFU/ 100mL και για το δείκτη FC $1,35 \times 10^5$ CFU/ 100mL. Παρατηρείται ότι οι τιμές αυτές είναι εντός των τιμών που ελήφθησαν από τους Kalogerakis et al. (2008). Παρόλα αυτά, υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση των τιμών, καθώς, ο δείκτης TC παίρνει τιμές από 5×10^3 CFU/ 100mL έως $5,9 \times 10^4$ CFU/ 100mL, ενώ ο δείκτης TC παίρνει τιμές από 5×10^3 CFU/ 100mL έως $8,1 \times 10^5$ CFU/ 100mL.

2. Ανίχνευση βακτηριοφάγων

Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις εγκαταστάσεις των βιολογικών καθαρισμών Ηρακλείου, Χανίων και Νέας Κυδωνίας από τον Ιούνιο 2012 και έπειτα εξετάστηκαν για την ανίχνευση βακτηριοφάγων. Ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με καταμέτρηση των σχηματιζόμενων πλακών βακτηριοφάγων ανά 100mL (PFU/100mL).

Πίνακας 4.2.1: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Χανίων, όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3= χλωρίωση, S4= έξοδος

	S1 (PFU/100mL)	S2 (PFU/100mL)	S3 (PFU/100mL)	S4 (PFU/100mL)
ΙΟΥΝΙΟΣ	$2,07 \times 10^5$	$5,31 \times 10^4$	0	0
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ	$3,11 \times 10^6$	6×10^2	8×10^2	0
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	$2,43 \times 10^5$	5×10^2	0	0
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ	$5,73 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$	1×10^2	0

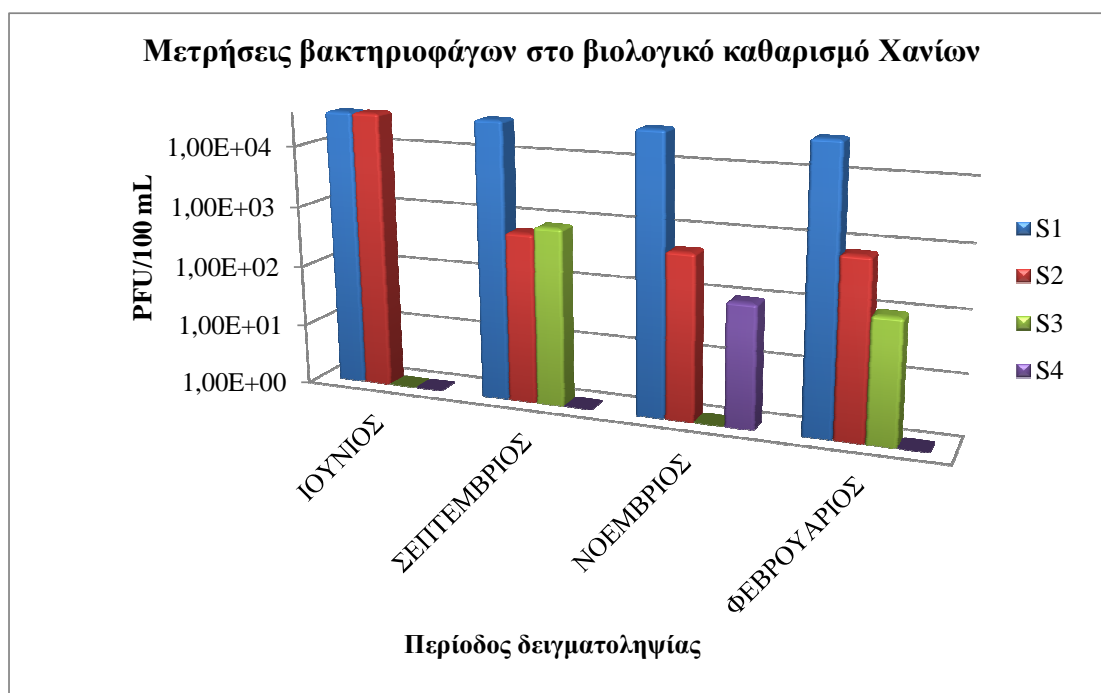
Πίνακας 4.2.2: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Νέας Κυδωνίας, όπου S1=είσοδος, S2= μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3= χλωρίωση, S4= έξοδος

	S1 (PFU/100mL)	S2 (PFU/100mL)	S3 (PFU/100mL)	S4 (PFU/100mL)
ΙΟΥΝΙΟΣ	$3,17 \times 10^6$	$3,28 \times 10^5$	$1,15 \times 10^4$	5×10^2
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ	$5,78 \times 10^6$	$1,00 \times 10^2$	0	$4,10 \times 10^3$
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	$6,37 \times 10^5$	$1,50 \times 10^2$	0	0
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ	$4,65 \times 10^5$	$3,37 \times 10^4$	0	0

Πίνακας Δ.2.3: Αποτελέσματα βακτηριοφάγων για το βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου, όπου S1=είσοδος, S2=μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, S3=χλωρίωση, S4= έξοδος

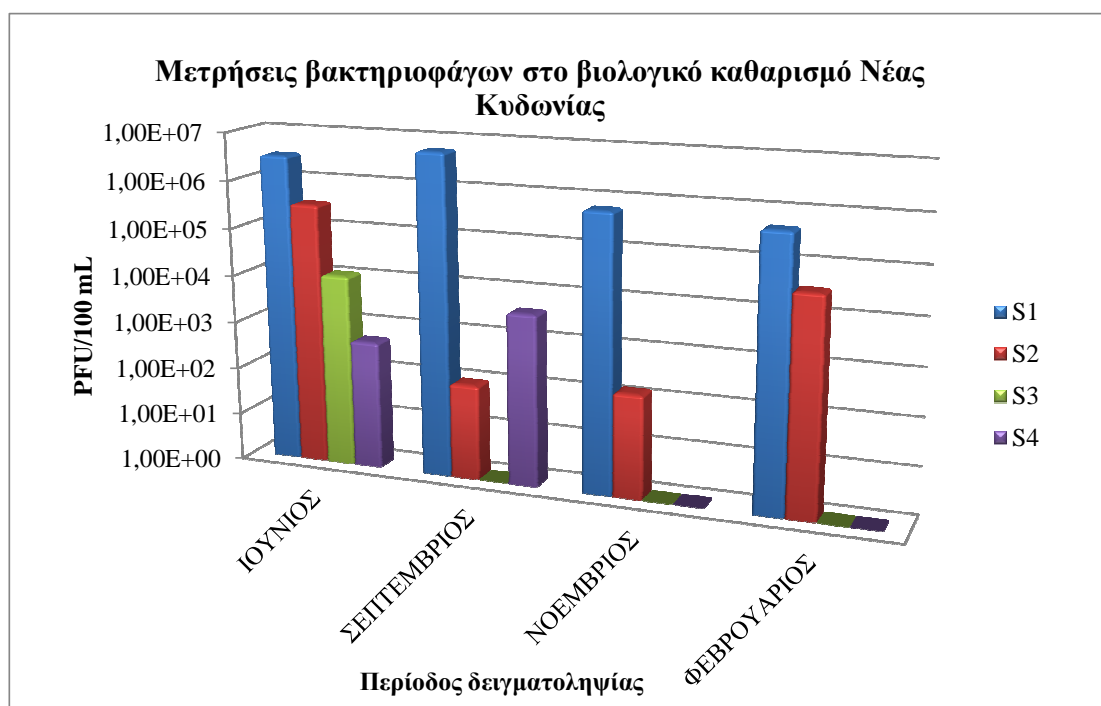
	S1 (PFU/100mL)	S2 (PFU/100mL)	S3 (PFU/100mL)
ΙΟΥΝΙΟΣ	$2,36 \times 10^5$	$1,25 \times 10^3$	$3,00 \times 10^2$
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ	$3,38 \times 10^4$	$6,00 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	$9,67 \times 10^5$	$1,60 \times 10^3$	$6,50 \times 10^2$
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ	$6,63 \times 10^4$	$5,50 \times 10^2$	0

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτουν τα σχήματα Δ.2.α- Δ.2.γ. Στην εγκατάσταση των Χανίων στο τέλος Σεπτεμβρη, ανιχνεύονται στη χλωρίωση 800 PFU/100mL. Στη συγκεκριμένη δειγματοληψία, ιδιαίτερα επιβαρυνμένη εμφανίζεται και η είσοδος του βιολογικού, καθώς μετρήθηκαν $3,11 \times 10^6$ PFU/100mL δείγματος, ενώ οι υπόλοιπες δειγματοληψίες είναι της τάξης του έδωσαν από 2 έως $5,7 \times 10^3$ PFU/100mL. Επίσης, μεγάλη είναι η διακύμανση του ικού φορτίου που φαίνεται να απομακρύνεται από τη δευτεροβάθμια καθίζηση, με το ποσοστό απομάκρυνσης να κυμαίνεται από 75% έως 98%. Σε καμία μέτρηση δεν εντοπίζονται βακτηριοφάγοι στο θαλάσσιο αποδέκτη της εξόδου του συγκεκριμένου βιολογικού σταθμού επεξεργασίας λυμάτων.



Σχήμα Δ.2.α: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Χανίων

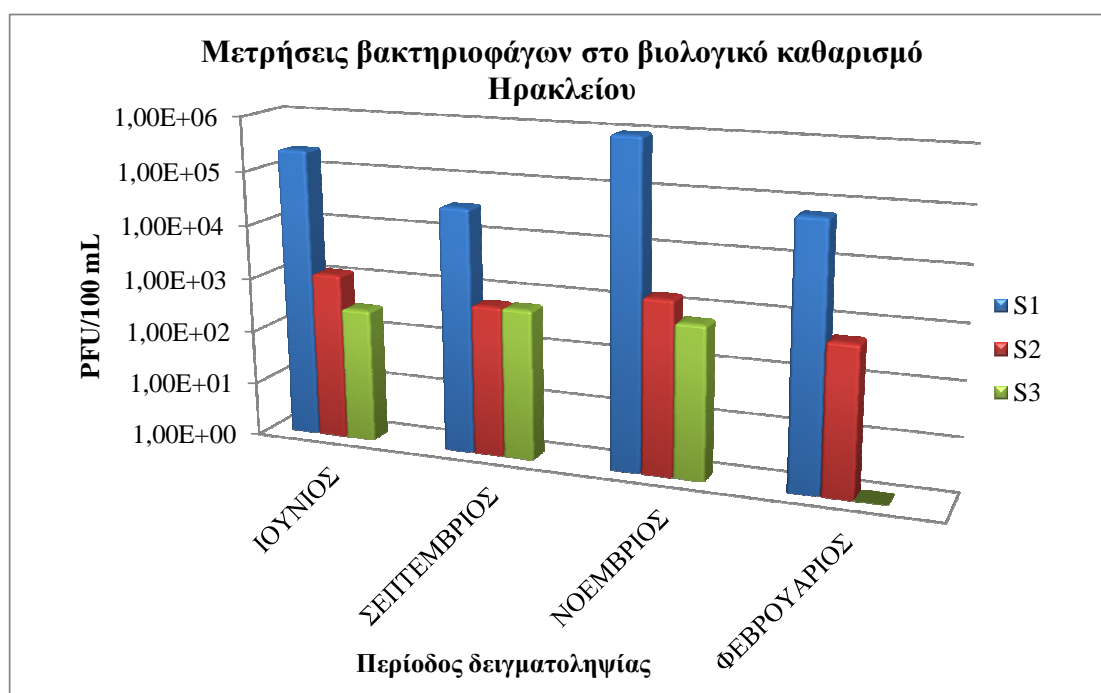
Ο βιολογικός καθαρισμός Νέας Κυδωνίας εμφανίζει αυξημένα επίπεδα ιικής φόρτισης στο τέλος Ιουνίου και Σεπτεμβρίου, ενώ τις ίδιες περιόδους, εμφανίζονται και βακτηριοφάγοι 5×10^2 PFU/100mL και $4,10 \times 10^3$ PFU/100mL στην έξοδο του σταθμού (θαλάσσια περιοχή Γερανίου). Επίσης, τον Ιούνιο εμφανίζεται απομάκρυνση μόλις 99,6% των ιών από τη χλωρίωση, ενώ το Σεπτέμβριο και το Νοέμβριο η απομάκρυνση είναι 100%. Μεγάλη απομάκρυνση ιών παρουσιάζει και η δευτεροβάθμια καθίζηση στο συγκεκριμένο σταθμό. Στην εγκατάσταση της Νέας Κυδωνίας εμφανίζεται η πιο επιβαρυνμένη είσοδος για τους υπό εξέταση σταθμούς. Η σημαντική διαφορά του συγκεκριμένου σταθμού, είναι ότι αν και εξυπηρετεί μικρότερο πληθυσμό, πρόκειται ουσιαστικά για τη μόνη μονάδα που επεξεργάζεται λύματα από αγροτικές περιοχές, με έντονη κτηνοτροφική δραστηριότητα.



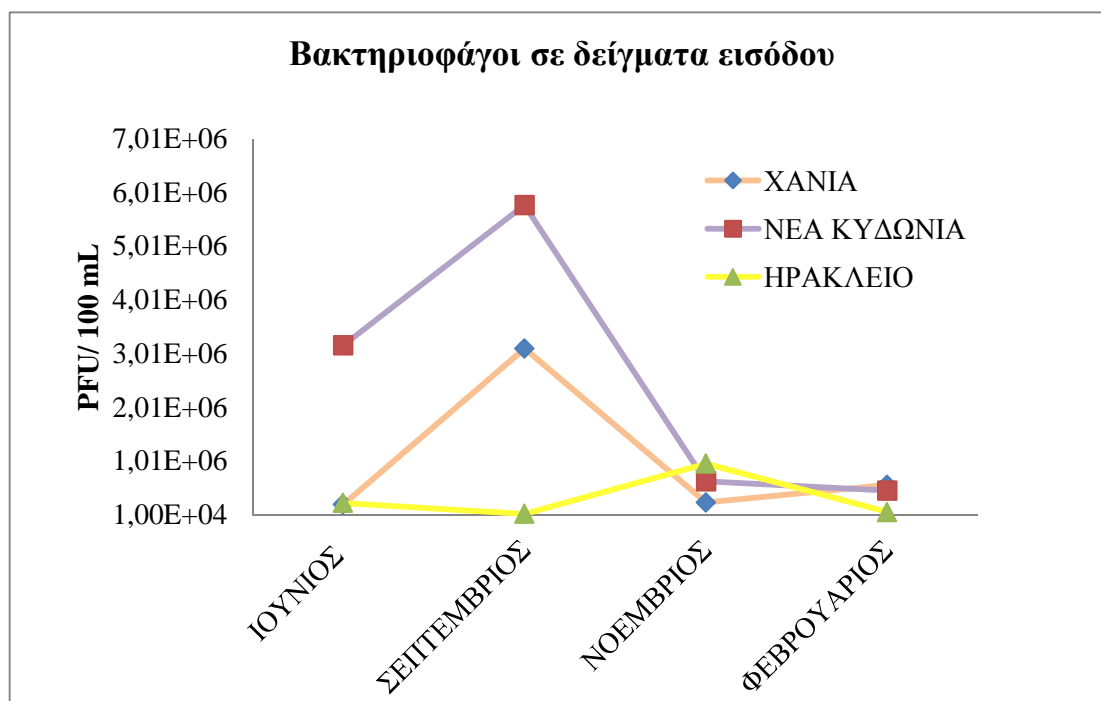
Σχήμα Δ.2.β: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Νέας Κυδωνίας

Στο βιολογικό σταθμό Ηρακλείου παρουσιάζεται η μικρότερη αποφόρτιση ιών. Η μεγαλύτερη ποσότητα ιών στο σταθμό Ηρακλείου εντοπίζεται κατά το μήνα Νοέμβριο και είναι $9,67 \times 10^5$ PFU/100mL. Στη δευτεροβάθμια καθίζηση η απομάκρυνση είναι μέχρι 99,8%, ενώ στη χλωρίωση παρατηρείται απομάκρυνση του >99,9% του αρχικού φορτίου. Στο βιολογικό σταθμό Ηρακλείου μετά την

απολύμανση, μόνο στη μέτρηση του Φεβρουαρίου παρατηρήθηκε μηδενική παρουσία βακτηριοφάγων στα τριβλία.



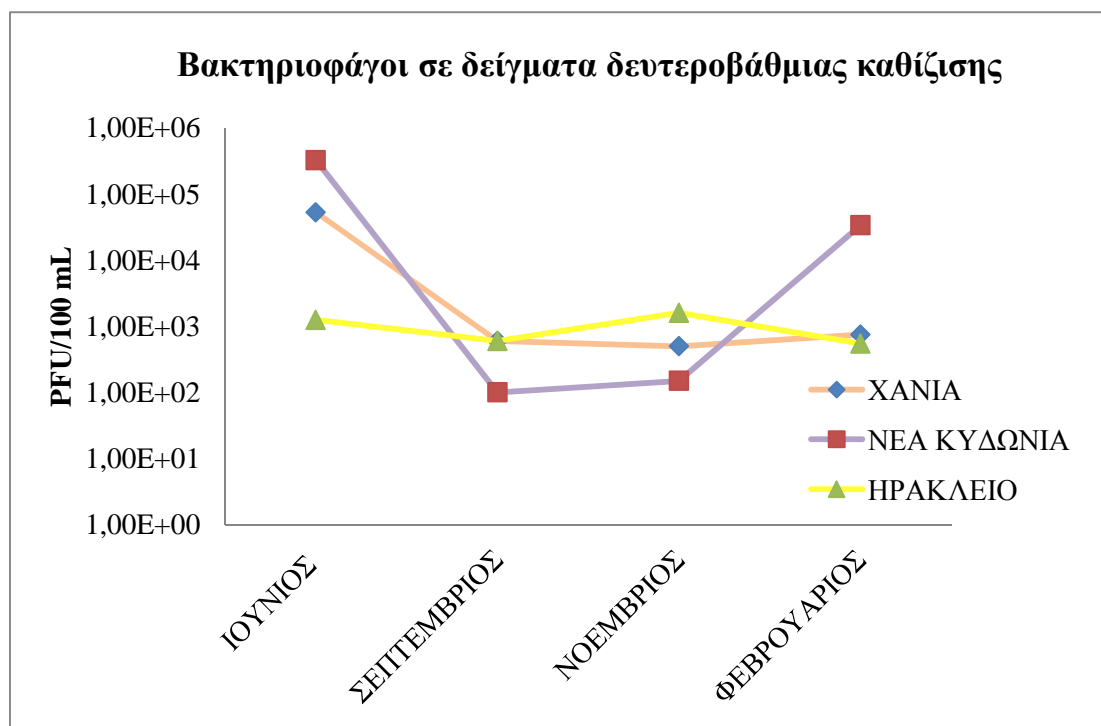
Σχήμα Δ.2.γ: Αποτελέσματα πειράματος βακτηριοφάγων στο βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου



Σχήμα Δ.2.δ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων εισόδου

Στην εγκατάσταση της Νέας Κυδωνίας εμφανίζεται η πιο επιβαρυνμένη είσοδος για τους υπό εξέταση σταθμούς. Η σημαντική διαφορά του συγκεκριμένου σταθμού,

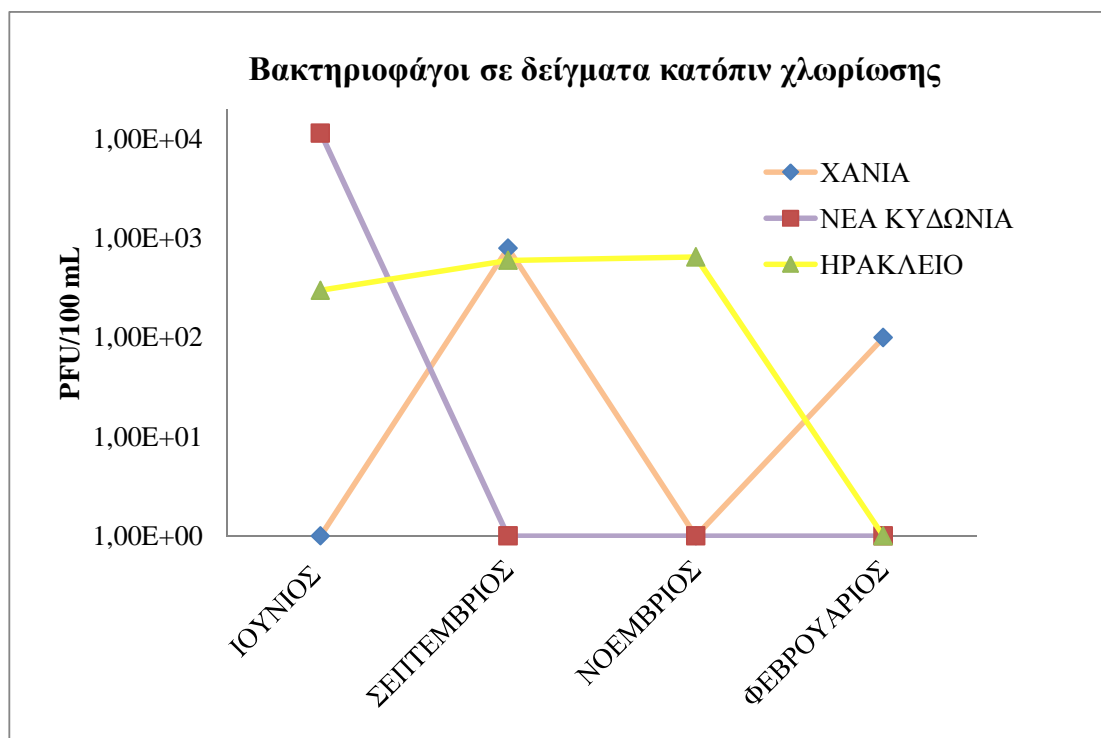
είναι ότι αν και εξυπηρετεί μικρότερο πληθυσμό, πρόκειται ουσιαστικά για τη μόνη μονάδα που επεξεργάζεται λύματα από αγροτικές περιοχές, με έντονη κτηνοτροφική δραστηριότητα. Επίσης, ο πληθυσμός που εξυπηρετείται από το σταθμό, διπλασιάζεται κατά τους θερινούς μήνες λόγω τουρισμού. Μεγάλη αύξηση το καλοκαίρι παρουσιάζεται και στον πληθυσμό των Χανίων. Το Ηράκλειο, το οποίο είναι αστικό κέντρο, παρουσιάζει μικρή διακύμανση στον πληθυσμό του και αυτό μεταφράζεται σε σχετικά σταθερές μετρήσεις στο φορτίο στην είσοδο του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου. Κατά τη διάρκεια της τουριστικής περιόδου στους σταθμούς Χανίων και Νέας Κυδωνίας λαμβάνονται οι μετρήσεις βακτηριοφάγων πολλαπλάσια μεγαλύτερες σε σχέση με τους χειμερινούς μήνες. Αντίθετα, στο Ηράκλειο η μεγαλύτερη μέτρηση λαμβάνεται για το μήνα Νοέμβριο.



Σχήμα 4.2.ε: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων δευτεροβάθμιας καθίζησης

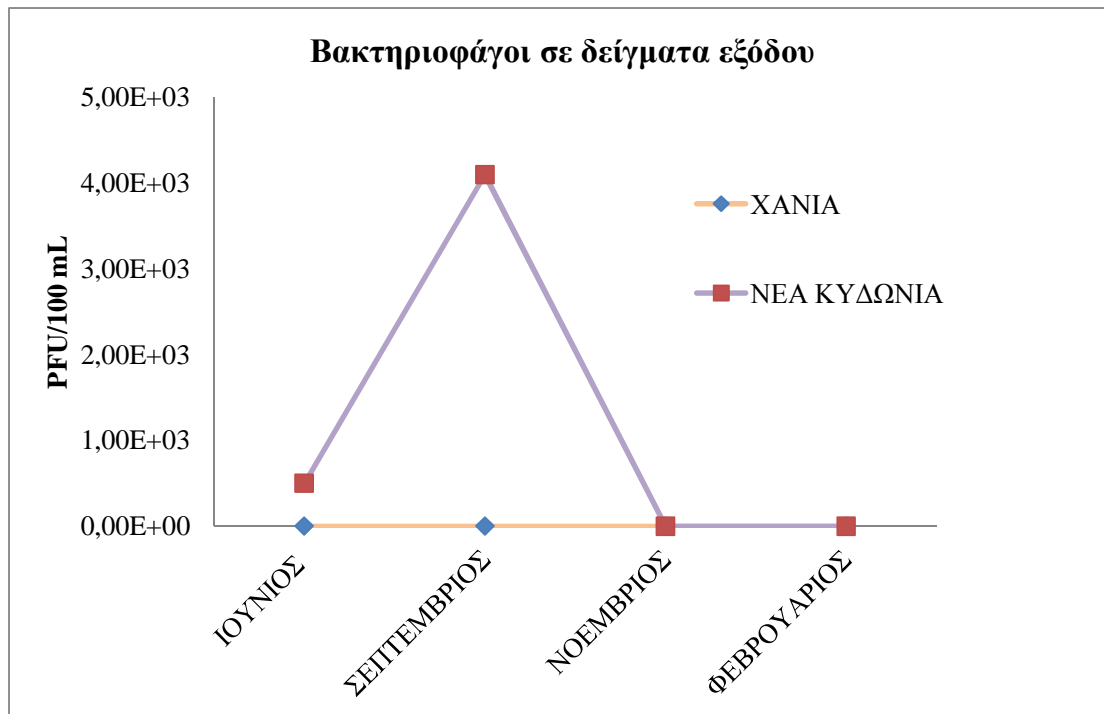
Στο βιολογικό καθαρισμό Ηρακλείου παρατηρείται σχετικά σταθερή φόρτιση μετά τη δεξαμενή δευτεροβάθμια καθίζησης. Στο σταθμό της Νέας Κυδωνίας παρατηρείται η μεγαλύτερη διακύμανση. Τον Ιούνιο η μέτρηση των βακτηριοφάγων είναι $3,28 \times 10^5$, η οποία είναι και η μέγιστη τιμή για τη συγκεκριμένη εγκατάσταση, ακολουθώντας την τάση που επικρατεί στην είσοδο. Το Σεπτέμβριο, παρόλο που στην είσοδο μετρήθηκαν $5,78 \times 10^6$ PFU/100mL, στην έξοδο από τη δεξαμενή καθίζησης μετρήθηκαν μόλις 100 PFU/100mL και στη χλωρίωση της ίδιας περιόδου λήφθηκε

μηδενική μέτρηση. Αν και στην είσοδο του σταθμού Ηρακλείου ελήφθησαν μικρότερες μετρήσεις βακτηριοφάγων από τους άλλους σταθμούς, η δευτεροβάθμια επεξεργασία δεν κινείται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα Χανιά και τη Νέα Κυδωνία.



Σχήμα 1.2.στ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων χλωρίωσης

Ο σταθμός Ηρακλείου και στη χλωρίωση δίνει σχετικά σταθερά αποτελέσματα, καθώς οι μετρήσεις είναι της τάξης 10^2 , με εξαίρεση τη μηδενική μέτρηση το Φεβρουαρίου. Ο σταθμός Νέας Κυδωνίας δίνει peak στη μέτρηση του Ιουνίου, στην οποία και η δευτεροβάθμια καθίζηση δίνει τη μέγιστη τιμή της στην καταμέτρηση βακτηριοφάγων, ενώ οι υπόλοιπες μετρήσεις είναι μηδενικές. Στα Χανιά οι μετρήσεις βακτηριοφάγων μετά τη χλωρίωση κυμαίνονται από 0 έως 800 PFU/100mL.



Σχήμα Δ.2.ζ: Συγκριτικό διάγραμμα βακτηριοφάγων εξόδου

Ο υδάτινος αποδέκτης της εκροής του βιολογικού καθαρισμού Χανίων φαίνεται να μην επηρεάζεται ως προς το υικό φορτίο από τα επεξεργασμένα λύματα, καθώς όλες οι μετρήσεις είναι μηδέν. Στη θαλάσσια περιοχή του Γερανίου, η μέτρηση 5×10^2 PFU/100mL, φαίνεται να σχετίζεται με την εκροή της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων Νέας Κυδωνίας, καθώς εκείνη την περίοδο στη χλωρίωση του σταθμού λαμβάνεται μέτρηση $1,15 \times 10^4$ PFU/100mL. Παρόλα αυτά, το Σεπτέμβριο λαμβάνεται μέτρηση 4×10^3 PFU/100mL, η οποία δε δικαιολογείται από τις μετρήσεις της δευτεροβάθμιας και της χλωρίωσης και πιθανόν να συνδέεται με τον αυξημένο αριθμό λουόμενων τη συγκεκριμένη περίοδο στην περιοχή.

3. Ανίχνευση ιών σε αστικά λύματα

Στα δείγματα που ελήφθησαν από την είσοδο, τη δευτεροβάθμια καθίζηση και τη χλωρίωση των εγκαταστάσεων των βιολογικών καθαρισμών έγινε απομόνωση γενετικού υλικού, όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

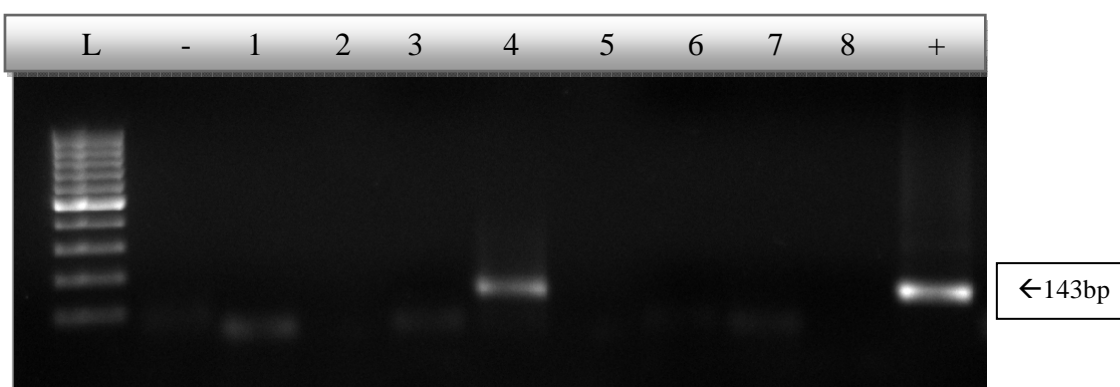
Στη συνέχεια τα δείγματα φωτομετρήθηκαν και ελέγχθηκε ο λόγος οπτικής απορρόφησης στα 260 και 280 nm. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της PCR χρησιμοποιήθηκαν με λόγο $O.D_{260}/O.D_{280} > 1,6$.

Σε όλα τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκε γενετικό υλικό ιών έγινε ανάλυση PCR για την ανίχνευση ιών εντερικής προέλευσης και συγκεκριμένα αδενοϊών και εντεροϊών. Τα δείγματα κατόπιν της PCR και της nested- PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις παρακάτω εικόνες.

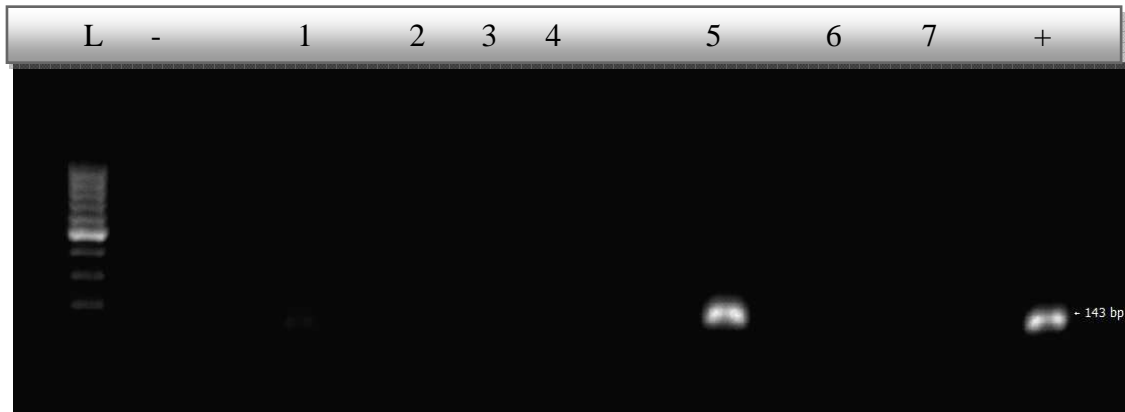
3.1 Αδενοϊοί

Στην PCR και nested-PCR χρησιμοποιήθηκε δείκτης ladder 100 bp. Στη nested-PCR για αδενοϊούς το αναμενόμενο προϊόν, εφόσον το δείγμα είναι θετικό σε αδενοϊούς, αναμένεται να εντοπιστεί στα 143 bp. Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων ισχύει ο συμβολισμός:

1. S1= είσοδος βιολογικού καθαρισμού (πριν την εσχάρωση)
2. S2= μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση
3. S3= μετά τη χλωρίωση



Εικόνα Δ.3.1.α: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Χανιά 8/5 S1, 2: Χανιά 8/5 S2, 3: Χανιά 8/5 S3, 4: Ν. Κυδωνία 15/5 S1, 5: Ν. Κυδωνία 15/5 S2, 6: Ν. Κυδωνία 15/5 S3, 7: Ηράκλειο 21/5 S1, 8: Ηράκλειο 21/5 S2, +: θετικό δείγμα



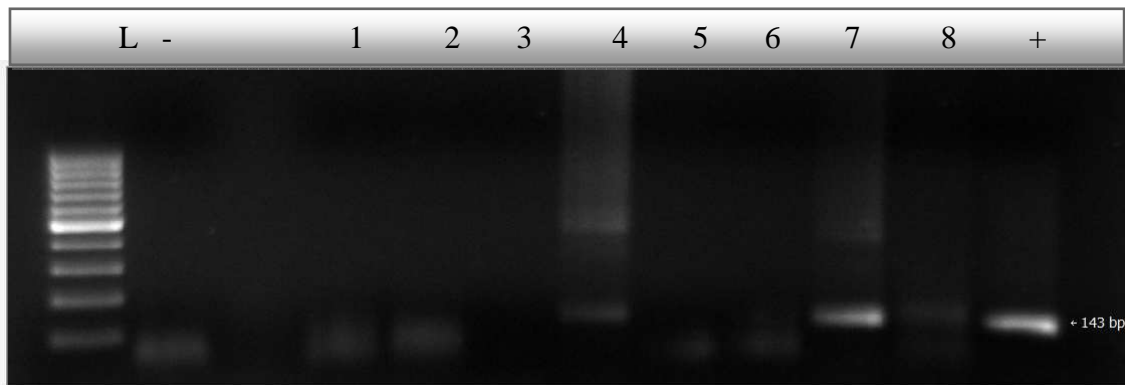
Εικόνα Δ.3.1.β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 21/5 S3, 2: Χανιά 13/6 S1, 3: Χανιά 13/6 S2, 4:Χανιά 13/6 S3, 5:Ηράκλειο 19/6 S1, 6: Ηράκλειο 19/6 S2, 7: Ηράκλειο 19/6 S3, +:θετικό δείγμα



Εικόνα Δ.3.1.γ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Χανιά 6/3 S1, 2: Χανιά 6/3 S2, 3: Χανιά 6/3 S3, 4: Ν. Κυδωνία 19/3 S1, 5: Ν. Κυδωνία 19/3 S2, 6: Ν. Κυδωνία 19/3 S3, +:θετικό δείγμα



Εικόνα Δ.3.1.δ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 27/4 S1, 2: Ηράκλειο 27/4 S2, 3: Ηράκλειο 27/1 S3, 4: Ν. Κυδωνία 22/6 S1, 5: Ν. Κυδωνία 22/6 S2, 6: Ν. Κυδωνία 22/6 S3, +: θετικό δείγμα



Εικόνα Δ.3.1.ε: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 24/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3, 4: Χανιά 27/9 S1, 5: Χανιά 27/9 S2, 6: Χανιά 27/9 S3, 7: Ν. Κυδωνία 4/10 S1, 8: Ν. Κυδωνία 4/10 S2, +: θετικό δείγμα



Εικόνα 4.3.1.στ: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για αδενοϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, 1: Ν. Κυδωνία 4/10 S3, 2: Ν. Κυδωνία 26/11 S1, 3: Ν. Κυδωνία 26/11 S2, 4: Ν. Κυδωνία 26/11 S3, 5: Χανιά 28/11 S1, 6: Χανιά 28/11 S2, 7: Χανιά 28/11 S3, 8: Ηράκλειο 30/11 S1, 9: Ηράκλειο 30/11 S2, 10: Ηράκλειο 30/11 S3, +: θετικό δείγμα

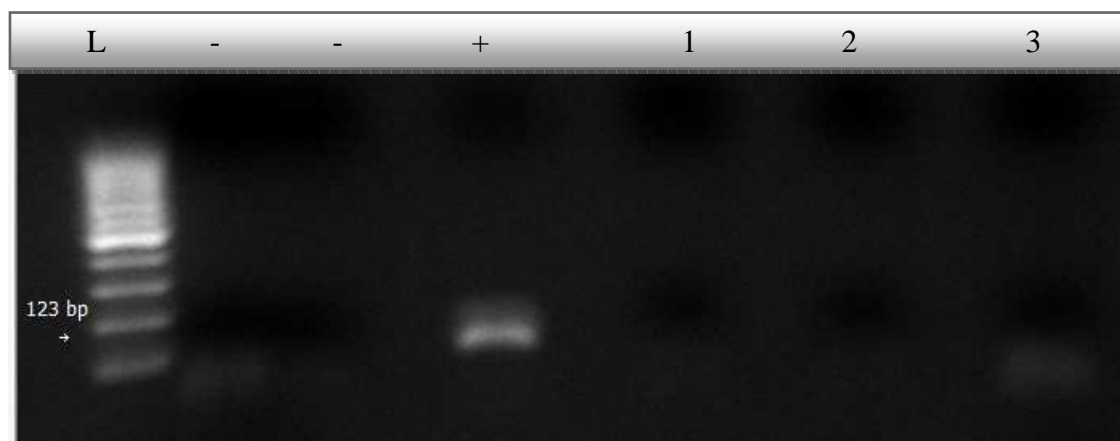
Αδενοϊοί ανιχνεύονται στις 15/5/2012 στο σταθμό της Νέας Κυδωνίας (ΔΕΥΑΒΑ) μόνο στην είσοδο, στις 19/5/2012 στην είσοδο του σταθμού του Ηρακλείου, στις 27/9/2012 στην είσοδο του βιολογικού καθαρισμού Χανίων, στις 4/10 στη ΔΕΥΑΒΑ σε όλα τα στάδια, στις 26/11/2012 στην είσοδο της ΔΕΥΒΑ, αλλά και στην έξοδο από τη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, στις 28/11/2012 στα Χανιά στην είσοδο της ΔΕΥΑΧ και τέλος στη ΔΕΥΑ Ηρακλείου στις 30/11/2012 στην είσοδο και έξοδο από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, οι αδενοϊοί φαίνεται να μην εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του θέρους. Κυρίως εντοπίζονται στα δείγματα του χειμώνα με αποκορύφωμα τις μετρήσεις του Νοεμβρίου. Επίσης, εντοπίζονται και το φθινόπωρο στις μετρήσεις Οκτωβρίου, κυρίως, όμως στην είσοδο των βιολογικών σταθμών, ενώ ασθενέστερη είναι η παρουσία τους την άνοιξη, καθώς ανιχνεύονται μόνο στην είσοδο του σταθμού Ηρακλείου και Νέας Κυδωνίας στις 19 και 15/5/2012 αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο οι αδενοϊοί εμφανίζονται και μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία σε όλους τους σταθμούς, ενώ στη μονάδα της Νέας Κυδωνίας ανιχνεύονται και μετά τη χλωρίωση. Προφανώς η ποσότητα δεν είναι η ίδια με την είσοδο, υποδηλώνεται όμως ότι η φόρτιση στην είσοδο είναι πολύ μεγάλη και μετά την επεξεργασία της απολύμανσης με χλώριο ένα μέρος του αρχικού υκού φορτίου επιβιώνει.

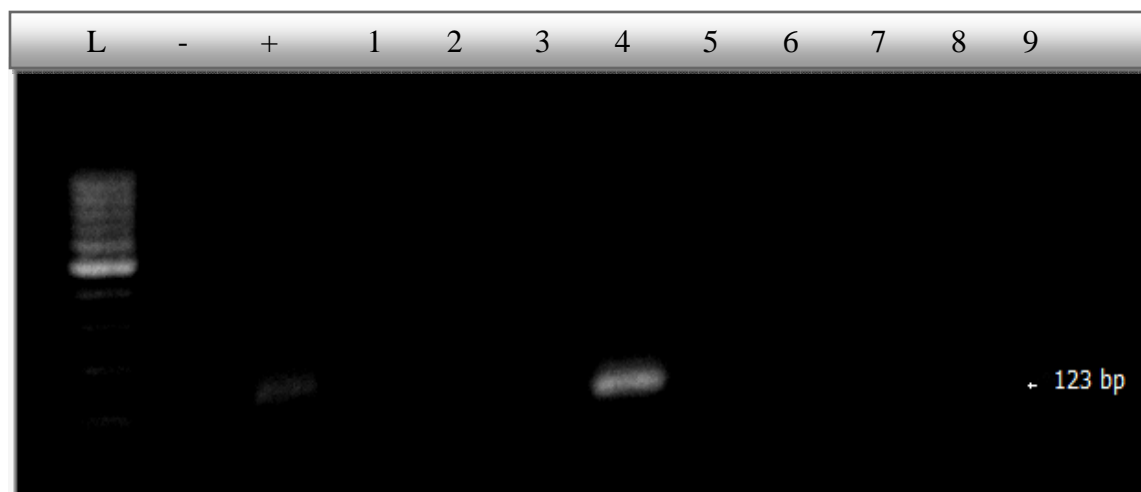
3.2 Εντεροϊοί

Οι εντεροϊοί, σε αντίθεση με τους αδενοϊούς, έχουν RNA γενετικό υλικό, το οποίο είναι πιο ασταθές και, κατά συνέπεια, πιο ευπαθές στις διάφορες μηχανικές διεργασίες. Για το λόγο αυτό, πριν από κάθε PCR για τους εντεροϊούς προηγήθηκε σύνθεση cDNA από το απομονωμένο γενετικό υλικό των δειγμάτων. Η σύνθεση έγινε με τη διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Αντίστροφης Μεταγραφάσης (RT-PCR). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει μία αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία συντίθεται cDNA από το RNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Αφού δημιουργηθεί το cDNA στη συνέχεια πραγματοποιείται η διαδικασία της PCR. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση mRNA, όπως στην περίπτωση των εντεροϊών. (Metcalf et al., 1995)

Στην PCR και nested-PCR χρησιμοποιήθηκε δείκτης ladder 100 bp. Στη nested-PCR για αδενοϊούς το αναμενόμενο προϊόν, εφόσον το δείγμα είναι θετικό σε εντεροϊούς, αναμένεται να εντοπιστεί στα 123 bp.



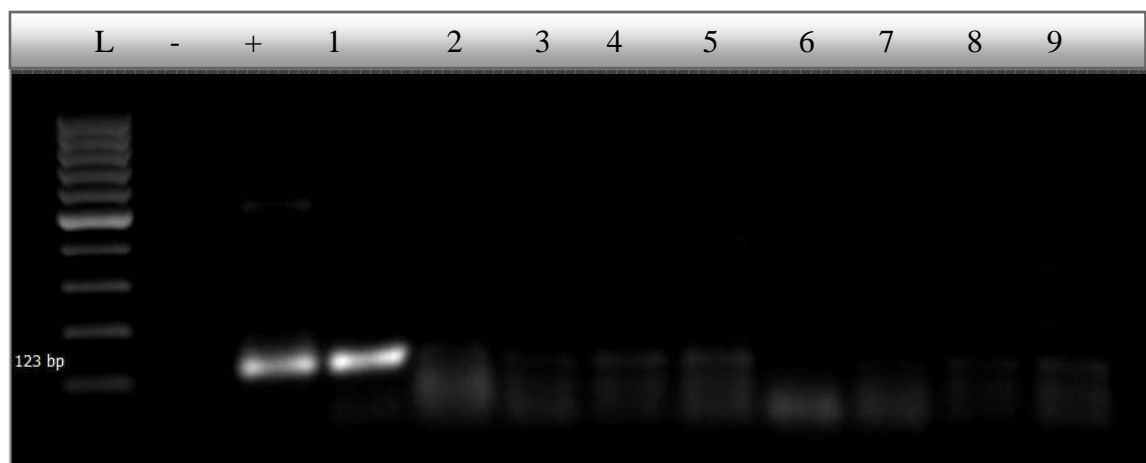
Εικόνα 4.3.2.α: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 4/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3



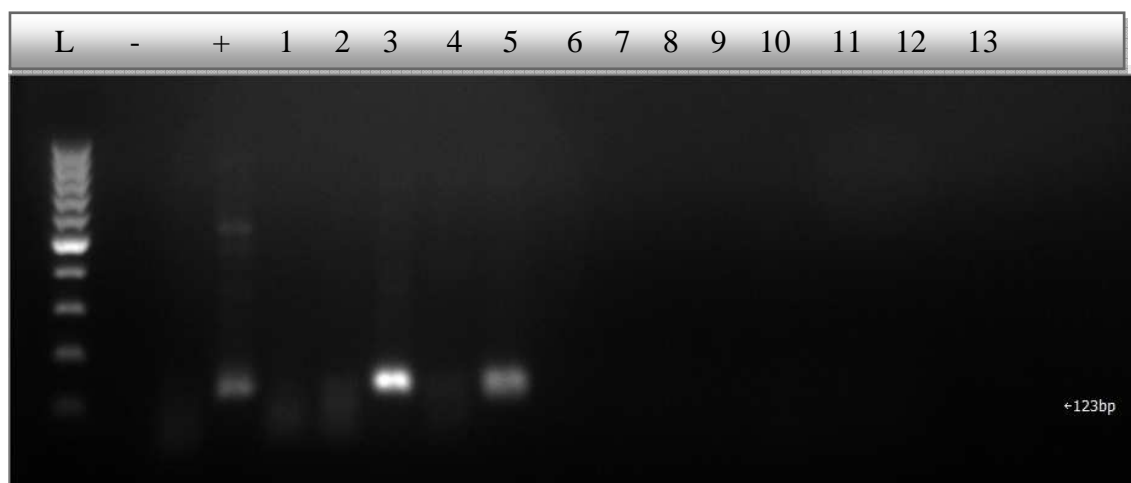
Εικόνα Δ.3.2.β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Χανιά 6/3 S1, 2: Χανιά 6/3 S2, 3: Χανιά 6/3 S3, 4: Ν. Κυδωνία 19/3 S1, 5: Ν. Κυδωνία 19/3 S2, 6: Ν. Κυδωνία 19/3 S3, 7: Ηράκλειο 27/4 S1, 8: Ηράκλειο 27/4 S2, 9: Ηράκλειο 7/4 S3



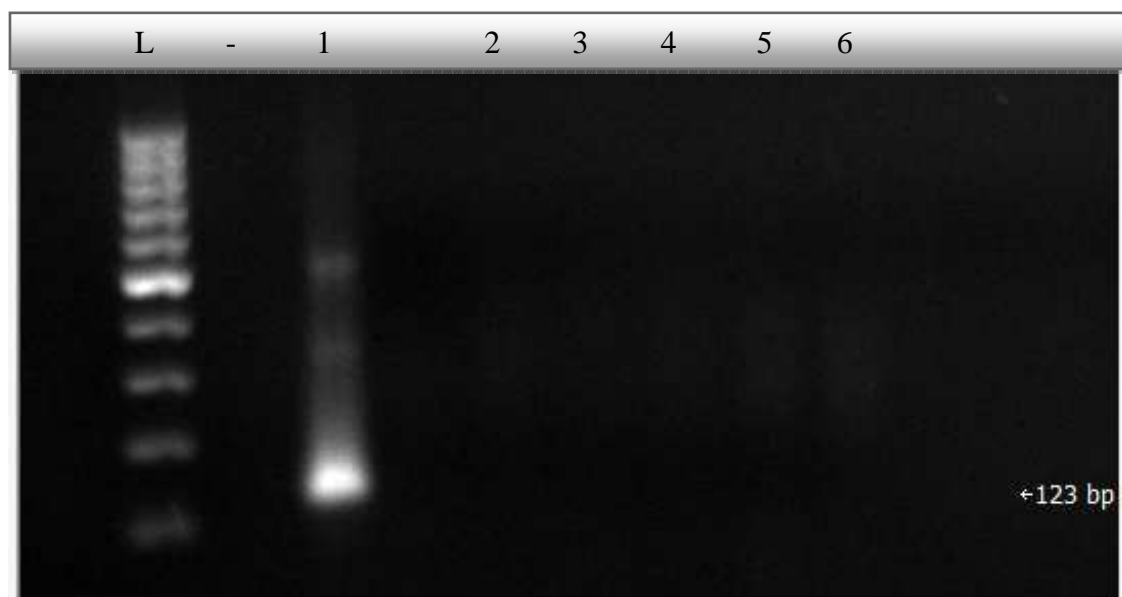
Εικόνα Δ.3.2.γ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Χανιά 8/5 S1, 2: Χανιά 8/5 S2, 3: Χανιά 8/5, 4: Ν. Κυδωνία 15/5 S1, 5: Ν. Κυδωνία 15/5 S2, 6: Ν. Κυδωνία 15/5 S3, 7: Ηράκλειο 21/5 S1, 8: Ηράκλειο 21/5 S2, 9: Ηράκλειο 21/5 S3



Εικόνα Δ.3.2.δ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Χανιά 13/6 S1, 2: Χανιά 13/6 S2, 3: Χανιά 13/6 S3, 4: Ηράκλειο 19/6 S1, 5: Ηράκλειο 19/6 S2, 6: Ηράκλειο 19/6 S3, 7: Ν. Κυδωνία 22/6 S1, 8: Ν. Κυδωνία 22/6 S2, 9: Ν. Κυδωνία 22/6 S3



Εικόνα Δ.3.2.ε: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested PCR για εντεροϊούς σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Ηράκλειο 24/9 S1, 2: Ηράκλειο 24/9 S2, 3: Ηράκλειο 24/9 S3, 4: Χανιά 27/9 S1, 5: Χανιά 27/9 S2, 6: Χανιά 27/9 S3, 7: Ν. Κυδωνία 4/10 S1, 8: Ν. Κυδωνία 4/10 S2, 9: Ν. Κυδωνία 4/10 S3, 10: Ν. Κυδωνία 26/11 S1, 11: Ν. Κυδωνία 26/11 S2, 12: Ν. Κυδωνία 26/11 S3



Εικόνα Δ.3.2.στ.: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *nested PCR* για εντεροϊούς σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, Διαδρομές→ L: ladder (100 bp), -: αρνητικό δείγμα, +: θετικό δείγμα, 1: Χανιά 28/11 S1, 2: Χανιά 28/11 S2, 3: Χανιά 28/11 S3, 4: Ηράκλειο 30/11 S1, 5: Ηράκλειο 30/11 S2, 6: Ηράκλειο 30/11 S3

Εντεροϊοί εντοπίζονται στην είσοδο του σταθμού Νέας Κυδωνίας στις 19/3/2012, στην είσοδο του σταθμού Χανίων στις 13/6/2012, στην είσοδο και έξοδο από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία του Ηρακλείου στις 19/6/2012, στις 24/9/2012 επίσης στη ΔΕΥΑ Ηρακλείου στο δείγμα της δευτεροβάθμιας και τέλος στη ΔΕΥΑ Χανίων στην είσοδο στις 27/9/2012.

Αντιθέτως με τους αδενοϊούς, κατά τους χειμερινούς μήνες ο εντεροϊός δεν εντοπίζεται σε κανένα δείγμα. Κυρίως ανιχνεύονται στα δείγματα του θέρους, και εντονότερα το τέλος της καλοκαιρινής περιόδου, καθώς το Σεπτέμβριο ανιχνεύονται στην είσοδο του Ηρακλείου και των Χανίων. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε καμία περίπτωση οι εντεροϊοί δεν έχουν επιβιώσει μετά την απολύμανση με χλώριο. Επίσης, ενώ στο βιολογικό καθαρισμό του δήμου Πλατανιά (Νέα Κυδωνία) ο αδενοϊός εμφανίζεται σε κάποιες περιπτώσεις και μετά τη χλωρίωση και εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα, ο εντεροϊός ανιχνεύεται σε ένα μόνο δείγμα στις 19/3 στην είσοδο του συγκεκριμένου σταθμού.

Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας εμφάνισης αδενοϊών και εντεροϊών ανά σταθμό και ανά δειγματοληψία.

Πίνακας Δ.3.1: Συνοπτικός πίνακας ανίχνευσης ιών

A/A	Ημερομηνία	Σταθμός	Δείγμα	Αδενοϊοί	Εντεροϊοί
1	06.03.2012	Χανίων	S1	-	-
			S2	-	-
			S3	-	-
2	19.03.2012	Νέας Κυδωνίας	S1	-	+
			S2	-	-
			S3	-	-
3	27.04.2012	Ηρακλείου	S1	-	-
			S2	-	-
			S3	-	-
4	08.05.2012	Χανίων	S1	-	-
			S2	-	-
			S3	-	-
5	15.05.2012	Νέας Κυδωνίας	S1	+	-
			S2	-	-
			S3	-	-
6	19.05.2012	Ηρακλείου	S1	+	-
			S2	-	-
			S3	-	-
7	13.06.2012	Χανίων	S1	-	+
			S2	-	-
			S3	-	-
8	19.06.2012	Ηρακλείου	S1	-	+
			S2	-	+
			S3	-	-
9	22.06.2012	Νέας Κυδωνίας	S1	-	-
			S2	-	-
			S3	-	-
10	24.09.2012	Ηρακλείου	S1	-	-
			S2	-	+
			S3	-	-
11	27.09.2012	Χανίων	S1	+	+
			S2	-	-
			S3	-	-
12	04.10.2012	Νέας Κυδωνίας	S1	+	-
			S2	+	-
			S3	+	-

13	26.11.2012	Νέας Κυδωνίας	S1	+	-
			S2	+	-
			S3	-	-
14	28.11.2012	Χανίων	S1	+	-
			S2	-	-
			S3	-	-
15	30.11.2012	Ηρακλείου	S1	+	-
			S2	+	-
			S3	-	-

Παρόμοια μελέτη διεξήχθη από το College of William and Mary, school of marine science και δημοσιεύτηκε το 2013. Ελήφθησαν δείγματα από τρεις διαφορετικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων της Virginia των Η.Π.Α., στην έξοδο από τη δευτεροβάθμια καθίζηση και μετά τη χλωρίωση και ελέγχθηκαν για την ύπαρξη αδενοϊών. Οι δειγματοληψίες έγιναν κατά τους μήνες Ιανουάριο, Απρίλιο, Ιούλιο και Οκτώβριο και για δύο χρόνια (2010- 2012). Σύμφωνα με τη μελέτη, ο Οκτώβριος είναι ο λιγότερο επιβαρυσμένος μήνας, καθώς μόλις μία μονάδα βρέθηκε θετική σε αδενοϊούς μόνο στη δειγματοληψία του 2011. Τον Απρίλιο 2012 σε όλες τις μονάδες εντοπίζονται αδενοϊοί, τόσο μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση, όσο και στη χλωρίωση. Τον ίδιο μήνα του 2011 δύο μονάδες ήταν θετικές, η μία μόνο στη χλωρίωση. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι στη μονάδα επεξεργασίας λυμάτων James River ήταν μεγαλύτερη η συχνότητα εμφάνισης του ιού (σε έξι από τις οκτώ δειγματοληψίες), και σε ορισμένες περιπτώσεις μόνο μετά τη χλωρίωση (Quidrot, 2013). Η ιδιαιτερότητα της μονάδας έγκειται στο ότι η εκροή είναι εκτεθειμένη στο νερό ισχυρών καταιγίδων της περιοχής. Εν αντιθέσει, στις μονάδες που εξετάστηκαν στην Κρήτη, οι αδενοϊοί εντοπίζονται κυρίως κατά τους χειμερινούς μήνες και λιγότερο την άνοιξη. Στη Virginia τον Ιανουάριο του 2012 σε καμία μονάδα δεν εντοπίζονται αδενοϊοί σε κανένα στάδιο, ενώ το 2012 σε δυο μονάδες εμφανίζονται στη χλωρίωση, που πιθανώς να συνδέεται με εξωγενείς παράγοντες και όχι απόλυτα με την επεξεργασία των λυμάτων.

Σε έρευνα που διεξήχθη το 2009 από το Ain Shams University της Αιγύπτου, εξετάστηκε η παρουσία εντεροϊών σε δείγματα μονάδας επεξεργασίας αποβλήτων του Κάιρου σε βάθος δύο ετών, από τους Shoeib et al. Δείγματα ελήφθησαν πριν και μετά τη χλωρίωση. Προηγήθηκε σύνθεση cDNA και στη συνέχεια PCR. Στη μελέτη του

Κάιρου, εντεροϊοί εντοπίστηκαν στο 26% των δειγμάτων πριν τη χλωρίωση και στο 16% μετά (Shroeib et al., 2009).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης nested- PCR της παρούσας εργασίας παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με μελέτη που διεξήχθη στο πανεπιστήμιο της Βαρκελώνης από τους Pina et.al., κατά τη διάρκεια της οποίας εξετάστηκαν 15 δείγματα από οικιακά βοθρολύματα πριν και μετά την επεξεργασία τους. Όπως και στην παρούσα μελέτη, τα δείγματα θετικά σε αδενοϊούς ήταν περισσότερα από αυτά των εντεροϊών, διαφοροποιείται όμως αισθητά το ποσοστό ανιχνευσιμότητας. Συγκεκριμένα, στη μελέτη που έγινε για τους βιολογικούς καθαρισμούς της Βόρειας Κρήτης, οι αδενοϊοί ανιχνεύονται στο 40% των δειγμάτων εισόδου και οι εντεροϊοί στο 25%, ενώ στη μελέτη στην Ισπανία τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 93% και 40%. Οι δειγματοληψίες και στην περίπτωση της Βαρκελώνης έχουν ληφθεί κατά τη διάρκεια ενός έτους. Στο πανεπιστήμιο της Βαρκελώνης εξετάστηκαν μόνο τρία δείγματα εκροής. Στη Βαρκελώνη, όπως και στην Κρήτη, σε κανένα ρεύμα εξόδου δεν ανιχνεύτηκαν εντεροϊοί. Αντιθέτως, και στις δύο μελέτες σε ορισμένα δείγματα εξόδου από τη δευτεροβάθμια καθίζηση εντοπίστηκαν αδενοϊοί. Σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο μελέτες είναι ότι στην Ισπανία οι αδενοϊοί εντοπίζονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, ενώ οι στην Κρήτη περιορίζονται κυρίως στους χειμερινούς μήνες, το φθινόπωρο και λιγότερο την άνοιξη. Οι εντεροϊοί, από την άλλη μεριά, και στις δύο περιπτώσεις εμφανίζονται την άνοιξη και στο τέλος του καλοκαιριού, αρχές φθινοπώρου.

Σε παλαιότερη έρευνα πάλι από το πανεπιστήμιο της Βαρκελώνης από τους Puig et al. (1994), σε βοθρολύματα οι αδενοϊοί εντοπίστηκαν στο 100% των δειγμάτων και οι εντεροϊοί στο 75%. Στη μελέτη των Puig et al. Ο δείκτης FC στα ακατέργαστα λύματα κυμαινόταν από 10^5 έως 10^6 , ενώ στα δείγματα που εξετάστηκαν στην Κρήτη ο δείκτης κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών ήταν της τάξης του 10^6 σταθερά.

Μελέτες, συμπεριλαμβανομένων και των προαναφερθέντων, με αντικείμενο την ανίχνευση ιών σε υδατικά δείγματα στις οποίες εξετάζεται η ανίχνευση ιών με τη μέθοδο της PCR, αλλά και με το πείραμα των βακτηριοφάγων δεν έχουν δώσει κάποια καλή συσχέτιση ανάμεσα στις σχηματιζόμενες πλάκες των τρυβλίων των βακτηριοφάγων και των ιών. Βακτηριοφάγοι που υποδηλώνουν μόλυνση από ιούς ανιχνεύονται σε όλα τα ακατέργαστα λύματα και σε ορισμένες περιπτώσεις και μετά την επεξεργασία. Η παρουσία των βακτηριοφάγων, ωστόσο, δε δίνει περαιτέρω

στοιχεία για τον ιό από τον οποίο προήλθε η μόλυνση. Για την ακριβή συσχέτιση βακτηριοφάγων και ιών που ανιχνεύονται στην PCR απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθούν τεχνικά λάθη, τα οποία τυχόν θα επηρέαζαν τα αποτελέσματα. Οι αδενοϊοί έχουν πιο σταθερή δομή από τους εντεροϊούς, γι' αυτό και εντοπίζονται και σε επεξεργασμένα απόβλητα. Η παρουσία των αδενοϊών σε ένα δείγμα μπορεί να επιβεβαιωθεί και από απλή PCR. Αντίθετα, οι εντεροϊοί δεν είναι ανιχνεύσιμοι αν δεν πραγματοποιηθεί nested PCR. Η PCR και ειδικά η n-PCR είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ανίχνευση ιών και αξιόπιστη. Σημαντικός παράγοντας του χαμηλού επιπέδου ανίχνευσης εντεροϊών είναι ο υποχρεωτικός εμβολιασμός του ανθρώπινου πληθυσμού σε νεαρή ηλικία για πολιομυελίτιδα.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την παραπάνω επεξεργασία, φαίνεται οι μονάδες βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων να λειτουργούν αποτελεσματικά, ενώ σημαντικό είναι ότι οι σταθμοί Χανίων και Πλατανιά, για τους οποίους εξετάστηκε και η απόρριψη, δεν επηρεάζουν αρνητικά το θαλάσσιο αποδέκτη τους. Επίσης, ο δείκτης *Clostridium perfringens* που ανιχνεύθηκε στο θαλάσσιο αποδέκτη κατά τους μήνες Σεπτέμβριο και Νοέμβριο, φαίνεται να μη σχετίζεται με την απορροή των βιολογικών σταθμών, καθώς στις μετρήσεις των αντίστοιχων περιόδων στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του σταθμού βιολογικού καθαρισμού δεν εντοπίζεται.

Η φόρτιση σε μικροοργανισμούς με βάση τους μικροβιολογικούς δείκτες είναι αναμενόμενη και συγκεκριμένα της τάξης του 10^6 . Οι διακυμάνσεις στη φόρτιση δεν είναι σημαντικές (δεν αλλάζει η τάξη μεγέθους στη φόρτιση σε κανέναν από τους βιολογικούς καθαρισμούς στην είσοδο), γεγονός που ευνοεί την ομαλή λειτουργία των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων. Σε περίπτωση μεγάλων διακυμάνσεων ενισχύεται η πιθανότητα εμφάνισης βιοφίλμ. Στη μονάδα του Ηρακλείου παρατηρείται η μικρότερη ποσοστιαία μείωση μικροβιολογικής φόρτισης ολικών κολοβακτηριδίων μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση με μέση απομάκρυνση περίπου στο 81%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα Χανιά και τον Πλατανιά είναι 94% και 96%. Η χλωρίωση και στους τρεις σταθμούς εμφανίζεται αποτελεσματική με μείωση του αρχικού φορτίου πάνω από 99,8%.

Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στην απορροή του βιολογικού καθαρισμού Χανίων, για τους μήνες Μάρτιο, Μάιο, Ιούνιο και Σεπτέμβριο ο δείκτης TC ήταν μικρότερος από 5 CFU/100mL, που καθιστούν το νερό κατάλληλο για κολύμβηση. Ο δείκτης TC κυμάνθηκε στο ίδιο επίπεδο το Σεπτέμβριο 2012 και Φεβρουάριο 2013, όπου οι αντίστοιχες μετρήσεις είναι 9 και 12 CFU/100mL.

Πίνακας Ε.1: Τυπικά χαρακτηριστικά μη επεξεργασμένων λυμάτων (Τσώνης, 2004)

Χαρακτηριστικό	Μονάδες	Συγκέντρωση σε λύματα		
		ασθενή	μέσα	ισχυρά
Στερεά				
• Ολικά(ΟΣ) [Total Solids, TS]	mg/L	350	720	1200
• Διαλυτά (ΔΣ) [Dissolved Solids, DS]	mg/L	250	500	850
✓ Μη Πτητικά [Fixed]	mg/L	145	300	525
✓ Πτητικά (Volatile)	mg/L	105	200	325
• Αιωρούμενα Στερεά (ΑΣ)	mg/L	100	220	350
✓ Μη Πτητικά [Fixed]	mg/L	20	55	75
✓ Πτητικά [Volatile]	mg/L	80	165	275
Καθιζάνοντα στερεά [Settleable Solids]	mL/L	5	10	20
Βιοχημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο, 5 ημερών σε 20°C (ΒΑΟ ₅)	mg/L	110	220	400
Ολικός Οργανικός Άνθρακας (ΟΟΑ)	mg/L	80	160	290
Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (ΧΑΟ)	mg/L	250	500	1000
Ολικό Άζωτο (ΟΑ), σαν Ν	mg/L	20	40	85
✓ Οργανικό	mg/L	8	15	35
✓ Ελεύθερο Αμμωνιακό	mg/L	12	25	50
✓ Νιτρώδες	mg/L	0	0	0
✓ Νιτρικό	mg/L	0	0	0
Ολικός Φώσφορος (ΤΡ), σαν Ρ	mg/L	4	8	15
✓ Οργανικός	mg/L	1	3	5
✓ Ανόργανος	mg/L	3	5	10
Χλωριόντα (Cl ⁻)	mg/L	30	50	100
Θειικά (SO ₄ ²⁻)	mg/L	20	30	50
Αλκαλικότητα (σαν CaCO ₃)	mg/L	50	100	200
Λίπη και Έλαια	mg/L	50	100	150
Ολικά Κολοβακτηρίδια	No/100mL	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁸
Πτητικά Οργανικά Συστατικά (VOC)	μg/L	<100	100-400	>400

Παρόμοια εικόνα αποτελεσμάτων εμφανίστηκε στην απόρριψη του Πλατανιά, όπου μόνο κατά το Μάρτιο ο δείκτης TC είναι 61 CFU/100mL δείγματος, ενώ όλες οι άλλες μετρήσεις είναι <50 CFU/100mL. Το γεγονός ότι ειδικά ο αποδέκτης της Νέας Κυδωνίας δεν επηρεάζεται αρνητικά από την απόρριψη του βιολογικού καθαρισμού έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς η περιοχή είναι τουριστική και η ακτογραμμή Πλατανιά- Γερανίου αποτελεί μία δημοφιλή κολυμβητική περιοχή του νομού Χανίων. Η εκροή των βιολογικών Χανίων και Νέας Κυδωνίας κρίνεται κατάλληλη για άρδευση και βιομηχανική χρήση, καθώς πληροί τις προϋποθέσεις του ΥΠΕΚΑ,

σύμφωνα με τις οποίες το 80% και το 95% των δειγμάτων πρέπει να περιέχουν λιγότερο από 5 και 50 CFU *E. coli*/ 100mL δείγματος, αντίστοιχα.

Η εκροή της μονάδας του Ηρακλείου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περιορισμένη άρδευση, σε περιοχές μη προσβάσιμες στο κοινό και καλλιέργειες ζωοτροφών, καθώς και σαν νερό ψύξης μίας χρήσης για βιομηχανική ψύξη.

Ο δείκτης FC δε φαίνεται να συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα των βακτηριοφάγων. Στα δείγματα της εκροής του σταθμού Χανίων σε κανένα δείγμα δε μετρώνται βακτηριοφάγοι, ενώ ο δείκτης FC στις αντίστοιχες δειγματοληψίες είναι από 0 έως 5 CFU/100mL. Το Σεπτέμβριο λαμβάνεται η μεγαλύτερη τιμή για το δείκτη FC και είναι $5,5 \times 10^6$ CFU/100mL και, αντιστοίχως οι βακτηριοφάγοι είναι $3,11 \times 10^6$ CFU/100mL, δίνοντας επίσης τη μέγιστη τιμή τους. Στα δείγματα της δευτεροβάθμιας καθίζησης υπάρχει μεγαλύτερη ταύτιση των αποτελεσμάτων, καθώς οι μέγιστες τιμές για τους βακτηριοφάγους και για το δείκτη FC ταυτίζονται και γενικά οι βακτηριοφάγοι ακολουθούν την τάση του FC. Στη χλωρίωση του ίδιου σταθμού δεν εμφανίζεται καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων FC και βακτηριοφάγων.

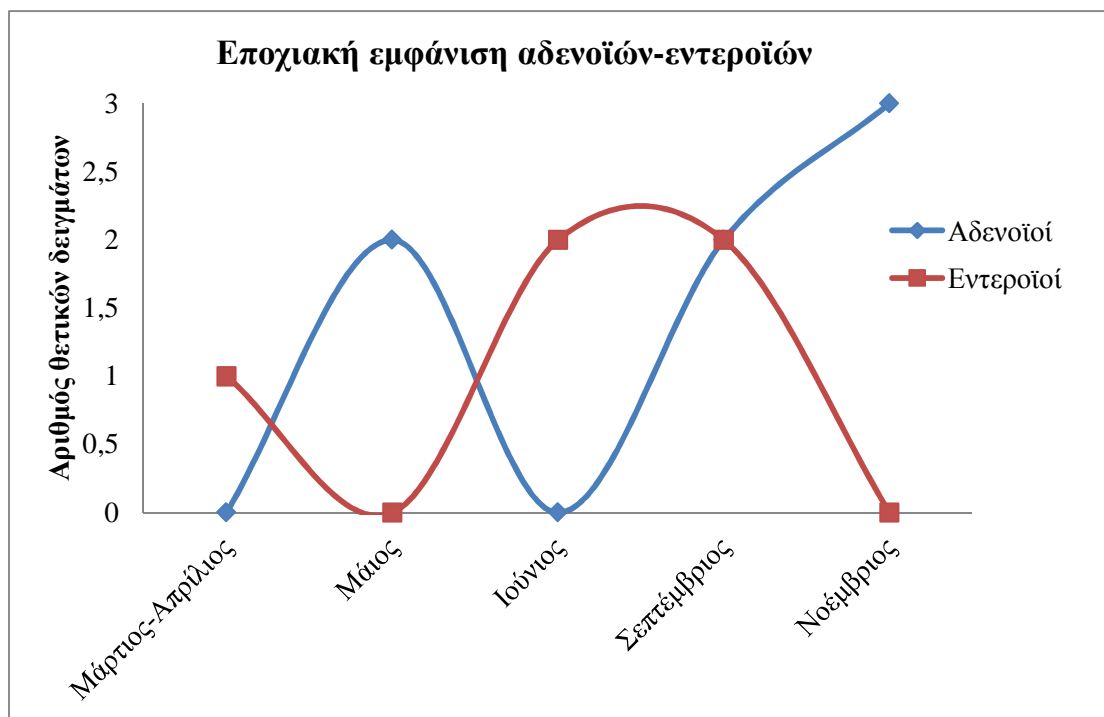
Για το σταθμό της ΔΕΥΑΒΑ στη Νέα Κυδωνία, στη χλωρίωση και εκροή δεν εμφανίζεται συνάφεια των αποτελεσμάτων για τους δύο δείκτες (FC & βακτηριοφάγοι). Στην είσοδο του σταθμού η μέγιστη τιμή του δείκτη FC παρατηρείται τους μήνες Νοέμβριο και Φεβρουάριο, ενώ η αντίστοιχη των βακτηριοφάγων κατά τους μήνες Ιούνιο και Σεπτέμβριο. Μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση υπάρχει μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων, καθώς οι μέγιστες τιμές και στις δύο περιπτώσεις λαμβάνονται κατά το μήνα Ιούνιο, και τα αποτελέσματα των βακτηριοφάγων ακολουθούν απόλυτα την τάση του δείκτη FC.

Στην περίπτωση του σταθμού Ηρακλείου οι μετρήσεις παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μεταξύ τους αποκλίσεις και δε φαίνεται να υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση των δύο. Συμπερασματικά, οι βακτηριοφάγοι φαίνεται να ακολουθούν την τάση του δείκτη FC, όχι όμως σε μικρές (<100 CFU/100mL) και πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (>10⁵). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποιοτική ανάλυση, δε φαίνεται όμως, τουλάχιστον στην περίπτωση των επεξεργασμένων λυμάτων να είναι καλοί δείκτες για ποσοτική ανάλυση σε όλα τα στάδια της διεργασίας.

Από τις μειωμένες συγκεντρώσεις των βακτηριοφάγων στη δευτεροβάθμια καθίζηση και τη χλωρίωση σε σχέση με την είσοδο, γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει αισθητή μείωση των ιών κατά την επεξεργασία των λυμάτων.

Όσον αφορά στην ανάλυση PCR που έγινε για αδενοϊούς και εντεροϊούς, οι αδενοϊοί εμφανίζονται πιο ανθεκτικοί σε σχέση με τους εντεροϊούς, καθώς οι τελευταίοι ανιχνεύθηκαν στην είσοδο των βιολογικών σταθμών, ελαττώθηκαν σημαντικά στο σύνολο των δειγμάτων μετά τη δευτεροβάθμια και δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα που ελήφθη μετά τη χλωρίωση (σχήμα E.1). Αντιθέτως, οι αδενοϊοί και ειδικά κατά τους χειμερινούς μήνες που είναι σε έξαρση, φαίνεται να ανθίστανται κατά τη χλωρίωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη σταθερότητα της δομής των αδενοϊών, καθώς είναι ιοί με γενετικό υλικό DNA και όχι RNA. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι η PCR είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος και ανιχνεύει ακόμη και ελάχιστη ποσότητα γενετικού υλικού.

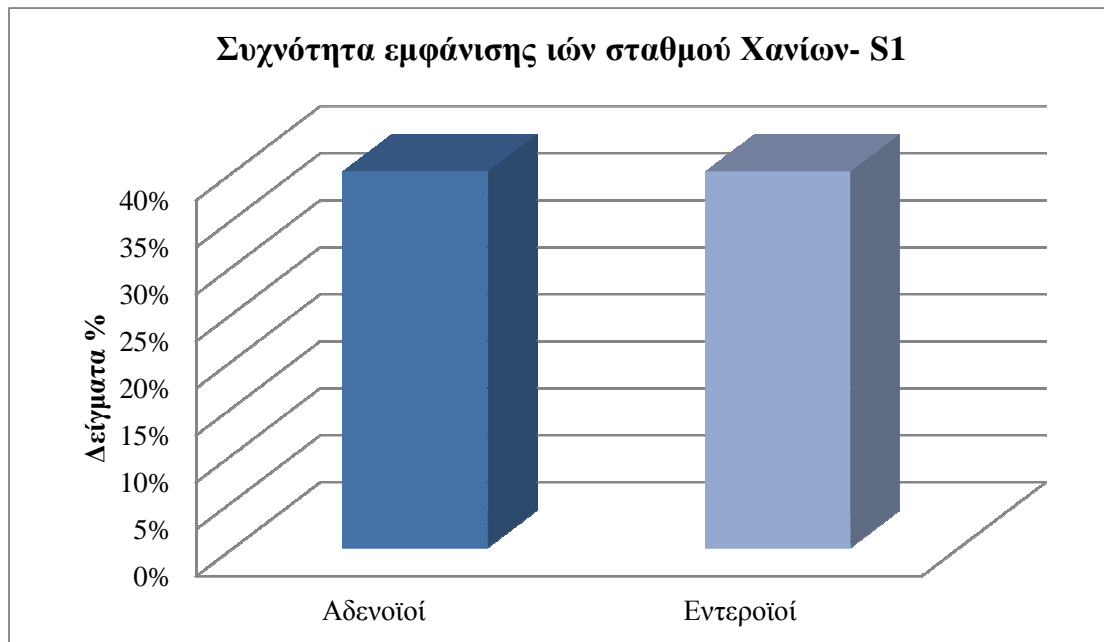
Οι αδενοϊοί ενοχοποιούνται για την εκδήλωση πολλών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της φαρυγγίτιδας, φαρυγγολαρυγγίτιδα, επιπεφυκίτιδα, γαστρεντερίτιδα, πνευμονία, διάφορες παιδικές ασθένειες και επιδημίες που εκδηλώνονται συνήθως τους χειμερινούς μήνες (www.who.int).



Σχήμα E.1: Εποχιακή εμφάνιση ιών

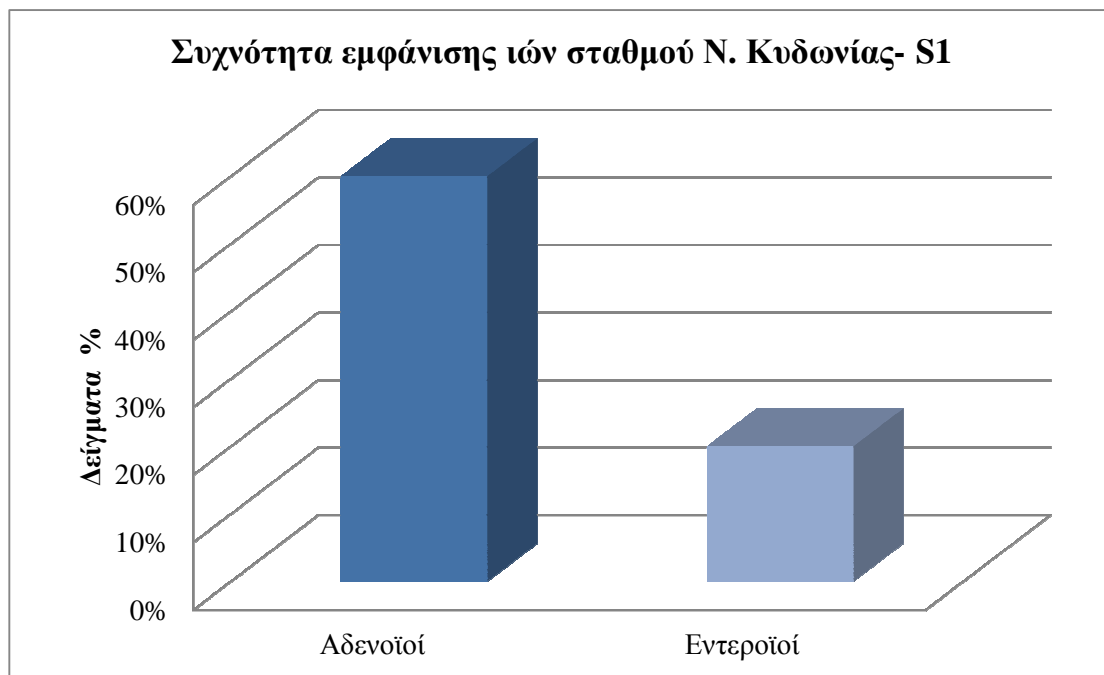
Γενικότερα, από τα αποτελέσματα της PCR ανάλυσης των δειγμάτων φαίνεται ότι οι σταθμοί Ηρακλείου και Χανίων παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ στην εμφάνιση

αδενοϊών και εντεροϊών, με πιο αποτελεσματική, όμως, τη χλωρίωση του σταθμού των Χανίων.

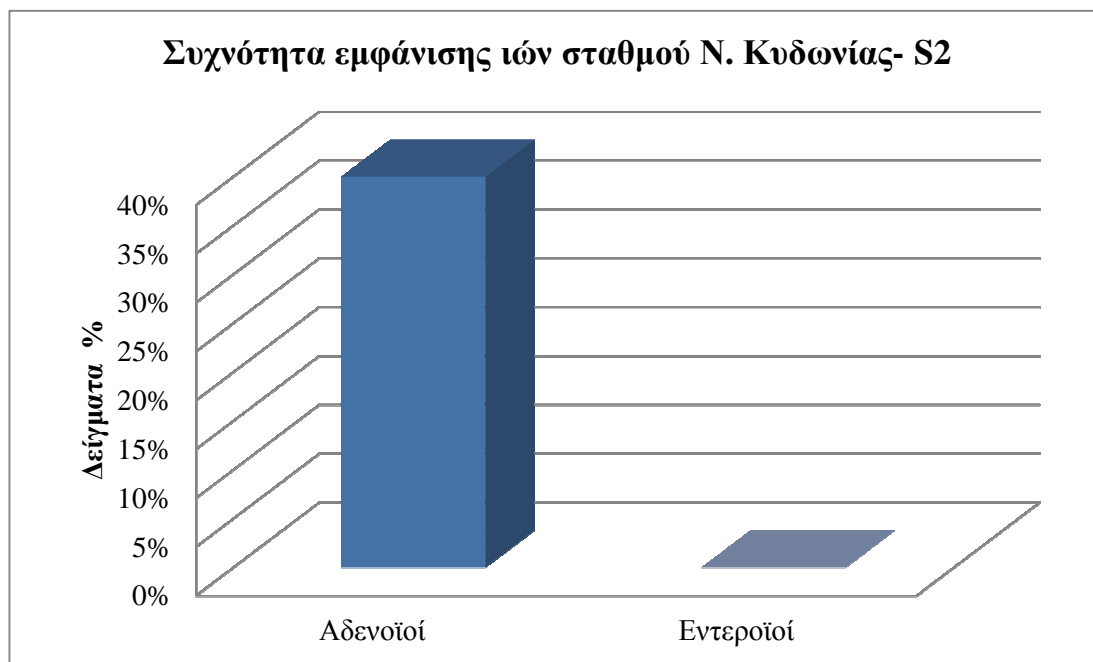


Σχήμα Ε.2: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Χανίων στην είσοδο

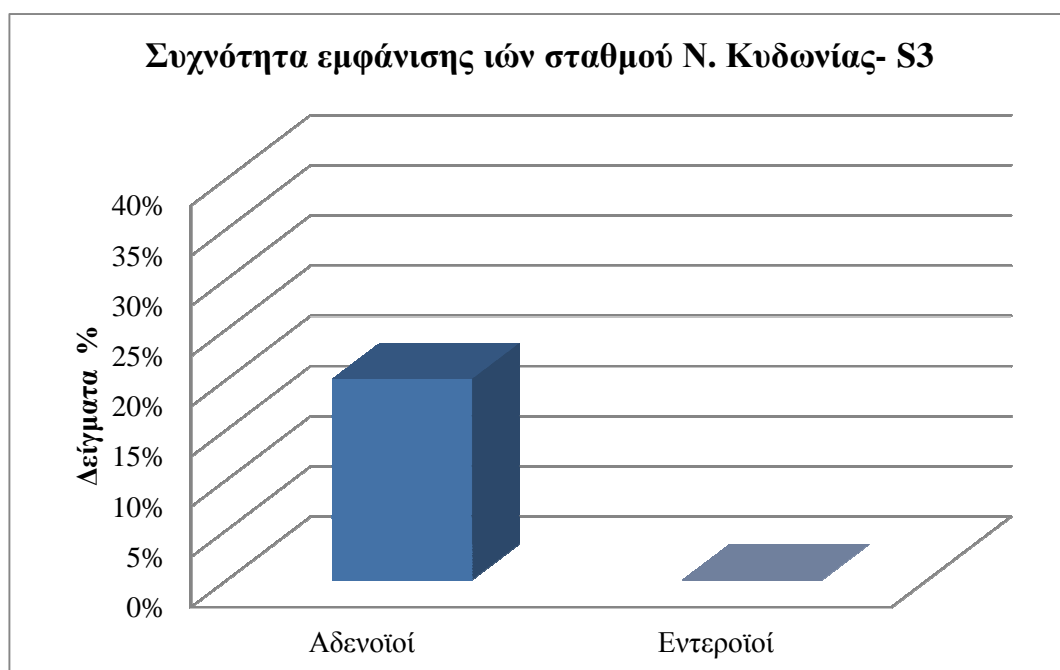
Τόσο μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση όσο και μετά τη χλωρίωση σε κανένα δείγμα από το σταθμό Χανίων δεν εντοπίζονται ιοί.



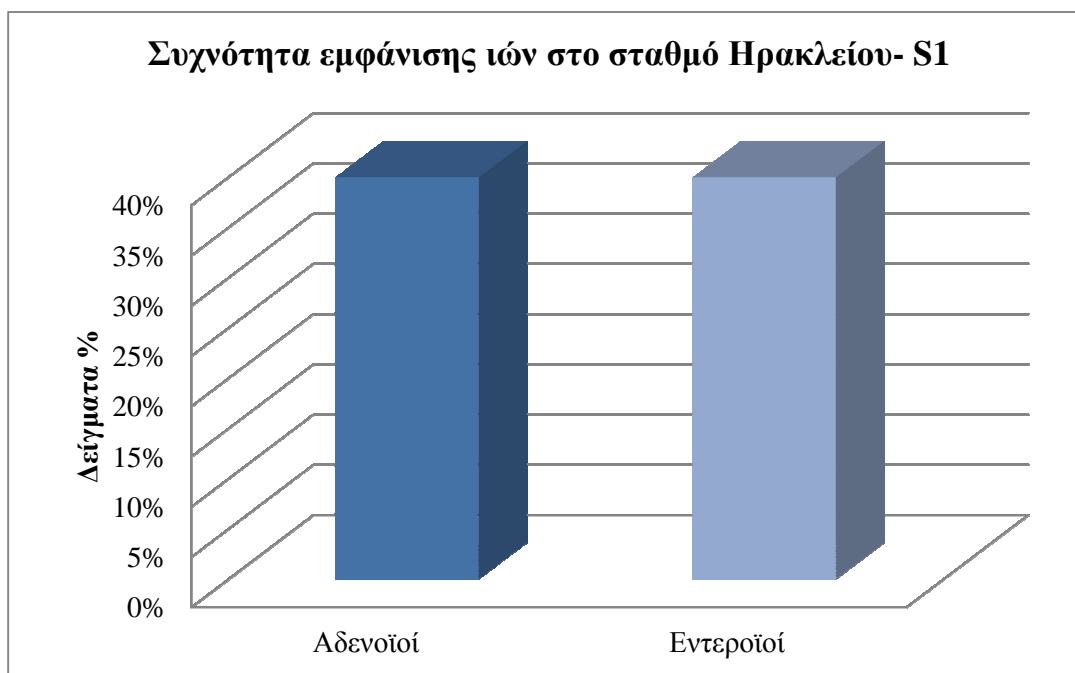
Σχήμα Ε.3: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας στην είσοδο



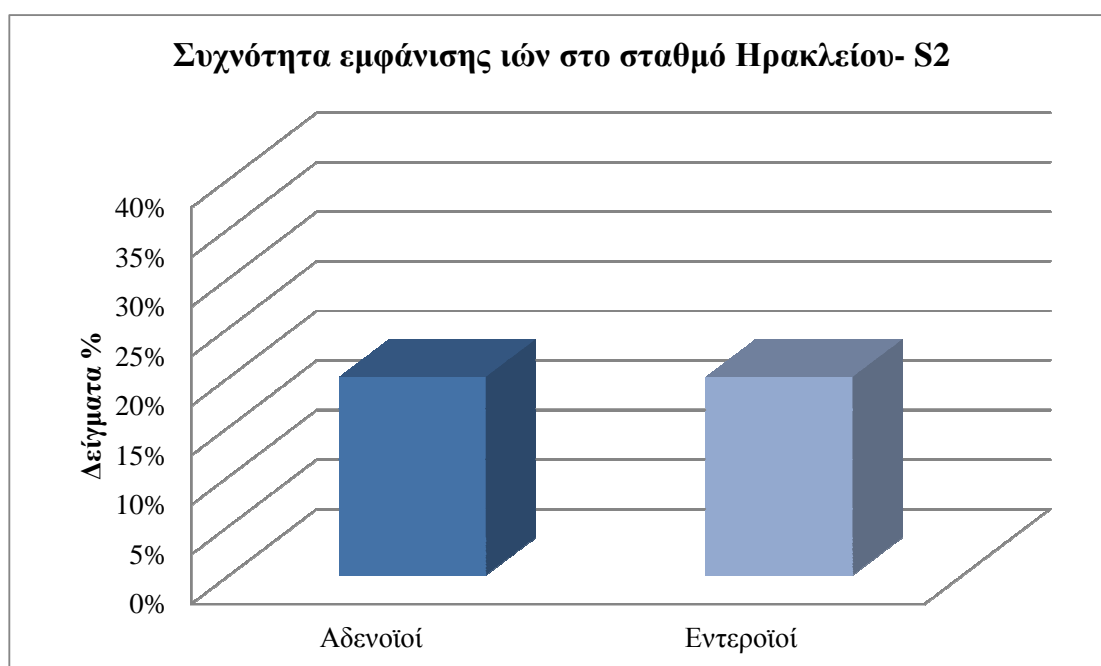
Σχήμα Ε.4: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία



Σχήμα Ε.5: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Νέας Κυδωνίας μετά τη χλωρίωση

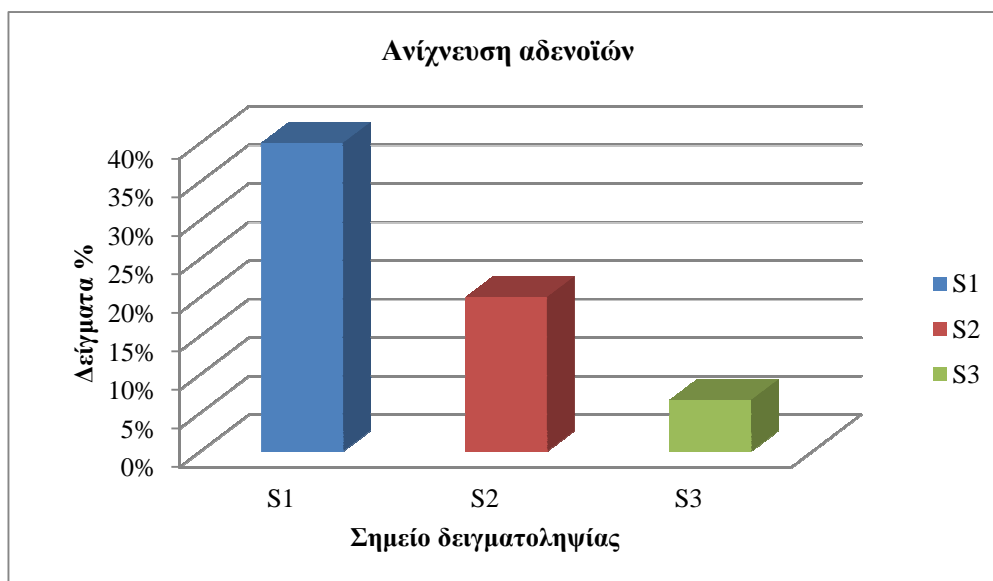


Σχήμα E.6: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Ηρακλείου στην είσοδο

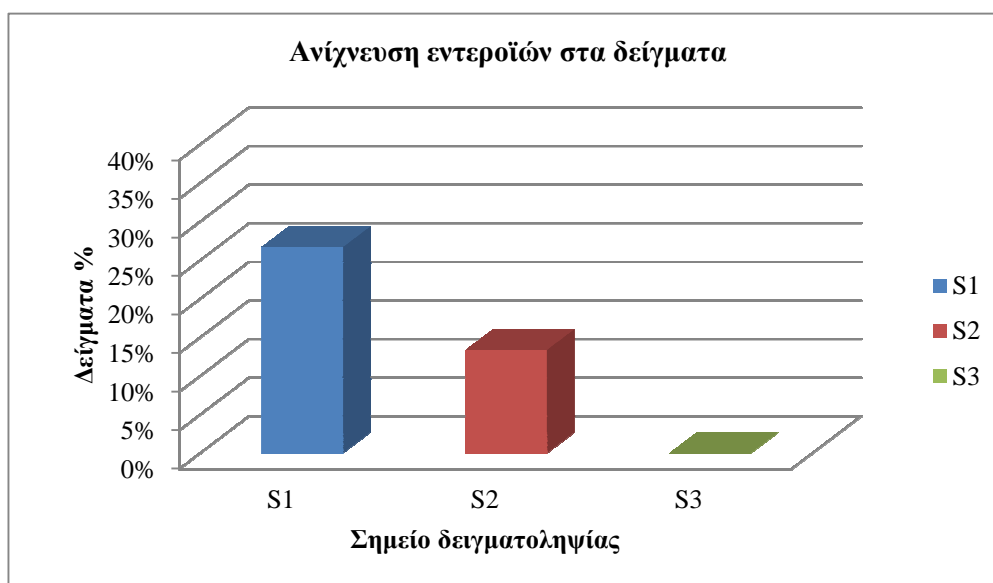


Σχήμα E.7: Συχνότητα εμφάνισης ιών στο σταθμό Ηρακλείου μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση

Σε καμία δειγματοληψία του σταθμού Ηρακλείου δεν εντοπίστηκαν ιοί μετά τη χλωρίωση.



Σχήμα E.8.: Ανίχνευση αδενοϊών στα δείγματα



Σχήμα E.9.: Ανίχνευση εντεροϊών στα δείγματα

Η ανίχνευση αδενοϊών ακόμα και μετά τη χλωρίωση αναδεικνύει την ανθεκτικότητα που τους διακρίνει και την ικανότητα παραμονής στο υδάτινο περιβάλλον υπό αντίξοες συνθήκες. Αντίθετα, οι εντεροϊοί φαίνεται να αδρανοποιούνται στις υπάρχουσες συνθήκες χλωρίωσης στους σταθμούς βιολογικού καθαρισμού που ελέγχθηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης καθίσταται αναγκαία ο συστηματικός έλεγχος και η παρακολούθηση όχι μόνο των κλασικών βακτηριακών δεικτών αλλά και των ιών εντερικής προέλευσης, δεδομένης της επικινδυνότητας που έχουν για τη δημόσια υγεία και της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν στις συμβατικές μεθόδους απολύμανσης που εφαρμόζονται στους σταθμούς βιολογικού καθαρισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Baggi F., Peduzzi R. (2000). Genotyping of Rotaviruses in environmental water and stool samples in Southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene. *J Clin Microbiol.* 38(10):3681-3685.
2. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 28(3):495-503.
3. Dewedar A., Ismail A., Khafagi I., Shatoury S. EL., Talaat M. (2006). Efficiency of the biological waste water treatment system in pollution control and wastewater management. *Int J Agri Biol.* 8(3):313-319.
4. ISO (1996) Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages 10705-1-1996, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
5. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (2007). *Fields' virology*. Publisher: Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, ©2007, p. 2395.
6. Melemenis M., Stamatakis D., Xekoukoulotakis N.P., Mantzavinos D., Kalogearakis N. (2009). Disinfection of Municipal Wastewater by TiO₂ photocatalysis with UV-A, visible and solar irradiation and BDD electrolysis. *Global Nest J.* 11:357-363.
7. Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology, a trip of 50 years. *Ann Rev Microbiol.* 49:461-487.
8. Parker V. Louise and Martel C. James. October 2002. Long-term survival of enteric microorganisms in frozen wastewater. Technical Report ERDC/CRREL TR-02-16. US Army Corps of Engineers.
9. Pina S., Puig M., Lucena F., Jofre J., Girones R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 64(9): 3376–3382.
10. Puig M., Jofre J., Lucena F., Allard A., Wadell G., Girones R. (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 60(8): 2963–2970.

11. Quidort W.L. & College of William and Mary. School of Marine Science (2013). Detection and infectivity of human adenovirus in wastewater effluent, biosolids and shellfish, and its persistence in estuarine water.
12. Shoeib A.R., Abd El Maksoud S.N., Barakat A.B., Shoman S.A., El-Esnawy N.A. (2009). Comparative assessment of mammalian reoviruses versus enteroviruses as indicator for viral water pollution. J Egypt Public Health Assoc. 84(1-2):181-96.
13. Toze, S., Hanna, J., Smith, T., Edmonds, L., McCrow, A. (2004). Determination of water quality improvements due to the artificial recharge of treated effluent. Wastewater Reuse and Groundwater Quality, IAHS Publication Series No. 285, pp. 53–60.
14. Tzanakakis V.E., Paranychianakis N.V., Kyritsis S. and Angelakis A.N. (2003). Wastewater treatment and biomass production by slow rate systems using different plant species. Water Recycl Med Reg 3(4):185-192.
15. Melemei M., Stamatakis D., Xekoukoulotakis N.P., Mantzavinos D., Kalogerakis N. (2008), Disinfection of municipal wastewater by TiO_2 photocatalysis with UV-A, visible and solar irradiation and BDD electrolysis, Global NEST Journal, 11(3), pp 357-363
16. Βενιέρη Δ. (2011). Παρουσιάσεις μεταπτυχιακού μαθήματος: Περιβάλλον & Δημόσια Υγεία. Πολυτεχνείο Κρήτης, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών (Β' εξάμηνο σπουδών ακ. έτους 2011 -12).
17. Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, Τεύχος Δεύτερο, Αρ. φύλλου 354, 8 Μαρτίου 2011
18. Νταράκας Ε. (2014), Σημειώσεις «Διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων» για το μάθημα Τεχνική Περιβάλλοντος (Π.Σ. ΑΠΘ)
19. Π. Τσώνης (2004). Επεξεργασία λυμάτων. Εκδόσεις Παπασωτηρίου.
20. Υπουργική Απόφαση, Αριθ. Ειβ 145116/2011, Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις
21. Υπουργική Απόφαση, Αριθ. Ειβ 221/65, Περί διαθέσεως λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων
22. Χατζηιωάννου Θ.Π., Κούππαρη Μ.Α. (2002). Ενόργανη Ανάλυση. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών.

1. <http://viralzone.expasy.org>
2. <http://www.geneticliteracyproject.org/2014/09/08/what-should-we-make-of-mystery-respiratory-virus-sweeping-through-the-midwest-enterovirus-is-not-a-mystery/>
3. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Adenovirus-based_Gene_Therapy:_a_Promising_Novel_Cancer_Therapy
4. <http://www.microbiologybytes.com/virology/Adenoviruses.html>
5. <http://emedicine.medscape.com/article/211738-overview>
6. <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/B/bacteriophage.html>
7. <http://ypeka.plexscape.com/>
8. <http://www.deyax.org.gr>
9. <http://www.scribd.com/doc/24748679/PCR-primers>
10. http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/recreadischap6.pdf